(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 875544 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 875544

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
A61K 31/70
A61K 31/505

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **16.12.1987**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **16.12.1987**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **18.06.1988**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

17.12.1986 US 942666

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Yale University,** 333 Cedar Street, P.O. Box 3333 New Haven, Connecticut, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Lin, Tai-Shun,** United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **Prusoff, William H.,** United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

3'-deoksitymidin-2'-eenin (3'-deoksi-2',3'-didehydrotymidiini) käyttö retroviruksilla infektoituneiden potilaiden hoitoon.

Användning av 3'-deoxitymidin-2'-en (3'-deoxi-2',3'-didehydrotymidin) för behandling av patienter infekterade med retrovirus.

3'-deoksitymidin-2'-eenin (3'-deoksi-2', 3'-didehydrotymidiini) käyttö retroviruksilla infektoituneiden potilaiden hoitoon

Esillä oleva keksintö koskee 3'-deoksitymidin-2'-eenin (3'-deoksi-2', 3'-didehydrotymidiini) käyttöä retroviruksilla infektoituneiden potilaiden hoitoon.

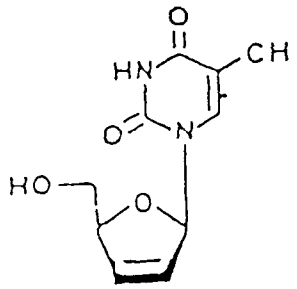
Hankitun immuunikatosyndrooman (AIDS) tunnustetaan yleisesti olevan seuraamusta infektiosta retroviruksella, jota nimitetään eri tavoin: ihmisen T-lymfotrooppinen virus tyyppiä III (HTLV-III), lymfadenopatiaan liittyvä virus (LAV), AIDS:iin liittyvä retrovirus (ARV) tai ihmisen immuunikatovirus (HIV). Joukolla yhdisteitä on osoitettu olevan antiviraalista aktiivisuutta tätä virusta vastaan, joihin yhdisteisiin lukeutuvat HPA-23 (D. Dormont, B. Spire, F. Barre-Sinoussi, L. Montagnier ja J. C. Chermann, Ann. Inst. Pasteur/Virol., 75, 136E, (1985) ja W. Rosenbaum, D. Dormont, B. Spire, E. Vilmer, M. Gentilini, C. Griscelli, L. Montagnier, F. Barre-Sinoussi ja J. C. Chermann, Lancet i, 450, (1985), interferonit (D. D. Ho, K. L. Hartshorn, T. R. Rota, C. A. Andrews, J. C. Kaplan, R. T. Schoolkey ja M. S. Hirsch, Lancet i. 602, (1985), ribaviriini (J. B. McCormick, J. P. Getchell, S. W. Mitchell ja D. R. Hicks, Lancet ii, 1367, (1984)), fosfonoformaatti (E. G. Sandstrom, J. C. Kaplan, R. E. Byington ja M. S. Hirsch, Lancet i, 1480 (1984) ja P. S. Sarin, Y. Taguchi, D. Sun, A. Thornton, R. C. Gallo ja B. Oberg, Biochem. Pharmac., 34, 4075, (1985)), ansamysiini (R. Anand, J. L. Moore, A. Srinivason, V. Kalyanaraman, D. Francis, P. Feorino ja J. Curran, Abstracts of the International Conference on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS), April 14-17, Atlanta, GA, sivu 72, (1985), suramiini (H. Mitsuya, M. Popovic, R. Yarchoan, S. Matsushita, R. C. Gallo ja S. Broder, Science, 266, 172, (1984); H. Mitsuya, S. Matsushita, M. E. Harper ja S. Broder, Cancer Res., 45, 4583s, (1985) ja E. DeClercq, Cancer Lett.,

8, 9, (1979)), imutioli (A. Pompidou, D. Zagury, R. C. Gallo, D. Sun, A. Thornton ja P. S. Sarin, Lancet, ii, 1423, (1985)), penisillamiini (P. Chandra ja P. S. Sarin, Drug Res., 36, 184, (1986)), rifabutiini (R. Anand, J. Moore, P. Feorino, J. Curran ja A. Srinivasan, Lancet, i, 97, (1986)), AL-721 (P. S. Sarin, R. C. Gallo, D. I. Scheer, F. Crews ja A. S. Lippa, New Engl. J. Med., 313, 1289, (1985)), 3′-atsido-3′-deoksitymidiini (W. Ostertag, T. Cole, T. Crozier, G. Gaedicke, J. Kind, N. Kluge, J. C. Krieg, G. Roselser, G. Steinheider, B. J. Wimann ja S. K. Dube, Proceedings of the 4th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund, Tokyo, 1973, Differentiation and Control of Malignancy of Tumor Cells, Eds. W. Nakahara, T. Ono, T. Sugimura ja H. Sugano, sivu 485, University of Tokyo Press, Tokyo, (1984); W. Ostertag, G. Roseler, C. J. Kreig, T. Cole, T. Crozier, G. Gaedicke, G. Steinheider, N. Kluge ja S. K. Dube, Proc. Natn. Acad. Sci. USA, 71 4980, (1974); S. L. Dube, G. Gaedicke, N. Kluge, B. J. Weimann, H. Melderis, G. Steinheider, T. Crozier, H. Beckmann ja W. Ostertag, Proceedings of the 4th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund, Tokyo, 1973, Differentiation and Control of Malignancy of Tumor Cells, Eds. W. Nakahara, T. Ono, T. Sugimura ja H. Sugano, sivu 99, University of Tokyo Press, Tokyo, (1974); S. K. Dube, I. B. Pragnell, N. Kluge, G. Gaedicke, G. Steinheider ja W. Ostertag, Proc. Natn. Acad. Sci. USA, 72 1863, (1975) ja H. Mitsuya, K. J. Weinhold, P. A. Furman, M. H. St. Clair, S. Lehrman Nusinoff, R. C. Gallo, D. Bolognesi, D. W. Barry ja S. Broder, Proc. Natn. Acad. Sci. USA, 82, 7096, (1985)) ja äskettäin erilaiset 2′, 3′-dideoksinukleosidit (H. Mitsuya ja S. Broder, Proc. Natn. Acad. Sci. USA, 83, 1911, (1986)), joista 2′,3′-dideoksisytidiini (ddCyd) on tehokkain. Kokooma-artikkeli näistä ja muista yhdisteistä, joiden aktiivisuutta HIV:iä vastaan arvioidaan, kuin myös pohdintaa AIDSongelmasta yleensä, on esitetty (E. DeClercq, J. Med. Chem., 29, 1561, (1986).

Aikaisemmin on havaittu, että 2′,3′-dideoksisytidin-2′-eeni (2′,3′-dideoksi-2′,3′-didehydrosytidiini; D4C), 2′,3′-dideoksisytidiinin (ddCyd) johdannainen, on antiviraalisesti aktiivista HIV:iä vastaan (Lin et al., Biochem. Pharmacol., painossa). Tästä syntyi virike syntetisoida 3′-deoksitymidin-2′-eeniä (3′-deoksi-2′,3′-didehydrotymidiini), vaikkakin Mitsuya ja Broder, edellä, totesivat 2′,3′-dideoksitymidiinin (3′-deoksitymidiini) olevan hyvin heikko HTLV-III/LAV:n inhibiittori. Havainto 3′-deoksitymidin-2′-eenin tehokkaasta antiviraalisesta aktiivisuudesta oli sen tähden eenin tehokkaasta antiviraalisesta aktiivisuudesta oli sen tähden odottamatonta perustuen em. raporttiin.

Esillä oleva keksintö kohdistetaan retroviruksella infektoituneen lämminverisen eläimen, mukaanlukien ihmiset, hoitamiseen, käsittäen sen, että annetaan lämminveriselle eläimelle, esim. ihmispotilaalle, anti-retroviraalinen tehokas määrä 3′-deoksitymidin-2′-eeniä (3′-deoksi-2′,3′-didehydrotymidiini), joko sellaisenaan tai sekoitettuna laimentimen kanssa tai lääkkeen muodossa.

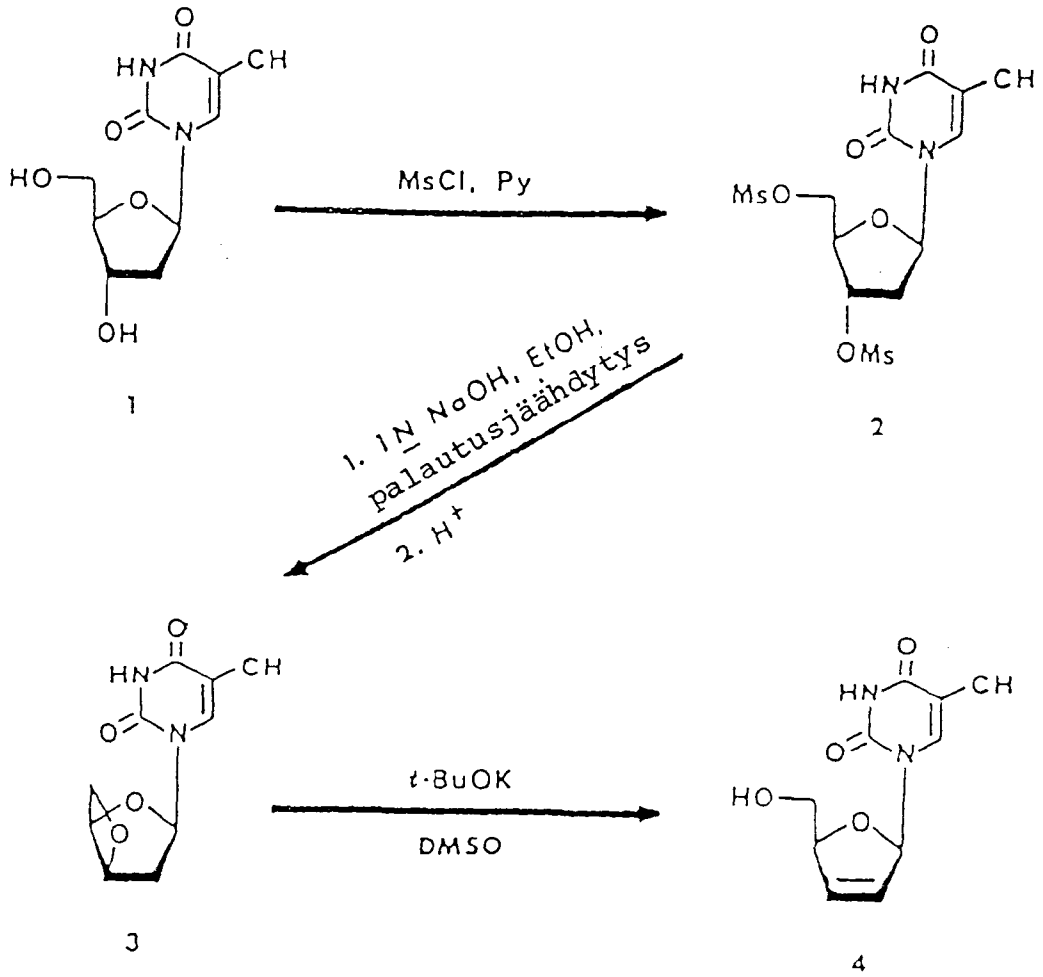
3′-deoksitymidin-2′-eenin (3′-deoksi-2′,3′-didehydrotymidiinin; D4T) rakenne on seuraava:



3′-deoksitymidin-2′-eeni (3′-deoksi-2′,3′-didehydrotymidiini) on antiviraalisesti aktiivinen retroviruksia vastaan, esim., hiiren leukemiavirus ja ihmisen immuunikatovirus, so., HIV; HTLV III/LAV-virus (AIDS-virus).

Retrovirukset ovat RNA-viruksia, joiden genomi sisältää suurimolekyylipainoisen yksijuosteisen RNA:n kopioita. Virioni sisältää käänteistranskriptaasia. Ei-rajoittaviin esimerkkeihin retroviruksista kuuluvat eläinten leukemia- ja sarkoomavirukset, kädellisten huokoiset virukset ja eräät hitaat virukset, esim. lampaan visna ja maedi.

Esillä olevan keksinnön mukaisen aktiivisen yhdisteen synteesiä kuvataan seuraavassa reatiokaaviossa:



1 2 3 4

3'-deoksitymidin-2'-eeniä (3'-deoksi-2',3'-didehydrotymidiini) (4) voidaan syntetisoida pohjimmiltaan vähäisin modifikaatioin J. P. Horwitz'in, J. Chua'n, M. A. DaRooge'n, M. Noel'in ja I. L. Klundt'in menetelmän mukaisesti J. Org.

Chem., 31, 205, (1966). Viitaten edelliseen reaktiokaavioon, tymidiinin (1) käsitteleminen metaanisulfonyylikloridin kanssa pyridiinissä 0 °C:ssa tuottaa vastaavaa disulfonaattia 2. Yhdisteen 2 keittäminen palauttaen 1 N NaOH-liuoksen kanssa etanolissa tuottaa 3',5'-syklistä eetteriä 3. Yhdisteen 3 käsitteleminen kalium-t-butoksidin kanssa kuivassa DMSO:ssa tuottaa haluttua 2',3'-tyydyttämätöntä johdannaista 4.

Esillä oleva keksintö antaa käyttöön farmaseuttisen koostumuksen, joka sisältää aktiivisena aineosana 3'-deoksitymidin-2'-eeniä (3'-deoksi-2',3'-didehydrotymidiini) sekoitettuna kiinteän, nestemäisen tai nestekaasumaisen laimentimen kanssa.

Keksintö antaa edelleen käyttöön farmaseuttisen koostumuksen, joka sisältää aktiivisena aineosana 3'-deoksitymidin-2'-eeniä (3'-deoksi-2',3'-didehydrotymidiini) steriilin ja/tai fysiologisesti isotonisen vesiliuoksen muodossa.

Keksintö antaa myös käyttöön lääkkeen annosyksikkömuodossa, joka sisältää 3'-deoksitymidin-2'-eeniä (3'-deoksi-2',3'-didehydrotymidiini).

Keksinnön mukaisesti annetaan myös käyttöön lääke tablettien (mukaanlukien lääkepastillit ja rakeet), kaplettien, sokerirakeiden, kapselien, pillerien, ampullien tai peräpuikkojen muodossa, jotka käsittävät 3'-deoksitymidin-2'-eenin (3'-deoksi-2',3'-didehydrotymidiini).

"Lääkkeellä", käytettynä tässä yhteydessä, tarkoitetaan fysikaalisesti erillisiä, koossa pysyviä osia, jotka ovat sopivia lääketieteelliseen lääkkeen antamiseen. "Lääke annosyksikkömuodossa" tarkoittaa tässä fysikaalisesti erillisiä, koossa pysyviä yksikköjä, jotka sopivat lääketieteelliseen lääkkeen antamiseen, jokaisen yksikön sisältäessä päivittäisen annoksen tai kerrannaisen (nelinkertaiseen asti) tai tasaosan (neljäskymmenesosaan saakka) keksinnön mukaisen yhdisteen

päiväannoksesta, yhdessä kantajan kanssa ja/tai suljettuna kuoreen. Se, sisältääkö lääke päiväannoksen, vai esimerkiksi puolet, kolmanneksen tai neljänneksen päiväannoksesta, riippuu siitä annetaanko lääke kerran, vai esimerkiksi kaksi, kolme vai neljä kertaa päivässä, vastaavasti.

Keksinnön mukaiset farmaseuttiset koostumukset voivat esimerkiksi esiintyä suspensioiden, liuosten ja emulsioiden muodossa sisältäen aktiivista yhdistettä vedellisissä tai vedettömissä laimentimissa, siirapeissa, rakeissa tai jauheissa.

Farmaseuttisissa koostumuksissa (esim. rakeet) käytettäviksi tarkoitettuihin laimentimiin, jotka soveltuvat muodostettavaksi tableteiksi, sokerirakeiksi, kapseleiksi ja pillereiksi, lukeutuvat seuraavat: (a) täyteaineet ja jatkoaineet, esim. tärkkelys, sokerit, mannitoli ja piihappo; (b) sideaineet, esim. karboksimetyyliselluloosa ja muut selluloosajohdannaiset, alginaatit, gelatiini ja polyvinyylipyrrolidoni; (c) kostutusaineet, esim. glyseroli; (d) hajottavat aineet, esim. agar-agar, kalsiumkarbonaatti ja natriumbikarbonaatti; (e) liukenemista hidastavat aineet, esim. parafiini; (f) imeytymistä edistävät aineet, esim. kvartääriset ammoniumyhdisteet; (g) pinta-aktiiviset aineet, esim. setyylialkoholi, glyserolimonostearaatti; (h) adsorptiiviset kantajat, esim. kaoliini ja bentoniitti; (i) voitelevat aineet, esim. talkki, kalsium- ja magnesiumstearaatti ja kiinteät polyetyyliglykolit.

Keksinnön mukaisista farmaseuttisista koostumuksista muodostetuilla tableteilla, sokerirakeilla, kapseleilla, kapleteilla ja pillereillä voi olla tavanomaisia päällysteitä, kuoria ja suojaavia matriiseja, jotka voivat sisältää samentimia. Ne voivat olla siten muodostettuja, että niistä vapautuu aktiivinen aineosa ainoastaan tai edullisesti tietyssä osassa suolistoa, mahdollisesti jonkin ajanjakson kuluessa. Päällysteet, kuoret ja suojaavat matriisit voi olla valmistettu esimerkiksi polymeerisistä aineista tai vahoista.

Aktiivinen aineosa voi myös olla valmistettu mikrokapseloidussa muodossa, yhdessä yhden tai useamman edellä mainitun laimentimen kanssa.

Laimentimet, joita on tarkoitus käyttää farmaseuttisissa koostumuksissa, jotka soveltuvat muodostettavaksi peräpuikoiksi, voivat esimerkiksi olla tavallisia vesiliukoisia laimentimia, kuten esimerkiksi polyetyleeniglykolit ja rasvat [esim. kaakaoöljy ja korkeammat esterit, (esim. C_{14}-alkoholi C_{16}-rasvahapon kanssa)] tai näiden laimentimien seoksia.

Farmaseuttiset koostumukset, jotka ovat liuoksia tai emulsioita, voivat esimerkiksi sisältää tavanomaisia laimentimia (poissulkien tietenkin edellä mainitut liuottimet, joiden molekyylipaino on alle 200, paitsi pinta-aktiivisen aineen läsnäollessa), kuten liuottimia, liuottavia aineita ja emulgoivia aineita. Spesifisiä ei-rajoittavia esimerkkejä sellaisista laimentimista ovat vesi, etyylialkoholi, isopropyylialkoholi, etyylikarbonaatti, etyyliasetaatti, bentsyylialkoholi, bentsyylibentsoaatti, propyleeniglykoli, 1,3-butyleeniglykoli, dimetyyliformamidi, öljyt (esimerkiksi maapähkinäöljy), glyseroli, tetrahydrofurfuryylialkoholi, polyetyleeniglykolit ja sorbitolin rasvahappoesterit tai niiden seoksia.

Parenteraalista lääkkeen antamista varten liuosten ja emulsioiden tulisi olla steriilejä ja tarvittaessa veren suhteen isotonisia.

Farmaseuttiset koostumukset, jotka ovat suspensioita, voivat sisältää tavallisia laimentimia, kuten esimerkiksi nestemäisiä laimentimia, esim. vesi, etyylialkoholi, propyleeniglykoli, pinta-aktiiviset aineet (esim. etoksyloidut isostearyylialkoholit, polyoksietyleenisorbiitti ja sorbitaaniesterit), mikrokiteistä selluloosaa, alumiinimetahydroksidia, bentoniittia, agar-agaria ja tragakanttia tai niiden seoksia.

Kaikki keksinnön mukaiset farmaseuttiset koostumukset voivat myös sisältää väriaineita ja säilöntäaineita, kuin myös hajuaineita ja arominlisääjiä (esim. piparminttuöljy ja eukalyptusöljy) ja makeutusaineita (esim. sakkariini ja aspartaami).

Keksinnön mukaiset farmaseuttiset koostumukset sisältävät yleensä 0,5 - 90 % aktiivista aineosaa (3'-deoksitymidin-2'-eeniä (3'-deoksi-2',3'-didehydrotymidiini)) kokonaiskoostumuksen painosta.

3'-deoksitymidin-2'-eenin (3'-deoksi-2',3'-didehydrotymidiini) lisäksi, keksinnön mukaiset farmaseuttiset koostumukset ja lääkkeet voivat myös sisältää muita farmaseuttisesti aktiivisia yhdisteitä.

Mikä tahansa esillä olevan keksinnön mukaisissa lääkkeissä oleva laimennin voi olla mikä tahansa niistä, joita edellä mainittiin esillä olevan keksinnön mukaisten farmaseuttisten koostumusten yhteydessä. Sellaiset lääkkeet voivat sisältää liuottimia, joiden molekyylipaino on alle 200, ainoana laimentimena.

Keksinnön mukaisen lääkkeen muodostavat erilliset, koossa pysyvät osat muokataan yleensä muotonsa ja pakkauksen puolesta lääketieteellistä lääkkeen antamista varten, ja ne voivat olla esimerkiksi mitä tahansa seuraavista: tabletit (mukaanlukien lääkepastillit ja rakeet), pillerit, sokerirakeet, kapselit, peräpuikot ja ampullit. Jotkin näistä muodoista voi olla valmistettu aktiivisen aineen viivästynyttä vapautumista ajatellen. Jotkin, kuten kapselit, voivat sisältää suojaavan kuoren, joka tekee lääkkeen osista fysikaalisesti erillisiä ja koossa pysyviä.

Edullinen päiväannos keksinnön mukaisten lääkkeiden antamiselle on 2,5 - 250 mg aktiivista aineosaa siinä tapauksessa,

että lääkettä annetaan laskimonsisäisesti, ja 25 - 250 mg aktiivista aineosaa annettaessa suun kautta.

Edellä mainittuja farmaseuttisia koostumuksia ja lääkkeitä sisältävä tuote saadaan aikaan millä tahansa alalla tunnetulla menetelmällä, esimerkiksi sekoittamalla keskenään aktiivinen aineosa(t) laimentimen(ien) kanssa farmaseuttisen koostumuksen muodostamiseksi (esim. rae), ja muodostamalla koostumuksesta sen jälkeen lääke (esim. tabletteja).

Tämän keksinnön mukaisesti annetaan käyttöön menetelmä edellä mainittujen tautien hoitamiseen lämminverisillä eläimillä, joka menetelmä käsittää keksinnön mukaisen yhdisteen antamisen eläimille, nimittäin 3′-deoksitymidin-2′-eenin (3′-deoksi-2′,3′-didehydrotymidiini), sellaisenaan tai seoksessa laimentimen kanssa tai keksinnön mukaisen lääkkeen muodossa.

Keksinnön mukaisesti ajatellaan, että tätä aktiivista yhdistettä, nimittäin 3′-deoksitymidin-2′-eeniä (3′-deoksi-2′,3′-didehydrotymidiini), tullaan antamaan suun kautta, parenteraalisesti (esimerkiksi lihaksensisäisesti, vatsaontelonsisäisesti, ihonalaisesti tai laskimonsisäisesti), peräsuolen kautta tai paikallisesti, edullisesti suun kautta tai parenteraalisesti, erityisesti kielenalaisesti tai laskimonsisäisesti. Edullisia farmaseuttisia koostumuksia ja lääkkeitä ovat sen vuoksi sellaiset, jotka ovat sopivia annettaviksi esimerkiksi suun kautta tai parenteraalisesti. Lääke annetaan keksinnön mukaisessa menetelmässä edullisesti suun kautta tai parenteraalisesti.

Yleensä on osoittautunut edulliseksi antaa lääke laskimonsisäisesti määrinä 0,01 mg - 10 mg/kg, edullisesti 0,05 - 5 mg/kg ruumiinpainoa päivää kohti, ja antaa lääkettä suun kautta 0,05 - 20 mg/kg, edullisesti 0,5 mg - 5 mg/kg ruumiinpainoa päivää kohti, tehokkaiden tulosten aikaansaamiseksi.

Siitä huolimatta voi aika ajoin olla välttämätöntä poiketa noista annostusmääristä, ja erityisesti sen mukaan, mikä on hoidettavan ihmis- tai eläinkohteen laatu ja ruumiinpaino, tämän kohteen yksilöllinen reaktio käsittelylle, formulointilaji, jossa aktiivinen aines annetaan, tapa, jolla lääkkeen antaminen toteutetaan ja taudin kehitysvaihe tai antamisväli. Jossain tapauksessa voi näin ollen olla riittävää käyttää vähemmän kuin edellä mainittu minimiannosmäärä, kun taas toisissa tapauksissa mainittu yläraja on ylitettävä haluttujen tulosten saavuttamiseksi. Silloin kun annetaan suurempia määriä, voi olla suositeltavaa jakaa nämä useaan yksittäiseen antamiskertaan päivän mittaan.

Keksintöä kuvataan nyt viittaamalla seuraaviin ei rajoittaviin esimerkkeihin.

Esimerkki 1

3'-deoksitymidin-2'eenin (3'-deoksi-2',3'-didehydrotymidiinin synteesi

Syklisen eetterin 3 liuosta (katso edellä kuvailtua reaktiokaaviota) (8,64 g, 38,4 mmoolia) 240 ml:ssa kuivattua DMSO:ta, joka sisälsi 8,70 g (76,4 mmoolia) kalium-t-butoksidia, sekoitettiin huoneen lämpötilassa kahden tunnin ajan. Reaktioseos neutraloitiin suunnilleen pH-arvoon 7 etanolisella etikkahapolla ja liuos haihdutettiin sen jälkeen kuivaksi suunnilleen 50°C:ssa alennetussa paineessa. Jäännös trituroitiin useilla annoksilla kuumaa asetonia. Liukenemattomat materiaalit poistettiin suodattamalla ja suodos haihdutettiin kuivaksi. Jännös eluoitiin piihappogeelikolonnin läpi ($CHCl_3$-EtOH, 2:1), jolloin saatiin 6,5 g (76 %) tuotetta: s.p. 158-160°C; NMR (Me_2SO-d_6) δ 1,82 (s, 3H, 5-CH_3), 3,53 (m, 2H, 5'-H), 4,80 (m, 1H, 4'-H), 4,96 (t, 1H, 5'-OH, D_2O vaihdettavissa), 5,90 (m, 1H, 3'-H, vinyyli), 6,40 (m, 1H, 2'-H, vinyyli), 6,82 (m, 1H, 1'-H), 7,67 (s, 1H, 6-H).

Esimerkki 2

Biologinen määritysmenetelmä antiviraaliselle aktiivisuudelle ihmisen immuunikatovirusta vastaan (HIV; HTLV-III/LAV)

Kolme päivää vanhoja mitogeenilla stimuloituja ihmisen perifeerisen veren mononukleaarisia (PBM) soluja (10^6 per ml) infektoitiin HIV:llä (kanta LAV) 3'-deoksitymidin-2'-eenin poissaollessa ja läsnäollessa eri pitoisuuksissa, 1, 10, 100 uM. Viisi päivää infektoinnin jälkeen supernatantissa oleva virus pelletoitiin ja hajottamisen jälkeen määritettiin käänteistranskriptaasin aktiivisuus.

Menetelmät, joita käytettiin PBM-solujen viljelyyn, viruksen talteenottoon ja käänteistranskriptaasin aktiivisuuden määrittämiseen, olivat samat, joita ovat kuvanneet J. S. McDougal, S. P. Cort, M. S. Kennedy, C. D. Cabridilla, P. M. Feorino, D. P. Francis, D. Hicks, V. S. Kalyanaramen ja L. S. Martin, J. Immun. Meth., 76, 171, (1985). Virus lisättiin viljelmiin samaan aikaan kuin lääkeaine.

Saadut tulokset osoittivat, että oleellisesti täydellinen inhibitio "AIDS"-viruksen replikoinnissa saavutettiin (>98 % inhibitio) kaikissa kolmessa konsentraatiossa.

Esimerkki 3

Biologinen määritysmenetelmä antiviraaliselle aktiivisuudelle Moloneyn hiiren leukemiavirusta (M-MuLV) vastaan XC-määrityksen avulla

XC-määrityssysteemi on epäsuora menetelmä hiiren leukemiaviruksen kvantitoimiseksi (MuLV), jota alunperin kuvasivat V. Klement, W. P. Rowe, J. W. Hartley ja W. E. Pugh, Proc. Natl. Acad. Sci., 63, 753, (1969) ja modifioivat W. P. Rowe, W. E. Pugh ja J. W. Hartley, Virology, 42, 1136, (1970). Tämä

testi perustuu synkytiumin muutosten kehittymiseen XC-solulinjassa, kun sitä viljellään yhdessä hiiren fibroblastisolujen kanssa (SC-1-solut), tuottoisasti infektoituna MuLV:n kanssa. XC-solulinja saatiin rotan tuumorista, jonka oli indusoinut Rousen sarkoomavirus (RSV), Praha-kanta (J. Svoboda, P. Chyle, D. Simkovic ja J. Hilgert, Folia Biol., 9, 77, (1963)). Tämä solulinja sisältää RSV-genomin, mutta ei tuota infektiivistä virusta auttaja-viruksen poissa ollessa.

10^6 SC-solua siirrostettiin Earlsin minimaalialustalle (ENEM) - 10 % naudan sikiön seerumia (FBS), 60 mm:n petrimaljoille. Seuraavana päivänä solujen joukkoon siirrostettiin 0,5 ml viruslaimennosta, joka sisälsi 25 µg/ml DEAE-dekstraania. Maljoja inkuboitiin 1 tunnin ajan 37°C:ssa kosteutetussa 5 % CO_2-inkubaattorissa. Virussiirros poistettiin sen jälkeen ja korvattiin 5 ml:lla alustaa, joka sisälsi testiyhdisteen sopivia konsentraatioita (kaksi maljaa/konsentraatio). Alustaa, joka sisälsi 10 % FBS:ää, lisättiin viruskontrollimaljoille. Alusta (testiyhdisteen kanssa tai ilman) vaihdettiin 48 tunnin kohdalla.

Viisi päivää virussiirrostuksen jälkeen, viljelyneste dekantoitiin ja soluja säteilytettiin General Electric'in mikrobeja tappavalla lampulla 30 sekunnin ajan (1500 - 1800 ergiä UV-valoa) ($1,5 \times 10^{-4}$ - $1,8 \times 10^{-4}$ J). Viljelmien päälle lisättiin välittömästi 10^6 SC-solua 5 ml:ssa ENEM - 10 % FBS/malja. Alusta vaihdettiin 2 päivän välein. Neljä päivää XCsolujen lisäämisen jälkeen viljelmät kiinnitettiin samanaikaisesti ja värjättiin GEIMSA-värillä 10 - 15 minuutin ajan.

Plakit laskettiin, käyttäen käänteismikroskopiaa, reikinä solukerroksessa, jotka sisälsivät synkytium-soluja tai monitumaisten jättiläissolujen pesäkemassoina. Antiviraalinen aktiivisuus oli hyvin merkitsevä ja ED_{50}-arvo oli 2,5 µM.

Inhibitio-%/konsentraation laskeminen (Inh.-%/kons.):

Inh.-%/kons. =

$$100 - \left[\frac{\text{keskimääräinen synkytium-solujen lukum./ testiyhdisteen konsentraatio}}{\text{keskimääräinen synkytium-solujen lukum./ viruskontrollissa}} \times 100 \right]$$

ED_{50}: Kumulatiivinen inhibitio-% käyttäen Reed-Muenchin menetelmää

Tulee ymmärtää, että tämä patenttihakemus ja patenttivaatimukset tuodaan esille kuvauksen eikä rajoittamisen vuoksi, ja että erilaisia modifikaatioita ja muutoksia voidaan tehdä poikkeamatta esillä olevan keksinnön hengestä ja alueesta.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi käytettäväksi LAV/HTLV III:lla infektoituneen potilaan hoitoon, **tunnettu** siitä, että se sekoitetaan 3'-deoksitymidin-2'-eeniä terapeuttisesti tehokas määrä sopivan kantajan tai laimentimen kanssa.

2. 3'-deoksitymidin-2'-eenin käyttö lääkkeen valmistamiseksi käytettäväksi erityisesti LAV/HTLV III:lla infektoituneen ihmisen hoitoon.



Missing part

Hak.n:o 875544

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggnings- och patentskrifter:

FI

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

Käännä Vänd

EP

WO

JP 52-27783 (C07D 405/04)

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

15.6.92 Anne-Ch. Nelson-Spoof

Allekirjoitus