



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **329929**

(13) **B1**

NORGE

(51) **Int Cl.**

C07K 5/02 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20030928	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2001.08.31 PCT/US2001/26008
(22)	Inng.dag	2003.02.27	(85)	Videreføringsdag	2003.02.27
(24)	Løpedag	2001.08.31	(30)	Prioritet	2000.08.31, US, 229398 2001.03.21, US, 277641
(41)	Alm.tilgj	2003.04.16			
(45)	Meddelt	2011.01.24			
(73)	Innehaver	Vertex Pharmaceuticals Inc, 130 Waverly Street, US-MA02139-4242 CAMBRIDGE, USA			
(72)	Oppfinner	Shu-Hui Chen, 3807 Steeplechase Drive, US-IN46032 CARMEL, USA Xicheng David Sun, 923 Grays Peak Drive, US-CO80027 SUPERIOR, USA Robert Edward Babine, 19 Concetta Way, US-MA02038 FRANKLIN, USA Jason Eric Lamar, 2027 North Bolton Avenue, US-IN46218 INDIANAPOLIS, USA Nancy June Snyder, 3830 West 850 North, US-IN46149 LIZTON, USA Mark Joseph Tebbe, Volksdorfer Weg 32, DE-22391 HAMBURG, Tyskland Frantz Victor, 4855 North Tuxedo Street, US-IN46205 INDIANAPOLIS, USA Q May Wang, 12345 Moon River Court, US-IN46236 INDIANAPOLIS, USA Yvonne Yee Mai Yip, 1441 Badger Drive, US-IN46260 INDIANAPOLIS, USA Ivan Collado, C/Santa Barbara 21, 2C, ES-28220 MADRID, Spania Cristina Garcia-Paredes, C/Arroyo de la Elipa 1, 4 Drcha, ES-28017 MADRID, Spania Raymond Samuel Parker III, 511 Hayfield Court, US-PA18901 DOYLESTOWN, USA Ling Jin, 3750 Power Drive, US-IN46033 CARMEL, USA Deqi Guo, 5747 Aqua Marine Drive, US-IN46033 CARMEL, USA John Irvin Glass, 625 Bryn Mawr Drive, US-IN46260 INDIANAPOLIS, USA			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Ny forbindelse samt anvendelser derav og farmasøytisk preparat			
(56)	Anførte publikasjoner	Ingen			
(57)	Sammendrag				

Peptidomimetiske forbindelser som kan benyttes som protease-inhibitorer, særlig som serin- protease-inhibitorer og mer spesielt hepatitt -C- NS3-protease-inhibitorer. Det beskrives mellomprodukter og forbindelsenes fremstilling beskrives inkludert nye stereoselektive prosesser til mellomprodukter. Det beskrives videre farmasøytiske preparater og fremgangsmåter for anvendelse av forbindelser for inhibering av HCV-protease eller behandling av en pasient som lider av en HCV-infeksjon eller fysiologiske tilstander relatert denne infeksjon. Det tilveiebringes videre farmasøytiske kombinasjoner som i tillegg til en eller flere HCV- serin-protease-inhibitorer omfatter et eller flere interferoner som viser anti-HCV-aktivitet og/eller en eller flere forbindelser med anti-HCV-aktivitet og en farmasøytisk akseptabel bærer, samt metoder for terapi eller prevensjon av en HCV-infeksjon hos en pasient ved bruk av et slikt preparat. Det beskrives videre sett eller farmasøytiske pakker til bruk ved terapi eller prevensjon av HCV-infeksjon hos pasienter.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en nærmere definert forbindelse og farmasøytisk akseptable salter og solvater derav; farmasøytiske preparater inneholdende nevnte forbindelse; samt anvendelse av nevnte forbindelse, for fremstilling av et medikament for behandling av HCV-infeksjon.

5

Oppfinnelsens bakgrunn

Infeksjon på grunn av HCV er et alvorlig humanmedisinsk problem og er i dag erkjent som det forårsakende middel for de fleste tilfeller av ikke-A-, ikke-B-hepatitt.

- 10 HCV er antatt å infisere kronisk 3% av verdens befolkning [A. Alberti et al., "Natural History of Hepatitis C", "J. Hepatology", 31, (suppl. 1), 17-24 (1999)]. Bare i de Forente Stater er infeksjonsmengden 1,8% eller 3,9 millioner mennesker [M.J. Alter, "Hepatitis C Virus Infection in the United States", "J. Hepatology", 31, (suppl. 1), 88-91 (1999)]. Av alle infiserte pasienter utvikler over 70% en kronisk infeksjon som antas
15 å være en hovedårsak til cirrhose og hepatocellulært karsinom [D. Lavanchy, "Global Surveillance and Control of Hepatitis C", "J. Viral Hepatitis", 6, 35-47 (1999)].

- Replikeringen av HCV omfatter genomisk koding av et polyprotein på 3010-3033 aminosyrer [Q.-L. Choo et al., "Genetic Organization and Diversity of the Hepatitis C
20 Virus", "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 88, 2451-2455 (1991); N. Kato et al., "Molecular Cloning of the Human Hepatitis C Virus Genome From Japanese Patients with Non-A, Non-B Hepatitis", "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 87, 9524-9528 (1990); A. Takamizawa et al., "Structure and Organization of the Hepatitis C Virus Genome Isolated From Human Carriers", "J. Virol.", 65, 1105-1113 (1991)]. De HCV-ikkestrukturelle (NS)-
25 proteiner antas å tilveiebringe det vesentlige katalytiske maskineri for viral replikering. NS-proteinene avledes ved proteolytisk spalting av polyproteinet [R. Bartenschlager et al., "Nonstructural Protein 3 of the Hepatitis C Virus Encodes a Serin-Type Proteinase Required for Cleavage at the NS3/4 and NS4/5 Junctions", "J. Virol.", 67, 3835-3844 (1993); A. Grakoui et al., "Characterization of the Hepatitis C Virus-Encoded Serine
30 Proteinase: Determination of Proteinase-Dependent Polyprotein Cleavage Sites", "J. Virol.", 67, 2832-2843 (1993); A. Grakoui et al., "Expression and Identification of Hepatitis C Virus Polyprotein Cleavage Products", "J. Virol.", 67, 1385 (1993); L. Tomei et al., "NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C Virus polyprotein", "J. Virol.", 67, 4017-4026 (1993)]. Det er de første 181 aminosyrer av NS3
35 (restene 1027-1207 av det virale polyprotein) som er påvist å inneholde serin-protease-domenet av NS3 som prosesserer alle fire nedstrøms seter av HCV-polyproteinet [C.

Lin et al., "Hepatitis C Virus NS3 Serine Proteinase: Trans-Cleavage Requirements and Processing Kinetics", "J. Virol.", 68, 8147-8157 (1994)].

HCV-NS-protein 3 (NS3) inneholder en serin-protease-aktivitet som hjelper til ved
 5 prosessering av majoriteten av de virale enzymer og anses således essensiell for viral
 replikasjon og infiserbarhet. Essensialiteten av NS3-proteasen ble dedusert fra det
 faktum at mutasjoner i gulfebervirus NS3-proteasen reduserte viral infiserbarhet [T.J.
 Chambers et al., "Evidence that the N-terminal Domain of Nonstructural Protein NS3
 From Yellow Fever Virus is a Serine Protease Responsible for Site-Specific Cleavages
 10 in the Viral Polyprotein", "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 8898-8902 (1990)]. I den
 senere tid er det påvist at mutasjoner på det aktive setet av HCV-NS3-proteasen
 fullstendig kunne avskaffe HCV-infeksjonen i en sjimpansemodell [C.M. Rice et al.,
 "Hepatitis C Virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3'-
 nontranslated region are essential for virus replication in vivo.", "J. Virol.", 74/4, 2046-
 15 51 (2000)]. HCV-NS3-serin-proteasen anses således essensiell for viral replikasjon og
 den og dens assosierte kofaktor, NS4A, understøtter prosesseringen av alle de virale
 enzymer. Denne prosessering synes å være analog med den som utføres av den humane
 immunodefektivitetsvirus ("HIV") aspartyl-protease. I tillegg viser bruken av HIV-
 protease-inhibitorer som potente antivirale midler i menneske at avbrytning av et
 20 proteaseprotein-prosesseringstrinn i den virale livsøyklus resulterer i terapeutisk aktive
 midler. Som en konsekvens er proteaseenzymet et attraktivt mål for medikament
 oppdagelser.

Flere potensielle HCV-protease-inhibitorer er beskrevet. WO 00/09558, WO 00/09543,
 25 WO 99/64442, WO 99/07733, WO 99/07734, WO 99/50230, WO 98/46630, WO
 98/17679 og WO 97/43310, US 5 990 276, M. Llinás-Brunet et al., "Bioorg. Med.
 Chem. Lett.", 8, 1713-1718 (1998), W. Han et al., "Bioorg. Med. Chem. Lett.", 10, 711-
 713 (2000), R. Dunsdon et al., "Bioorg. Med. Chem. Lett.", 10, 2267-2270 (2000) og S.
 LaPlante et al., "Bioorg. Med. Chem. Lett.", 10, 2271-2274 (2000) beskriver alle poten-
 30 sielle HCV-NS3-protease-inhibitorer. Uheldigvis er det ingen serin-protease-inhibitorer
 tilgjengelige i dag som anti-HCV-midler.

Således finnes det ingen anti-HCV-terapi bortsett fra interferon- α , interferon- α -
 ribavirin-kombinasjoner og i den senere tid pegylert interferon- α . De opprettholdte
 35 responsgrader for interferon- α -terapi og interferon- α /ribavirin har imidlertid en
 tendens til å være lav (<50%) og bivirkningene som vises ved disse terapi har en
 tendens til å være signifikante og alvorlige [M.A. Walker, "Hepatitis C Virus: an

Overview of Current Approaches and Progress", "DDT", 4, 518-529 (1999); D. Moradpour et al., "Current and Evolving Therapies for Hepatitis C", "Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.", 11, 1199-1202 (1999); H.L.A. Janssen et al., "Suicide Associated with Alfa-Interferon Therapy for Chronic Viral Hepatitis", "J. Hepatol.", 21, 241-243 (1994); og P.F. Renault et al., "Side effects of alpha interferon", "Seminars in Liver Disease", 9, 273-277 (1989)]. Videre inkluderer interferonterapiene kun langtidsemissjon i kun en del (~25) av tilfellene [O. Weiland, "Interferon Therapy in Chronic Hepatitis C Virus Infection", "FEMS Microbiol. Rev.", 14, 279-288 (1994)]. Problemene ovenfor med interferon- α -terapi har også ført til utviklingen og en klinisk studie av pegylerte, derivatiserte interferon- α -forbindelser som forbedrede anti-HCV-terapeutika.

I lys av dagens situasjon med henblikk på anti-HCV-terapeutika er det klart at det er behov for mer effektive og bedre tolererte terapier.

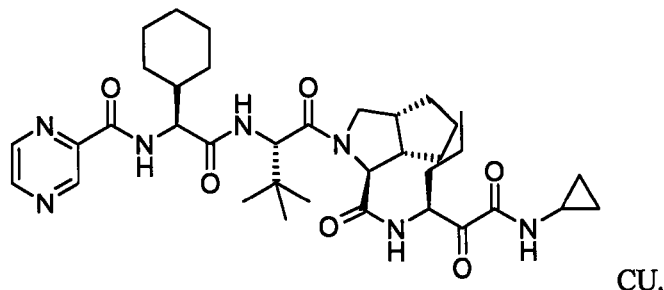
Videre har syntesen av komplekset peptidomimetiske forbindelser lenge vært hemmet av den ikke stereoselektive art av de fleste syntetiske, organiske prosesser. Det er velkjent at den terapeutiske aktivitet for enantiomerer av peptidomimetiske forbindelser varierer innen vide områder. Det ville derfor være en stor fordel å tilveiebringe slike stereospesifikke, syntetiske prosesser.

Tidligere forsøk på å syntetisere chiralt spesifikke bicykloprolinat-intermediater til bruk ved syntese av de her beskrevne terapeutiske peptidomimetiske protease-inhibitorer har lidd under at de ikke var enantioselektive eller diastereoselektive eller omfattet lange syntetiske fremstillingsveier, eller var uegnet for fremstilling av store mengder av produktet.

Det er derfor også et behov for midler for å fremstille store mengder av bicykloprolinater på en diastereoselektiv måte og i enantiomerisk anriket form.

Oppsummering av oppfinnelsen

Et første aspekt ved foreliggende oppfinnelse vedrører en forbindelse, kjennetegnet ved at den er gitt ved strukturen



5 eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat deriv.

Et andre aspektv ved oppfinnelsen vedrører et farmasøytisk preparat, kjennetegnet ved at det omfatter en farmasøytisk akseptabel mengde av forbindelsen ifølge det første aspekt ved oppfinnelsen og en farmasøytisk akseptabel bærer.

10

Et tredje aspekt ved oppfinnelsen verører anvendelse av en forbindelse ifølge det første aspekt ved oppfinnelsen, for fremstilling av et medikament for behandling av HCV-infeksjon.

15 Kort beskrivelse figurene

Figur 1 viser inhiberingen av HCV-replikon RNA-akkumulering etter 48 timers behandling av replikonholdige celler med forbindelse CU og interferon- α 2B, individuelt eller i kombinasjon;

20 figur 2 grafisk viser isobolkonkaviteten som utøves av forbindelsene bruk i kombinasjon som er antagonistisk, additiv og synergistisk i henhold til synergi-beregningsmetodene til Greco, Park og Rustom ((1990) "Appllication of a New Approach for the Quantitation of Drug Synergism to the Combination of cis-Diamminedichloroplatinum and 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine", "Cancer Research", 50, 5318-5327);

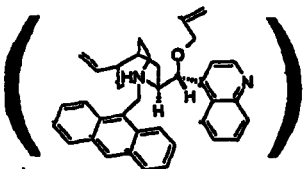
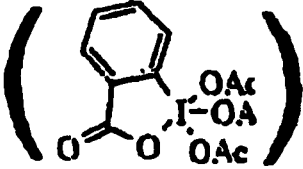
25 figur 3 viser den geometriske sammenheng mellom α og mengden kurvatur i isobolen. En hypotetisk isobol ved E = 50% effektnivået vises med en rettlinje-isobol som ville være forventet under additivitet. M er skjæringspunktet for linjen $y = x$ og den hypotetiske isobol. N er skjæringspunktet for linjen $y = x$ og rettlinjeisobolen. O er origo (0,0). S gir et mål på mengden krumming i isobolen, der $S = ON/OM$. ON er avstanden fra O til N og OM er avstanden fra O til M. Parameteren α henger sammen med S ved ligningen $\alpha = 4(S^2 - S)$;

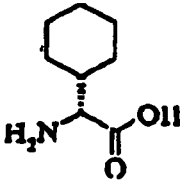
30

- figur 4 viser isobolberegningene under anvendelse av metoden til Greco et al., supra, for kombinasjonen av forbindelse CU og interferon α -2B (Schering-Plough) ved bruk av 6 fortynninger av hver forbindelse i forsøk 1;
- 5 figur 5 viser isobolberegningene ved bruk av metoden ifølge Greco et al., supra, for kombinasjonen av forbindelse CU og interferon α -2A ved bruk av 6 fortynninger av hver forbindelse i forsøk 2;
- figur 6 viser isobolberegningene under anvendelse av metoden til Greco et al., supra, for kombinasjonen av forbindelse CU og interferon α -2B (Schering-Plough) ved bruk av 8 fortynninger av hver forbindelse i forsøk 1;
- 10 figur 7 viser isobolberegningene ved bruk av metoden ifølge Greco et al., supra, for kombinasjonen av forbindelse CU og interferon α -2A ved bruk av 8 fortynninger av hver forbindelse i forsøk 4;
- figur 8 viser isobolberegningene ved bruk av metoden ifølge Greco et al., supra, for kombinasjonen av forbindelse CU og ovin-interferon τ ved bruk av 8 fortynninger av hver forbindelse i forsøk 5;
- 15 figur 9 viser isobolberegningene ved bruk av metoden ifølge Greco et al., supra, for kombinasjonen av forbindelse EC og interferon- α -2B (Schering-Plough) ved bruk av 8 fortynninger av hver forbindelse i forsøk 6;
- figur 10 viser isobolberegningene ved bruk av metoden ifølge Greco et al., supra, for kombinasjonen av forbindelse EC og interferon- α -2A ved bruk av 8 fortynninger av hver forbindelse i forsøk 7;
- 20 figur 11 viser isobolberegningene ved bruk av metoden ifølge Greco et al., supra, for kombinasjonen av forbindelse CU og interferon- β ved bruk av 8 fortynninger av hver forbindelse i forsøk 8;
- 25 figur 12 viser isobolberegningene ved bruk av metoden ifølge Greco et al., supra, for kombinasjonen av forbindelse EP og interferon- α -2B (Schering-Plough) ved bruk av 8 fortynninger av hver forbindelse i forsøk 9;
- figur 13 viser isobolberegningene ved bruk av metoden ifølge Greco et al., supra, for kombinasjonen av Ribavirin og interferon- α -2B (Schering-Plough) ved bruk av 8 fortynninger av hver forbindelse i forsøk 10;
- 30 figur 14 viser inhiberingen av HCV-replikon RNA-akkumulering forårsaket av behandling av replikonceller med enten (A) Ribavirin alene eller (B) interferon α -2B alene. I begge tavler vises den målte inhibering så vel som inhiberingen korrigert for forbindelsene cytotoxisitet.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Som brukt ovenfor, og ellers i beskrivelsen, skal de følgende forkortelser, hvis ikke annet er sagt, ha følgende betydning:

5	<u>Angivelse</u>	<u>Reagens eller fragment</u>
	ACN	acetonitril
	AIBN	2,2'-azabisisobutyronitril
	BOC eller Boc	tert-butylkarbamat
	BOP	benzotriazol-1-yl-oksytris(dimetylamino)fosfonium-
10		heksafluorofosfat
	n-Bu ₃ SnH	tri-n-butyltinnhydrid
	t-Bu	tert-butyl
	Cbz	benzylkarbamat
	chiral PTC	chiral faseoverføringskatalysator
15		
	DAST	(dietylamino)svovelt trifluorid (Et ₂ NSF ₃)
20	DCC	dicyklokarbodiimid
	DCM	diklormetan (CH ₂ Cl ₂)
	DIBAL-H	diisobutylaluminiumhydrid
	DIC	1,3-diisopropylkarbodiimid
	DIPEA	diisopropyletylamin
25	DMAP	4-(N,N-dimetylamino)pyridin
	DMP-reagens	Dess-Martin-periodinanreagens
30		
	DMF	dimetylformamid
	DMSO	dimetylsulfoksyd
	EA	elementanalyse
	EDCI	1-etyl-3-(3-dimetylamino)propyl)karbodiimid HCl
35	eq	ekvivalent(er)
	Et	etyl
	Et ₂ O	dietyleter

	EtOH	etanol
	EtOAc	etylacetat
	Et ₃ Si	trietylsilan
	Fmoc	9-fluorenylmetoksykarbonyl
5	H-Chg-OH	
	HOAt	1-hydroksy-7-azabenzotriazol
10	HOBT	1-hydroksybenzotriazol
	HOSu	N-hydroksysuccinamid
	HPLC	høy-ytelsesvæskeskromatografi
	LAH	litiumaluminiumhydrid
	Me	metyl
15	MeI	metyliodid
	MeOH	metanol
	MeOC(O)Cl	metylklorformat
	MOMCl	metoksymetylklorid
	MOM	metoksymetyl
20	MS	massespektroskopi
	NaBH ₄	natriumborhydrid
	Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆	natriumtartrat
	NMP	N-metylpyrrolidon
	NMR	kjernemagnetisk resonans
25	P-	polymerbinding
	PyBOP	benzotriazol-1-yl-oksytris-pyrrolidino-fosfonium-heksafluorfosfat
	TBD	1,5,7-triazabicyklo[4.4.0]-dec-5-en
	RP-HPLC	reversfase – høytrykksvæskeskromatografi
30	TBSCl	tert-butyldimetylsilylklorid
	TCA	trikloreddiksyre
	TFA	trifluoreddiksyre
	Tf ₂ O	triflatanhydrid
	THF	tetrahydrofuran
35	THP	tetrahydropyran
	TLC	tynnsjikt-kromatografi

”Effektiv mengde” betyr en mengde av en forbindelse eller et preparat ifølge oppfinnelsen som er effektiv med henblikk på å gi den ønskede terapeutiske effekt.

”Hydrat” betyr et solvat der solvatmolekylet eller –molekylene er H₂O.

5

”Pasient” betyr både mennesker og andre dyr.

”Farmasøytisk akseptable salter” henviser til de relativt ikke-toksiske, uorganiske og organiske syreaddisjonssalter, og baseaddisjonssalter, av forbindelsen ifølge oppfinnelsen. Disse salter kan fremstilles in situ under en endelige isolering og rensing av forbindelsene. Særlig kan syreaddisjonssaltene fremstilles ved separat å omsette den rensede forbindelse i sin frie baseform med en egnet organisk eller uorganisk syre og så å isolere det således dannede salt. Eksempler på syreaddisjonssalter inkluderer hydrobromid, hydroklorid, sulfat, bisulfat, fosfat, nitrat, acetat, oksalat, valerat, oleat, palmitat, stearat, laurat, borat, benzoat, lactat, fosfat, tosylat, citrat, maleat, fumarat, succinat, tartrat, naftylat, mesylat, glucoheptonat, lactiobionat, sulfamater, malonater, salicylater, propionater, metylen-bis-β-hydroksynaftoater, gentisater, isetionater, di-p-toluoyltartrater, metansulfonater, etansulfonater, benzensulfonater, p-toluensulfonater, cykloheksylsulfamater og kinatlaurylsulfonatsalter og lignende. Se for eksempel S.M. Berge et al. i ”Pharmaceutical Salts”, ”J. Pharm Sci.”, 66, 1,19 (1977) når det gjelder detaljer. Baseaddisjonssalter kan også fremstilles ved separat å omsette den rensede forbindelse i sin syreform med en egnet, organisk eller uorganisk base og så å isolere det således dannede salt. Baseaddisjonssalter inkluderer farmasøytisk akseptable metall- og aminsalter. Egnede metallsalter inkluderer natrium-, kalium-, kalsium-, barium-, sink-, magnesium- og aluminiumsalter. Natrium- og kaliumsaltene er foretrukket. Egnede organiske baseaddisjonssalter fremstilles fra metallbaser som inkluderer natriumhydrid, -hydroksyd, kalium-, kalsium-, aluminium-, litium-, magnesium- eller sinkhydroksyd og lignende. Egnede aminbaseaddisjonssalter fremstilles fra aminer som har tilstrekkelig basisitet for å danne et stabilt salt og inkluderer fortrinnsvis de aminer som hyppig benyttes i den medisinske kjemi på grunn av den lave toksisitet og aksepterbarhet når det gjelder medisinsk bruk og kan for eksempel være ammoniakk, etylendiamin, N-metyl-glucamin, lysin, arginin, ornitin, cholin, N,N'-dibenzyletylendiamin, klorprocain, dietanolamin, procain, N-benzylfenetylamin, dietylamin, piperazin, tris-(hydroksymetyl)-aminometan, tetrametylammونیumhydroksyd, trietylamin, dibenzylamin, efenamin, dehydroabietylamin, N-etylpiiperidin, benzylamin, tetrametylammونیum, tetraetylammونیum, metylamin, dimetylamin, trimetylamin, etylamin, basiske aminosyrer som lysin og arginin, og dicykloheksylamin og lignende.

”Ringgruppesubstituenten” betyr substituenten bundet til aromatisk eller ikke-aromatisk
 ringsystem inkludert aryl, heteroaryl, hydroksy, alkoksy, cyklyloksy, aryloksy, hetero-
 aryloksy, acyl eller dennes tiokso-analog, cyklylkarbonyl eller dennes tiokso-analog,
 5 aroyl eller dennes tiokso-analog, heteroaroyl eller dennes tiokso-analog, acyloksy,
 cyklylkarbonyloksy, aroyloksy, heteroaroyloksy, halo, nitro, cyano, karboksy(syre),
 -C(O)-NHOH, -C(O)-CH₂OH, -C(O)-CH₂SH, -C(O)-NH-CN, sulfo, fosfono, alkyl-
 sulfonylkarbamoyl, tetrazolyl, arylsulfonylkarbamoyl, N-metoksykarbamoyl, hetero-
 arylsulfonylkarbamoyl, 3-hydroksy-3-cyklobuten-1,2-dion, 3,5-diokso-1,2,4-oksadia-
 10 zolidinyl eller hydroksyheteroaryl som 3-hydroksyisoksazolyl, 3-hydroksy-1-metyl-
 pyrazolyl, alkoksykarbonyl, cyklyloksykarbonyl, aryloksykarbonyl, heteroaryloksy-
 karbonyl, alkylsulfonyl, cyklylsulfonyl, arylsulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylsulfinyl,
 cyklylsulfinyl, arylsulfinyl, heteroarylsulfinyl, alkyltio, cyklyltio, aryltio, heteroaryltio,
 cyklyl, aryldiazo, heteroaryldiazo, tiol, Y¹Y²N-, Y¹Y²NC(O)-, Y¹Y²NC(O)O-,
 15 Y¹Y²NC(O)NY³- eller Y¹Y²NSO₂-, der Y¹, Y² og Y³ uavhengig er hydrogen, alkyl, aryl
 eller heteroaryl, eller der substituentene er Y¹Y²N-, der en av Y¹ og Y² kan være acyl,
 cyklokarbonyl, aroyl, heteroaroyl, alkoksykarbonyl, cyklyloksykarbonyl, aryloksy-
 karbonyl eller heteroaryloksykarbonyl, som definert her og den andre av Y¹ og Y² er
 som definert tidligere, eller, der substituentene Y¹Y²NC(O)-, Y¹Y²NC(O)O-,
 20 Y¹Y²NC(O)NY³- eller Y¹Y²NSO₂-, Y¹ og Y² sammen med N-atomet hvor til de er
 bundet danner en 4- til 7-leddet azaheterocyklyl eller azaheterocyklenyl. Når et ring-
 system er mettet eller partielt mettet, inkluderer ”ringgruppesubstituenten” metylen
 (H₂C=), okso (O=) og tiokso (S=). Sure/amidringgruppesubstituenten er karboksy(syre),
 -C(O)-NHOH, -C(O)-CH₂OH, -C(O)-CH₂SH, -C(O)-NH-CN, sulfo, fosfono, alkyl-
 25 sulfonylkarbamoyl, tetrazolyl, arylsulfonylkarbamoyl, N-metoksykarbamoyl, hetero-
 arylsulfonylkarbamoyl, 3-hydroksy-3-cyklobuten-1,2-dion, 3,5-diokso-1,2,4-oksadia-
 zolidinyl eller hydroksyheteroaryl som 3-hydroksyisoksazolyl, 3-hydroksy-1-metyl-
 pyrazolyl og Y¹Y²NCO-. Ikke-sure polarringgruppesubstituenten er hydroksy, okso
 (O=), tiokso (S=), acyl eller dennes tiokso-analog, cyklylkarbonyl eller dennes tiokso-
 30 analog, aroyl eller dennes tiokso-analog, heteroaryl eller dennes tiokso-analog, alkoksy-
 karbonyl, cyklyloksykarbonyl, aryloksykarbonyl, heteroaryloksykarbonyl, acyloksy,
 cyklylkarbonyloksy, aroyloksy, heteroaroyloksy, alkylsulfonyl, cyklylsulfonyl, aryl-
 sulfonyl, heteroarylsulfonyl, alkylsulfinyl, cyklylsulfinyl, arylsulfinyl, heteroaryl-
 sulfinyl, tiol, Y¹Y²N-, Y¹Y²NC(O)-, Y¹Y²NC(O)O-, Y¹Y²NC(O)NY³- eller Y¹Y²NSO₂.

35

”Solvat” betyr en fysikalsk assosiasjon av en forbindelse ifølge oppfinnelsen med et
 eller flere solventmolekyler. Denne fysiske assosiasjon inkluderer hydrogenbinding. I

visse tilfeller vil solvatet være i stand til isolering, for eksempel når et eller flere solventmolekyler innarbeides i krystallgitterverket i det krystallinske faststoff. "Solvat" omfatter både oppløsningsfase og isolerbare solvater. Eksempler på solvater er hydrater, etanolater, metanolater og lignende.

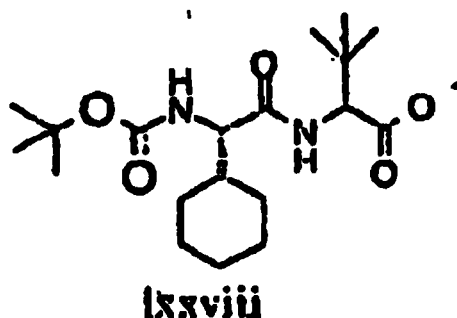
5

Fremstilling av forbindelse ifølge oppfinnelsen

Mellomprodukt eksempel 74 – Forbindelse lxxviii

Til 50 ml av en THF-oppløsning av H-Chg-OH 2 (5 g, 19,4 mmol) settes HOBt (2,63 g, 19,4 mmol) og EDCI (3,72 g, 19,4 mmol). Etter omrøring ved rundt romtemperatur i 20 minutter settes 19 ml THF- og 10 ml DMF-oppløsning inneholdende tert-L-leucin-metylesterhydroklorid (19,4 mmol) og DIPEA (6,75 ml, 38,8 mmol) til den ovenfor angitte oppløsning. Reaksjonsblandingen omrøres ved rundt romtemperatur over natten. Standard vandig opparbeiding og silikagelkromatografi over 15 → 20% EtOAc:heksaner ga 2,27 g (30%) forbindelse lxxviii

20

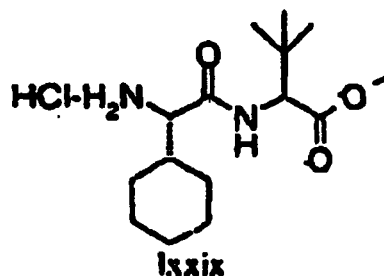


Mellomprodukt eksempel 75 – Forbindelse lxxix

Til 12 ml av en THF-oppløsning av forbindelse lxxviii (2,27 g, 5,91 mmol) settes 4N HCl-oppløsning i dioksan (7,38 ml, 29,5 mmol). Reaksjonsblandingen omrøres ved rundt romtemperatur over natten. På dette tidspunkt fjernes oppløsningsmidlet under redusert trykk for å gi forbindelse lxxix som benyttes direkte for den neste reaksjon.

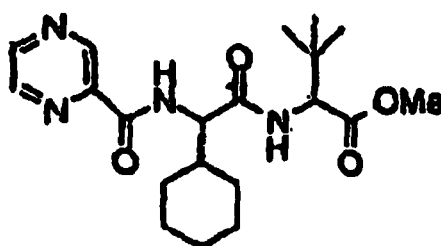
30

35

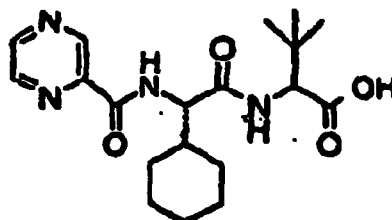


Mellomproduktseksempel 76 – Forbindelse lxxx

Til en THF-oppløsning av forbindelse lxxix (5,9 mmol) settes 20 ml av en THF-oppløsning inneholdende 2-pyrazinkarboksylsyre (878 mg, 7,08 mmol), HOBt (957 mg, 7,08 mmol) og EDCI (1,36 g, 7,08 mmol). Til den resulterende blanding settes så DIPEA (2,05 ml, 11,8 mmol). Reaksjonsblandingen omrøres over natten ved rundt romtemperatur og quenches så med vann. Reaksjonsblandingen ekstraheres med EtOAc. De organiske sjikt vaskes med saltoppløsning og konsentreres under vakuum for å gi en rest som renses ved silikagelkromatografi med 40 → 50% EtOAc:heksaner for å gi 1 g (36%) forbindelse lxxx

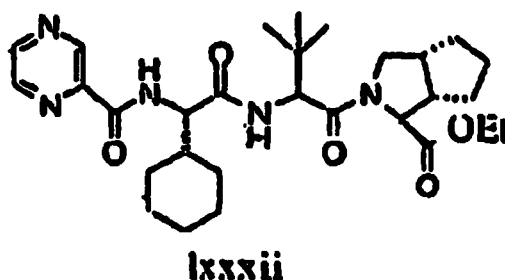
**lxxx****Mellomproduktseksempel 77 – Forbindelse lxxxi**

Til 20 ml av en metanoloppløsning av forbindelse lxxx (1 g, 2,56 mmol) settes 2N NaOH (3,2 ml, 6,4 mmol). Reaksjonsblandingen omrøres ved rundt romtemperatur over natten. På dette tidspunkt surgjøres reaksjonsblandingen til pH 3 ved bruk av 5N HCl. Reaksjonsblandingen fortynnes med 75 ml EtOAc, og vaskes med vann og saltoppløsning. Det således oppnådde, organiske sjikt tørkes og konsentreres under vakuum for å gi en rest som oppløses i CH₃CN:H₂O 1:1 for lyofilisering. Det oppnås til sammen rundt 1 g (100%) av forbindelse lxxxi:

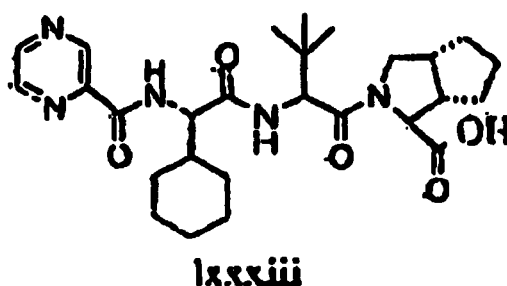
**lxxxi**

Mellomproduktseksempel 78 – Forbindelse lxxxii

10 ml av en diklormetanoppløsning av forbindelse lxxxi (2,56 mmol) behandles med HOAt (348 mg, 2,56 mmol) og DCC (2,56 ml, 1M, 2,56 mmol). Etter omrøring i 30 minutter behandles reaksjonsblandingen med 5 ml av en THF-oppløsning av forbindelse
 5 v (2,56 mmol). Etter omrøring ved rundt romtemperatur over natten, fjernes de hvite faststoffer (urea) ved filtrering. Filtratene konsentreres under vakuum for å gi en rest som renses ved silikagelkromatografi for å gi 1,4 g (100%) av forbindelse lxxxii:

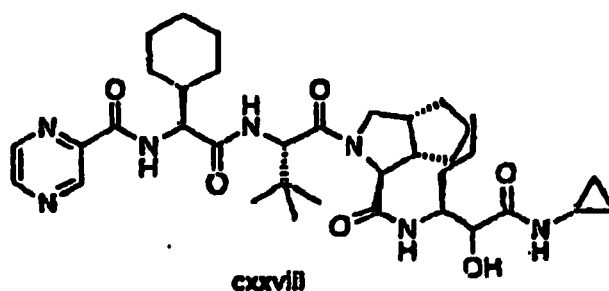
**Mellomproduktseksempel 79 – Forbindelse lxxxiii**

15 ml av en etanoloppløsning av forbindelse lxxxii (1,4 g, 2,58 mmol) behandles med 2N NaOH (2,58 ml, 5,17 mmol). Etter omrøring ved rundt romtemperatur over natten, surgjøres reaksjonsblandingen til pH med sur harpiks. Faststoffene filtreres av. De
 20 resulterende filtrater konsentreres under vakuum for å gi en rest som lyofiliseres for å gi 1,32 g (~100%) forbindelse lxxxiii

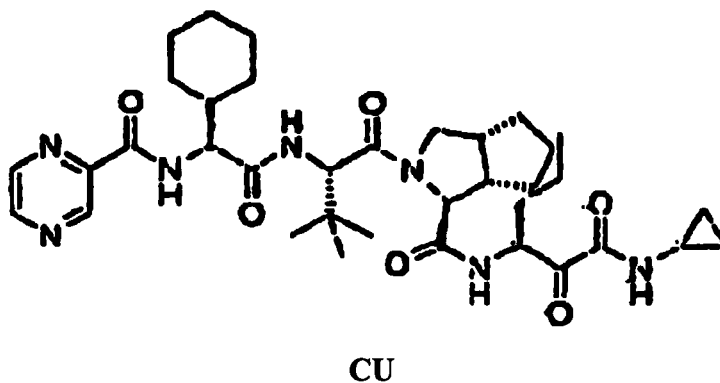


Mellomprodukt eksempel 126 – Forbindelse cxxviii

Forbindelse lxxxiii (400 mg, 0,78 mmol) oppløses i 5 ml DCM. PyBOP (610 mg, 1,2 mmol) settes til oppløsningen, fulgt av forbindelse xiii' (230 mg, 1,2 mmol). Til den resulterende blanding settes det DIPEA (0,2 ml, 1,2 mmol). Reaksjonsblandingen omrøres over natten under N₂. Reaksjonsblandingen fortynnes med EtOAc og den organiske fase vaskes med mettet NaHCO₃ og saltoppløsning. Etter konsentrering av den organiske fase, renses resten kromatografisk med 100% EtOAc → 5% EtOH:EtOAc for å gi forbindelse cxxviii (365 mg, 68,7%).

**Eksempel 27 – Forbindelsene CU.**

Forbindelse cxxviii (356 mg, 0,52 mmol) oppløses i 5 ml DCM. DMP-reagens (270 mg, 0,63 mmol) settes til denne oppløsning og det hele omrøres i 1 time. Reaksjonsblandingen quenches med 10% Na₂SO₃, hvorefter den organiske fase separeres og vaskes med mettet NaHCO₃ og saltoppløsning. Etter konsentrering av det organiske oppløsningsmiddel, renses resten kromatografisk med 100% EtOAc for å oppnå forbindelse CU i en mengde av 200 mg (56,3%) med smeltepunkt 225-235°C.



Massespektra [M] for CU vist i tabell 1:

TABELL 1

LY#	Eksempel	Funnet masse
	CU	679,2

Høy-resonansmassespektra, HRMS, for CU vist i tabell 2:

TABELL 2

10

Eksempel	Molekylformel (M+1)	Beregnet MS (M+1)	Funnet masse (M+1)
CU	C ₃₆ H ₅₄ N ₇ O ₆	680.4316	680.4128

Farmakologi

15 Forbindelsen ifølge oppfinnelsen er anvendbar for å inhibere HCV-protease og er derfor også anvendbar for inhibering av HCV-replikasjon.

Et tredje aspekt ved oppfinnelsen er følgelig rettet på anvendelse av en forbindelse ifølge det første aspekt ved oppfinnelsen, for fremstilling av et medikament for behandling av HCV-infeksjon.

20

Referanser her når det gjelder behandling av HCV-infeksjon skal være underforstått til å omfatte profylaktisk terapi for prevensjon eller inhibering av infeksjonen så vel som terapi av en etablert akutt eller kronisk HCV-infeksjon eller fysiologiske betingelser assosiert med HCV-infeksjon for i det vesentlige å helbrede pasienten for infeksjonen, 25 inhibere graden (mengden) av infeksjon eller forbedre de fysiologiske tilstander forbundet dermed.

30 "Effektiv mengde" er ment å beskrive en mengde av forbindelsen ifølge oppfinnelsen som er effektiv innenfor rammen av rimelig biologisk bedømmelse, egnet for bruk i kontakt med cellene i mennesker eller andre pattedyr uten urimelig toksisitet, irritasjon, allergisk respons og lignende, og er kommensuratet med en rimelig fordel/risikobetraktning i forbindelse med behandling av en HVC-infeksjon og dermed i de ønskede, terapeutiske effekter.

Fysiologiske tilstander slik de her beskrives inkluderer noen, men ikke alle, av de mulige kliniske situasjoner der en anti-HCV-behandling er på sin plass. Erfarne fagfolk på området er vel klar over de omstendigheter som krever en anti-HCV-behandling.

- 5 "Farmasøytiske preparater" betyr en blanding omfattende en forbindelse ifølge oppfinnelsen og minst en komponent valgt fra gruppen omfattende farmasøytisk akseptable bærere, diluenter, belegg, adjuvanter, eksipienser eller transportører, som preserveringsmidler, fyllstoffer, disintegratorer, fukte- og emulgeringsmidler, emul-
- 10 sjonsstabiliserende midler, suspensjonsmidler, isotoniserende midler, søtnings- og smaksstoffer, parfymer, fargestoffer, antibakterielle og antifungale midler, andre terapeutiske midler, smøremidler, adsorpsjonsforsinkende eller –fremmende midler og dispergeringsmidler, alt avhengig av arten av administrering og doseringsform. Preparatene kan presenteres i form av tabletter, piller, granuler, pulvere, vandige oppløsninger eller suspensjoner, injiserbare oppløsninger, eliksirer eller siruper. Eksempler på
- 15 suspensjonsmidler er etoksylerte isostearylalkoholer, polyoksyetylensorbitol og sorbitanestere, mikrokrySTALLinsk cellulose, aluminiummetahydroksyd, bentonitt, agar-agar og tragacant, eller blandinger av disse stoffer. Eksempler på antibakterielle og antifungale midler for prevensjon av virkningen av mikroorganismer inkludere parabener, klorbutanol, fenol, sorbinsyre og lignende. Eksempler på isotoniske midler er sukkere,
- 20 natriumklorid og lignende. Eksempler på adsorpsjonsforsinkende midler for å forlenge adsorpsjonen inkluderer aluminiummonostearat og gelatin. Eksempler på adsorpsjonsfremmende midler for å øke absorpsjonen inkluderer dimetylsulfoksyd og relaterte analoger. Eksempler på bærere, diluenter, oppløsningsmidler, transportører, oppløseliggjørende midler, emulgatorer og emulsjonsstabilisatorer omfatter vann, kloroform,
- 25 sucrose, etanol, isopropylalkohol, etylkarbonat, etylacetat, benzylalkohol, tetrahydrofurfurylalkohol, benzylbenzoat, polyoler, propylenglycol, 1,3-butylenglycol, glycerol, polyetylen glykoler, dimetylformamid, Tween® 60, Span® 80, cetostearylalkohol, myristylalkohol, glycerylmonostearat og natriumlaurylsulfat, fettsyreestere av sorbitan, vegetabiliske oljer (som bomullsfrø-, jordnøtt-, maisfrø-, oliven-, ricinus- og sesamolje)
- 30 og injiserbare, organiske estere som etyloleat og lignende, eller egnede blandinger av disse stoffer. Eksempler på eksipienser er lactose, melkesukker, natriumcitrat, kalsiumkarbonat, dikalsiumfosfat. Eksempler på disse integratorer er stivelse, alginsyrer og visse komplekse silikater. Eksempler på smøremidler er magnesiumstearat, natriumlaurylsulfat, talkum, så vel som polyetylen glycoler med høy molekylvekt.

35

Andre terapeutiske midler som kan benyttes i kombinasjon med en forbindelse ifølge oppfinnelsen, er andre anti-HCV-midler. Enkelte eksempler på kjente anti-HCV-midler

er immunomodulatoriske midler, som α -, β - eller γ -interferoner; pegylerte, derivatiserte interferon- α -forbindelser, andre antivirale midler som ribavirin og amantadin; andre inhibitorer av hepatitis C-protease; inhiberer av andre mål i HCV-livscyklusen inkludert helicase, polymerase, metalloprotease, indre ribosominngang, eller bred-spektrum anti-
 5 virale forbindelser som VX-497, en inhibitor av cellulær inosin-monofosfat-dehydrogenase, IMPDH (dekket av US 5 807 876); eller kombinasjoner derav. Terapeutiske midler som benyttes i kombinasjon med en forbindelse ifølge oppfinnelsen kan administreres separat, samtidig eller sekvensielt.

10 Valget av materialet i det farmasøytiske preparat annet enn forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse bestemmes generelt i henhold til de kjemiske egenskaper for den aktive forbindelse som oppløselighet, den valgte administreringsmodus og andre ting å ta hensyn til i farmasøytisk praksis. For eksempel kan eksipienser som lactose, natriumcitrat, kalsiumkarbonat, dikalsiumfosfat og disintegreringsmidler som stivelse,
 15 alginsyre og visse komplekse silikater, kombinert med smøremidler som magnesiumstearat, natriumlaurylsulfat og talkum, benyttes for fremstilling av tabletter.

De farmasøytiske preparater kan presenteres i assosierte former som tabletter, piller, granuler, pulvere, vandig oppløsninger eller suspensjoner, injiserbare oppløsninger,
 20 eliksirer eller siruper.

”Flytende doseringsform” betyr at dosen av den aktive forbindelse som skal administreres til pasientene foreligger i flytende form, for eksempel som farmasøytisk akseptable emulsjoner, oppløsninger, suspensjoner, siruper og eliksirer. I tillegg til de aktive
 25 forbindelser kan den flytende doseringsform inneholde inerte fortynnere slik de vanligvis benyttes i teknikken, videre oppløsningsmidler, oppløseliggjørende midler og emulgatorer.

Faste preparater kan også benyttes som fyllstoffer i myk- og hårdfylte gelatinkapsler ved bruk av drøymidler som lactose eller melkesukker så som polyetylenglycoler med
 30 høy molekylvekt, og lignende.

Når vandige suspensjoner benyttes, kan disse inneholde emulgeringsmidler eller midler som letter suspensjon.

35 Oljeaktig fase av et farmasøytisk emulsjonspreparat kan bestå av kjente bestanddeler på i og for seg kjent måte. Mens fasen kan omfatte bare en emulgator (eller kjent som en

emulgent), omfatter den helst en blanding av minst en emulgator med et fett eller en olje eller med både et fett og en olje. Fortrinnsvis er en hydrofil emulgator inkludert sammen med en lipofil emulgator som virker som stabilisator. Det er også foretrukket å inkludere både en olje og et fett. Sammen vil emulgatoren(e) med eller uten stabilisator(er) utgjøre den emulgerende voks og sammen med oljen og fettene utgjøre den emulgerende massebasis som utgjør den oljeaktige, dispergerte fase av kremformulering.

Hvis ønskelig kan den vandige fase i krembasen inkludere for eksempel minst 30 vekt-% av en polyhydroksyalkohol, for eksempel en alkohol med to eller flere hydroksylgrupper som propylenglycol, butan, 1,3-diol, mannitol, sorbitol, glycerol og polyetylen-glycol (inkludert PEG 400) og blandinger derav. De topiske formuleringer kan helst inkludere en forbindelse som forbedrer absorpsjonen eller penetrasjon av den aktive bestanddel gjennom huden eller andre affekterte områder.

Valget av egnede oljer eller fett for formuleringer er basert på å oppnå gode kosmetiske egenskaper. Således bør kremen fortrinnsvis være et ikke-fett, et ikke-flekkende og vaskbart produkt med egnet konsistens for å unngå lekkasje fra tuber eller andre beholdere. Rette eller forgrenede mono- eller dibasiske alkylestere som diisopropylmyristat, decyloleat og isopropylpalmitat, butylstearat, 2-etylheksylpalmitat eller en blanding av forgrenede estere kjent som Crodamol CAP, kan benyttes. Disse kan benyttes alene eller i kombinasjon avhengig av de ønskede egenskaper. Alternativt kan lipider med høyt smeltepunkt som for eksempel hvit myk paraffin og/eller flytende paraffin eller andre mineraloljer, benyttes.

I praksis kan en forbindelse/et farmasøytisk preparat ifølge oppfinnelsen administreres i en egnet formulering til mennesker og dyr ved topisk eller systemisk administrering inkludert oral, inhalatorisk, rektal, nasal, buccal, sublingual, vaginal, colonisk, parenteral (inkludert subkutan, intramuskulær, intravenøs, intradermal, intratekal og epidural), intracisternal og intraperitoneal administrering. Det vil erkjennes at den foretrukne vei kan variere med for eksempel mottagers tilstand.

"Farmasøytisk akseptabel doseringsform" henviser til doseringsformer for forbindelsen ifølge oppfinnelsen og inkluderer for eksempel tabletter, dragéer, pulvere, eliksirer, siruper, flytende preparater inkludert suspensjoner, spray, inhaleringstabletter, lozengers, emulsjoner, oppløsninger, granuler, kapsler og suppositorier, så vel som flytende preparater for injeksjon inkludert liposompreparater. Teknikker og formule-

ringer kan generelt finnes i Remingtons "Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, siste utgave.

"Formuleringer egnet for oral administrering" kan foreligge som diskrete enheter som kapsler, poser eller tabletter som hver inneholder en på forhånd bestemt mengde av den aktive bestanddel; som pulver eller granuler; som oppløsning eller suspensjon i en vandig eller ikke-vandig væske; eller som en flytende olje-i-vann-emulsjon eller flytende vann-i-olje-emulsjon. Den aktive bestanddel kan også foreligge som en bolus, elektuær eller pasta.

10

En tablett kan fremstilles ved støping, eventuelt med eller uten hjelpebestanddeler. Presedetabletter kan fremstilles ved en egnet maskin å komprimere den aktive bestanddel i en frittrislende form som pulver eller granuler, eventuelt blandet med et bindemiddel, smøremiddel, inert fortynner, et preserveringsmiddel, et overflateaktivt eller dispergerende middel. Støpte tabletter kan støpes i en egnet maskin av en blanding av de pulverformige forbindelser fuktet med en inert, flytende fortynner. Tablettene kan eventuelt belegges eller utstyres med hakk og formuleres for å gi langsom eller kontrollert frigiving av den aktive bestanddel.

20 Faste preparater for rektal administrering inkluderer suppositorier som er formulert i henhold til kjente metoder og inneholder minst en forbindelse ifølge oppfinnelsen.

Hvis ønskelig, og for mer effektiv fordeling, kan forbindelsene mikroinnkapsles i eller festes til et avleveringssystem for målrettet eller langsomfrigivning, for eksempel en biokompatibel og bionedbrytbar polymermatriks (for eksempel poly-(d,l-lactid-koglycolid)), liposomer og mikrosfærer, og injiseres subkutan eller intramuskulært ved en teknikk kalt subkutan eller intramuskulær depotadministrering for å tilveiebringe en kontinuerlig langsom frigivning av forbindelsen(e) i et tidsrom på 2 uker eller mer. Forbindelsene kan steriliseres, for eksempel ved filtrering gjennom et bakterie-tilbakeholdende filter, eller ved å innarbeide steriliserende midler i form av faste, sterile preparater som kan oppløses i sterilt vann, eller noe av det sterile, injiserbare medium umiddelbart før bruk.

35 "Formuleringer egnet for nasal eller inhalatorisk administrering" betyr formuleringer som benyttes i en form som er egnet for nasal administrering eller administrering ved inhalering. Formuleringen kan inneholde en bærer, i en pulverform, ved partikkelstørrelse for eksempel i området 1 til 500 mikron (inkludert partikkelstørrelser i om-

rådet mellom 20 og 500 mikron i inkremerter på 5 mikron som 30 mikron, 35 mikron, osv.) Egnede formuleringer der bæreren er en væske for administrering for eksempel som en nesenspray eller nesedråper, inkluderer vandige eller oljeaktige oppløsninger av den aktive bestanddel. Formuleringer som er egnet for aerosoladministrering kan fremstilles i henhold til konvensjonelle metoder og kan avleveres med andre terapeutiske midler. Inhalasjonsterapi kan lett administreres ved inhalatorer med tilmålte doser.

”Formuleringer egnet for oral administrering” betyr formuleringer som foreligger i en form egnet for administrering oralt til en pasient. Formuleringene kan presenteres som diskrete enheter som kapsler, poser eller tabletter som hver inneholder en på forhånd bestemt mengde av den aktive bestanddel; som pulver eller granuler; som oppløsning eller en suspensjon i en vandig væske eller en ikke-vandig væske; eller som en flytende olje-i-vann-emulsjon eller en flytende vann-i-olje-emulsjon. Den aktive bestanddel kan også foreligge som en bolus, elektuær eller en pasta.

”Formuleringer egnet for parenteral administrering” betyr formuleringer som foreligger i en form egnet for administrering parenteralt til en pasient. Formuleringene er sterile og inkluderer emulsjoner, suspensjoner, vandige eller ikke-vandige injeksjonsoppløsninger, som kan inneholde suspensjonsmidler og fortykningsmidler og anti-oksydanter, buffere, bakteriestater og oppløste stoffer som gjør formuleringen isotonisk, og har egnet justert pH-verdi tilpasset til den tilsiktede mottagers blod.

”Formuleringer egnet for rektal eller vaginal administrering” betyr formuleringer som foreligger i en form egnet for administrering rektalt eller vaginalt til en pasient. Formuleringene foreligger fortrinnsvis i form av suppositorier som kan fremstilles ved blanding av forbindelsene ifølge oppfinnelsen med egnede ikke-irriterende eksipienter eller bærere som kakaosmør, polyetylenglycol eller en suppositorievoks, som er faste ved vanlige temperaturer, men flytende ved kroppstemperatur, og som derfor smelter i rektum eller vaginalkaviteten og frigir den aktive bestanddel.

”Formuleringer egnet for systemisk administrering” betyr formuleringer som foreligger i en form egnet for administrering systemisk til en pasient. Formuleringen administreres fortrinnsvis ved injeksjon inkludert transmuskulær, intravenøs, intraperitoneal og subkutan injisering. For injisering blir forbindelsene ifølge oppfinnelsen formulert i flytende oppløsninger og særlig i fysiologisk kompatible buffere som Hanks oppløsning eller Ringers oppløsning. I tillegg kan forbindelsene formuleres i fast form og gjenoppløses eller suspenderes umiddelbart før bruk. Lyofiliserte former er også inkludert. Systemisk

administrering kan også skje ved transmucosale eller transdermale midler, eller forbindelsene kan administreres oralt. For transmucosal eller transdermal administrering benyttes det penetranter som er egnet for bæreren som skal gjennomtrenges, i formuleringen. Slike penetranter er generelt kjent i teknikken og inkluderer for eksempel gallesalter og fusidinsyrederivater for transmucosal administrering. I tillegg kan det benyttes detergenter for å lette gjennomtrengningen. Transmucosal administrering kan skje for eksempel via nesespray eller suppositorier. For oral administrering formuleres forbindelsene til konvensjonelle orale administreringsformer som kapsler, tabletter og lignende.

10

”Formuleringer egnet for topisk administrering” betyr formuleringer som er i en form egnet for administrering topisk til en pasient. Formuleringen kan foreligge som topiske preparater som salver og lignende masser, pulvere, spray og inhaleringsmidler, geler (vann- eller alkoholbaserte), kremer, slik det generelt er kjent, eller være innarbeidet i en matriksbase for anvendelse i en pute, noe som tillater en kontrollert frigivning av forbindelsen gjennom den transdermale barriere. Formulert i en salve eller lignende kan den eller de aktive bestanddeler benyttes sammen med enten en paraffinisk eller en vannblandbar påføringsbase. Alternativt kan de aktive bestanddeler formuleres til en krem med en olje-i-vann-krembase. Formuleringer som er egnet for topisk administrering i øyet inkluderer øyedråper, der den aktive bestanddel er oppløst eller suspendert i en egnet bærer, særlig et vandig oppløsningsmiddel for den aktive bestanddel. Formuleringer som er egnet for topisk administrering i munnen inkluderer lozengers omfattende den eller de aktive bestanddeler i en smakssatt basis, vanligvis sucrose og akasia eller tragacant; pastiller som omfatter den aktive bestanddel i en inert base som gelatin og glycerol, eller sucrose og akasia; og munnvask omfattende den aktive bestanddelen i en egnet flytende bærer.

15

20

25

30

35

”Fast doseringsform” betyr en doseringsform av forbindelsen ifølge oppfinnelsen der formen har en fast form som kapsler, tabletter, piller, pulvere, dragéer eller granuler. I slike faste doseringsformer er forbindelsen ifølge oppfinnelsen blandet med minst en inert, vanlig eksipiens (eller bærer) som natriumcitrat eller dikalsiumfosfat eller

- (a) fyllstoffer eller drøyere som for eksempel stivelser, lactose, sucrose, glucose, mannitol og silisiumsyre,
- (b) midler som for eksempel karboksymetylcellulose, alginater, gelatin, polyvinylpyrrolidon, sucrose og akasia,
- (c) fuktmidler som for eksempel glycerol,

- (d) disintegreringsmidler som for eksempel agar-agar, kalsiumkarbonat, potet- eller tapioca-stivelse, alginsyre, visse komplekse silikater og natriumkarbonat,
 - (e) oppløsningsforsinkere som for eksempel paraffin,
 - (f) absorpsjonsakseleratorer som for eksempel kvaternære ammoniumforbindelser,
 - 5 (g) fuktemidler som for eksempel cetylalkohol og glycerolmonostearat,
 - (h) adsorbenter som for eksempel kaolin og bentonitt,
 - (i) smøremidler som for eksempel talkum, kalsiumstearat, magnesiumstearat, faste polyetylglycoler, natriumlaurylsulfat,
 - (j) opacifiserende midler,
 - 10 (k) buffermidler og
- midler som frigir forbindelsen ifølge oppfinnelsen i en viss del av kroppens innvendige kanaler på forsinket måte.

De reelle dosenivåer for den eller de aktive bestanddeler i preparatet ifølge oppfinnelsen kan varieres for å oppnå en mengde av disse som er effektiv for å oppnå en ønsket, terapeutisk respons for et spesielt preparat og en spesiell administreringsmodus for en pasient. Et valgt dosenivå for en hvilken som helst spesiell pasient avhenger derfor av et antall faktorer inkludert den ønskede terapeutiske effekt, administreringsvei, den ønskede varighet for behandlingen, sykdommens alvor og etiologi, pasientens tilstand, vekt, kjønn, diett og alder, type potens for hver aktiv bestanddel, absorpsjons-, meta-

20 bolisme- og/eller utskillingshastigheter og andre faktorer.

Den totale daglige dose for oppfinnelsens forbindelse ved administrering til en pasient i enkle eller oppdelte doser kan være i mengder for eksempel fra rundt 0,001 til rundt 100 mg/kg kroppsvekt daglig og ligger fortrinnsvis fra 0,01 til 10 mg/kg/dag. For voksne ligger for eksempel dosene fra rundt 0,01 til 100, fortrinnsvis 0,01 til rundt 10 mg/kg kroppsvekt pr. dag ved inhalering, fra rundt 0,01 til rundt 100, fortrinnsvis 0,1 til 70 og helst 0,5 til 10 mg/kg kroppsvekt pr. dag ved oral administrering og fra rundt 0,01 til rundt 50, fortrinnsvis 0,01 til 10 mg/kg kroppsvekt pr. dag ved intravenøs admini-

30 strering. Prosentandelen aktiv bestanddel i preparatene kan varieres selv om de bør utgjøre en andel slik at egnede doser oppnås. Enhetsdosepreparatene kan inneholde slike mengder eller slike submultipli derav for å tildanne den daglige dose. Åpenbart kan flere enhetsdoseformer administreres samtidig. En dose kan administreres så ofte det er nødvendig for å sikre den ønskede, terapeutiske effekt. Noen pasienter responderer

35 hurtig på høyere eller lavere doser og kan finne en meget svakere opprettholdelse tilstrekkelig. For andre pasienter kan det være nødvendig å ha langtidsbehandlinger i mengde på 1 til 4 doser pr. dag i henhold til de fysiologiske krav for hver enkelt pasient.

Det skulle ikke være nødvendig å si at for andre pasienter, behøver det ikke være nødvendig med mer enn en eller to doser pr. dag.

Formuleringene kan omdannes til enhetsdoseformer ved en hvilken som helst av farmasiens kjente metoder. Slike metoder inkluderer å bringe den aktive bestanddel i forbindelse med bæreren som utgjør en eller flere hjelpebestanddeler. Generelt fremstilles formuleringene ved enhetlig og grundig å bringe den aktive bestanddel i forbindelse med flytende bærere eller finoppdelte, faste bærere eller begge deler og så, hvis nødvendig, å formgi produktet.

Formuleringene kan presenteres i enhetsdose- eller multidosebeholdere, for eksempel forseglede ampuller og lignende med elastomere tette innretninger, og kan lagres i frysetørket (lyofilisert) tilstand som kun krever tilsetning av steril flytende bærer som vann for injeksjon, umiddelbart før bruk. Egnede injeksjonsoppløsninger og –suspensjoner kan fremstilles fra sterile pulvere, granuler og tabletter på den ovenfor beskrevne måte.

Forbindelsen innenfor oppfinnelsens ramme viser en markert farmakologisk aktivitet i henhold til tester som er beskrevet i litteraturen og også nedenfor, idet testresultatene antas å korrelere med den farmakologiske aktivitet hos mennesker og andre pattedyr.

In vitro-enzymanalyseprosedyrer

Inhibering av HCV-NS3-serin-protease

HCV-NS3-proteasedomenet ble uttrykt og rensset som beskrevet tidligere (Vertex, WO 98/17679). Den kromogeniske peptidsubstans, EDVVA_{bu}C-p-nitroanilid og NS4A-kofaktorfragmentet (-KKGSVVIVGRIVLSGK-) for NS3-protease ble syntetisert på vanlig måte av American Peptide Com, California. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen ble testet med henblikk på deres evne til å inhibere HCV-NS3-protease-aktiviteten ved bruk av en spektrofotometrisk analyse med EDVVA_{bu}C-p-nitroanilid som substrat. Analysen ble kjørt i en 96-brønners mikrotiterplate ved bruk av en SpectraMax 250-leser (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) med kinetisk kapabilitet. Spalting av EDVVA_{bu}C-p-nitroanilid (500 µM) substratet ved rensset HCV-NS3-protease (0,5 µM) ble gjennomført ved 30°C i bufferen inneholdende 30 µM NS4A-fragment, 46 mM Hepes, pH 8,0, 92 mM NaCl, 18% glycerol, 5 mM DTT og 7,5% DMSO i fravær eller nærvær av forbindelsen under utøving. Reaksjonen ble overvåket for pNA (p-nitroanilin) frigivning ved 405 nm.

Bestemmelsen av de kinetiske parametrene inkludert V_{maks} , K_m og V_{maks}/K_m ble gjennomført under betingelser som beskrevet ovenfor. K_i -verdiene er beregnet fra hastigheten mot [inhibitor]-plottene, ved fikserte konsentrasjoner for enzym og substrat, ved en ikke-lineær minst kvadrat tilpasning av data til Morrisons ligning for kompetitiv bindingsinhibering [J.F. Morrison, "Biochim. Biophys. Acta", 185, 269-286 (1969)].
 5 Prism-programmet (GraphPad Software, Inc.) ble benyttet for denne prosedyre.

HCV-serin-protease-inhibitorer som beskrives her kan benyttes i kombinasjon med andre molekyler som direkte viser eller indirekte utløser anti-HCV-aktivitet enten
 10 profylaktisk i pasienter som har en risiko for å få HCV-infeksjon, eller for å behandle pasienter som allerede er infektet. Uttrykket "anti-HCV-aktivitet" henviser til evnen hos et molekyl, når det er til stede, til fullstendig å inhibere eller redusere akkumuleringen av HCV-virioner sammenlignet med HCV-virion-akkumuleringen i fravær av et slikt molekyl, og/eller evnen for et molekyl til å redusere eller forbedre betingelser
 15 eller symptomer assosiert med HCV-infeksjon eller patogenese hos pasienter. Molekyler med anti-HCV-aktivitet inkluderer de som forstyrrer et eller flere trinn i HCV-infeksjonen eller –replikasjonen, så vel som de som evokerer immunomodulering og antiproliferative aksjoner i vertscellene. Molekyler med anti-HCV-aktivitet kan inhibere HCV-spesifikke replikative evenementer som, men ikke begrenset til, HCV-rettet
 20 nukleinsyre- eller –proteinsyntese. Trinn i HCV-replikasjonen der molekylene med anti-HCV-aktivitet kan virke inkluderer celleinngang (for eksempel festing; penetrering); avdekking og frigjøring av HCV-genomet; replikasjon av HCV-genomet (for eksempel replikasjon av hver streng av det virale RNA-genom; transkripsjon av viral meddeler-RNA); translasjon av HCV-proteiner; posttranslasjonell modifikasjon av HCV-proteiner
 25 (for eksempel proteolytisk spalting; glycosylering); intracellulær transport av virale proteiner; sammensetning av virionkomponenter; og frigivning av virale partikler (for eksempel budding). Klasser av molekyler med antiviral aktivitet inkluderer, men er ikke begrenset til, oppløselige reseptor-decoys og antireseptorantistoffer; ionekanalblokkere, kapsidstabilisatorer og fusjonsprotein-inhibitorer; inhibitorer av virale polymeraser,
 30 revers transkriptase, helikase, primase eller integrase; antisens-oligonukleotider og ribozymmer; immunomodulerings- og immunostimuleringsmidler, inkludert cytokiner som interferoner, så vel som peptidantagonister, steroider og klassiske medikamenter som levamisol; inhibitorer av regulatoriske proteiner; protease-inhibitorer; sammensetningsprotein-inhibitorer; og antivirale antistoffer og cytotoxiske lymfocytter. Uttrykket
 35 "anti-HCV-effektiv mengde" eller "farmasøytisk effektiv mengde" henviser til en mengde av en forbindelse, eller en kombinasjon av forbindelser, som beskrevet her, som er effektiv for å redusere eller forbedre betingelser eller symptomer assosiert med HCV-

infeksjon eller assosiert patogenese hos pasienter, eller å redusere virale nivåer in vitro eller in vivo. In vitro-applikasjoner inkluderer replicon-analysesystemet som beskrevet nedenfor, der slike mengder er effektive for redusering av HCV-replikon RNA-akkumuleringen og/eller akkumuleringen av proteiner kodet av gener inneholdt deri.

5

Forbindelsene med anti-HCV-aktivitet som er omfattet for anvendelse i preparatene inkluderer, men er ikke begrenset til, immunomodulatoriske molekyler inkludert immunostimulatoriske cytokiner, og andre forbindelser kjente for å ha HCV-antiviral aktivitet, som forskjellige antivirale nukleosider og nukleotider.

10

Immunomodulatoriske molekyler som det er tatt sikte på for bruk i kombinasjon med HCV-serin-protease-inhibitorene som beskrevet her inkluderer, men er ikke begrenset til, interferon- α 2B (Intron A, Schering Plough); Rebatron (Schering Plough, Interferon- α 2B + ribavirin); pegylert interferon- α (K.R. Reddy et al., "Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon alpha-2a compared with interferon alpha-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C", "Hepatology", 33, 433-438 (2001)); konsensus-interferon (J.H. Kao, P.J. Chen, M.Y. Lai & D.S. Chen, "Efficacy of consensus interferon in the treatment of chronic hepatitis C", "J. Gastroenterol. Hepatol.", 15, 1418-1423 (2000)); interferon- α 2A (A. Roferon; Roche); lymfoblastoid eller "naturlig" interferon; interferon τ (P. Clayette et al., "IFN-tau, a new interferon type I with anti-retroviral activity", "Pathol. Biol." (Paris) 47, 553-559 (1999)); interleukin 2 (G.L. Davis, D.R. Nelson & G.R. Reyes, "Future options for the management of hepatitis C", "Seminars in Liver Disease", 19, 103-112 (1999)); interleukin 6 (G.L. Davis, D.R. Nelson & G.R. Reyes, "Future options for the management of hepatitis C", "Seminars in Liver Disease", 19, 103-112 (1999)); interleukin 12 (G.L. Davis, D.R. Nelson & G.R. Reyes, "Future options for the management of hepatitis C", "Seminars in Liver Disease", 19, 103-112 (1999)); ribavirin; og forbindelser som forbedrer utviklingen av en type 1 helper-T-cellerespons (G.L. Davis, D.R. Nelson & G.R. Reyes, "Future options for the management of hepatitis C", "Seminars in Liver Disease", 19, 103-112 (1999)). Interferoner kan forbedre virale infeksjoner ved å utøve direkte antivirale effekter og/eller ved å modifisere immunresponsen mot infeksjon. De antivirale effekter av interferoner er ofte medierte via inhibering av viral penetrering eller avdekking; syntese av viral RNA, translatering av virale proteiner, og/eller viral sammensetning og frigjøring.

35

Forbindelser som stimulerer syntesen av interferon i celler (E.B. Tazulakhova, O.V. Parshina, T.S. Gusev & F.I. Ershov, "Russian Experience in Screening, Analysis and

Clinical Application of Novel Interferon Inducers", "J. Interferon Cytokine Res.", 21-65-73) inkluderer uten begrensning, dobbelstrengt RNA, alene eller i kombinasjon med tobramycin, og Imiquimod (3M Pharmaceuticals) (D.N. Sauder, "Immunomodulatory and pharmacologic properties of imiquimod.", "J. Am. Acad. Dermatol.", 43, sidene 6-11 (2000)).

Andre forbindelser som er kjente for å ha eller som kan ha, HCV-antiviral-aktivitet på grunn av ikke-immunomodulatoriske mekanismer inkluderer, uten begrensning, Ribavirin ("ICN Pharmaceuticals"); inosin-5'-monofosfatdehydrogenase-inhibitorer (VX-497, utviklet av Vertex Pharmaceuticals); amantadin og rimantadin (A.M. Younossi og R.P. Perillo, "The roles of amantadine, rimantadine, ursodeoxycholic acid, NSAIDs, alone or in combination with alpha interferons, in the treatment of chronic hepatitis C", "Seminars in Liver Disease", 19, 95-102 (1999)); LY217896 (US 4 835 168) (J.M. Colacino et al. "Evaluation of the anti-influenza virus activities of 1,3,4-thiadiazol-2-ylcyanamide (LY217896) and its sodium salt.", "Antimicrobial Agents & Chemotherapy", 34, 2156-2163 (1990)); og 9-hydroksyimino-6-metoksy-1,4a-dimetyl-1,2,3,4,4a,9,10,10a-oktahydro-fenantren-1-karboksylysyre-metylester; 6-metoksy-1,4a-dimetyl-9-(4-metylpipezazin-1-ylimino)-1,2,3,4,4a,9,10,10a-oktahydro-fenantren-1-karboksylysyre-metylester.hydroklorid; 1-(2-klorfenyl)-3-(2,2-difenyletyl)-urea (US 6 127 422).

Formuleringer, doser og administreringsruter for de ovenfor angitte molekyler er enten beskrevet i referansene eller er som angitt nedenfor eller er velkjente i teknikken som for eksempel beskrevet hos F.G. Hayden i "Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics", 9. utgave, Hardman et al., utgivere, McGraw-Hill, New York (1996), kapittel 50, sidene 1191-1223 og de deri angitte referanser. Alternativt kan, når først en forbindelse som viser HCV-antiviral aktivitet er identifisert, en farmasøytisk effektiv mengde av forbindelsen bestemmes ved bruk av teknikker som er velkjente for fagmannen, merk for eksempel Benet et al. i "Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics", 9. utgave, Hardman et al., utgivere, McGraw-Hill, New York (1996), kapittel 1, sidene 3-27 og de deri angitte referanser. Således kan egnede formuleringer, doseområder og doseregimer, for en slik forbindelse, lett bestemmes ved rutinemetoder.

Medikamentkombinasjonene ifølge oppfinnelsen kan tilveiebringes til en celle eller til celler, eller til en human pasient, enten i separate, farmasøytisk akseptable formuleringer administrert samtidig eller sekvensielt, formuleringer inneholdende mer enn et

terapeutisk middel, eller ved et assortiment av enkeltmiddel- og flermiddelformuleringer. Uansett hvordan administreringen skjer, utgjør disse medikamentkombinasjoner en anti-HCV-effektiv mengde av komponenter.

- 5 Et stort antall andre immunomodulatorer eller immunostimulanter som kan benyttes ved de her beskrevne metoder er i dag tilgjengelige og inkluderer: AA-2G; adamantylamid-dipeptid; adenosindeaminase; Enzon; adjuvant, Alliance; adjuvanter, Ribic; adjuvanter, Vaxcel; Adjuvax; agelasphin-11; AIDS-terapi, Chiron; algalglucan, SRI; algammulin, Anutech; Anginlyc; anticellulære faktorer, Yeda; Anticort; antigastrin-17-immunogen, Ap; antigenavleveringssystem, Vac; antigenformulering, IDBC; antiGnRH immunogen, Apton; antiherpin, Arbidol; azarol; Bay-q-8939; Bay-r-1005; BCH-1393; Betafectin; Biostim; BL-001; BL-009; Broncostat; Cantastim; CDRI-84-246; cefodizim; chemokin-inhibitorer, ICOS; CMV-peptider, City of Hope; CN-5888; cytokin-frigivende middel, St; DHEAS, Paradigm; DISC TA-HSV; J07B; I01A; I01Z; ditiokarb-natrium; ECA-10-142; ELS-1; endotoksin, Novartis; FCE-20696; FCE-24089; FCE-24578; FLT-3-ligand, Immunex; FR-900483; FR-900494; FR-901235; FTS-Zn; G-proteiner, Cadus; glutapcin; glutaurin; glycofosfopeptikal; GM-2; GM-53; GMDP; vekstfaktorvaksine, EntreM; H-BIG, NABI; H-CIG, NABI; HAB-439; Helicobacter pylori-vaksine; herpes-spesifikk immunfaktor; HIV-terapi, United Biomed; HyperGAM+CD; ImmuMax; 10 Immun BCG; immunterapi, Connective; immunomodulator, Evans; immunomodulatorer, Novacell; imreg-1; imreg-2; Indomune; inosin pranobex; interferon, Dong-A (α 2); interferon, Genentech (γ); interferon, Novartis (α); interleukin-12, Genetics Ins; interleukin-15, Immunex; interleukin-16, Research Cor; ISCAR-1; J005X, L-644257; licomarsminsyre; LipoTher; LK-409; LK-410; LP-2307; LT (R1926); LW-50020; 15 MAF, Shionogi; MDP-derivater, Merck; met-enkefalin, TNI; metylfurylbutyrolactoner; MIMP; mirimostim; blandet bakteriell vaksine, Tem; MM-2; moniliastat; MPLA, Ribic; MS-705; murabutid; murabutid, Vacsyn; muramyldipeptidderivat; muramylpeptid-derivatmyelopid; -563; NACOS-6; NH-765; NISV, Proteus; NPT-16416; NT-002; PA-485; PEFA-814; peptider, Scios, peptidoglycn, Plica; Perthon, Advanced Plant; PGM-derivat, Pliva; Farmaprojekter nr. 1099; nr. 1426; nr.1549; nr. 1585; nr. 1607; nr. 1710; 20 nr. 1779; nr. 2002; nr. 2060; nr. 2795; nr. 3088; nr. 3111; nr. 3345; nr. 3467; nr. 3668; nr. 3998; nr. 3999; nr. 4089; nr. 4188; nr. 4451; nr. 4500; nr. 4689; nr. 4833; nr. 494; nr. 5217; nr. 530; pidotimod; pimelautid; pinafid; PMD-589; podofyllotoksin, Conpharm; POL-509; poly-ICLC; poly-ICLC, Yamasa Shoyu; PolyA-PolyU; poly-sakkarid A; protein A, Berlox Bioscience; PS34WO; Pseudomonas MAbs, Teijin; 25 Psomaglobin; PTL-78419; Pyrexol; pyriferon; Retrogen; Retropep; RG-003; Rhinostat; rifamaxil; RM-06; Rollin; romurtid; RU-40555; RU-41821; Rubella-antistoffer, ResCo;

S-27609; SB-73; SDZ-280-636; SDZ-MRL-953; SK&F-107647; SL04; SL05; SM-4333; Solutein; SRI-62-834; SRL-172; ST-570; ST-789; stafaglysat; Simulon; suppressin; T-150R1; T-LCEF; tabilautid; temertid; Theradigm-HBV; Theradigm-HPV; Theradigm-HSV; THF, Pharm & Upjohn; THF, Yeda; tymalfasin; tymikk hormon-fraksjoner; tymocatin; tymolymfotropin; tymopentin; tymopentin-analoger; tymopentin, Peptech; tymosinfraksjon 5, α ; tymostimulin; tymotrinan; TMD-232; TO-115; overføringsfaktor, Viragen; tuftsin, Selavo; ubenimex; Ulsastat; ANGG-; CD-4+; Collag+; COLSF+; COM+; DA-A+; GAST-; GF-TH+; GP-120-; IF+; IF-A+; IF-A-2+; IF-B+; IF-G+; IF-G-1B+; IL-2+; IL-12+; IL-15+; IM+; LHRH-; LPCOR+LLYM-B+; LYM-NK+; LYM-T+; OPI+; PEP+; PHG-MA+; RNA-SYN-; SY-CW-; TH-A-1+; TH-5+; TNF+; UN.

Representative nukleosid- og nukleotidforbindelser som kan benyttes ifølge oppfinnelsen inkluderer, men er ikke begrenset til:

- (+)-cis-5-fluor-1-[2-(hydroksymetyl)-[1,3-oksatiolan-5-yl]cytosin;
- (-)-2'-deoksy-3'-tiocytidin-5'-trifosfat (3TC);
- (-)-cis-5-fluor-1-[2-(hydroksymetyl)-[1,3-oksatiolan-5-yl]cytosin (FTC);
- (-)-2',3'-dideoksy-3'-tiacytidin-[(-)-SddC];
- 1-(2'-deoksy-2'-fluor- β -D-arabinofuranosyl)-5-iodcytosin (FIAC);
- 1-(2'-deoksy-2'-fluor- β -D-arabinofuranosyl)-5-iodcytosintrifosfat (FIACTP);
- 1-(2'-deoksy-2'-fluor- β -D-arabinofuranosyl)-5-metylluracil (FMAU);
- 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-karboksamid;
- 2',3'-dideoksy-3'-fluor-5-metyl-deoksycytidin (FddMeCyt);
- 2',3'-dideoksy-3'-klor-5-metyl-deoksycytidin (ClddMeCyt);
- 2',3'-dideoksy-3'-amino-5-metyl-deoksycytidin (AddMeCyt);
- 2',3'-dideoksy-3'-fluor-5-metyl-cytidin (FddMeCyt);
- 2',3'-dideoksy-3'-klor-5-metyl-cytidin (ClddMeCyt);
- 2',3'-dideoksy-3'-amino-5-metyl-cytidin (AddMeCyt);
- 2',3'-dideoksy-3'-fluorthymidin (FddThd);
- 2',3'-dideoksy- β -L-5-fluorocytidin (β -L-FddC);
- 2',3'-dideoksy- β -L-5-tiacytidin;
- 2',3'-dideoksy- β -L-5-cytidin (β -L-ddC);
- 9-(1,3-dihydroksy-2-propoksymetyl)guanin;
- 2'-deoksy-3'-tia-5-fluorcytosin;
- 3'-amino-5-metyl-deoksycytidin (AddMeCyt);
- 2-amino-1,9[(2-hydroksymetyl-1-(hydroksymetyl)etoksy)metyl]-6H-purin-6-on (gancyklovir);

- 2-[2-(2-amino-9H-purin-9-yl)etyl]-1,3-propandildiacetat (famciklovir);
 2-amino-1,9-dihydro-9-[(2-hydroksyetoksy)metyl]-6H-purin-6-on (acyklovir);
 9-(4-hydroksy-3-hydroksymetyl-but-1-yl)guanin (penciklovir);
 9-(4-hydroksy-3-hydroksymetyl-but-1-yl)-6-deoksy-guanindiacetat (famciklovir);
 5 3'-azido-3'-deoksythymidin (AZT);
 3'-klor-5-metyl-deoksytidin (ClddMeCyt);
 9-(2-fosfonylmetoksyetyl)-2',6'-diaminopurin-2',3'-dideoksyribosid;
 9-(2-fosfonylmetoksyetyl)adenin (PMEA);
 acyklovirtrifosfat (ACVTP);
 10 D-karboksytsyre-2'-deoksyguanosin (CdG);
 dideoksy-cytidin;
 dideoksy-cytosin (ddC);
 dideoksy-guanin (ddG);
 dideoksy-inosin (ddI);
 15 E-5-(2-bromvinyl)-2'-deoksyuridintrifosfat;
 fluor-arabinofuranosyl-ioduracil;
 1-(2'-deoksy-2'-fluor-1-β-D-arabinofuranosyl)-5-iod-uracil (FIAU);
 stavudin;
 9-β-D-arabinofuranosyl-9H-purin-6-amino.monohydrat (Ara-A);
 20 9-β-D-arabinofuranosyl-9H-purin-6-amin-5'-monofosfat.monohydrag (Ara-AMP);
 2-deoksy-3'-tia-5-fluorcytidin;
 2',3'-dideoksy-guanin; og
 2',3'-dideoksy-guanosin.
- 25 Syntetiske metoder for fremstilling av nukleosider og nukleotider som kan anvendes
 ifølge oppfinnelsens konsept er velkjente i teknikken som beskrevet i "Acta Biochim.
 Pol.", 43, 25-36 (1996); "Swed. Nucleosides Nucleotides", 15, 361-378 (1996);
 "Synthesis", 12, 1465-1479 (1995); "Carbohydr. Chem.", 27, 242-276 (1995); "Chem.
 Nucleosides Nucleotides", 3, 421-535 (1994); "Ann. Reports in Med. Chem.",
 30 Academic Press og "Exp. Opin. Invest. Drugs", 4, 95-115 (1995).

De kjemiske reaksjoner som er beskrevet i referansene som angitt ovenfor er generelt
 beskrevet uttrykt ved den bredeste applikasjon til fremstilling av forbindelser ifølge
 oppfinnelsen. Leilighetsvis kan reaksjonene være lite anvendelige som beskrevet for
 35 hver forbindelse som ligger innenfor rammen av de her beskrevne forbindelser. Forbin-
 delsene der dette skjer, vil lett erkjennes av fagmannen. I alle slike tilfeller kan enten
 reaksjonen gjennomføres med hell ved konvensjonelle modifikasjoner som velkjente for

fagmannen, for eksempel ved egnet beskyttelse av interfererende grupper, ved å endre til alternative konvensjonelle reagenser, ved rutinemodifikasjon av reaksjonsbetingelsene og lignende, eller andre reaksjoner som beskrevet her og ellers konvensjonelle, vil kunne anvendes ved fremstilling av de tilsvarende forbindelser ifølge oppfinnelsen. I alle preparative metoder er alle utgangsstoffer velkjente eller lett tilgjengelige fra kjente utgangsstoffer.

Mens nukleosid-analoger generelt benyttes som antivirale midler slik de er, må nukleotider (nukleosidfosfater) noen ganger konverteres til nukleosider for å lette deres transport gjennom cellemembraner. Et eksempel på et kjemisk modifisert nukleotid som er i stand til å trenge inn i celler er S-1-3-hydroksy-2-fosfonylmetoksypropylcytosin (HPMPC, Gilead Sciences). Nukleosid- og nukleotidforbindelser ifølge oppfinnelsen som er syrer kan danne salter. Eksempler på salter er slike med alkalimetaller eller jordalkalimetaller som natrium, kalium, kalsium eller magnesium, eller med organiske baser eller basiske, kvaternære ammoniumsalter.

Immunomodulatorer og immunostimulatorer som er brukbare i kombinasjonsterapi-metoder ifølge oppfinnelsen kan administreres i mengder lavere enn de som er konvensjonelle i teknikken. For eksempel kan interferon- α karakteristisk administreres til mennesker for behandling av HCV-infeksjoner i en mengde fra rundt 1×10^6 enheter/person tre ganger pr. uke til rundt 10×10^6 enheter/person tre ganger pr. uke (Simon et al., "Hepatology" 25: 445,448 (1997)). I de her beskrevne metoder og preparater kan denne dose ligge i området fra rundt $0,1 \times 10^6$ enheter/person tre ganger pr. uke til rundt $7,5 \times 10^6$ enheter/person tre ganger pr. uke, mer spesielt fra rundt $0,5 \times 10^6$ enheter/person tre ganger pr. uke til rundt 5×10^6 enheter/person tre ganger pr. uke; og aller helst fra rundt 1×10^6 enheter/person tre ganger pr. uke til rundt 3×10^6 enheter/person tre ganger pr. uke. På grunn av den forbedrede hepatitt-C-virus-antivirale effektivitet for immunomodulatorene og immunostimulatorene i nærvær av HCV-serin-protease-inhibitorer ifølge oppfinnelsen, kan reduserte mengder av disse immunomodulatorer/immunostimulatorer benyttes i de her beskrevne metoder og preparater. På grunn av forbedret hepatitt-C-virus-antiviral effektivitet for de her beskrevne HCV-serin-protease-inhibitorer i nærvær av immunomodulatorer og immunostimulatorer, kan på tilsvarende måte reduserte mengder av disse HCV-serin-proteaseinhibitorer benyttes i metodene og preparatene som her beskrevet. Slike reduserte mengder kan bestemmes ved rutineforsøk ved overvåking av hepatitt-C-virustitertil smittede pasienter som undergår terapi. Dette kan gjennomføres for eksempel ved å overvåke HCV RNA-verdiene hos pasienters serum ved slot-blot-, dot-blot- eller RT-PCR-teknikker, eller

ved måling av HCV-overflaten eller andre antigener. Pasienter kan likeledes overvåkes under kombinasjonsterapi under anvendelse av HCV-serin-protease-inhibitorer som her beskrevet og andre forbindelser med anti-HCV-aktivitet, for eksempel nukleosid- og/eller nukleotid-antivirale midler for å bestemme de lavest effektive doser for hver når de benyttes i kombinasjon.

Antivirale nukleosid- eller nukleotidforbindelser, eller blandinger derav, kan administreres til mennesker i en mengde innen området fra rundt 0,1 mg/person/dag eller rundt 500 mg/person/dag; fortrinnsvis fra rundt 10 mg/person/dag til rundt 300 mg/person/dag; mer foretrukket fra rundt 25 mg/person/dag til rundt 200 mg/person/dag; enn mer foretrukket fra rundt 50 mg/person/dag til rundt 150 mg/person/dag; og aller helst fra området rundt 1 mg/person/dag til rundt 50 mg/person/dag.

Doser av forbindelsene kan administreres til en pasient i en enkelt dose eller i proporsjonale multiple subdoser. I det sistnevnte tilfellet kan enhetsdosepreparatet inneholde slike mengder av submultipli derav til at det utgjør daglig dose. Multiple doser pr. dag kan også øke den totale daglige dose hvis dette skulle bestemmes av fagmannen som foreskriver medikamentet.

Regimet for behandling av en pasient som lider av en HCV-infeksjon med forbindelsen og/eller preparatet ifølge oppfinnelsen velges i henhold til en varietet av faktorer inkludert alder, vekt, kjønn, diett og medisinsk tilstand hos pasienten, infeksjonens alvor, administrasjonsmodus, farmakologiske betraktninger som aktivitets-, effektivitets-, farmakokinetisk- og toksikologisk profiler for den spesielle forbindelse som benyttes samt hvorvidt det benyttes et medikamentavleveringssystem. Administrering av medikamentkombinasjoner som beskrevet her bør generelt fortsettes over et tidsrom på flere uker til flere måneder eller år inntil virustiteren når aksepterbare nivåer, noe som indikerer at infeksjonen er under kontroll eller er utslettet. Pasienter som undergår behandling med medikamentkombinasjoner som her beskrevet kan rutinemessig overvåkes ved måling av virale hepatitt-RNA-nivåer i pasientens serum ved slot-blot-, dot-blot- eller RT-PCR-teknikker eller måling av virale hepatitt-C-antigener som overflate-antigener, i serum for å bestemme terapi-effektiviteten. Kontinuerlig analyse av data som oppnås ved disse metoder tillater modifikasjon av behandlingsregimet under terapien slik at optimale mengder av hver komponent i kombinasjonen administreres, og slik at behandlingsvarigheten også kan bestemmes. Således kan behandlingsregimet/doseringsoppsettet modifiseres rasjonelt i løpet av terapien slik at de lavest

mulige mengder av hver av de antivirale forbindelser som benyttes i kombinasjon med hverandre som viser tilfredsstillende anti-hepatitt-C-virus-effektivitet administreres, og slik at administreringen av slike antivirale forbindelser i kombinasjonen fortsetter kun så lenge det er nødvendig å behandle infeksjonen.

5

Forbindelsen ifølge oppfinnelsen, som her beskrevet, kan forekomme i et antall kombinasjoner med de foregående og tilsvarende typer forbindelser med anti-HCV-aktivitet for behandling eller prevensjon av HCV-infeksjoner hos pasienter. For eksempel kan en eller flere HCV-serin-protease-inhibitorer benyttes i kombinasjon med:

10 et eller flere interferoner eller interferonderivater med anti-HCV-aktivitet; en eller flere ikke-interferonforbindelser med anti-HCV-aktivitet; eller et eller flere interferoner eller interferonderivater med anti-HCV-aktivitet og en eller flere ikke-interferonforbindelser med anti-HCV-aktivitet. Benyttet i kombinasjon for behandling eller prevensjon av HCV-infeksjon hos mennesker kan en hvilken som helst av de her beskrevne HCV-

15 serin-protease-inhibitorer og de foregående forbindelser med anti-HCV-aktivitet, være til stede i en farmasøytisk eller anti-HCV-effektiv mengde. På grunn av deres additive eller synergistiske effektivitet, når de benyttes i kombinasjon som beskrevet ovenfor, kan hver også være til stede i en subklinisk farmasøytisk effektiv eller anti-HCV-effektiv mengde, det vil si en mengde som, hvis forbindelsen ble benyttet alene, ville gi

20 redusert farmasøytisk effektivitet ved fullstendig inhibering eller reduisering av akkumuleringen av HCV-virioner og/eller reduisering eller forbedring av tilstander eller symptomer forbundet med HCV-infeksjon eller patogenese hos pasienter sammenlignet med slike HCV-serin-protease-inhibitorer og forbindelser med anti-HCV-aktivitet når de benyttes i farmasøytisk effektive mengder. I tillegg omfatter foreliggende

25 oppfinnelse bruken av kombinasjoner av HCV-serin-protease-inhibitorer og forbindelser med anti-HCV-aktivitet som beskrevet ovenfor for å behandle eller forhindre HCV-infeksjoner, der en eller flere av disse inhibitorer eller forbindelser er til stede i en farmasøytisk effektiv mengde, og den eller de andre er til stede i en subklinisk farmasøytisk effektiv eller anti-HCV-effektiv mengde på grunn av deres additive eller

30 synergistiske effekter. Som benyttet her beskriver uttrykket "additiv effekt" den kombinerte effekt av to (eller flere) farmasøytisk aktive midler som er lik summen av effektene for hvert middel gitt alene. En synergistisk effekt er en der den kombinerte effekt av to (eller flere) farmasøytisk aktive midler er større enn summen av effekten av hvert middel gitt alene.

35

Eksempel 42

Dagens standardterapi for hepatitt-C-virus (HCV) infeksjon er behandling med immunomodulator α -interferonene ("Chronic Hepatitis C: Current Disease Management", U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1999). Denne terapi er ineffektiv hos de fleste HCV-pasienter som enten ikke viser noen respons eller en svikt selv etter forlenget interferonterapi. I tillegg er det flere bivirkninger forbundet med interferonterapi.

I lys av det preserende behov for nye, mer effektive antivirale medikamenter for behandling av HCV-infiserte pasienter har foreliggende oppfinnere utviklet en serie forbindelser som inhiberer serin-proteasen av HCV (et kompleks av HCV-virale proteiner NS3 og NS4A). Disse forbindelser kan benyttes alene, sammen med hverandre og i kombinasjon med andre klasser forbindelser for å behandle eller forhindre HCV-infeksjon. Dette eksempel beskrives testingen av tre representative HCV-serin-protease-inhibitorer, det vil si forbindelse CU, forbindelse EP og forbindelse EC, alene og i kombinasjon med individuelle medlemmer av et sett av interferoner (interferon- α -2B (Schering-Plough), interferon- α -2A (PBL Biomedical Laboratories, New Brunswick, NJ), interferon- β (Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ), og ovin-interferon- τ (Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ)) i en HCV-subgenomisk RNA-replikonanalyse (Replicon Assay) for å bestemme hvorvidt de to forbindelser virker sammen for å redusere HCV-RNA-akkumulering. Replikonanalysen måler mengden av HCV-subgenomisk RNA (replikon RNA) som er tilbake i replikonceller (Lohmann et al., "Science", 285: 110-113 (1999)) etter to dagers medikamentbehandling i forhold til den mengde replikon-RNA som er til stede i ikke-behandlede celler. I denne analyse er potensen av forbindelser som HCV-antivirale medikamenter direkte proporsjonal med nivået av inhibering av replikon-RNA-akkumulering.

De to medikamenter testes i kombinasjon i in vitro-replikonanalysesystemet for å bestemme hvorvidt, når de benyttes sammen, de viser additiv eller synergistisk anti-HCV-aktivitet. Replikonanalysen benyttes som en surrogatmodell for in vitro-HCV-infeksjon for å bedømme de kombinerte effekter av immunomodulatoren, for eksempel interferon- α -2B ((Intron A); Schering Plough), og HCV-serin-protease-inhibitoren, for eksempel forbindelse CU. Som vist nedenfor viser resultatene at det er en klar synergistisk anti-HCV-effekt for disse to typer medikamenter målt ved bruk av formelle matematiske bestemmelser for synergi for å analysere dens kapasitet for å redusere HCV-RNA-nivåer i replikonanalysen.

Replikonanalysen

Replikonanalysen som benytter en cellelinje inneholdende den selv-replikerende HCV-subgenomiske RNA (replikon) er beskrevet av Lohmann et al. i "Science", 285: 110-113 (1999). Genbank-aksessnummeret for sekvensen for den replikon som benyttes i forsøkene som beskrevet her, er angitt i denne referanse som AJ242654. Denne artikkel
 5 beskriver metodene for in vitro-transkripsjon av RNA fra replikon cDNA, transfeksjon av replikon RNA inn i Huh7-celler ved elektroporering og seleksjon av celler inneholdende replikon-RNA'et ved bruk av antibiotiske G418. Huh7-celler er en hepatomacellelinje oppnådd fra dr. William Mason ved Fox Chase Cancer Research Center
 10 (Philadelphia). Disse celler er offentlig tilgjengelige fra Fox Chase og er utstrakt beskrevet i den vitenskapelige litteratur (Nakabayashi et al., "Cancer Res.", 42:3858-3863 (1982)). I de her beskrevne forsøk blir alt av templat-DNA'et fjernet fra in vitro-transkripsjons-RNA-preparatet før elektroporering av dette RNA inn i Huh7-celler ved multipelbehandling med DNase (tre sekvensielle behandlinger).

15 Replikonanalysen gjennomføres som beskrevet i detalj nedenfor. Kort sagt blir replikonceller anbragt i 96-brønners skåler i en densitet av 10 000 celler pr. brønn og inkubert ved 37°C. Cellene inkuberes i DMEM (Dulbeccos minimale essensielle medium) supplert med 10% føtalbovinserum, glutamin, ikke-essensielle aminosyrer og
 20 den antibiotiske G418 (0,25 mg/ml). Etter inkubering over natten, erstattes mediumet DMEM inneholdende 2% føtalbovinserum og forskjellige konsentrasjoner av serin-protease-inhibitoren, som forbindelse CU, og/eller et interferon som interferon- α -2B (Intron A, Schering Plough). Hver forbindelse testes ved 6 til 8 forskjellige konsentrasjoner. For et ekstremt av området av konsentrasjoner, velges høye konsentrasjoner av
 25 forbindelsene som vil resultere i en så å si fullstendig inhibering av replikon-RNA-akkumulering etter to dagers behandling. Fra disse utgangskonsentrasjoner foretas det seriefortynninger slik at konsentrasjonsområdene som testes i replikonanalysen inkluderer konsentrasjoner ved hvilke forbindelsene er sterkt effektive, så vel som konsentrasjoner ved hvilke det ikke er noen signifikant effekt. Hver HCV-serin-protease-inhi-
 30 bitor-konsentrasjon testes uten noe tilsatt interferon, så vel som med tilsetning av 6 til 8 forskjellige interferondoser. På tilsvarende måte testes interferon uten noe tilsatt HCV-serin-protease-inhibitor. Etter en 48-timers inkubering med forbindelsene, fjernes mediet fra platene og det totale cellulære RNA ekstraheres fra cellene ved bruk av RNeasy-96-kittet fremstilt av Qiagen Inc. (Valencia, SA). Denne RNA analyseres så
 35 ved kvantitativ RT-PCR eller TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA). TaqMan® RT-PCT-målet er neomycin resistensgenet i replikon RNA'en. Platene konfigureres slik at det er 5 replikater av hver medikamentbehandlingsprøve og 16

replikater av de ikke-behandlede prøver. Dette tillater høyere statistisk konfidens i de kvantitative RT-PCR-data.

Analyse av replikonanalysedata gir to verdier som er brukbare ved bedømmelse av potensen av potensielle HCV-antivirale midler. Ved hver testede forbindelseskonsentrasjon bestemmes nivået av inhibering i replikon-RNA-akkumuleringen forårsaket av forbindelsen under to dagers behandling i forhold til mengde replikon-RNA i ikke-behandlede celler. Dette rapporteres som prosent inhibering. Når det er oppnådd en serie datapunkter som er generert under behandling av celler ved et område for konsentrasjoner, genereres IC_{50} -verdier, det vil si den forbindelseskonsentrasjon ved hvilken HCV-replikon-RNA-akkumuleringen reduseres med 50% på grunn av forbindelsen. Gjentatt testing av HCV-serin-protease-inhibitorer i replikonanalysen, bestemmes det at IC_{50} har en prosentual koeffisientvariasjon, % CV eller $100\% \times \text{standardavvik i } IC_{50} / \text{middel } IC_{50}$) på rundt 20%. IC_{50} er den verdi som benyttes for å bedømme individuelle forbindelser som testes i denne analyse basert på deres potens som HCV-antivirale midler. Enkle IC_{50} -bestemmelser er utilstrekkelige til å bedømme anvendeligheten for forbindelser som benyttes i kombinasjon. Den mest effektive analyse av mønsteret av data som genereres under bruk av alle kombinasjonene av forskjellige interferoner og serin-protease-inhibitorer krever bedømmelse av prosentual inhibering som vist i tabell 7 ved bruk av matematiske metoder som beskrevet nedenfor som er konstruert for bestemme hvorvidt kombinasjonsbehandlingene er agonistiske, additive eller synergistiske.

Detaljer ved replikonanalysen er som følger:

25

Prosedyre for kvantitativ analyse av HCV-replikon-RNA i HCV-replikonanalysen ved bruk av TaqMan®-RT-PCR

Replikonanalysen benyttes for å måle kapasiteten for potensielle HCV-antivirale forbindelser til å inhibere akkumuleringen av et HCV-subgenomisk RNA-replikonmolekyl i en Huh7-cellelinje (Lohmann et al., "Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line", "Science", 285: 110-113 (1999)). Denne analysen omfatter tre operasjonelle komponenter:

- (1) Replikoncelle-opprettelse, analyseplateoppsett og påføring av forbindelse;
 - (2) Ekstrahering av totalt cellulært RNA fra replikoncellene; og
 - (3) Reell tid RT-PCR (TaqMan®) for å måle mengden av replikon-RNA i hver prøve.
- Replikonanalysen krever minst 4 dagers arbeid; imidlertid kan prosessen avbrytes og prøver fryses mellom trinnene. Hver analysekomponent er beskrevet nedenfor.

1. Replikoncelleopprettholdelse, analyseplateoppsett og forbindelsespåføring

1.1 Replikoncellelinjeopprettholdelse

Cellelinjen som benyttes i replikonanalysen produserer som beskrevet hos Lohmann et al. i "Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line", "Science", 285: 110-113 (1999). Etter at 150 cm² cellekulturkolber (Costar) inneholdende replikonceller er inkubert ved 37°C og 5% CO₂ og er blitt konfluent, fortynnes cellene 1:10 på volumbasis til friske 150 cm² cellekulturkolber. Mediet er DMEM inneholdende 10% føtalbovinserum (FBS), 1X ikke-essensielle aminosyrer (NEAA), 1X glutamin (Glu) og 0,25 mg/ml G418. Det gjennomføres tre seriepassasjer, hver gang tillates cellene å bli konfluent, fulgt av fortynning av cellene til friske 150 cm² cellekulturflasker. Disse celler, kalt "opprinnelige celler" aliquoterer og lagres så til fremtidig bruk i replikonanalysen. TagMan®-basert analyse gjennomføres for å bestemme antall HCV-replikongenomer pr. celle, noe som gir nærværet av ~150 kopier av replikonet pr. celle. Dette er basert på forholdet mellom kopier av replikon-RNA til to ganger kopiene av det humane apoB-genet (antallet haploidgenomer).

1.1.1 Opprinnelige celler lagres i flytende N₂. For celler som benyttes replikonanalysen blir, etter 20 seriepassasjer, cellene gitt opp og en frisk lot hentes fra lagring i flytende N₂.

1.2 Plating av celler i 96-brønners skåler for replikonanalyse

1.2.1 For fremstilling av 96-brønners plater, blir en 75% konfluent 75 cm² kolbe av replikonholdige celler trypsinisert og resuspendert i 10 ml medium A. Trypsiniseringsen gjennomføres ved å fjerne medium og å tilsettes 1 ml trypsin-EDTA 0,25% vekt/volum, og så å fjerne trypsin-EDTA. Etter 5-10 minutter frigis cellene fra kolbe og resuspenderes i medium.

1.2.2 Celler telles ved bruk av et hemacytometer og cellekonsentrasjonen justeres til 10⁵ celler/ml.

1.2.3 Hver brønn ympes med en 100 µl celleduspensjon ved bruk av en Impact-2-multi-kanalpipette (Matrix), idet det aldri bringes på plater mer enn 96-brønners plater fra en enkelt celleduspensjon.

1.2.4 96-brønners plater inkuberes ved 37°C over natten.

1.3 Forbindelsesfortynning og påføring på replikoncelleskåler

1.3.1 HCV-serin-protease-inhibitorforbindelsene oppløses i dimetylsulfoksyd (DMSO) til en sluttkonsentrasjon på 20 mM. Interferoner suspenderes i fosfatbufret salt-oppløsning inneholdende 0,1% vekt/volum bovinserumalbumin.

s 1.3.2 20 mM forbindelseoppløsningen fortynnes til 1 mM med DMSO.

1.3.3 50 µl forbindelse oppløst i DMSO, settes til 10 ml medium B (forbindelseskonsentrasjonen er 5 mM, og DMSO-konsentrasjonen er nå 0,5%) eller 20 µl 1 mM forbindelse og 30 µl DMSO settes til 10 ml medium B (forbindelseskonsentrasjonen er 2 µM).

10 1.3.4 Forbindelsesfortynningen til sluttkonsentrasjonen fullføres ved å blande
forbindelse/medium B-oppløsningen med medium C (inneholder 0,5% DMSO).
Serie en- til fem-fortynninger av forbindelsen foretas med medium C i en 2 ml
propylen 96-brønnersblokk for å oppnå de ønskede sluttkonsentrasjoner av for-
bindelsen.

15 1.3.5 Celleplaten fjernes fra 37°C inkubatoren og merkes i det øvre høyre hjørne av
blokken og høyre side av bunnen. Mediet helles av 96-børnnersplatene.

1.3.6 100 µl forbindelse/medium-oppløsningene fra hver brønn av 96-brønnersfortynningsblokken settes til 96-brønnerscelleplaten ved bruk av en Impact-2-pipette.

1.3.7 100 µl medium C settes til alle de ubehandlede brønner i henhold til tabell 3 for testing av forbindelsene ved enten 1, 3 eller 6 forskjellige konsentrasjoner. "Untx" henviser til narrebehandlede celler (DMSO tilsatt ved samme konsentrasjon som i de behandlede celler); "Con." henviser til forbindelseskonsentrasjoner.

TABELL 3

25 **2 forbindelser, 6 konsentrasjoner, 5 replikater**

[illegible]

4 forbindelser, 3 konsentrasjoner, 5 replikater

	Forbindelse 1					Forbindelse 2						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	
B		con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	
C		con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	
D		con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	
E		con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	
F		con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	
G		con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	
H		untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	

5

16 forbindelser, 1 konsentrasjon, 4 replikater

		Forbindelse 1				Forbindelse 2						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		untx	cpd 1	cpd 2	cpd 3	cpd 4	cpd 5	cpd 6	cpd 7	cpd 8	untx	
B		untx	cpd 1	cpd 2	cpd 3	cpd 4	cpd 5	cpd 6	cpd 7	cpd 8	untx	
C		untx	cpd 1	cpd 2	cpd 3	cpd 4	cpd 5	cpd 6	cpd 7	cpd 8	untx	
D		untx	cpd 1	cpd 2	cpd 3	cpd 4	cpd 5	cpd 6	cpd 7	cpd 8	untx	
E		untx	cpd 9	cpd 10	cpd 11	cpd 12	cpd 13	cpd 14	cpd 15	cpd 16	untx	
F		untx	cpd 9	cpd 10	cpd 11	cpd 12	cpd 13	cpd 14	cpd 15	cpd 16	untx	
G		untx	cpd 9	cpd 10	cpd 11	cpd 12	cpd 13	cpd 14	cpd 15	cpd 16	untx	
H		untx	cpd 9	cpd 10	cpd 11	cpd 12	cpd 13	cpd 14	cpd 15	cpd 16	untx	

10

15

12 forbindelser, 1 konsentrasjon, 5 replikater

	Forbindelse 1					Forbindelse 2						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	
B		cpd 1	cpd 1	cpd 1	cpd 1	cpd 1	cpd 7	cpd 7	cpd 7	cpd 7	cpd 7	
C		cpd 2	cpd 2	cpd 2	cpd 2	cpd 2	cpd 8	cpd 8	cpd 8	cpd 8	cpd 8	
D		cpd 3	cpd 3	cpd 3	cpd 3	cpd 3	cpd 9	cpd 9	cpd 9	cpd 9	cpd 9	
E		cpd 4	cpd 4	cpd 4	cpd 4	cpd 4	cpd 10	cpd 10	cpd 10	cpd 10	cpd 10	
F		cpd 5	cpd 5	cpd 5	cpd 5	cpd 5	cpd 11	cpd 11	cpd 11	cpd 11	cpd 11	
G		cpd 6	cpd 6	cpd 6	cpd 6	cpd 6	cpd 12	cpd 12	cpd 12	cpd 12	cpd 12	
H		untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	

5

1.4 Platene inkuberes i 48 timer ved 37°C og underkastes så RNA-ekstrahering.**TABELL 4****Oppsummering av utstyr og forhold som benyttes for celledyrking og forbindelsesoppsett**

10

8 kanal Impact-2-pipette, 1250 µl	katalog nr. 2004	Matrix
2 ml polypropylen dyp-brønnblokk, 96-brønner, steril	katalog nr. 4222	Matrix
25 ml reagensreservoarer, sterilt	katalog nr. 8096	Matrix
1250 µl ekstralange pipettespisser	katalog nr. 8255	Matrix
96-brønners plater	katalog nr. 3959	Matrix
Hemocytometer	Lys linje forbedret Neubauer 0,1 mm dyp	Reichert
DMEM	kat. nr. 5144-79P	JRH
L-glutamin (Glu)	kat. nr. 12403-010	GIBCO-BRL
Ikke-essensielle aminosyrer (NEAA)	kat. nr. 11140-050	GIBCO-BRL
Føtalbovinserum (FBS)	kat. nr. 16250-078	GIBCO-BRL
G418	kat. nr. 55-0273	Invitrogen
DMSO	kat. nr. D-2650	Sigma

Oppsummering av utstyr og forhold som benyttes for celledyrking og forbindelsesoppsett (fortsettelse)

Medium A	DMEM, 10% FBS, 1X NEAA, 1X Glu, 0,25 mg/ml G418
Medium B	DMEM, 2% FBS, 1X NEAA, 1X Glu
Medium C	DMEM, 2% FBA, 1X NEAA, 1X Glu, 0,5% DMSO
Trypsin-EDTA 0,25%	GIBCO-BRL

2. Ekstrahering av totalcellulær RNA fra replikonceller

5

2.1 Innføring

Formålet med prosedyren er å ekstrahere RNA fra in vitro-vevkulturprøvene slik at det virale eller cellulære RNA gjenvinnes kvantitativt og rent nok til å kunne analyseres ved kvantitativt HCV RT-PCR-analyse.

10

For å tillate detektering av variasjoner i effektiviteten av RNA-ekstraheringen, settes standardmengder bovin-viral-diarré-virus (BVDV), en RNA-virus med en viss likhet med HCV, til hver celleprøve før RNA-ekstrahering. Således skulle nivået av BVDV-RNA som detekteres i den endelig multipleks RT-PCR-reaksjon være konsistent blant alle brønnene innen variabilitetsgrensene som assosieres med replikonanalysen. Denne internkontroll av RNA-ekstraheringseffektiviteten diskuteres videre i TaqMan®-delen nedenfor.

15

RNA-ekstraheringsveien som benyttes er RNeasy-96-metoden som er tilveiebragt av Qiagen Inc. (Valencia, CA). Denne metode bruker 96-silika-baserte minikolonner som er posisjonert i et mønster kompatibelt med 96-brønners vevkulturoperasjoner. RNA-ekstraheringsteknologien er en modifikasjon av Boom-metoden hvori alle cellulære proteiner og nukleinsyre, inkludert nukleaser, først denatureres med et sterkt, kaotropisk salt (guanidiniumtiocyanat). I denne omgivelse har nukleinsyrer en sterk affinitet for silika, materialet i minikolonnene; imidlertid binder proteiner og andre kontaminanter ikke til silika og går gjennom kolonnene. Etter vasking av kolonnene med kaotropisk/etanoloppløsninger, blir prøvene partielt tørket og nukleinsyren så satt fri fra kolonnen i et lite volum vann.

20

25

For å redusere variabiliteten i gjenvinning av HCV RNA, er man omhyggelige med betingelsene for kolonnevasking og partiell tørking. Nærværet av små mengder etanol på en kolonne vil kontaminere den endelige RNA og interferere med RT-PCR-detekteringssystemet. Forsiktighet er krevet i alle faser av denne prosedyre, fordi utgangs-

30

prøvene kan medføre biorisiki, det kaotropiske salt er meget kaustisk og kan, som tiosyanat, generere giftig cyanidgass, hvis man tillater at forbindelsen kommer i kontakt med sure omgivelser.

5

TABELL 5

Oppsummering av utstyr og forråd som er nødvendige for HCV RNA-ekstraherings-prosedyrer.

RNeasy-96- kitt (24)	katalog nr. 74183	Qiagen
QIAvac 96 manifold	katalog nr. 19504	Qiagen
Sentrifuge 4-15C- for 2x96-plater, 6000 x g	katalog nr. 81010	Qiagen
Platerotor for 2x96-plater	katalog nr. 81031	Qiagen
200 Proof-etylalkohol		
8 kanal-Impact-2-pipette, 250 µl	katalog nr. 2002	Matrix
8 kanal Impact-2-pipette, 1250 µl	katalog nr. 2004	Matrix
2 ml polypropylen dyp-brønnblokk, 96-brønner, steril	katalog nr. 4222	Matrix
25 ml reagensreservoar, steril	katalog nr. 8096	Matrix
1250 µl ekstra lange pipettespisser	katalog nr. 8255	Matrix
200 µl pipettespisser	katalog nr. 7275	Matrix
Serumfritt MEM-medium	katalog nr. 11095-80	GIBCO-BRL

2.2 Prosedyre:

10 2.2.1 Cellelysering

2.2.1.1 Fremstilling av lyseringsbuffer: For en 96-brønners plate, tilsettes 150 µl β-merkapttoetanol (β-ME) og 1 µl BVDV-forråd (vortex-røring av forrådet før tilsetning) til 15 ml RLT-buffer (en komponent av RNeasy-sett, Qiagen).

15 Dette forråd fremstilles ved infeksjon av MDBK-celler (bovin-nyreceller, #CCL-22, tilgjengelig fra American Type Culture Collection, Manassas, VA) med BVDV og høsting av kulturen ved den høyeste cytopatiske effekt (CPE). Dette forråd har en infektøs titer på rundt 2×10^7 pfu/ml. Dette gir BVDV en terskelcyklus (C_t) på ca. 22 i TaqMan®-analysen. BVDV-forrådet lagres i en fryse på -80°C.

20 2.2.1.2 Cellene vaskes med 150 µl serumfritt MEM-medium (program 4 på 8-kanals elektronisk pipetter P1250: Fill 1250, Disp 150 x 8). 150 µl lyseringsbuffer settes til hver brønn (samme program).

2.2.1.3 RNA ekstraheres umiddelbart eller cellene fryses til -80°C.

- 2.2.2 Preparering av reagenser og materialer for RNA-ekstrahering.
- 2.2.2.1 Merk at lottnummeret for RPE og RNeasy-96-kitt.
- 2.2.2.2 RPE: 720 ml 100% etanol settes til en flaske RPE (Qiagen) og blandes godt; RPE-flaskene rystes alltid godt før bruk.
- 5 2.2.2.3 70% etanol: 150 ml dietylpyrokarbonyl (DEPC) vann settes til 350 ml 100% etanol og det hele blandes godt.
- 2.2.3 Fremstilling av RNA med RNeasy-96-kitt.
- 2.2.3.1 Frosne prøver tines ved romtemperatur i 40 minutter. Samtidig tines en
10 kolonne av Extration Control for hver plate (Extraction Controls: RNeasy
Extraction-kontrollene er et sett på 8 rør som alle er forbundet. Inne i hvert rør
er det 170 µl cellelysatsat med et visst forhold mellom HCV-positive og negative
celler. Fra topp til bunn er to hver av en lav-, medium-, høy- og null-antalls
kontroller, respektivt. (Se avsnitt 2.3 i protokollen nedenfor.)
- 15 2.2.3.2. Prøvene blandes ved pipettering av 100 µl opp og ned fem ganger. Hele
prøven overføres til kolonner 1-10 i 2 ml Matrix-kvadratbrønnblokken
(program 1 på P250: Mix 100 x 5, Fill 170, Purge).
- 2.2.3.3. 150 µl av replikonstandard overføres til kolonne 11 (ingen prøve i kolonne
12).
- 20 2.2.3.4 150 µl 70 %-ig etanol (EtOH) settes til hver prøve (program 4 på P1250: Fill
1250, Disp 150).
- 2.2.3.5 En RNeasy-96-plate merket med det riktige platenummer anbringes i vakuum-
manifolden. Det hele blandes og lysat/EtOH overføres til RNeasy-96-platen
(program 1 på P1250; Mix 200, Times 5, Fill 330 og Purge). Alle ikke-
25 benyttede brønner forsegles med transparent tape (levert til Qiagen), vanligvis
kolonne 12.
- 2.2.3.6 Vakuum (rundt 800 mbar) legges på for å fylle prøven på minikolonnene.
- 2.2.3.7 RNeasy-96-platen vaskes med 1000 µl RW1-buffer (Qiagen)/brønn (program
2 på P1250: Fill 1000, Disp 1000).
- 30 2.2.3.8 Vakuum legges på filteret gjennom RW1-bufferen og gjennomstrømningen
tømmes ut.
- 2.2.3.9 RNeasy-96-platen vaskes med 1000 µl RPE-buffer/brønn (program 2 på
P1250).
- 2.2.3.10 Vakuum legges på filteret gjennom RPE-bufferen.
- 35 2.2.3.11 Trinn 2.2.3.9 gjentas.
- 2.2.3.12 Vakuum legges på filteret gjennom RPE-bufferen, mens man holder pålagt
vakuum i 3 minutter.

- 2.2.3.13 RNeasy-96-platen tørkes. RNeasy-96-platen anbringes i et mikrorør-samlestativ (levert av Qiagen), dekkes med levert AirPore-tape og enheten sentrifugeres i 10 minutter ved 6000 x g (Qiagen Sigma-sentrifuge; 4-15°C).
- 2.2.3.15 RNA leveres fra RNeasy-96-brønners platen: RNeasy-96-platen overføres til toppen av et nytt mikrorørsamlestativ. 70 µl RNase-fritt vann settes til midten av hver brønn (program 3 på P1250: Fill 850, Disp 70).
- 2.2.3.16 Det hele inkuberes i 1 minutt ved romtemperatur og derefter anbringes en frisk AirPore-tape over platen.
- 2.2.3.17 Enheten sentrifugeres i 4 minutter ved 6000 x g i en Sigma 4-15°C sentrifuge. Det eluerte volum måler mellom 28 µl og 50 µl.
- 2.2.3.18 RNeasy-96-platen kasseres og rørsamlerstativet forsegles med Qiagen-tilveiebragt lokk (8 pr. strimmel).
- 2.2.3.19 Det eluerte RNA lagres ved -80°C eller analyseres umiddelbart i TaqMan®-analysen.

15

2.3. Preparering av ekstraheringskontroller

Dag 1

- 2.3.1.1 2,5 x 10⁷ replikon-produserende celler plates ut i en 150 cm² vevkulturkolbe (T-150).
- 2.3.1.2 2,0 X 10⁶ Huh7-celler plates ut i en 75 cm² vevkulturkolbe (T-75).
- 2.3.1.3 Det hele inkuberes over natten ved 37°C.

20

Dag 2

- 2.3.1.4 Cellene lyseres med lyseringsbuffer.
- 2.3.1.5 Supernatanten fjernes fra Huh7- og replikon-produserende celler og monosjiktet vaskes med 10 ml serumfritt medium (MEM).
- 2.3.1.6 30 ml lyseringsbuffer (med 1 µl BVDV-forråd/15 ml lyseringsbuffer) settes til Huh7-cellene, blandes ved gjentatt pipettering og cellelysaten anbringes i et 50 ml vevkultur-sentrifugerør med konisk bunn.
- 2.3.1.7 10,5 ml lyseringsbuffer settes til de replikon-produserende celler, blandes med gjentatt pipettering og cellelysaten anbringes i et 15 ml vevkultur-sentrifugerør med konisk bunn.
- 2.3.2 For HØY-ekstraheringsstandarden: 170 µl av cellelysaten av de replikon-produserende celler aliquoterer inn i rekkene 5 og 6 av to Matrix 0,75 ml rørstativ.

30

35

- 2.3.3 For MEDIUM-ekstraheringsstandarden: 1,0 ml av cellelysatet av de replikon-produserende celler settes til 9 ml av Huh7-lysatet og blandes godt. 170 µl av denne blanding aliquoterer til rekkene 3 og 4 av to Matrix 0,75 ml rørstativ.
- 2.3.4 For LAV-ekstraheringsstandarden: 50 µl cellelysat av replikon-produserende celler settes til 10 ml av Huh7-lysatet og blandes godt. 170 µl av denne blanding aliquoterer til rekkene 1 og 2 av to Matrix 0,75 ml rørstativ.
- 2.3.5 NULL-ekstraheringskontroll: 170 µl av Huh7-cellelysatet aliquoterer til rekkene 7 og 8 av to Matrix 0,75 ml rørstativ.
- 2.3.6 Kontrollene lagres ved -80°C.

3. TaqMan® RT-PCR og dataanalyse

3.1 Innføring:

Kvantitativ nutid RT-PCR benyttes for å måle mengden HCV-replikon-RNA i hver prøve. Denne teknologi kalles også PCR-basert 5'-nukleaseanalyse, og TaqMan®. Det analytiske instrument er Applied Biosystems 7700 Prism Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Dette instrument er i det vesentlige en tidsmultiplexsert laser-indusert fluorescensspektrograf koblet med en termisk sykler. Den styrer akkumuleringen av PCR-amplikon i hver brønn i en 96-brønners prøveskål under forløpet av PCR-prosessen.

3.2 Bruken av BVDV intern kontroll:

Som nevnt i avsnittet før innarbeides en indre positiv kontroll i hver prøve. Denne tjener som et mål på RNA-ekstraheringseffektivitet og viser om prøven inneholder kontaminanter som inhiberer TaqMan® PAC. BVDV blandes med den kaotropiske cellelyseringsbuffer før lyseringsbufferen bringes til cellene. Selv om den positive kontroll er i hver prøve, blir den indre BVDV positive kontrollanalyse kun gjennomført når HCV-replikon RNA-analysedataene faller utenfor de ventede grenser, noe som antyder at det kan foreligge et problem med prøvene. Denne 7700 er i stand til samtidig å overvåke akkumuleringen av to forskjellige PCR-amplikoner i det samme rør ved å benytte detekteringsprober merket med to forskjellige fluorescente rapportør farvestoffer ("multipleksing"). Spesifikke kriterier som eliciterer en TaqMan®-analyse for den indre positive BVDV-kontroll for en prøve er beskrevet i delen om dataanalyse (3.6).

3.3 HCV-replikon RNA TaqMan®-probe og primere.

På grunn av den ventede genetiske stabilitet og den generelle mangel på sekundær RNA-struktur i neomycinresistensgenet (neo) kodet i replikonet, benyttes det primere

og en probe som binder i dette området. Dette segment av replikon RNA'en strekker seg fra basene 342-1193 av den 8001 store basepar-replikon (SEQ ID nr. 1):

```

301 ntacttqcca gttccccggg aggtctcgtt gaccgtgcac catgaacacg aa:ccctaac
361 ctcaaaagaa aacaaahuyt uucacuzhuy qrcduh:unt. ynti.ghacna ya'.ghnttgc
421 acqcaqphic tcrvgccgct cgggtcgaga ggc'attcgg ctatgactqg gcacaacaga
481 coalcyyctg ctctggtgcc gctgtgttgc agctgtcngc ycaqgyuy:gc caggt:ctct:
541 ctgtcaagac cgaacctgtc gytccccyya iteyuuh:tgca qnacagaca gspcyctat
501 cgtgyctgyc cagcaacggc gttcct:qca caqctgtgt cgaacttgtc acrtaaqrqg
561 yaaqggactg gctyctattg ygtayah:gc cgggacagga tctcctgtta t:ct:actt:gc
621 ctcttgcaga qaaqytatcc ctctgtgtc gctctgtgt acgctctgtc
781 cggctacctg cccattcgac caccaghi:ga aacatcgcat cghy:gaqca cgtactcyya
841 tggaaqccgg tcttgtctgat caggatgata tggacgaagq gcactcagggg ctccgycccg
901 ccaaacctgt cgcacagctc aaggtcgcga tgcctcagcg cgaaggtctc gtcgtgacct
961 atggcgatgc ctgtct:gtcg omtatca:gy t:qnaaaatcg ccgcttttct ggattcatco
                                forward primer
1021 actatgcccc cctgggtgtg cgggacgct atcgggncat agcgttggct acccgtgata
                                TaqMan' probe
1081 ctgtcgaaga gcttgcggc gattcggctg accgcttctc cgtactt:ac ggtatcgccg
                                reverse primer
1141 ctcccgatct gtagcgcatc gcttctatc gccttcttga caggttcttc tgaqcttuna

```

5

3.4 Prosedyrer

3.4.1 Metode for fremstilling av 1x Master-blandinger for NEO og BVDV RT-PCR

TABELL 6

Oppsummering av utstyr og forråd for preparering av RT-PCD 10-plate
Master-Mix

Utstyr og forråd	Ordre nr.	Leverandør
0,5-10 µl pipette	22 47 005-1 2000 serier	Eppendorf
2-20 µl pipette	22 47 015-9 2000 serier	Eppendorf
10-100 µl pipette	22 47 020-6 2000 serier	Eppendorf
50-200 µl pipette	22 47 025-6 2000 serier	Eppendorf
100-1000 µl pipette	22 47 030-2 2000 serier	Eppendorf
1250 µl Matrix-spisser	kat. nr. 8255	Matrix
200 µl Matrix-spisser	kat. nr. 7275	Matrix
10 µl ART-spisser	kat. nr. 2140	Molecular Bioproducts
20 µl ART-spisser	kat. nr. 2149P	Molecular Bioproducts
100 µl ART-spisser	kat. nr. 2065E	Molecular Bioproducts
200 µl ART-spisser	kat. nr. 2069	Molecular Bioproducts
1000 µl ART-spisser	kat. nr. 2079E	Molecular Bioproducts
Elektronisk pipette, Impack-2	kat. nr. 2001	Matrix
1,5 ml RNase-frie mikrofugerør	kat. nr. 12450	Ambion
14 ml polypropylenrør	kat. nr. 35059	Falcon

10

25 ml reagensreservoar	kat. nr. 8096	Matrix
96-brønners reaksjonsplate	kat. nr. N801-0560	Applied Biosystems
Optiske lukkestrimler	kat. nr. N801-0935	Applied Biosystems
Engangsutstyr	kat. nr. 9515-E	Baxter
Reagenser	Ordre nr.	Leverandør
Syre	0,1N HCl	Fisher
RNAseZap	kat. nr. 9780	Ambion
RNAse away	kat. nr. 7005	Molecular Bioproducts
10-pak, EZ RT-PCR-kjerne-reagenssett, 5x reaksjonsbuffer, 25 mM manganacetat, deoksy NTPs	kat. nr. 403028	Applied Biosystems
VIC NEO-probe, 2 μ M (=10x), 550 μ l pr. aliquot	kat. nr. 450003, kunde, 5'-VIC-CTG TGG CCG GCT GGG TGT GG-TAMRA-3' (SEQ ID nr. 2)	Applied Biosystems

VIC BVDV-probe, 2 μ M, (=10x), 550 μ l pr. aliquot (Vertex)	kat. nr. 450003, kunde, 5'-VIC-CCC TCG TCC ACG TGG CAT CTC GA-TAMRA-3' (SEQ ID nr. 3)	Applied Biosystems
NEO-foroverprimer, 3 μ M (=10x) forover/reversprimer, 550 μ l pr. aliquot	kat. nr. 4304972, kunde, 5'-CCG CTT TTC TGG ATT CAT CG-3' (SEQ ID nr. 4)	Applied Biosystems
NEO-reversprimer, 3mM (=10x) forover/reversprimerblanding, 550 μ l pr. aliquot	kat. nr. 4304972, kunde, 5'-CCC ATT CGC CGC CAA-3' (SEQ ID nr. 5)	Applied Biosystems
BVDV foroverprimer, 3 μ M (=10x) forover/reversprimer-blanding, 550 μ l pr. aliquot	kunde, 5'-CAG GGT AGT CGT CAG TGG TTC G-3' (SEQ ID nr. 6), 1,0 μ M skala m/gelrensing	Oligos etc.
BVDV reversprimer, 3 μ M (=10x) forover/reversprimer-blanding, 550 μ l pr. aliquot	kunde, 5'-GGC CTC TGC AGC ACC CTA TC-3' (SEQ ID nr. 7<9, 1,0 μ M skala m/gelrensing	Oligos etc.

NEO RNA-standarder	In vitro-transkribert RNA fra et plasmid inneholdende neo-gendelen av HCV-replikon RNA'en ved bruk av T7 RNA-polymerase. Den in vitro-transkriberte RNA kvantiteres basert på kjent molekylvekt for transkriptene og UV-absorbansen for den rensede transkriptopløsning. Denne RNA fortynnes, aliquoteres og lagres ved -80°C. Individuelle aliquoter tines for hver TaqMan®-analyse.	
RNA-prøver som skal testes isoleres fra HCV-replikoncellene (del 2 av denne protokoll), 10 µl/96-brønners plate		
Nuklease-fritt vann (ikke DEPC-behandlet)	kat. nr 9930	Ambion

3.4.2 Preparering av reagenser for Master-blanding (Master mix)

3.4.2.1 Rengjøres i henhold til de to trinnene nedenfor og pipettene med RNase strykes bort

5 RNase Zap (Ambion, Austin, TX)

RNase Away (Molecular Bioproducts, San Diego, CA)

3.4.2.2 EZ RT-PCR-kjernereagensene åpnes (Applied Biosystems) og 5x bufferen legges på is, frosne reagenser tines ved romtemperatur i rundt 15 minutter og legges så på is. Et EZ RT-PCR-reagenskitt kan benyttes for å analysere to 96-
10 brønners RNA-ekstraksjoner.

3.4.2.3 Et rør av 2 µM VIC-probe (NEO eller BVDV, 550 µl pr. rør) hentes fra -20°C og legges på is.

3.4.2.4 Et 3 µM forover/reversprimerblandingsrør (NEO eller BVDV, 550 µl pr. rør) hentes fra -20°C og legges på is.

15 3.4.2.5 Et rør (30 µl) av standard-RNA-transkript (10^8 kopier/10 µl) hentes fra -80°C og anbringes på is.

3.4.2.6 Et rør med Ambion-vann av temperatur hentes.

3.4.3 Sammensetning av masterblanding for en 96-brønners platereaksjon

20 3.4.3.1 Bruk en 1 ml pipette for å overføre 5x buffer (Applied Biosystems) til et 14 ml rør; totalt tilsatt volum 1100 µl.

3.4.3.2 Bruk en 1 ml pipette for å sette 25 mM Mn(OAc)₂ (Applied Biosystems) til et 14 ml rør; totalt tilsatt volum 660 µl.

25 3.4.3.3. Bruk en 200 ml pipette for å sette 165 µl 10 mM dATP til 14 ml røret. Gjør det samme for 10 mM cCTP, 20 mM dUTP og 10 mM dGTP.

- 3.4.3.4 Bruk en 1 ml pipette for å sette 550 μ l 10x 3 μ M forover/revers-primer-blanding.
- 3.4.3.5 Bruk en 1 ml pipette for å tilsette 550 μ l 10x 2 μ M probe.
- 3.4.3.6 Bruk en 1 ml pipette for å tilsette 220 μ l rTth DNA-polymerase (Applied Biosystems).
- 3.4.3.7 Bruk en 100 μ l pipette for å tilsette 55 μ l AmpErase UNG (Applied Biosystems).
- 3.4.3.8 Bruk en 1 ml pipette for å sette 605 μ l Ambion H₂O til 14 ml røret; sluttvolumet er 4400 μ l totalt.
- 3.4.3.9 Overfør 4400 μ l masterblanding til 25 ml reagensreservoar.
- 3.4.3.10 Avgi 40 μ l pr. brønn for alle 96 brønner ved bruk av en 8-kanal pipette.
- 3.4.3.11 Overfør 10 μ l ekstraherte, ukjente prøver til brønner på reaksjonsplaten ved bruk av en 8-kanal pipette, kolonne for kolonne, fra og med kolonne 1 til og med kolonne 11, dekk hver kolonne etter overføring.
- 3.4.3.12 Sett 270 μ l Ambion H₂O til 30 μ l 10⁸ kopier/10 μ l RNA-transkript for bruk i standardkurven og bland. Det er nu 10⁷ kopier av HCV-replikonkvantiterings-standard-RNA/10 μ l.

3.4.4 Sett opp ABI 7700 for hvert forsøk

- 3.4.4.1 Før hvert forsøk gjeninnstilles datamaskinen for ABI 7700 og desktoppen settes opp igjen.
- 3.4.4.2 Lukk og fjern alle overfladige programmer fra harddriven; overflødige data kasseres.
- 3.4.4.3 Sekvensdetektor v1,7 programmet åpnes (SDS-program).
- 3.4.4.5 Åpne "Replicon Assay Runs"-dokumentet.
- 3.4.4.6 Åpne "Replicon Assay"-templatplaten. De termiske syklerbetingelser som er programmert inn i templatet er som følger:
 - Trinn 1: 50°C i 2 minutter
 - Trinn 2: 60°C i 30 minutter
 - Trinn 3: 95°C i 5 minutter
 - Trinn 4: 95°C i 15 sekunder
 - Trinn 5: 60°C i 60 sekunder
 - Cyklusrepeteringsantall for hvert trinn 4-5: 40.
 - Templatinstrument: diagnose: fremførte muligheter:
 - Velg visning: display mse.
 - Velg visning: display best fit.
 - Velg miscellaneous: referansefarvestoff ROX.

3.4.4.7 "Save" (ikke "save as") filen i "Replicon Assay Runs"-folderen.

3.4.4.8 Vis oppsett: trykk RUN

3.5 Preparering av ABI7700-data efter et forsøk ved bruk av SDS-program

- 5 3.5.1 Analyseplatene fjernes fra ABI7700 og kasseres uten en gang å være åpnet. Dette reduserer i vesentlig grad laboratorieproblemer med PCR-krysskontaminering.
- 3.5.2 Data analyseres ved bruk Sequence Detector System-program V1.7.
- 3.5.3 Terskelnivåene settes til å begynne med ved bruk av default-innstilling.
- 10 3.5.4 Dataavvisningskriteria: Datapunkter eller serier for hele plater kan avvises. Hvis det har vært et signifikant avvik fra protokollen, reagenssvikt eller uhell, eller ABI 7700 forsøkssvikt, kan data kasseres. For avvisning av ethvert datapunkt for et synelatende vanlig forsøk, må et eller flere av disse kriterier tilfredsstilles.
- 15 3.5.4.1 Terskelcyklusberegninger. Vanligvis brukes de default-verdiene for SDS-programmet. Hvis Ct for den mest konsentrert prøve er mindre enn 15, bør terskelverdistopp grensen etter behov endres til en lavere verdi slik at Ct for den høyest konsentrerte prøve er større enn stoppverdien. Oppdater beregningene efter endring er gjort.
- 20 3.5.3.2 Overvei avvisning av et helt anormalt TaqMan®-forsøk som indikert ved et avvik fra middelverdiene for hellings- og y-akseskjæringen for den linje som genereres ved analyse av neo RNA-standardene. De akseptable områder for disse verdier er:
Hellingsverdier bør være mellom 3,0 og 3,6
25 y-skjæringscykler bør være mellom 36 og 41 cykler.
- 3.5.4.3 Feilaktig individuelle TaqMan®-brønner som antyd det ved ekstreme $R_n/\Delta R_n$ kan utelates før dataanalyser slik at de ikke påvirker SDS-programberegningene.
- 3.5.4.4 Undersøk og noter ikke-templatkontroll Ct-verdier og bekreft at de er $>7,0$ Ct
30 ($>100X$) enn Ct for enhver forbindelsesbehandlet prøve.
- 3.5.5 HCV RNA-standard Ct-verdiene sammenlignes med tidligere resultater.
- 3.5.6 HCV RNA-standardkurven sammenlignes med tidligere resultater.
- 3.5.7 Hvis feilaktig forsterkning er åpenbar i individuelle celler, identifiseres og noteres disse.
- 35 3.5.8 "Resultat"-filen eksporteres og overføres fra 7700-maskinen til en annen maskin for analyse ved bruk av Microsoft Excel.

- 3.5.9 En hvilken som helst av de følgende forandringer i reagensprepareringen eller fortynningen som benyttes rapporteres.
- Ny probe eller primersyntese fra leverandør.
 - Ny probe eller primerfortynning og aliquoter.
 - 5 Nye standarder for RNA-transkriptpreparering.
 - Nye standarder for RNA-transkriptfortynning og aliquoter.
 - Nye BVDV-virale preparater.
 - Nye kolonne 11 standardpreparater.
- 10 **3.6 TaqMan®-dataanalyse**
- 3.6.1 Kopier og lim TaqMan®-HCV Ct-antall og kopinummer fra TaqMan®-resultatfilen inn i de riktige celler av replikonanalysedata analyse Microsoft Excel makro og kjør makroen.
- 3.6.2 Kopier TaqMan®-resultattabellen fra makroarket på et annet ark, putt inn
- 15 forbindelses serienummer og lottnummer.
- 3.6.3 Fra dette excel-ark vil middel, standardavvik og prosentdel CV av forbindelsesinhiberingsaktiviteten så vel som HCV-kopinummer, HCV Ct-nummer og BVDV Ct-nummer (hvis tilgjengelig) for alle fortynningspunkter i 5 replikater og ikke-forbindelseskontroll, beregnes.
- 20 3.6.4 Kriterier for dataavvisning og implementering av BVDV-kontroll TaqMan®. Sjekk alle beregninger. Datapunkter eller serier av hele plater kan avvises. Hvis det er et signifikant avvik fra protokollen, reagenssvikt eller uhell, eller ABI 7700-kjøringssvikt, kan data kasseres. For avvisning av ethvert datapunkt fra et tilsynelatende vanlig forsøk, må et eller flere av disse kriterier tilfredsstilles.
- 25 Standardavvik for prosentual inhibering bør være mindre enn 30% i aktive forbindelser. % CV for HCV-kopiantallet bør være mindre enn 30%. Standardavvik for HCV Ct for alle prøver bør være mindre enn 0,5; denne er vanligvis rundt 0,1 til 0,3 i de fleste prøver. Hvis HCV Ct standardavviket er mer enn 0,5, gå da tilbake til rådatatabellen og sjekk Ct-numrene for 5 replikater.
- 30 Hvis Ct-nummeret for enhver brønn er 2 Ct forskjellig fra midlere 5 Ct-tall for 5 replikater, bør denne brønn utelates fra analysen. Hvis mer enn 3 brønner (ikke på samme kolonne) har uvanlige Ct-nummere, bør BVDV TaqMan® intern kontrollanalysen gjennomføres. Hvis BVDV-data viser irregularitet, bør forbindelsen testes igjen.
- 35 3.6.5 IC₅₀-beregning: Kopier og lim inn data for midlere inhibering og standardavvik i en sigmoid dosisrespons med en variabel hellingskalkulator som benytter ikke-linære regresjonsmetoder. Ved bruk av dette verktøy beregnes

IC₅₀ ved å benytte begge av de to metoder: fiksering av kun toppen ved 100% inhibering, eller fiksering av toppen ved 100% inhibering og bunnen ved 0% inhibering. Den metoden som gir den klareste tilpasning, rapporteres så for hver forbindelse. De mest pålitelige IC₅₀-verdier kommer fra beregningen som har den laveste standardfeil. Hvis IC₅₀'ene som er beregnet fra disse to kurvetilpasningsmuligheter viser mer enn en engangsforskjell, eller hvis IC₅₀-standardavvik er større enn IC₅₀, bør forbindelsen testes igjen ved justerte konsentrasjoner.

10 **Beregning av effekten av HCV-serin-protease-inhibitorer i kombinasjon med interferoner**

Effekten av en HCV-serin-protease-inhibitor (HSPI) og et interferon i kombinasjon kan bedømmes i replikonanalysen ved å generere en dosisresponskurve for HSPI i nærvær av forskjellige nivåer av interferon, eller å bestemme en dosisresponskurve for et interferon i nærvær av forskjellige nivåer av HSPI. Målet er å bedømme hvorvidt det er mer eller mindre inhibering av viral RNA-akkumulering enn det som skulle forventes hvis de to medikamenter gir additive effekter på denne RNA. Mer spesielt benyttes den additive definisjon i henhold til Lowe ((1928) "Die Quantitation Probleme der Pharmakologie", "Ergebn. Physiol.", 27, 47-187). Denne definisjon er som følger. Man lar

20 D_{E,INF} være konsentrasjonen for interferon som gir effekten E og man lar D_{E,HSPI} være konsentrasjonen av protease-inhibitor som resulterer i effekten E.

$$1 = \frac{D_1}{D_{E,INF}} + \frac{D_2}{D_{E,HSPI}} \quad (1)$$

25 Så defineres ingen interaksjon eller Lowe-additivitet ved den følgende sammenheng, der kombinasjonen av konsentrasjon D₁ av INF og D₂ av HSPI gir effekten E.

Graden av synergi eller antagonisme uttrykkes ved iso-effektkurver eller isoboler. Kombinansen (D₁, D₂) er et punkt på et diagram der aksene er konsentrasjonene av interferon og HSPI (figur 2). Alle slike kombinasjoner som gir et effektnivå E utgjør E-effektisobolen. Det er nødvendigvis tilfelle at (D_{E,INF}, 0) og (0, D_{E,HSPI}) er punkter på isobolen. Isobolene er rette linjer som forbinder punktene (D_{E,INF}, 0) og (0, D_{E,HSPI}) når den additive ligning (1) er tilfredsstilt.

35 Isoboler som er konkave oppover indikerer synergi og isoboler som er konkave ned indikerer antagonisme. Følger man retningslinjene i henhold til M.C. Berenbaum

((1985) "The expected effect of a combination of agents: the general solution", "J. Theor. Biol.", 114, 413-431); og Greco, Park og Rustom ((1990) "Application of a New Approach of the Quantitation of Drug Synergism to the Combination of cis-Diamin-
 minedichloroplatinum and 1-β-D-arabinofuranosylcytosine", "Cancer Research", 50,
 5 5318-5327) adderes en term til (1) for å gjøre regning for synergi eller antagonisme. Ligningen definerer en responsoverflate som kan tilpasses de prosentuale kontrollverdi ved alle behandlingskombinasjoner. Konturplott fra de tilpassede responsoverflater er isobolene.

- 10 Responsoverflatemodellen antar en sigmoid dosisrespons for hver forbindelse definert ved (2).

$$E = \frac{E_{\text{maks}}}{1 + \left(\frac{[Drug]}{IC50} \right)^m} + B \quad (2)$$

- 15 Konsentrasjonen som en spesifisert aktivitetsnivå E alene er gitt ved ligning (3)

$$D_{E,INF} = IC50_{INF} \left(\frac{E - B}{E_{\text{maks}} - E + B} \right)^{1/m_{INF}} \quad D_{E,HSP1} = IC50_{HSP1} \left(\frac{E - B}{E_{\text{maks}} - E + B} \right)^{1/m_{310}} \quad (3)$$

20

For å tilfredsstille modellen ifølge Greco et al. (1990), må den kombinerte virkning av medikamentene så tilfredsstille ligning (4) for hver kombinasjon av medikamenter som gir dosisresponsnivået E:

$$\begin{aligned} 25 \quad 1 = & \frac{[INF]}{IC50_{INF} \left(\frac{E - B}{E_{\text{maks}} - E + B} \right)^{1/m_{INF}}} + \frac{[HSP1]}{IC50_{HSP1} \left(\frac{E - B}{E_{\text{maks}} - E + B} \right)^{1/m_{310}}} \\ & + \frac{\alpha [INF][HSP1]}{IC50_{INF} IC50_{HSP1} \left(\frac{E - B}{E_{\text{maks}} - E + B} \right)^{1/2m_{INF}} \left(\frac{E - B}{E_{\text{maks}} - E + B} \right)^{1/2m_{310}}} \end{aligned} \quad (4)$$

Parameteren α måler mengden av interaksjon. En null-verdi for α betyr ingen interaksjon eller additivitet fordi ligningen reduseres til (1) der $\alpha = 0$. Gitt IC_{50} 'er, Hill-hellinger (m), maksimumverdi (E_{maks}) og minimumsverdi (B), kan denne ligning løses for å gi effekten som er resultatet av enhver behandlingskombinasjon [INF] og [HSPI].

Derfor definerer denne ligning en responsoverflate. Gitt et forsøk der [INF] og [HSPI] varieres, kan parametrene velges ved bruk av ikke-lineære vektet minst kvadrats regresjon. Parameteren α kan relateres til et synergi målt S (P.S. Hewlett, (1969) "Measurement of potencies of drug mixtures.", "Biometrics", 25, 477-487), som hentes direkte fra isobolene ved en 50% effekt. S er forholdet mellom på den ene side avstanden mellom opprinnelsen og isobolen som definerer aktivitet, på den annen side avstanden fra opprinnelsen til isobolen for de tilpassede data, langs linjen ved 45° fra aksene ($S=ON/OM$ se figur 3). Forholdet er $\alpha = 4(S^2 - S)$.

Den metode som er diskutert av Greco et al. (1990) ovenfor, for tilpasning av responsoverflaten og bestemmelse av synergiparameteren α med sitt signifikansnivå følges av bedømmelse av graden av synergi i en serie av forsøk som tester HSPI'er i kombinasjon med flere forskjellige interferoner. Imidlertid er det et behov for å vekte observasjonene med lavere telling mer enn de med høyere telling. Tellingene relaterer direkte til prosentual kontroll som er effekten E . Ved bruk metoder som beskrevet av R.J. Carroll og D. Rupert ((1988) ("Transformation and Weighting in Regression", Chapman and Hall, New York), kan variabiliteten fra brønn til brønn sees å øke med kvadratet av gjennomsnittskontrollverdien. Derfor blir observasjonene vektet med en over den tilpassede prosentkontrollverdi (E) i kvadrat. Variansen og vektingen som benyttes for å analysere disse forsøk er konsistent med variabilitetssammenhenger som observeres av forskere som undersøker metoder for å analysere radioligandanalyser (D.J. Finney (1976) "Radioligand Assay", "Biometrics", 32, 721-740 og R.A. Dudley, P. Edward, R.P. Ekins, I.G.M. McKinzie, G.M. Raab, D. Rodbard og R.P.C. Rodgers (1985), "Guidelines for Immunoassay Data Processing", "Clinical Chemistry", 31/8, 1264-1271).

Resultater

I et første forsøk ble HCV-serin-protease-inhibitorforbindelse CU testet over et konsentrasjonsområdet fra $3 \mu M$ til $0,0123 \mu M$, det vil si et 244-gangers område.

Interferon- α -2B konsentrasjonene varierer fra 30 enheter pr. prøve til $0,0096$ enheter pr. prøve, det vil si et 3125-gangers område. Som vist i tabell 7 og ved bruk av en enkelt-medikamentbehandling, viser forbindelse CU en IC_{50} -verdi på $0,48 \mu M$ og interferon

IC₅₀ er 2,19 U. Innenfor nøyaktigheten av replikonanalysen, som er ca. 20%, resulterer tilsetning av interferon- α -2B en økning av inhiberingen av replikon-RNA-akkumulering på en dosisavhengig måte. For eksempel resulterer behandling av celler med 0,333 μ M forbindelse CU, i en 28% inhibering av replikon-RNA-akkumulering.

- 5 Behandling av celler med en kombinasjon av 0,333 μ M forbindelse CU, som er 71% av IC₅₀ (0,469 μ M) og 0,24 U interferon- α -2B, som er 11% av interferon- α -2B IC₅₀ (2,05 μ M), resulterer i en 49 %-ig inhibering av replikon-RNA-akkumulering. Således resulterer 71% av en IC₅₀-dose i kombinasjon med 11% av den andre, i 49% inhibering av replikon-RNA-akkumulering. Ved bruk av en intuitiv tilnærming for bestemme hvor-
- 10 vidt en kombinasjonsbehandling er synergistisk eller additiv eller antagonistisk, kan man forutsi at hvis effekten av kombinasjonsbehandlingen kun var additiv, ville man vente at de kombinerte fraksjoner av de to IC₅₀-doser som var nødvendige for oppnå 49% inhibering av replikon-RNA-akkumulering skulle være 98%. Søkere eksperimentelle resultater viser at nivået av inhibering av replikon-RNA-akkumulering oppnås ved
- 15 bruk av 71% pluss 11%, det vil si 82% av IC₅₀-dosen i stedet for 98%, som prediktert for additive effekter i kombinasjonsbehandling. Således synes, ved disse forbindelses-konsentrasjoner, effekten å være synergistisk fordi mindre andelsdoser av IC₅₀-dosene av hver forbindelse benyttes. For å oppnå 49% inhibering av HCV-replikon-RNA enn det som ville kreves for hver forbindelse alene, der 98% av IC₅₀-dosen ville være nød-
- 20 vendige. Resultatene av denne kombinasjonsbehandling er vist i tabell 8 og grafisk i figur 1.

TABELL 7

**Inhibering av replikon-RNA-akkumulering etter 48 timers behandling
med forbindelse CU og interferon- α -2B, individuelt eller i
kombinasjon**

	Interferon- α -2B (enheter)						
Forbindelse CU (kons.)	30 U	6 U	1,2 U	0,24 U	0,048 U	0,0096 U	0 U
3 μ M	99%	99%	99%	99%	98%	98%	98%
1 μ M	99%	98%	96%	95%	92%	93%	88%
0,333 μ M	94%	87%	66%	49%	33%	27%	28%

0,1111 μ M	93%	79%	46%	29%	12%	15%	11%
0,0370 μ M	92%	78%	44%	21%	2%	7%	8%
0,0123 μ M	92%	78%	44%	20%	19%	19%	5%
0 μ M	89%	73%	38%	16%	8%	12%	0%

Disse første resultater, oppnådd som angitt tidligere via bruk av in vitro-replikonanalyse og en enkel additiv analyse av data generert ved denne analyse, demonstrerer at kombinasjonsbehandlingen av replikonceller med en HCV-serin-protease-inhibitor og et interferon, gir minst en additiv antiviral effekt, og sannsynligvis en synergistisk antiviral effekt.

De foregående data er analysert igjen ved bruk av de formelle matematiske verktøy som beskrevet ovenfor for å bestemme hvorvidt sammenhengen mellom HCV-serin-protease-inhibitor CU og interferon- α -2B er synergistisk, additiv eller antagonistisk. De reanalyserte data er vist numerisk i tabell 8 og grafisk i figur 4.

Tabell 8 oppsummerer ytterligere resultater oppnådd med replikonanalysen etter behandling av replikonholdige celler i 48 timer med forskjellige HCV-serin-protease-inhibitorer ifølge oppfinnelsen og flere forskjellige interferoner, individuelt eller i kombinasjon. Det skal påpekes at standardavviket for verdiene målt for inhibering av HCV-replikon RNA i replikonanalysen er rundt 20%. Forbindelsene testes over et bredt konsentrasjonsområde og ved lavere forbindelseskonsentrasjon enn det som forårsaket ikke signifikant inhibering av HCV-replikon RNA konsentrasjonen. På grunn av dette rundt 20% standardavvik for analysen vil enkelte datapunkter generere negative verdier. Negative inhiberingsverdier indikerer i et spesielt forsøk at det er gjennomsnittlig mer HCV-replikon RNA-molekyler i de forbindelsesbehandlede prøver enn det er i blind-prøvene.

TABELL 8

**Inhibering av replikon-RNA-akkumulering etter 48 timers behandling
med HCV-serin-protease-inhibitorer og forskjellige interferoner,
individuelt eller i kombinasjon**

5

FORSØK 1

Forbindelse CU (μM)	Interferon-α-2B (enheter)						
	30,00	6,00	1,20	0,24	0,048	0,0096	0,000
0,000	89%	73%	38%	16%	8%	12%	0%
0,012	92%	78%	44%	20%	19%	19%	5%
0,037	92%	78%	44%	21%	2%	7%	8%
0,111	93%	79%	46%	29%	12%	15%	11%
0,333	94%	87%	66%	49%	33%	27%	28%
1,000	99%	98%	96%	95%	92%	93%	88%
3,000	99%	99%	99%	99%	98%	98%	98%

FORSØK 2

Forbindelse CU (μM)	Interferon-α-2B (enheter)						
	30	6	1,2	0,24	0,048	0,0096	0
0	86%	61%	27%	4%	-7%	5%	0%
0,0123	87%	66%	17%	-23%	8%	8%	10%
0,37	85%	62%	13%	-2%	0%	-1%	1%
0,1111	87%	68%	37%	20%	-6%	12%	10%
0,333	92%	77%	58%	41%	26%	25%	44%
1	98%	96%	90%	86%	84%	83%	85%
3	99%	99%	98%	98%	98%	98%	98%

10

FORSØK 3

Interfe- ron-α-2B (enheter)	Forbindelse CU (μM)								
	3	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,0234	0
0	98%	93%	62%	23%	12%	-2%	-4%	-2%	0
0,049	98%	95%	70%	39%	12%	2%	6%	9%	3%

56

0,123	98%	95%	70%	43%	15%	7%	2%	5%	2%
0,307	98%	95%	73%	46%	16%	14%	7%	19%	-3%
0,768	98%	95%	82%	56%	43%	34%	28%	32%	28%
1,920	98%	98%	87%	71%	51%	54%	49%	52%	45%
4,8	99%	98%	92%	82%	74%	71%	69%	71%	59%
12,0	99%	98%	96%	89%	87%	85%	85%	85%	80%
30,0	99%	99%	98%	95%	93%	92%	92%	93%	89%

FORSØK 4

Interfe- ron- α -2B (enheter)	Forbindelse CU (μ M)								
	3	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,0234	0
0	98%	94%	74%	38%	17%	3%	-1%	6%	0%
0,049	98%	93%	60%	22%	29%	21%	-9%	-6%	6%
0,123	98%	93%	67%	29%	21%	12%	3%	2%	-8%
0,307	98%	93%	66%	29%	22%	4%	-3%	-4%	10%
0,768	98%	95%	67%	46%	24%	21%	20%	9%	15%
1,920	98%	96%	73%	48%	43%	44%	27%	33%	29%
4,8	98%	97%	82%	61%	61%	59%	52%	55%	43%
12,0	99%	98%	91%	75%	76%	72%	71%	74%	73%
30,0	99%	98%	96%	89%	86%	85%	84%	84%	83%

5

FORSØK 5

Ovin- interferon τ (enheter)	Forbindelse CU (μ M)								
	3	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,0234	0
0	98%	95%	65%	24%	-1%	-14%	-14%	-12%	0
0,9375	97%	95%	72%	41%	17%	11%	12%	6%	17%
1,875	97%	95%	71%	40%	31%	18%	18%	11%	4%
3,75	98%	96%	75%	44%	38%	25%	34%	18%	17%
7,5	98%	96%	82%	61%	42%	37%	25%	26%	36%
15	98%	97%	84%	64%	59%	61%	56%	51%	53%
30	98%	98%	90%	79%	72%	68%	65%	68%	68%
60	98%	98%	93%	87%	80%	80%	74%	77%	82%
120	98%	98%	95%	92%	86%	87%	86%	86%	87%

57

FORSØK 6

Interfe- ron- α -2B (enheter)	Forbindelse EC (μ M)								
	3	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,0234	0
0	96%	93%	81%	56%	29%	23%	19%	1%	0
0,0492	96%	92%	80%	60%	31%	15%	19%	29%	6%
0,1229	96%	94%	78%	58%	32%	13%	20%	20%	4%
0,3072	97%	95%	82%	60%	38%	32%	34%	42%	23%
0,768	97%	95%	87%	66%	43%	41%	46%	43%	25%
1,92	98%	97%	90%	73%	62%	51%	54%	58%	47%
4,8	98%	97%	94%	87%	76%	73%	78%	76%	69%
12,0	98%	98%	96%	92%	86%	86%	86%	85%	84%
30,0	98%	98%	96%	96%	93%	92%	92%	95%	91%

FORSØK 7

5

Interfe- ron- α -2B (enheter)	Forbindelse EC (μ M)								
	3,0	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,02344	0
0	96%	92%	81%	47%	28%	17%	-1%	-8%	0
0,0492	96%	93%	78%	58%	21%	8%	-12%	-10%	-17%
0,1229	95%	93%	79%	64%	14%	5%	14%	7%	-22%
0,3072	95%	91%	80%	64%	22%	15%	5%	2%	-5%
0,768	96%	95%	81%	64%	34%	21%	19%	20%	4%
1,92	96%	95%	88%	78%	44%	41%	19%	33%	21%
4,8	97%	95%	91%	85%	60%	58%	60%	53%	49%
12,0	97%	97%	95%	91%	77%	72%	76%	70%	71%
30,0	98%	98%	97%	94%	91%	86%	85%	85%	84%

FORSØK 8

Interfe- ron- β (enheter)	Forbindelse CU (μ M)								
	3,0	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0938	0,0469	0,02344	0
0	97%	95%	77%	34%	16%	6%	-7%	0%	0
0,2344	98%	97%	83%	49%	31%	19%	-21%	-7%	1%
0,4688	98%	96%	84%	56%	39%	27%	10%	-3%	21%
0,9375	98%	97%	91%	73%	54%	42%	31%	15%	30%

58

1,875	98%	98%	95%	80%	65%	58%	65%	60%	60%
3,75	98%	98%	97%	92%	86%	81%	77%	73%	79%
7,5	99%	98%	98%	96%	93%	93%	93%	90%	92%
15,0	99%	99%	99%	97%	97%	96%	97%	95%	96%
30,0	99%	99%	99%	99%	98%	99%	98%	98%	97%

FORSØK 9

Interfe- ron- α -2B (enheter)	Forbindelse EP (μ M)								
	8	4	2	1	0,5	0,25	0,0125	0,0625	0
0	94%	96%	96%	92%	64%	36%	23%	8%	0
0,0492	95%	96%	96%	91%	67%	25%	28%	8%	3%
0,1229	95%	97%	96%	91%	65%	44%	4%	11%	4%
0,3072	95%	97%	96%	91%	71%	46%	20%	8%	20%
0,7680	96%	97%	97%	93%	75%	49%	36%	24%	24%
1,92	96%	97%	97%	94%	82%	67%	49%	52%	54%
4,8	96%	98%	97%	96%	90%	79%	75%	75%	70%
12	97%	98%	98%	98%	96%	94%	94%	95%	92%
30	97%	98%	98%	98%	96%	94%	94%	95%	92%

5

FORSØK 10

Interfe- ron- α -2B (enheter)	Ribavirin (μ M)								
	200	80	32	12,8	5,12	3,048	0,8192	0,3277	0
0	85%	62%	43%	3%	-8%	-17%	-22%	-6%	0
0,0492	87%	66%	48%	44%	11%	-4%	-10%	11%	-7%
0,1229	84%	64%	53%	40%	26%	-12%	-5%	11%	-9%
0,3072	86%	70%	62%	44%	28%	1%	6%	14%	7%
0,7680	90%	80%	72%	65%	38%	30%	28%	44%	29%
1,92	93%	85%	77%	76%	61%	57%	58%	50%	46%
4,8	96%	92%	87%	83%	82%	74%	71%	77%	72%
12	97%	95%	93%	91%	90%	89%	90%	89%	85%
30	98%	97%	96%	95%	94%	94%	93%	95%	94%

Som vist i figurene 4-13, og som grafisk viser data fra tabell 8, plottet ved bruk av den ovenfor beskrevne matematiske metode for måling av synergi, er isobolkurvene for alle

kombinasjoner av HCV-serin-protease-inhibitorer og interferoner som ble testet, konkave opp, noe som indikerer at den antivirale effekt for behandlingene i replikon-analysen, er synergistisk. Disse resultater er tabellert i tabell 9 som viser relative synerginivåer for kombinasjonsbehandlingen og IC_{50} -verdiene for antivirale forbindelser som benyttes individuelt. Nøkkelelementene i tabell 9 er α -verdien og p-verdiene for bestemmelsene. α -uttrykket er et mål på maksimal infleksjon av isobolene for hver kombinasjonsbehandling. En α -verdi på null indikerer additivitet, en negativ verdi indikerer antagonisme og som tilfellet er ved kombinasjonsbehandlingene med HCV-serin-protease-inhibitoren og interferonene som vist ovenfor, indikerer en verdi større enn 1, synergi. Desto større α -parameteren, desto større synergien. Som vist i tabell 9 har, for kombinasjonene av HCV-serin-protease-inhibitorer og interferoner, og selv når man ignorerer signifikansnivåene i hvert forsøk, en t-test basert på de 9 forsøk for gjennomsnittlig α -verdi lik 0 (ingen interaksjon) en p-verdi på 0,00014, noe som antyder at resultatene er høyst signifikante.

Beregningen av synergien basert på metoden i henhold til Greco Rustom ((1990) "Application of a New Approach for the Quantitation of Drug Synergisme to the Combination of cis-diamminedichloroplatinum and 1- β -D-arabinofuranosylcystosin", "Cancer Research", 50, 5318-5327) som ble benyttet ved denne analyse er et ideelt verktøy for å evaluere typen av forsøksdata som kan genereres ved bruk av HCV-replikonanalysen. Det finnes andre metoder som er anvendt for studier av antivirale forbindelser som for eksempel Pritchard og Shipman (M.N. Pritchard og C. Shipman Jr., (1990) "A three-dimensional model to analyze drug-drug-interactions (review)", "Antiviral Res.", 14: 181-206). Anvendelsen av deres synergiberegningsmetode på de data som er vist i tabell 8 indikerer også at kombinasjonsbehandlingen av replikonceller med en HCV-serin-protease-inhibitor og interferon, vil resultere i en synergistisk inhibering av HCV-replikon-RNA-akkumulering (data ikke vist).

TABELL 9

**Relative nivåer for synergi for kombinasjonsbehandling og
IC₅₀-verdier for antivirale forbindelser brukt individuelt**

5

	HCV-serin-protease-inhibitor (HSPI)	Interferon	IC ₅₀ INF (enheter)	IC ₅₀ HSPI (μM)	α (SF) ¹	P-verdi α >0
Forsøk 1	Forbindelse CU	IFN-α-2B	2,05	0,469	0,477 (0,09)	<0,0001
Forsøk 2	Forbindelse CU	IFN-α-2A	3,72	0,446	0,770 (0,12)	<0,0001
Forsøk 3	Forbindelse CU	IFN-α-2B	2,36	0,587	0,730 (0,08)	<0,0001
Forsøk 4	Forbindelse CU	IFN-α-2A	5,67	0,633	0,438 (0,08)	<0,0001
Forsøk 5	Forbindelse CU	IFN-τ	13,22	0,605	0,328 (0,07)	<0,0001
Forsøk 6	Forbindelse EC	IFN-α-2B	2,53	0,384	0,516 (0,10)	<0,0001
Forsøk 7	Forbindelse EC	IFN-α-2A	5,50	0,312	1,24 (0,20)	<0,0001
Forsøk 8	Forbindelse CU	IFN-β	1,82	0,466	0,551 (0,09)	<0,0001
Forsøk 9	Forbindelse EP	IFN-α-2B	3,06	0,426	0,490 (0,12)	<0,0001
Forsøk 10	Ribavirin	IFN-α-2B	1,22	145	-0,24 (0,067)	0,0004

¹(SF) Standardfeil

En annen måte for evaluering av den synergistiske art av anti-HCV-medikamentbehandling ved bruk av de her beskrevne HCV-serin-protease-inhibitorer og interferoner er å bruke den samme metode som beskrevet ovenfor for å evaluere dagens standard kombinasjonsterapi for HCV, det vil si interferon-α-2B i kombinasjon med Ribavirin i replikonanalysen. Den siste linje i tabell 9 viser at α-parameteren for blandingen av interferon-α-2B og Ribavirin er et negativt tall, noe som antyder at det er en liten grad av antagonisme mellom disse to medikamenter. Dette understreker ytterligere signifikansen av kombinasjonsbehandlingen som her beskrevet, som anvender de her beskrevne HCV-serin-protease-inhibitorer i kombinasjon med interferoner, idet at disse behandlinger klart gir synergi, men standard kombinasjonsterapien i bruk for HCV (interferon-α-2B i kombinasjon med Ribavirin) ikke er synergistisk i replikonanalysen.

20

Den foregående sammenligning av kombinasjonsbehandlinger som anvender de her beskrevne HCV-serin-protease-inhibitorer pluss interferoner opp mot Ribavirin pluss interferon i replikonanalysen indikerer klart at den førstnevnte er synergistisk, mens den sistnevnte ikke er det. Forsøksresultatene som oppnås ved bruk av replikonanalysen antyder at den meget lavere dose interferon vil være effektiv, hvis interferonet benyttes i

25

kombinasjon med en HCV-serin-protease-inhibitor enn det som er nødvendig når interferon- α -2B benyttes i kombinasjon med Ribavirin. Replikonanalysen er et brukbart modellsystem for å teste potensielle anti-HCV-forbindelser og man stoler i stor grad på denne som en effektiv prediktor for forbindelsers anti-HCV-aktivitet. Se til dette, for eksempel Blight et al. (2000) "Efficient Initiation of HCV RNA Replication in Cell Culture", "Science", 8; 290: 1972-1974 og Chung et al. (2001) "Hepatitis C virus replication is directly inhibited by IFN- α in a full-length binary expression system.", "Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.", 98 (17): 9847-52. Ribavirin alene er marginalt effektivt med henblikk på å redusere akkumuleringen av HCV-replikon-RNA i replikonanalysen (tabell 8, forsøk 10 samt siste linje i tabell 9). Dette resultat er åpenbart i konflikt med in vivo-studier der, benyttet alene, Ribavirin ikke har noen signifikant terapeutisk verdi for behandling av HCV. Tvert imot har, i replikonanalysen, og med korleksjon for cytotoxissiteten som beskrevet ovenfor, Ribavirin en IC_{50} på 145 μ M. Dette resultat kan forklares ved å erkjenne at replikonanalysen tillater evaluering av høye Ribavirin-konsentrasjoner som ikke ville være mulig i humanterapi på grunn av in vivo cytotoxissitet (A. Chutaputti (2000), "Adverse effects and other safety aspects of the hepatitis C antivirals", "Journal of Gastroenterology and Hepatology", 15 suppl., E156-63).

Denne evaluering krever nødvendigvis bedømmelse av cytotoxissiteten for Ribavirin. Slik toksissitet opptrer hos pasienter og i cellulære analyser (M.L. Shiffman, S.B. Verbeke, P.M. Kimball (2000) "Alpha interferon combines with ribavirin potentiates proliferative suppression but not cytokine production in mitogenically stimulated human lymphocytes", "Antiviral Research.", 48(2):91-9). I forsøkene som her beskrives er Ribavirin cytotoxissiten i replikonanalysen observert og målt på to måter. I både den XTT metabolske analysen for å bestemme replikoncelle-levedyktighet (M.W. Roehm, G.H. Rodgers, S.M. Hatfield, A.L. Glasebrook (1991), "An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT", "Journal of Immunol. Methods", 142(2): 257-65) og den TaqMan® kvantitative RT-PCR-analyse som måler glyceraldehyd-3-fosfatdehydrogenase (GAPDH) mRNA-nivåene i behandlede mot ikke-behandlede celler i replikonanalysen (N. Brin, M. Szamel, A.R. Young, K.P. Wittern, J. Bergemann (2000), "Comparative quantification of IL-1 β , IL-10, IL-10r, TNF α and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin in vivo", "Inflammation Research.", 49(6): 290-6), ble det observert signifikante Ribavirin-indusert cytotoxissitet, men er korrigert som følger. Det antas at nivået av GAPDH mRNA som er et konstitutivt uttrykt husholdningsgen, er det samme i alle levedyktige celler. Det er kjent fra måling av GAPDH mRNA-nivåer i celler som er behandlet med transkripsjonsinhibitor actinomycin D at halveringstiden for GAPDH mRNA kun er noen timer

(data ikke vist). Således postuleres det, slik det er gjort av andre som benytter TaqMan®-teknologien for å bestemme nivåene av særlig mRNA'er er humane celler, at GAPDH mRNA-nivåene er proporsjonale med antallet levedyktige celler (VCN) i enhver gitt prøve, med sammenhengen $VCN = 2^{(40 - Ct_{GAPDH \text{ mRNA}})}$. VCN beregnes for hver av replikonanalyse-prøvebrønnene og derefter divideres HCV-replikon-RNA-kopi-
 5 antallet for en spesifikk brønn med VCN for denne brønn. Når det er beregnet, benyttes dette forhold i stedet for HCV-kopiantallet for å beregne inhibering ("Avg. Inh using ratio"; figur 14.A). Uten korreksjon av replikonanalysedata på grunn av denne cytotoxissitet, blir cytotoxissiteten lest som falsk positiv inhibering av HCV RNA-replikon-
 10 akkumuleringen. I replikonanalysen antas det at den målte inhibering av HCV RNA-replikon-akkumuleringen er summen av den virkelige inhibering av HCV RNA-replikon-akkumulering og at den tilsynelatende inhibering av HCV RNA-replikon-akkumuleringen skyldes cytotoxissitet. Det antas videre at, basert på den nære korrelasjon av XTT- og TaqMan® GAPDH mRNA-målinger av cytotoxissitet, at inhiberingen
 15 av akkumuleringen av GAPDH mRNA som forårsaket av forbindelser som er testet i replikonanalysen, er et pålitelig mål på tilsynelatende inhibering av HCV RNA-replikon-akkumulering på grunn av cytotoxissitet. Således kan den virkelige anti-HCV-aktivitet for en forbindelse i replikonanalysen, korrigert for generell cytotoxissitet, estimeres ved å dividere antall HCV-replikon-RNA-molekyler som er målt i hver prøve
 20 med VCN og derved normalisere antallet levedyktige celler i hver prøve. Ved bruk av denne metode viser figur 14A et estimat av virkelig Ribavirin anti-HCV-aktivitet i replikonanalysen ("Avg. Inh using ratio"). Estimaten av IC_{50} for Ribavirin beregnes best ved å benytte denne metode. I figur 14A viser "Avg. Inh original" den ikke-korrigerte IC_{50} for Ribavirin som er omtrent $80 \mu M$, mens den korrigerte IC_{50} -verdi beregnet fra
 25 "Avg. Inh using ratio"-kurven er omtrent $145 \mu M$. Merk at forskjellen mellom korrigert og målt inhibering av HCV RNA-replikon-akkumulering som et resultat av interferon- α -2B-behandlingen (figur 14B) er insignifikant i lys av rundt 20% CV for replikonanalysen. På samme måte som interferon- α -2B viste HCV-serin-protease-inhibitorene som ble testet i dette eksempel ingen signifikant cytotoxissitet ved de benyttede konsentrasjoner. Dette bestemmes ved bruk av XTT-analyser, hvori TC_{50} -verdiene for de forskjellige forbindelser er: CU= $64,7 \mu M$, EP>> $10 \mu M$ og EC>> $50 \mu M$. Disse TC_{50} -verdier er 20-140 ganger større enn IC_{50} -verdiene som vises i tabell 9. Således har cytotoxissiteten for disse forbindelser ingen signifikant effekt på HCV RNA-akkumuleringen i
 30 replikonanalysen innen nøyaktighetsområdet for analysen, fordi slik cytotoxissitet kun inntreffer ved HCV-serin-protease-inhibitorkonsentrasjoner som er betydelig større enn de som ble testet i replikonanalysen.

Konklusjonen hva angår effektiviteten av HCV-serin-protease-inhibitorer og interferoner, individuelt og i kombinasjon

Anti-HCV-aktivitetene for de herværende HCV-serin-protease-inhibitorer og forskjellige interferoner, bruk alene i HCV-replikonanalysen, er vist i kolonnene og linjene i de individuelle forsøk som utgjør tabell 8 som benytter kun et antiviral middel. Tabell 9 oppsummerer IC_{50} -verdiene som måles for hver antiviral forbindelse testet alene. De foregående resultater, avledet via bruk av in vitro replikonanalysen, viser også at kombinasjonsbehandling av replikonceller med HCV-serin-protease-inhibitorer ifølge oppfinnelsen og forskjellige interferoner, gir synergistiske antiviral effekter. Det er fullt ut forventet at disse effekter vil translateres til in vivo-effektivitet.

Kombinasjonsterapi ved bruk av HCV-serin-protease-inhibitorer ifølge oppfinnelsen har flere vesentlige fordeler i forhold til enkeltmedikament terapi. Ved for det første å muliggjøre behandling med lavere doser av de individuelle medikamenter enn det som ville være brukt alene, vil man forvente en reduksjon i toksisitet og bivirkninger i forbindelse med behandlingen. Dette er særlig viktig når det gjelder interferonterapi der bivirkningene er alvorlige, og er påvist å være proporsjonale med den dose som administreres til pasientene. De foregående data antyder at en dose av HCV-serin-protease-inhibitor som CU ved IC_{95} -nivået kan kombineres med en dose av interferon- α , for eksempel ved IC_{50} -nivået, og resultatet vil være meget effektivt terapeutisk sett enn det som kan oppnås med HCV-serin-protease-inhibitoren alene uten de ugunstige bivirkninger som forårsakes av de høye doser av interferon- α . En annen hovedfordel ved kombinasjonsterapi er at fordi de to medikamenter virker uavhengig, er det mindre sjanse for utvikling av mutante HCV-stammer som motstår behandling. Utvikling av resistens er en hovedbekymring med RNA-viruser som HCV. På grunn av den høye mutasjonsgrad kan slike viruser hurtig tilpasse seg miljøbelastninger. Den tredje fordel ved kombinasjonsterapi kan være reduserte omkostninger på grunn av behovet for lavere mengder av terapeutiske midler som er krevet for effektiv behandling.

Ytterligere immunomodulatorer som kan benyttes ved metodene som beskrives her, er for eksempel α -interferon-2A, konsensus-interferon, τ -interferon, interferon + Ribavirin (Rebatron), pegylert interferon og promotere av interferongenekspresjon. Det er fullt anticipert at anti-HCV-aktiviteten for disse forbindelser vil forbedres når de benyttes i kombinasjon med HCV-serin-protease-inhibitorer som beskrevet her. Da interferoner er kjent for å være aktive in vivo og i replikonanalysen, ventes det at de her beskrevne HCV-serin-protease-inhibitorer også vil være aktive in vivo og viktigere, være i stand til å utløse synergistisk aktivitet når de benyttes i kombinasjon med interferoner, immu-

systemstimulatorer derav eller andre forbindelser med antiviral HCV-aktivitet som virker med egen mekanisme annen enn inhiberingen av HCV-serin-proteasen.

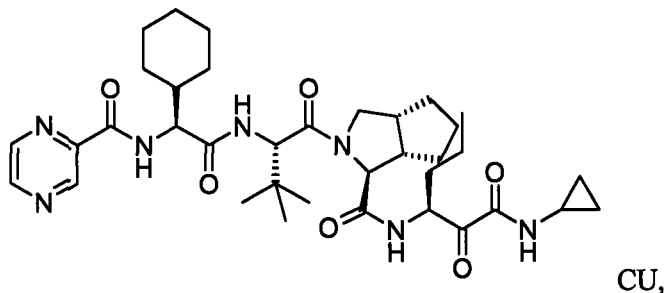
Den beste gjengse terapi for HCV benytter interferon- α og nukleosidanalogene
5 Ribavirin. Denne behandling er kun marginalt effektiv og resulterer i signifikante
bivirkninger som reduserer pasientfordrageligheten ("Chronic Hepatitis C: Current
Disease Management", US Department of Health and Human Services, National
Institutes of Health, 1999). Hos transplantatpasienter er det i tillegg ikke klart om
10 Ribavirin-interferonkombinasjonen virker og kan i realiteten være verre enn interferon
alene ("Chronic Hepatitis C: Current Disease Management", US Department of Health
and Human Services, National Institutes of Health, 1999).

De resultater som er vist ovenfor, viser en synergistisk kombinasjonseffekt når inter-
feroner benyttes med ny klasse HCV-antivirale midler, serin-protease-inhibitorer
15 ifølge oppfinnelsen. Det ventes fullt ut at in vitro-resultatene som her er beskrevet vil
føre til mer effektiv behandling av HCV-pasienter enn det som i dag er mulig ved bruk
av interferon alene. Subterapeutiske doser av interferon kunne mobilisere pasientens
immunsystem for bedre å bekjempe virusen og serin-protease-inhibitoren kan angripe
virusen direkte og ta seg av virusen i et to-sidig angrep via forskjellige virknings-
20 mekanismer. Behandling av HCV-infeksjon kan således oppnås til redusert pris for
pasienten uttrykt både ved skadelige bivirkninger og lavere økonomiske utgifter for
nødvendige farmasøytiske midler da mindre mengder av begge medikamenter vil være
nødvendig for effektiv HCV-antiviral terapi.

P a t e n t k r a v

1.

Forbindelse, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er gitt ved
 5 strukturen



eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

2.

10 Farmasøytisk preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det
 omfatter en farmasøytisk akseptabel mengde av forbindelsen ifølge krav 1 og en
 farmasøytisk akseptabel bærer.

3.

15 Anvendelse av en forbindelse ifølge krav 1, for fremstilling av et medikament for
 behandling av HCV-infeksjon.

1/14

Figur 1.

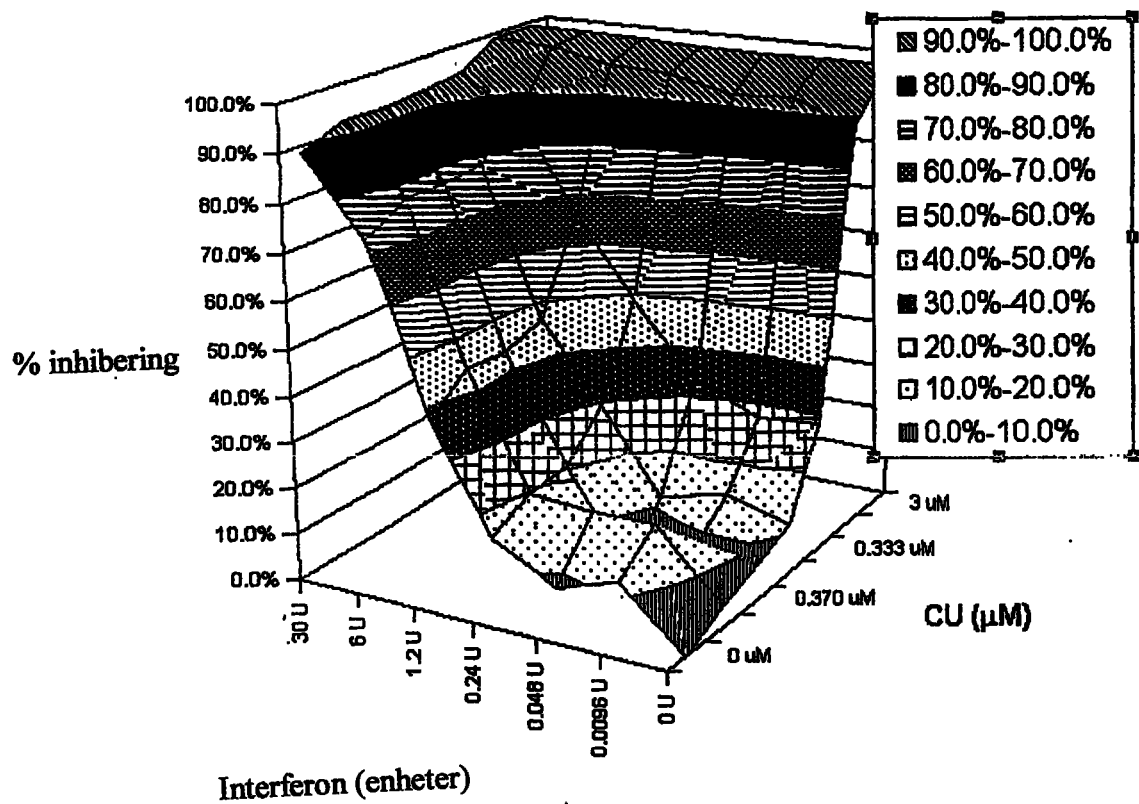
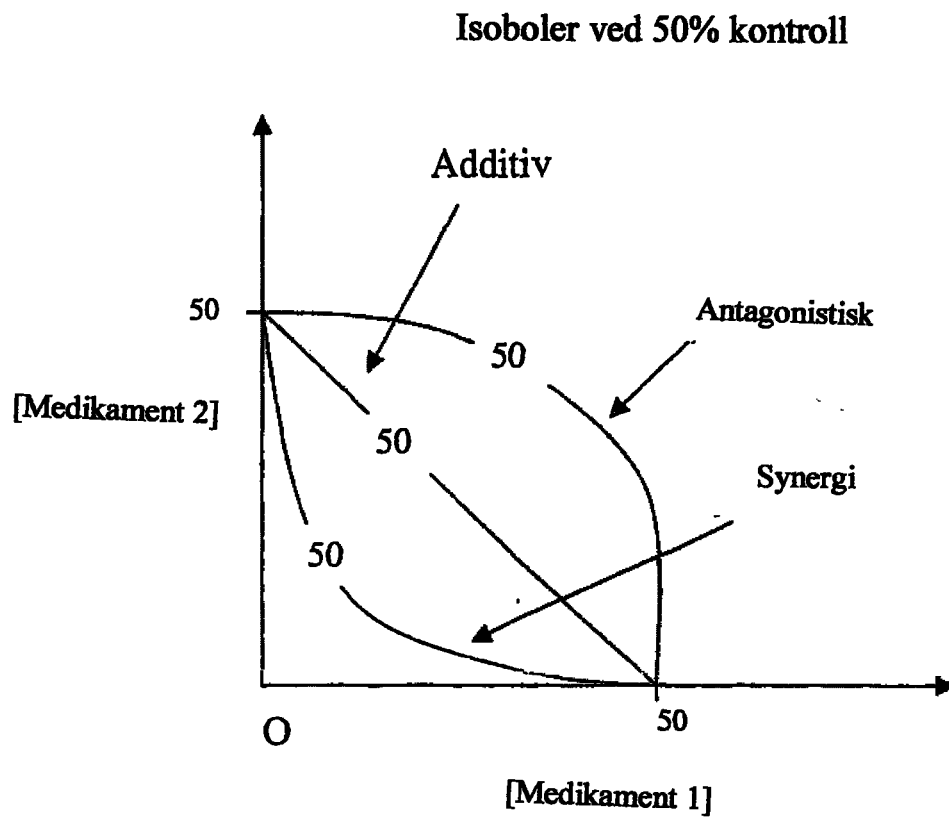
Kombinasjonsbehandling med interferon α -2B og forbindelse CU

Fig 2.



3/14

Fig. 3.

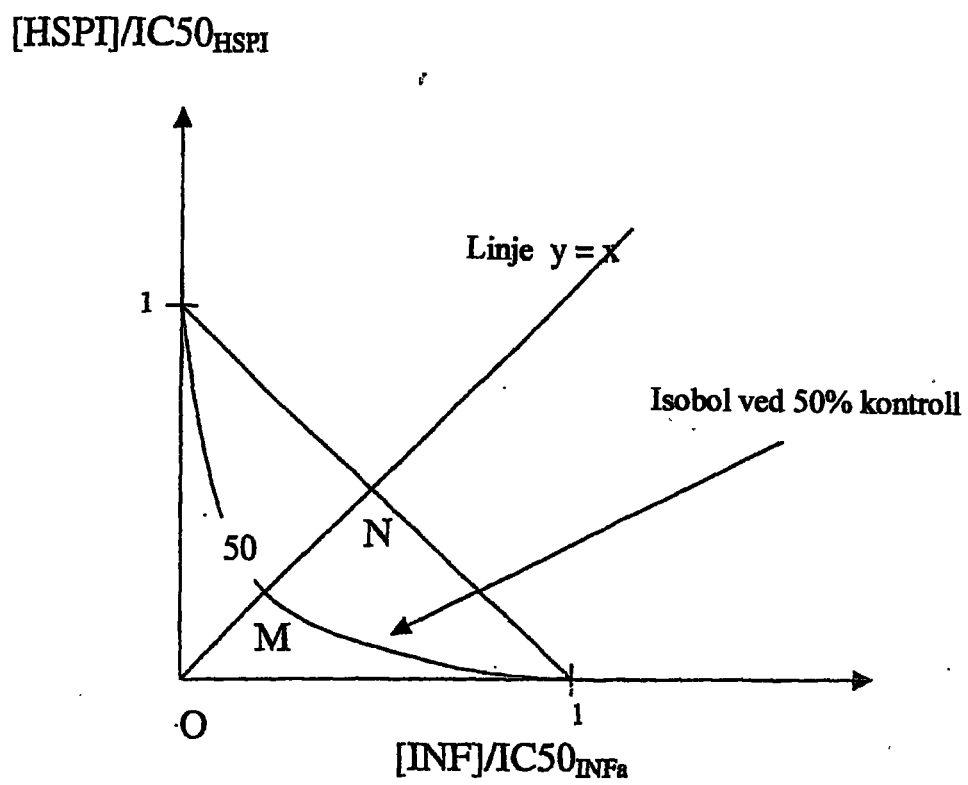
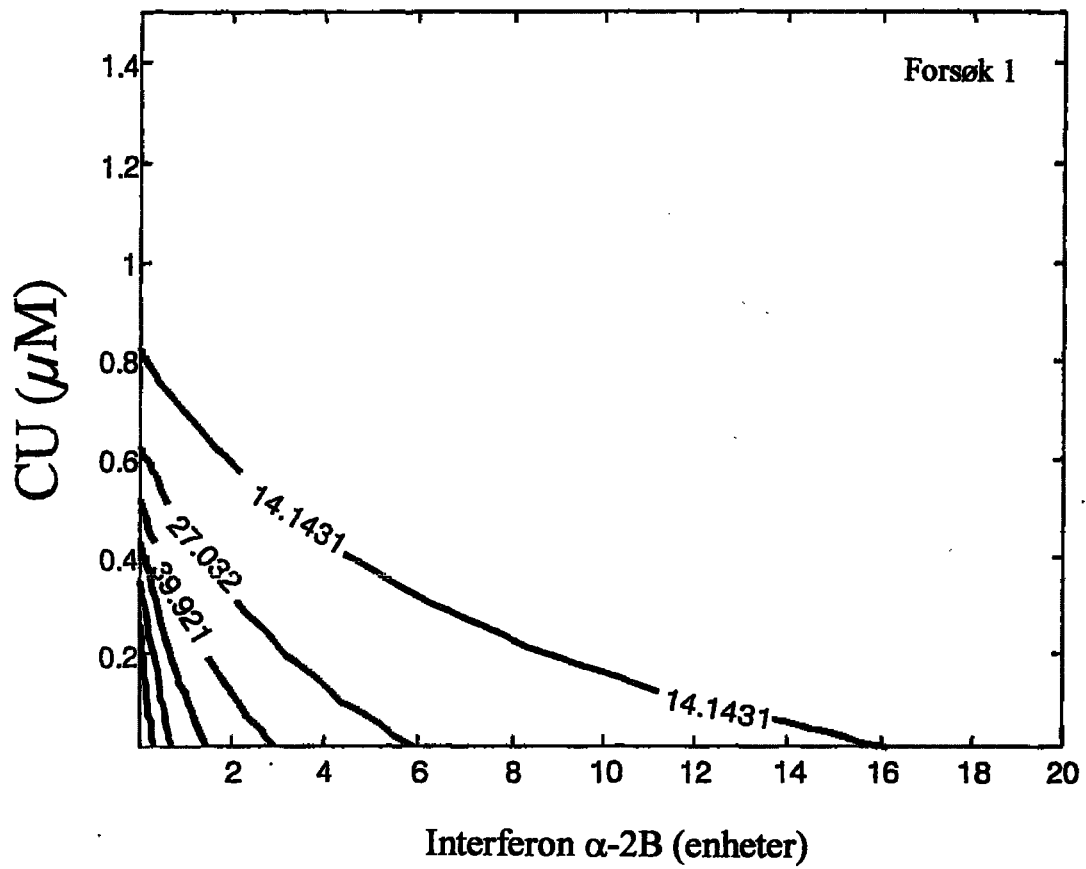
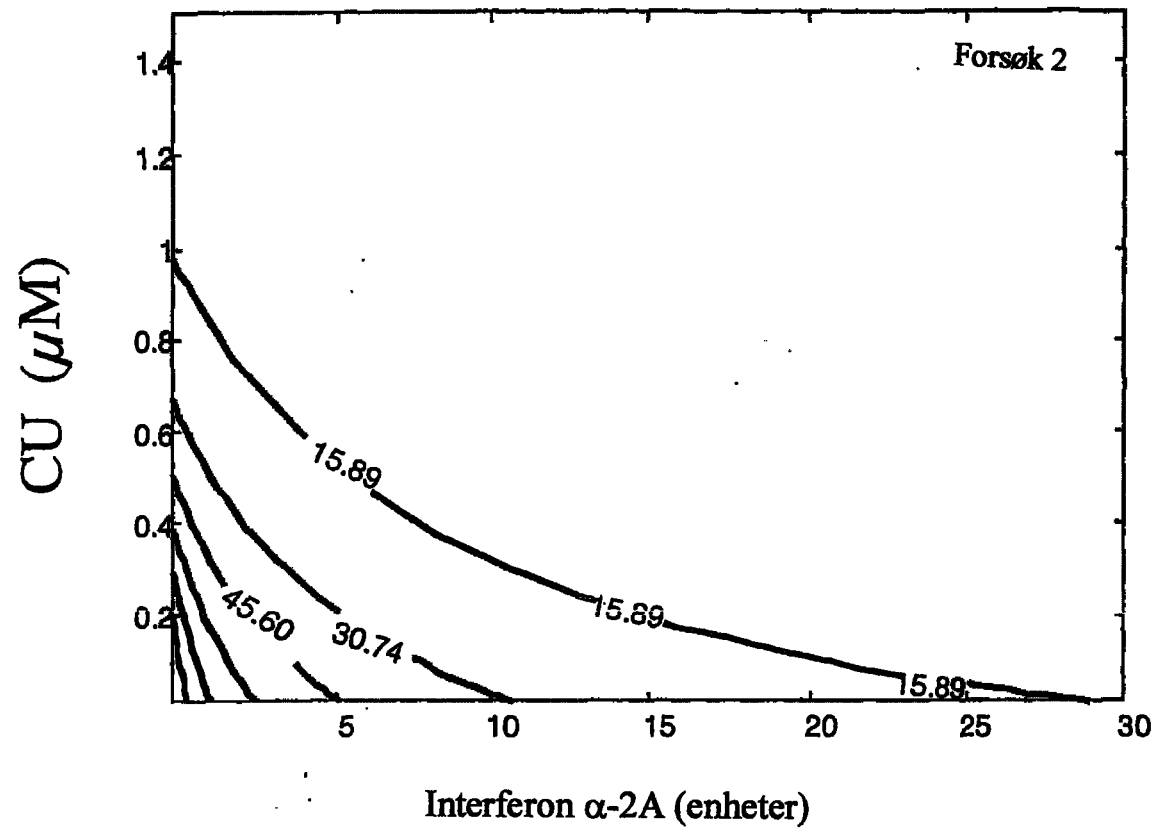


Fig. 4.



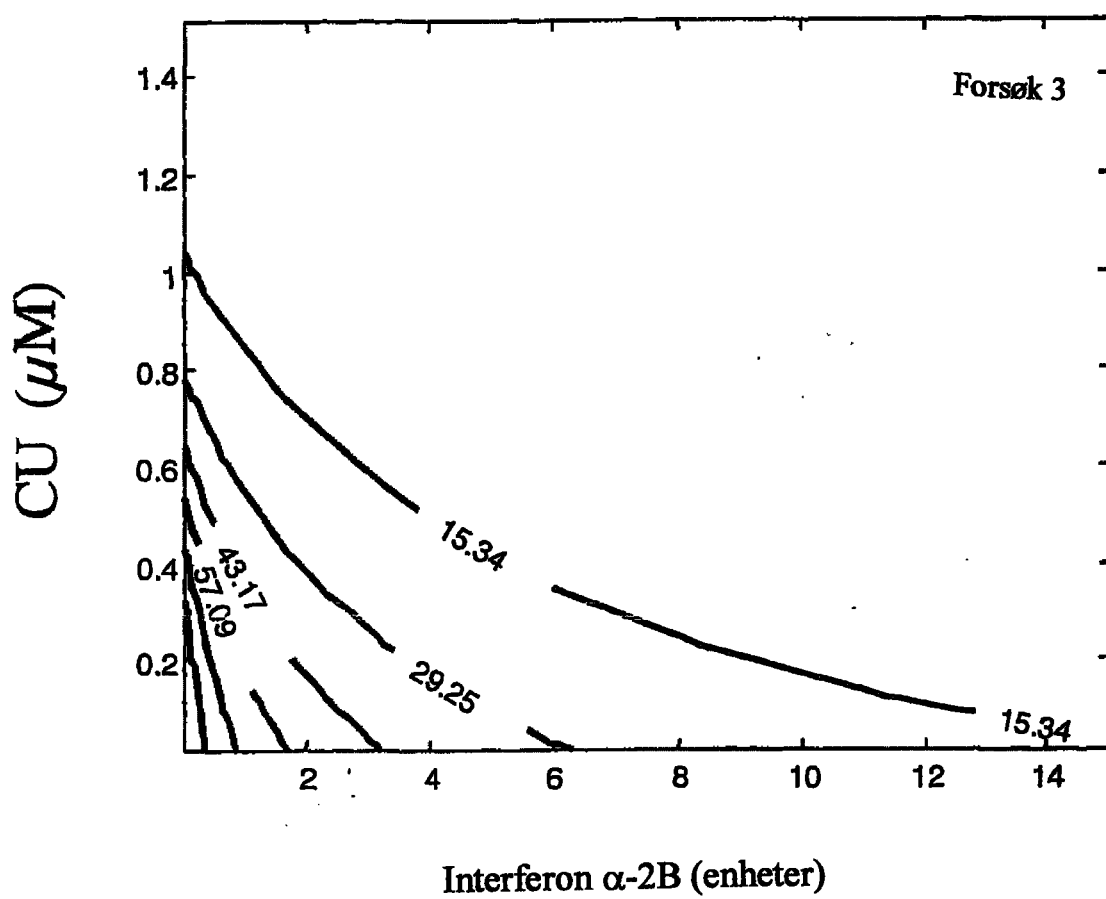
5/14

Fig. 5



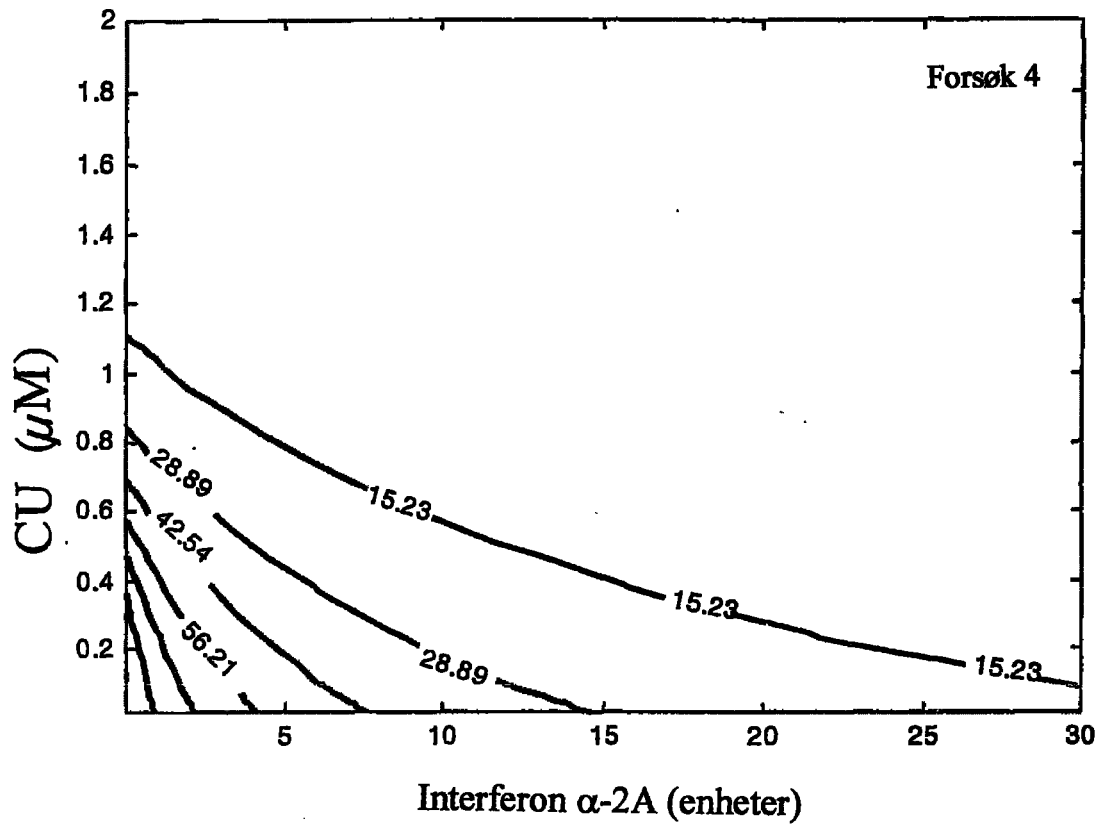
6/14

Fig. 6



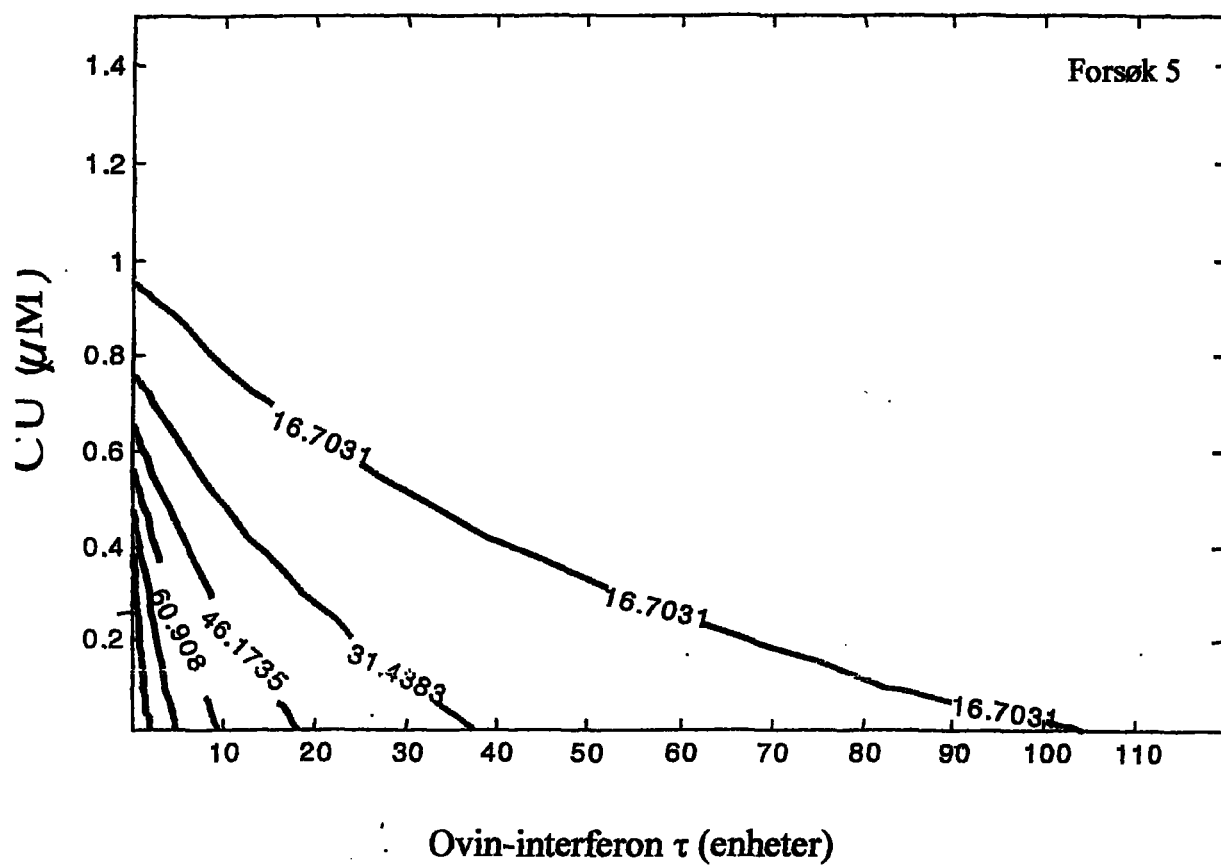
7/14

Fig. 7



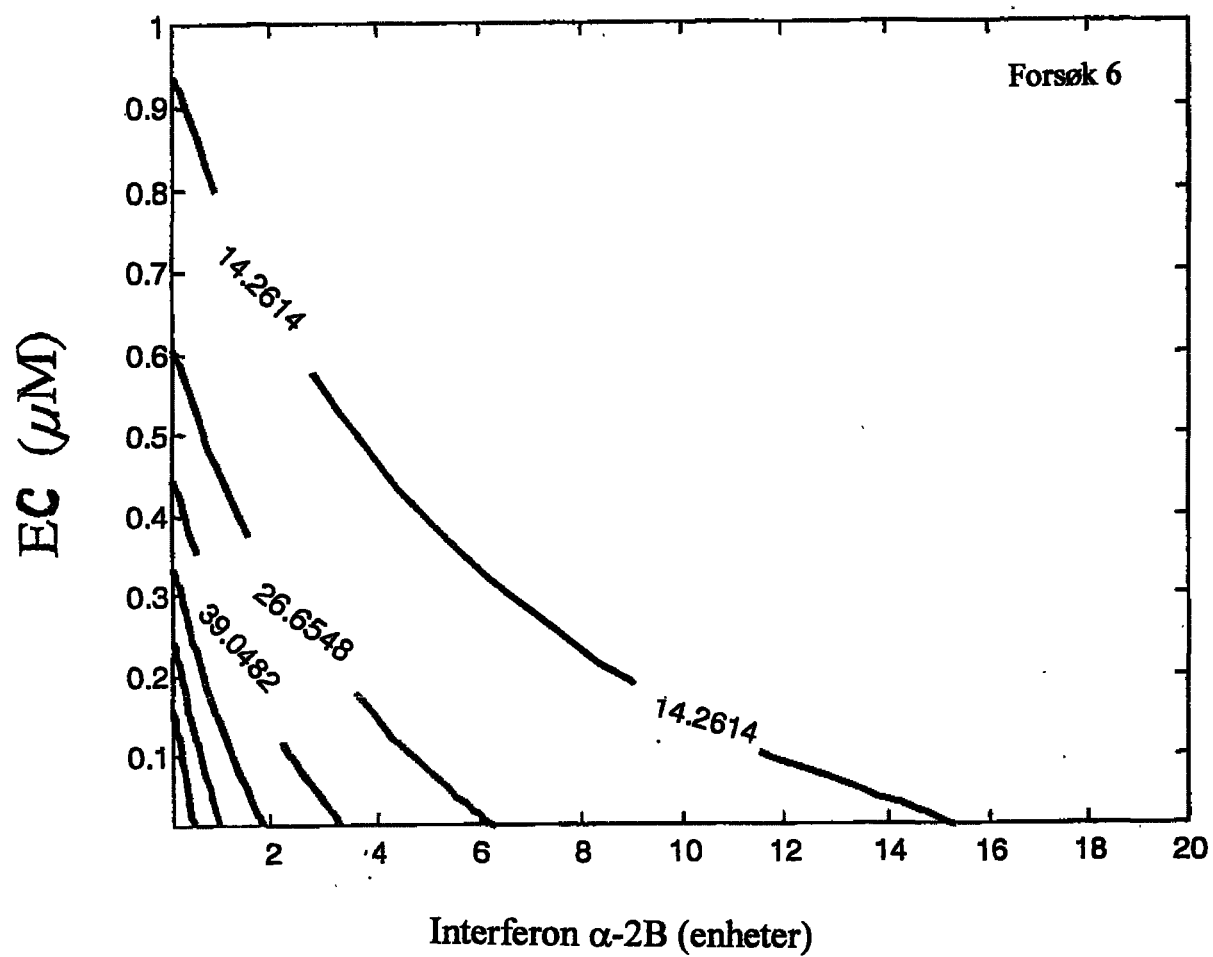
8/14

Fig. 8.



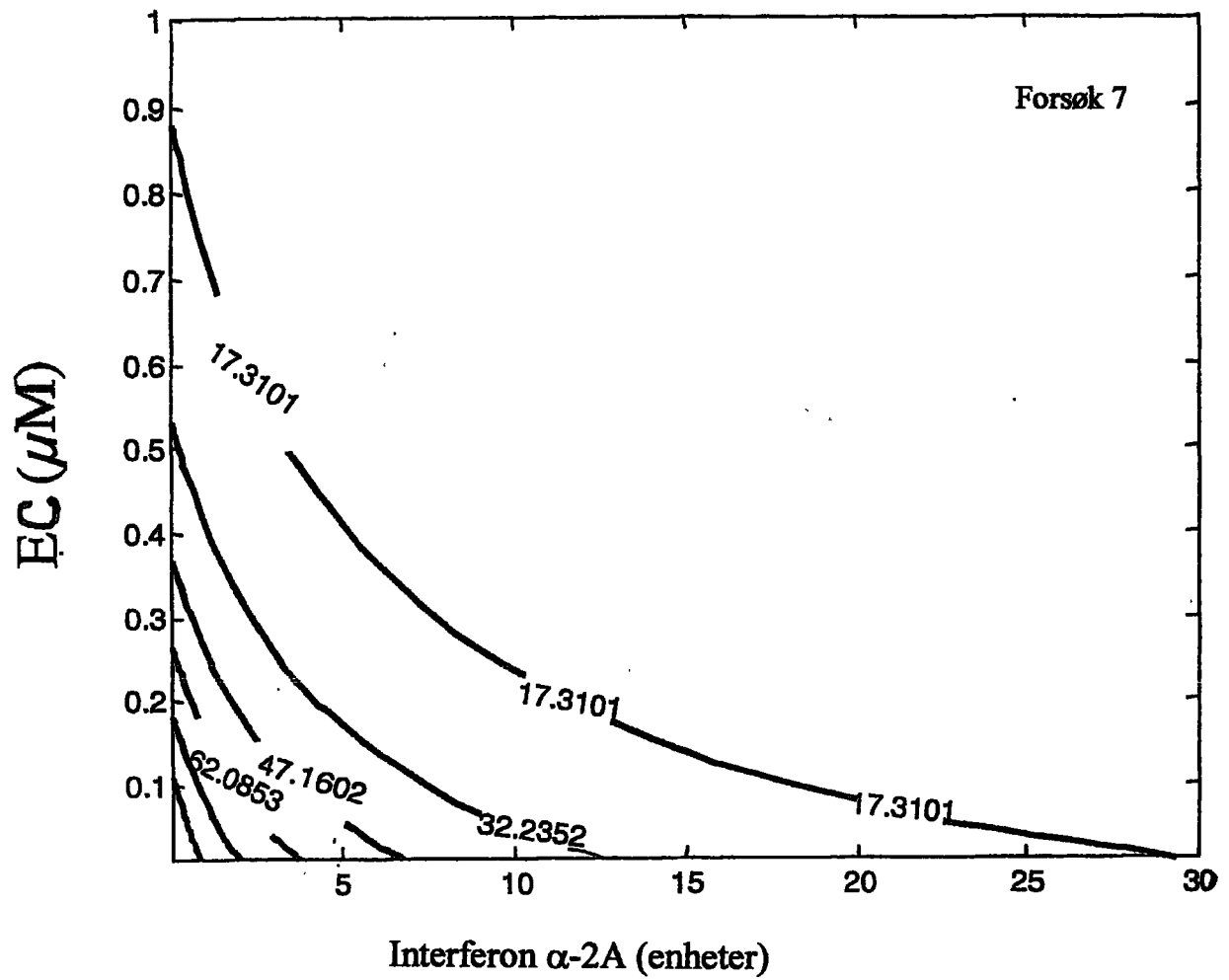
9/14

Fig 9.



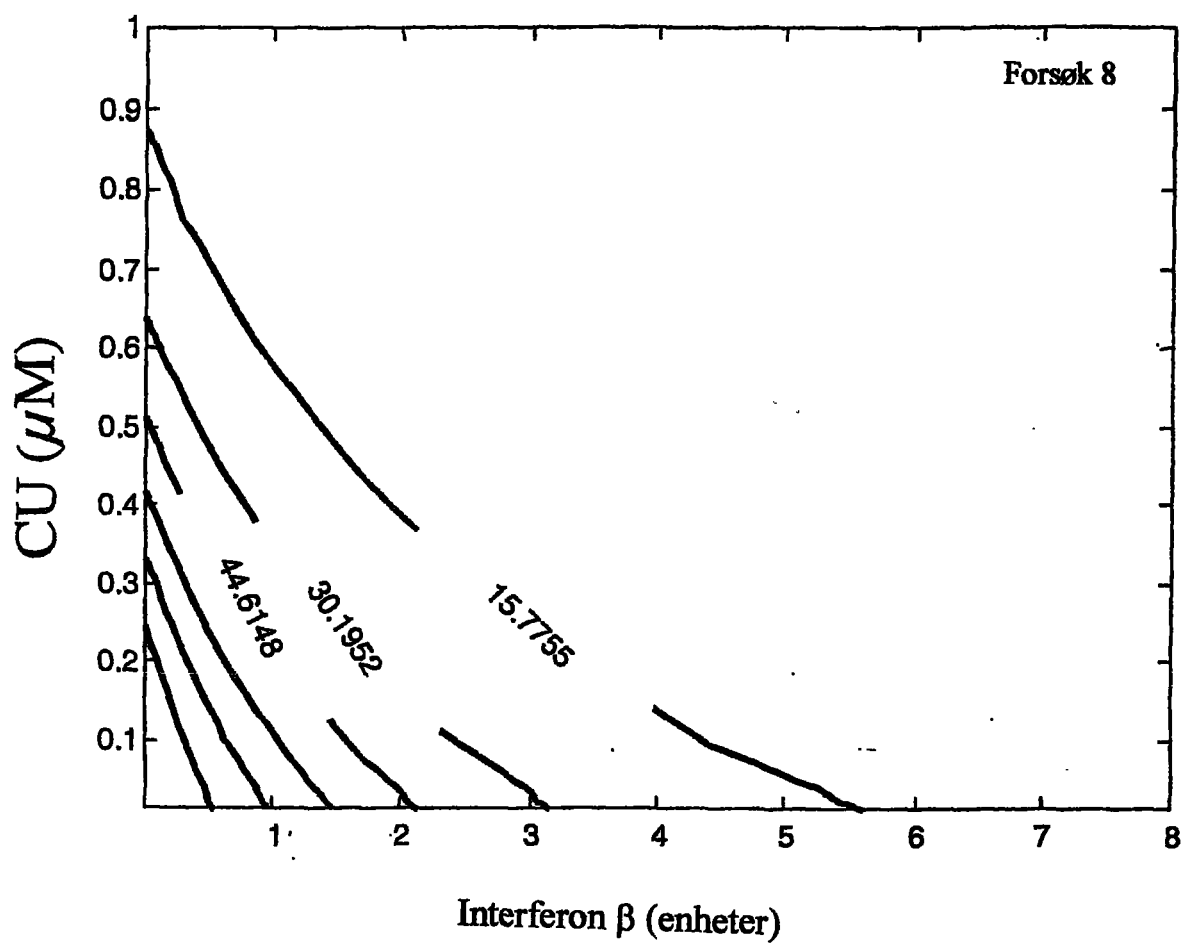
10/14

Fig. 10.



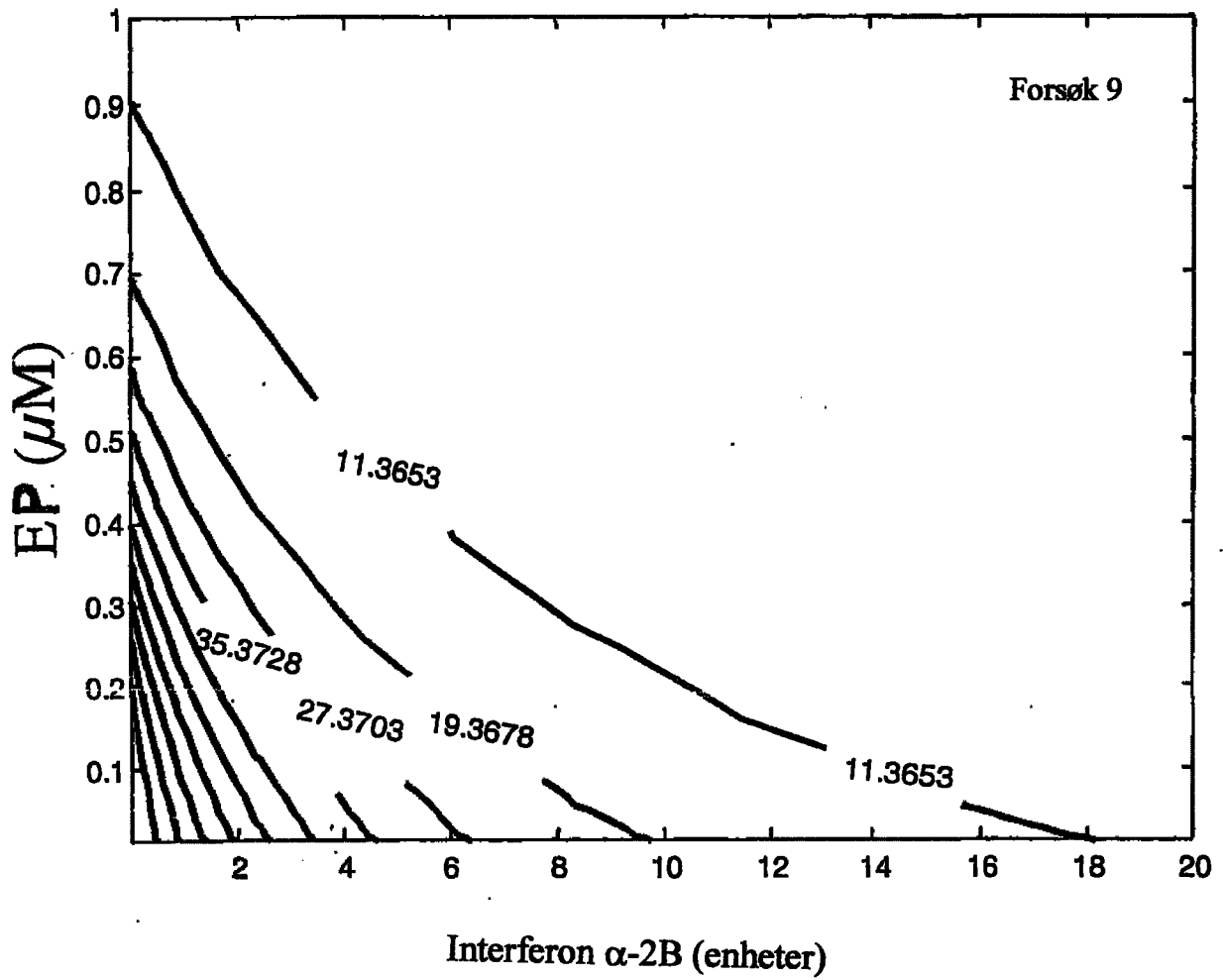
11/14

Fig 11.



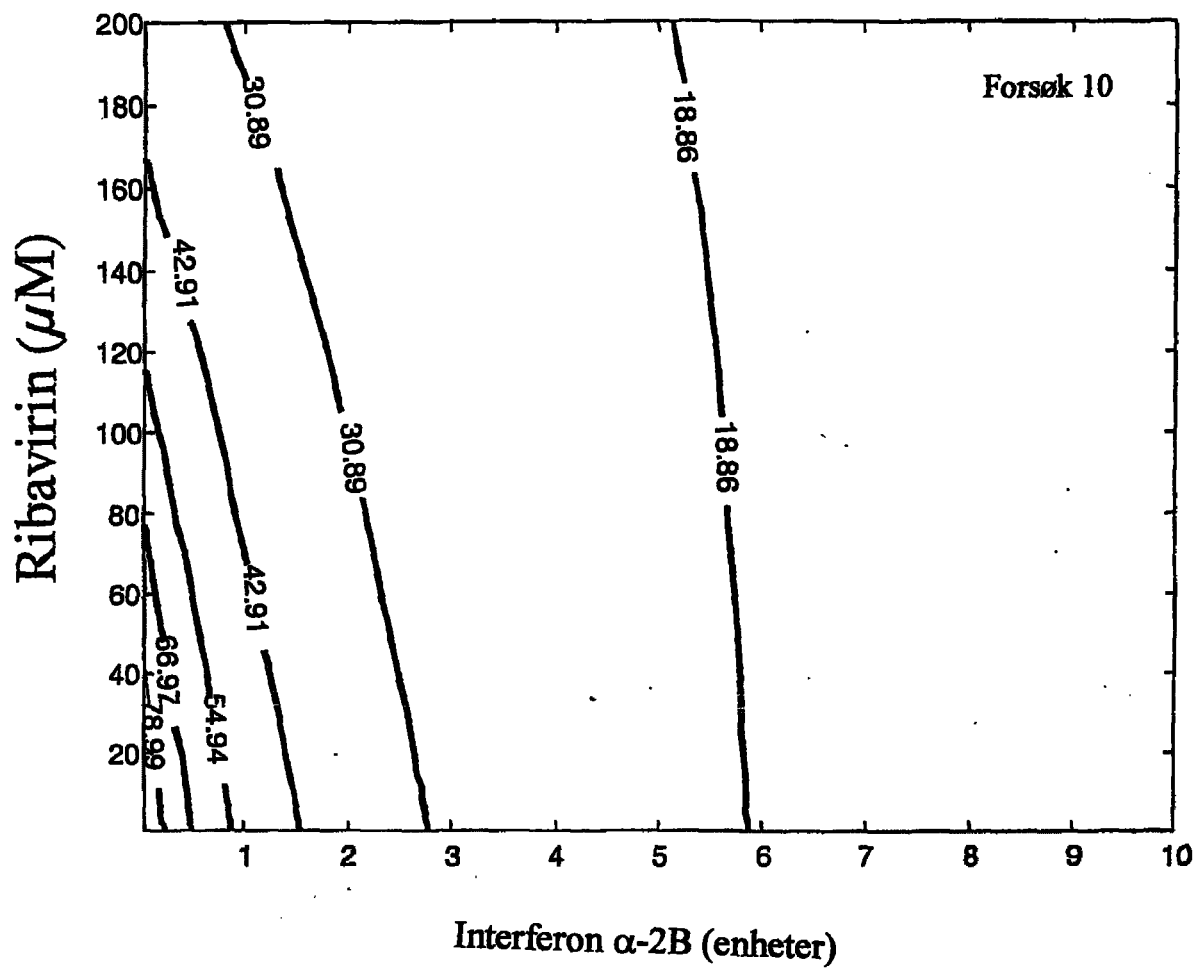
12/14

Fig. 12.



13/14

Fig 13.



14/14

Fig. 14

