



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 199 094

K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

(61)

(23) Výstavná priorita
(22) Přihlášeno 11 11 77
(21) PV 7378-77

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³ A 61 K 31/52
A 61 K 31/53 //
C 07 D 253/06
C 07 D 473/34

(40) Zveřejněno 17 09 79
(45) Vydáno 30 09 82

(75)

Autor vynálezu RADA BŘETISLAV RNDr. CSc., BRATISLAVA a HOLÝ ANTONÍN RNDr. CSc., PRAHA

(54) Antivirové léčivo

1

Vynález řeší léčivo s virostatickým účinkem při terapii virových onemocnění.

Virová onemocnění působí velké národohospodářské škody a působí velké škody na zdraví lidu. Kromě humánních virů mají z národohospodářského hlediska velký význam v zemědělství a veterinářství viry zvířecí a rostlinné. Některá virová onemocnění se podařilo zvládnout imunologickou prevencí vakcínami. V chemoterapii virových onemocnění se dosud dosáhlo pouze částečných úspěchů.

Marboran (Bauer D. J.: Intern. Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics, Section 61, Chemotherapy of Virus Diseases Vol. I, str. 35 Pergamon Press, Oxford 1972) je účinný při chronických komplikacích způsobených vakcinálním virem, proti pravým neštovicím je účinný jen profylakticky. 5-Jod-2'-desoxyuridin (Herrmann E. C., jr: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 107, 142 (1961), Kaufman H. E. et al.: Archs. Ophtal. 68, 235 (1962) byl po několik let užíván v terapii herpetických keratitid, méně při herpetických kožních afekcích. V poslední době však bylo zjištěno, že působí v nádorových buňkách indukci virových partikulí typu C. Amantadin (Davies L. W. et al., Science 144, 862 (1964) je účinný pouze proti viru chřipky typu A2 při aplikaci profylaktické, cytosinarabinosid (Ranis H. E., Johnson H. G.: Bact. Proc., American Soc. for Microbiology, str. 140, 1962; Kaufman H. E., Maloney E. D., Archs. Ophtal. 69, 629 (1963) inhibuje DNK viry a Virazol (Sidwell R. W. et al., Science 177, 705 (1972) je patrně účinný proti hepatitidě a méně účinný proti chřipce a některým DNK virům.

Zvýšení chemoterapeutického efektu proti virovým onemocněním kombinací více látek bylo dosud málo studováno. Synergický efekt 6-azauridinu (I) a některých přirozených derivátů adeninu byl nalazen při inhibici viru Newcastleké nemoci NDV - modelového zástupce velkých RNK virů (Rada B., Dragůň M.: *Acta virol.* 20, 97 (1976); *Acta virol.* 20, 102 (1976).

9-(S)-(2,3-dihydroxypropyl)adenin (II) byl popsán jako látka s vysokým antivirovým účinkem na některé viry (čs. autorské osvědčení č. 199 093), Holý A., DeClerq E.: *Science* 200 : 563 (1978), A. Holý, *Collection* 40 : 187 (1975); Kritzyn A. M., Kolobushkina L. I., Mikhailov S. N., Florentiev V. L.: *Khim. Geterotsikl. Soed.* 125 (1975); Scheffer H. J., Vogel D., Vince R.: *J. Med. Chem.* 8 : 502 (1965); Seita T., Kinoshita M., Imoto M.: *Bull. Chem. Soc. Japan* 46 : 926 (1972). Důležitou vlastností této látky je její snadná přístupnost, nízký cytostatický účinek a malá toxicita. 6-Azauridin (I) (čs. patent č. 88 063) nemá sám výraznou antivirovou účinnost při nízkých aplikovaných dávkách. Terapií těch typů virových infekcí, vůči nimž jsou jednotlivé látky I a II málo účinné, se zabývá předmětný vynález, jehož význakem je použití kombinace 6-azauridinu a (S) - nebo (RS)-9(2,3-dihydroxypropyl)adeninu v hmotnostním poměru 1 : 1 až 1000 : 1, v absolutní koncentraci 10 µg/ml až 1000 µg/ml jednotlivých složek, jako léčiva humánní a veterinární medicíně, zvyšující účinek inhibice cytopathogenního působení viru, a to při koncentraci nižší nejméně o řád, než je minimální cytotoxická koncentrace jednotlivých složek i jejich kombinací.

Dokladem účinnosti uvedené kombinace je měření inhibice tvorby plaků na monolayeru kuřecích embryonálních buněk infikovaných virem a převrstvených agarovou půdou při difuzi látky ze středu misky (agar-difusní test). Výsledky spolu s údaji ostatních antivirových látek uvádí tabulka 1. Kombinace látky I difundující agarem a látky II inkorporované do agarové vrstvy vykazuje zřetelný synergický účinek, celkově převyšující účinek cytosinabinosidu, který je za daných podmínek dosud najúčinnější popsanou látkou. V suspensních kulturách buněk HeLa, kde je při nízkých koncentracích obou složek I a II celkový efekt aditivní (virus vakcinie), při vysokých koncentracích látky II se však již dále neprohlubuje. Synergismus se zjevně projevuje inhibicí cytopathického efektu (tabulka 2).

Toxicita obou jednotlivých složek I a II i jejich kombinací je nízká: pro kuřecí embryonální buňky je maximální netoxická koncentrace látky II 1000 µg/ml, pro HeLa buňky se toxicita projevuje teprve při kombinaci 1000 µg/ml obou složek, a to zřejmě vlivem látky i samotně. Pro dosažení výrazného virostatického efektu však plně dostačují koncentrace látky II o řád nižší, tj. 100 µg/ml; za těchto podmínek nedochází k cytopathogennímu efektu ani k morfologickým změnám hostitelských buněk.

Výhodou popsané kombinace je, že obě složky jsou snadno dostupné, dobře rozpustné ve vodě a za běžných sterilních podmínek stálé. 6-Azauridin (I) nemá kancerogenní ani mutagenní účinek. Lze očekávat, že při aplikaci kombinace bude zachována možnost tvorby protilátek v organismu. Využití vynálezu přichází v úvahu v terapii infekčních virových onemocnění, v terapii nádorových onemocnění a v infekční veterinární medicíně.

V dalším je vynález osvětlen v příkladech provedení virostatických a cytotoxických zkoušek, aniž se tím jakkoli omezuje.

Inhibice množení viru vakcinie v suspenčních kulturách buněk HeLa
kombinací látek I a II (provedení viz příklad 3)

Tabulka 2

Látka I ($\mu\text{g/ml}$) Látka II ($\mu\text{g/ml}$)	1000	100	10	0
1000	3.3×10^3	4.3×10^3	6.1×10^3	3×10^3
100	2.7×10^4	5.5×10^4	3.5×10^4	5.5×10^4
10	4.3×10^4	1.10^5	1.6×10^5	2.2×10^5
0	5.2×10^4	1×10^5	2.4×10^5	3.2×10^5

Titř viru 2 hod. po infekci: 2.6×10^3 PFU/ml

Ostatní titry viru (PFU/ml) zjištěné 24 hod. po infekci.

Příklad 3

Inhibice množení viru vakcinie v suspenčních kulturách buněk HeLa kombinací látek I a II (metoda viz. Rađa B., Blaškovič D.: Acta virol. 10, 1, 1966).

Suspense buněk HeLa 2×10^6 buněk/ml se infikuje virem vakcinie, po 1 hodinové adsorpcii se suspense promyje trojnásobně k odstranění neadsorbovaného viru. Buňky se naředí na hustotu 2×10^5 buněk/ml a k jednotlivým kulturám se přidají odpovídající koncentrace látek I a II a jejich kombinací. Titř viru v kulturách se stanoví 24 hod. po infekci po třech cyklech zmrazení a rozmrazení kultur.

Látka II samotná v nejvyšší koncentraci účinně inhibuje množení viru vakcinie (efekt dosahuje maximální hranici mohutnosti metody - udržení viru na hladině 2 hod. po infekci, tabulka 2. Při nižších koncentracích obou látek je efekt na množení viru aditivní.

Příklad 4

Stanovení toxicity kombinací látek I a II na buňkách HeLa. Testy byly provedeny na buňkách HeLa (American Type Collection) ve stacionárních zkumavkách; pro fotografii na Petriho miskách. K testům toxicity byla zvolena koncentrace buněk 5×10^4 buněk HeLa v 1 ml (a 1 ml ve stacionárních zkumavkách nebo 7 ml v Petriho miskách o průměru 6 cm) vyrůstajících v monolayer, aby bylo možno vedle morfologie buněk pozorovat a porovnávat růst buněk a jeho inhibici podle hustoty buněčné vrstvy.

U kultur exponovaných 3 dny ke studované kombinaci látek nedochází k závažným změnám v morfologii buněk. Pouze při použití nejvyšších koncentrací (II 1000 $\mu\text{g/ml}$ + I 1000 $\mu\text{g/ml}$) lze pozorovat lehké zakulacení malé části buněk; takové změny působí v této koncentraci látka I sama. Tlumení růstu buněk HeLa při kombinaci (látka II 1000 $\mu\text{g/ml}$ + látka I 1000 $\mu\text{g/ml}$) je způsobeno látkou I samou jak vyplývá ze srovnání s kontrolními kulturami I 1000 $\mu\text{g/ml}$ a II 1000 $\mu\text{g/ml}$. V hustotě buněčného monolayeru mezi kontrolou a skupinami II 1000 $\mu\text{g/ml}$ + I 100 $\mu\text{g/ml}$ látkou I 100 $\mu\text{g/ml}$ a látkou II 1000 $\mu\text{g/ml}$ není podstatný rozdíl.

Příklad 1

Účinek kombinace látek I a II na virus vakcinie v agar-difusním testu (metoda viz Rada B., Závada J.: Neoplasma 9, 57, 1962).

Kultury kuřecích embryonálních buněk v 15 cm Petriho miskách se infikují dávkou viru vakcinie tvořící semikonfluentní plaky a kultury se po adsorpci viru převrství agarem, v němž byla předem rozpuštěna látka II v koncentraci 100 µg/ml. Kultura se obarví 3 dny po infekci. Za těchto podmínek dojde jen k malému nebo žádnému zmenšení velikosti plaků. Po ztuhnutí agarů se do válečku v centru kultury pro difusi agarem vnese roztok látky I (500 mg/ml). Dojde k zábraně tvorby plaků až téměř k okrajiisky.

Příklad 2

Stanovení toxicity látky II na kuřecích buňkách. Ke kuřecím embryonálním buňkám ve stacionárních zkumavkách (4 paralelní zkumavky tvoří experimentální skupinu) po vytvoření monovrstvy byl přidán roztok látky II tak, aby výsledná koncentrace byla 30 µg - 10 000 µg/ml. Kultury byly denně hodnoceny mikroskopicky. Maximální netoxická koncentrace látky II po třídní expozici je 1000 µg/ml.

Vyšší koncentrace látky II 3000 µg/ml vykazuje lehké změny ve srovnání s kontrolou, monovrstva buněk není zcela souvislá, buňky jsou protáhlého fibroblastového typu; pH média je nepatrně alkaličtější ve srovnání s kontrolou. Teprve kultury inkubované s 10 000 µg/ml ukázaly zřetelný toxický efekt projevující se zrnitostí, zakulacováním a snížením počtu buněk.

Srovnání inhibičního účinku některých virostatik agar-difusním testem

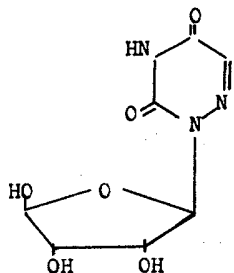
Tabulka 1

L á t k a (koncentrace difusního roztoku v mg/ml)	Inhibiční zóna (průměr v mm)		
	Vakcinia	NDV	WEE
5-Jod-2'-desoxyuridin (2)	72	0	0
Cytosinarabinosid (100)	123	0	0
6-Azaauridin (I) (500)	62	0	0
II (50)	42	16	0
II-RS (50)	60	16	0
I a II ^a	140	21	21
I a II ^a -RS	99	0	0

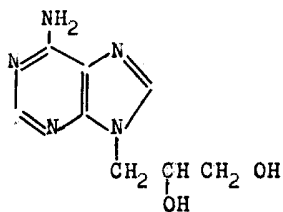
^a500 mg/ml látky I pro difusi, 100 µg/ml látky II v agarové vrstvě.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Antivirové léčivo, vyznačující se tím, že je kombinací 6-azauridinu vzorce I



a (S) - nebo (RS) - 9(2,3-dihydroxypropyl)adeninu vzorce II,



a to v hmotnostním poměru 1 : 1 až 1000 : 1 a v absolutní koncentraci 10 ug/ml až 1000 ug/ml jednotlivých složek.