



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 02 278 T2** 2005.12.15

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 383 515 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 02 278.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IL02/00298**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 726 402.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 02/083152**

(86) PCT-Anmeldetag: **11.04.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **24.10.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.01.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **15.12.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.12.2005**

(51) Int Cl.⁷: **A61K 31/7076**
A61K 31/52, A61K 31/70

(30) Unionspriorität:
832818 12.04.2001 US

(73) Patentinhaber:
Can-Fite Biopharma Ltd., Petach Tikva, IL

(74) Vertreter:
**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
Schwanhäusser, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:
FISHMAN, Pnina, 46365 Herzliya, IL

(54) Bezeichnung: **AKTIVIERUNG NATÜRLICHER KILLERZELLEN DURCH ADENOSIN-A3-REZEPTORAGONISTEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft die therapeutische Verwendung von Adenosin A3 Rezeptoragonisten zur Aktivierung natürlicher Killerzellen.

Stand der Technik

[0002] Das Folgende ist eine Liste von Dokumenten des Standes der Technik, von der angenommen wird, dass sie ist für die Beschreibung des Standes der Technik auf dem Gebiet der Erfindung wichtig ist.

- Nilsson J. und Olsson AG. Atherosclerosis 53: 77–82, (1984);
- Ward AC, et al. Biochem Biophys Res Commun 224: 10–6 (1994);
- Wilson NJ, et al. Biochem Biophys Res Commun 244: 475–80 (1998);
- Giblett ER, et al. Lancet 2: 1067–9 (1972);
- Priebe T, et al. Cell Immunol 129: 321–8 (1990);
- Miller JS, et al. J Immunol 162: 7376–82 (1999);
- Hall TJ, et al. Clin Exp Immunol 54: 493–500 (1983);
- Trinchieri G. Annu Rev Immunol 13: 251–76 (1995);
- Link AA, et al. J Immunol 164: 436–42 (2000);
- Hasko G, et al. FASEB 14: 2065–74 (2000);
- Hasko G, et al. Eur J Pharmacol 358: 261–8 (1998);

Hintergrund der Erfindung

[0003] Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) wurden zuerst in Mäusen bedingt durch ihre Fähigkeit, bestimmte Tumorzellziele schnell zu lysieren, identifiziert. Diese Zellen sind eine kleine Untergruppe der peripheren Blut-lymphozyten, die 5–16% der gesamten Lymphozytenpopulation ausmachen und eine bestimmte Gruppe von Lymphozyten ohne immunologisches Gedächtnis ausbilden und unabhängig vom adaptiven Immunsystem sind.

[0004] NK-Zellen vermitteln eine Reihe von Funktionen, die für die menschliche Gesundheit und Erkrankung wichtig sind. Zum Beispiel wurde herausgefunden, dass NK-Zellen eine wichtige Verteidigung der ersten Linie gegen maligne Zellen sind sowie Zellen, die durch Viren, Bakterien und Protozoen infiziert sind. Zusätzlich partizipieren diese Zellen in der Immunregulation, Hämatopoese, Reproduktion und neuroendokrinen Wechselwirkungen. Der Fund, dass NK-Zellen die Herstellung einer Reihe von Cytokinen bewirkt, führte zu der Annahme, dass NK-Zellen genau wie T-Zellen in diskrete funktionelle Untergruppen mit verschiedenen Wirkungen auf die adaptive Immunität differenzieren.

Zusammenfassung der Erfindung

[0005] Es wurde im Einklang mit dem Vorliegenden herausgefunden, dass Adenosin A3 Rezeptoragonisten (A3RAg) natürliche Killerzellen (NK-Zellen) aktivieren und dass diese Aktivierung in der Gegenwart von Adenosin A3 Rezeptorantagonisten (A3RAn) aufgehoben wird.

[0006] Adenosin ist ein ubiquitäres Nukleosid, das in allen Körperzellen vorhanden ist. Es wird aus metabolisch aktiven oder gestressten Zellen freigesetzt und wirkt anschließend als ein regulatorisches Molekül. Es bindet an Zellen durch spezifische A₁-, A_{2A}-, A_{2B}- und A₃- G-Protein-assoziierte Zelloberflächenrezeptoren, wodurch es als ein Signaltransduktionsmolekül durch Regulierung der Mengen an Adenylcyclase und Phospholipase C wirkt [Linden J. The FASEB J 5: 2668–2676 (1991); Stiles G. L. Clin. Res. 38: 10–18 (1990)].

[0007] Gemäß mit einem ersten ihrer Aspekte betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Adenosin A3 Rezeptoragonisten (A3RAg) zur Herstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen zur Erzielung einer therapeutischen Wirkung, wobei die therapeutische Wirkung die Aktivierung von NK-Zellen umfasst.

[0008] Der Begriff „Adenosin A3 Rezeptoragonist“ bezieht sich für die vorliegenden Zwecke auf jegliches Molekül, das in der Lage ist, an den Adenosin A3 Rezeptor zu binden, wodurch besagter Rezeptor vollständig oder teilweise aktiviert wird. Beispiele von solchen Molekülen werden hiernach zur Verfügung gestellt. Ein vollständiger Agonist für die vorliegenden Zwecke sollte dahingehend als ein Agonist verstanden werden, der die maximal mögliche Reaktion zur Verfügung stellt, die durch Aktivierung seines Rezeptors in der zu untersuchen-

den Zubereitung möglich ist, während ein teilweiser Agonist dahingehend als ein Agonist zu verstehen ist, der, egal wie hoch die angewendete Konzentration ist, nicht in der Lage ist, eine maximale Aktivierung der Rezeptoren zur Verfügung zu stellen.

[0009] Die „wirksame Menge“ (oder „Menge wirksam für“) für die vorliegenden Zwecke wird durch solche Überlegungen bestimmt, wie sie auf dem Gebiet bekannt sind. Die Menge muss wirksam sein, um die Aktivierung von NK-Zellen in einer nachweisbaren und vorzugsweise in einer therapeutisch wirksamen Menge zu erzielen. Eine Person, die auf dem Gebiet versiert ist, wird wissen, wie die wirksame Menge abhängig inter alia von der Art und der Schwere der zu behandelnden Krankheit und dem Behandlungsansatz zu bestimmen ist.

[0010] Der Begriff „Aktivierung von NK“ für die vorliegenden Zwecke bezieht sich per se auf die Aktivierung der cytotoxischen oder cytostatischen Wirkung von NK-Zellen auf fremde oder abnormale und unerwünschte Zellen oder die Erhöhung der cytotoxischen oder cytostatischen Wirkung von pre-aktiven (d. h. bereits aktiven) NK-Zellen auf die unerwünschten (fremden oder abnormalen) Zellen sowie auf die Erhöhung von deren anderen biologischen Funktionen wie die Stimulierung der Cytokinproduktion.

[0011] Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Aktivierung von NK-Zellen ex vivo durch das zur Verfügung stellen einer wirksamen Menge eines Adenosin A3 Rezeptoragonisten (A3RAg) an besagte Zellen.

[0012] Des Weiteren bezieht sich die vorliegende Erfindung auf die Verwendung von A3RAg in einer wirksamen Menge für die Herstellung eines Medikaments, das für das Erzielen einer therapeutischen Wirkung geeignet ist, wobei die therapeutische Wirkung die Aktivierung von NK-Zellen in besagtem Individuum umfasst.

[0013] Der Begriff „Behandlung“ für die hierin verwendeten Zwecke bezieht sich auf die Milderung unerwünschter Symptome, die mit einer Krankheit assoziiert sind, sogar ohne Heilung der Krankheit, z. B. die Verringerung von Schmerz; die Verhinderung der Manifestation von solchen Symptomen bevor sie aufkommen; die Verlangsamung der Verschlimmerung von Symptomen oder der Progression einer Krankheit; die Verringerung der Schwere oder die Heilung der Krankheit; die Beschleunigung des natürlichen oder konventionellen Heilungsprozesses; die Verbesserung der Überlebensrate oder die schnellere Rekonvaleszenz des Individuums, das an der Krankheit leidet; die Verhinderung des Aufkommens einer Krankheit oder eine Kombination von zwei oder mehreren der oben genannten.

[0014] Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von A3RAg zur Herstellung eines Medikaments, das für die Behandlung einer Krankheit oder einer Erkrankung geeignet ist, das die Aktivierung von NK-Zellen umfasst, wobei besagte NK-Zellen durch das in Kontakt bringen von NK-Zellen ex vivo mit einer wirksamen Menge an A3RAg aktiviert werden. Typischerweise umfasst ein solches Verfahren das Entnehmen von NK-Zellen aus dem Individuum (d. h. autologe NK-Zellen), das Aussetzen solcher Zellen an eine wirksame Menge mindestens eines A3RAg und das Einführen der aktivierten NK-Zellen in den Empfänger (ex vivo-Aktivierung). Alternativ dazu können die NK-Zellen von einem Spender entnommen werden. Solche gespendeten NK-Zellen können nach Aktivierung mit dem A3RAg in einem vorbehandelten Spender entnommen werden oder nach der Entnahme in vitro und vor der Verabreichung an das empfangende Individuum aktiviert werden. Dieser Aspekt der Erfindung ist auch unter dem Namen „adoptiver Transfer“ bekannt, gemäß dem eine Immunität durch das Transferieren immunkompetenter Zellen aus einem vorbehandelten Spender an einen nicht immunen Empfänger transferiert wird.

[0015] Der Begriff „a priori Aktivierung“ bezieht sich auf die Aktivierung von NK-Zellen entweder in einer Zell- oder Gewebekultur oder in einem Tiermodell, worin die Zellen, das Gewebe oder das Tier jeweils mit einer Menge an A3RAg behandelt werden, die zur Aktivierung von NK-Zellen wirksam ist, und dann werden Zellen oder Gewebesubereitungen, die darin besagte aktivierte NK-Zellen enthalten, aus der Kultur oder aus dem Tier für die Verabreichung an ein nicht immunes Individuum, das deren bedarf, entfernt. Die aktivierten NK-Zellen, die an ein Individuum verabreicht werden, sind vorzugsweise, obwohl nicht ausschließlich, autologe Zellen.

[0016] Des Weiteren stellt die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Erzielung einer therapeutischen Wirkung zur Verfügung, wobei die Zusammensetzung einen A3RAg in einer Menge umfasst, die wirksam ist, um besagte therapeutische Wirkung zu erzielen, wobei die therapeutische Wirkung die Aktivierung von NK-Zellen umfasst.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0017] Um die Erfindung zu verstehen und zu erkennen, wie sie in der Praxis durchgeführt werden kann, wird nun eine bevorzugte Ausführungsform im Wege eines nicht einschränkenden Beispiels mit Bezugnahme auf die beigefügten Figuren beschrieben, in denen:

[0018] [Fig. 1](#) die Wirkung der Behandlung eines Adenosin A3 Rezeptoragonisten, CI-IB-MECA, auf menschliche periphere Blut-NK-Zellen nach Inkubation der Zellen mit 10 nM CI-IB-MECA zeigt sowie die umgekehrte Wirkung, die in der Gegenwart eines Adenosin A3 Rezeptorantagonisten (MRS1220) erhalten wird, wie durch die Menge an Lyse (% Lyse) der Zielzellen (K562 Leukämiezellen) durch die aktivierten NK-Zellen bestimmt wird.

[0019] [Fig. 2](#) zeigt die Wirkung von verschiedenen Dosierungen (10–1000 µg/kg Körpergewicht) von CI-IB-MECA, das oral an Mäuse verabreicht wird, auf die Aktivierung von murinen NK-Zellen, die durch den Prozentanteil (von der gesamten Freisetzung) der Freisetzung von ⁵¹Cr aus YAC Lymphomzellen bestimmt wird, die mit Na₂[⁵¹Cr]O₄ markiert sind.

[0020] [Fig. 3](#) zeigt die zeitabhängige stimulierende Wirkung von CI-IB-MECA auf die Aktivität von NK-Zellen nach oraler Verabreichung von CI-IB-MECA (10 µg/kg Körpergewicht) an Mäuse für vier aufeinander folgende Tage, bestimmt durch den Prozentanteil (von der gesamten Freisetzung) der Freisetzung an ⁵¹Cr.

[0021] [Fig. 4](#) zeigt die Menge an IL-12 in den Serumproben, die aus CI-IB-MECA-behandelten Mäusen (10 µg/kg Körpergewicht) abgeleitet wurden.

[0022] [Fig. 5A–Fig. 5F](#) zeigt die hemmende Wirkung von CI-IB-MECA auf die Entwicklung von Melanom und Dickdarmkarzinom in Mäusen ([Fig. 5A](#), [Fig. 5B](#)) mit einer Erhöhung in der Menge an IL-12 in den korrespondierenden Melanom- oder Dickdarmkarzinomtragenden Mäusen (jeweils [Fig. 5C](#), [Fig. 5D](#)). Auch zeigte sich eine erhöhte NK-Zellaktivität (durch den Prozentanteil (aus der gesamten Freisetzung) der ⁵¹Cr-Freisetzung bestimmt) in der Milz, die aus CI-IB-MECA-behandelten Melanom- oder Dickdarmkarzinom-tragenden Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Mäusen ([Fig. 5E](#), [Fig. 5F](#), jeweils) erhalten wurde.

[0023] [Fig. 6](#) zeigt die hemmende Wirkung von gepfropften CI-IB-MECA-„aktivierten“ NK-Zellen auf das Tumorzellwachstum in B16-F10 Melanom-tragenden Mäusen, wie sie durch die Anzahl von metastatischen Lungenfoci bestimmt wird, die sich nach dem Pfropfen der „aktivierten“ NK-Zellen auf Melanom-tragenden Mäusen entwickelten.

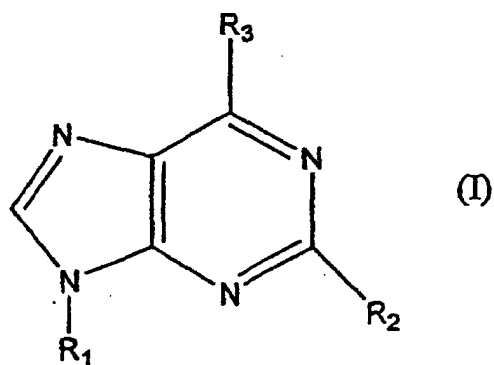
Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0024] Wie in den folgenden Beispielen gezeigt werden wird, wurde herausgefunden, dass CI-IB-MECA, ein A3Rag, NK-Zellen in einer biologisch signifikanten Menge sowohl in vitro wie auch in vivo aktiviert. Offensichtlich hat dieser Fund eine therapeutische Bedeutung, da NK-Zellen an einer Reihe von biologischen Prozessen partizipieren, einschließlich der Verteidigung gegen maligne und infektiöse Krankheiten, Immunregulation, Hämatopoese, Reproduktion und neuroendocrine Wechselwirkungen.

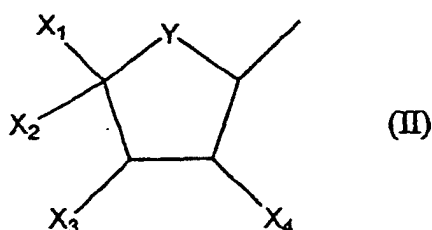
[0025] Gemäß einem ihrer Aspekte stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Aktivierung natürlicher Killer (NK)-Zellen ex vivo zur Verfügung.

[0026] Die Eigenschaften und Verfahren der Herstellung einiger Adenosin A3 Rezeptoragonisten werden im Detail inter alia in US 5,688,774; US 5,773,423, US 5,573,772, US 5,443,836, US 6,048,865, WO 95/02604, WO 99/20284 und WO 99/06053, WO 97/27173 sowie in anderen Publikationen beschrieben, die den Fachleuten, die auf dem Gebiet versiert sind, zur Verfügung stehen.

[0027] Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung ist der A3Rag eine Verbindung der allgemeinen Formel I:



worin R_1 ein Alkyl-, Hydroxyalkyl-, Carboxyalkyl- oder Cyanoalkyl oder eine Gruppe der folgenden allgemeinen Formel (II) darstellt:



in welcher:

Y ein Sauerstoff, Schwefel oder Kohlenstoffatom ist;

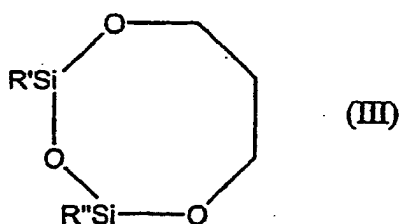
X_1 H, Alkyl, $R^a R^b NC(=O)-$ oder HOR^c- ist, worin

R^a und R^b gleich oder verschieden sein können und aus Wasserstoff, Alkyl, Amino, Halogenalkyl, Aminoalkyl, BOC-aminoalkyl und Cycloalkyl ausgewählt sind oder so miteinander verbunden sind, dass sie einen heterocyclischen Ring bilden, der zwei bis vier Kohlenstoffatome enthält; und

R^c ist aus Alkyl, Amino, Haloalkyl, Aminoalkyl, BOC-Aminoalkyl und Cycloalkyl ausgewählt;

X_2 ist Wasserstoff, Hydroxyl, Alkylamino, Alkylamido oder Hydroxyalkyl;

X_3 und X_4 sind unabhängig voneinander Wasserstoff, Hydroxyl, Amino, Amido, Azido, Halogen, Alkyl, Alkoxy, Carboxy, Nitrilo, Nitro, Trifluor, Aryl, Alkaryl, Thio, Thioester, Thioether, $-OCOPh$, $-OC(=S)OPh$ oder X_3 wie auch X_4 sind Sauerstoffe, die mit $\geq C=S$ so verbunden sind, dass sie einen 5-gliedrigen Ring bilden, oder X_2 und X_3 einen Ring der Formel III bilden:



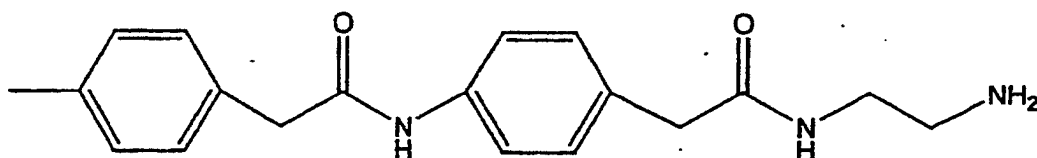
wobei R' und R'' unabhängig voneinander eine Alkylgruppe darstellen;

R_2 ist aus Wasserstoff, Halogen, Alkylether, Amino, Hydrazido, Alkylamino, Alkoxy, Thioalkoxy, Pyridylthio, Alkenyl; Alkynyl, Thio und Alkylthio ausgewählt; und

R_3 ist eine Gruppe der Formel $-NR_4R_5$ worin

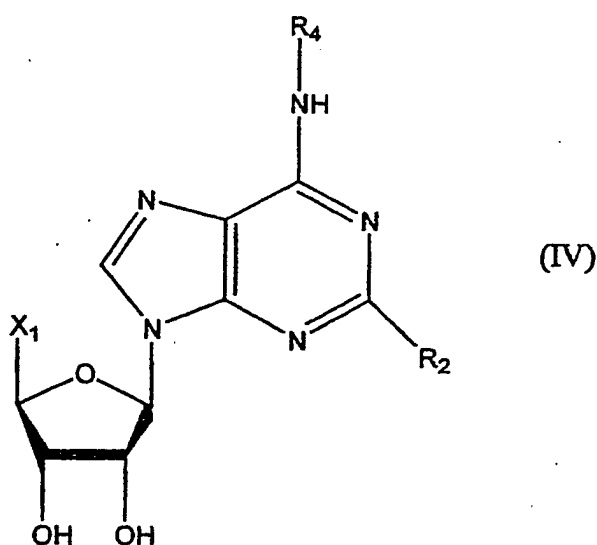
R_4 ein Wasserstoffatom oder eine Gruppe ist, die aus Alkyl, substituiertem Alkyl oder Aryl- $NH-C(Z)-$ ausgewählt ist, wobei Z, O, S oder NR^a ist, wobei R^a die oben genannten Bedeutungen hat; und im Falle, dass R_4 Wasserstoff ist; dann wird

R_5 aus R- und S-1-Phenylethyl-, Benzyl-, Phenylethylgruppen ausgewählt, die in einer oder mehreren Positionen mit einem Substituenten substituiert oder nicht substituiert sind, der aus Alkyl, Amino, Halogen, Haloalkyl, Nitro, Hydroxyl, Acetamido, Alkoxy und Sulfonsäure oder einem Salz davon; Benzodioxanmethyl, Fururyl, L-Propylalanyl-Aminobenzyl, β -Alanylaminobenzyl, T-BOC- β -Alanylaminobenzyl, Phenylamino, Carbamoyl, Phenoxy oder Cycloalkyl ausgewählt ist; oder R_5 ist eine Gruppe der folgenden Formel:



oder, falls R_4 ein Alkyl oder Aryl-NH-C(Z)- ist, dann ist R_5 aus der Gruppe ausgewählt, die aus Heteroaryl-NR^a-C(Z)-, Heteroaryl-C(Z)-, Alkaryl-NR^a-C(Z)-, Alkaryl-C(Z)-, Aryl-NR-C(Z)- und Aryl-C(Z)- besteht; wobei Z ein Sauerstoff, Schwefel oder Amin ist; oder ein physiologisch verträgliches Salz der oben genannten Verbindung.

[0028] Mehr bevorzugt ist der A3Rag ein Nukleosidderivat der allgemeinen Formel (IV):



(IV)

und physiologisch verträgliche Salze von besagter Verbindung, worin X_1 , R_2 und R_4 wie oben definiert sind.

[0029] Die nicht-cyclischen aliphatischen Gruppen (z. B. Alkyl, Alkenyl, Alkynyl, Alkoxy, Aralkyl, Alkaryl, Alkylamin etc.), die Teil des Substituenten der Verbindung der vorliegenden Erfindung ausbilden, sind entweder verzweigte oder lineare aliphatische Ketten, vorzugsweise solche, die ein oder zwei bis zwölf Kohlenstoffatome enthalten.

[0030] Wenn auf „physiologisch verträgliche Salze“ der Verbindungen, die von der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden, Bezug genommen wird, sind jegliche nicht-toxischen Alkalimetall-, Alkalierdmetall- und Ammoniumsalze gemeint, die üblicherweise in der pharmazeutischen Industrie verwendet werden, einschließlich der Natrium-, Kalium-, Lithium-, Kalzium-, Magnesium-, Barium-, Ammonium- und Protaminzinksalze, die durch Verfahren, die auf dem Gebiet bekannt sind, hergestellt werden. Der Begriff umfasst auch nicht-toxische Säureadditionssalze, die im Allgemeinen durch das Reagieren der Verbindungen dieser Erfindung mit einer geeigneten organischen oder anorganischen Säure hergestellt werden. Die Säureadditionssalze sind solche, die die biologische Wirksamkeit und qualitativen Eigenschaften der freien Basen beibehalten und die nicht-toxisch oder anderweitig unerwünscht sind. Beispiele umfassen inter alia Säuren, die aus Mineralsäuren abgeleitet sind, Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure, Phosphorsäure, Metaphosphorsäure und Ähnliche. Organische Säuren umfassen inter alia Weinsäure, Essigsäure, Propionsäure, Zitronensäure, Maleinsäure, Malonsäure, Milchsäure, Fumarsäure, Benzoesäure, Zimtsäure, Mandelsäure, Glykolsäure, Gluconsäure, Brenztraubensäure, Bernsteinsäure, Salicylsäure und Arylsulphonsäure, z. B. p-Toluolsulphonsäure.

[0031] Spezifische Beispiele von A3Rag, die gemäß der allgemeinen Formel (IV) der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, umfassen, ohne darauf eingeschränkt zu sein, N⁶-2-(4-Aminophenyl)ethyladenosin (APNEA), N⁶-(4-Amino-3-iodobenzyl)adenosin-5'-(N-methyluronamid) (AB-MECA) und N⁶-(2-Iodobenzyl)adenosin-5'-N-methyluronamid (IB-MECA) und vorzugsweise 2-Chlor-N⁶-(2-iodobenzyl)-adenosin-5'-N-methyluronamid (CI-IB-MECA).

[0032] Des Weiteren stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung eines A3RAg für die Herstellung eines Medikaments zur Verfügung, das für die Behandlung einer Krankheit oder Erkrankung geeignet ist, die die Aktivierung von NK-Zellen umfasst, wobei besagte NK-Zellen ex vivo durch das in Kontakt bringen von NK-Zellen mit einer aktivierenden Menge an A3RAg aktiviert werden. Gemäß einer Ausführungsform sind die NK-Zellen autologe Zellen, die von dem gleichen Individuum entnommen wurden und dann ex vivo durch das in Kontakt bringen dieser mit einer Menge an A3RAg aktiviert wurden, um besagte Aktivierung zu erzielen, und dann in das Individuum durch eine geeignete parenterale Verabreichung wieder eingeführt wurden. Alternativ dazu können die NK-Zellen aus einem Donor entweder nach Aktivierung in vivo durch Verabreichung des A3RAg an den Donor für einen ausreichenden Zeitraum vor der Entnahme der Zellen oder durch Aktivierung der Zellen in einer Kultur, wie oben beschrieben, oder durch beides erhalten werden. Verfahren zur Entnahme von relativ aufgereinigten NK-Zellpopulationen aus einem Individuum und deren Behandlung in Kultur sind auf dem Gebiet bekannt und müssen daher nicht weiter hierin ausgeführt werden.

[0033] Der A3RAg kann auf verschiedene Arten formuliert werden. Er kann als solches formuliert werden oder in ein pharmazeutisch verträgliches Salz umgewandelt werden. Er kann allein oder in Kombination mit pharmazeutisch verträglichen Trägermitteln, Verdünnungsmitteln, Additiven und Adjuvantien (im Allgemeinen hierin als pharmazeutisch verträgliche Hilfsstoffe bezeichnet) verabreicht werden.

[0034] Wenn ein A3RAg einem Individuum für eine in vivo-Behandlung oder an ein Tiermodell für eine adoptive Transferbehandlung zur Verfügung gestellt wird, ist er vorzugsweise zur oralen Verabreichung formuliert. Jedoch sind auch andere Verfahren der Verabreichung geeignet wie die parenterale Verabreichung einschließlich der intravenösen, subkutanen, intramuskulären, intramedullären Injektion, die intraarterielle, intraperitoneale und intranasale Verabreichung sowie die intrathecale und durch Infusionstechniken. Zur oralen Verabreichung wird vorzugsweise A3RAg mit guter oraler Bioverfügbarkeit gewählt. Die Suche nach einem A3RAg mit guter oraler Bioverfügbarkeit und guter Wirksamkeit für die Erzielung der gewünschten therapeutischen Wirkung ist für den Fachmann eine Routineaufgabe.

[0035] Wenn ein A3RAg oral verabreicht wird, ist er vorzugsweise für die Verabreichung als eine Tablette, eine Suspension, eine Lösung, eine Emulsion, eine Kapsel, ein Pulver, ein Sirup oder Ähnliches formuliert.

[0036] Wenn ein A3RAg parenteral verabreicht wird, wird er im Allgemeinen in einer Einheitsdosierungsform zur Injektion (Lösung, Suspension, Emulsion) formuliert sein und wird sterile wässrige Lösungen oder Dispersionen und sterile Pulver zur Rekonstitution in sterile injizierbare Lösungen oder Dispersionen umfassen.

[0037] Es wird erwähnt, dass Menschen im Allgemeinen länger als experimentelle Tiere, wie sie hierin beispielhaft aufgeführt werden, behandelt werden, da die Behandlung eine Länge aufweist, die proportional zur Länge des Krankheitsprozesses ist. Die Dosierungen können Einzeldosierungen oder Mehrfachdosierungen über einen Zeitraum von, z. B. mehreren Tagen sein und können von den physikalischen Eigenschaften wie der Größe, dem Gewicht und dem Geschlecht des zu behandelnden Individuums abhängen. Im Allgemeinen sind die verabreichten Dosierungen vorzugsweise Einheitsdosierungsformen. Die Behandlung hat im Allgemeinen eine Länge, die mit der Länge und dem Stadium des Krankheitsprozesses und der Wirksamkeit des aktiven Mittels und dem zu behandelnden Spezies einhergeht.

[0038] Somit stellt die vorliegende Erfindung auch pharmazeutische Zusammensetzungen zur Erzielung einer therapeutischen Wirkung zur Verfügung, wobei die Zusammensetzung pharmazeutisch verträgliche Hilfsstoffe und eine Menge an einem aktiven Inhaltsstoff umfasst, der wirksam ist, um besagte therapeutische Wirkung zu erzielen, wobei die therapeutische Wirkung die Aktivierung von NK-Zellen umfasst und der aktive Inhaltsstoff ein A3RAg ist. Wie die Fachleute auf dem Gebiet zu schätzen wissen, kann die Zusammensetzung der Erfindung einen einzelnen A3RAg oder eine Kombination von zwei oder mehr A3RAg enthalten.

[0039] Unter dem Begriff „pharmazeutisch verträgliche Hilfsstoffe“ sind jegliche inerten, nicht-toxischen Materialien gemeint, die nicht mit A3RAg reagieren und die typischerweise zu Formulierungen als Verdünnungsmittel oder Trägermittel oder zur Formgebung oder Vermittlung von Konsistenz zu der Formulierung hinzugefügt werden, um ihr eine spezifische Form zu geben, z. B. in Pillenform, als ein einfacher Sirup, aromatisches Pulver oder andere verschiedene Formen. Die Hilfsstoffe können auch Substanzen zur Vermittlung von Stabilität für die Formulierung sein (z. B. Konservierungsmittel) oder zum zur Verfügung stellen der Formulierung mit einem essbaren Geschmack, etc.

[0040] Die Hilfsstoffe können jegliche sein, die konventionell verwendet werden, und sie sind nur durch chemisch-physikalische Überlegungen eingeschränkt, wie Löslichkeit und Mangel an Reaktivität mit A3RAg und

durch die Art der Verabreichung. Die Wahl des Hilfsstoffes wird teilweise durch den eingesetzten spezifischen A3RAG bestimmt sowie durch das jeweilige Verfahren, das zur Verabreichung der Zusammensetzung verwendet wird. Dem entsprechend kann der Hilfsstoff Additive, Farbstoffe, Verdünnungsmittel, Puffermittel, Zersetzungsmittel, Feuchtigkeitsmittel, Konservierungsmittel, Geschmacksmittel und pharmakologisch kompatible Trägermittel umfassen. Zusätzlich können die Hilfsstoffe ein Adjuvanz sein, das durch Definition eine Substanz ist, die die Wirkung des aktiven Inhaltsstoffes in einer voraussagbaren Weise beeinflusst.

[0041] Dem entsprechend können pharmazeutische Zusammensetzungen, die zur oralen Verabreichung geeignet sind, aus (a) flüssigen Lösungen bestehen, bei denen eine wirksame Menge an A3RAG in Verdünnungsmitteln wie Wasser, Salzlösung, natürlichem Saft, Alkoholen, Sirup, etc. aufgelöst ist; (b) Kapseln (z. B. der übliche hart oder weich ummantelte Gelatinetyp, der z. B. Tenside, Gleitmittel und inerte Füller enthält), Tabletten, Pastillen (worin der A3RAG sich in einem Geschmacksmittel wie Sucrose und Akazie oder Tragacanth befindet, oder der A3RAG befindet sich in einer inerten Base wie Gelatine und Glycerin) und Pastillen, die jeweils eine vorbestimmte Menge an A3RAG als Feststoffe oder Körnchen enthalten; (c) Pulver; (d) Suspensionen in einer geeigneten Flüssigkeit; (e) geeignete Emulsionen; (f) Liposomformulierungen; und andere.

[0042] Manchmal kann ein A3RAG in Aerosolformulierungen zur Verabreichung durch Inhalation hergestellt werden. Diese Aerosolformulierungen können in mit Druck versehene Treibmittel platziert werden, wie Dichlordifluormethan, Propan, Stickstoff und Ähnliche. Sie können auch als Pharmazeutika für Zubereitungen ohne Druck, wie in einem Vernebler oder Atomisator, formuliert werden.

[0043] Des Weiteren werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen manchmal zu parenteralen Verabreichung formuliert und können wässrige und nicht wässrige, isotonische sterile Injektionslösungen umfassen, die Antioxidationsmittel, Puffer, Bacteriostatika und Lösungen enthalten, die die Formulierungen isoton mit dem Blut des vorgesehenen Empfängers machen und wässrige und nicht wässrige sterile Suspensionen, die Suspendierungsmittel, Lösungsvermittler, Verdickungsmittel, Stabilisatoren und Konservierungsmittel enthalten. Öle wie Petroleum, tierische, Pflanzen- oder synthetische Öle und Seifen wie Fettsäurealkalimetall-, Ammonium- und Triethanolaminsalze und geeignete Tenside können auch zur parenteralen Verabreichung verwendet werden. Des Weiteren können, um die Irritation an der Stelle der Injektion zu minimieren oder zu eliminieren, die Zusammensetzungen ein oder mehrere nicht-ionische Tenside enthalten. Geeignete Tenside umfassen Polyethylensorbitanfettsäureester wie Sorbitanmonooleat und die höher molekulargewichtigen Addukte von Ethylenoxid mit einer hydrophoben Base, die durch die Kondensation von Propylenoxid mit Propylenglycol hergestellt werden.

[0044] Die parenteralen Formulierungen können in verschlossenen Einheitsdosierungs- oder Mehrfachdosierungs- Behältern wie Ampullen und Gläschen präsentiert werden und können in einem gefriergetrockneten (lyophilisierten) Zustand gelagert werden, der nur die Zugabe des sterilen flüssigen Trägermittels, z. B. Wasser, für Injektionen direkt vor der Verwendung voraussetzt. Extrem poröse Injektionslösungen und Suspensionen können aus sterilen Pulvern, Körnern und Tabletten der zuvor beschriebenen Art hergestellt werden.

[0045] Die Erfindung wird nun im Folgenden beispielhaft dargestellt. Es ist zu verstehen, dass diese Beispiele in ihrer Natur als Illustration vorgesehen sind.

Spezifische Beispiele

[0046] Es wurde die Wirkung des synthetischen A3 Adenosinrezeptoragonisten 2-Chlor-N⁶-(2-Iodobenzyl)-adenosin-5'-N-methyl-uronamid (CI-IB-MECA) auf die in vitro, ex vivo und in vivo Aktivität von NK-Zellen getestet.

[0047] Der A3 Adenosinrezeptorantagonist 9-Chlor-2-(2-furanyl)-5-[(phenylacetyl)amino] [1,2,4,]triazol[1,5-c]quinazolin (MRS-1220) wurde verwendet, um die spezifische Bindung von CI-IB-MECA an den A3AR nachzuweisen.

[0048] Alle Medikamente wurden von RBI Massachusetts, USA gekauft. Eine Stammlösung wird durch das Auflösen von 5 mg CI-IB-MECA oder MRS1220 in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Weitere Verdünnungen wurden in RPMI durchgeführt.

[0049] Murine Milzzellen wurden aus der Milz von ICR-Mäusen (Harlan Laboratories, Jerusalem, Israel) abgeleitet und menschliche mononukleare Zellen wurden durch einen Ficoll-Hypaquegradienten aus heparinisiertem Blut von gesunden, normalen Spendern abgetrennt.

Beispiel 1

[0050] Die Wirkung von CI-IB-MECA auf die Aktivität von menschlichen peripheren Blut-NK-Zellen wurde durch einen Standard 4 Stunden ^{51}Cr -Freisetzungssassay unter Verwendung von K562 Leukämiezellen als Zielzellen untersucht. Menschliche mononukleare Zellen wurden bei einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/Well in 96 Well-Rundbogenplatten kultiviert und als Effektor (E)-Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit 10 nM CI-IB-MECA für 18 Stunden vorinkubiert, dann wurde der Agonist aus den Wells ausgewaschen und die Zellen wurden in RPMI resuspendiert, das 10% FCS enthielt. K562-Zellen wurden als die Zielzellen (T) verwendet und wurden mit 100 $\mu\text{Ci Na}_2[^{51}\text{Cr}]\text{O}_4$ bei 37°C für 1 Stunde markiert.

[0051] Nach intensivem Waschen zum Entfernen des Überschusses ^{51}Cr wurden die Zielzellen (1×10^4) in RPMI resuspendiert und mit den Effektorzellen in einem E : T-Verhältnis von 1 : 50 in einem Gesamtvolumen von 200 μl (Dreifachassays) vermischt. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C in 5% CO_2 wurden die Platten zentrifugiert und die Überstände wurden in einem Gammazähler (LKB) gezählt.

[0052] Die NK-Cytotoxizität wurde unter Verwendung der folgenden Gleichung berechnet (CPM: Zähler pro Minute):

$$\% \text{ Lyse} = \frac{\text{CPM-Probe} - \text{CPM spontan}}{\text{CPM maximal} - \text{CPM spontan}} \times 100$$

[0053] CPM spontan und CPM maximal wurden jeweils durch Messung der CPM (Zähler pro Minute) der Überstände der Zielzellen in der Gegenwart von $\text{Na}_2[^{51}\text{Cr}]\text{O}_4$ in dem Assaymedium oder in der Gegenwart von 1% Triton bestimmt. Es ist erwähnenswert, dass die spontane Freisetzung unter 10% der maximalen Freisetzung über die Dauer dieses Experiments lag.

[0054] Es wurde eine Erhöhung in der Aktivität von natürlichen Killerzellen nach Vorinkubation mit CI-IB-MECA beobachtet. Die Einführung des A3 Adenosinrezeptorantagonisten MRS-1220 beendete die stimulatorische Wirkung, was die spezifische Aktivierung des A3 Adenosinrezeptors durch CI-IB-MECA ([Fig. 1](#)) zeigt.

Beispiel 2

Medikamente

[0055] CI-IB-MECA wurde in DMSO aufgelöst und dann wurden Verdünnungen in PBS für die in vivo-Experimente erhalten.

Ex vivo NK-Aktivität

[0056] Um die in vivo Induktion von NK-Zellaktivität durch CI-IB-MECA zu untersuchen, wurde männlichen ICR-Mäusen (Harlan Laboratories, Jerusalem, Israel), die zwei Monate alt waren und durchschnittlich 20 g wogen, oral CI-IB-MECA verabreicht.

[0057] Milzzellen, die aus den behandelten Mäusen hergestellt wurden, wurden zur Beurteilung entfernt und die NK-Zellaktivität wurde durch einen Standard 4 Stunden ^{51}Cr -Freisetzungssassay unter Verwendung von YAC-Lymphomzellen als Zielzellen getestet. Insbesondere wurden Milzzellen (1×10^6) in 96er Rundbodenwellplatten kultiviert und in RPMI resuspendiert, das 10% FBS enthielt. Die YAC-Lymphomzellen wurden mit 100 $\mu\text{Ci Na}_2[^{51}\text{Cr}]\text{O}_4$ bei 37°C für 1 Std. markiert. 2×10^4 Zellen wurden dann resuspendiert und mit den Effektorzellen in dem E : T-Verhältnis von 50 : 1 in einem Volumen von 200 μl vermischt. Nach 4 Std. Inkubation, bei 37°C in 5% CO_2 wurden die Platten zentrifugiert und die Überstände wurden in einem Gammazähler (LKB) gezählt. Die NK-Cytotoxizität wurde unter Verwendung der oben beschriebenen Gleichung berechnet.

[0058] Anfänglich wurde die Dosis-abhängige Wirkung von CI-IB-MECA durch Verabreichung verschiedener Dosierungen des Medikaments an Mäuse (10–1000 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht) über die orale Route bestimmt. Milzzellen wurden aus den Mäusen 48 Std. nach der Behandlung mit dem Medikament abgetrennt und auf NK-Aktivität unter Verwendung des ^{51}Cr -Assays, wie er oben beschrieben wird, getestet. Wie in [Fig. 2](#) gezeigt wird, wurde eine Dosis-abhängige Potenzierung der NK-Aktivität durch CI-IB-MECA induziert und die maximale Aktivität wurde bei einer Dosierung von 10 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht beobachtet.

[0059] In einem anderen Experiment wurde die zeitliche kinetische Wirkung von CI-IB-MECA (10 µg/kg Körpergewicht) auf die NK-Aktivität untersucht. In diesem Experiment wurden Mäuse für vier aufeinander folgende Tage mit dem Medikament behandelt. 4, 11 und 18 Tage nach der letzten Behandlung wurden die Mäuse geopfert und die Milz wurde entfernt. Die Milzzellen wurden abgetrennt und auf NK-Aktivität unter Verwendung des wie oben beschriebenen ⁵¹Cr-Assays getestet. Zusätzlich wurden Serumproben zur Beurteilung der IL-12-Mengen gesammelt. Jede Gruppe enthielt fünf Mäuse und die Studie wurde vier Mal wiederholt.

[0060] Die Ergebnisse produzierten eine glockenförmige Reaktionskurve mit einer maximalen NK-Zellaktivität an Tag 4 nach der letzten CI-IB-MECA-Behandlung, wobei die Kontrollwerte am Tag 18 erreicht wurden ([Fig. 3](#)). Eine Erhöhung in der Menge des Cytokins IL-12 wurde in Serumproben beobachtet, die aus CI-IB-MECA-behandelten Mäusen entnommen wurden ([Fig. 4](#)).

Beispiel 3

Tumorzellen

[0061] B16-F10 Melanomzellen und HCT-116 menschliche Dickdarmkarzinomzellen wurden in diesem Satz an Experimenten verwendet. Die Zellen wurden in RPMI-Medium aufbewahrt, das 10% fetales Rinderserum (FBS) enthielt. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich zu einem frisch hergestellten Medium transferiert.

[0062] In dieser in vivo-Studie wurden C57B1/6J männliche Mäuse (Harlan Laboratories, Jerusalem, Israel), die zwei Monate alt waren und durchschnittlich 25 g wogen, als das künstliche Melanomlungenmetastasenmausmodell verwendet, die metastatische Lungenfoci 15 Tage nach der Inokulation entwickeln. Die C57B1/6J-Mäuse wurden intravenös (i. v.) mit B-16 Melanomzellen ($2,5 \times 10^5$) inokuliert und täglich oral mit 10 µg/kg Körpergewicht CI-IB-MECA (beginnend einen Tag nach der Tumorinokulation) behandelt. Als Kontrolle dienten Mäuse, die nur mit dem Trägermittel behandelt wurden.

[0063] Nach 15 Tagen wurden die Mäuse geopfert und die Milz wurde entfernt und Serumproben wurden zur IL-12-Mengenbestimmung gesammelt. Jede Gruppe enthielt 15 Mäuse und die Studie wurde drei Mal wiederholt.

[0064] In einem noch weiteren Experiment wurden HCT-116 ($1,2 \times 10^6$) Dickdarmkarzinomzellen subkutan in die Flanke von Nackt/BalbC-Mäusen injiziert. Die Mäuse wurden täglich einen Tag nach der Tumorinokulation mit 10 µg/kg Körpergewicht CI-IB-MECA oral behandelt. Als Kontrolle dienten Mäuse, die nur mit Trägermittel behandelt wurden. Tumorwachstum wurde alle 3–4 Tage beurteilt, angefangen an Tag 13 nach der Tumorinokulation durch Messung der Breite (W) und der Länge (L) des Tumors. Jede Gruppe enthielt 10 Mäuse und die Studie wurde drei Mal wiederholt. Die Tumorgroße wurde gemäß der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Tumorgro\ss e} = \frac{(W)^2 \times L}{2}$$

[0065] Zusätzlich wurden Serumproben für eine IL-12-Mengenbestimmung gesammelt.

[0066] Es wurde eine deutliche Hemmung in der Entwicklung von metastatischen Lungenfoci und der Dickdarmkarzinomtumorgröße in CI-IB-MECA-behandelten Mäusen beobachtet ([Fig. 5A](#), [Fig. 5B](#)). Die Menge an IL-12, die in den Serumproben gemessen wurde, die aus CI-IB-MECA-behandelten Mäusen abgeleitet wurden, lag in beiden Tumor-tragenden Modellen ([Fig. 5C](#) und [Fig. 5D](#)) um 41% höher als die Menge, die mit der Kontrollgruppe erhalten wurden. Es wurde auch eine erhöhte NK-Zellaktivität in Milzzellen aufgezeigt, die aus den CI-IB-MECA-behandelten Melanom- oder Dickdarmkarzinom-tragenden Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Mäusen abgeleitet wurden ([Fig. 5E](#) und [Fig. 5F](#)).

Beispiel 4

Adoptives Transferexperiment

[0067] Für ein adoptives Transferexperiment wurden Milzzellen, die aus B16-F10 Melanom-tragenden Mäusen abgeleitet wurden, die mit 10 µg/kg Körpergewicht CI-IB-MECA behandelt wurden, als „aktivierte“ Zellen bezeichnet, und solche aus der Kontrollgruppe wurden als „nicht aktivierte“ Milzzellen bezeichnet. Es wurde die Fähigkeit von „aktivierten“ Milzzellen untersucht, in vivo gegen Melanonzellen zu wirken. „Nicht aktivierte“ und „aktivierte“ Milzzellen (siehe die Definition oben) wurden auf Mäuse aufgepfropft, die vier Tage zuvor mit

B16-F10 Melanomzellen ($2,5 \times 10^5$) inokuliert worden waren. Als Kontrolle dienten die Mäuse, die mit den B16-F10 Melanomzellen inokuliert worden waren, jedoch nicht mit den Milzzellen gepfropft wurden.

[0068] Die Mäuse wurden am Tag 15 geopfert und die Lungen wurden entfernt. Die Anzahl an Lungenmelanomfoci wurde unter Verwendung eines Seziernikroskops gezählt. Jede Gruppe enthielt zehn Mäuse und die Studie wurde drei Mal durchgeführt.

[0069] Wie in [Fig. 6](#) zu sehen ist, zeigten Mäuse, die mit „aktivierten“ Milzzellen gepfropft wurden, eine deutliche Hemmung in der Entwicklung von metastatischen Lungenfoci im Vergleich zu der Anzahl von Foci, die sich in Mäusen entwickelten, die mit „nicht aktivierten“ Milzzellen gepfropft wurden oder mit der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse beweisen, dass CI-IB-MECA NK-Zellen aktiviert.

IL-12-Analyse in Serumproben

[0070] Serumproben für die Analyse der IL-12-Mengen wurden gewonnen und durch einen kommerziellen murinen ELISA-Kit von R&D Systems, Minneapolis MN, untersucht.

Statistische Analyse

[0071] Die Ergebnisse wurden statistisch unter Verwendung des Studenten t-Tests beurteilt. Für eine statistische Analyse wurde ein Vergleich zwischen dem Mittelwert von verschiedenen Experimenten durchgeführt. Das Kriterium für statistische Signifikanz war $p < 0,05$.

Diskussion

[0072] Die hierin gezeigten Ergebnisse zeigen, dass der A3AR Agonist CI-IB-MECA die IL-12 Produktion induziert, gefolgt durch eine erhöhte NK-Zellaktivität in vivo. Milzzellen, die aus Mäusen erhalten wurden, die oral mit CI-IB-MECA behandelt wurden, übten eine dosis- und zeitabhängige erhöhte NK-Aktivität aus, wenn sie ex vivo mit Zielzellen inkubiert wurden. Die Behandlung von Melanom- oder Dickdarmkarzinom-tragenden Mäusen mit CI-IB-MECA induzierte die Produktion von IL-12, erhöhte die NK-Zellaktivität und hemmte die Tumorentwicklung. Zudem waren Milzzellen, die aus CI-IB-MECA-behandelten Melanom-tragenden Mäusen abgeleitet wurden, die auf Mäuse gepfropft wurden, die mit B16-F10-Melanomzellen inokuliert worden waren, in der Lage, die Entwicklung von metastatischen Lungenfoci zu verhindern.

[0073] Adenosin übt verschiedene Wirkungen auf das Immunsystem aus, einschließlich antientzündlicher Aktivität, Modulierung der Cytokinproduktion, Hemmung der Plättchenaggregation, Induktion der Erythropoetinproduktion, somit die Modulierung der Lymphozytenfunktion [Nilsson J. und Olsson AG, *Atherosclerosis* 53: 77–82, (1984); Ward AC, et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224: 10–6 (1994); und Wilson NJ, Jaworski A, Ward AC, Hamilton JA. *cAMP enhances CSF-1-induced ERK* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244: 475–80 (1998)]. Adenosin wurde klinisch mit dem Immunsystem durch die Beobachtung in Verbindung gebracht, die in Patienten mit SCID gemacht wurde, denen das Enzym Adenosindeaminase fehlt, was sie außer Lage setzt, Adenosin zu katabolisieren [Giblett ER, et al. *Lancet* 2: 1067–9 (1972)]. Von Purinnukleotiden wurde berichtet, dass sie mehrfache Wirkungen auf lymphoide Zellen haben [Priebe T. et al. *Cell Immunol.* 129: 321–8 (1990)]. Die Inkubation menschlicher NK-Zellen mit extrazellulären Purinnukleotiden resultierte in einer dosisabhängigen Hemmung der Proliferation ohne Wirkung auf die Kapazität zur Lyse von Tumorzielzellen [Miller JS, et al. *J. Immunol.* 192: 7376–82 (1999)]. Dibutyryl cAMP oder Forskolin (ein Mittel, das in den Zellen die cAMP-Menge durch Aktivierung der Adenylylcyclase erhöht) waren in der Lage, eine hemmende Wirkung auf die cytolytische Aktivität von NK-Zellen gegenüber bestimmten Tumorzielzellen auszuüben [Hall TJ., et al. *Clin. Exp. Immunol.* 54: 493–500 (1983)]. Die Ergebnisse, die mit dem Adenosinrezeptoragonisten erhalten wurden, zeigen eine Rolle für die A1- und A2-Rezeptoren bei der Regulierung der murinen NK-Zellaktivität an. Priebe et al. (supra) berichteten, dass in Mausmilzlymphozyten NK-Zellaktivität durch Adenosinrezeptor A2-Agonisten gehemmt wurde, während potente A1-Rezeptoragonisten wirksamere Stimulatoren sind.

[0074] Die hierin gezeigten Ergebnisse zeigen, dass die Verabreichung eines spezifischen A3AR-Agonisten in der Aktivierung von NK-Zellen in vivo resultierte.

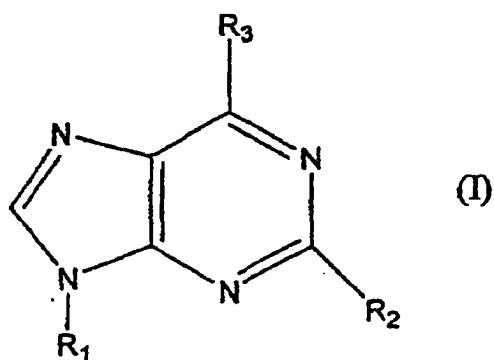
[0075] IL-12 ist ein Cytokin, von dem bekannt ist, dass es ein zentraler Induzierer von Th1-Reaktionen und zellvermittelter Immunität durch Induktion von NK-Zellaktivität und Produktion von Tumornecrosefaktor ist [Trinchieri G. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 151–76 (1995)]. Frühere Berichte zeigten, dass Adenosinanaloga die Produktion von IL-12 durch aktivierte menschliche Monocyten durch Stimulierung von A2A-Rezeptoren und

anschließende Erhöhung von cAMP hemmten [Link AA. et al. J. Immunol. 164: 436–42 (2000)]. Hasko et al. [Hasko G. et al. FASEB 14: 2065–74 (2000)] zeigten, dass Adenosinrezeptoragonisten die Produktion von IL-12 in peritonealen MQ in der folgenden Reihenfolge der Stärke GCS-21680 (A2AR-Agonist) > IB-MECA (A3AR-Agonist) > CCPA (A1AR-Agonist) hemmten. Diese Ergebnisse schlagen vor, dass A2 Adenosinrezeptoren eine dominante Rolle in der Hemmung der IL-12-Produktion durch Adenosinagonisten aufweisen. Zudem wurde gezeigt, dass die Wirkung von IB-MECA biphasisch war, d. h. die Hemmung der IL-12-Produktion erreichte ihr Maximum bei 10 µm, während bei 100 µm IB-MECA die Produktion von IL-12 erhöhte [Hasko G. et al. supra]. Auf der anderen Seite zeigte die gleiche Gruppe von Hasko & Szabo, dass die IP-Verabreichung von IB-MECA (500 µg/kg) an Mäuse als eine Vorbehandlung zu einer lethalen Dosis eines Endotoxins, Lypopolysaccharid, die Überlebensrate der Mäuse verbesserte. Die LPS-Behandlung bewirkte das Aufkommen von großen Mengen an IL-12 in dem Plasma, während die IB-MECA-Vorbehandlung die Mengen an IL-12 in dem Plasma unterdrückte. Es bleibt zu erwähnen, dass diese Wirkung von IB-MECA nur sichtbar war, wenn Tiere mit dem Medikament vorbehandelt wurden, und bis 8 Std. nach Behandlung beobachtet wurde [Hasko G. et al. Eur. J. Pharmacol. 358: 261–8 (1998)]. In dieser Studie induzierte die Verabreichung von geringen Dosierungen von CI-IB-MECA die IL-12-Produktion, der die Induktion von NK-Aktivität folgte. Somit kann geschlossen werden, dass ein A3AR-Agonist die IL-12-Produktion induziert, wodurch die NK-Aktivität stimuliert wird, was eine Rolle in der CI-IB-MECA Antitumorwirkung spielt.

[0076] Die hierin gezeigten Ergebnisse zeigen, dass die orale Verabreichung von geringen Dosierungen eines A3AR-Agonisten (CI-IB-MECA) erhöhte Mengen an Serum IL-12 induzierte, was durch erhöhte NK-Zellaktivität und Tumorstillwachstumshemmung gefolgt wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine chronische Aktivierung des Rezeptors in einer gegenteiligen Wirkung, im Vergleich zu solchen, die bei akuter Aktivierung des Rezeptors beobachtet werden, resultieren könnte.

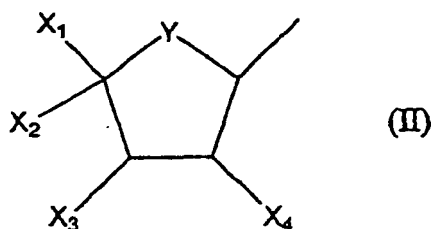
Patentansprüche

1. Verwendung von A3Rag (A3 receptor agonist) zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung einer infektiösen Erkrankung.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei die infektiöse Erkrankung durch ein Agens verursacht wird, ausgewählt aus: einem Virus, einem Bakterium und einem Einzeller.
3. Die Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei das genannte A3Rag eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) ist:



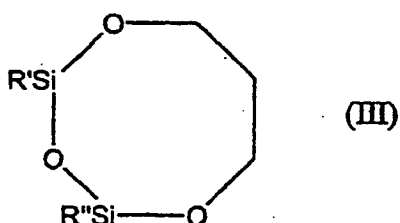
wobei,

– R₁ ein Alkyl, Hydroxyalkyl, Carboxyalkyl oder Cyanoalkyl oder eine Gruppe der folgenden allgemeinen Formel (II) repräsentiert:



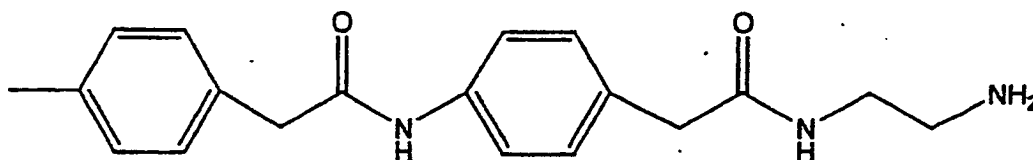
in welcher:

- Y Sauerstoff, Schwefel oder CH_2 repräsentiert;
- X_1 ein H, Alkyl, $\text{R}^a\text{R}^b\text{NC}(=\text{O})$ - oder HOR^c - repräsentiert, wobei
- R^a und R^b gleich oder unterschiedlich sein können und ausgewählt werden aus Wasserstoff, Alkyl, Amino, Haloalkyl, Aminoalkyl, BOC-Aminoalkyl, und Cycloalkyl, oder so miteinander verbunden sind, dass sie einen heterozyklischen Ring bilden, der zwei bis fünf Kohlenstoffatome enthält; und
- R^c ausgewählt wird aus Alkyl, Amino, Haloalkyl, Aminoalkyl, BOC-Aminoalkyl, und Cycloalkyl;
- X_2 ein H, Hydroxyl, Alkylamino, Alkylamido oder Hydroxyalkyl ist;
- X_3 und X_4 unabhängig voneinander Wasserstoff, Hydroxyl, Amino, Amido, Azido, Halo, Alkyl, Alkoxy, Carboxy, Nitrilo, Nitro, Trifluoro, Aryl, Alkaryl, Thio, Thioester, Thioether, $-\text{OCOPh}$, $-\text{OC}(=\text{S})\text{OPh}$ darstellen oder beiderseits X_3 und X_4 Sauerstoff sind, die mit $>\text{C}=\text{S}$ so verbunden sind, dass sie einen 5-gliedrigen Ring bilden, oder X_2 und X_3 einen Ring der Formel (III) bilden:



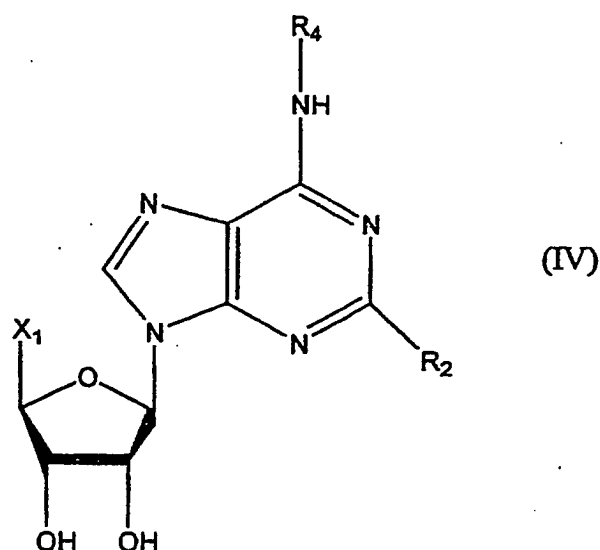
wobei R' und R'' unabhängig voneinander eine Alkylgruppe repräsentieren;

- R_2 ausgewählt wird aus Wasserstoff, Halo, Alkylether, Amino, Hydrazido, Alkylamino, Alkoxy, Thioalkoxy, Pyridylthio, Alkenyl; Alkynyl, Thio und Alkylthio; und
- R_3 eine Gruppe aus der Formel $-\text{NR}_4\text{R}_5$ ist, wobei
- R_4 ein Wasserstoffatom oder eine Gruppe ist ausgewählt aus Alkyl, substituiertem Alkyl oder Aryl- $\text{NH}-\text{C}(\text{Z})$ -, wobei Z , O, S, oder NR^a ist, wobei R^a die oben beschriebenen Bedeutungen besitzt; und im Falle, dass R_4 Wasserstoff ist;
- R_5 ausgewählt wird aus R- und S-1-Phenylethyl, Benzyl, Phenylethylgruppen, die unsubstituiert sind oder in einer oder mehreren Positionen mit einem Substituenten substituiert sind, der ausgewählt wird aus Alkyl, Amino, Halo, Haloalkyl, Nitro, Hydroxyl, Acetoamido, Alkoxy und Sulfonsäure oder einem Salz davon; Benzodioxanmethyl, Fururyl, L-Propylalanyl-Aminobenzyl, β -Alanylalanyl-Benzyl, T-BOC- β -Alanylaminobenzyl, Phenylamino, Carbamoyl, Phenoxy oder Cycloalkyl; oder R_5 ist eine Gruppe der folgenden Formel:



oder, wenn R_4 ein Alkyl oder Aryl- $\text{NH}-\text{C}(\text{Z})$ - ist, wird R_5 ausgewählt aus Heteroaryl- $\text{NR}^a-\text{C}(\text{Z})$ -, Heteroaryl- $\text{C}(\text{Z})$ -, Alkylaryl- $\text{NR}^a-\text{C}(\text{Z})$ -, Alkaryl- $\text{C}(\text{Z})$ -, Aryl- $\text{NR}-\text{C}(\text{Z})$ - und Aryl- $\text{C}(\text{Z})$ -; Z repräsentiert Sauerstoff, Schwefel oder Amin; oder ein pharmazeutisch geeignetes Salz der oben genannten Verbindung.

4. Die Verwendung gemäß Anspruch 3, wobei A3RAg ein Nucleosidderivat der allgemeinen Formel (IV) ist:



wobei X_1 , R_2 und R_4 wie in Anspruch 3 definiert sind.

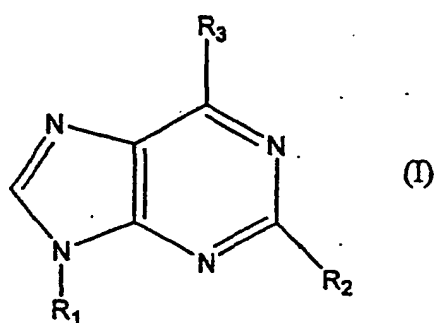
5. Die Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei das genannte A3RAG ausgewählt wird aus N^6 -2-(4-Aminophenyl)ethyladenosin (APNEA), N^6 -(4-Amino-3-Iodobenzyl)-Adenosin-5'-(N-Methyl-Uronamid) (AB-MECA), N^6 -(3-Iodobenzyl)-Adenosin-5'-N-Methyl-Uronamid (IB-MECA), und 2-Chloro- N^6 -(3-Iodobenzyl)-Adenosin-5'-N-Methyl-Uronamid (CI-IB-MECA).

6. Die Verwendung gemäß Anspruch 5, wobei das genannte A3RAG C1-IB-MECA ist.

7. Die Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die für die orale Verabreichung geeignet ist.

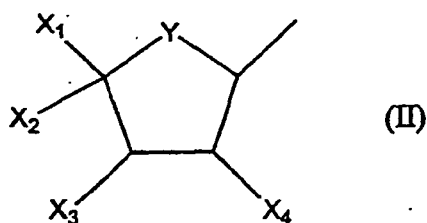
8. Ein Verfahren zur Aktivierung natürlicher Killer (NK) Zellen, welches das Kontaktieren der genannten Zellen ex vivo mit einer solchen Menge an Agens umfasst, die für die Aktivierung der genannten NK-Zellen wirksam ist, wobei das genannte aktive Agens ein Adenosin A3 Rezeptoragonist (A3RAG) ist.

9. Das Verfahren gemäß Anspruch 8, wobei das genannte A3RAG eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) ist:



wobei,

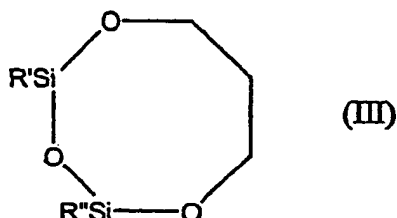
– R_1 ein Alkyl, Hydroxyalkyl, Carboxyalkyl oder Cyanoalkyl oder eine Gruppe der folgenden allgemeinen Formel (II) repräsentiert:



in welcher:

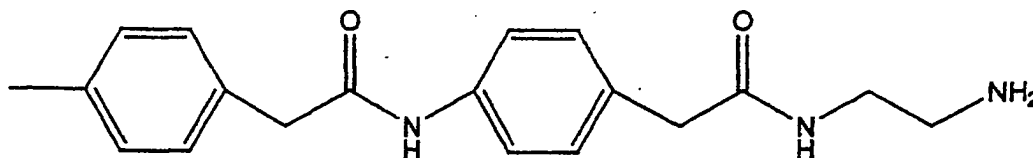
– Y einen Sauerstoff, Schwefel oder CH_2 repräsentiert;

- X_1 ein H, Alkyl, $R^a R^b NC(=O)-$ oder HOR^c- repräsentiert, wobei
- R^a und R^b gleich oder unterschiedlich sein können und ausgewählt werden aus Wasserstoff, Alkyl, Amino, Haloalkyl, Aminoalkyl, BOC-Aminoalkyl und Cycloalkyl, oder miteinander verbunden sein können, um einen heterozyklischen Ring zu bilden, der zwei bis fünf Kohlenstoffatome enthält; und
- R^c ausgewählt wird aus Alkyl, Amino, Haloalkyl, Aminoalkyl, BOC-Aminoalkyl, und Cycloalkyl;
- X_2 ein H, Hydroxyl, Alkylamino, Alkylamido oder Hydroxyalkyl ist;
- X_3 und X_4 unabhängig voneinander Wasserstoff, Hydroxyl, Amino, Amido, Azido, Halo, Alkyl, Alkoxy, Carboxy, Nitrilo, Nitro, Trifluoro, Aryl, Alkaryl, Thio, Thioester, Thioether, $-OCOPh$, $-OC(=S)OPh$ repräsentieren, oder beiderseits X_3 und X_4 Sauerstoffe sind, die mit $>C=S$ verknüpft sind, um einen fünfgliedrigen Ring zu bilden, oder X_2 und X_3 den Ring der Formel (III) bilden:



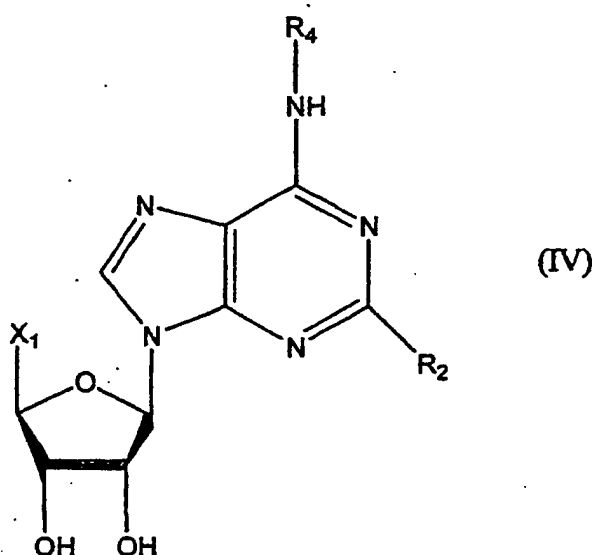
wobei R' und R'' unabhängig voneinander eine Alkylgruppe repräsentieren;

- R_2 ausgewählt wird aus Wasserstoff, Halo, Alkylether, Amino, Hydrazido, Alkylamino, Alkoxy, Thioalkoxy, Pyridylthio, Alkenyl, Alkynyl, Thio und Alkylthio; und
- R_3 eine Gruppe der Formel $-NR_4R_5$ ist, wobei
- R_4 ein Wasserstoffatom oder eine Gruppe ist ausgewählt aus Alkyl, substituiertem Alkyl oder Aryl-NH-C(Z)-, wobei Z ein O, S oder NR^a ist, wobei R^a die oben genannten Bedeutungen besitzt; wobei im Falle, dass R_4 Wasserstoff ist,
- R_5 ausgewählt wird aus R- und S-1-Phenylethyl, Benzyl, Phenylethylgruppen, die unsubstituiert sind oder an einer oder mehreren Positionen mit einem Substituenten substituiert sind, der ausgewählt wird aus Alkyl, Amino, Halo, Haloalkyl, Nitro, Hydroxyl, Acetoamido, Alkoxy, und Sulfonsäure, oder einem Salz davon; Benzodioxanmethyl, Fururyl, L-Propylalanyl-Aminobenzyl, β -Alanylaminobenzyl, T-BOC- β -Alanylaminobenzyl, Phenylamino, Carbamoyl, Phenoxy oder Cycloalkyl; oder R_5 ist eine Gruppe der folgenden Formel:



oder wenn R_4 ein Alkyl oder Aryl-NH-C(Z)- ist, wird R_5 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Heteroaryl-NR^a-C(Z)-, Heteroaryl-C(Z)-, Alkaryl-NR^a-C(Z)-, Alkaryl-C(Z)-, Aryl-NR-C(Z)- und Aryl-C(Z)-; Z repräsentiert Sauerstoff, Schwefel oder Amin;
oder ein pharmazeutisch geeignetes Salz der oben genannten Verbindung.

10. Das Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei das genannte A3RAg eine Verbindung der allgemeinen Formel (IV) ist:



wobei X_1 , R_2 und R_4 wie im Anspruch definiert sind.

11. Das Verfahren gemäß Anspruch 10, wobei A3RAg ausgewählt wird aus N^6 -2-(4-Aminophenyl)Ethyladenosin (APNEA), N^6 -(4-Amino-3-Iodobenzyl)-Adenosin-5'-(N-Methyl-Uronamid) (AB-MECA), N^6 -(3-Iodobenzyl)-Adenosin-5'N-Methyl-Uronamid (IB-MECA), und 2-Chloro- N^6 -(3-Iodobenzyl)-Adenosin-5'N-Methyl-Uronamid (C1-IB-MECA).

12. Das Verfahren gemäß Anspruch 11, wobei das genannte A3RAg C1-IB-MECA ist.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

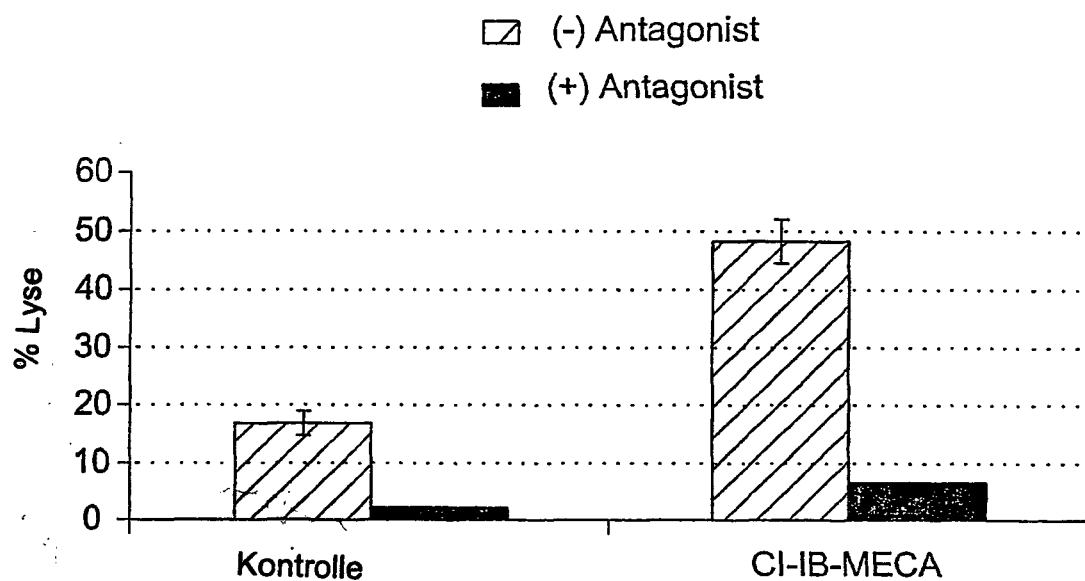


FIG. 1

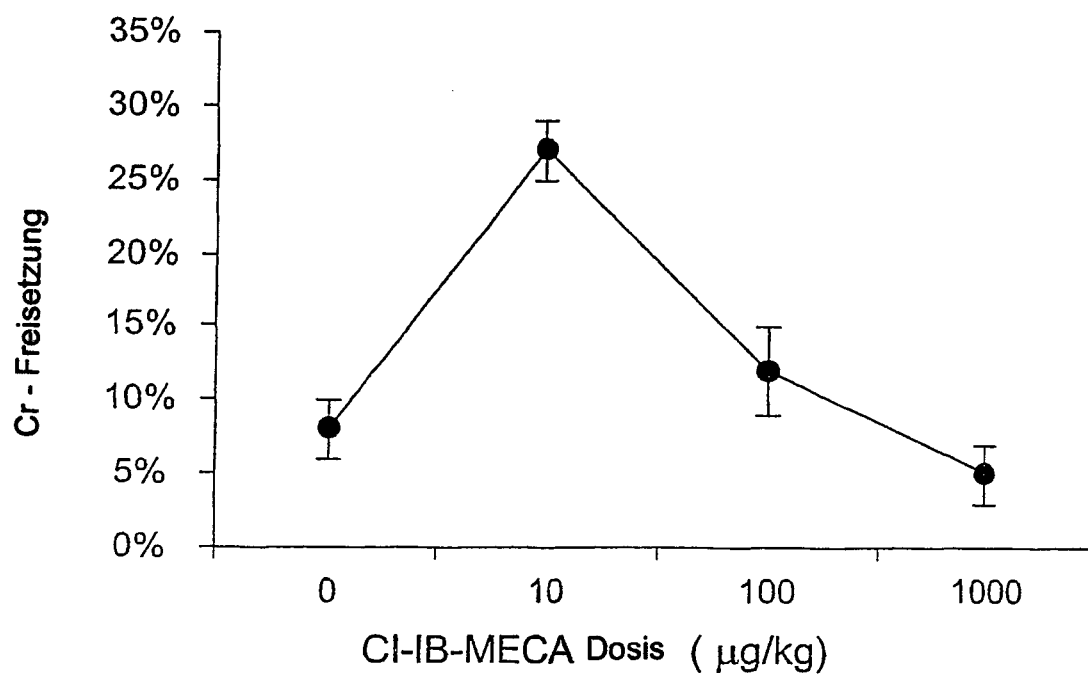


FIG. 2

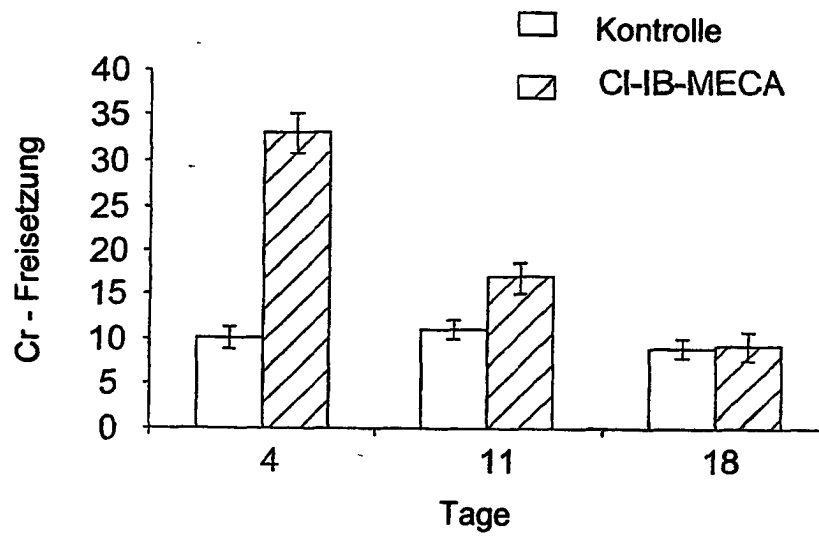


FIG. 3

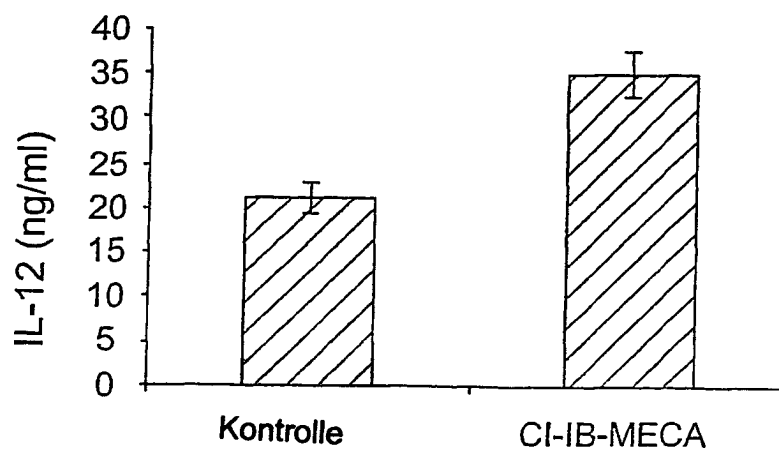


FIG. 4

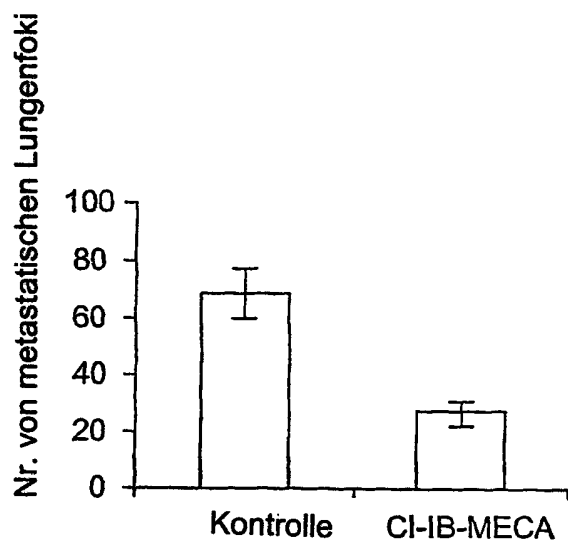


FIG. 5A

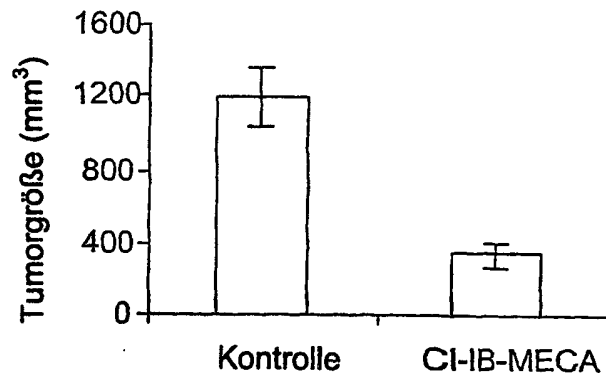


FIG. 5B

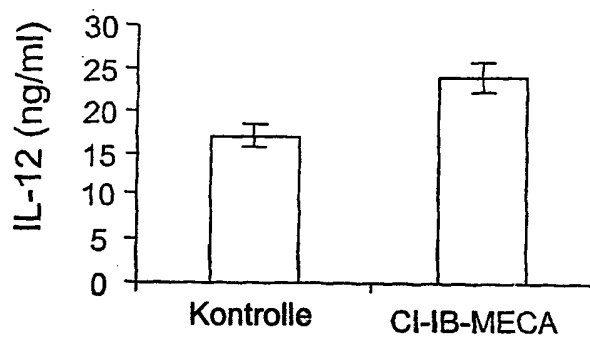


FIG. 5C

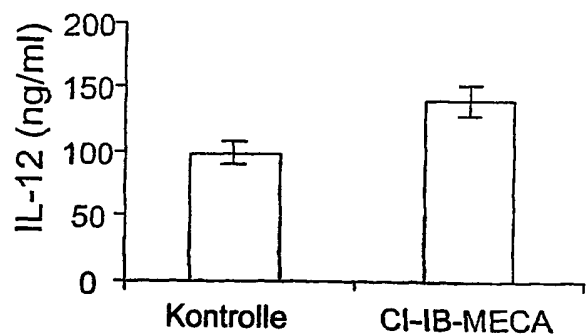


FIG. 5D

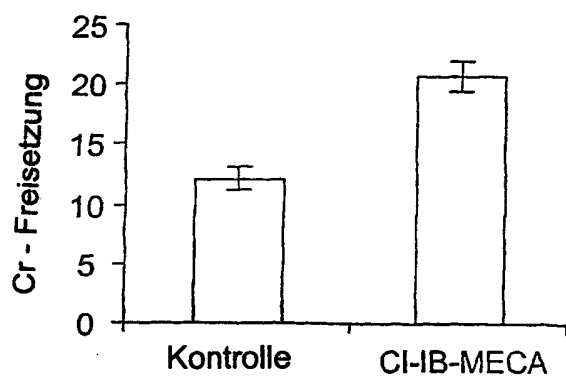


FIG. 5E

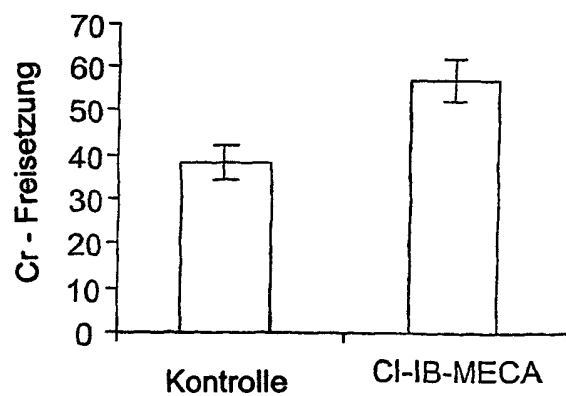


FIG. 5F

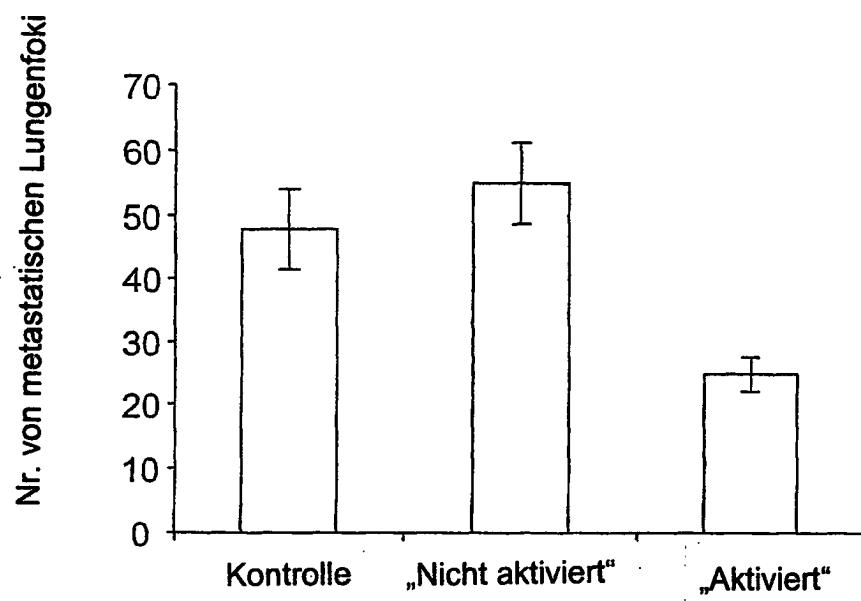


FIG. 6