

P04 00500

30767

Vírusos fertőzések kezelése Levovirin™ alkalmazásával

K I V O N A T

**NYOMDAPÉLDÁNY
MÁSOLATA**

A találmány tárgya eljárás vírusos fertőzések kezelésére Levovirin [1-(β -L-ribofuranozil)-1,2,4-triazol-3-karboxamid] alkalmazásával. A találmány szerinti eljárásban különösen HIV-fertőzés, HCV-fertőzés vagy HBV-fertőzés kezelésére alkalmazható.

P04 00500

Vírusos fertőzések kezelése LevovirinTM alkalmazásával

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A találmány tárgyát eljárás képezi vírusos fertőzések kezelésére.

Számos vírusos fertőzés a citokinprofilnak Th1-válasz irányából a Th2-válasz irányába történő eltolódásával jár, és újabb kutatások eredményei arra utalnak, hogy a Th1-válasz és a Th2-válasz közötti egyensúly szabályozása előnyös lehet vírusos fertőzés elleni immunitás kialakulása és/vagy fenntartása szempontjából. Fokozott Th1-válasz különösen fontosnak tűnik HIV-fertőzés esetében, amennyiben hosszú távú túlélők Th1 túlsúllyal jellemzett választ mutatnak, míg a progresszív tüneteket mutató egyénekben inkább a Th2-válasz dominál. Barker és munkatársai szerint például, HIV során a betegség progresszióját a fertőzött gazdaszervezetben belül a citokinek termelődésében bekövetkező, Th1-választól a Th2-válasz irányába történő eltolódás eredményezi [Barker E, Mackewicz CE., Levy JA.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(24), 11135-9 (1995. nov.)]. Hasonlóképpen, a Th2-válasz csökkenése úgy tűnik terápiás jelentőséggel bír, hiszen Reiser és munkatársai beszámoltak arról, hogy a Th2-citokin szintek emelkednek krónikus hepatitisz-C fertőzés során [Reiser M és munkatársai: *J. Hepatol.*, 26(3), 471-8 (1997)]. Különböző eljárások ismertek a Th1/Th2 egyensúly befolyásolására, ezek nagy általánosságban citokinnel összefüggő és citokinnel nem összefüggő eljárásokra oszthatók.

Citokinnel összefüggő kezelési eljárásokban, citokint adunk be a Th1/Th2-egyensúly Th1-típusú vagy Th2-típusú válasz irányába történő eltolására. Knight és mtsai. például arra a

következtetésre jutottak, hogy IL-12-vel (interleukin-12) - egy, a Th1-sejtek fejlődését elősegítő citokinnel - végzett kezelés alkalmazható AIDS kezelésére, mivel az IL-12 beadása hatékonynak bizonyult a sejt által közvetített immunitás helyreállítására AIDS-vírussal vagy Rauscher leukémia vírussal (RLV) fertőzött egerekben [Knight S.C. és Patterson S.: *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 539 (1994)]. Egy további példában Gracie J.A. és munkatársai kimutatták, hogy IL-18 beadása egereknek a Th1-válaszok kialakulása szempontjából kulcsfontosságú pleiotrop aktivitású [Gracie és mtsai: *J. Clin. Invest.* **104**(10), 1393 (1999. november)]. Bár a citokinek adagolása tipikusan a kívánt Th1-citokinek viszonylag specifikus növekedését eredményezi, citokinek tartós adagolása problematikus lehet, több okból. Például a rekombináns citokinek előállítása viszonylag költséges, és a nem-rekombináns citokinek izolálása természetes forrásból általában nehéz, mivel a citokinek természetes forrásukban igen kis koncentrációban vannak jelen. További nehézséget okoz, hogy a citokinkészítménynek jellemzően igen nagy tisztaságúnak kell lennie, az ismételt adagolást követően fellépő allergiás reakciók elkerülésére. Ezen felül a citokinforrásától függően a betegek a citokineket rosszul tolerálhatják.

A citokinekkal össze nem függő eljárásokban, citokinektől eltérő immunszabályozó szereket alkalmazunk a Th1-válasz és Th2-válasz egyensúlyának módosítására. Sprietsma J.E. például feltételezi [Sprietsma J.E.: *Med. Hypotheses* **53**(1), 6 (1999. július)], hogy cinkionok (Zn^{2+}) és nitrogén(II)-oxid (NO) glutationnal (GSH) és annak oxidált formájával (GSSG) együtt segíthetik antigénre adott immunválaszok szabályozását. A

szerző részletesen leírja, hogy Zn^{2+} , NO és/vagy GSH hiánya a Th1/Th2-egyensúlyt Th2 irányba tolja el, és a Zn^{2+} , NO és/vagy GSH pótlása a Th1/Th2-egyensúlyt Th1 irányba tolhatja el. Zn^{2+} vagy GSH/GSSH adagolása különösen előnyös lehet, mivel ezek a vegyületek magasabb koncentrációban sem toxikusak, és előállításuk olcsó. Ezen felül, a Zn^{2+} - vagy GSH/GSSH-készítmények szájon át adagolhatók, ezáltal jelentősen csökken az allergiás reakciók kialakulásának kockázata, különösen akkor, ha a készítmények nem ultratisztaságúak. A Zn^{2+} - vagy GSH/GSSH-készítmények beadása azonban csak a Th1/Th2-egyensúly Th2-dominancia által jellemzett állapotból történő helyreállítására tűnik alkalmasnak, míg az nem világos, hogy a Zn^{2+} - vagy GSH/GSSH-készítmények adagolásával növelhető-e a Th1-válasz normális Th1/Th2-egyensúly esetén.

Egy további példa szerint a 09/156 645 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben, amely teljes terjedelmében a kitanítás részét képezi, Ribavirin [1-(59-dezoxi- β -D-ribofuranozil)-1,2,4-triazol-3-karboxamid] nukleozidanalógot alkalmaznak a Th1-Th2-válasz egyensúlyának módosítására. A Ribavirin alkalmazása különösen előnyös vírusinfekciók kezelésére, mivel a Ribavirin nem csak az immunválasz Th1-válasz felé történő eltolódását idézi elő, hanem a vírusreplikációt is gátolja. Ribavirint sikeresen alkalmaztak például hepatitis C kezelésére. Hatásainak egy része vírusellenes hatásaival, más része a citokinegyensúly módosításával függ össze.

Bár a Ribavirinnek a vírusok számára és immunstátuszra kifejtett hatása előnyösnek bizonyult, tartós adagolása, viszonylag magas dózisokban gyakran járt mellékhatásokkal, pél-

dául leukopéniával és hemolitikus anémiával. A mellékhatások előfordulási gyakoriságának vagy súlyosságának mérséklésére vezették be a Ribavirin és $\text{INF}\alpha\text{-2B}$ együttes adagolását [Reichert O. és mtsai.: *Lancet*, **351**, 83 (1988)]. A Ribavirin és $\text{INF}\alpha\text{-2B}$ együttes adagolása azonban jelentősen növeli a kezelés költségét. Az említetteken felül, az $\text{INF}\alpha\text{-2B}$ tartós adagolása növeli az $\text{INF}\alpha\text{-2B}$ beadásával kapcsolatos új mellékhatások kialakulásának kockázatát.

Annak ellenére, hogy a Ribavirint viszonylag sikeresen alkalmazták vírusos betegségek kezelésére, a Ribavirin adagolása problematikus maradt a különböző mellékhatások kiváltása miatt. Szükség van tehát a Th1/Th2 -válasz szabályozására alkalmas, viszonylag alacsony toxicitású vagy ilyen hatással nem járó javított eljárásokra és készítményekre, vírusos fertőzések kezelésére.

Az alábbiakban összefoglaljuk a találmány szerinti megoldás lényegét.

A találmány tárgyát eljárás képezi vírusfertőzések kezelésére betegben, amelynek során a betegnek Levovirint™ [1-(β -L-ribofuranozil)-1,2,4-triazol-3-karboxamid] adagolunk, HIV-fertőzés, HCV-fertőzés vagy HBV-fertőzés kezelésére.

A találmány egy szempontja szerint, a Levovirin™ adagolása növeli a betegben a Th1 -választ a Th2 -válaszhoz képest, és kiemelendő, hogy a Th2 -válasz növekedése abszolút értékben mérhető. A találmány egy további szempontja szerint, Levovirint™ adunk be *in vivo*, előnyösen intravénás (i.v.) injektálással vagy szájon át, előnyösen 0,1-1,0 mg/kg dózisban.

A találmány szerinti megoldás további célkitűzései, jellemzői, szempontjai és előnyei nyilvánvalóak lesznek a leírás-

hoz csatolt, a találmány előnyös megvalósítási módjait ismertető részletes kitanítás és ábrák alapján, ahol az azonos számok azonos komponenseket jelentenek.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz csatolt ábrákat.

Az 1. ábrán a Levovirin™ szerkezeti képletét mutatjuk be.

A 2. ábrán a Levovirin™ szintézisének menetét ismertetjük.

A 3.A-C ábrákon Levovirin™ és Ribavirin adagolásának különböző biológiai hatásait szemléltetjük grafikusán a Th1-válasz elemeire nézve.

A 4. ábrán látható grafikonon a Levovirinnal és Ribavirinnal történő kezelés hatására kialakult szérum ALT-szinteket ábrázoltuk ConA-kezelt egerekben.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmány szerinti megoldást.

A leírás szerinti értelemben „vírusfertőzésen” vírusinfekciók bármely stádiumát értjük, ezen belül az inkubációs időt, latens és alvó (dormans) fázist, akut fázist, és valamely vírussal szembeni immunitás kialakulásának és fennmaradásának szakaszát. Következésképpen a „kezelés” kifejezés a beteg immunrendszerével kapcsolatos immunitás létrehozására vagy helyreállítására, valamint a vírusreplikáció szupresszállására vagy gátlására vonatkozik.

Szintén a leírás szerinti értelemben, limfokineknek segítő T-sejtek által termelt citokinek szubpopulációját nevezzük, amelyek általánosságban két alcsoportra, Th1- és Th2-sejtekre oszthatók. A Th1-sejtek (újabbán 1-es típusú sejtek) interleukin 2 (IL-2), tumor nekrozis faktor (TNF α) és interferon-gamma (IFN γ) citokineket termelnek, és elsősorban sejt által

közvetített immunitásért, például a késői típusú hiperszenzitivitási reakcióért és antivirális immunitásért felelősek. Ezzel szemben, a Th2-sejtek (újabbán 2-es típusú sejtek) IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 és IL-13 interleukineket termelnek, és elsősorban a humorális immunválasz, például az allergénekre adott válasz támogatásában játszanak szerepet, például az IgE és IgG4 ellenanyag izotípusváltásban [Mosmann: *Annu Rev. Immunol.* 7, 145 (1989)].

Szintén a leírás szerinti értelemben, Th1- és Th2-„válaszon” Th1- és Th2-limfociták indukálódásából eredő hatások teljes skáláját értjük. Ilyen válaszok többek között a megfelelő citokinek termelődésének növekedése, a megfelelő limfociták proliferációjának növekedése, és citokinek növelt termelődésével kapcsolatos más hatások, például motilitási hatások. A Th1-választ általánosságban növelt IL-2-, TNF α - és INF γ -szintek jellemzik, míg a Th2-válasz tipikusan az IL-4-, IL-5-, IL-6- és IL-10-szint növekedésével jár.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, mintegy 500/mikroliter CD4 limfocitaszámú HIV-fertőzött beteg 30 napig kap naponta egyszer, injektálással Levovirint™ vizes oldat formájában, 0,5 mg/testtömeg-kg dózisban.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, az eljárás nem szükségszerűen korlátozódik körülbelül 500/mikroliter CD4 limfocitaszámú HIV-fertőzött beteg kezelésére, hanem alacsonyabb CD4 limfocitaszámoknál is, például 500-300, 300-150 vagy 150-nél alacsonyabb CD4 limfocitaszámoknál is alkalmazható. Hasonlóképp, az eljárás alkalmazható magasabb (azaz >500/mikroliter) CD4 limfocitaszámoknál is. Világos továbbá, hogy a vírustitertől és CD4 limfocitaszámtól

eltérő klinikai markerek - például direkt és indirekt vizsgáló eljárások - is alkalmasak lehetnek a HIV-vírus jelenlétének kimutatására. Direkt vizsgáló eljárások például PBMC-sejtek (perifériás vér eredetű mononukleáris sejtek) és plazma-HIV kvantitatív tenyésztése, kvalitatív és kvantitatív PCR-eljárások stb. Indirekt vizsgáló eljárásokként alkalmazhatunk például kvalitatív és kvantitatív ELISA-eljárásokat stb.

A vírusfertőzést okozó vírus típusa vonatkozásában, a vírusfertőzés kezelése nem korlátozódik HIV vírus meghatározott típusára vagy altípusára, és világos, hogy a HIV-vírustól eltérő egyéb vírusok esetében is alkalmazható. Általánosságban kijelenthető, hogy az eljárás alkalmazható Ribavirinnel - amely a Levovirin™ D-izomerje - kezelhető egyéb vírusfertőzésekben. Annak alkalmazása elsősorban HCV- és HBV-fertőzésekben merül fel.

A találmány egy további szempontja szerint, a Levovirin™ adagolása nem korlátozódik 30 napig, napi egyszeri injektálással történő adagolásra, hanem más gyakorisággal és más úton is beadható. Amennyiben például viszonylag nagy mennyiségű Levovirint™ kívánunk bejuttatni, mérlegelhetjük a napi két-négy vagy több injektálás lehetőségét. Hasonlóképp, ha hosszabb idő keresztül magas Levovirin™ plazmakoncentrációkat kívánunk elérni, folyamatosan adagolhatjuk, például folyamatos infúzióval, ozmotikus pumpával vagy elnyújtott felszabadulást biztosító implantátummal. Világos továbbá, hogy a bejuttatást nem csak injektálással végezhetjük, hanem szájon át (orálisan), transzdermálisan, intranazálisan, pulmonárisan stb. is. Következésképp, a Levovirin™ készítmények kiszerezhetők tabletták, szirup, gél, aeroszol stb. formájában. Levovirint™ al-

kalmazhatunk továbbá *in vitro*. Eljárhatunk például úgy, hogy előre meghatározott mennyiségű teljes vért vagy annak frakcióját preinkubálunk Levovirinnel™ *in vitro*, immunogén behatással szembeni immunreakció felerősítésére vagy kiváltására.

A Levovirin™ adagolását tekintve, különböző dózisokat alkalmazhatunk, például 0,5 mg/kg, 0,1 mg/kg vagy annál alacsonyabb dózisokat, vagy akár 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg vagy magasabb dózisokat. Általánosságban, a megfelelő dózis több paramétertől függ, például a vírusfertőzés típusától, a vírusfertőzés stádiumától, a Levovirin™ kívánt plazmakoncentrációjától, a kezelés időtartamától stb. Például, míg bizonyos vírusfertőzések esetén sikeres lehet a kezelés viszonylag alacsony Levovirin™-plazmakoncentrációk mellett, más vírusfertőzések viszonylag magas dózisok alkalmazását teszik szükségessé.

A találmány egy még további szempontja szerint, Levovirint™ kombinálhatunk más gyógyászatilag aktív hatóanyagokkal a vírusfertőzések kezelésének támogatására. Ilyen aktív hatóanyagok lehetnek például vírusellenes szerek és immunszabályozó hatóanyagok. Vírusellenes szerként alkalmazhatunk például proteázgátlókat vagy nukleotid- és nukleozidanalógokat, immunszabályozó szerként pedig citokineket.

Anélkül, hogy meghatározott elmélethez ragaszkodnánk, megállapítottuk, hogy a Levovirin™ adagolása a Th1-válasz fokozásával jár a betegben a Th2-válaszhoz képest, és a Th1-válasz relatív növekedése a Th2-válaszhoz képest a Th1-válasz abszolút növekedésének tudható be. A citokinszintek külön-külön vagy együtt is emelkedhetnek. Például, Levovirin™ hozzáadása aktivált humán PBMC-sejtekhez az IL-2-szint átlagos csúcsértékének legalább 70%-os növekedését eredményezheti (tömegre

számítva) az aktivált kontrollokban mérhető szinthez képest. Ezenfelül, Levovirin™ hozzáadása aktivált humán PBMC-sejtekhez az IFN- γ -szint átlagos csúcsértékének legalább 72%-os növekedését eredményezheti (tömegre számítva) az aktivált kontrollban mérhető értékhez képest; vagy a TNF- α -szint legalább 50%-os növekedését eredményezheti (tömegre számítva) az aktivált kontrollokban mérhető szinthez képest (lásd még a 3.A-C ábrákat). Egy további példában, a Th1-válasz fokozódása az IL-2, IFN- γ - és TNF- α -szintek átlagos csúcsértékének 42%-os, 125%-os, illetve 72%-os emelkedésével járt az aktivált kontrollban mérhető szintekhez képest.

Kiemelendő továbbá, hogy bár a Ribavirinnel és Levovirinnel™ kezelhető vírusfertőzések spektruma bizonyos mértékben átfedő, a Levovirin™ lényegesen kisebb toxicitással rendelkezik. Például, míg a Ribavirin orális adagolása patkányoknak 180 mg/kg dózisban, négy hétig jelentős hemolitikus anémiát és leukopeniát idézett elő, a Levovirin™ nem okozott kimutatható klinikailag kóros elváltozást. Lényeges továbbá, hogy vírusos betegségek kezelése Levovirinnal™ elsősorban a Th1/Th2-egyensúly Th1-sejtek túlsúlyával jellemzett állapot irányába történő modulálásán alapul, és nem elsősorban direkt vírusellenes hatáson. A leírás szerinti értelemben, „direkt vírusellenes” hatáson vagy aktivitáson valamely hatóanyag közvetlen hatását vagy aktivitását értjük a vírusok összeépülésére vagy replikációjára. Ezzel szemben, a vírusaktivitás vagy vírusreplikáció - legalább részben - az immunrendszer egy vagy több komponense által közvetített csökkenését nem tekintjük „direkt vírusellenes” hatásnak vagy aktivitásnak. Hasonlóképp nyilvánvaló, hogy a Th2-válasz relatív csökkenése a ta-

lálomány szerinti eljárással végzett kezelés során különösen előnyös lehet fokozott Th2-válasszal járó betegségekben (például HCV-fertőzésben).

A találmány szerinti megoldást a továbbiakban a pontosabb értelmezhetőség céljából konkrét megvalósítási példákon keresztül kívánjuk szemléltetni, anélkül azonban, hogy igényünket az ismertetettetekre korlátoznánk.

1. példa

LevovirinTM szintézise

1,2,3,5-tetra-O-acetil- β -L-ribofuranóz (1) képletű vegyület

L-ribóz (50,0 g, 333,33 mmol/l) vízmentes metanolban készült oldatához (500 ml), szobahőmérsékleten, keverés közben frissen készített vízmentes metanolos HCl-t adtunk (amelyet úgy állítottunk elő, hogy HCl-gázt buborékolattunk át metanolon, 0 °C-on, 4 g tömegnövekedésig) fecskendőn át, argonatmoszférában, 15 perc alatt. A metanolos HCl hozzáadását követően, a reakcióelegyet 3-4 órán át szobahőmérsékleten kevertük. Az elegyhez vízmentes piridint adtunk, és nagyvákuumban 40 °C-on bepároltuk. Ezt az eljárást további piridin (100 ml) hozzáadásával még egyszer ismételtük. A maradékot vízmentes piridinben (250 ml) oldottuk, és jégfürdőben, argonatmoszféra alatt 0 °C-ra hűtöttük. A folyamatosan kevert, lehűtött oldathoz ecetsavanhidridet (100 ml) adtunk csepegtetőtölcséren át, 15 perc alatt. Az ecetsavanhidrid hozzáadását követően, a reakcióelegyet 24 órán át, a nedvesség kizárásával, szobahőmérsékleten kevertük. A reakcióelegyet bepároltuk. A maradékot etil-acetát (400 ml) és víz (400 ml) között megosztottuk, a fázisokat szétválasztottuk, és EtOAc alkalmazásával extraháltuk. A vizes fázist EtOAc (100 ml) alkalmazásával újra extra-

háltuk. Az elegyített EtOAc-extraktumokat a következőkkel mos-
tuk: víz (400 ml), telített NaHCO_3 (2x300 ml), víz (300 ml) és
sós víz (200 ml). A szerves extraktumot vízmentes Na_2SO_4 -en szá-
rítottuk, szűrtük, és a szűrletet bepároltuk. A maradékot víz-
mentes toluollal (2x150 ml) együtt, nagyvákuumban bepároltuk.
A beszárított olajos maradékot (92 g, 95%) alkalmaztuk az
alábbi reakciókban, további jellemzés nélkül.

A fenti reakcióban kapott szirupot (92 g) jégcetben ol-
dottuk, és szobahőmérsékleten ecetsavanhidriddel (75 ml) ke-
zeltük. Az oldatot jégfürdőben, argonatmoszféra alatt 0-5 °C-ra
hűtöttük. Az elegyhez koncentrált H_2SO_4 -et (21 ml) adtunk las-
san, 15 perc alatt. A H_2SO_4 hozzáadását követően a reakció-
elegyet 14 órán át szobahőmérsékleten kevertük, és jégzúzalék-
ra (500 g) öntöttük, addig kevertük, míg a jég el nem olvadt.
Az elegyhez vizet (500 ml) adtunk, és CHCl_3 -mal (2x300 ml) ext-
raháltuk. A kloroformos extraktumot vízzel (3x400 ml,) telí-
tett NaHCO_3 -tal (2x300 ml), vízzel (200 ml) és sós vízzel
(200 ml) mostuk. A mosott szerves extraktumot vízmentes MgSO_4 -
on szárítottuk, szűrtük, szárazra bepároltuk, miáltal olajos
maradékot kaptunk (99 g). A maradékot vízmentes toluollal
(200 ml) együtt, nagyvákuumban bepároltuk, és dietiléterben
(200 ml) oldottuk, amelyben egy nap alatt 10 °C-ra lehűtve
színtelen kristály képződött. A szilárd kristályt szűrtük, he-
xán:éterrel (2:1; 50 ml) mostuk, és beszárítottuk, miáltal
60,5 g terméket kaptunk.

Metil-1-(2,3,5-tri-O-acetil- β -L-ribofuranozil)-1,2,4-triazol-3-karboxilát (3) képletű vegyület és metil-1-(2,3,5-tri-O-acetil- β -L-ribofuranozil)-1,2,4-triazol-5-karboxilát (4) képletű vegyület

Metil-1,2,4-triazol-3-karboxilát (25,4 g; 200 mmol/l), 1,2,3,5-tetra-O-acetil- β -L-ribofuranóz (63,66 g; 200 mmol/l) és bisz(p-nitrofenil)foszfát (1 g) elegyét RB-palackba (500 ml) mértük. A palackot vízlégszivattyú előidézett vákuum mellett 165-175 °C-ra előremelegített olajfürdőbe tettük, 25 percre. A kivált ecetsavat az elszívó és RB-palack közé iktatott jég-hideg kondenzedényben felfogtuk. A palackot eltávolítottuk az olajfürdőből, és lehűtöttük. Amikor a palack hőmérséklete körülbelül 60-70 °C-ot ért el, EtOAc-t (300 ml) és telített NaHCO₃-ot (150 ml) adtunk hozzá, majd EtOAc-dal extraháltuk. A vizes oldatot EtOAc-tal (200 ml) ismét extraháltuk. Az elegyített EtOAc-extraktumokat telített NaHCO₃-tal, vízzel (300 ml) és sósvízzel (200 ml) mostuk. A szerves extraktumot vízmentes Na₂SO₄-on szárítottuk, szűrtük, és a szűrletet szárazra bepároltuk. A maradékot EtOH-ban (100 ml) oldottuk, és MeOH-val (60 ml) hígítottuk, amelyben 12 óra alatt, 0 °C-on szintelen kristályok képződtek. A szilárd kristályt szűrtük, minimális mennyiségű hideg EtOH-nal (20 ml) mostuk, és szilárd NaOH-n, nagyvákuumban szárítottuk, miáltal 60 g (78%) terméket kaptunk. A szűrletet bepárlással szárítottuk, és szilikagél oszlopon tisztítottuk CHCl₃->EtOH (9:1) eluensként történő alkalmazásával. A terméket izoláltuk a szűrletből: 8,5 g gyorsan eluálódó terméket (11%) és 5 g (6,5%) lassan eluálódó terméket kaptunk. A lassan eluálódó termék a (4) képletű terméknek bizonyult, és habként képződött. A (3) képletű termék mennyisége

összesen 65 g volt (84%).

1- β -ribofuranozil-1,2,4-triazol-3-karboamid (5) képletű vegyület

Metil-1-(2,3,5-tri-O-acetil- β -L-ribofuranozil)-1,2,4-triazol-3-karboxilátot (62 g; 161 mmol/l) acél reaktorba mértünk, és frissen készített metanol-ammóniával (350 ml; amelyet úgy készítettünk, hogy vízmentes HCl-gázt vezettünk át vízmentes metanolon 0 °C-on, telítésig) kezeltünk 0 °C-on. Az acél reaktort lezártuk, és 18 óráig szobahőmérsékleten rázattuk. Ezután, az acél reaktort 0 °C-ra lehűtöttük, kinyitottuk, és tartalmát bepárlással szárítottuk. A maradékot vízmentes etanollal (100 ml) kezeltük, és bepárlással szárítottuk. A visszamaradt terméket acetonnal szétdőrsöltük, hogy szilárd terméket kapjunk, amelyet szűrtünk, és acetonnal mostunk. A szilárd terméket egy éjszakán át, szobahőmérsékleten szárítottuk, és forró EtOH (600 ml) és víz (10 ml) elegyében oldottuk. Az EtOH-oldat térfogatát forró lapon történő melegítéssel és keveréssel 150 ml-re csökkentettük. A forró EtOH-oldat hűtése közben színtelen kristályok képződtek, amelyeket szűrtünk, acetonnal mostunk, és vákuumban szárítottunk. A szűrlet további koncentrációja további terméket eredményezett. Az összes termék 35 g volt (89%).

2. példa

LevovirinTM- és Ribavirin-kezelés által előidézett citokinmintázatok meghatározása

Perifériás vér eredetű mononukleáris sejteket izoláltunk egészséges donorokból sűrűséggradiens-centrifugálással, majd T-sejtdúsítással, Lymphokwik (One Lambda), Canoga Park, CA) alkalmazásával. A kontamináló monocitákat műanyaghoz történő

kitapadással távolítottuk el. Tisztított T-sejtek több mint 99%-ban $CD2^+$, kevesebb mint 1%-ban $HLA-DR^+$ és kevesebb mint 5%-ban $CD25^+$ sejteknek bizonyultak, amelyeket RPMI-AP5 (5% autológ plazmát, 1% glutamint, 1% penicillin/streptomycin antibiotikumot és 0,05% 2-merkaptóetanolt tartalmazó RPMI-1640) tápközegben tartottuk fenn. A citokin proteinszintek meghatározására a T-sejteket ($0,2 \times 10^6$ sejt 0,2 ml térfogatban) aktiváltunk 80 ng Staphylococcus enterotoxin-B (SEB, Sigma, St. Louis, MI) hozzáadásával, és 96 lyukú lemezekben inkubáltunk 48 órán át, 37 °C-on, 0-10 $\mu\text{mol/l}$ Levovirin[™] vagy Ribavirin jelenlétében. Az aktiválást követően, a felülúszókat sejteredetű citokintermelésre analizáltuk. A citokinmeghatározást IL-2-re, IFN γ -ra és TNF α -ra specifikus ELISA-eljárással végeztük (Biosource, Camarillo, CA). Valamennyi ELISA-eredményt pg/ml egységekben fejeztük ki, az aktivált kontrollhoz viszonyított százalékos arányokként adtuk meg, és úgy számítottuk ki, hogy az aktivált T-sejtek citokinszintjét viszonyítottuk Levovirin[™] vagy Ribavirin jelenlétében kezeletlen, aktivált T-sejtek citokinszintjéhez, amelyet 100%-nak tekintettünk. A citokinszintre kifejtett zéró hatás tehát az aktivált kontroll értékének, 100%-nak felel meg. A 3.A-C ábrákon a Ribavirinnel és Levovirinnel[™] és különböző Th1-citokinekkal kezelt T-sejtek dózis-válasz görbéjének hasonlósága figyelhető meg. Az 1. táblázatban Ribavirin és Levovirin[™] hatását foglaltuk össze SEB által stimulált T-sejtek Th1-citokineket - IL-2-t, IFN γ -t és TNF α -t - expresszáló képességére. Eredményeink egyértelműen azt mutatják, hogy a Levovirin[™] igen alkalmas olyan betegségek kezelésére, amelyek kialakulásában 1-es típusú citokinek kritikus szerepet játszanak.

1. táblázat

Ribavirin és Levovirin™ hatása SEB által stimulált T-sejtek
Th1-citokineket - IL-2, IFN γ és TNF α - expresszáló képességére

Kezelés	IL-2	IFN- γ	TNF- α
SEB	100	100	100
SEB+Ribavirin	143+/-18	131+/-6	124+/-4
SEB+Levovirin™	131+/-12	122+/-3	144+/-7

Valamennyi adatot az aktivált kontrollhoz viszonyított százalékos arányok átlagaként adtuk meg (+/-standard hiba; SD) az egyes citokinekre vonatkoztatva. A SEB által indukált 1-es típusú citokinszekréció abszolút értéke [pg/ml+/-SD] az IL-2 esetében 640+/-36, IFN γ esetében 462+/-37, TNF α esetében 223+/-27 volt. A nyugalmi érték valamennyi citokin esetében kisebb volt mint 30 pg/ml.

3. példa

Vizsgálatok a direkt vírusellenes aktivitás és citotoxicitás meghatározására

Huffman J.H. és munkatársai, valamint Barnard D.L. és munkatársai eljárásával *in vitro* vizsgáltuk a Levovirin™ és Ribavirin direkt vírusellenes aktivitását influenza A, B, parainfluenza 1 és 2, valamint légúti szincíciumképző vírus (RSV) ellen [Huffman J.H. és mtsai.: *Antiviral Chem. and Chemother.*, **8**, 75 (1997); valamint Barnard D.L. és mtsai.: *Antiviral Chem. and Chemother.*, **8**, 223 (1997)]. A humán immundeficiencia vírus ellenes aktivitást a National Cancer Institute intézetében vizsgálták egy olyan eljárással, amely a vírusreprodukció bármely szakaszában képes kimutatni a fertőző

ágenst [Weislow O.W. és mtsai: *J. Natl. Cancer Inst.*, **81**, 577 (1989)]. A hepatitis-B (HBV) elleni aktivitást Marion és munkatársai eljárásával követtük [Marion és mtsai.: *Hepatology*, **7**, 724 (1987)]. A Ribavirin HIV ellenes aktivitását és citotoxicitását korábbi adatok alapján ismerjük [McCormick J.B.: *Lancet* II, 1367 (1998)].

2. táblázat

Direkt vírusellenes aktivitás és citotoxicitás meghatározása

Vegyület	Aktivitás	HBV	HIV	INFL.A	INFL.B	PARA 1	PARA 3	RSV
Levovirin TM	Direkt vírusellenes hatás	>100	>600	>200	>200	>1000	>1000	>1000
	Citotoxikus hatás	>100	>600	>200	>200	>1000	>1000	>1000
Ribavirin	Direkt vírusellenes hatás	>100	40	6,1	1,9	4	4	5
	Citotoxikus hatás	53	>40	56	>100	480	480	100

Az alábbi vírusokat teszteltük: hepatitis B (HBV); humán immundeficiencia vírus (HIV), influenza (INFL) A és B; para-influenza (PARA) 1 és 3; valamint légúti szincíciumképző vírus (RSV). A vírusellenes aktivitást (EC₅₀) vagy citotoxicitást (CC₅₀) $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban adtuk meg.

4. példa

LevovirinTM gyulladásgátló aktivitása Conavalin-A által indukált hepatitisben

BALB/c-egereket (csoportonként 6 egeret) injektáltunk intraperitoneálisan egyetlen 20 μg -os (1 mg/kg) Ribavirin vagy LevovirinTM dózissal, vagy 200 μl PBS-sel, majd egy óra múlva intravénásan, 0,3 mg Concalin-A-val (Con A, Calbiochem, San

Diego, CA). Huszonnégy (24) óra múlva, az egereket Penthrane alkalmazásával elaltattuk, és szívpunkcióval elvéreztettük, hogy teljes vért kapjunk. Az alvadt vérből szérumot nyertünk, és abból szérum aminosztransferáz (ALT) meghatározást végeztünk. A szérum ALT-szinteket enzimaktivitási vizsgálattal határoztuk meg (Sigma), a szubsztrátok, az alanin és α -ketoglutársav katalízise során képződött termékek (piroszőlősav és glutaminsav) kolorimetriás mérésével. A 4. ábrán azt ábrázoltuk, hogy miként függ a szérum-ALT mennyisége a Ribavirin vagy Levovirin[™] kezeléstől, vagy PBS-kezeléstől. Mind a Ribavirin, mind a Levovirin[™] képesnek bizonyult ConA által indukált szérum-ALT-szintek jelentős mértékű csökkentésére: körülbelül 1900 egység/ml szintről Ribavirin esetében 969 egység/ml $\pm$ 192 szintre, Levovirin[™] esetében 954 egység/ml $\pm$ 179 szintre.

A leírásban tehát vegyületeket és eljárásokat ismertettünk vírusfertőzések kezelésére Levovirin[™] alkalmazásával. Szakember számára nyilvánvaló azonban, hogy a találmány szerinti megoldásnak a leírásban ismertetetteken felül számos módosítása lehetséges, anélkül, hogy a találmányi gondolattól eltérnénk. A találmány tehát nem korlátozódik az ismertetettekre, hacsak igényünkben kifejezetten másképp nem kötjük ki. Ezenfelül, a leírás és az igénypontok vonatkozásában, valamennyi kifejezést a szövegösszefüggéssel összhangban, a lehető legtágabb értelemben használjuk. Különösen, a "tartalmaz" és "tartalmazni" kifejezéseket elemek, komponensek és lépések vonatkozásában nem kizáró értelemben használjuk, utalva arra, hogy az elemek, komponensek vagy lépések jelen lehetnek, illetve azokat alkalmazhatjuk más elemekkel, komponensekkel vagy lépésekkel együtt, amelyekre a leírásban kifejezetten nem utaltunk.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás vírusfertőzés kezelésére betegben, amelynek során (1) képletű vegyületet adagolunk.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, amelynek során HIV-fertőzést, HCV-fertőzést vagy HBV-fertőzést kezelünk.
3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, amelynek során a kezeléssel növeljük a Th1-választ a Th2-válaszhoz képest a betegben.
4. A 3. igénypont szerinti eljárás, amelynek során a vegyület beadásával a Th1-választ fokozzuk.
5. A 4. igénypont szerinti eljárás, amelynek során a Th1-válasz fokozásával az IL-2-szint átlagos csúcsértékét legalább 70 tömeg%-kal növeljük az aktivált kontrollokban mérhető szinthez képest.
6. A 4. igénypont szerinti eljárás, amelynek során a Th1-válasz fokozásával az IFN- γ -szint átlagos csúcsértékét legalább 20 tömeg%-kal növeljük az aktivált kontrollokban mérhető szinthez képest.
7. A 4. igénypont szerinti eljárás, amelynek során a Th1-válasz fokozásával a TNF- α -szint átlagos csúcsértékét legalább 50 tömeg%-kal növeljük az aktivált kontrollokban mérhető szinthez képest.
8. A 4. igénypont szerinti eljárás, amelynek során a Th1-válasz fokozásával az IL-2-szint átlagos csúcsértékét legalább 42 tömeg%-kal, az IFN- γ -szint szint átlagos csúcsértékét legalább 125 tömeg%-kal, a TNF- α -szint szint átlagos csúcsértékét pedig legalább 72 tömeg%-kal növeljük az aktivált kontrollokban mérhető szinthez képest.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, amelynek során a beadást *in vivo* végezzük.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, amelynek során a beadást szájon át végezzük.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás, amelynek során a beadást injektálással végezzük.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás, amelynek során a vegyületet 0,1-1,0 mg/testtömeg-kg dózisban adjuk be a betegnek.

13. Immunválaszt szabályozó szer, amely egy (1) képletű vegyület.

A meghatalmazott:

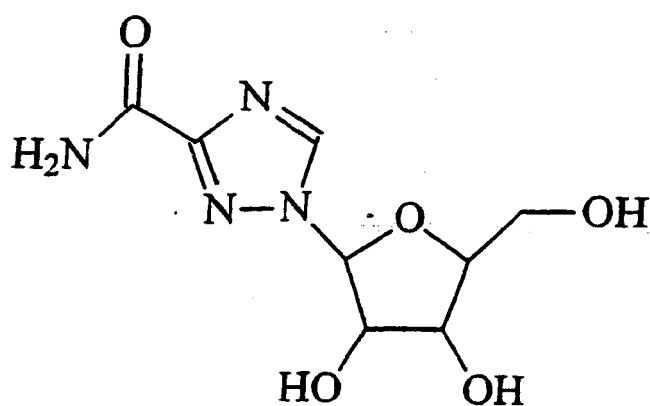
DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
Gárdonyi Zoltánné
szabadalmi ügyvivő



A dddal napjzad

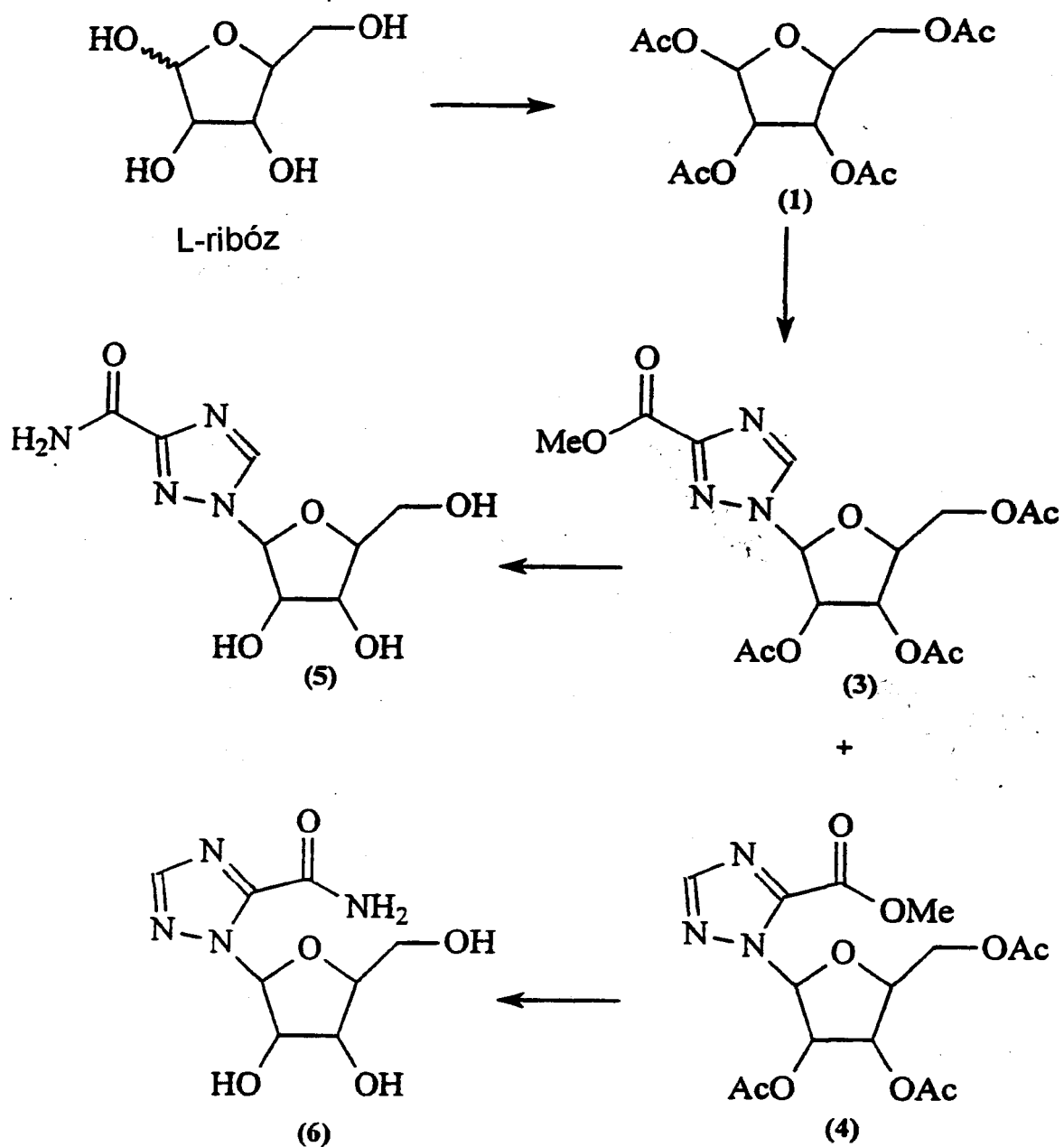
2004. 04. 30. PK

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



1. ÁBRA

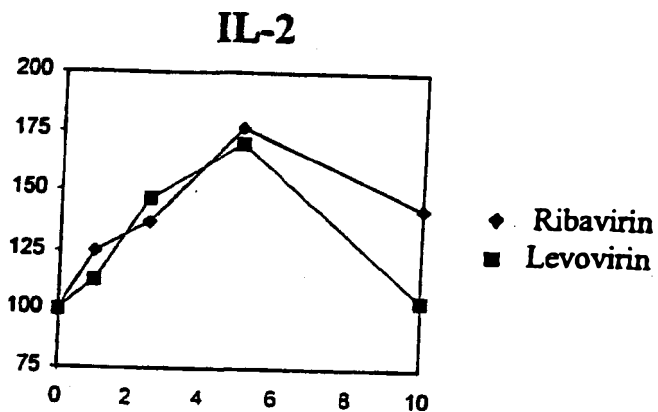
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



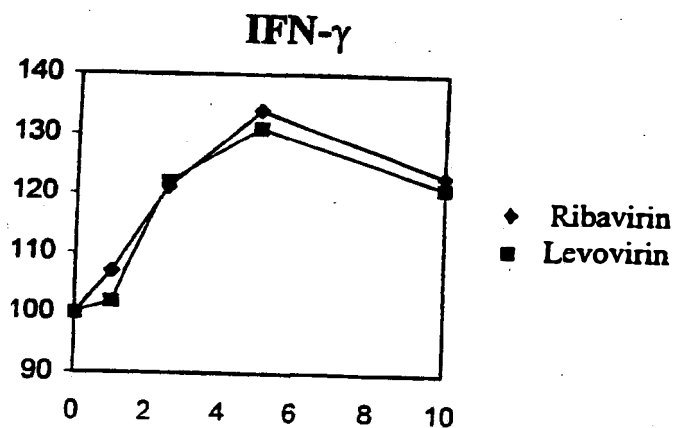
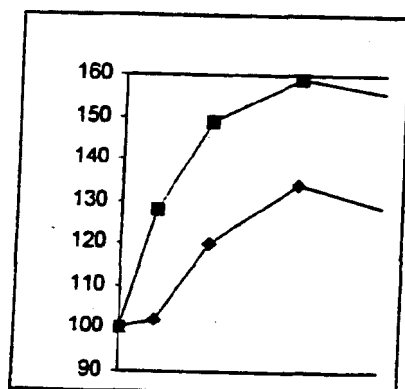
2. ÁBRA

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

3.A ÁBRA



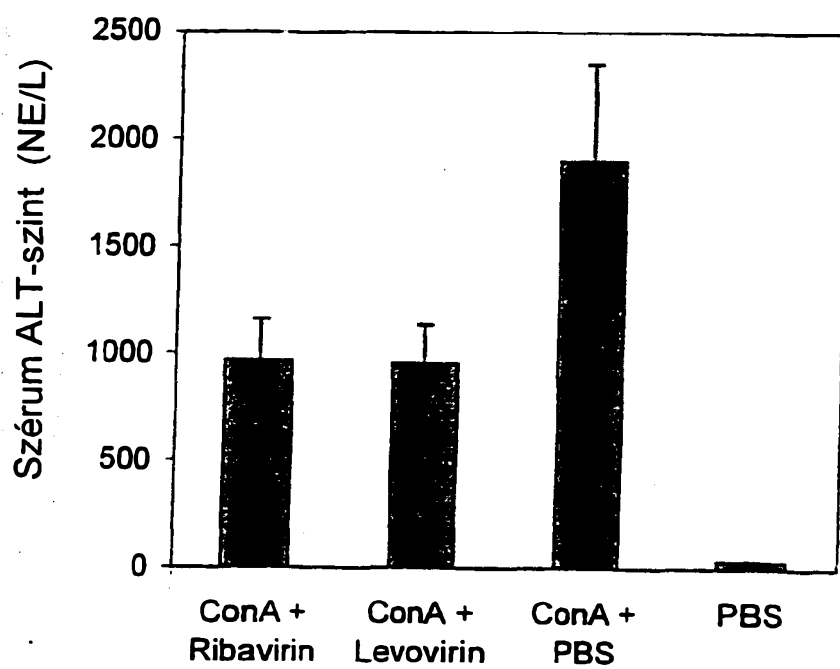
3.B ÁBRA


TNF- α


3.C ÁBRA

◆ Ribavirin
■ Levovirin

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



4. ÁBRA