

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2002 -968

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **15.12.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **23.12.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/471513**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.10.2003**
(Věstník č. 10/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/US00/34610**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/046212**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 31/7056

A 61 P 31/12

A 61 P 31/18

(71) Přihlašovatel:

RIBAPHARM INC., Costa Mesa, CA, US;

(72) Původce:

Tam Robert, Costa Mesa, CA, US;

(74) Zástupce:

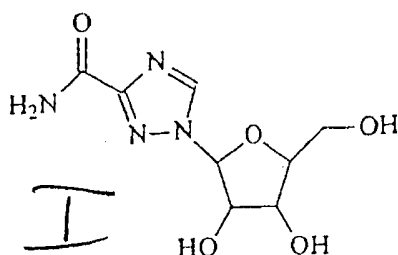
**PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273, Praha 4,
14000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

Modulátor imunitní odpovědi

(57) Anotace:

Použití I (β -L-ribofuranosyl)-1,2,4-triazol-3-karboxamidu
vzorce I pro přípravu léčiva pro modulaci exprese lymfokinů
v buňce, které je vhodné pro léčbu virových infekcí, které
zahrnují HIB infekcí, HCV infekcí nebo HBV infekcí.



Modulátor imunitní odpovědi

Oblast techniky

Předložený vynález se týká použití sločeniny pro výrobu léčiva pro modulaci exprese lymfokinů v buňce, které je vhodné pro léčbu virových infekcí.

Dosavadní stav techniky

Mnoho virových infekcí je spojeno s posunem v cytokinovém profilu od Th1 buněčné odpovědi směrem k Th2 buněčné odpovědi a nedávné výzkumy naznačují, že ovlivnění rovnováhy mezi Th1 odpovědí a Th2 odpovědí by mohlo být výhodné z hlediska navození a/nebo udržení imunity proti virové infekci. Zvýšená Th1 odpověď se zdá být zvláště významná u infekce HIV, kde dlouho přežívající pacienti vykazují dominující Th1 odpověď, zatímco v případě progresu onemocnění dominuje Th2 odpověď. Například, Barker a kol., předpokládá, že progresu onemocnění v případě HIV vyplývá z posunu produkce cytokinů u infikovaného hostitele od Th1 směrem k obrazu Th2 (Barker E, Mackewicz CE, Levy JA *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 Nov 21; 92(24): 11135-9). Podobně, snížení Th2 odpovědi se zdá mít terapeutický význam, s ohledem na to Reiser a kol. popisuje, že Th2 cytokinové hodnoty jsou zvýšené u chronické virové hepatitidy C (Reiser, M. et al.; *J. Hepatol* 1997 Mar; 26(3):471-8). Jsou známy různé způsoby ovlivňování Th1/Th2 rovnováhy a mohou být přibližně členěny na metody spojené s použitím cytokinů a na metody, které se s použitím cytokinů nepojí.

V případě způsobů léčby spojených s použitím cytokinů, jsou cytokiny podány s cílem ovlivnit rovnováhu směrem k Th1 nebo naopak k Th2 typu odpovědi. Například, Knight et al. stanovil, že léčba za užití IL-12 (interleukin-12), cytokinu podporujícího vývoj Th1 buněk, může být využita jako léčba u AIDS, na základě toho, že podání IL-12 se ukázalo jako efektivní v obnově buňkami zprostředkované imunity u myší infikovaných myší formou viru AIDS nebo Rauscherovým

leukemickým virem (RLV) (Knight, S.C. and Patterson, S., *Annu. Rev. Immunol.* 1994, 15: 593-615): V jiném příkladě, Gracie, J.A. a kol. popisuje, že podání IL-18 myši vykazuje různorodé účinky kritické pro vývoj Th1 odpovědi (Gracie a kol. *J. Clin. Invest.* 1999 Nov 15; 104(10):1393-1401). Ačkoliv podání cytokinů typicky vede k relativně specifickému zvýšení požadovaných Th1 cytokinů, dlouhodobé podávání cytokinů může být z mnoha důvodů

problematické. Například výroba rekombinantních cytokinů je poměrně drahá a izolace non-rekombinantních cytokinů z přirozeného zdroje je obecně obtížná, vzhledem k velmi nízké koncentraci cytokinů v přirozeném zdroji. Dalším problémem je požadavek na vysoký stupeň čistoty cytokinových preparátů s cílem zabránit alergické reakci po opakovaném podání. Navíc, v závislosti na původu cytokinu, nemusí pacient cytokiny dobře tolerovat.

U způsobu léčby, který není spojen s použitím cytokinů, jsou k ovlivňování rovnováhy mezi Th1 a Th2 odpovědí využívány jiné imunomodulační látky než cytokiny. Například, Sprietsma J.E. předpokládá (Sprietsma J.E.; *Med Hypotheses* 1999 Jul;53(1):6-16), že zinkové ionty (Zn^{++}) a oxid dusnatý (NO), spolu s glutathionem (GSH) a jeho oxidovanou formou, GSSG, mohou pomoci regulovat imunitní odpověď na antigen. Autor ve větších detailech popisuje, že deplece Zn^{++} , NO a/nebo GSH posouvá Th1/Th2 rovnováhu směrem k Th2 a že doplnění Zn^{++} , NO a/nebo GSH může posunout Th1/Th2 rovnováhu směrem k Th1. Podávání Zn^{++} nebo GSH/GSSG je zvláště výhodné, vzhledem k tomu, že tyto látky nejsou toxické ani ve zvýšené koncentraci a jejich výroba není drahá. Navíc, Zn^{++} a GSH/GSSG mohou být podávány perorálně, čímž významně snižují riziko alergických reakcí, zvláště v případech, kdy preparáty nejsou extrémně čisté. Zdá se však, že podávání Zn^{++} a/nebo GSH/GSSG je prospěšné pouze k obnovení Th1/Th2 rovnováhy ze stavu Th2 dominance, zatímco není jasné, zda může podání Zn^{++} a/nebo GSH/GSSG zvýšit Th1 odpověď ze stavu normální Th1/Th2 rovnováhy.

V jiném příkladě, patentové přihlášce US 09/156 646, zmíněné zde formou odkazu, je popisován postup, ve kterém vynálezce využívá nukleosidový analog Ribavirin (1-(5-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-1,2,4-triazol-3-karboxamid) k ovlivnění rovnováhy Th1/Th2 odpovědí. Použití Ribavirinu je zvláště výhodné u léčby virových infekcí, protože Ribavirin nejenom posouvá imunitní odpověď směrem k Th1 odpovědi, ale působí také jako činidlo inhibující replikaci viru. Ribavirin byl, například, úspěšně použit v léčbě Hepatitis C. Část tohoto efektu byla připisována antivirovým účinkům a část cytokinové bilanci.

Ačkoliv Ribavirin vykazoval požadovaný vliv na množství viru a stav imunity, dlouhodobé podávání Ribavirinu v poměrně vysokých dávkách bylo často spojeno s množstvím nežádoucích účinků, zahrnujících leukopenii a hemolytickou anémii. S cílem redukovat četné nežádoucí účinky, bylo zavedeno společné podávání Ribavirinu s $IFN\alpha$ -2B (Reichert, O., et al. 1998; *Lancet* 351:83-87). Společné podávání Ribavirinu s $IFN\alpha$ -2B však výrazně prodražilo léčbu. Navíc, dlouhodobé podávání $IFN\alpha$ -2B zvýšilo riziko vzniku nových vedlejších účinků spojených s $IFN\alpha$ -2B.

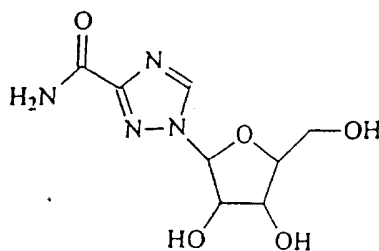
Navzdory poměrně úspěšnému podávání Ribavirinu při léčbě virových onemocnění, zůstává použití Ribavirinu problematické vzhledem ke vzniku různých vedlejších účinků. Proto zde

vzniká potřeba poskytnout lepší způsoby a prostředky ovlivňující Th1/Th2 rovnováhu s relativně nízkými nebo žádnými toxickými vedlejšími účinky vzniklými při léčbě virových infekcí.

Podstata vynálezu

Předložený vynález se zaměřuje na použití látky LevovirinTM (1-(β -L-ribofuranosyl)-1,2,4-triazol-3-karboxamid) pro přípravu léčiva pro léčení virové infekce, kde virovou infekcí je HIV, HCV nebo HBV infekce.

Je popsáno použití sloučeniny se strukturou I pro výrobu léčiva pro modulaci exprese lymfokinů v buňce, ve kterém se buňce dodává sloučenina v koncentraci účinné pro modulaci exprese lymfokinů, přičemž strukturou I je



kde modulace je účinná pro ošetření podmínky, která je spojená s expresí cytokinu Th1.

Jedním z hledisek zkoumané problematiky je, že LevovirinTM zvyšuje u pacientů Th1 odpověď v poměru k Th2 odpovědi a že, což se zejména předpokládá, Th1 odpověď roste absolutně. Dalším hlediskem předmětu vynálezu je podávání LevovirinuTM *in vivo*, přednostně intravenózní injekcí nebo perorálně, přičemž doporučená dávka LevovirinuTM je mezi 0,1 mg/kg a 1,0 mg/kg.

V použití podle předloženého vynálezu je Th1 odpověď vybrána ze skupiny sestávající z průměrného píkoveho nárůstu hodnoty IL-2 vzhledem k hodnotě aktivované kontroly nejméně o 70 % hmotn., průměrného píkoveho nárůstu hodnoty IFN- γ vzhledem k hodnotě aktivované kontroly nejméně o 20 % hmotn., průměrného píkoveho nárůstu hodnoty TNF- α vzhledem k hodnotě aktivované kontroly nejméně o 50 % hmotn., a průměrného

píkového nárůstu hodnoty vzhledem k hodnotě aktivované kontroly IL-2, IFN- γ a TNF- α 42 % hmotn., 125 % hmotn. a případně 72 % hmotn.

Ve výhodném provedení vynálezu nárůst v Th1 odpovědi zahrnuje průměrný píkový nárůst vzhledem k hodnotě aktivované kontroly IL-2 alespoň 70 % hmotn.

V dalším výhodném provedení nárůst v Th1 odpovědi zahrnuje průměrný píkový nárůst vzhledem k hodnotě aktivované kontroly IL-2 alespoň 20 % hmotn.

V dalším výhodném provedení nárůst v Th1 odpovědi zahrnuje průměrný píkový nárůst vzhledem k hodnotě aktivované kontroly TNF- α alespoň 50 % hmotn.

V dalším výhodném provedení nárůst v Th1 odpovědi zahrnuje průměrný píkový nárůst vzhledem k hodnotě aktivované kontroly IL-2, IFN- γ a TNF- α 42 % hmotn., 125 % hmotn. a případně 72 % hmotn.

Různé záměry, znaky, ohledy a výhody předloženého vynálezu se stanou více zřejmé z následujícího podrobného popisu výhodných provedení vynálezu spolu s předloženými výkresy, ve kterých jsou jednotlivé složky reprezentovány číslicemi.

Výraz "virová infekce" se vztahuje k jakémukoliv stadiu virové infekce, včetně inkubační doby, latentního nebo dormantního stadia, akutního stadia a vzniku a přetrvání imunity proti viru, jak bude použit i dále. V této souvislosti, má výraz "ošetření" zahrnovat aspekty vzniku nebo navození imunity imunitního systému pacienta, stejně jako potlačení nebo inhibici virové replikace.

Jak bude chápáno i dále, lymfokiny jsou podskupinou cytokinů, kterou produkují pomocné T lymfocyty, a obecně se soudí, že spadají do dvou podtříd, Th1 a Th2. Th1 buňky (nověji známé jako buňky typu 1) produkují interleukin 2 (IL-2), tumor-nekrotizující faktor (TNF- α) a interferon γ (IFN- γ) a jsou primárně odpovědné za buňkami zprostředkovanou imunitu, jako je hypersenzitivita oddáleného typu nebo protivirová imunita. Ve srovnání s tím, Th2 buňky jako hypersenzitivita

12.00.00

(nověji nazývané buňky typu 2) produkují interleukiny IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 a IL-13 a primárně se angažují v podpoře humorální odpovědi, kterou vidíme při reakci na alergen, např. IgE a IgG4 izotypový přesmyk (Mosmann, 1989, *Annu Rev Immunol*, 7:145-173).

Termíny Th1 a Th2 "odpověď" mají zahrnovat celý rozsah účinků vyplývajících z aktivace Th1 a Th2, respektive, jak bude užito i dále. Mimo jiné, tyto odpovědi zahrnují zvýšenou produkci odpovídajících cytokinů, zvýšenou proliferaci odpovídajících lymfocytů a další následky spojené

se zvýšenou produkcí cytokinů, včetně migračního efektu. Th1 odpověď je obecně charakterizována zvýšením IL-2, TNF- α a IFN- γ , zatímco Th2 odpověď je typicky charakterizována zvýšením IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10.

V doporučené dávce obdrží pacienti infikovaní HIV s počtem CD4⁺ lymfocytů okolo 500 buněk na mikrolitr jednou denně, po dobu třiceti dní, jednu injekci vodného roztoku LevovirinuTM v celkové dávce 0,5 mg/kg tělesné hmotnosti.

Z dalšího možného hlediska zkoumané problematiky, HIV infekce nemusí být limitována na počet CD4⁺ lymfocytů okolo 500 buněk na mikrolitr, ale může zahrnovat i nižší počet CD4⁺ lymfocytů, včetně hodnot mezi 500 a 300, 300 až 150 a méně než 150 CD4⁺ lymfocytů. Podobně se zvažují i vyšší hodnoty CD4⁺ lymfocytů (např. >500). Mělo by se dále připomenout, že přijatelné mohou být různé další klinické markery, jiné než titr protilátek a hodnota CD4⁺ lymfocytů, včetně přímých a nepřímých metod určení přítomnosti HIV. Přímé metody jsou, například, kvantitativní kultivace PBMCs a plasmatického HIV, kvalitativní a kvantitativní metody PCR a atp. Nepřímé metody zahrnují kvalitativní a kvantitativní ELISA metody, atd.

S ohledem na typ virové infekce se předpokládá, že léčba virové infekce není omezena na specifický typ nebo subtyp HIV viru a je vhodné si uvědomit, že jsou zvažovány také jiné viry než HIV. Obecně se předpokládá, že jiné virové infekce zahrnují ty infekce, které mohou být léčeny Ribavirinem, D-izomerem LevovirinuTM. Jiné, zvláště zamýšlené virové infekce, zahrnují HCV a HBV infekci.

Mezi další pohledy nově popsané problematiky patří, že aplikace LevovirinuTM nemusí být omezena na jednodenní injekce podávané po dobu třiceti dní, ale může zahrnovat jiné frekvence i formy aplikace. V případě potřeby podání poměrně vysokého množství LevovirinuTM se uvažuje o dvou až čtyřech nebo i více injekcích za den. Podobně v případě, kde jsou požadovány vysoké plasmatické koncentrace LevovirinuTM po delší období, se zvažuje permanentní aplikace. Stálý přísun může, například, zahrnovat použití kontinuální infuze, osmotické pumpy nebo implantátu s usnadněným uvolňováním. Mělo by se zdůraznit, že forma podání není omezena na formu injekční, ale vhodné podání může zahrnovat aplikaci perorální, transdermální, intranazální, inhalační, atd. V souvislosti s tím, přípravky možných preparátů LevovirinuTM mohou zahrnovat tablety, sirupy, gely, aerosole, atd. Dále se také zvažuje možnost podání LevovirinuTM in vitro. Určené množství celé krve nebo krevních derivátů tak může být, například, preinkubováno s LevovirinemTM in vitro, s cílem buď podpořit nebo navodit imunitní reakci směřující k imunitní obraně.

S ohledem na dávkování LevovirinuTM se zvažuje, že jsou přípustné i různé možnosti dávkování zahrnující dávky mezi 0,5 mg/kg a 0,1 mg/kg a méně, ale také dávky mezi 0,5 a 1,0

mg/kg a více. Obecně bude vhodné dávkování záviset na mnoha faktorech, včetně typu virové infekce, stádiu virové infekce, požadované plazmatické koncentraci LevovirinuTM, trvání léčby, atd. Zatímco u některých virových infekcí může být, například, dosaženo úspěšné léčby při poměrně malých plazmatických koncentracích LevovirinuTM, jiné virové infekce mohou vyžadovat dávky poměrně vysoké.

Mezi další pohledy nově popsané problematiky ještě patří možnost kombinace LevovirinuTM s jinými farmaceuticky aktivními látkami podporujícími léčbu virové infekce. Přidatné farmaceuticky aktivní látky, které jsou zvažovány, zahrnují antivirová činidla a imunomodulátory. Příkladem antivirových činidel jsou inhibitory proteázy, nukleotidy nebo nukleosidové analogy a imunomodulátory mohou zahrnovat cytokiny.

Ačkoliv není žádoucí omezit se na nějakou konkrétní teorii, předpokládá se, že podání LevovirinuTM koreluje u pacientů se zvýšením odpovědi Th1 relativně k odpovědi Th2 a zvláště se předpokládá, že poměrné zvýšení Th1 odpovědi vzhledem k Th2 odpovědi se děje na základě absolutního nárůstu Th1 odpovědi. Hladiny cytokinů mohou tak být zvýšeny jednotlivě nebo společně. Předpokládá se například, že ošetření aktivovaných lidských PBMCs LevovirinemTM může vést k průměrnému píkóvému nárůstu hodnoty IL-2 nejméně o 70 hmotn. % vyššímu, než je hodnota aktivované kontroly. Případně se předpokládá, že přidání LevovirinuTM k aktivovaným PBMCs může vést k průměrnému píkóvému nárůstu hodnoty IFN- γ nejméně o 20 hmotn. % vyššímu, než je hodnota aktivované kontroly nebo k průměrnému píkóvému nárůstu hodnoty TNF- α nejméně o 50 hmotn. % vyššímu, než je hodnota aktivované kontroly (viz také obr. 3A-C). V jiném příkladě se předpokládá, že zvýšení Th1 odpovědi může zahrnovat průměrný píkóvý nárůst oproti hodnotám aktivované kontroly u IL-2, IFN- γ a TNF- α o 42 hmotn. %, 125 hmotn. % a 72 hmotn. %, respektive.

Mělo by se zvláště zdůraznit, že zatímco spektrum léčitelných virových infekcí se mezi Ribavirinem a LevovirinemTM poněkud překrývá, LevovirinTM má podstatně sníženou toxicitu. Například, zatímco perorální podání Ribavirinu krysám v dávce 180 mg/kg po dobu čtyř týdnů vedlo k vážné hemolytické anémii a leukopenii, LevovirinTM nezpůsobil žádnou klinicky pozorovatelnou patologii. Dále se zvláště posuzuje, že léčba virových onemocnění LevovirinemTM je přednostně založena na ovlivnění Th1/Th2 rovnováhy ve prospěch převažující Th1 odpovědi a nezakládá se hlavně na přímém antivirovém účinku. Výraz „přímý antivirový“ účinek nebo aktivita, jak je užito i dále, se vztahuje k bezprostřednímu účinku nebo aktivitě na přežití viru nebo replikaci. Naproti tomu, potlačení virové aktivity nebo replikace aspoň částečně zprostředkované jednou nebo více složkami imunitního systému, není považováno za „přímý protivirový“ účinek nebo aktivitu. Podobně je dobré zdůraznit, že relativní redukce Th2

odpovědi během léčby odpovídající zkoumané problematice, by mohla být zvláště výhodná u chorob spojených se zvýšenou odpovědí Th2 (např. HCV infekce).

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 ukazuje strukturu Levovirinu™.

Obr. 2 ukazuje schéma syntézy Levovirinu™.

Obr. 3A-C ukazují grafy zobrazující různé biologické účinky Levovirinu™ a Ribavirinu na jednotlivé součásti Th1 odpovědi.

Obr. 4 ukazuje graf zobrazující sérové hodnoty ALT u myši injikovaných Con A v závislosti na léčbě Levovirinem™ a Ribavirinem.

Příklady provedení vynálezu

Následující příklady ilustrují ukázkovou syntézu a různé aplikace Levovirinu™.

Příklad 1: Syntéza Levovirinu™

1,2,3,5-tetra-O-acetyl- β -L-ribofuranóza (1): Do roztoku L-ribózy (50,0 g, 333,33 mmol) v neředěném methanolu (500 ml) rozmíchaného při pokojové teplotě byla přidána čerstvě připravená suchá methanolovaná HCl (40 ml, připravená probubláváním suchého plynu HCl methanolem při 0 °C do hmotnostního přírůstku 4g) pomocí stříkačky, během 15 minut, v prostředí argonové atmosféry. Po přidání methanolované HCl byla reakční směs ponechána při pokojové teplotě ve třepačce, po dobu 3 až 4 hodin. Byl přidán suchý pyridin (100 ml) a odpařen do vysušení při vysoké hodnotě vakua s teplotou pod 40 °C. Tento postup byl opakován podruhé s přidáním suchým pyridinem (100 ml). Zůstatek byl rozpuštěn v suchém pyridinu (250 ml) a ochlazen v ledové lázni na 0 °C v prostředí argonové atmosféry. K tomuto vychlazenému, protřepanému roztoku byl přidán acetanhydrid (100 ml) po kapkách pomocí nálevky během 15 minut. Po přidání acetanhydridu byla reakce ponechána ve třepačce při pokojové teplotě za vyloučení přístupu vlhkosti po dobu 24 hodin. Reakční směs byla odpařena až do vysušení. Zbytek byl rozdělen mezi ethylacetát (400 ml) a vodu (400 ml) a extrahován v EtOAc. Vodná vrstva byla opět oddělena pomocí EtOAc (100 ml). Celkový EtOAc extrakt byl promýván vodou (400 ml), nasyceným NaHCO₃ (2×300 ml), vodou (300 ml) a fyziologickým roztokem (200 ml). Organický extrakt byl vysoušen pomocí anhydrogenního Na₂SO₄, přefiltrován a filtrát odpařen do sucha. Zbytek byl odpařován v přítomnosti suchého toluenu (2×150 ml) při vysoké hodnotě

vakua. Vysušený olejnatý zbytek (92g, 95%) byl jako takový, bez další charakterizace, použit pro následující reakci.

Sirup (92 g) z výše popsané reakce byl rozpuštěn ve vychlazené kyselině octové (300 ml) a smíchán s acetanhydridem (75 ml) při pokojové teplotě. Roztok byl ochlazen v ledové lázni na 0 až 5 °C v prostředí argonové atmosféry. Byla pomalu přidána během časové periody 15 minut koncentrovaná H_2SO_4 (21 ml). Po přidání H_2SO_4 byla reakční směs 14 hodin protřepávána při pokojové teplotě a nalita na ledovou tříšť (500 g) a míchána dokud led neroztál. Byla přidána voda (500 ml) a extrahována pomocí CHCl_3 ($2 \times 300\text{ml}$). Chloroformový extrakt byl promýván vodou ($3 \times 400\text{ ml}$), nasyceným NaHCO_3 ($2 \times 300\text{ ml}$), vodou (200 ml) a fyziologickým roztokem (200 ml). Promytý organický extrakt byl vysoušen pomocí anhydrogenního MgSO_4 , přefiltrován a odpařen do sucha za vzniku olejnatého zbytku (99 g). Zbytek byl odpařován v přítomnosti suchého toluenu (200 ml) a rozpuštěn v ethyletheru (200 ml), který následně po chlazení na 10 °C po jeden den vytvořil bezbarvé krystaly. Krystaly byly filtrovány, promývány směsí hexan:etheru (2:1, 50 ml) a vysušeny za vzniku 60,5 g produktu.

Methyl-1-(2,3,5-tri-O-acetyl- β -L-ribofuranosyl)-1,2,4-triazol-3-karboxylát (3) a methyl-1-(2,3,5-tri-O-acetyl- β -L-ribofuranosyl)-1,2,4-triazol-5-karboxylát (4): Směs methyl-1-2,4-triazol-3-karboxylátu (25,4 g, 200 mmol), 1,2,3,5-tetra-O-acetyl- β -L-ribofuranózy (63,66 g, 200mmol) a bis(p-nitrofenyl)fosfátu (1g) byla umístěna do RB-láhve (500 ml). Láhev byla na dobu 25 minut vložena do olejové lázně předehřáté na 165 až 175 °C do podmínek vakua vytvořeného vodní vývěvou a byla protřepávána. Vytěsněná kyselina octová byla zachytávána ve vychlazeném lapači umístěném mezi aspirátor vývěvy a RB-láhev. Láhev byla vyjmuta z olejové lázně a chlazená. Když teplota láhve dosáhla přibližně 60 až 70 °C, byly smíšeny EtOAc (300 ml) a nasycený NaHCO_3 (150 ml) a extrahovány v EtOAc. Vodná vrstva byla extrahována opět pomocí EtOAc (200 ml). Společný EtOAc extrakt byl promyt nasyceným NaHCO_3 (300 ml), vodou (300 ml) a fyziologickým roztokem (200 ml). Organický extrakt byl vysušen v prostředí anhydrogenního Na_2SO_4 , přefiltrován a filtrát byl odpařen do sucha. Zbytek byl rozpuštěn v EtOH (100 ml) a zředěn MeOH (60 ml), který po ochlazení na 0 °C po dobu 12 hodin vytvořil bezbarvé krystaly. Pevná fáze byla přefiltrována, promývána minimálně vychlazeným EtOH (20 ml) a vysoušena při vysokých hodnotách vakua nad pevným NaOH za vzniku 60 g (78 %). Filtrát byl odpařen do sucha a čištěn na křemičitém nosiči za použití $\text{CHCl}_3 > \text{EtOAc}$ (9:1) jako eluátu. Z filtrátu byly izolovány dva produkty: rychle se pohybující 8,5 g (11 %) produkt a pomalu se pohybující 5 g (6,5 %) produkt. Pomalu se pohybující produkt se shodoval s produktem krystalizace. Rychle se pohybující produkt byl identifikován jako (4) a byl získán ve formě pěny. Celkový zisk (3) byl 65 g (84 %).

1- β -ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-karboxamid (5): Methyl-1-(2,3,5-tri-O-acetyl- β -L-ribofuranosyl)-1,2,4-triazol-3-karboxylát (62 g, 161 mmol) byl umístěn do ocelové bomby a ošetřen s čerstvě připraveným metanolovaným amoniakem (350 ml, připraven pasáží suchého HCl plynu suchým methanolem při 0 °C do nasycení). Ocelová bomba byla uzavřena a protřepávána při pokojové teplotě 18 hodin. Ocelová bomba byla poté ochlazená na 0 °C, otevřena a obsah byl odpařen do sucha. Zbytek byl ošetřen suchým ethanolem (100 ml) a odpařen do sucha. Získaný zbytek byl rozmělněn s acetonem za vzniku pevné fáze, která byla filtrována a promyta acetonem. Pevná fáze byla sušena přes noc při pokojové teplotě a rozpuštěna ve směsi horkého EtOH (600 ml) a vody (10 ml). Objem roztoku EtOH byl snížen na 150 ml jeho ohříváním a mícháním na horké plotně. Horký roztok EtOH po ochlazení poskytl bezbarvé krystaly, které byly filtrovány, promývány acetonem a sušeny v podmínkách vakua. Další koncentrace filtrátu poskytla další materiál. Celkový zisk představoval 35g (89%) produkt.

Příklad 2: Určení cytokinového profilu v odpovědi na Levovirin™ a Ribavirin

Od zdravého dárce byly pomocí centrifugace podle hustotního gradientu izolovány mononukleární buňky periferní krve s následným obohacením T buňkami za použití Lymphokwiku (One Lambda, Canoga Park, CA). Kontaminující monocyty byly odstraněny pomocí adheze na plast. Čisté T buňky představovaly >99 % CD2⁺, <1 % HLA-DR⁺, <5 % CD25⁺ a byly udržovány v RPMI-AP5 (mediu RPMI1640 obsahujícím 5% autologní plasmu, 1% glutamin, 1% penicilin/streptomycin a 0,05% 2-merkapt ethanol). Pro určení hodnot cytokinových proteinů byly T buňky ($0,2 \cdot 10^6$ v objemu 0,2 ml) aktivovány přidáním 80 ng stafylokokového enterotoxinu B (SEB, Sigma, St. Louis, MI) a inkubovány v přítomnosti 0 až 10 μ M Levovirinu™ nebo Ribavirinu v 96-jamkových plotnách po dobu 48 hodin při 37 °C. Po následné aktivaci byly supernatanty analyzovány na buněčnou cytokinovou produkci. Určení cytokinů bylo provedeno užitím ELISA kitů specifických pro IL-2, IFN- γ , TNF- α (Biosource, Camarillo, CA). Všechny výsledky ELISA metody byly vyjádřeny v pg/ml. Data jsou zobrazena jako procenta aktivovaných kontrol, počítaná jako poměr cytokinů aktivovaných T buněk nacházejících se v přítomnosti Levovirinu™ nebo Ribavirinu proti hodnotám cytokinů neošetřených aktivovaných T buněk násobený 100 %. Nulový efekt na cytokinové hodnoty by tak vykazoval procentuální hodnotu aktivovaných kontrol 100 %. Obrázek 3A-C ukazuje podobnost na dávce závislých odpovědí T buněk ošetřených Ribavirinem nebo Levovirinem™ a různými Th1 cytokiny. Tabulka 1 ukazuje efekt Ribavirinu a Levovirinu™ u SEB stimulovaných T buněk na expresi Th1 cytokinů IL-2, IFN- γ a TNF- α . Přítomná data jasně naznačují, že

Levovirin™ poskytuje významný potenciál k léčbě těch onemocnění, kde hrají kritickou roli cytokiny typu 1.

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

Tabulka 1: Všechna data jsou společně ukázána jako průměrné procentuální hodnoty aktivovaných kontrol (+/- standardní odchylka – dále st.o.) pro všechny cytokiny. Celkové hodnoty (pg/ml +/- st.o.) SEB indukované sekrece cytokinů typu 1 byla pro IL-2 640 $\pm$ 36, pro IFN- γ 462 $\pm$ 37 a pro TNF- α 223 $\pm$ 27. Klidové hodnoty byly u všech cytokinů <30 pg.

Příklad 3: Metody určení přímé antivirové aktivity a cytotoxicity

In vitro testování přímé antivirové aktivity Levovirinu™ a Ribavirinu proti infleunze A a B, parainfluenze 1 a 2 a respiračním syncytiálním viru bylo provedeno stejně, jako popisuje Huffman, J.H. et al. *Antiviral Chem. and Chemother.* 1997, 8:75-83 a Bernard, D.L. et al. *Antiviral Chem. and Chemother.* 1997, 8:223-233. Určení Anti-HIV aktivity provedl National Cancer Institute, který používá postupy navrhované na detekci agens působícího v jakémkoliv stadiu reprodukčního cyklu viru (Weislow, O.W. et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 1989, 81:577-586). Aktivita proti hepatitidě B byla sledována za použití metod, které popisuje Marion et al., *Hepatology* 1987, 7:724-731. Anti-HIV aktivita a cytotoxicita Ribavirinu byla určena z dříve známých dat (McCormick, J.B., *Lancet* 1998, II: 1367-1369).

Tabulka 2 ukazuje srovnání přímé antivirové aktivity a cytotoxicity LevovirinuTM a Ribavirinu na buňky infikované různými viry.

Přípravek	Účinek	HBV	HIV	INFL.A	INFL.B	PARA 1	PARA 3	RSV
Levovirin TM	Přímý antivirový	>100	>600	>200	>200	>1000	>1000	>1000
	Cytotoxický	>100	>600	>200	>200	>1000	>1000	>1000
Ribavirin	Přímý antivirový	>100	40	6,1	1,9	40	4	5
	Cytotoxický	53	>40	56	40	>1000	480	100

Tabulka 2: Testovány byly viry hepatitis B (HBV), virus lidského imunodeficitu (HIV), influenza (INFL) A a B, parainfluenza (PARA) 1 a 3 a respirační syncytiální virus (RSV). Antivirová aktivita (EC₅₀) nebo cytotoxicity (CC₅₀) jsou znázorněny v μ M.

Příklad 4: Protizánětlivý účinek LevovirinuTM u hepatitidy indukované Concavalinem A

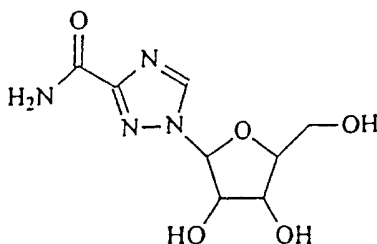
BALB/c myši (6 ve skupině) byly intraperitoneálně injikovány jednou dávkou 20 μ g (1 mg/kg) Ribavirinu nebo LevovirinuTM nebo 200 μ l PBS, 1 hodinu před intravenózní injekcí 0,3 mg Concavalinu A (Con A, Calbiochem, San Diego, CA) aplikovanou do ocasní žíly. Po 24 hodinách byly myši anestetizovány Penthranem a kardiální punkcí jim byla odebrána všechna krev (exsanguinace). Sérum získané ze sražené krve bylo použito k určení sérové hladiny alaninaminotransferázy (ALT). Sérové hodnoty ALT byly určeny použitím metody stanovení enzymové aktivity (Sigma) založené na kalorimetrickém měření produktů (kyseliny pyrohroznové a glutamové) vzniklých při katalýze substrátů, alaninu a kyseliny α -ketoglutarové. Obrázek 4 ukazuje množství sérové ALT v závislosti na Ribavirinu nebo LevovirinuTM nebo PBS. Oba, Ribavirin a LevovirinTM, byly schopny podstatně snížit Con A-indukované hodnoty ALT z asi 1900 U/ml na 969 U/ml $\pm$ 192 u Ribavirinu a na 954 U/ml $\pm$ 179 u LevovirinuTM.

Takto byly ozřejmeny specifické podoby a aplikace sloučenin a způsobů léčby virové infekce pomocí LevovirinuTM. Mělo by být však zřejmé, vzhledem ke znalostem v oboru, že vedle běžně popisovaných, jsou možné mnohé další modifikace, bez odchýlení se od nově popsaného pojetí. Nově popsaný objev proto není omezen jinak, než ve smyslu připojených nároků. Navíc, v interpretaci obojího, přesného popisu a nároků, by měly být všechny výrazy interpretovány nejširším možným způsobem v souladu s kontextem. Zejména výrazy „obsahuje“ a „obsahující“ by měly být interpretovány jako odkazující na součásti, složky nebo postupy nevylučujícím způsobem ukazujícím, že zmíněné součásti, složky nebo postupy mohou být prezentovány nebo

využity nebo kombinovány spolu s jinými součástmi, složkami nebo postupy, které nebyly přímo uvedeny.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití sloučeniny se strukturou I pro výrobu léčiva pro modulaci exprese lymfokinů v buňce, ve kterém se buňce dodává sloučenina v koncentraci účinné pro modulaci exprese lymfokinů, přičemž strukturou I je



kde modulace je účinná pro ošetření podmínky, která je spojená s expresí cytokinu Th1.

2. Použití podle nároku 1, ve kterém dodávání sloučeniny zvyšuje Th1 odpověď u pacienta relativně k Th2 odpovědi.

3. Použití podle nároku 2, ve kterém Th1 odpověď je vybrána ze skupiny sestávající z průměrného píkoveho nárůstu hodnoty IL-2 vzhledem k hodnotě aktivované kontroly nejméně o 70 % hmotn., průměrného píkoveho nárůstu hodnoty IFN- γ vzhledem k hodnotě aktivované kontroly nejméně o 20 % hmotn., průměrného píkoveho nárůstu hodnoty TNF- α vzhledem k hodnotě aktivované kontroly nejméně o 50 % hmotn., a průměrného píkoveho nárůstu hodnoty vzhledem k hodnotě aktivované kontroly IL-2, IFN- γ a TNF- α 42 % hmotn., 125 % hmotn. a případně 72 % hmotn.

4. Použití podle nároku 2, ve kterém nárůst v Th1 odpovědi zahrnuje průměrný píkový nárůst vzhledem k hodnotě aktivované kontroly IL-2 alespoň 70 % hmotn.

5. Použití podle nároku 2, ve kterém nárůst v Th1 odpovědi zahrnuje průměrný píkový nárůst vzhledem k hodnotě aktivované kontroly IFN- γ alespoň 20 % hmotn.

6. Použití podle nároku 2, ve kterém nárůst v Th1 odpovědi zahrnuje průměrný píkový nárůst vzhledem k hodnotě aktivované kontroly TNF- α alespoň 50 % hmotn.

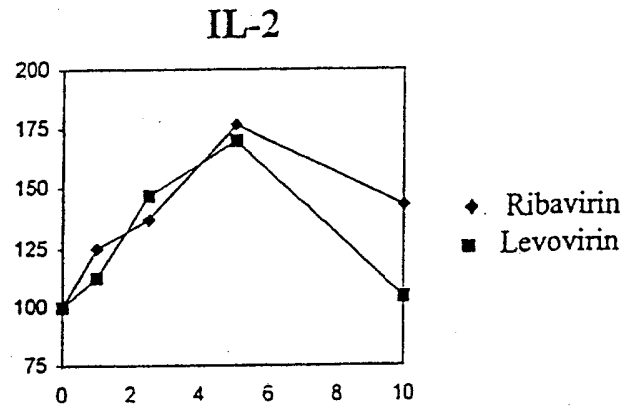
7. Použití podle nároku 2, ve kterém nárůst v Th1 odpovědi zahrnuje průměrný píkový nárůst vzhledem k hodnotě aktivované kontroly IL-2, IFN- γ a TNF- α 42 % hmotn., 125 % hmotn. a případně 72 % hmotn.

8. Použití podle nároku 1, ve kterém krok dodávání zahrnuje *in vivo* dodávání.

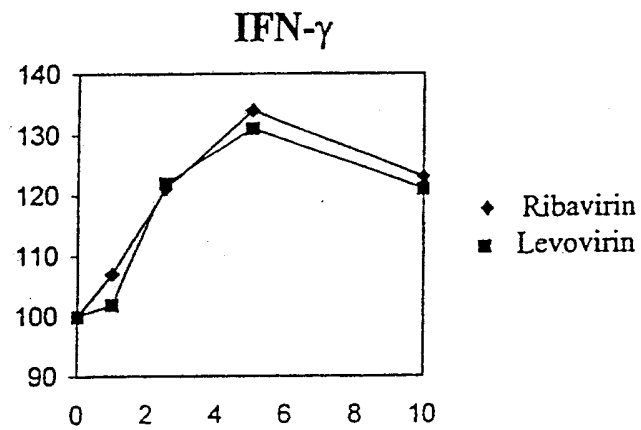
9. Použití podle nároku 1, ve kterém podmínkou je virusová infekce vybrána ze skupiny sestávající z HIV infekce, HCV infekce a HBV infekce.

17.04.02

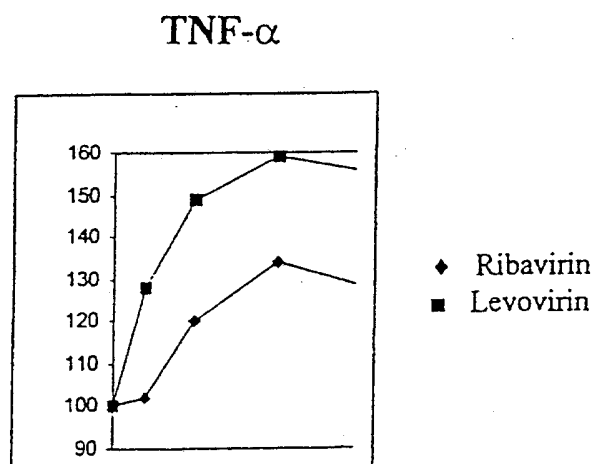
Obrázek 3A



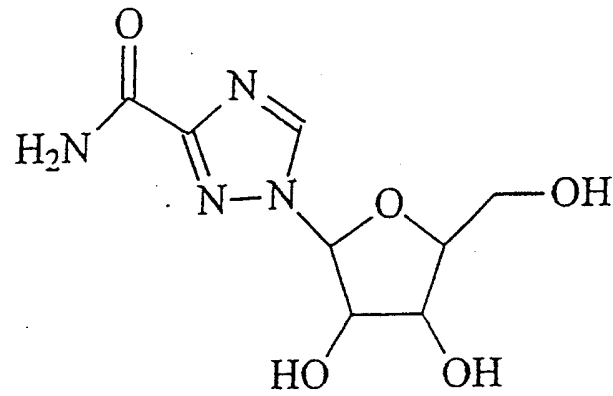
Obrázek 3B



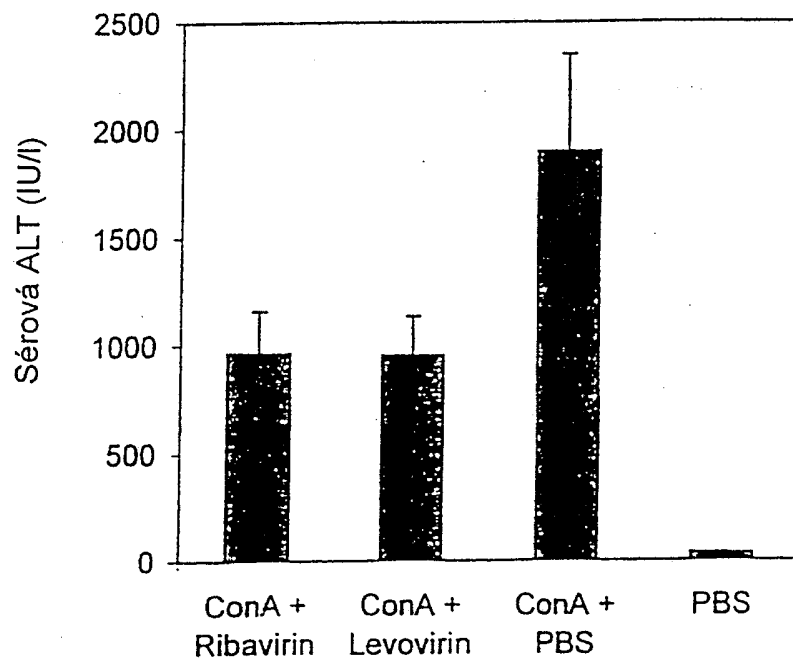
Obrázek 3C



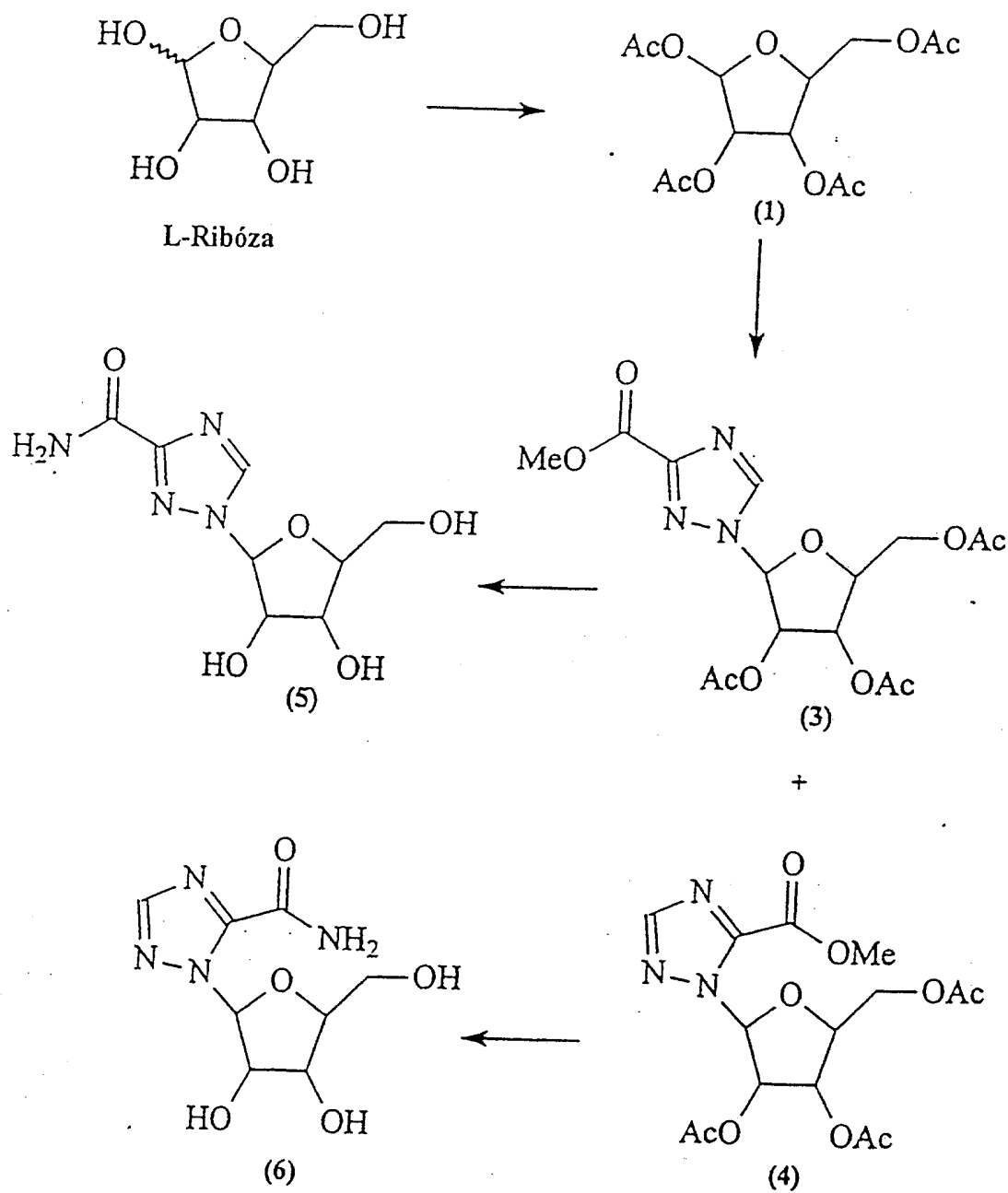
17.04.02



Obrázek 1



Obrázek 4



Obrázek 2