

P0300912

50424

KARBOXAMIDIN-MÓDOSÍTOTT, KÉTGYŰRŰS BÁZISÚ
NUKLEOZIDANALÓGOK

47

K I V O N A T

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A találmány tárgya karboxamidin-módosított, kétgűrűs bázisú nukleozidanalógok alkalmazása rendellenes állapotként autoimmun betegség, például *rheumatoid arthritis*, *sclerosis multiplex* vagy *diabetes*, vagy gyulladásos betegség, pl. kontakt *dermatitis*, vagy neoplázia kezelésére szolgáló gyógyszer előállításában.

A találmány szerint vegyületek alkalmasak az immunrendszer válaszreakciója jellege, közelebbről a az 1. típusú és 2. típusú citokin-válaszreakció aránya modulálására.

Handwritten signature
2003 MAJ 29

P0300912

50424

Az

Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

**KARBOXAMIDIN-MÓDOSÍTOTT, KÉTGYŰRŰS BÁZISÚ
NUKLEOZIDANALÓGOK**

A találmány tárgyát képezik nukleozidanalógok és eljárások alkalmazásukra, közelebbről karboxamidin-módosított, kétgűrűs bázisú nukleozidanalógok alkalmazása rendellenes állapot kezelésére szolgáló gyógyszer előállításában.

A találmány szerint vegyületek előnyösen alkalmazhatók az immunrendszer válaszreakciójának modulálására.

Az emlősök immunrendszere a limfociták két fő osztályát tartalmazza: B-limfociták (B-sejtek), amelyek a csontvelőből származnak, és a T-limfociták (T-sejtek), amelyek a timuszból származnak. A B-sejtek nagyrészt a humorális immunválaszért (azaz az antitest-termelésért), míg a T-sejtek túlnyomóan a sejtközvetített immunitásért felelősek.

A T-sejteket általában két alosztályba soroljuk, a "segítő" (helper) T-sejtek és a citotoxikus T-sejtek alosztályába. A segítő T-sejtek más limfocitákat, többek között B-sejteket, citotoxikus T-sejteket és makrofágokat aktiválnak úgy, hogy a sejtközvetített immunitásban szerepet ját-

Aktaszámunk: 97235-9353B/SG

szó, citokineknek nevezett oldható fehérjemediátorokat bocsájtanak ki. A limfokin kifejezésen a leírásban citokinek részhalmazát értjük.

A segítő T-sejteket általában szintén két alosztályba soroljuk, az 1. típusú és a 2. típusú alosztályba. Az 1. típusú sejtek interleukin-2-t (IL-2), tumornekrózis-faktort (TNF α) és gamma-interferont (IFN γ) termelnek, és elsődlegesen sejtközvetített immunitásért, mint például a késői típusú hiperszenzitivitásért és az antivirális immunitásért felelősek. Ezzel szemben a 2. típusú sejtek interleukinokat, IL-4-et, IL-5-öt, IL-6-ot, IL-9-et, IL-10-et és IL-13-at termelnek, és elsődlegesen a humorális immunválaszok segítségével játszanak szerepet, például az allergénekre adott immunválaszokban, például az IgE- és IgG4-antitest izotípusváltásában [Mosmann, Annu. Rev. Immunol. 7: 145-173 (1989)].

Az 1. típusú és 2. típusú „válaszreakciók” alatt az 1. és 2. típusú limfociták indukciójának eredményeként keletkező hatások teljes sorozatát értjük. Ilyen válaszreakciók többek között a megfelelő citokinek termelése, transzkripció, transzláció, szekréció által és lehetséges módon más mechanizmusokkal; a megfelelő limfociták megnövelt proliferációja és más, a citokinek megnövelt termelésével összefüggő hatások, többek között a mozgékonyági hatások.

Korábbi szabadalmi bejelentések [09/462714, 09/291097, 09/291093, 09/471513, 60/164365, 60/164366, 60/172097, 60/175111] (amelyekre úgy hivatkozunk, mintha

teljes terjedelmükben beépítettünk volna a leírásba, és azok a kitanítás részét képezik), a különböző nukleozidoknak (amelyeket itt úgy definiálunk, mint amelyek magukban foglalják a natív nukleozidok származékait és analógjait) a limfocita-válaszreakciók egymásra vonatkoztatott, szelektív modulálására gyakorolt hatására vonatkozó felismeréseink szempontjaira vonatkoznak. Többek között kimutattuk, hogy akár az 1. típusú vagy akár a 2. típusú válaszreakciók szelektív módon elnyomhatóak, míg a másik válaszreakció indukálható vagy változatlanul hagyható, és akár 1. típusú vagy akár a 2. típusú válaszreakciók szelektív módon indukálhatóak, míg a másik válaszreakció elnyomott, vagy akár viszonylagosan nem befolyásolt. Felismertük azt a meglepő tényt is, hogy bizonyos nukleozidok, amelyek hatásosak az 1. típusú és a 2. típusú válaszreakciók egymáshoz viszonyított, szelektív modulálásában, hajlamosak a bimodális hatásra. Bizonyos nukleozidok, amelyek általánosságban hajlamosak viszonylag nagyobb dózisban elnyomni vagy indukálni az 1. típusú és a 2. típusú aktivitás is, hajlamosak többek között alacsonyabb dózisokban az 1. típusú és a 2. típusú aktivitás szelektív módon történő, egymáshoz viszonyított modulálására.

Más nukleozidanalóg-vegyületeknek a limfocita-válaszreakciók egymáshoz viszonyított, szelektív modulálására gyakorolt hatását korábban nem vizsgálták vagy nem dokumentálták. Felismertük, hogy a bimodális hatás vagy az 1. típusú és a 2. típusú válaszreakciók egymáshoz viszonyított, szelektív modulálása fellép más nukleozidanalóg vegyületek,

mint például a vegyületek prodrogformájának beadása után is.

Biológiaiag aktív vegyületek klinikailag alkalmazható hatóanyagokká történő fejlesztésekor sok akadállyal kell megküzdenünk. Sok, hatásos biológiaiag aktív hatóanyag sohasem lesz klinikailag alkalmazható hatóanyag nemkívánatos biofarmakológiai tulajdonságai miatt, mint például a biológiai korlátokon való alacsony áthatolási képesség, mint például a vér-agy-gát (*blood brain barrier, BBB*) és a bél-gát. Sokféle faktor gyakorol hatást egy hatóanyag biológiai hozzáférhetőségére, azonban sok hatóanyag nemkívánatos fiziko-kémiai tulajdonságai (pl. töltés, lipofilitás, hidrogénkötési potenciál, méret) valószínűleg a leggyakrabban előforduló faktorok közé tartoznak, amelyek akadályozzák a hatóanyagok biológiai gátakon történő áthatolását. Ezáltal egy hatóanyag fiziko-kémiai jellemzői (töltés, lipofilitás, hidrogénkötési potenciál, méret) optimalizálása a legvalószínűbb általános stratégia a hatóanyagok ilyen membránkorlátokon át történő transzportja lehetővé tételére.

Hatóanyagok fiziko-kémiai tulajdonságai optimalizálásának egy lehetséges stratégiája a prodrog-stratégia [Bundgaard, H., *Design of Prodrugs*, kiad.: Elsevier, Amsterdam (1985); Bodor, N., Prokai, L., Wu, W.M., Farag, H., Jonalagadda, S., Kawamura, J. Simpkins, *Science* 257: 1698-1700-1992); Taylor, H.E., Sloan, K.B., *J. Pharm. Sci.* 87: 5-20 (1998)]. A prodrog kifejezést olyan hatóanyag leírásakor alkalmazzuk, amelynek kémiai vagy enzimatis transzformáción kell átesnie a beadás után az aktív vagy eredeti

hatóanyag eléréséhez, úgy, hogy a metabolikus termék vagy eredeti hatóanyag ezt követően kifejtthesse a kívánt farmakológiai válaszreakciót. Kisméretű szerves molekulák esetében bizonyos poláros funkcionális csoportokon tranziens és biológiailag reverzibilis módon származék képezésével e csoportok nem kívánatos fiziko-kémiai jellegzetességei (pl. töltés, hidrogénkötési potenciál) „elmaszkírozódnak” anélkül, hogy a molekulák farmakológiai tulajdonságait véglegesen megváltoztatnánk. Ezt a stratégiát nagyon sikeresen alkalmazzák olyan esetekben, ahol a prodrog-származékképzés magában foglalja többek között karboxil- vagy hidroxil-funkcióscsoport észterre történő konvertálását, amely *in vivo* könnyen hidrolizál kémiai vagy enzimatis úton. Azt feltételezzük, hogy az ígéretes prodrog-konceptió szerint az eredeti hatóanyagba más molekularészek bevitele megnöveli a biológiai hozzáférhetőséget, az adszorpciós és anti-vitrális hatásokat.

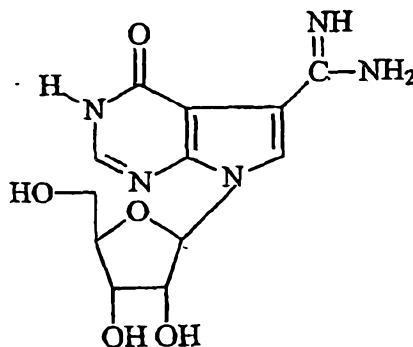
Ezek a felismerések különösen jelentősek, mivel a fent ismertetett betegségek közül sok esetében a kezelésére szolgáló modern stratégia hatékonysága korlátozott, és/vagy jelentős mellékhatásai vannak. Autoimmun betegségek kezelése például gyakran tüneti kezelésre, toxikus antitestek eltávolítására (mint a *myastenia gravis* esetében) veszélyes drogok, többek között kortikoszteroidok, klorokvin-származékok és antimetabolikus és tumorellenes hatóanyagok, az immunrendszer sejtjeit célzó hatóanyagok (mint a ciklosporin) beadására korlátozódik.

A technika állása szerint számos immunmodulátor-vegyület ismert, azonban mindegyiknek van egy vagy több hátránya. Ezáltal továbbra is szükség van javított eljárásokra és immunmodulátor-vegyületek készítményeire.

Az alábbiakban a találmány rövid összefoglalását adjuk.

A találmány tárgyát új nukleozidanalóg-vegyületek és azokkal rokon vegyületek, mint például prodrogok, ezek terápiás alkalmazásai és szintézise képezik.

A találmány egyik szempontja szerint a nukleozidanalóg-vegyületek általános szerkezete az 1. képlettel írható le, hol a kémiai konfiguráció lehet L-konfiguráció vagy D-konfiguráció:



1. képlet

ICN-10776

A találmány egy másik szempontja szerint a gyógyászati készítmény tartalmaz az 1. képlettel leírható vegyület, vagy gyógyászatilag elfogadott észtere vagy sója terápiásan hatásos mennyiségét legalább egy gyógyászatilag elfogadott hordozóval keverve.

A találmány egy másik szempontja szerint a gyógyászati készítmény tartalmazza az 1. képlettel leírható vegyület prodrog formáját vagy gyógyászatilag elfogadott észterét vagy sóját legalább egy gyógyászatilag elfogadott hordozóval keverve.

A találmány egy másik szempontja szerint 1. vagy 2. képlettel leírható vegyületet alkalmazzuk bármely olyan állapot esetében, amely a vegyület beadására pozitív módon reagál, bármely készítménynek és előíratnak megfelelően, amely a pozitív válaszreakciót megvalósítja. Többek között a találmány szerint az 1. vagy 2. képlettel leírható vegyületek alkalmazhatóak fertőzés, parazita-fertőzés, rák, tumor vagy más neoplazma, óriássejtes arteritisz vagy autoimmun betegség kezelésében.

Az alábbiakban röviden ismertetjük az ábrákat.

Az 1A-1F. ábrák a találmány szerinti vegyületek a humán eredetű, aktivált T-sejtek citokin- és proliferatív válaszreakciójára gyakorolt dózishatását bemutató grafikonok.

A 2. ábra a találmány szerinti vegyületekkel kezelt sejtek különböző RNS-expresszióit bemutató autoradiogramm.

A 3. ábra a találmány szerinti vegyületekkel történő kezelés hatására a specifikus citokintermelő sejtek számát (ill. annak változását 5. old) bemutató grafikon.

A 4A-4F. ábrák a találmány tárgyát szerinti vegyületeknek a humán eredetű, aktivált T-sejtek életképességére, citokin-válaszreakcióira és proliferációjára gyakorolt időleges hatásait bemutató grafikonok.

Az 5A-5B. ábrák a találmány szerinti vegyületeknek a normál donorokból és reumatoid artritiszben szenvedő páciensekből származó, aktivált, perifériás T-sejtek citokin-termelésére gyakorolt összehasonlító hatásait bemutató grafikonok.

A 6. ábra sejteknek a találmány szerinti vegyületekkel történő kezelésre adott válaszreakciójaként a különböző RNS-expressziókat bemutató autoradiogramm.

A 7. ábra a találmány szerinti vegyületeknek a CD4+ és CD8+ T-sejtcsoportok aktivált citokinválaszára gyakorolt hatását mutatja be.

A 8. ábra a találmány szerinti vegyületeknek az egéreredetű Th1 T-sejtek keletkezésére gyakorolt hatását bemutató ábra.

A 9A. ábra fülduzzadási méréseket mutat be.

A 9B. ábra sejteknek a találmány szerinti vegyületekkel történő kezelésre adott válaszreakciójaként a sejtekben különböző RNS-expressziókat bemutató autoradiogramm.

A 10. ábra egy másik, fülduzzadási méréseket bemutató ábra.

A 10B. ábra sejteknek a találmány szerinti vegyületekkel történő kezelésre adott válaszreakciójaként a sejtekben különböző RNS-expressziókat bemutató autoradiogramm.

Az alábbiakban a találmány részletes leírását adjuk meg.

A leírásban következő kifejezéseket az alább definiáltak szerint alkalmazzuk:

A „nukleozid” és „nukleozid-analógvegyület” kifejezések felcserélhetőek, és bármely, specifikus pozíciójában heterociklushoz, aromás heterociklushoz, vagy purinanalóg (9. pozíció) vagy pirimidinanalóg (1. pozíció) esetében ezzel ekvivalens pozícióhoz kapcsolt pentózból vagy módosított pentózzrészből áll.

A „nukleotid” kifejezésen nukleozid 5'-pozícióban szubsztituált foszfátészterét értjük.

A „heterociklusos” kifejezésen monovalens, telített vagy nem telített, szénatomokból álló (karbociklusos) gyűrűs gyököt értünk, amelyben legalább egy heteroatom van, mint például N, O vagy S, és a gyűrűben minden hozzáférhető pozíció adott esetben, függetlenül szubsztituálva van, például hidroxí-, oxo-, amino-, imino-, kis tagszámú alkil-, bróm-, klór- és/vagy cianocsoporttal. A szubsztituensek ilyen osztályába soroljuk a purinokat és pirimidineket is.

A „purin” kifejezésen nitrogéntartalmú, kétgyűrűs heterociklusos vegyületeket értünk.

A „pirimidin” kifejezésen nitrogéntartalmú, egygyűrűs heterociklusos vegyületeket értünk.

A „D-nukleozidok” kifejezésen D-ribóz cukor-molekularészt tartalmazó nukleozidvegyületeket értünk.

Az „L-nukleozidok” kifejezésen L-ribóz cukor-molekularészt tartalmazó nukleozidvegyületeket értünk.

Az „L-konfiguráció” és D-konfiguráció” kifejezéssel a leírásban a vegyületek ribofuranozil-molekularészének kémiai konfigurációját írjuk le, amely a molekula pirrol-pirimidon-részéhez kapcsolódik.

A „C-nukleozidok” kifejezéssel a leírásban a ribóz-cukorrész és a heterociklusos bázis között kialakult kötést írjuk le. A C-nukleozidokban a kötés a ribóz-cukorrész C1-pozíciójából ered és a heterociklusos bázis szénatomjához kapcsolódik. A C-nukleozidokban kialakuló kötés szén-szén-típusú kötés.

Az „N-nukleozidok” kifejezéssel a leírásban a ribóz-cukorrész és a heterociklusos bázis között kialakult kötést írjuk le. Az N-nukleozidokban a kötés a ribóz-cukorrész C1-pozíciójából ered és a heterociklusos bázis nitrogénatomjához kapcsolódik. Az N-nukleozidokban kialakuló kötés szén-nitrogén-típusú kötés.

A „védőcsoport” kifejezésen olyan kémiai csoportot értünk, amelyet oxigén- vagy nitrogénatomhoz adunk azért, hogy megvédjük azokat a molekula más részein végzett származékképzés során a további reakciótól. A szerves kémiai szintézisben jártas szakember számára az oxigén és nitrogén védőcsoportjai széles választéka ismeretes.

A „kis tagszámú alkil-” kifejezésen metil-, etil-, n-propil-, izopropil-, n-butil-, t-butil-, i-butil- vagy hexilcsoportot értünk. E kifejezésre további példák (lehetnek) egy-hat szénatomos gyűrűs, elágazó vagy egyenes szénláncú csoportok.

Az „aril-” kifejezésen monovalens, nem telített, aromás széngyűrűs gyököt értünk, amelyben egy gyűrű (pl. fenil-) vagy két kondenzált gyűrű (pl. naftil-) van, amely adott esetben lehet szubsztituálva hidroxil-, kis tagszámú alkil-, klorid- és/vagy cianocsoporttal.

A „heterociklusos” kifejezésen monovalens, telített vagy nem telített, szénatomokból álló (karbociklusos) gyűrűs gyököt értünk, amelyben legalább egy heteroatom van, mint például N, O, S, Se vagy P, és a gyűrűben minden hozzáférhető pozíció adott esetben, függetlenül szubsztituálva van, például hidroxil-, oxo-, amino-, imino-, kis tagszámú alkil-, bróm-, klór- és/vagy cianocsoporttal. (az előző oldalon már definiálta, és nem is pontosan így 7. old), vagy nincs szubsztituálva.

Az „egygyűrűs” kifejezésen monovalens, telített, szénatomokból álló (karbociklusos) ciklusos gyököt értünk, amelyben legalább egy heteroatom van, mint például N, O, S, Se vagy P, és a gyűrűben minden hozzáférhető pozíció adott esetben, függetlenül szubsztituálva van cukor-molekularésszel vagy más csoportokkal, mint bróm-, klór- és/vagy cianid-csoporttal úgy, hogy az egygyűrűs rendszer végső soron aromássá válik (pl. timidin).

Az „immunmodulátor” és „modulátor” kifejezéseken az 1. képlettel leírható vegyület olyan mennyiségét értjük, amely helyreállítja az immunfunkció normális szintjét, vagy az immunfunkciót a normális szint fölé emeli fertőzés eliminálása céljából.

Az 1 képlettel leírható vegyületek tartalmazhatnak aszimmetriaközpontokat. Ennek megfelelően ezek előállíthatók akár optikailag aktív formában vagy akár racém keverék formájában. A leírásban és az igénypontokban ismertetettek szerint a találmány oltalmi köre magában foglalja az 1.

képlettel leírható vegyületek egyedi optikai izomerjeit és nem racém keverékeit, valamint racém formáit is.

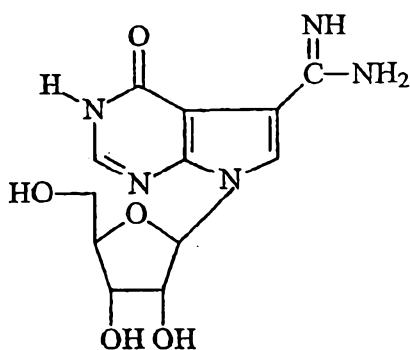
Az „ α ” „ β ” betűkkel aszimetriás szénatom szubsztituense specifikus sztereokémiai konfigurációját jelöljük kémiai szerkezet rajzán jelölve.

Az „enantiomerek” kifejezésen olyan sztereoizomer-párt értünk, amelyek egymással fedésbe nem hozható tükörpárok. Enantiomer-párok 1:1 keveréke „racém” keverék.

Az „izomerek” kifejezésen olyan, különböző vegyületeket értünk, amelyek képlettel azonos. A „sztereoizomerek” olyan izomerek, amelyek csak az atomok térbeli elrendezésében különböznek.

A „gyógyászatilag elfogadott só” lehet bármely só, amely szervetlen és szerves sóból vagy bázisból származik.

A találmány tárgyát képező nukleozidanalógvegyületek általában az 1. képlettel írhatóak le:



1. képlet

ICN-10776

ahol a kémiai konfiguráció L- vagy D-konfiguráció, és ahol a találmány szerinti vegyületek lehetnek bármely alkalmas sóformában (pl. HCl-só). Ráadásul be kell látnunk különösen azt, hogy a találmány szerinti vegyületek magukban foglalják az 1. képlet szerinti vegyület prodrogformáit is. A különösen előnyös prodrogformák előnyösen megvalósítják a következők közül legalább az egyiket: célszerv vagy célsejt iránti megnövelt specificitás, metabolikus stabilitás a célsejten vagy célszerven kívül más kompartmentumban, csökkent mértékű toxicitás, meghosszabbított féléletidő a szérumban, a specifikus sejtek és/vagy kompartmentumok szempontjából megnövelt felvehetőségi képesség, és javított fiziko-kémiai tulajdonságok (megnövelt oldhatóság, semlegesítés vagy elektromos töltés bevitele, megnövelt/csökkent polaritás és/vagy hidrofób jelleg), stb. Ráadásul be kell látnunk, hogy a találmány szerinti vegyületek minden észterét és sóját szintén alkalmazhatónak tekintünk.

Nukleoziddrogok számos prodrogformája ismert a technika állása szerint, és a találmány szerinti prodrogformák magukban foglalhatják a cukorrész és/vagy a bázisrész módosításait is. Az adott vegyülettől vagy megcélzott szervtől/sejttől függően a különösen előnyös módosítás lehet a találmány szerinti vegyületek 3-tri-O-acetil-származéka a cukorrész 5'-OH-csoportja észterezése 5'-retinoil-származék kialakítása céljából, vagy alternatív savakkal képzett származékok [szintézisének leírását lásd: C. Sergheraert, C. Pierlot, A. Tartar, Y. Henin, M. Lemaitre, J. Med. Chem. 36: 826-830 (1993)]. Alternatív módon kumarin- vagy amino-

sav-észtereket állíthatunk elő a találmány szerinti vegyületekből. A hatóanyagoknak specifikusan a májba és az epéhez történő eljuttatásához a belső epesavtranszportrendszer alkalmazása előnyös megoldás lehet. Ennek következményeként a találmány szerinti vegyületekből kólsav-észterek állíthatóak elő.

Ahol a találmány szerinti vegyületek nukleotidok (azaz tartalmazznak 5'-foszfátcsoporthoz), előállíthatunk védett 5'-monofoszfát-származékokat (pl. gyűrűs és nem gyűrűs mono-, di- és triésztereket), különösen (előnyösen) aminosav-foszforamidokat szalicilát-foszfonésztereket, és lipofil vegyületekkel foszfonésztereket (módosított és nem módosított alkil-, alkenil-, koleszteril-, stb.). Más, lehetséges prodrugok többek között a következőkben felsorolt nemzetközi szabadalmi bejelentésekben bemutatott csoportok lehetséges kombinációi: WO/98/39342, WO 98/39343, WO/98/39344 és WO 99/45016. A találmány szerinti vegyületek prodrugjait előállíthatjuk az amidin-funkcióscsoporton történő származékképzéssel, és különösen előnyös származékok többek között a szubsztituált amidok, amelyek a találmány szerinti vegyületek karboxamidcsoportjához kapcsolódnak. A nukleozidok és analógjai további előnyös prodrugformái leírása megtalálható a 09/594.410. számú, 2000. június 16-án benyújtott amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben, és amely a kitanítás részét képezi.

Jelen szabadalmi bejelentésben igényeljük továbbá az amerikai egyesült államokbeli, 60/182676. ideiglenes számon 2000. február 15-én benyújtott, és az amerikai egyesült ál-

lamokbeli, 09/595365. sorozatszámú, 2000. június 16-án benyújtott szabadalmi bejelentések elsőbbségét, amelyek bejelentésekre úgy hivatkozunk, mintha teljes terjedelmükben beépítettünk volna a leírásba, és azok a kitanítás részét képezik.

Az alábbiakban a találmány szerinti vegyületek alkalmazásait ismertetjük.

A találmány szerinti megoldásban az 1. képlettel leírható vegyületeket sokféle (rendellenes) állapot kezelésében alkalmazzuk, és valójában bármely olyan állapot esetében, amely pozitív módon reagál a találmány szerinti vegyületek beadására. Többek között specifikusan előnyös a találmány tárgyát képező vegyületek alkalmazása fertőzés, parazita-fertőzés, rák, tumor vagy autoimmun betegség kezelésére. Ezen kívül előnyös a találmány szerinti vegyület alkalmazása a páciens specifikus szervét, például máját vagy szívét érintő állapot vagy betegség megcélzására.

A találmány szerint a találmány szerinti vegyületekkel kezelendő fertőző betegségek többek között a respirátoros syncytialis vírus (RSV), hepatítisz B-vírus (HBV), hepatítisz C-vírus (HCV), 1. és 2. típusú herpes simplex vírus, herpes genitalis, herpes keratitis, herpes encephalitis, herpes zoster, humán papillómavírus (HPV), kanyaró és gomba okozta fertőzések.

A találmány szerint a találmány szerinti vegyületekkel kezelendő parazita-fertőzések többek között a protozoa, valamint a bélféreg és más paraziták által okozott parazita-fertőzések.

A találmány szerint a kezelendő rák vagy tumor többek között vírus által előidézett rák vagy tumor, és a kezelés hatása lehet többek között a vírussal fertőzött sejt neoplasztikus állapotba való transzformációjának gátlása, a vírusnak a transzformált sejtől más normál sejtekhez való elterjedése gátlása és/vagy vírus által transzformált sejtek növekedése megállítása.

A találmány szerint a kezelendő autoimmun és más rendellenességek többek között az *arthritis*, *psoriasis*, bélbetegég, *juvenile diabetes*, *lupus*, *sclerosis multiplex*, köszvény és köszvényes *arthritis*, *rheumatoid arthritis*, transzplantációs kilökődés, óriássejtes *arteritis*, allergia és asztma.

A találmány szerinti vegyületek további, találmány szerint alkalmazása többek között más nukleozid- vagy nukleotidanalógok kémiai szintézisében olyan intermediereként való alkalmazása, amelyek viszont alkalmazhatóak más célokra terápiás hatóanyagként.

A találmány egy további szempontja szerint a találmány tárgyát képezi eljárás emlőseredetű állat ember kezelésére, amely eljárás magában foglalja a találmány tárgyát képező vegyületet tartalmazó gyógyszer terápiásan és/vagy profilaktikusan hatásos mennyiségének beadását. Ebből a szempontból a hatás összefügghet az emlőseredetű állat ember immunrendszerének bizonyos elemei modulálásával, különösen az 1. és 2. típusú limfokinprofil egymáshoz viszonyított modulálásával. Az 1. és 2. típusú limfokinek modulálásakor különösen előnyös, ha a modulálás többek között az 1.

és 2. típusú limfokinek közül mindkettő elnyomása, vagy az 1. típusúak elnyomása és a 2. típusúak stimulálása.

Például sok autoimmun betegség (pl. *rheumatoid arthritis, sclerosis multiplex, diabetes*) esetében kimutatták, hogy 1. típusú polarizált citokinexpresszióval függenek össze. Kimutattuk, hogy a találmány szerinti vegyületek hatásosan indukálják a 2. típusú citokinexpressziót, csökkentik az 1. típusú citokinexpressziót, és csökkentik az aktivált T-sejtek proliferációját (alább). Ennek következtében meg kell értenünk, hogy, a találmány szerinti vegyületek többek között előnyösen alkalmazhatóak olyan betegségek kezelésében, amelyek megnövelt 1. típusú citokinexpresszióval vannak összefüggésben, vagy olyan betegségek kezelésében, amelyek csökkent 2. típusú citokinexpresszióval vannak összefüggésben, vagy amelyek megnövelt 1. típusú és csökkent 2. típusú citokinexpresszióval vannak összefüggésben. Így különösen előnyös a találmány szerinti vegyületeket 1. típusú citokin által közvetített gyulladásos válaszreakciókban és autoimmun betegségekben történő alkalmazása. Ennek következtében meg kell értenünk, hogy a találmány szerinti vegyületek alkalmazhatóak immunmodulátorként, és különösen 1. típusú szuppresszánsként és/vagy stimulánsként.

Általánosságban azok a találmány szerinti legelőnyösebb alkalmazások, amelyek esetében az aktív vegyületek a nem célba vett gazdasejtek számára viszonylagosan kevésbé citotoxikusak, és viszonylagosan aktívabbak a megcélzott sejtek/szövetek esetében. Ebből a szempontból előnyös lehet

az is, hogy az L-nukleozidok a D-nukleozidokkal szemben stabilabbak lehetnek, ami jobb farmakokinetikához vezethet. Ez az eredmény elérhető, mivel az L-nukleozidokat az enzimek nem ismerik fel, így hosszabb lehet a féléletidejük.

Az alábbiakban a találmány szerinti vegyületek beadási módjait ismertetjük.

A találmány szerinti vegyületeket előnyösen alkalmas gyógyászati készítményben adjuk be, alkalmas előírat szerint. Így a beadás történhet orálisan, parenterálisan (többek között szubkután injekcióban, intravénásan, intramuszkulárisan, intraszernális injekcióban vagy infúziós technikával), inhalációs spray alkalmazásával, rektálisan, helyileg és így tovább, és dózisegységformában, amely tartalmaz hagyományos, nem toxikus, gyógyászatilag elfogadott hordozókat, adjuvánsokat és oldószereket.

Példaként említve, a találmány szerinti vegyületek előnyösen formulázhatóak gyógyászatilag elfogadott hordozóval. Például a találmány szerinti vegyületek beadhatóak orálisan gyógyászatilag elfogadott sók formájában. Mivel a találmány szerinti vegyületek többnyire vízben oldhatóak, ezért beadhatóak intravénásan fiziológiai sóoldatban (pl. 7.2-7.5 pH-értékre pufferolva). Hagományos pufferok, mint a foszfát-, bikarbonát- vagy citrátpuffer alkalmazható ilyen célra. Természetesen a technikában járt szakember a leírás kitanításai szerint módosíthatja a készítményt a beadás konkrét módja célját szolgáló számos készítmény céljára anélkül, hogy a találmány szerinti készítményt instabilná tenné vagy gyengítené terápiás aktivitását. Előnyösen a

találmány szerinti vegyületek módosítása vízben vagy más oldószerben való oldhatóvá tétel céljából például könnyen végrehajtható kisebb módosításokkal (sóképzés, észterezés stb.), amelyek a technikában járta szakember számára magától értetődőek. Szintén magától értetődő a technikában jártas szakember számára a konkrét vegyület beadási módja és dózisdagolása módosítása abból a célból, hogy a találmány szerinti vegyület farmakokinetikáját a páciens szempontjából a maximálisan előnyös hatások elérése céljából irányítsa.

Bizonyos gyógyászati dózisformák esetében a vegyületek prodrogformája, különösen például a találmány szerinti vegyületek acilált (pl. acetilált) származékai, piridin-észterei és különböző sóformái előnyösek, és beadhatóak páciens állapota kezelésére szolgáló eljárásban.

Ráadásul a találmány szerinti vegyületek beadhatóak önmagukban vagy más hatóanyagokkal kombinálva a fent ismertetett fertőzések és állapotok kezelése céljából. A találmány szerinti kombinált terápiák tartalmazzák a találmány szerinti legalább egy vegyület vagy annak funkcionális származéka és legalább egy másik, gyógyászatilag aktív összetevő beadásának lépését. Az aktív összetevő (összetevők) és gyógyászatilag aktív hatóanyagok beadhatóak külön vagy együtt, és ha külön adjuk be azokat, akkor beadhatóak egymást követően, vagy külön-külön bármilyen sorrendben. Az aktív összetevő (összetevők) és gyógyászatilag aktív hatóanyagok mennyiségét és a beadás viszonylagos időzítését úgy választjuk meg, hogy a kívánt, kombinált terápiás hatást

elérjük. Előnyösen a kombinált terápia magában foglalja a találmány szerinti egyik vegyület vagy fiziológiailag funkcionális származéka és az egyik, alábbiakban ismertetésre kerülő hatóanyag beadásának lépését.

A találmány szerinti vegyületekkel kombinációban a találmány szerint hatásos hatóanyagok vagy aktív összetevők például vírusellenes hatóanyagok, mint az interferon, többek között, de nem kizárólagosan az interferon- α és az interferon- γ , *Ribavirin*, *acyclovir* és *AZT*TM; gombaellenes hatóanyagok, mint például a *tolnaftate*, *Fungizone*TM, *Lotrimin*TM, *Nystatin* és *Amphotercin*; parazitaellenes hatóanyagok, mint a *Mintezol*TM, *Nicolcide*TM, *Vermox*TM és *Flagyl*TM, bélre ható anyagok, mint például az *Immodium*TM, *Lomotil*TM és *Phazyme*TM; tumorellenes hatóanyagok, mint az interferon- α és az interferon- γ , *Adriamycin*TM, *Cytosan*TM, *Imuram*TM, *Metotrexate*TM, *Mithracin*TM, *Tiazofurin*TM, *Taxol*TM; bőrgyógyászati hatóanyagok, mint az *Aclovate*TM, *Cyclocort*TM, *Denorex*TM, *Florone*TM, *Oxsoralen*TM, kőszénkátrány és szalicilsav; migréncsökkentő szerek, mint az ergotamin-vegyületek; fel nem felsorolt szteroidok és immunszuppresszánsok, többek között *cyclosporin*-ok, *Diprosone*TM, hidrokortizon, mikofenolsav, *Arava*TM (leflumonid); *Floron*TM, *Lidex*TM, *Topicort* és *Valisone*; és metabolikus hatóanyagok, mint az inzulin, és más hatóanyagok, amelyek nem illeszkednek pontosan a fenti kategóriákba, többek között a citokinek, mint például az IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 és IL-12. Különösen előnyös elsődleges hatóanyag az *AZT*, *3TC*, a 8. pozícióban szubsztituált guanozin-analógok, 2,3-dideoxi-

nukleozidok, interleukin-II, interferonok, mint például az I α B-interferonok, *tucaresol*, *levamisole*, *isoprinosine* és ciklolignánok.

Az ilyen terápiás hatóanyagokra további példák többek között azok, amelyek hatásosak az immunrendszer modulálásában, vagy azzal összefüggő állapotokban, mint például az AZT, 3TC, a 8. pozícióban szubsztituált guanozin-analógok, 2',3'-dideoxi-nukleozidok, interleukin-II, interferonok, mint például az I α B-interferonok, *tucaresol*, *levamisole*, *isoprinosine* és ciklolignánok. Bizonyos, találmány szerinti vegyületek hatásosak lehetnek bizonyos, találmány szerinti hatóanyagok biológiai aktivitása növelésében a metabolizmus csökkentése által vagy más vegyületek gátlása által, és például beadhatóak azzal együtt a kívánt hatás elérése céljából.

Az adagolás szempontjából a technikában jártas szakember felismeri, hogy a terápiásan hatásos mennyiség változhat a kezelendő fertőzéstől vagy állapottól, annak súlyosságától, az alkalmazandó kezelési rendtől, az alkalmazott hatóanyag farmakokinetikájától, valamint a páciensről (állat vagy ember) függően. Előnyösen különböző, alternatív adagolás szintén alkalmazható, többek között 0.5-0.1 mg/kg közötti vagy kevesebb, azonban 0.5-2.0 mg/kg (pl. 1.25 mg/kg) dózis vagy több szintén alkalmazható. Ráadásul, míg bizonyos rendellenes állapotokban sikeres kezelés érhető el a találmány tárgyát képező vegyületek viszonylag alacsony plazmakoncentrációival, a találmány szerinti megoldásban más rendellenes állapotokban szükség lehet viszonylagosan maga-

sabb dózisokra. A találmány szerinti megoldásban azonban alkalmas adagolási rend fejleszthető ki, ha kis mennyiséget adunk be, és ezután addig növeljük az adagot, amíg a mellékhatások túlzottan kedvezőtlenek lesznek, vagy a kívánt hatást elérjük.

Az aktív vegyület beadása változhat a folyamatos (intravénás csepegtetés) a naponkénti néhány orális beadásig (például *Q.I.D.*) és a beadás módja lehet többek között orális, helyi, parenterális, intramuszkuláris, intravénás, szubkután, transzdermális (amely tartalmazhat többek között penetrációt elősegítő hatóanyagot), bukkális és végbélkúp-ként történő adagolás.

A találmány szerinti gyógyászati készítmény előállításakor egy vagy több, találmány szerinti vegyületet alaposan elkeverünk gyógyászatilag elfogadott hordozóval hagyományos, gyógyászati vegyítő technikákkal, dózis előállítása céljából. A hordozó a beadni kívánt készítmény formájától, például orális vagy parenterális formától függően sokféle formát ölthet. Az orális dózisformájú gyógyászati készítmények előállításakor bármely szokásos gyógyászati közeg alkalmazható. Így folyadékformájú orális készítmények, mint például szuszpenziók, elixírek és oldatok esetében alkalmas hordozók és adalékok többek között a víz, glikolok, olajok, alkoholok, ízesítőanyagok, tartósítószer, színezékek és ilyenek alkalmazhatóak. Szilárd orális készítmények, mint például a porok, tabletták, kapszulák, és szilárd készítmények, mint például a végbélkúpok esetében alkalmas hordozók és adalékok többek között a keményítők, cukorhordozók, mint

például a dextróz, mannitol, laktóz és ezekkel rokon hordozók, hígítók, granulálóanyagok, síkosítók, kötőanyagok, dezintegráló hatóanyagok és ehhez hasonlóak. Szükség esetén a tabletták és kapszulák készíthetők enteroszolvens pasztillabevonattal vagy kibocsájtást késleltető bevonattal standard technikák alkalmazásával.

A parenterális készítmények esetében a hordozó rendszerint tartalmaz steril vizet vagy vizes nátrium-klorid oldatot, azonban más összetevők, mint például a diszperziót segítő anyagok, szintén alkalmazhatóak. Természetesen ahol a steril víz sterilen alkalmazandó, a készítményt és a hordozókat szintén sterilizálni kell. Előállíthatóak injektálható szuszpenziók, amely esetében alkalmas folyadék-hordozókat, szuszpendáló hatóanyagokat és hasonlókat alkalmazhatunk.

PÉLDÁK

A következő példák a találmány szerinti vegyületek néhány biológiai hatása illusztrálása célját szolgálják. Közelebbről a kísérleti adatok azt jelzik, hogy a találmány szerinti vegyületek gátolják az aktiváció által indukált IFN γ -, IL-2- és TNF α -szekréciót és T-sejt-proliferációt, azonban növelik az IL-4- és IL-5-termelést humán eredetű T-sejtekben, dóziszfüggő módon.

A találmány szerinti vegyületek által közvetített, perifériás T-sejtekre gyakorolt biológiai hatás, amely 48 óra elteltével érte el a maximumot, és látható volt PMA/ionomycin vagy PHA-val történő stimulálással, citokin-

fehérje és mRNS-szintjén detektáltuk normál személyeknél és *rheumatoid arthritis*-ben szenvedő páciensek esetében, megnövelte a 2. típusú citokintermelő sejtek számát, míg csökkentette az 1. típusú citokintermelő sejtek számát.

Ráadásul a találmány szerinti vegyületek által kiváltott, 2. típusú citokin-eltolódás indukciója egybeesett az indukálható nitrogénoxid-szintáz, c-myc, IL-6 és IL-1b mRNS-e csökkenésével (gyulladáscsökkentő hatást valószínűsítve), és még drámaibb volt a humán eredetű T-sejtek CD4⁺-populációja esetében. Ráadásul találmány szerinti vegyületek Th2-citokin-eltolódást indukáltak egéredetű nyirokmirigyből származó Th1-sejtekben *in vivo*, és (0.3 és 0.6 mg/kg-nál), i.p. beadva *BALB/c*-egerek esetében két, 1. típusú citokinközvetített akut gyulladásos válaszreakciót, dinitrofluor-benzolra adott kontakt hiperszenzitivitást és *Staphylococcus B*-enterotoxin által kiváltott gyulladásos válaszreakciót gátolt.

Ezek az *in vivo* hatások fokozott IL-10- és csökken IFN γ -mRNS-expresszióval függtek össze a nyirokszervekben. Összefoglalva ezek az adatok azt jelzik, hogy a találmány szerinti vegyületek funkcionálisan indukálhatnak Th2-citokin-eltolódást *in vitro* és *in vivo*.

Vegyületek

A találmány szerinti vegyületekre példaként említhető a 7- β -D-ribofuranozil-4-oxopyrrolo[2,3-d]pirimidin-5-karboxamidint a korábban leírtak szerint szintetizáltuk [Synthesis and cytokine modulation properties of pyrrolo[2,3-d]pyrimidine nucleosides. J. Med. Chem. 43:

2566-74 (2000)]. Mindkét vegyület molekulatömege 309.28, és vizes oldatban oldhatóak.

Humán eredetű T-sejtek előállítása és *in vivo* aktiválása

Egészséges donorokból vagy *reheumatoid arthritis*-ben szenvedő páciensekből perifériás mononukleáris vérsejteket állítottunk elő sűrűséggradiens-centrifugálással, majd T-sejt-dúsítással, *Lymphokwik* (*One Lambda*, Canoga Park, CA) alkalmazásával. A szennyező monocitákat műanyaghoz történő kitapasztással eltávolítottuk. A tisztított T-sejtekben >99% CD2⁺, <1% HLA-DR⁺ és <5% CD25⁺, és a sejteket *RPMI-AP5*-ben (20 mM HEPES-puffert, pH 7.4, 5% autológ plazmát, 0% L-glutamint, 1% penicillint/sztreptomicint és 0.01% 2-merkapto-etanol tartalmazó *RPMI-1640*-es tápközeg) tartottuk fenn.

Citokinfehérje-szintek meghatározása céljából T-sejteket (1×10^6 sejt 1 ml-es térfogatban) aktiváltunk 10 ng *PMA* és 0.5 μ g *ionomycin* (mindkettő a *Calbiochem*-től, *La Jolla*, CA) hozzáadásával, és 24-üregű lemezeken inkubáltuk 0-20 μ M nukleozid jelenlétében 48 órán át 37°C-on 5% CO₂-ben, párásított inkubátorban. Az aktiválást követően a felülúszókat sejtből származó citokintermelésre vizsgáltuk. Proliferációs és életképességi vizsgálatok céljára a fenti előíratot módosítottuk: 96-üregű lemez, 0.2×10^6 sejt, 0.2 ml térfogat és 2 ng *PMA*-val és 0.1 μ g *ionomycin*-nel történő aktiválás. Más kísérletekben 5×10^6 T-sejtet aktiváltunk 2 ml-ben 20 ng *PMA*-val és 1 μ g *ionomycin*-nel. Itt teljes RNS-t izoláltunk a T-sejtekből 6-24 órás inkubálás után, és

analizáltunk *RT-PCR*-rel a különböző citokinek és gyulladásai közvetítők mRNS-e szintjei meghatározása céljából. Ismét más kísérletekben humán eredetű T-sejteket tovább tisztítottunk (sejtdúsító reagens alkalmazásával, *Stem Cell Technologies*, Vancouver, BC) $CD4^{+}$ -sejtek ($<1\%$ $CD8^{+}$, *RosetteSep* humán $CD4^{+}$ -T-sejt-izoláló reagens), és $CD8^{+}$ -sejtek ($<1\%$ $CD4^{+}$, *RosetteSep* humán $CD8^{+}$ -T-sejt-izoláló reagens) tiszta T-sejt-alosztályok populációjának előállítása céljából, ami után 1×10^6 sejt/ml-t aktiváltunk *PMA*-val és *ionomycin*-nel, mint a teljes T-sejtes kísérletek esetében.

Extracelluláris citokinanalízisek

Humán citokinszinteket határoztunk meg sejtfelülszókban, megfelelő hígítások után, IL-2-re, IFN γ -ra, TNF α -ra, IL-4-re és IL-5-re specifikus *ELISA*-reagenskészletek alkalmazásával (*Biosource International*, Camarillo, CA). Egéreredetű citokinszinteket határoztunk meg egéreredetű IFN γ -ra és IL-4-re specifikus *ELISA*-reagenskészletek alkalmazásával (*R and D Systems*, Minneapolis, MN). Minden *ELISA*-eredményt pg/ml-ben fejeztünk ki. Bizonyos adatokat az aktivált kontroll százalékában mutatunk, az aktivált T-sejt teszt nukleozid mellett mért citokinszintje a nem kezelt, aktivált T-sejt-citokinszintjéhez viszonyítva $\times 100\%$. A teszt nukleozidok citokinszintekre gyakorolt zéró hatása az aktivált kontroll százalékos értékében 100%-ot ad. Alternatív módon az adatokat az aktivált kontrollhoz viszonyított százalékos változásként mutatjuk ($[(\text{teszt pg/ml} - \text{aktivált kontroll pg/ml}) / \text{aktivált kontroll pg/ml}] \times 100\%$). A teszt-

nukleozidok citokinszintekre gyakorolt zéró hatása az aktívált kontroll százalékos értékében 0%-ot ad.

ELISA-folt mérési eljárás („spot assay”)

ELISA-folt-lemezeket (Whatman Polyfiltronics, Rockland, MA) burkoltunk „befogó” (capture) antitesttel steril PBS-ben, egy éjszakán át. Egéreredetű, monoklonális, (mAb), humán eredetű interferon- γ -elleni antitestet (IFN γ , MD1-klón, Biosource) alkalmaztunk 4 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációban az IFN γ esetében. IL-2-elleni „befogó” antitestet (4 $\mu\text{g/ml}$, 5334.21. klón, R and D Systems) alkalmaztunk az IL-2, esetében, IL-4-elleni „befogó” antitestet alkalmaztunk (8D4-8. klón, Pharmingen, San Diego, CA) alkalmaztunk (5 $\mu\text{g/ml}$, TRFK-5. klón, Pharmingen) az IL-5 esetében. Steril PBS-sel történő kétszeri mosás után a lemezeket 1.5 órán át blokkoltuk 1% BSA-t tartalmazó steril PBS-sel, és ezután 3-szor mostuk. 200 μl RPMI-tápközegben (1% „pen-strep”, 1% glutaminsav és 10%-FCS) 0.2×10^6 PBMC-t helyeztünk minden üregbe 4 $\mu\text{g/ml}$ PHA-val nukleoziddal (10 μM) vagy anélkül, és 24 órán át (IL-2) vagy 48 órán át (IL-4, IL-5, IFN γ) tenyésztettük 37°C-on 5% CO $_2$ -ben. Mosás után, biotinilált, limfokin-elleni detektáló antitestet adtunk hozzá egy éjszakára, humán IFN γ -elleni (4 $\mu\text{g/ml}$, Biosource), IL-2-elleni antitestet (3 $\mu\text{g/ml}$, R and D Systems), IL-4-elleni antitestet (2 $\mu\text{g/ml}$, Pharmingen), és IL-5-elleni antitestet (2 $\mu\text{g/ml}$, Pharmingen). A biotinilált antitestek kötődésének meghatározása céljából tormaperoxidáz-sztreptavidint (1:2000 PBS-ben, 0.025% Tween, 1.5 óra, szobahőmérséklet, Vector, Burlingame, CA) alkalmaztunk. A lemezeket 12 ml

nátrium-acetát-pufferben (0.1 M nátrium-acetát, pH 5.0, és 6 μ l H_2O_2) oldott, 400 μ l AEC- (*Sigma*, St. Louis, MO, 10 mg oldva 1 ml dimetil-formamidban) alkalmazásával hívtuk elő. Az eredményül kapott foltokat számítógépes *ELISA spot image analyzer* (*ImmunoSpotTM Image Analyzer*, *Cellular Technology, Ltd.*, Cleveland, OH) készülékkel számláltuk, amelyet *ELISA*-foltok előre meghatározott feltételek mellett történő detektálására terveztek.

Proliferációs és életképességi vizsgálat

T-sejt-proliferációs válaszreakciókat vizsgáltunk [3H]-timidin (1 μ Ci, *ICN*, Irvine, CA) beépülésének mérésével minden vizsgálat utolsó 16 órájára. A sejteket szűrőkön gyűjtöttük össze, és DNS-szintézist mértünk szcintillációs számlálóval való meghatározással *Wallac Betapalte* számlálóval (*Perkin-Elmer/Wallac*, Gaithersburg, MD). Életképességet határoztunk meg propidium-jodid-kizárással (5 μ g/ml), nem kezelt és nukleoziddal kezelt humán eredetű T-sejtekkel, amelyeket *FITC-CD3*-mal festettünk (*Becton Dickinson*, San Jose, CA). A $CD3^+$ -sejtek életképességét propidium-jodid hozzáadása után (*Roche Molecular Biochemicals*, Indianapolis, IN) áramlási (*flow*) citometriával határoztuk meg (*FACScan*, *Becton Dickinson*).

Kontakt hiperszenzitivitás (CHS)

DNFB-vel, egy kontakt allergénnel szembeni reaktivitást határoztunk meg *BALB/c*-egerekben, a korábban leírtak szerint [Ishii, N., Takahashi, K., Nakajima, H., Tanaka, S., Askenase, P.W. *DNFB contact sensitivity (CS) in BALB-c and C3H/He mice. J. Invest. Dermatol.* 102: 321 (1994)]. Rö-

viden, „naív” egereket szenzitizáltunk 20 µl 0.3% *DNFB* aceton:olivaolaj 4:1 alkalmazásával, borotvált hason. A maximális *CHS* kiváltása céljából az egereket minden fül mindkét oldalán 20 µl 0.12%-os *DNFB* hatásának kitéve provokáltuk, öt nappal a szenzitizálás után. Nem szenzitizált egereket szintén provokáltunk, és minden kísérletnél kontrollként alkalmaztunk. 24 óra elteltével a fül vastagságát mértük és a *DNFB*-re adott válaszreakciót a provokáció utáni értékből a provokáció előtti értéket kivonva állapítottuk meg. Ahol jelöltük, a 7-β-D-ribofuranozil-4-oxopyrrolo[2,3-d]pirimidin-5-karboxamidint adtunk be 6.2 µg dózisban 50 µl PBS-ben (0.3 mg/kg) vagy 12.4 µg dózisban 100 µl PBS-ben (0.6 mg/kg) i.p. injekcióban a *DNFB*-vel történő provokáció idején. A 7-β-D-ribofuranozil-4-oxopyrrolo[2,3-d]pirimidin-5-karboxamidin ilyen dózisa maximális hatást adtak az előzetes optimalizációs vizsgálatokban. Az utolsó fülvastagság-mérések után az egereket feláldoztuk *cervicalis* diszlokációval, és a hónalji/laterális hónalji nyirokcsomókat eltávolítottuk. A teljes celluláris RNS izolált nyirokcsomó-sejtekből történő kivonása után *RT-PCR* és *Southern Blot* analíziseket hajtottunk végre az egér IFNγ-, IL-2- és IL-10 mRNS-szintek mérése céljából.

Staphylococcus B-enterotoxin-kezelés in vivo

SEB-t injektáltunk i.p. 50 µg/egér dózisban a 0. napon. 4 egeret tartalmazó 3 csoportban. Az egyik csoportot 6.2 µg 7-β-D-ribofuranozil-4-oxopyrrolo[2,3-d]pirimidin-5-karboxamidinnel (0.3 mg/kg), és egy csoportot 12.4 µg -β-D-ribofuranozil-4-oxopyrrolo[2,3-d]pirimidin-5-

karboxamidinnel (0.6 mg/kg) oltottunk be, mindkettőt 50 µl PBS-sel, i.p., 1 órával a *SEB*-bel történő injektálás előtt. A 7-β-D-ribofuranozil-4-oxopyrrolo[2,3-d]pirimidin-5-karboxamidin 0.6 mg/kg-os dózisa maximális hatást adott az előzetes optimalizációs vizsgálatokban. 24 órával később minden egeret elaltattunk inhalációs altató, *Penthane* (*Abbott Labs*, N. Chocago. IL) alkalmas dóziséval, szívből elvéreztettük teljes vér kinyerése céljából, és a lépeket eltávolítottuk. Splenocita-szuszpenziókat állítottunk elő az egyedi lépekből, miután a szennyező vörösvértesteket eltávolítottuk ACK-lizáló pufferrel (0.15 M NH_4Cl , 1 mM KHCO_3 , és 0.1 M Na_2EDTA pH 7.2-7.4 szűrt). Miután az izolált splenocitákból a teljes RNS izoláltuk, *RT-PCR*-t és *Southern Blott* analízist hajtottunk végre az egér $\text{IFN}\gamma$ -, IL-2 -, IL-10 és iNOS -mRNS-szintjei meghatározása céljából. Nitrogén-oxid-termelést határoztunk meg annak stabil végterméke, nitrit és nitrát mérésével. Teljes nitrit/nitrát-szinteket határoztunk meg a nitrát nitritté való redukciója után nitrát-szintáz-enzimreakcióval, majd kolorimetriás mérési eljárással (*Sigma*), amely a teljes nitrit *Griess*-reagens hatására, bíbor azovegyületté történő redukcióján alapul.

Citokin-mRNS analízise

Teljes celluláris RNS-t extraháltunk *Trizol*-reagens (*Life Technologies*, Gaithersburg, MD) alkalmazásával. A cDNS-szintézis-reakciót oligo (dT) 12-18 láncindító és *Superscript-II* reverz transzkriptáz (*Life Technologies*) alkalmazásával hajtottuk végre. A *PCR*-reakció (*GeneAmp PCR*-

reagenskészlet, *Perkin-Elmer*, Foster City, CA) 50 μ l keverékben tartalmazott cDNS-t, dNTP-eket (mindegyik 200 μ M), 0.5 μ M mindegyik láncindítópárból és 1.25 egység *Taq*-polimerázt. A humán eredetű IL-2, IL-10, IL-4, IL-6, IL-1b, IFN γ , c-myc, IL-2R, CD40L (*Stratagene*, La Jolla, CA) iNOS (*Clontech*, Palo Alto, CA) és pHE7 riboszómális gén láncindítóit alkalmaztuk. Tipikus amplifikálási körülmények többek között: 5 perc denaturálás 94°C-on és 5 perc annealálás 60°C-on, majd 35 ciklus: 1.5 perc 72°C-on, 45 másodperc 94°C-on és 45 másodperc 60°C-on, végső extenziós lépés 10 percig, 72°C-on. Az egérer eredetű IL-2, IFN γ és β -aktin láncindítóit a *Stratagene*-től, és az egérer eredetű IL-10-ét a *Clontech*-től szereztük be. A *Stratagene* egércitokin-láncindítók amplifikálási körülményei: 5 perc denaturálás 94°C-on és 5 perc annealálás 60°C-on, majd 35 ciklus: 1.5 perc 72°C-on, 45 másodperc 94°C-on és 45 másodperc 60°C-on és 2 perc 72°C-on, végső extenziós lépés 7 percig, 72°C-on.

Minden géntermék esetében kísérletileg határoztuk meg az optimális cDNS-hígítást és azt azzal a cDNS-hígítással definiáltuk, amely a telítési körülmények alatti detektálható koncentrációt ér el. A PCR-termékeket 2%-os, etídiumbromidot tartalmazó agarózgélen választottuk el, és *Hybond-N*⁺-membránon immobilizáltuk (*Amersham Pharmacia*, Piscataway, NJ) egy éjszakán át, 0.4 M NaOH és 0.2 M NaCl alkalmazásával. A blottokat az eredeti láncindítókból előállított 32P- γ ATP-vel jelölt oligonukleotid-próbákkal (*Stratagene*), vagy az egyedi PCR-termékek centrális régió-

jával komplementernek tervezett (humán eredetű iNOS, egér-eredetű IL-10 és humán eredetű pHE7) specifikus próbákkal hibridizáltattuk. A pHE7 szenz láncindítóból előállított próbákkal történő hibridizálás után ekvivalens feltöltést („loading”) állapítottunk meg. A mosott blottokat ezután *PhosphorImager* (Biorad, Richmond, CA) vizsgáltuk. A citokin-mRNS vagy más teszt-mRNS viszonylagos változásait a denzitometriás értékekben adtuk meg, és a „bemenő” RNS (input) bármely ingadozására normáltuk úgy, hogy meghatároztuk a kérdéses mRNS-nek a pHE7 fenntartó (*housekeeping*) mRNS-ére vonatkoztatott arányát.

Th1 és Th2 T-sejtek

8-10 BALB/c- vagy C57BL/6-eget feláldoztunk *cervicalis* diszlokációval, és a hónalji/laterális hónalji és térdhajlati nyirokcsomókat eltávolítottuk, nyirokcsomó-sejt-szuszpenziót állítottunk elő mindegyik állatból, és összegyűjtöttük. Egéreredetű CD4⁺ T-sejteket izoláltunk az összegyűjtött nyirokcsomósejt-szuszpenzióból minden egérvonal esetében, egéreredetű T-sejtdúsító reagens, *StemStep* alkalmazásával (*Stem Cell Technologies*). A Th1- és Th2-sejtek előállítását a korábban leírt előírathoz hasonlóan hajtottuk végre [Austrup, F., Vestveber, D., Borges, E., Lohning, M., Brauer, R., Herz, U., Renz, R., Hallmann, R., Scheffold, A., Radbruch, A., Hamann, A., P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* 385: 81 (1997)]. Röviden, a sejteket optimális mennyiségű (1 mg/üreg) CD3-ellein mAb-vel (145-2C11. klón, Pharmingen) burkolt, 24-üregű szövet-

tenyésztő lemezekben aktiváltuk a jelzett rekombináns egércitokinek és citokin-Ab-k (mind a *Pharmingen*-től) jelenlétében (IL-2 önmagában, 50 U/ml; Th1: IL-2, 50 U/ml; IL-12, 1000 U/ml; IFN γ 10 mM ICN-10776 jelenlétében és anélkül, és Th2: IL-2, 50 U/ml; IL-4, 10ng/ml; IFN γ -elleni antitest (XMG1.2. klón, 10 mg/ml), és 4 napon át tenyésztettük. A sejteket friss lemezekre vittük át tápközegválttatás nélkül, és további 48 órán át inkubáltuk, azután háromszor mostuk és friss tápközeget adtunk hozzá, egy éjszakán át inkubáltuk, és újra stimuláltuk 5 órán át PMA-val (10 ng) és *ionomycin*-nel (0.5 mg). Ezután sejtmentes felülúszót vettünk az egéreredetű IL-4- és IFN γ -szinteket meghatározó *ELISA* céljára. Az újonnan nem stimulált sejtek IL-4-re és IFN γ -ra negatívak voltak, azt jelezve, hogy a tenyésztés során adott citokint nem vittük át.

Statisztikai analízis

Trendanalízist hajtottunk végre egyutas vagy kétutas ANOVA-analízis alkalmazásával. A releváns statisztikai szignifikanciát a *Student-Newman-Keuls* többszörös összehasonlító eljárással állapítottuk meg.

Eredmények

Az ICN-10776-nak az aktivált, humán eredetű T-sejtek citokin- és proliferatív válaszreakcióra gyakorolt dózishatása

Vizsgáltuk az 1. típusú és 2. típusú citokinprofilt, valamint a T-sejt proliferatív válaszreakciókat, amelyet 7- β -D-ribofuranozil-4-oxopirrolidin-5-karboxamidin (ICN-10776) és humán eredetű, aktivált, pe-

rifériás T-sejtek 48 órás inkubálásával indukáltunk. 0.2-20 μ M-os dózistartományban az ICN-10776 növelte a PMA-ionomycin (PMA-ION) által indukált, 2. típusú citokinek szintjét, az IL-4-et és IL-5-öt, dóziszfüggő módon, 10 μ M-nál 166%-os és 77%-os csúcsnövekedéssel (1B és 1D. ábra). A bemutatott adatok 5 donor reprezentatív mintájából származnak. Ráadásul azonos dózistartományban és szintén dóziszfüggő módon, az ICN-10776 drámai módon elnyomta (szuppresszálta) az 1. típusú, PMA-ION által indukált citokineket, az IL-2-t, IFN γ -t és TNF α -t, 20 μ M-nál 62%-os, 72%-os és 78%-os csúcsszuppresszióval (1F. ábra). Egy második proliferációs mérési eljárást is végrehajtottunk kolonimetriás mérési eljárás alkalmazásával (I-es MTT-sejtproliferációs reagenskészlet, Roche Molecular Biochemicals), amely az MTT tetrazóliumsó mitokondriális dehidrogenázok általi, formazan-festékké történő konverzióján alapul (540 nm-en detektálható). A mérési eljárás alkalmazásával az ICN-10776 drámai módon gátolta a T-sejtproliferációt, azt bizonyítva, hogy az ICN-10776 hatása nem a timidinfelvétel interferenciájának tulajdonítható, amint azt más nukleozidanalógok esetében bizonyított. A citokinmoduláció hasonló hatásait láttuk PHA-val stimulált T-sejteken és PBMC-ken (az adatokat nem mutatjuk be).

Egy másik kísérletsorozatban PMA-ION-nel önmagában és 2, 5 vagy μ M ICN-10776 vagy annak L-enantiomere, az ICN-17465 jelenlétében aktivált T-sejteket aktiváltunk 6 órán át vagy 24 órán át, majd RNS-t izoláltunk és RT-PCR-t hajtottunk végre az 1. és 2. típusú citokin-mRNS szintjei meg-

határozása céljából. Azt figyeltük meg, hogy növekvő ICN-10776 dózisainál az IL-4-mRNS szintje növekedett és az IFN γ - és TNF α -mRNS szintje ezzel egyidejűleg csökkent (2. ábra, három donor reprezentatív mintájából származó adatok). Érdekes módon az ICN-10776 L-enantiomerénél, ICN-17465-nél e citokinek aktivált szintjeinél hasonló modulációt nem figyeltünk meg, ami a D-ribóz-cukorrész bioaktivitáshoz való abszolút szükségességét bizonyítja (2. ábra).

Egy harmadik kísérletsorozatban PHA-val önmagában vagy 10 μ M ICN-10776-tal vagy L-enantiomerjével, ICN-17465-tel PBMC-kat aktiváltunk 24-48 órán át specifikus citokinantitesttel burkolt folt-ELISA-lemezeken (*spot ELISA*). A specifikus citokintermelő sejtek számát ezután az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint határoztuk meg. Az IL-2- és IFN γ -termelő sejtek számának drámai csökkenését figyeltük meg ICN-10776 jelenlétében, azonban az L-enantiomer, az ICN-17465 jelenlétében nem (3. ábra). Ezzel szemben az ICN-10776 az IL-4- és IL-5-termelő sejtek számának jelentős növekedését okozta (az L-enantiomer, az ICN-17465 nem) (3. ábra).

Összefoglalva, ezek az adatok azt mutatják, hogy az ICN-10776 az 1. típusú citokinek szintjét és a T-sejt-proliferációt is csökkenti, míg növeli a 2. típusú citokinek szintjeit dóziszfüggő módon. A ICN-10776 citokinválaszreakcióra gyakorolt hatásait megfigyeltük fehérjeszinten és mRNS-szinten is, és ezek érintették a specifikus citokintermelő sejtek számát. Ráadásul a 2. típusú citokin-

eltolódás indukciójához D-ribozilációra van szükség, mivel e nukleozid L-enantiomerje nem mutatott bioaktivitást.

Az ICN-10776 aktivált, humán eredetű T-sejtek citokin-válaszreakciójára és proliferációjára gyakorolt időleges hatása.

Annak eldöntését tűztük célul, hogy az 1. típusú citokinexpresszió elnyomása és a T-sejt-proliferatív válaszreakció gátlása csupán az ICN-10776 T-sejt-toxicitása-e. Ha a toxicitás volt a felelős a megfigyelésért, akkor a T-sejtek életképességét az inkubációs idő és az ICN-10776 dózisa is befolyásolja. Propídium-jodid-kizárási vizsgálatokat alkalmazva azt figyeltük meg, hogy az életképesség 20 μ M 10776-tal történő, 48 órás inkubálás után a nyugvó CD3⁺-T-sejtek életképessége 95%-ról 85%-ra csökkent (4A, 4B. ábra). A PMA-ION által aktivált CD3⁺-T-sejtek esetében nukleozidkezelés nélkül az életképesség időleges, 8 óránál $91 \pm 1\%$ -ra, 24 óránál $88 \pm 2\%$ -ra, és 48 óránál $83 \pm 1\%$ -ra való csökkenését figyeltük meg, azonban 0.2-20 μ M-os dózistartományban nem tapasztaltunk szignifikáns mértékű eltérést nukleozid jelenlétében (4C. ábra). Ezek az adatok azt valószínűsítik, hogy az életképesség kis csökkenését elsődlegesen a T-sejtek aktiváció által indukált apoptózis indukálja, és nem a nukleozid közvetlen toxikus hatása. Ráadásul az ICN-10776-tal történő inkubálás időleges hatása a T-sejt-proliferáció (4D. ábra) és IFN γ -szekréció (4F. ábra) dózisfüggő csökkenését mutatta, a szupresszió csúcsa azonban 48 óránál volt. Ehhez hasonlóan, az IL-4-szint dózisfüggő növekedését szintén 48 óránál figyeltük meg (4E. ábra).

ra). Ezek az adatok azt mutatták, hogy az ICN-10776-tal történő kezelést követően megfigyelt biológiai hatások nem az *in vitro* toxicitás eredményei, és a hatás csúcsa 48 órás inkubálás után látható. A hatás csökkenése 48 óra után a nukleozid defoszforiláció vagy deriboziláció általi, inaktív degradációs termékekké való degradációjával lehet összefüggésben.

Az ICN-10776 $\text{TNF}\alpha$ -, $\text{IFN}\gamma$ - és IL-4-termelésre gyakorolt komparatív hatásai normál donorokból és *rheumatoid arthritis*-ben szenvedő páciensből származó aktivált, perifériás T-sejtekben.

Korábban kimutatták, hogy a perifériás T-sejtek 2. fenotípussá történő differenciálódása *in vitro rheumatoid arthritis*-ben csökkent mértékű normál a donorokhoz viszonyítva [Berg, D.J., Leach, M.W., Kuhn, R., Rajewski, K., Muller, W., Davidson, N.J., Rennick, D., Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses. *J. Exp. Med.* 182: 99 (1995)]. Összehasonlítottuk az ICN-10776 16 normál donorból és 16 RA-páciensből származó, PMA-ION-aktivált, perifériás T-sejt aktivált citokinprofiljára gyakorolt hatását. Azt figyeltük meg, hogy 10 μM ICN-1776 által indukált 2. típusú citokin-eltolódás a normál donorokból és RA-páciensből származó perifériás T-sejtek esetében is megnyilvánult, amint azt a szekretált $\text{IFN}\gamma$ csökkent szintjeiből megállapítottuk (43% és 63%, $p=0.0008$ arra, hogy az ICN-10776<, mint a nem kezelt csoportban és az ICN-17465-tel kezelt csoportban), és emelkedett az IL-4-termelés (266% és 192%, $p<0.0001$ arra,

hogy az ICN-10776 >, mint a nem kezelt csoport és az ICN-17465-tel kezelt csoport) (5A. ábra, bal oldalon). Noha a citokin-válaszreakciók szignifikáns mértékben nagyobbak voltak a normál csoportban ($p < 0.0001$), nem volt szignifikáns mértékű különbség az ICN-10776 által indukált, 2. típusú citokineltolódás nagyságrendjében, egyik csoportban sem (5A. ábra, bal oldal). A perifériás T-sejteket $10 \mu\text{M}$ ICN-17465-nek, az ICN-10776 L-enantiomerjének kiteve nem tapasztaltunk az aktivált citokinprofilon hasonló hatást egyik csoport esetében sem (5A. ábra, jobb oldal). Különálló kísérletekben PMA-ION-stimulált, perifériás T-sejtek aktivált citokin-mRNS-profilját normál donorokból és RA-páciensekből származó T-sejtek esetében is meghatároztuk $10 \mu\text{M}$ ICN-10776 és ICN-17465 jelenlétében és anélkül. Amint az a fenti, szekretált citokinfehérjére vonatkozó adatokból látszik, az ICN-10776, az ICN-17465-tel ellentétben, megnövelte az IL-4-mRNS-szinteket és szuppresszálta az IFN γ - és TNF α -szinteket mindkét csoportból származó perifériás T-sejtek esetében (5B. ábra). Ezáltal a 2. típusú citokineltolódás ICN-10776 általi, fehérje-és mRNS-szinten is megnyilvánuló indukciója a T-sejtekben általános jelenséget képvisel, és valószínűleg nem csökken az RA-páciensekből származó T-sejtek esetében sem.

Az ICN-10776 által közvetített citokin-válaszreakciók
gyulladás-keltő és gyulladás-elleni közvetítőanyagokra gyakorolt hatása

Mivel az 1. típusú citokin-eltolódás általában gyulladás-keltő válaszreakciókat indukál, míg a 2. típusú citokin-eltolódás rendszerint gyulladás-elleni válaszreakciókhoz vezet, meghatároztuk az 1. és 2. típusú citokinek mRNS-szintjeit aktivált, humán eredetű T-sejtekben és összehasonlítottuk ezeket az azonos donorból származó sejtek néhány kritikus gyulladás-elleni vagy gyulladás-keltő közvetítő mRNS-szintjeivel. Azt figyeltük meg, hogy az ICN-10776, ráadásul az 1. típusú (az IFN γ , a TNF α és az IL-2 szuppressziója) és 2. típusú citokinekre (IL-4 növelése) gyakorolt hatásán kívül az IL-10, egy gyulladás-elleni citokin szintjének növekedését is indukálta, és szuppresszálta két gyulladás-keltő citokin, az IL-6 és az IL-1 β szintjeit. Ráadásul ezzel egyidejűleg csökkent az indukálható nitrogén-oxid-szintáz, a gyulladás-keltő közvetítőanyag termeléséért felelős enzim (iNOS) expressziója, nitrogén-oxidot is megfigyeltünk (6. ábra). Ráadásul, a ICN-10776 anti-prolifertív hatása is bebizonyosodott, a c-myc, proliferáló limfocitákban erősítő szabályozás alatt álló protoonkogén szuppressziója miatt (6. ábra). Ezek az adatok azt mutatják, hogy az ICN-10776-kezelés által kiváltott, megnövelt 2. típusú citokin-válaszreakció és a gyengített 1. típusú citokin-válaszreakció megnövelt gyulladás-elleni környezetet, valamint határozott anti-proliferatív hatást eredményez perifériás T-sejtekben.

Az ICN-10776 hatása az aktivált citokin-válaszreakcióra CD4⁺- és CD8⁺-T-sejt-alosztályokon

A *helper* T-sejt-alosztály (CD4⁺) is, és a citotoxikus (CD8⁺) T-sejt-alosztály is fontos szerepet játszik az antigénre adott immunválaszban, függetlenül attól, hogy az antigén idegen vagy saját. Mindkét alosztály képes az 1. típusú vagy a 2. típusú citokinek termelésére való differenciálódásra. Mivel a CD4⁺- és CD8⁺-T-sejt eltérő szerepet játszik az autoimmunitás patogenezisében és a patogénekre adott protektív válaszreakcióban, fontos volt, hogy megkülönböztessünk bármely, differenciált hatást a két T-sejt-alosztályban az ICN-10776 által kiváltott 2. típusú citokineltolódásban. Így összehasonlítottuk az ICN-10776-közvetített aktivált citokin-válaszreakciót izolált CD4⁺- és CD8⁺-T-sejteken és azonos donor összes T-sejtjei esetében. A szekretált IL-4-szintek szignifikáns módon megnövekedtek minden T-sejt-csoportban a PMA-ION-nal történő 48 órás stimulálás után az ICN-10776 jelenlétében, de az ICN-17465 jelenlétében nem, a nem kezelt, aktivált kontrollokhoz viszonyítva ($p < 0.0001$ arra, hogy az ICN-10776>a nem kezelt és ICN-17465-tel kezelt) (7. ábra). Ráadásul az IFN γ -szintek szignifikáns mértékben csökkentek mindhárom T-sejt-csoportban az aktivált kontrollhoz vagy az ICN-17465-tel kezelt csoportokhoz viszonyítva ($p < 0.0001$). Meglepő módon az ICN-10776 által közvetített IL-4-növekedés a legdrámaibb a CD4⁺-T-sejtek esetében volt (994%-os növekedés az aktivált kontrollhoz viszonyítva, a CD8⁺-T-sejteknél 228%-kal és az összes T-sejtnél 320%-kal összehasonlítva,

$p < 0.03$). Ráadásul az IFN γ ICN-10776-tal történő szuppressziója szintén sokkal drámaibb volt a CD4⁺-T-sejtek esetében, noha mindhárom T-sejtcsoporthoz szignifikáns mértékű volt (81%-os csökkenés az aktivált kontrollhoz viszonyítva, CD8⁺-T-sejteknél 37%-os és az összes T-sejtnél 52%-os csökkenéssel összehasonlítva, $p < 0.05$). (7. ábra). Hasonló szuppresszív hatást nem figyeltünk meg az ICN-17465-tel kezelt három csoport egyikében sem. Ezek az adatok azt mutatják, hogy CD4⁺-T-sejtek voltak a legfogékonyabbak az ICN-10776 által közvetített citokinmoduláció iránt. Az is valószínűsíthető, hogy a CD8⁺-T-sejtek ellenállóbbak lehetnek az 10776 által közvetített hatásokkal szemben, és valószínűleg szabályozójelet nyújtanak a CD4⁺-T-sejtek számára, ami elfojtja az ICN-10776 által indukált, 2. típusú citokineltolódást.

Az ICN-10776 hatása az egérereredetű Th1-sejtek keletkezésére

Azt vizsgáltuk, hogy az ICN-10776 indukálhat-e 2. típusú citokineltolódást akár olyan körülmények között, amelyek normális körülmények között Th1-sejtek keletkezését idézik elő egérereredetű limfoid T-sejteknél. BALB-c és C57BL/6 (egerekből származó) nyirokcsomói T-sejteket izoláltunk és Th1-sejteket állítottunk elő kezdeti, CD3-elleni antitesttel és IL-2-vel, IFN γ -val és IL-12-vel burkolt lemezen történő inkubálást követően, a korábban leírtak szerint [Austrup, F., Vestweber, D., Borges, E., Lohning, M., Brauer, R., Herz, U., Renz, H., Hallmann, R., Scheffold, A., Radbruch, A., Hamann, A., P- and E-selectin mediate

recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. Nature 385: 81 (1997)]. Ezek a Th1-sejtek a restimulálás során alacsony szintű IL-4-et és jelentős mennyiségű IFN γ -t szekretálnak, a kizárólag CD3-elleni antitesttel és IL-2-vel történő kezeléshez viszonyítva (8. ábra). Az első inkubálási periódusban az ICN-10776-tal történő együttes inkubálás azonban ezeket az egérereredetű T-sejtek esetében magasabb szintű IL-4- és alacsonyabb szintű IFN γ -termelést indukált, mint a Th2-sejtek esetében (amelyeket a CD3-elleni antitesttel és IL-2-vel, IL-4-gyel és IFN γ -elleni antitesttel történő restimulálás után állítottunk elő) (8. ábra). Ezek a megfigyelések mindkét egértörzs esetében konzisztensek voltak. Összefoglalva ezek az adatok azt mutatják, hogy az ICN-10776 Th2-sejtek keletkezését indukálhatja még olyan körülmények között is, amelyek Th1-sejtek keletkezését segítik elő.

A kontakt hiperszenzitivitási válaszreakció ICN-10776 beadását követően fellépő csökkenése megnövelt szintű IL-10-expresszióval és csökkent IL-2- és IFN γ -expresszióval függ össze egérereredetű nyirokcsomósejtek esetében

Kontakt hiperszenzitivitási válaszreakciót (CHS) váltottunk ki DNFB-vel előkezelt BALB/c-egereknél, miután 0.2%-os DNFB hatásának kitéve a füleken válaszreakciót provokáltuk, a korábban leírtak szerint [Ishii, N., Takahashi, K., Nakajima, H., Tanaka, S., Askenase, P.W., Dnfb contact sensitivity (CS) in BALB/c and C3H/He mice. J. Invest. Dermatol. 102: 321 (1994)]. A 9A. ábrán bemutatjuk a DNFB-vel előkezelt és a naív egerek, és a 0.3 mg/kg és 0.6

mg/kg ICN-10776 -tal kezelt egerek esetében a fülduzzadási méréseket. Ebben a reprezentatív kísérletben a válaszreakció provokálása során i.p. beadott ICN-10776 nagyban csökkentette a DNFB-re adott CHS-válaszreakciókat dóziszfüggő módon, amint azt a fülvastagság átlagos csökkenése mutatja: 42% a 0.3 mg/kg, és 68% a 0.6 mg/kg dózis esetében 24 órával a válaszreakció provokálása után (a CHS-gátlást a nem előkezelt, DNFB-vel provokált (naív) egerek válaszreakcióinak kivonása után számítottuk ki). Nem figyeltünk meg lényeges változást a válaszreakció provokálása utáni fülvastagságban a DNFB-vel előkezelt, aceton-olivaolajjal provokált egerek, vagy aceton-olivaolajjal előkezelt, DNFB-vel provokált egerek esetében. Ráadásul, amint a 9B. ábrán bemutatjuk, az egéreredetű IL-10 mRNS-expressziója a nyirokcsomói sejtekben nagymértékben növekedett, azonban az IL-2- és IFN γ -mRNS-szintek a DNFB-vel előkezelt és ICN-10776-tal kezelt egerek esetében alapvetően csökkentek, a csak DNFB-vel előkezelt egerekhez viszonyítva. Összefoglalva ezek az adatok azt bizonyítják, hogy a BALB/c-egerekben az *in vivo* CHS-válaszreakciók ICN-10776-tal kiváltott csökkenése az IL-10 (a DNFB-re adott CHS-válaszreakcióban a fő szabályozócitokin) szintje növekedésével, és az IL-2 és IFN γ szintje (mindkettő a CHS-válaszreakciók fontos közvetítőanyaga) szuppressziójával függ össze.

A nitrogénoxid-kibocsájtással meghatározott, SEB-által indukált gyulladásai válaszreakciók csökkenése az ICN-10776 beadását követően *in vivo* az IL-10-expresszió növeke-

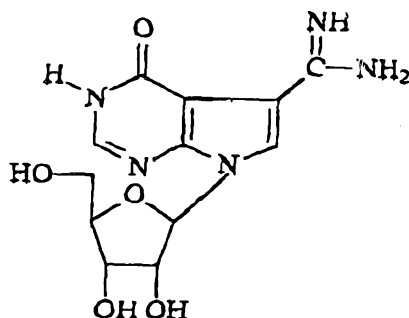
désével és az IFN γ -expresszió csökkenésével függ össze egérreredetű splenocitákban

SEB-által indukált gyulladásai válaszreakciókat váltottunk ki *BALB/C*-egerekben 50 μ l SEB i.p. injekcióban történő beadása után, a korábban leírtak szerint [Tam, R.C., Ramasamy, K., Bard, J., Pai, B., Lim, C., Averett, D.R., The ribavirin analog ICN 17261 demonstrates reduced toxicity and antiviral effects with retention of both immunomodulatory activity and reduction of hepatitis-induced serum alanine aminotransferase levels., *Anticancer Agents. Chemother.* 44: 1276 (2000)]. A 10A. ábrán bemutatjuk a 0.3 mg/kg vagy 0.6 mg/kg ICN-10766-tal kezelt egerekben az SEB-provokáció után mért teljes szérumszén-dioxid-nitritmérések eredményeit. Ebben a reprezentatív kísérletben, az ICN-10766 provokáció idején történő beadása nagymértékben csökkentette az SEB által kiváltott gyulladásai válaszreakciókat, dóziszfüggő módon, amit a szérumszén-dioxid-nitritszintjei csökkenése mutatják: 54% a 0.3 mg/kg dózishoz és 78% a 0.6 mg/kg dózishoz, 24 órával a provokáció után. Ráadásul, a 10B. ábrán bemutatottak szerint, az egérreredetű IL-10-mRNS expressziója nagymértékben növekedett, azonban a splenociták esetében az IFN γ -mRNS-szintek alapvetően csökkentek az ICN-10766-tal kezelt és SEB-bel provokált egerek esetében, a csak SEB-bel provokált egerekhez viszonyítva. Összefoglalva, ezek az adatok azt bizonyítják, hogy *in vivo*, *BALB/c*-egerekben SEB által indukált gyulladásai válaszreakciók ICN-10766 általi csökkenése gyulladáselleni citokin, az IL-10 (a SEB által kiváltott gyulladás követlen

szabályozója) szintje növekedésével, és az IFN γ (a SEB által kiváltott gyulladásai válaszreakciók fontos közvetítőanyaga) szintje elnyomásával függ össze.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Az 1. képletű vegyület alkalmazása rendellenes állapotként autoimmun betegség vagy gyulladásos betegség kezelésére szolgáló gyógyszer előállításában, ahol a vegyület cukorrészének kémiai konfigurációja L-konfiguráció vagy D-konfiguráció.



1. képlet

2. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a rendellenes állapot autoimmun betegség.

3. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az autoimmun betegség *rheumatoid arthritis*, *sclerosis multiplex* vagy *diabetes*.

4. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az autoimmun betegség *rheumatoid arthritis*.

5. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az autoimmun betegség *sclerosis multiplex*.

6. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az autoimmun betegség *diabetes*.

7. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol rendellenes állapot gyulladásos betegség.

8. A 7. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a gyulladásos betegség kontakt *dermatitis*.

9. A 7. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a gyulladásos betegségben az 1. típusú citokinexpresszió magasabb szintű, mint az 1. típusú citokinexpresszió egészséges személy esetében.

10. A 9. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az 1. típusú citokin interleukin-2.

11. A 9. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az 1. típusú citokin tumornekrózis-faktor- α .

12. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a gyógyszer *in vivo* beadásra van formulázva.

13. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a gyógyszer orális beadásra van formulázva.

14. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a gyógyszer injekcióban történő beadásra van formulázva, és ahol a vegyület cukorrésze L-konfigurációjú.

15. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a a vegyület dózisa 0.1 mg/kg páciens testsúly és 1.0 mg/kg páciens testsúly közötti.

16. A 2. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az autoimmun betegségben a 2. típusú citokinexpresszió magasabb szintű, mint az 2. típusú citokinexpresszió egészséges személy esetében.

17. a 16. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a 2. típusú citokin interleukin-4.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

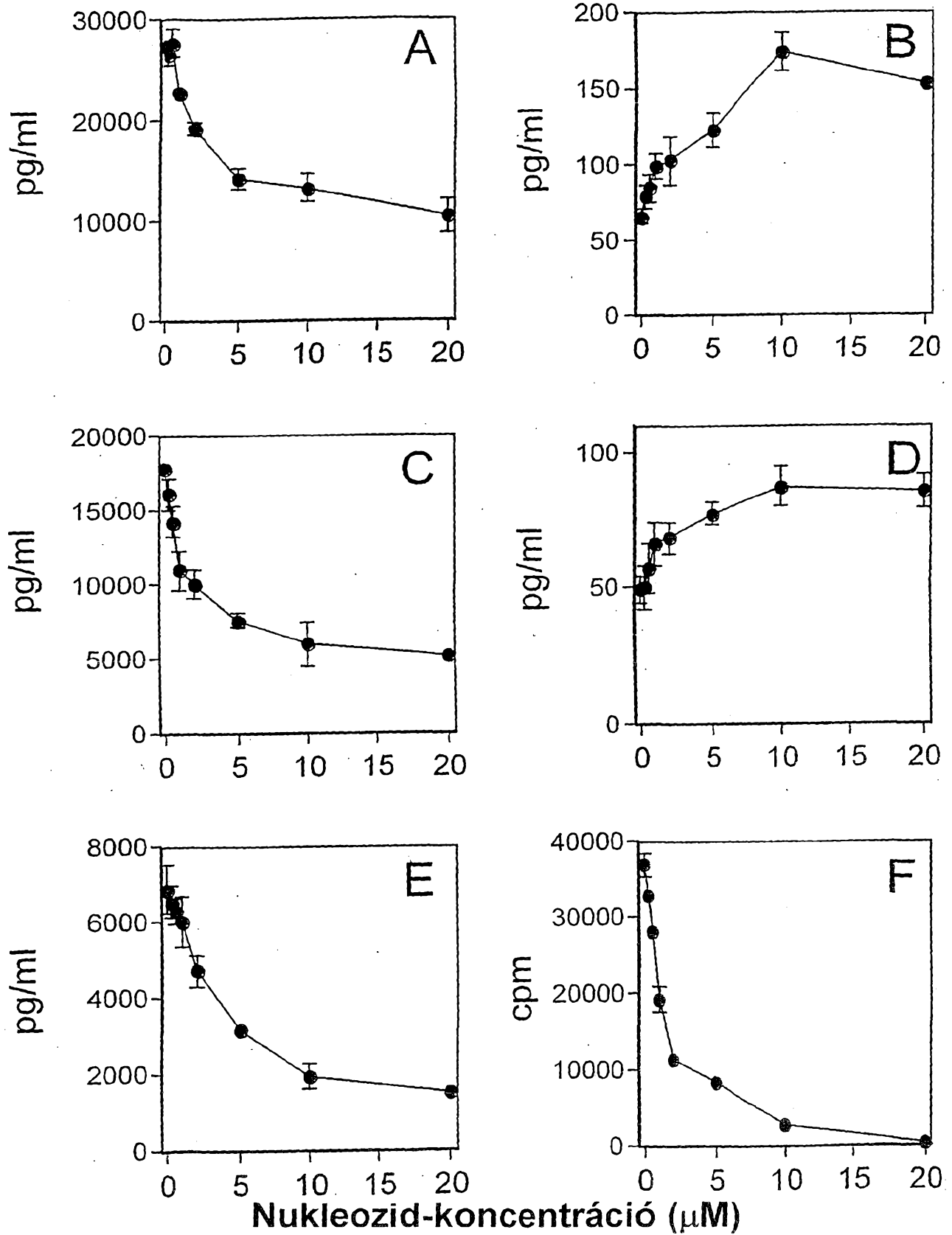


Dr. Svingor Ádám

szabadalmi ügyvivő

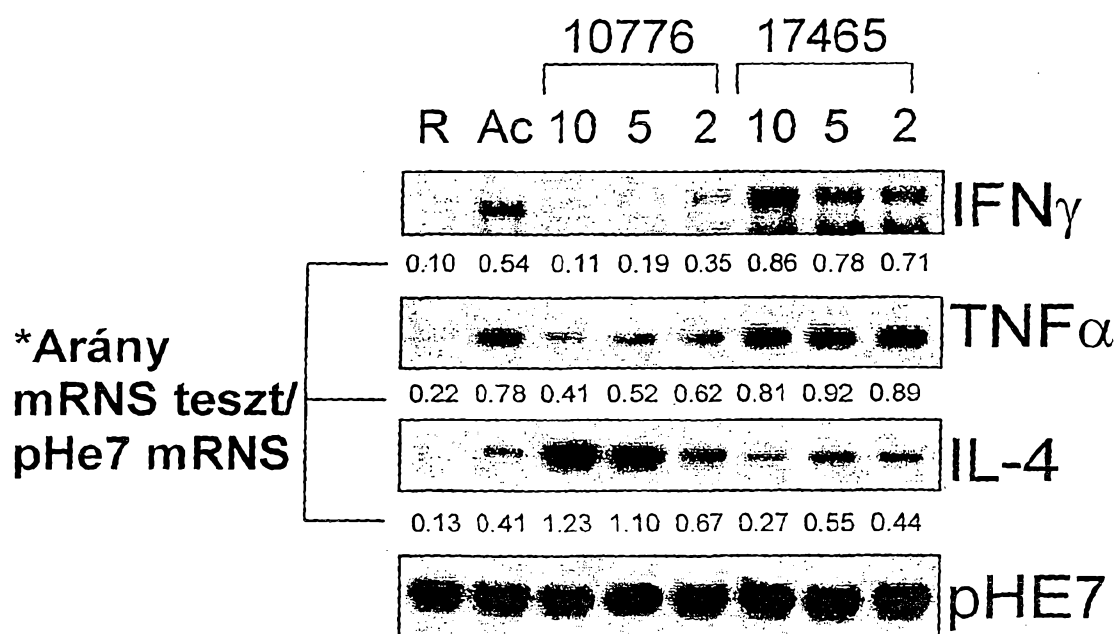
1060p. rojard
2003. máj. 28.

1. ábra



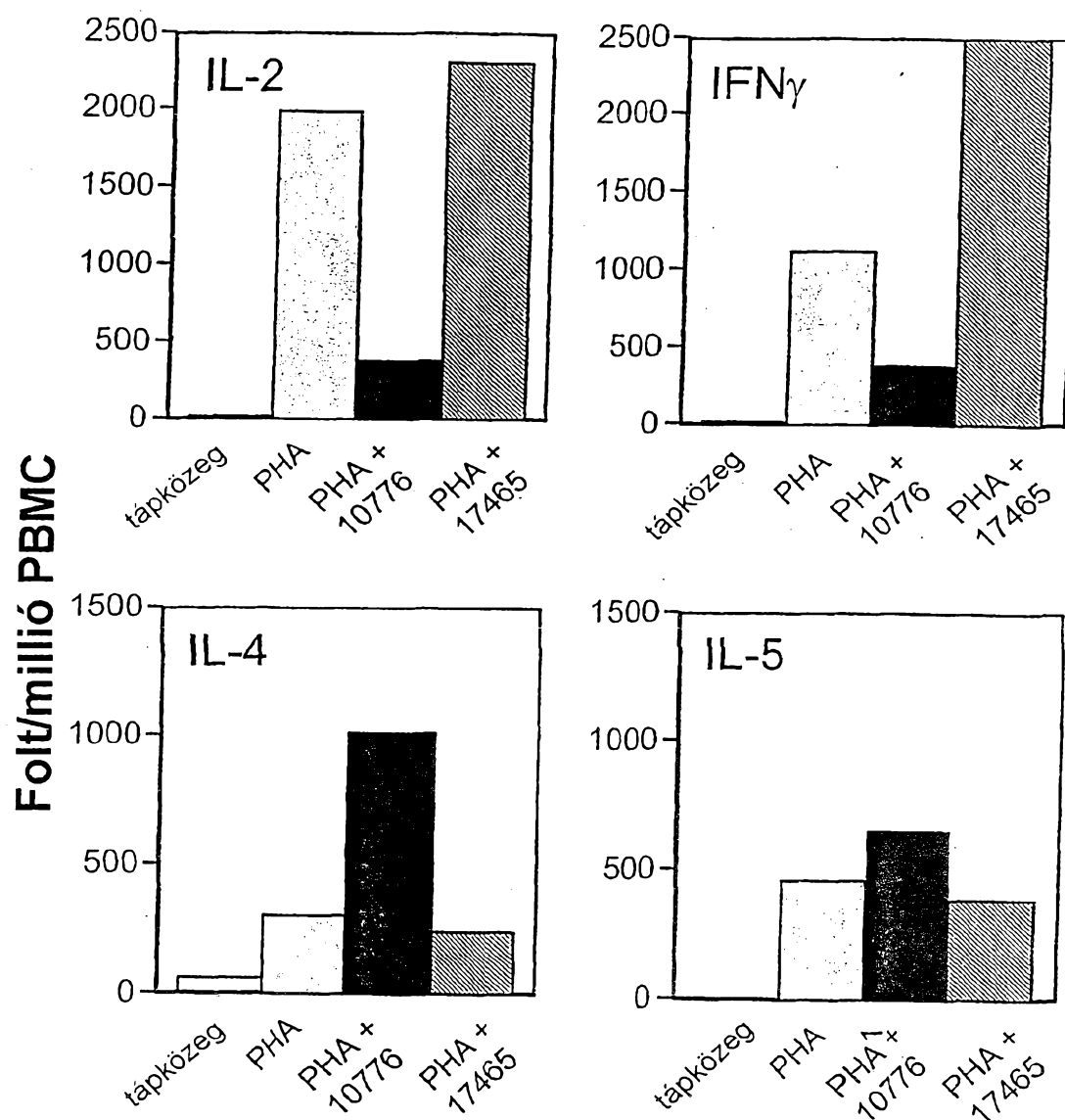
2. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



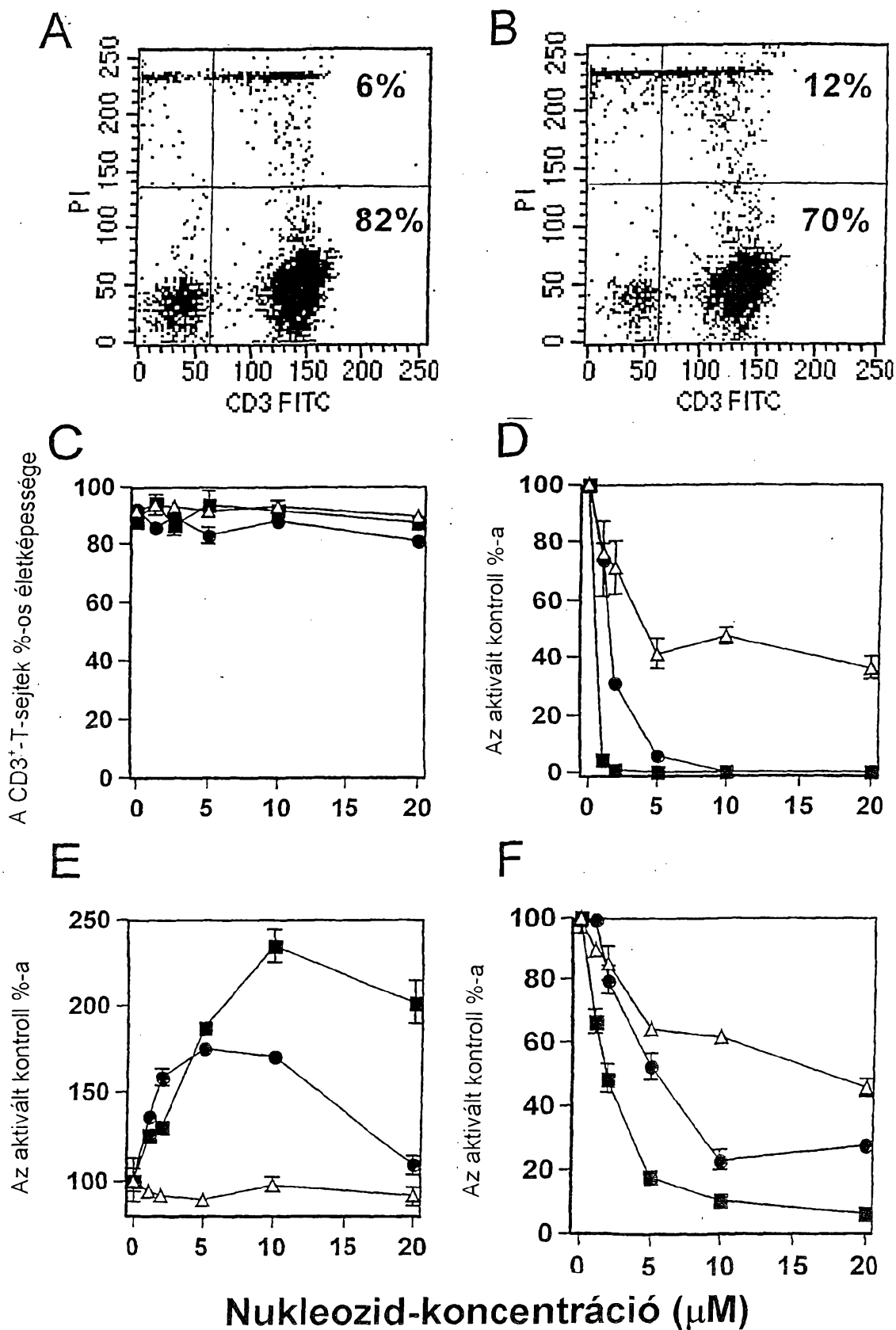
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

3. ábra



4. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

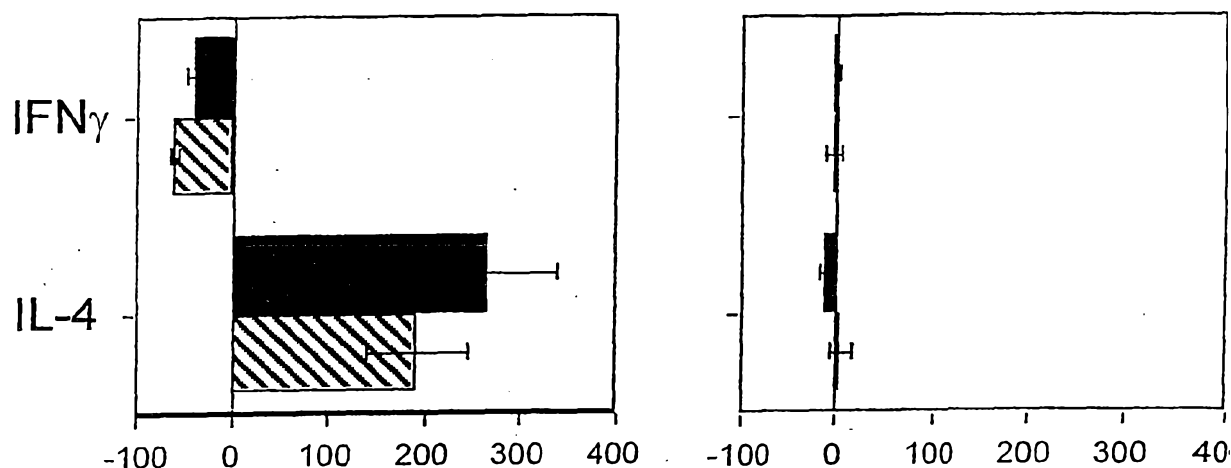


A

5. ábra

10776

17465

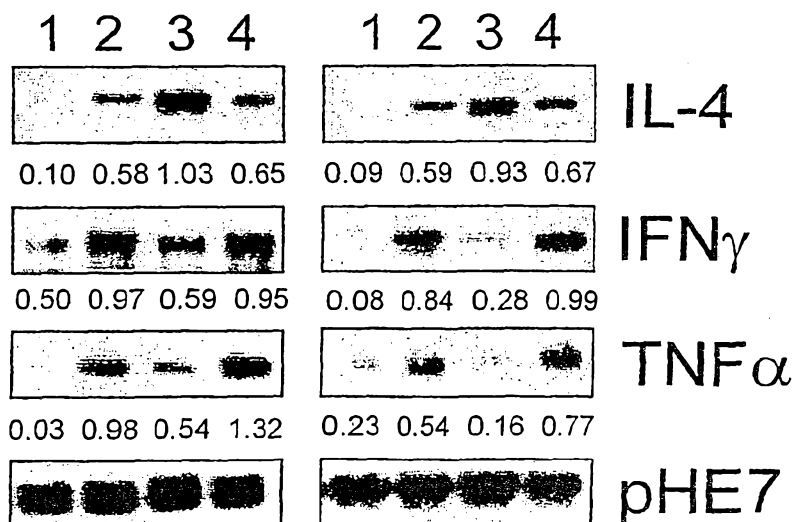


Az aktivált kontrollhoz viszonyított %-os változás

B

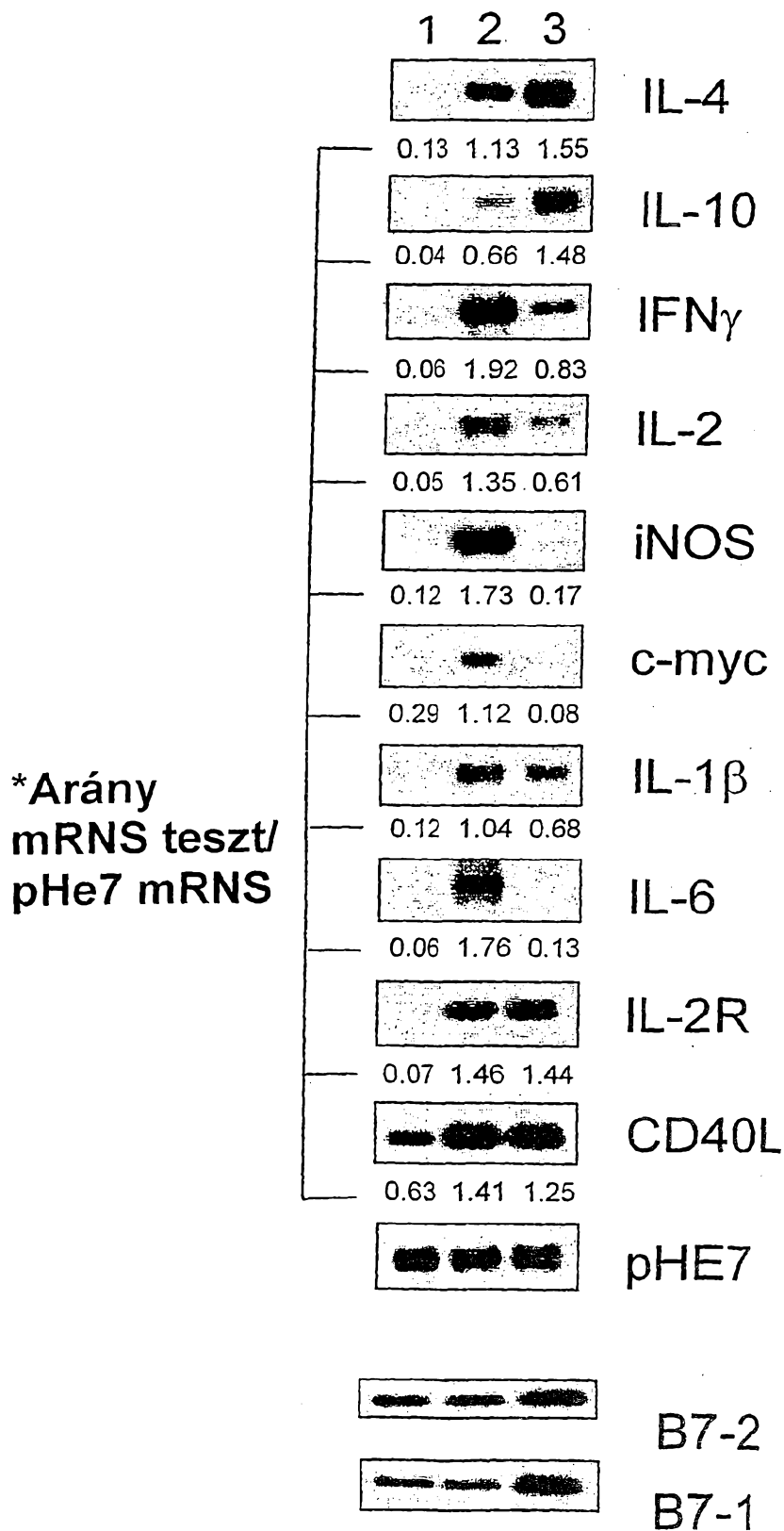
ND

RA

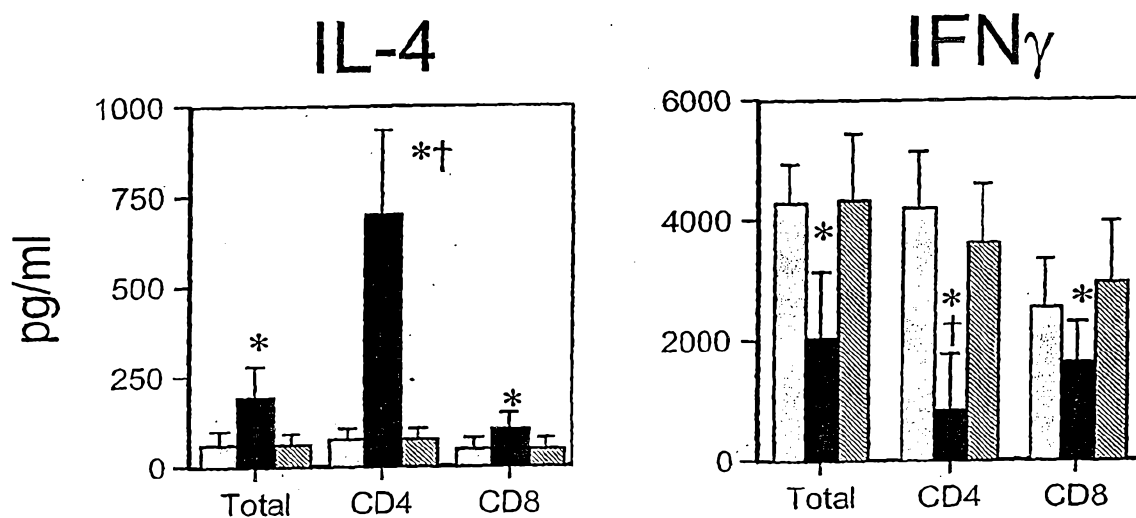
*Arány
mRNS teszt/
pHe7 mRNS

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

6. ábra

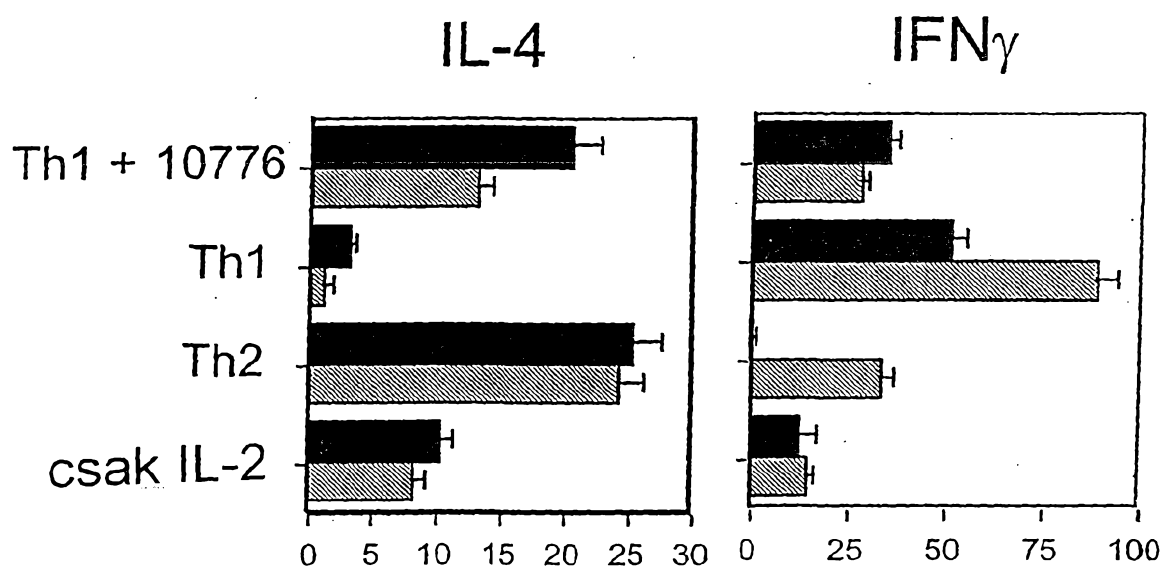


7. ábra



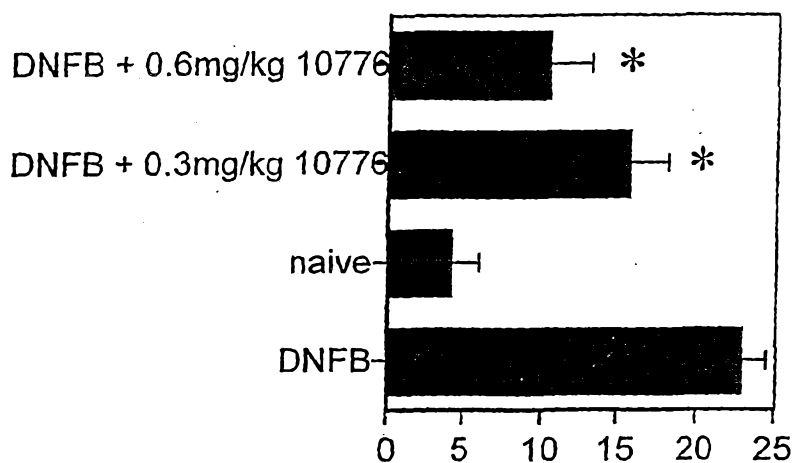
T-sejt-alosztály

8. ábra

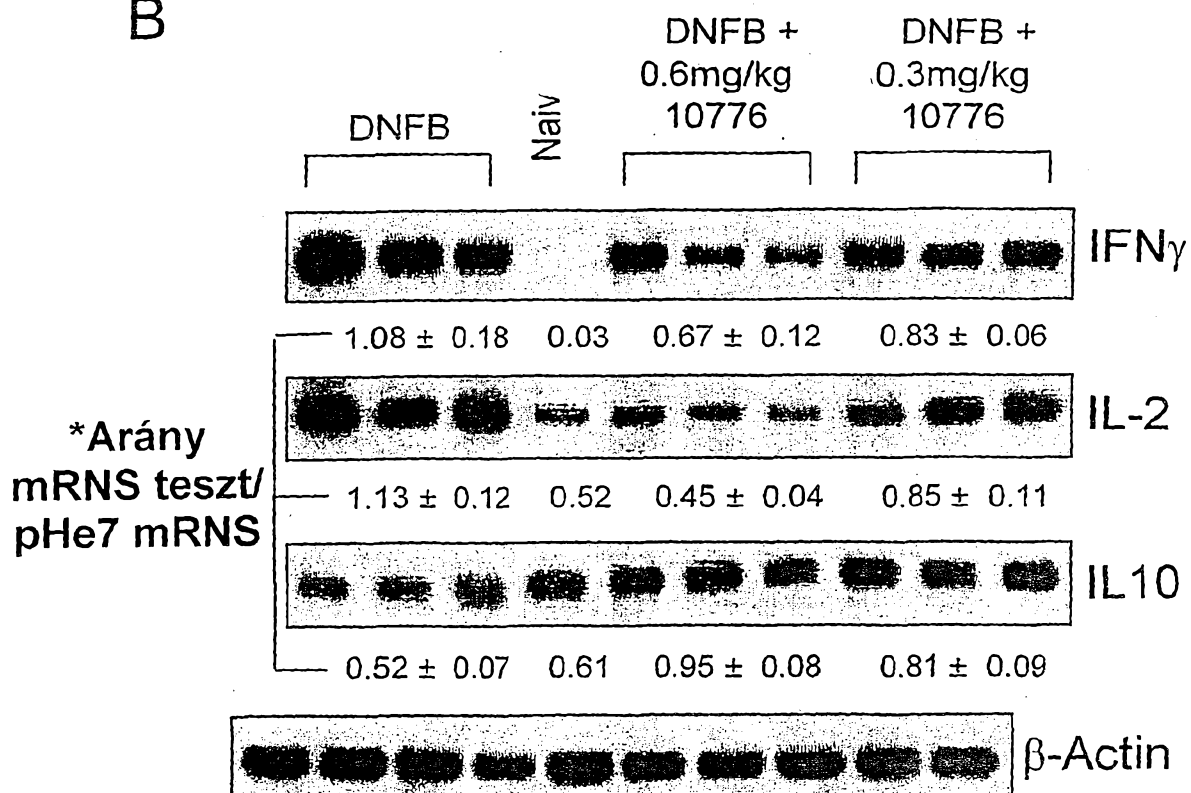


9. ábra

A

A füllduzzadás növekedése (mm x 10⁻²)

B



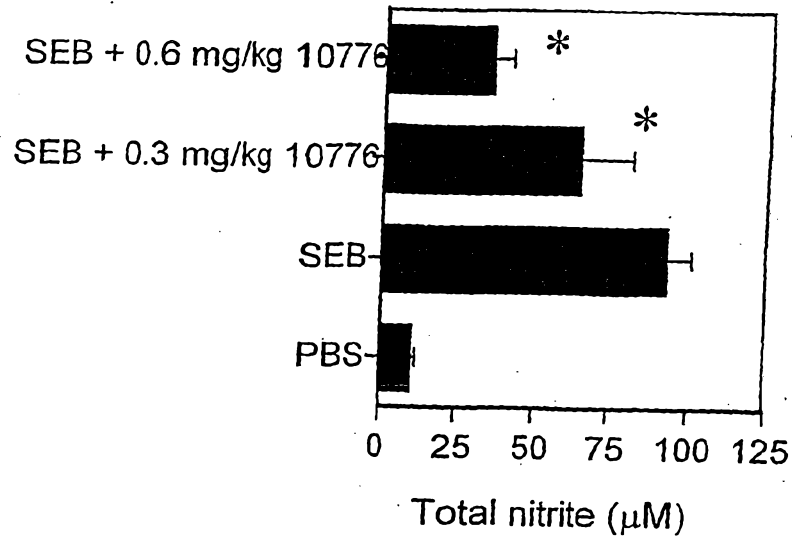
PCT/US01/60381

10/10

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

10. ábra

A



B

