



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **323586**

(13) **B1**

NORGE

(51) **Int Cl.**

A61K 31/513 (2006.01)

A61K 31/52 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20013599	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.01.21 PCT/US00/01738
(22)	Inng.dag	2001.07.20	(85)	Videreføringsdag	2001.07.20
(24)	Løpedag	2000.01.21	(30)	Prioritet	1999.01.22, US, 116773
(41)	Alm.tilgj	2001.09.20			
(45)	Meddelt	2007.06.11			
(73)	Innehaver	Emory University, 1380 South Oxford Road, GA30322 ATLANTA, USA			
(72)	Oppfinner	Raymond F. Schinazi, Decatur, GA, USA Dennis C. Liotta, McDonough, GA, USA Jennifer Hammond, Pittsburgh, PA, USA John W Mellors, Pittsburgh, PA, USA			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO			
(54)	Benevnelse	Farmasøytisk sammensetning omfattende β-D-D4FC og abacavir for behandling eller forebyggelse av HIV-infeksjon hos mennesker			
(56)	Anførte publikasjoner	Chen et al.: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, vol.8, no.22, 1998, s. 3245-3250 US 5,703,058 WO 96/22778 A			
(57)	Sammendrag				

Fremgangsmåte for behandling av HIV som omfatter administrering av β -D-D4FC eller dens farmasøytisk akseptable salt eller promedikament til et menneske som har behov for terapi i kombinasjon med eller altemnering med et medikament som induserer en mutasjon i HIV-1 ved en posisjon forskjellig fra kodon 70 (K til N), 90 eller 172 av revers transkriptase regionen. En fremgangsmåte for anvendelse av β -D-D4FC som "reddende terapi" til pasienter som har medikament resistens for andre anti-HIV-midler. β -D-D4FC kan generelt anvendes som reddende terapi for enhver pasient som har resistens for et medikament som induserer en mutasjon ved annet enn kodonene 70 (K til N), 90 eller 172.

I 1983 ble den etiologiske årsak til AIDS funnet å være humant immundefisiens virus (HIV). I 1985 ble det rapportert at det syntetiske nukleosid 3'-azido-3'-deoksytymidin (AZT) inhiberer replikasjon av humant immundefisiens virus. Siden da er flere andre syntetiske nukleosider, inkludert 2',3'-dideoksyinosin (DDI), 2',3'-dideoksytydin (DDC), 2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidin (D4T), cis-2-hydroksymetyl-5-(5-fluorcytosin-1-yl)-1,3-oksatiolan (FTC), (-)-cis-2-hydroksymetyl-5-(cytosin-1-yl)-1,3-oksatiolan (3TC), vist å være effektive mot HOV. Etter cellulær fosforylering til 5'-trifosfat ved cellulære kinaser inkorporeres disse syntetiske nukleosider i en voksende tråd av virus-DNA, hvilket forårsaker kjede terminering på grunn av fravær av 3'-hydroksyl gruppen. De kan også inhibere virus enzymet revers transkriptase.

Det er kjent at medikament-resistente varianter av HIV kan oppstå etter vedvarende behandling med et anti-virus middel. Medikament-resistens oppstår typisk ved mutasjon av et gen som koder for et enzym som anvendes i virus replikasjon, og mest vanlig for HIV, revers transkriptase, protease, eller DNA-polymerase. Nylig er det vist at effektiviteten til et medikament mot HIV-infeksjon kan forlenges, økes eller gjenvinnes ved å administrere forbindelsen i kombinasjon eller altemnering med en annen, og kanskje en tredje, anti-virus forbindelse som induserer en annen mutasjon enn den forårsaket av det opprinnelige medikament. Alternativt kan farmakokinetiske, biodistribusjons- eller andre medikament parametere endres ved en slik kombinasjons- eller altemneringsterapi. Vanligvis er kombinasjonsterapien foretrukket fremfor altemneringsterapien, fordi den induserer flere samtidige belastninger på viruset. Imidlertid kan man ikke forutsi hvilke mutasjoner som induseres i HIV-1-genomet ved et gitt medikament, om mutasjonen blir permanent eller forbigående, eller hvordan en infisert celle med en mutert HIV-1-sekvens vil respondere på terapi med andre stoffer i kombinasjon eller altemnering. Dette forverres av det faktum at det er lite data på kinetikken ved medikament resistens i langtids cellekulturer behandlet med moderne antiretrovirus midler.

HIV-1-varianter som er resistente mot 3'-azido-3'-deoksytymidin (AZT), 2',3'-dideoksyinosin (DDI) eller 2',3'-dideoksytydin (DDC) er isolert fra pasienter som har fått langtids monoterapi med disse medikamentene (Larder BA, Darby G, Richman DD. *Science* 1989;243:1731-4; St Clair MH, Martin JL, Tudor WG, *et al. Science* 1991;253:1557-9; St Clair MH, Martin JL, Tudor WG, *et al. Science* 1991;253:1557-9; og Fitzgibbon JE, Howell RM, Habertzettl CA, Sperber SJ, Gocke DJ, Dubin DT. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:153-7). Økende klinisk bevismateriale antyder

at AZT-resistens er en prediktor for et dårlig klinisk resultat hos både barn og voksne (Mayers DL. Lecture at the Thirty-second Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. (Anaheim, CA. 1992); Tudor-Williams G, St Clair MH, McKinney RE, *et al. Lancet* 1992;339:15-9; Ogino MT, Dankner WM, Spector SA. *J Pediatr* 1993;123:1-8; Crumpacker CS, D'Aquila RT, Johnson VA, *et al.* Third Workshop on Viral Resistance/(Gaithersburg, MD. 1993); og Mayers D, and the RV43 Study Group. Third Workshop on Viral Resistance. (Gaithersburg, MD. 1993)). Den raske utvikling av HIV-1-resistens overfor ikke-nukleosid revers transkriptase inhibitorer (NNRTI) er også rapportert både i cellukultur og i humane kliniske studier (Nunberg JH, Schleif WA, Boots EJ, *et al. J Virol* 1991;65(9):4887-92; Richman D, Shih CK, Lowy I, *et al. Proc Natl Acad Sci (USA)* 1991;88:11241-5; Mellors JW, Dutschman GE, Im GJ, Tramontano E, Winkler SR, Cheng, YC. *Mol Pharm* 1992;41:446-51; Richman DD and the ACTG 164/168 Study Team. Second International HIV-1 Drug Resistance Workshop. (Noordwijk, Nederland. 1993); og Saag MS, Ermini EA, Laskin OL, *et al. N Engl J Med* 1993;329:1065-1072). I tilfellet av NNRTI L'697,661 oppstod medikament resistent HIV-1 innen 2-6 uker av initierende terapi forbundet med tilbakefall av viremi til samme nivå som før behandling (Saag MS, Ermini EA, Laskin OL, *et al. N Engl J Med* 1993;329:1065-1072). En plutselig stigning i viremi assosiert med en tilsynekomst av medikament resistente stammer er også observert med andre klasser av HIV-1-inhibitorer, inkludert protease inhibitorer (Jacobsen H, Craig CJ, Duncan IB, Haenggi M, Yasargil K, Mous J. Third Workshop on Viral Resistance. (Gaithersburg, MD. 1993)). Denne observasjon har ført til bevissthet om at potensialet for HIV-1-medikament resistens må vurderes tidlig i den prekliniske evaluering av alle nye behandlingsformer for HIV-1.

2',3'-dideoksy-2',3'-didehydro-5-fluorcytidin (D4FC) er en kjent forbindelse. Den Europeiske patentsøknad med publikasjonsnummer 0 409 227 A2 innlevert av Ajinomoto Co., Inc., beskriver β -D-D4FC (eksempel 2) og dens anvendelse for å behandle hepatitt B. Det Nederlandske patent nr. 8901258 innlevert av Stichting Rega V.Z.W. beskriver generelt 5-halogeno-2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrocytidin-derivater for anvendelse ved behandling av HIV og hepatitt B ("HBV"). US patent nr. 5,703,058 beskriver en fremgangsmåte for å behandle HIV- og HBV-infeksjon som omfatter administrering av en effektiv mengde av β -L-D4FC i kombinasjon eller alternering med cis-2-hydroksymetyl-5-(5-fluorcytosin-1-yl)-1,3-oksatiolan, cis-2-hydroksymetyl-5-(cytosin-1-yl)-1,3-oksatiolan, 9-[4-(hydroksymetyl)-2-cyklopenten-1-yl]-guanin (karbovir), 9-[(2-hydroksyetoksy)metyl]guanin (acyklovir), interferon, 3'-deoksy-3'-

azido-tymidin (AZT), 2',3'-dideoksyinosin (DDI), 2',3'-dideoksytytidin (DDC), (-)-2'-fluor-5-metyl- β -L-ara-uridin (L-FMAU) eller 2',3'-didehydro-2',3'-dideoksytymidin (D4T). US patent nr. 5,905,070 beskriver en fremgangsmåte for behandling av HIV- og HBV-infeksjon som omfatter administrering av en effektiv mengde av β -D-D4FC i

5 kombinasjon eller alternering med cis-2-hydroksymetyl-5-(5-fluorcytosin-1-yl)-1,3-oksatiolan, cis-2-hydroksymetyl-5-(cytosin-1-yl)-1,3-oksatiolan, 9-[4-(hydroksymetyl)-2-cyklopenten-1-yl]-guanin (karbovir), 9-[(2-hydroksyetoksy)metyl]guanin (acyklovir), interferon, 3'-deoksy-3'-azido-tymidin (AZT), 2',3'-dideoksyinosin (DDI), 2',3'-dideoksytytidin (DDC), (-)-2'-fluor-5-metyl- β -L-ara-uridin (L-FMAU) eller 2',3'-

10 didehydro-2',3'-dideoksytymidin (D4T).

Et aspekt i følge foreliggende oppfinnelse er å frembringe en farmasøytisk sammensetning for behandling av HIV, der der den farmasøytiske sammensetningen omfatter β -D-D4FC i kombinasjon med abacavir for behandling av pasienter infisert

15 med HIV, og oppviser fordelaktig eller forbedret farmakokinetikk, biodistribusjon, metabolisme, resistens eller andre parametre i forhold til administrering av β -D-D4FC alene. Abacavir virker synergistisk med β -D-D4FC mot viruset.

20

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse angår således en β -D-D4FC eller dens farmasøytisk

25 akseptable salt, eventuelt i en farmasøytisk akseptabel bærer, sammen med abacavir, eventuelt i en farmasøytisk akseptabel bærer, som et kombinasjonspreparat for behandling eller forebyggelse av en HIV-infeksjon hos et menneske.

Videre angår oppfinnelsen anvendelse av en sammensetning for fremstilling av et

30 medikament for forebyggelse eller behandling av en HIV-infeksjon hos et menneske.

Det er funnet at β -D-D4FC induserer mutasjoner i HIV-1 ved det 70(K til N), 90 og 172 kodon av revers transkriptase regionen til viruset. Basert på dette funn er det frembrakt en fremgangsmåte for å behandle HIV som omfatter administrering av β -D-D4FC eller

35 dens farmasøytisk akseptable salt til et menneske som har behov for behandling i kombinasjon eller alternering med et medikament som induserer en mutasjon i HIV-1

på et annet sted enn det 70(K til N), 90 eller 172 kodon av revers transkriptase regionen. Denne fremgangsmåte kan utøves i henhold til publiserte mutasjons mønstre for kjente anti-HIV-medikamenter, eller ved å bestemme mutasjons mønstre for et nytt medikament.

5

Basert på dette funn frembringes også en fremgangsmåte for anvendelse av β -D-D4FC som "reddende behandling" til pasienter som har medikament resistens mot andre anti-HIV-midler. Det er funnet at β -D-D4FC ikke er betydelig kryss-resistent mot AZT, DDC, DDI, D4T, 3TC, (-)-FTC eller β -D-D4FC. I motsetning inducerer β -L-D4FC en mutasjon ved kodon 184 (metionin til valin), hvilket resulterer i et høyt nivå av resistens mot 3TC og FTC. β -D-D4FC kan vanligvis anvendes som reddende terapi for enhver pasient som har resistens mot et medikament som inducerer en mutasjon andre steder enn ved 70(K til N), 90 eller 172-kodonene.

15 Den beskrevne kombinasjon, alternering eller reddende regime er nyttig ved forebyggelse og behandling av HIV-infeksjoner og andre beslektede tilstander slik som AIDS-relatert kompleks (ARC), vedvarende generalisert lymfadenopati (PGL), AIDS-relatert neurologiske tilstander, anti-HIV-antistoff positive og HIV-positive tilstander, Kaposi's sarkom, trombocytopeni purpura og opportunistiske infeksjoner. I tillegg kan disse forbindelser eller formuleringer anvendes profylaktisk for å forebygge eller
20 retardere progresjonen av klinisk sykdom hos individer som er anti-HIV-antistoff positive eller HIV-antigen positive eller som er blitt eksponert for HIV.

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

25

Figur 1 er en tegning av β -D-D4FC.

Figur 2 er en kurve som viser konsentrasjonen av β -D-D4FC i mikromolar versus prosent inhibisjon av p24-antigen produksjon. Figuren illustrerer seleksjon av virus med
30 redusert sensitivitet overfor β -D-D4FC.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

I. Definisjoner

35

Slik det anvendes her i dokumentet betegner "resistent virus" et virus som har tre, og mer typisk, fem eller flere gangers økning i EC_{50} sammenlignet med naive virus i en stabil cellelinje, omfattende, men ikke begrenset til perifere blod mononukleære celler (PBMC) eller MT2- eller MT4-celler.

5

Betegnelsen D-D4FC anvendes vekselvis med betegnelse β -D-D4FC nedenfor. Slik det anvendes her i dokumentet betegner "hovedsakelig ren" eller "hovedsakelig i form av en optisk isomer" et nukleosid sammensetning som omfatter minst 95% til 98%, eller helt 99% til 100% av en enkelt enantiomer av det nukleosid. I en foretrukken
10 utførelsesform administreres β -D-D4FC i hovedsakelig ren form for en hvilken som helst av de beskrevne indikasjoner.

Slik det anvendes her i dokumentet betegner "farmasøytisk akseptable salter"
farmasøytisk akseptable salter som, ved administrering til resipienten, er i stand til å
15 frembringe direkte eller indirekte β -D-D4FC, eller som i seg selv har den aktivitet.

Forkortelsene på aminosyrene anvendt her i dokumentet er beskrevet i tabell 1.

Tabell 1

Aminosyrer			Kodoner						
	Alanin	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
5	Cystein	Cys	C	UGC	UGU				
	Asparginsyre	Asp	D	GAC	GAU	GAC	GAU		
	Glutaminsyre	Glu	E	GAA	GAG				
	Fenylalanin	Phe	F	UUC	UUU				
	Glycin	Gly	G	GGA	GCG	GGG	GGU		
10	Histidin	His	H	CAC	CAU				
	Isoleucin	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
	Lysin	Lys	K	AAA	AAG				
	Leucin	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	GUU
	Metionin	Met	M	AUG					
15	Asparagin	Asn	N	AAC	AAU				
	Prolin	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
	Glutamin	Gln	Q	CAA	CAG				
	Arginin	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
	Serin	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
20	Treonin	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
	Valin	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
	Tryptofan	Trp	W	UGG					
	Tyrosin	Tyr	Y	UAC	UAU				

25 II. Mutasjoner i HIV-1-revers transkriptase selektert for ved β -D-D4FC

Både D- og L-enantiomerene av β -2',3'-didehydro-2',3'-dideoksy-5-fluorcytidin (D4FC) er potente og selektive inhibitorer av HIV-1, selv om D-enantiomeren er mer selektiv. *In vitro* utvikling av resistens mot D-D4FC ble undersøkt ved seriell passasje av HIV-I_{LA1} i MT-2-celler og perifere blod mononukleære celler (PBMC) i nærvær av økende konsentrasjoner av medikament. Varianters resistens mot D-D4FC oppstod bare etter vedvarende eksponering for medikamentet. Virus oppnådd etter 20 passasjer i MT-2-celler hadde 5.3-gangers resistens mot D-D4FC. Resistent virus kunne ikke isoleres i PBMC på tross av mange forsøk. DNA-sekvensering av RT fra virus utvalgt i MT-2-celler viste to mutasjoner: K65R og V179D. Utvelgelsen av D-D4FC-resistent virus ble gjentatt i MT-2-celler og varianter med 19.3-gangers resistens kodet tre nye RT-

mutasjoner: K70N, V90I og R172K. Et K65R rekombinant HIV-1_{LAI} virus hadde 3.9-gangers resistens mot D-D4FC. V179D, en mutasjon som meddeler resistens mot ikke-nukleosid RT-inhibitorer, kompenserer sannsynligvis for K65R. Rollen til de andre mutasjoner i resistens mot D-D4FC ble også undersøkt ved å konstruere rekombinant virus med enkle og multiple mutasjoner, imidlertid viste ingen av de undersøkte rekombinante virus mer enn 2-gangers resistens.

Materialer og metoder

- 10 **Kjemikalier.** D-D4FC ble syntetisert ved et av våre laboratorier som beskrevet tidligere (Shi et al, 1999). Det ble tilberedt som stamløsninger på 10 mM i sterilt vann og lagret ved -20°C. Forbindelsen ble tinet og fortynnet til ønsket konsentrasjon umiddelbart før anvendelse.
- 15 **Celler.** MT-2-celler (AIDS Research and Reference Reagent Program, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, contributed by D. Richman) ble dyrket i RPMI 1640 (Whittaker M.A., Bioproducts, Walkersville, MD) tilsatt 10% føtalt bovint serum, 10 mM HEPES buffer, penicillin (50 IU/ml) og streptomycin (50 µg/ml).
- 20 **Virus.** HIV-1_{LAI}, et molekylært klonet klinisk isolat, ble anvendt både som utgangsvirus for resistens utvelgelse så vel som for fremstilling av rekombinante mutanter. Stamtilberedninger av HIV-1_{LAI} ble tilberedt ved å elektroporere 5-10 jig proviralt plasmid-DNA inn i 1.3×10^7 MT-2-celler. Ved maksimal viral cytopatisk effekt (vanligvis 7 dager etter transfeksjon), ble supernatanten fra infiserte kulturer innsamlet, delt i mindre porsjoner og lagret ved -80°C frem til anvendelse. Virus tilberedningene ble titrert ved tre-gangers endepunkts fortynning i MT-2-celler, og TCID₅₀ ble beregnet ved anvendelse av Reed og Muench-ligningen.
- 30 **Utvelgelse av resistent virus.** Forut for seleksjonen av D-D4FC-resistent virus startet ble utgangsviruset (HIV-1_{LAI}) passert som celle-fri virus i 10 sykluser i MT-2-celler i fravær av medikament. D-D4FC-resistent virus ble utvalgt ved serielt å passere HIV-1_{LAI} i MT-2-celler i nærvær av gradvis økende konsentrasjoner av D-D4FC. Seleksjon for D-D4FC-resistent virus ble utført to ganger. Seleksjonen ble initiert av inokulering av 1×10^6 MT-2-celler med 0.01 mol virus. Ved maksimal viral cytopatisk effekt (4-7 dager etter infeksjon), ble supernatanten fra de infiserte kulturer innsamlet og 0.1-0.3 ml
- 35

ble deretter anvendt for å initiere en annen infeksjonssyklus. Supernatanten ble også delt i mindre porsjoner og lagret ved -80°C for karakterisering av utvalgte virus. Virus ble passert minst tre ganger ved hver konsentrasjon og antallet sykluser ved en gitt konsentrasjon av medikament er avhengig av virusets evne til å vokse ved den spesielle konsentrasjon av D-D4FC. Under den første seleksjons prosedyren ble virus passert en gang i fravær av medikament før medikament konsentrasjonen økte (tabell 2). Som en kontroll ble virus også passert parallelt i fravær av medikament. Den første seleksjon ble initiert ved 0.75 µM og gradvis økt til 4.0 µM under forløpet av 37 sykluser av cellefri passasje. Den andre seleksjon ble initiert ved 0.2 µM og gradvis økt til 6.2 µM under forløp av 27 sykluser av celle-fri passasje (tabell 2).

TABELL 2

Seleksjon #1		Seleksjon #2	
Passasje nummer	[D-Fd4C] µM	Passasje nummer	[D-Fd4c] µM
1-2	0.75	1-3	0.2
3-4	1.5	4-6	0.4
5	1.0	7-9	0.8
6	0	10-12	1.6
7-9	1.5	13	3.2
10-12	2.0	14-16	1.6
13-16	3.0	17-19	3.2
17	0	20-22	4.8
18-20	4.5	23-25	6.2
21	0	26	12.0
22-35	4.5	27	6.2
36-38	1.0		
39-41	2.0		
42-43	4.0		

15

Antiviral suseptibilitets analyse. Virus følsom for D-D4FC ble målt ved å måle prosent inhibisjon av p24-antigen produksjon. I korthet ble MT-2-celler (1×10^5 celler/ml) infisert med virus ved en moi på 0.01 i nærvær av serie fortynninger av D-D4FC. Hver fortynning ble testet i triplikater. Kultur supernatanter ble høstet dag 7 etter infeksjon og analysert for p24-antigen produksjon ved anvendelse av en kommersiell

20

analyse (DuPont, NEN Products, Wilmington, Del). Virus suseptibilitet uttrykkes som konsentrasjon av medikament nødvendig for å inhibere produksjon av p24-antigen med 50% (EC₅₀).

- 5 **DNA-sekvensering av utvalgt virus revers transkriptase.** Virus-RNA (vRNA) fra utvalgte virus ble isolert ved anvendelse av TRIzol Reagent (GibcoBRL, Grand Island, NY). Full-lengde RT-kodende region ble amplifisert ved RT-PCR. PCR-produktet ble deretter renset ved Wizard PCR preps (Promega, Madison, WI) og sekvensert.
- 10 **Produksjon av mutant rekombinant HIV-1.** Mutant RT ble dannet ved anvendelse av Altered SitesII *in vitro* Mutagenesis System (Promega, Madison, WI). Mutagenese ble utført på HIV-1_{LAI}, RT klonet inn i en mutagenese vektor (PALTER, Promega). Tilstedeværelse av den ønskede mutasjon ble bestemt ved direkte sekvensering av RT-genet. Det mutante RT ble deretter ligert inn i pxxHIV-1_{LAI}-vektoren. Stamløsninger av
15 mutant virus ble deretter tilberedt ved å elektroporere 5-10 µg DNA inn i 1.3 x 10⁷ MT-2-celler som beskrevet ovenfor.

Resultater og diskusjon

- 20 **Fenotyping av resistent virus.** Virus resistent mot D-D4FC utvalgt etter 37 (seleksjon #1) og 20 (seleksjon #2) infeksjonssykluser i MT-2-celler. Undersøkelse av D-D4FC-følsomheten til virus fra seleksjon #1 passasje 37 (p37 D-D4FC#1) viste at p37 D-D4FC#1 er 19.4-ganger mindre sensitiv ovenfor D-D4FC enn villtypen vist ved en økning i EC₅₀, fra 0.21 µM til 4.07 µM (figur 2, tabell 3). Vurdering av D-D4FC-følsomheten til virus fra seleksjon #2 passasje 20 (p20 D4FC #2) viste at p20 D-D4FC#2 er 5.3-ganger mindre sensitiv ovenfor D-D4FC enn villtypen demonstrert ved
25 en økning i EC₅₀ fra 0.21 µM til 1.1 µM (figur 2, tabell 3).

- Genotyping av resistent virus.** vRNA fra p37 D-D4FC#1 og p20 D-D4FC#2 ble
30 isolert og utsatt for amplifisering ved RT-PCR. Sekvensering av PCR-produktet viste tilstedeværelse av tre nye mutasjoner i p37 D-D4FC#1: K70N (AAA→4AAT), V90I (GTT→ATT) og R172K (AGA→AAA) (tabell 2). To ulike mutasjoner ble identifisert i p20 D-D4FC#2: K65R (AAA→AGA) og V179D (GTT→GAT) (tabell 3). Ingen andre mutasjoner ble funnet i RT-genene fra disse virus (fra aminosyrene 8-330). I tillegg ble
35 ingen mutasjoner funnet i kontrollvirus passert parallelt i fravær av medikament.

- Isoleringen av D-D4FC-resistente virus med ulike assosierte mutasjoner kunne være resultat av forskjellig seleksjonsteknikker anvendt for å isolere D-D4FC-resistent virus. I seleksjon #1 ble seleksjonstrykket fjernet i en infeksjonssyklus før medikament konsentrasjonen økte. Dette ble ikke gjort ved den andre seleksjonsprosedyren. I tillegg
- 5 varierte utgangskonsentrasjonen av D-D4FC som ble anvendt ved hver seleksjonsprosedyre cirka 3 ganger. En mye høyere utgangskonsentrasjon av medikament ble anvendt ved seleksjon #1 (0.75 μM). Disse to forskjeller er sannsynligvis årsaken til de ulike mutasjonene som observeres i de utvalgte virus.
- 10 **Mutant rekombinant HIV-1.** Mutant rekombinant HIV-1 inneholdene mutasjonene identifisert i de utvalgte virus ble dannet ved stedsdirigert mutagenese. Tabell 4 lister hver av de dannede mutante rekombinante virus så vel som den tilsvarende EC_{50} . Mens xxHIV-1_{LA1}, K65R-viruset viste en 3.9-gangers decrease in følsomhet ovenfor D-D4FC, viste ingen andre virus >3.0 gangers resistens. Det skal imidlertid bemerkes at trippel
- 15 mutasjonen (xxHIV-1_{LA1}, K70N/V90I/R172K) ikke var lett å dyrke, og dette kan være forårsaket av manglende evne til å reproducere resistensen observert i den in vitro utvalgte virus.

Tabell 3 Følsomhet og assosierte mutasjoner av D-D4FC selekterte virus i MT-2-celler

20

Virus	EC_{50} (μM)	Gangers resistens	Mutasjoner fra baselinje
HIV-1 _{LA1p0}	0.21	--	--
HIV-1p37 D-Fd4C#1	4.07	19.4	K70N V90I R172K
HIV-1p20 D-Fd4C#2	1.11	5.3	K65R V179D

Tabell 4 D-D4FC følsomhet av rekombinant HIV-1 i MT-2-celler

Virus	EC₅₀	Gangers resistens
xxLAI	0.32	--
xxK65R	1.24	3.9
xxLAI	0.17	--
xxK70N	0.24	1.4
xxV90I	0.25	1.5
xxLAI	0.28	--
xxR172K	0.23	0.8
xxV90I/R172K	0.36	1.3
xxLAI	0.13	--
xxK70N/V90I/R172K	0.056	0.4

Tabell 5 viser den mediane effektive konsentrasjon og kombinasjonsindeks (C.I.)-
 s verdiene for D-D4FC alene og i kombinasjon med AZT og D4T i akutt infiserte humane
 PBM-celler (dag 6). Tabell 6 beskriver effekten av β-D og β-L-D4FC mot HIV-1 og
 klonede virus i humane PBM-celler.

TABELL 5

Median effektiv konsentrasjon og kombinasjonsindeks (C.I.)-verdier for D-D4FC alene og i kombinasjon med AZT og D4T i akutt infiserte humane PBM-celler (dag 6).

Behandling (medikamentforhold)	Parameter ^a			C.I. ved F_a ^b av				
	m±SE	EC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	r	0.50	0.75	0.90	0.95
D-D4FC	0.95±0.17	0.0076	0.078	0.97				
AZT	0.96±0.17	0.0033	0.032	0.98				
D4T	0.82±0.16	0.015	0.22	0.95				
D-D4FC/AZT	0.65±0.09	0.0012	0.035	0.96	0.164±0.134	0.276±0.233	0.465±0.407	0.664±0.598
(100:1)					0.163±0.120	0.274±0.215	0.460±0.384	0.654±0.571
D-D4FC/D4T	0.86±0.11	0.0087	0.11	0.98	1.14	1.25	1.38	1.47±1.44
(5:1)					1.045	1.154	1.276	1.37±1.27

^a m er lik vinkel koeffisienten ± standardfeil, EC₅₀ er den mediane effektive konsentrasjon, og r er korrelasjons koeffisienten bestemt ved median effekt plottet.

^b C.I. <1, lik 1 eller >1 antyder synergi, additivitet og antagonisme. F_a er en komponent i median effekt ligningen som referer til den del av systemet som er påvirket (for eksempel 0.50 betyr en 50% reduksjon av RT-aktivitet). C.I.-verdiene ble bestemt ved gjensidig ikke-eksklusiv interaksjon (verdiene i kursiv er fra gjensidig eksklusiv interaksjon, som er svakere).

Tabell 6

Effekt av β -D- og β -L-D4FC mot HIV-1 og klonet virus i humane PBM-celler

Virus	β -D-D4FC				β -L-D4FC			
	EC ₅₀ , μ M	EC ₉₀ , μ M	FI ₅₀	FI ₉₀	EC ₅₀ , μ M	EC ₉₀ , μ M	FI ₅₀	FI ₉₀
HIV-1 _{LAV}	0.22	1.32	-	-	0.034	0.16	-	-
xxBRU _{PITT}	0.065	0.46	-	-	0.025	0.088	-	-
M184V _{PITT}	0.14	1.04	2	2	3.66	14.3	146	163
4X AZT _{PITT} (67N,70R,215Y,219Q)	0.072	0.46	1	1	0.016	0.11	1	1
T215Y _{PITT}	0.067	0.35	1	1	0.0047	0.03	0.2	0.3
M184V/T215Y _{PITT}	0.057	0.47	1	1	8.3	74.6	332	848
215/41 _{PITT}	0.13	0.49	2	1	0.018	0.066	1	1
4xM184V _{PITT} ^a (184V,67N,70R,215Y,219Q)	0.045		0.2		>3.3		>47	
G2-2 _{PITT} ^a (103N,41L,184V,210W, andre ^b)	0.04		0.2		>3.3		>47	
L-D4FC-res.(25 μ M)	ND	ND	ND	ND	7.56	33.3	222	208

FI₅₀=EC₅₀ data fra resistant virus EC₅₀ data fra HIV-1_{LAV} eller xxBRU_{PITT}.FI₉₀=EC₉₀ data fra resistant virus EC₉₀ data fra HIV-1_{LAV} eller xxBRU_{PITT}.^s Utthevede verdier antyder FI>10.^a 1 MT-2-celler: Courtesy of Dr. J. Mellors (Pittsburgh)^b Ytterligere mutasjoner: 203D, 207A, 211K, 214F, 245M, 277N, 283I, 284K, 200D, 311R

III. Kombinasjons eller alternerende HIV-midler

Ved altemneringsterapi administreres vanligvis en effektiv dose av hvert stoff serielt, men ved kombinasjonsterapi administreres en effektiv mengde av to eller flere stoffer samtidig. Ved altemneringsterapi kan for eksempel en eller flere første stoffer administreres i en effektiv mengde i en effektiv tidsperiode for å behandle virusinfeksjonen, og deretter gis en eller flere andre stoffer isteden for de første stoffene i behandlingsregimet og på samme måte gi en effektiv mengde over en effektiv tidsperiode.

Dosene vil avhenge av slike faktorer som absorpsjon, biodistribusjon, metabolisme og ekskresjonshastighet for hvert medikament så vel som andre faktorer kjent for fagpersonen innen teknikken. Det bemerkes at doseverdiene også vil variere med alvorlighetsgraden av tilstanden som skal lindres. Det skal videre forstås at for ethvert individ bør spesifikke doseregimer og planer justeres over tid i henhold til individets behov og vurdering gjort av fagpersonen som administrerer sammensetningene eller en overordnet. Eksempler på egnede doseområder for anti-HIV-forbindelser, inkludert nukleosid derivater (for eksempel AZT, D4T, DDI og 3TC) eller protease inhibitorer, for eksempel nelfinavir og indinavir, kan finnes i den vitenskapelige litteratur og oppslagsverk for leger. Mange eksempler på egnede doseområder for andre forbindelser beskrevet her i dokumentet finnes også i offentlig litteratur, og kan identifiseres ved kjente fremgangsmåter. Disse doseområder kan endres etter behov for å oppnå et ønsket resultat.

I en foretrukken utførelsesform administreres D-D4FC i kombinasjon med protease inhibitoren er abacavir.

IV. Analyse av D-D4FC induisert mutasjon av HIV-genomet

Metoder og sett tilsvarende de beskrevet i US patent nr. 5,409,810 til Larder et al, for AZT, men basert på mutasjonsprofilen for D-D4FC, kan anvendes for å analysere tilstedeværelsen av D-D4FC-induserte mutasjoner og følgelig danne deler av oppfinnelsen presentert her i dokumentet. I tillegg til å inkorporere Larder-patentet ved referanse i sin helhet, beskrives disse teknikker nedenfor.

En fremgangsmåte for å vurdere sensitiviteten til en HIV-1-prøve ovenfor D-D4FC, omfatter:

- (i) isolering av nukleinsyren fra prøven,
- 5 (ii) hybridisering av en oligonukleotid til nukleinsyren der oligonukleotidet er komplementært til et område av villtype DNA-sekvensen (eller dens tilsvarende RNA) eller til et område av den mutante DNA-sekvens (eller dens tilsvarende RNA);
- (iii) å forsøke å polymerisere nukleinsyren fra den 3'-ende av oligonukleotidet,
- 10 (iv) fastslå om et oligonukleotid primer forlenget produkt er tilstede eller ikke.

Det er mulig å anvende genomt DNA eller RNA isolert fra HIV-1-prøver ved denne metodologi. Egnede celler som støtter veksten av HIV-1-isolatet inkuberes i en tidsperiode. Cellene gjenvinnes ved sentrifugering. DNA kan deretter isoleres ved
15 spalting av cellene med proteinase K i nærvær av EDTA og en detergent slik som SDS, etterfulgt av fenol ekstraksjon.

Velkjente ekstraksjons- og renseprosedyrer er tilgjengelig for isolering av DNA fra en prøve. RNA kan isoleres ved følgende metodologi. Egnede celler infiseres og inkuberes
20 i en tidsperiode. Cellene gjenvinnes ved sentrifugering. Cellene resuspenderes i en RNA-ekstraksjons buffer etterfulgt av spalting ved anvendelse av en proteinase spaltebuffer og spalting med proteinase K. Proteinene fjernes i nærvær av en fenol/kloroform blanding. RNA kan deretter gjenvinnes etter ytterligere sentrifugeringstrinn. (Maniatis, T., et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2.
25 utg., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)).

Selv om det er mulig å anvende uamplifisert nukleinsyre, foretrekkes det på grunn av den relative mangel på nukleinsyre i en HIV-1-prøve å amplifisere den. Nukleinsyren kan selektivt amplifiseres ved polymerase kjedereaksjon (PCR)-teknikken, som er en in
30 vitro metode for å fremstille store mengder av spesifikke nukleinsyre fragmenter med definert lengde og sekvens fra små mengder av en templat.

PCR omfattes av standard reagenser som anvender Mg^{2+} -konsentrasjon, oligonukleotid primere og sykliserings temperaturbetingelser for amplifisering av RT-genet ved hjelp
35 av primerne. Primerne velges slik at de vil amplifisere hele RT-genet eller en utvalgt

sekvens som inkorporerer nukleotider tilsvarende en region av villtype DNA-sekvensen til HIV-1 som omfatter kodonet som er mutert.

RNA kan amplifiseres direkte ved PCR. Den tilsvarende cDNA må syntetiseres.

- 5 Syntese av cDNA utføres normalt ved primet revers transkripsjon ved anvendelse av oligo-dT-primere. Primere velges fortrinnsvis slik at de forenkler nukleinsyre sekvensen for RT eller en utvalgt sekvens som inkorporerer nukleotider tilsvarende det området av RNA som tilsvarer villtype DNA-sekvensen eller den region av den mutante DNA-sekvens som tilsvarer 70(K til N), 90 eller 172-kodonet av revers transkriptase regionen.
- 10 Dette kan oppnås ved å tilberede en oligonukleotid primer som er komplementær til en region av RNA-tråden som er oppstrøms for den tilsvarende sekvens av villtype DNA-sekvensen. cDNA tilberedes ved denne metodologi (se Maniatis, T., et al., supra) kan deretter anvendes på samme måte som den allerede diskutert for DNA.

- 15 Det neste trinn i denne metodologi er hybridisering av nukleinsyren og oligonukleotidet som er komplementært til en region av villtype DNA-sekvensen (eller dens tilsvarende RNA) eller til en region av den mutante DNA-sekvens (eller dens tilsvarende RNA).

- Betingelser og reagenser frembringes deretter for å tillate polymerisering av
- 20 nukleinsyren fra den 3'-ende av oligonukleotid primeren. Slike polymeriseringsreaksjoner er velkjente innen teknikken.

- Dersom oligonukleotid primeren har ved sin 3'-ende et nukleotid som er komplementært til en mutant genotype, det vil si en genotype som har en nukleotid
- 25 endring ved kodon 70 (K til N), 90 eller 172 i RT-regionen, da vil polymeriseringen av nukleinsyre sekvensen bare foregå dersom nukleinsyren i prøven er den samme som den mutante genotype. Polymerisering av en villtype nukleinsyre sekvens vil ikke foregå eller i det minste ikke i en betydelig utstrekning fordi nukleotidene ikke er tilpasset ved den 3'-ende av oligonukleotid primeren og nukleinsyre sekvensen i prøven.

- 30 Dersom oligonukleotid primeren har ved sin 3'-ende et nukleotid som er komplementært til villtype genotypen, det vil si en genotype som har villtype nukleotidet ved kodonet 70 (K til N), 90 eller 172 i RT-regionen, da vil det være polymerisering av en nukleinsyre sekvens som er villtype ved denne posisjon. Det vil
- 35 ikke finne sted noen polymerisering av en nukleinsyre som har en mutant nukleotid ved den 3'-posisjon.

- Den foretrukne lengde av hvert oligonukleotid er 15-20 nukleotider. Oligonukleotidet kan frembringes i følge fremgangsmåter kjent for fagpersonen innen teknikken (Koster, H., Drug Research, 30 s. 548 (1980); Koster, H., Tetrahedron Letters s. 1527 (1972);
- 5 Caruthers, Tetrahedron Letters, s. 719 (1980); Tetrahedron Letters s. 1859 (1981); Tetrahedron Letters 24, s. 245 (1983); Gate, M., Nucleic Acid Research, 8, s. 1081 (1980)) og fremstilles vanligvis ved en automatisk DNA-syntesemaskin slik som en Applied Biosystems 381A synthesizer.
- 10 Det er hensiktsmessig å bestemme tilstedeværelsen av et forlenget oligonukleotid primerprodukt. Metodene for å utføre deteksjonen er ved en passende markør. Markøren kan hensiktsmessig festes til oligonukleotid primeren eller til noen andre molekyl som vil binde det forlengede primerpolymeriseringsprodukt.
- 15 Markøren kan for eksempel være et enzym, radioisotop eller fluorokrom. En foretrukken markør kan være biotin som etterfølgende kan påvises ved streptavidin konjugert til et enzym slik som peroksidase eller alkalisk fosfatase. Tilstedeværelse av et forlenget oligonukleotid primerpolymeriseringsprodukt kan påvises for eksempel ved å utføre polymeriseringsreaksjonen på en agarose gel og å observere et spesifikt DNA-
- 20 fragment markert med etidium bromid, eller Southern-blott og autoradiografi for å påvise tilstedeværelse eller fravær av bånd tilsvarende det polymeriserte produkt. Dersom et dominerende bånd er tilstede som tilsvarende bare det merkede oligonukleotid, da indikerer dette at polymerisering har foregått. Dersom bånd med korrekt forutsatt størrelse er tilstede, da vil dette indikere at polymerisering har foregått.
- 25 DNA isolert fra pasientenes lymfocytter som beskrevet her i dokumentet anvendes for eksempel som en templat for PCR-amplifisering ved anvendelse av syntetiske oligonukleotid primere som enten er tilpasset eller ikke er tilpasset de amplifiserte sekvenser. Muligheten til PCR i å påvise slike mutasjoner er allerede vist. PCR
- 30 anvender Amplification Refractory Mutation system ("ARMS") (Newton, C.R., et al. Nucleic Acids Research, 17, s. 2503, (1989)). Syntetiske oligonukleotider produseres som annealer til regionene nær opptil og omfattende de spesifikke mutasjoner slik at den 3'-ende av oligonukleotidet enten er tilpasset eller ikke er tilpasset en mutant eller villtype sekvens. PCR utføres hvilket resulterer i identifiseringen av et DNA-fragment
- 35 (ved anvendelse av gel elektroforese) der en tilpasning har oppstått eller ikke noe fragment som ikke er tilpasset er oppstått.

DNA ekstraheres fra HIV-1-infiserte T-celler som beskrevet her i dokumentet og utsatt for "ARMS"-PCR-analyse ved anvendelse av disse primere.

- 5 Tilstedeværelse av et fragment identifiseres ved anvendelse av en oligonukleotid primer som beskrevet ovenfor, det vil si ved å forsøke polymerisering ved anvendelse av en oligonukleotid primer som kan være merket for det amplifiserte DNA-fragment under stringente betingelser som bare tillater hybridisering av komplementært DNA (den eneste forskjellen er at differensiell hybridisering ikke trenger å utføres og fragmenter
- 10 av DNA amplifisert ved "ARMS"-metoden vil være de samme enten de er avledet fra mutant eller villtype DNS, slik at et felles oligonukleotid kan anvendes for å påvise tilstedeværelse av disse fragmenter. Sekvensen til et slikt oligonukleotid er avledet fra en DNA-sekvens i DNA-fragmentet som er konservert blant HIV-1-stammene).
- 15 Den ovennevnte PCR-analyse kan tilpasses for å muliggjøre direkte påvisning av mutasjoner assosiert med D-D4FC-resistens i DNA fra PBL-prøver fra infiserte individer som ikke er blitt dyrket for å oppnå virus. Da dette materialet vanligvis inneholder betydelig mindre HIV-1-DNA enn infiserte lymfoide kulturer, kan en "dobbel PCR" (eller "nestet" sett)-protokoll anvendes (Simmonds, P., Balfe, P.,
- 20 Peutherer, J.F., Ludlam, C.A., Bishop, J.O. og Leigh Brown, A.J., J. Virol., 64, 864-872 (1990)) for å forsterke mengden mål-HIV-1-RT-DNA-signal i prøvene. Den doble PCR overvinner problemet med begrenset amplifisering av en sjelden templat sekvens. En liten mengde av pre-amplifisert materiale kan anvendes i den andre PCR med primer par utformet for å muliggjøre diskriminering av villtype og mutante rester.
- 25 Et egnet testsett for anvendelse i en analyse for å bestemme resistens statusen i en HIV-1-prøve ovenfor D-D4FC som gjør bruk av en metodologi i følge det første aspekt av oppfinnelsen, omfatter et oligonukleotid som er komplementært til en region av villtype DNA-sekvensen (eller dens tilsvarende RNA) eller til en region av den mutante DNA-
- 30 sekvens som beskrevet her i dokumentet, andre materialer nødvendig for polymerisering av nukleinsyren fra 3'-ende av oligonukleotidet og hjelpemidler for å påvise tilstedeværelse av et forlenget oligonukleotid primerprodukt. Slike andre materialer omfatter hensiktsmessige enzymer, buffere og vaskeløsninger, og en markør og et substrat for markøren om nødvendig. Dersom PCR anvendes for å amplifisere
- 35 nukleinsyren da bør ytterligere materialer slik som hensiktsmessige oligonukleotid primere som vil amplifisere et område av villtype DNA-sekvensen (eller dens

tilsvarende RNA) eller et område av den mutante DNA-sekvens som beskrevet her i dokumentet (eller dens tilsvarende RNA) og dNTP inkluderes.

En annen fremgangsmåte for å påvise sensitiviteten til en HIV-1-prøve ovenfor D-
5 D4FC omfatter:

- (i) isolering av nukleinsyren fra prøven;
- (ii) hybridisering av nukleinsyren med et oligonukleotid som er komplementært til et område av villtype DNA-sekvensen (eller dens tilsvarende RNA) eller til en
10 region av den mutante DNA-sekvens beskrevet i figur 1 (eller dens tilsvarende RNA) inneholdene en eller flere av nukleotidene i regionen til 70- (K til N), 90-, eller 172-kodonet i RT-regionen; og
- (iii) fastslå om noen av de resulterende hybrider av oligonukleotidet og nukleinsyren har komplementære nukleotider ved et av disse posisjonene eller ikke.

15

Fortrinnsvis utformes oligonukleotidet slik at det danner en perfekt tilpasset hybrid med sitt komplement.

Nukleinsyre (DNA eller RNA) isoleres fra en prøve slik det tidligere er beskrevet ved
20 det første aspekt i følge oppfinnelsen.

Tilsvarende kan PCR anvendes for å amplifisere RT-DNA (eller dens tilsvarende RNA) eller fortrinnsvis for å amplifisere en region av RT-DNA (eller dens tilsvarende RNA) som inkorporerer DNA (eller dens tilsvarende RNA) inneholdene en eller flere
25 nukleotider ved den bestemte posisjon.

I det andre trinn av denne metodologi anvendes nukleinsyren deretter til å hybridisere med oligonukleotider komplementære med en region av villtype DNA-sekvensen (eller dens tilsvarende RNA) eller til en region av den mutante DNA-sekvens.

30

Oligonukleotidet kan være av enhver lengde avhengig av antallet nukleotid posisjoner av interesse som skal undersøkes. Dersom oligonukleotidet er utformet for å omfatte et nukleotid ved bare en posisjon av interesse da er dette nukleotid fortrinnsvis ved eller nær den sentrale posisjon av oligonukleotidet.

35

For å avgjøre om oligonukleotidet og nukleinsyre sekvensen har dannet et tilpasset hybrid eller ikke, settes spesifikke hybridiseringsbetingelser slik at et hybrid bare dannes når nukleotidet eller nukleotidene ved kodon 70 (K til N), 90 eller 172 av revers transkriptase regionen er komplementært til det tilsvarende nukleotid eller de
5 tilsvarende nukleotider av oligonukleotidet som enten tillater hybridisering eller ingen hybridisering. Det er viktig å etablere for eksempel temperaturen i reaksjonen og konsentrasjonen av saltløsning før hybridiseringstrinnene utføres for å finne betingelsene som er stringente nok til å garantere spesifisitet (Maniatis, T., et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. utg., Cold Spring Harbour Laboratory
10 Press, (1989). Dersom oligonukleotid proben har en DNA-sekvens som er komplementær med en villtype nukleinsyre sekvens ved en eller flere av dets nukleotider tilsvarende kodon 70 (K til N), 90 eller 172 i revers transkriptase regionen, da vil dette oligonukleotid hybridisere perfekt med villtype nukleinsyren. Dersom det ikke er noen hybridisering antyder dette at nukleinsyren isolert fra det samme
15 inneholder en eller flere mutasjoner.

Dersom oligonukleotid proben har en DNA-sekvens som er komplementær til en mutant nukleinsyre sekvens, da vil dette oligonukleotid hybridisere med mutant nukleinsyre. Dersom det ikke er noen hybridisering antyder dette at nukleinsyren isolert fra prøven
20 ikke inneholder noen mutasjon eller mutasjoner. Oligonukleotid proben kan merkes som et middel for påvisning i henhold til den første fremgangsmåten.

Hybridiseringen og etterfølgende fjerning av ikke-hybridiserte nukleinsyrer utføres under stringente betingelser som bare tillater hybridisering av den komplementære
25 DNA og ikke oligonukleotidet inneholdene en feil-tilpasning (det vil si oligonukleotid spesifikk hybridisering som beskrevet ved påvisning av sigd celle mutasjon ved anvendelse av β -globin eller HLA-DQ α -genet (Saiet, R.K., et al., Nature, 324, s. 163, (1986), the activated Ras gene (Ver Laan-de, Vries, M., et al., Gene, 50, 313, (1986)) og β -thalassaemia Wong, C., et al Nature, 330, s. 384, (1987)).

30 Hybridisering kan utføres ved immobilisering av RT-nukleinsyre sekvensen på nitrocellulose, nylon eller andre faste matrikser (for eksempel dot-blot). Det er hensiktsmessig å bestemme tilstedeværelsen av et hybrid ved anvendelse av en markør. For eksempel kan de kjemisk syntetiserte oligonukleotid probene merkes
35 hensiktsmessig ved anvendelse av enzym, radioisotop eller fluorokrom. En foretrukket

markør kan være biotin som deretter kan påvises ved streptavidin konjugert til et enzym slik som peroksidase eller alkalisk fosfatase.

Alternativt kan hybridiseringen utføres ved immobilisering av de kjemisk syntetiserte oligonukleotider beskrevet ovenfor, som er umerket, til et fast støttemateriale beskrevet ovenfor og deretter hybridisering av en merket RT-nukleinsyre sekvens som beskrevet tidligere.

I begge situasjoner beskrevet ovenfor for hybridisering vil egnede kontrollreaksjoner inkorporeres for å bestemme at effektiv hybridisering har foregått (for eksempel hybridisering av oligonukleotider til et komplementært oligonukleotid).

Resultatene vil være enkle å tolke siden den isolerte nukleinsyren vil hybridisere enten til villtype oligonukleotidet eller det mutante oligonukleotid.

Et egnet testsett for anvendelse i en analyse for å bestemme sensitiviteten til en HIV-1-prøve ovenfor D-D4FC som gjør bruk av en metodologi i følge det andre aspekt i følge oppfinnelsen omfatter et oligonukleotid komplementært til en region av villtype DNA-sekvensen (eller dens tilsvarende RNA) eller til en relevant region av den mutante DNA-sekvens, sammen med andre materialer nødvendig for å tillate hybridisering. Slike materialer omfatter hensiktsmessige buffere og vaskeløsninger og en markør og et substrat for markøren om nødvendig. Vanligvis vil oligonukleotidet merkes. Dersom PCR anvendes for å amplifisere nukleinsyren før hybridisering da bør ytterligere materialer slik som hensiktsmessige oligonukleotid primere som vil amplifisere en region av villtype DNA-sekvensen (eller dens tilsvarende RNA) eller en region av den mutante DNA-sekvens, hensiktsmessige enzymer og dNTP (deoksy nukleotid trifosfater) inkluderes.

I en alternativ utforming av analysen kan dNTP i amplifiseringen være eller ikke være koblet til et detektormolekyl slik som en radioisotop, biotin, fluorokrom eller enzym.

Det er mulig å påvise zidovudin resistente mutasjoner i HIV-1-RT-RNA isolert fra kliniske prøver ved et RNA-amplifiseringssystem. Ved anvendelse av metodologien beskrevet av Guatelli et al. (Proc. Natl. Acad. Sci, (USA), 8/7, 1874-1878, (mars 1990)) kan en mål nukleinsyre sekvens reprodusere (amplifisere) eksponensielt in vitro under isoterme betingelser ved å anvende tre enzym-aktiviteter essensielle for retrovirus

replikasjon: revers transkriptase, RNase H og en DNA-avhengig RNA-polymerase. En slik metodologi kan anvendes etterfulgt av et hybridiseringstrinn for å skille mutante fra villtype nukleotider slik diskutert tidligere.

5 FREMSTILLING AV FARMASØYTISKE SAMMENSETNINGER

Mennesker som lider av effekter forårsaket av en hvilken av helst av sykdommene og indikasjonene beskrevet her i dokumentet, og i særdeleshet HIV-infeksjon, kan behandles med den farmasøytiske sammensetningen som omfatter β -D-D4FC eller dens
 10 farmasøytisk akseptable salt, eventuelt i en farmasøytisk akseptabel bærer, sammen med abacavir, eventuelt i en farmasøytisk akseptabel bærer, som et kombinasjonspreparat. De aktive stoffene kan administreres ved en hvilken som helst hensiktsmessig måte, for eksempel oralt, parenteralt, enteralt, intravenøst, intradermalt, subkutant, transdermalt, intranasalt eller topisk, i flytende eller fast form.

15

Oppfinnelsen angår også anvendelse av en sammensetning for fremstilling av et medikament for forebyggelse eller behandling av en HIV-infeksjon hos et menneske.

De aktive forbindelser inkluderes i den farmasøytisk akseptable bærer eller
 20 fortynningsmiddel i en mengde tilstrekkelig for å avlevere til pasienten en terapeutisk effektiv mengde av forbindelsen til å inhibere virus replikasjon *in vivo*, spesielt HIV-replikasjon, uten å forårsake alvorlige toksiske effekter hos den behandlede pasient. Ved "inhibitorisk mengde" menes en mengde av aktiv ingrediens tilstrekkelig til å utøve en inhibitorisk effekt målt ved for eksempel en analyse slik som de beskrevet her i
 25 dokumentet.

En foretrukken dose av forbindelsen for alle de ovennevnte tilstander vil være i område fra cirka 1 til 75 mg/kg, fortrinnsvis 1 til 20 mg/kg kroppsvekt per dag, vanligvis 0.1 til cirka 100 mg per kilo kroppsvekt til mottakeren per dag. Det effektive doseområdet av
 30 de farmasøytisk akseptable derivater kan beregnes basert på vekten til moder nukleosidet som skal avleveres. Dersom derivatet har aktivitet i seg selv kan den effektive dosen beregnes som ovenfor ved anvendelse av derivatets vekt, eller ved andre fremgangsmåter kjent for fagpersoner innen teknikken.

35

Forbindelsene administreres mest hensiktsmessig som enheter av egnede doseformer, inkludert men ikke begrenset til en inneholdene 7 til 3000 mg, fortrinnsvis 70 til 1400 mg aktiv ingrediens per enhets doseform. En oral dose på 50 til 1000 mg er vanligvis hensiktsmessig.

5

Ideelt bør den aktive ingrediens administreres for å oppnå maksimale plasma konsentrasjoner av den aktive forbindelse på fra cirka 0.02 til 70 mikromolar, helst virka 0.5 til 10 mM. Dette kan oppnås for eksempel ved intravenøs injeksjon av en 0.1 til 25% løsning av den aktive ingrediens, eventuelt i saltvann, eller administreres som en bolus av aktiv ingrediens.

10

Konsentrasjonen av aktiv forbindelse i sammensetningene vil avhenge av absorpsjon, distribusjon, metabolisme og ekskresjonshastigheter av medikamentet så vel som andre faktorer kjent for fagpersonen innen teknikken. Det skal bemerkes at dose verdiene også vil variere med alvorligheten av tilstanden som skal lindres. Det skal videre forstås at for ethvert individ bør spesielle doseregimer justeres over tid i forhold til individets behov og den profesjonelle vurdering gjort av fagpersonen som administrerer eller en overordnet til fagpersonen som administrerer sammensetningen, og at konsentrasjons områdene beskrevet her i dokumentet bare er som eksempler og er ikke tilsiktet å begrense rammen eller utøvelsen av de patentsøkte sammensetninger. Den aktive ingrediens kan administreres med en gang, eller kan deles opp i et antall mindre doser som administreres ved forskjellige tidsintervall.

15

20

En foretrukken måte å administrere den aktive forbindelse er oralt. Orale sammensetninger vil vanligvis omfatte et inert fortynningsmiddel eller en spiselig bærer. De kan innesluttet i gelatinkapsler eller presses til tabletter. Når oral terapeutisk administrering er tilsiktet kan den aktive forbindelse inkorporeres med eksipienser og anvendes i form av tabletter, pastiller eller kapsler. Farmasøytisk kompatible bindemidler, og/eller adjuvansmaterialer kan inkluderes som deler av sammensetningen.

25

30

Tablettene, pillene, kapslene, pastillene og lignende kan inneholde noen av de følgende ingredienser, eller forbindelser som har tilsvarende egenskaper: et bindemiddel slik som mikrokrySTALLinsk cellulose, gummi traqant eller gelatin; en eksipiens slik som stivelse eller laktose, et disintegreringsmiddel slik som algin syre, Primogel, eller maisstivelse; et smøremiddel slik som magnesium stearat eller Sterotes; et glidemiddel slik som kolloidal silikon dioksid; et søtningsstoff slik som sukrose eller sakkarin; eller

35

et smaksstoff slik som peppermynte, metyl salicylat eller appelsin smaksstoff. Når enhets doseformen er en kapsel kan den inneholde i tillegg til materialer av den ovennevnte type, en flytende bærer slik som en fet olje. I tillegg kan enhets doseformen inneholde ulike andre materialer som endrer den fysikalske formen til doseenheten, for eksempel sukkerbelegg, skjellakk, eller andre enteriske midler.

Forbindelsene kan administreres som en bestanddel av en eliksir, suspensjon, sirup, oblat, tyggegummi eller lignende. En sirup kan inneholde, i tillegg til de aktive forbindelser, sukrose som søtningsstoff og visse konserveringsmidler, farge og smaksstoffer.

Forbindelsene eller deres farmasøytisk akseptable salter kan derfor også blandes med andre aktive materialer som ikke svekker den ønskede virkning, eller med materialer som supplerer den ønskede virkning, slik som antibiotika, anti-soppmidler, anti-inflammatoriske midler, protease inhibitorer og andre nukleosid- eller ikke-nukleosid antivirale midler, som diskutert i større detalj ovenfor. Løsninger eller suspensjoner anvendt for parenteral, intradermal, subkutan eller topisk anvendelse kan omfatte de følgende komponenter: en steril fortynningsløsning slik som vann for injeksjon, saltløsning, fete oljer, polyetylen glykoler, glyserin, propylen glykol eller andre syntetiske løsningsmidler; antibakterielle midler slik som benzyl alkohol eller metyl parabener; antioksidanter slik som askorbinsyre eller natrium bisulfitt; chelaterende midler slik som etylendiamintetraeddiksyre; buffere slik som acetater, citrater eller fosfater og midler for justering av tonisitet slik som natrium klorid eller dekstrose. Parenterale tilberedninger kan fylles på ampuller, engangssprøyter eller flerdose ampuller laget av glass eller plastikk.

Dersom administreringen er intravenøs er foretrukne bærere fysiologisk saltvann eller fosfat buffret saltvann (PBS).

Liposomale suspensjoner (inkludert liposomer målrettet mot infiserte celler med monoklonale antistoffer mot virus antigener) foretrekkes også som farmasøytisk akseptable bærere. De kan tilberedes i følge fremgangsmåtene kjent for fagpersoner innen teknikken, for eksempel som beskrevet i US patent nr. 4,522,811 (som er inkorporert heri dokumentet med fullstendig referanse). For eksempel kan liposom formuleringer tilberedes ved å løse opp hensiktsmessige lipider (slik som stearoyl fosfatidyl etanolamin, stearoyl fosfatidyl kolin, arakadoyl fosfatidyl kolin, og

kolesterol) i et uorganisk løsningsmiddel som deretter fordampes og etterlater en tynn film av tørket lipid på overflaten av beholderen. En vandig løsning av den aktive forbindelse eller dens monofosfat-, difosfat- og/eller trifosfat derivater innføres deretter i beholderen. Beholderen vendes i hånden for å løse lipid-materiale fra beholderens sider og for å dispergere lipid aggregater, dermed dannes den liposomale suspensjon.

Kontrollerte frigivelsesformuleringer

Alle US patentene referert i dette avsnitt som gjelder kontrollerte frigivelsesformuleringer er inkorporert med fullstendig referanse.

Området bionedbrytbare polymerer har utviklet seg raskt siden syntesen og bionedbrytbarheten av polymelkesyre ble beskrevet av Kulkarni et al., i 1966 ("Polylactic acid for surgical implants," *Arch. Surg.*, 93:839). Eksempler på andre polymerer som rapporteres å være nyttige som et matriks materiale for avleveringsanordninger omfatter polyanhydrider, polyestere slik som polyglykolider og polylaktid-co-glykolider, polyaminosyrer slik som polylysin, polymerer og copolymerer av polyetylen oksid, akryl terminert polyetylen oksid, polyamider, polyuretaner, polyortoestere, polyakrylnitriler, og polyfosfazener. Se for eksempel US patent nr. 4,891,225 og 4,906,474 til Langer (polyanhydrider), 4,767,628 til Hutchinson (polylaktid, polylaktid-co-glykolidsyre), og 4,530,840 til Tice, et al. (polylaktid, polyglykolid og copolymerer). Se også US patent nr. 5,626,863 til Hubbell, et al som beskriver fotopolymerbare bionedbrytbare hydrogeler som vevskontaktmaterialer og bærere for kontrollert frigivelse (hydrogeler av polymerisert og kryssbundet makromerer omfattende hydrofile oligomerer med bionedbrytbare monomer eller oligomer forlengelse, som er endedeksel monomerer og oligomerer som er i stand til å polymerisere og kryssbinde); og PCT WO 97/05185 innlevert av Focal, Inc. rettet mot multiblokk bionedbrytbare hydrogeler for anvendelse som kontrollert frigivelsesmiddel for medikamentavlevering og vevsbehandlingsstoffer.

Nedbrytbare materialer av biologisk opprinnelse er velkjente, for eksempel kryssbundet gelatin. Hyaluron syre er kryssbundet og anvendes som en nedbrytbar svellende polymer for biomedisinske applikasjoner (US patent 4,957,744 til Della Valle et al.; (1991) "Surface modification of polymeric biomaterials for reduced thrombogenicity," *Polym. Mater. Sci. Eng.*, 62:731-735)).

Mange dispersjonssystemer anvendes for tiden, eller utforskes for anvendelse som, bærere av substanser, spesielt biologisk aktive forbindelser. Dispersjonssystemer som anvendes for farmasøytiske eller kosmetiske formuleringer kan grupperes som enten suspensjoner eller emulsjoner. Suspensjoner defineres som faste partikler varierende i størrelse fra noen få nanometer opp til hundreder av mikron, dispergert i et flytende medium ved anvendelse av suspenderingsmidler. Faste partikler omfatter mikrosfærer, mikrokapsler og nanosfærer. Emulsjoner defineres som dispersjoner av en væske i en annen, stabilisert av en interfase film av emulgeringsmidler slik som surfaktanter og lipider. Emulsjon formuleringer omfatter vann-i-olje og olje-i-vann emulsjoner, multiple emulsjoner, mikroemulsjoner, mikrodråper og liposomer. Mikrodråper er unilamellære fosfolipid vesikler som består av et sfærisk lipidlag med en oljefase inni, som definert i US patent nr. 4,622,219 og 4,725,442 tilhørende Haynes. Liposomer er fosfolipid vesikler tilberedt ved å blande vannuløselige polare lipider med en vandig løsning. Den ugunstige entropi forårsaket av å blande det uløselige lipid i vann frembringer et svært ordnet montering av konsentriske lukkede membraner av fosfolipid der den vandige løsning er innesluttet.

US patent nr. 4,938,763 av Dunn et al., beskriver en fremgangsmåte for å danne et implantat in situ ved å løse opp en ikke-reaktiv, vannuløselig termoplastisk polymer i et biokompatibelt, vannløselig løsningsmiddel for å danne en væske, plassering av væsken i kroppen, og tillate løsningsmiddelet å forsvinne for å fremstille et fast implantat. Polymer løsningen kan plasseres i kroppen ved anvendelse av en sprøyte. Implantatet kan tilegne seg fasongen til det omgivende hulrom. I en alternativ utførelsesform dannes implantatet fra reaktive, væske oligomere polymerer som ikke inneholder løsningsmiddel og som herdes på stedet for å danne fast stoff, vanligvis ved tilsettelse av en herdekatalysator.

Et antall patenter beskriver medikament avleveringssystemer som kan anvendes for å administrere D-D4FC eller et nukleotid eller andre definerte prodruger av disse. US patent nr. 5,749,847 beskriver en fremgangsmåte for avlevering av nukleotider til organismer ved elektroporering. US patent nr. 5,718,921 beskriver mikrosfærer omfattende polymer og medikament dispergert. US patent nr. 5,629,009 beskriver et avleveringssystem for kontrollert frigivelse av bioaktive faktorer. US patent nr. 5,578,325 beskriver nanopartikler og mikropartikler av ikke-lineære hydrofile hydrofobe multiblokk copolymerer. US patent nr. 5,545,409 beskriver et

avleveringssystem for kontrollert frigivelse av bioaktive faktorer. US patent nr. 5,494,682 beskriver ioniske kryssbundede polymere mikrokapsler.

US patent nr. 5,728,402 tilhørende Andrx Pharmaceuticals, Inc. beskriver en kontrollert frigivelsesformulering som omfatter en indre fase som omfatter det aktive medikament, dets salt eller prodrug, i blanding med et hydrogel dannende stoff, og en ytre fase som omfatter et belegg som motstår oppløsning i magen. US patent nr. 5,736,159 og 5,558,879 tilhørende Andrx Pharmaceuticals, Inc. beskriver en kontrollert frigivelsesformulering for medikamenter med liten vannløselighet der en gjennomgang dannes in situ. US patent nr. 5,567,441 tilhørende Andrx Pharmaceuticals, Inc. beskriver en en gang om dagen kontrollert frigivelsesformulering. US patent nr. 5,508,040 beskriver et multipartikulært pulserende medikament avleveringssystem. US patent nr. 5,472,708 beskriver et pulserende partikkel-basert medikament avleveringssystem. US patent nr. 5,458,888 beskriver en kontrollert frigivelsestablettformulering som kan lages ved anvendelse av en blanding med en indre medikament-inneholdende fase og en ytre fase som omfatter en polyetylen glykol polymer som har en gjennomsnittlig molekylvekt fra 3,000 til 10,000. US patent nr. 5,419,917 beskriver fremgangsmåter for modifisering av frigivelseshastigheten til et medikament fra en hydrogel som baseres på anvendelse av en effektiv mengde av en farmasøytisk akseptabel ioniserbar forbindelse som er i stand til å frembringe en hovedsakelig nullte-ordens frigivelseshastighet av medikamentet fra hydrogelen. US patent nr. 5,458,888 beskriver en kontrollert frigivelsestablettformulering.

US patent nr. 5,641,745 tilhørende Elan Corporation, plc beskriver en farmasøytisk kontrollert frigivelsesformulering som omfatter det aktive medikament i en bionedbrytbar polymer for å danne mikrosfærer eller nanosfærer. Den biodegraderbare polymer er fortrinnsvis poly-D,L-laktid eller en blanding av poly-D,L-laktid og poly-D,L-laktid-co-glykolid. US patent nr. 5,616,345 tilhørende Elan Corporation plc beskriver en kontrollert absorpsjonsformulering for administrering en gang om dagen som inkluderer den aktive forbindelse i assosiasjon med en organisk syre, og en multilags membran som omslutter kjernen og inneholder en stor andel av en farmasøytisk akseptabel filmdannende, vann-uløselig syntetisk polymer og en mindre andel av en farmasøytisk akseptabel filmdannende vann-løselig syntetisk polymer. US patent nr. 5,641,515 beskriver en kontrollert frigivelsesformulering basert på bionedbrytbare nanopartikler. US patent nr. 5,637,320 beskriver en kontrollert absorpsjonsformulering for administrering en gang om dagen. US patent nr. 5,580,580

og 5,540,938 er rettet mot formuleringer og deres anvendelse ved behandling av neurologiske sykdommer. US patent nr. 5,533,995 er rettet mot en passiv transdermal anordning med kontrollert medikament avlevering. US patent nr. 5,505,962 beskriver en farmasøytisk kontrollert frigivelsesformulering.

5

10 P a t e n t k r a v

1.

Farmasøytisk sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter β -D-D4FC eller dens farmasøytisk akseptable salt, eventuelt i en farmasøytisk akseptabel bærer, sammen med abacavir, eventuelt i en farmasøytisk akseptabel bærer, som et kombinasjonspreparat for behandling eller forebygging av en HIV-infeksjon hos et menneske.

15

2.

Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at de effektive forbindelser administreres i en farmasøytisk akseptabel bærer.

20

3.

Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 1-2, k a r a k t e r i s e r t v e d at den farmasøytisk akseptable bæreren er egnet for oral avlevering, intravenøs avlevering, parenteral avlevering, intradermal avlevering, subkutan avlevering eller topisk avlevering.

25

4.

Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at forbindelsene er i form av en doseringsenhet.

30

5.

Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at doseringsenheten inneholder 10 til 1500 mg av hver forbindelse.

35

6.

Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d
at doseringsenheten er en tablett eller kapsel.

5 7.

Anvendelse av en sammensetning ifølge krav 1 for fremstilling av et medikament
for forebyggelse eller behandling av en HIV-infeksjon hos et menneske.

8.

10 Anvendelse ifølge krav 7, der de effektive forbindelser administreres i en
farmasøytisk akseptabel bærer.

9.

15 Anvendelse ifølge krav 8, der den farmasøytisk akseptable bærerene er egnet for
oral avlevering, intravenøs avlevering, parenteral avlevering, intradermal
avlevering, subkutan avlevering eller topisk avlevering.

10.

20 Anvendelse ifølge krav 7, der forbindelsene er i form av en doseringsenhet

11.

Anvendelse ifølge krav 7, der doseringsenheten inneholder 10 til 1500 mg av hver
Forbindelse.

25 12.

Anvendelse ifølge krav 31, der doseringsenheten er en tablett eller kapsel.

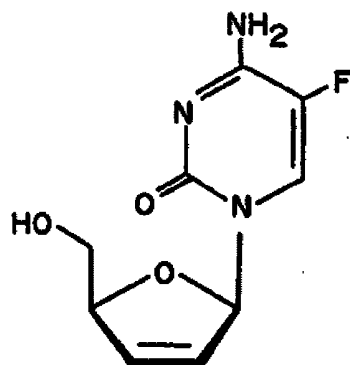


FIG. 1

B-D-D4FC

FIG. 2

