



УКРАЇНА

(19) UA (11) 92727 (13) C2
(51) МПК
A61K 31/405 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЛІКУВАННЯ АБО ПОПЕРЕДЖЕННЯ ГЕМОРАГІЧНИХ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ ЗА ДОПОМОГОЮ ІМУНОМОДУЛЮЮЧИХ СПОЛУК

1

2

(21) а200705421

(22) 27.10.2005

(24) 10.12.2010

(86) PCT/US2005/038834, 27.10.2005

(31) 60/622,022

(32) 27.10.2004

(33) US

(46) 10.12.2010, Бюл.№ 23, 2010 р.

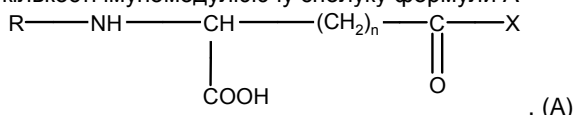
(72) МОССЕЛ ЕРІК С., US, ТАТХІЛЛ ЦІНТІЯ В., US, РУДОЛФ АЛЬФРЕД Р., US, ПІТЕРС КЛАРЕНС ДЖЕЙМС, US

(73) САЙКЛОН ФАРМАСЮТИКАЛС, ІНК., US, ДЗЕ БОАРД ОФ РЕГЕНТС ОФ ДЗЕ ЮНІВЕРСІТІ ОФ ТЕХАС СИСТЕМ, US

(56) US A 5916878 29.06.1999

US A 5744452 28.04.1998

(57) 1. Спосіб лікування або попередження геморагічної вірусної інфекції у індивідуума, який полягає в тому, що індивідуумові вводять в ефективній кількості імуномодулюючу сполуку формули А



у якій n означає 1 або 2, R означає водень, ацил, алкіл або пептидний фрагмент і X означає ароматичну або гетероциклічну амінокислоту або її похідну.

2. Спосіб за п. 1, у якому X означає L-триптофан або D-триптофан.

3. Спосіб за п. 1, у якому сполука являє собою SCV-07.

4. Спосіб за п. 1, у якому сполуку вводять у дозі, що становить приблизно 0,1-10 мг.

5. Спосіб за п. 1, у якому сполуку вводять у дозі, що становить приблизно 0,1-1 мг.

6. Спосіб за п. 1, у якому сполуку вводять у дозі, що становить приблизно 0,01-100 мкг/кг ваги тіла індивідуума.

7. Спосіб за п. 1, у якому сполуку вводять у дозі, що становить приблизно 0,1-10 мкг/кг ваги тіла індивідуума.

8. Спосіб за п. 7, у якому сполука являє собою SCV-07.

9. Спосіб за п. 1 лікування або попередження інфекції, що викликається вірусами родини Arenaviridae, включаючи вірус пропасниці Ласса,

вірус Юнін, вірус Мачупо, вірус Гуанаріто, вірус Сабіа, вірус білої води Арройо або вірус Флексала; родини Filoviridae, включаючи вірус Ебола або вірус Марбурга;

родини Bunyaviridae, включаючи вірус конго-кримської геморагічної пропасниці (CCHFV), вірус пропасниці долини Рифт, хантавіруси геморагічної пропасниці, асоційовані із нирковим синдромом, включаючи вірус Хантаан, вірус Сеула, вірус Добрава (який називають також вірусом Добрава-Белграда) або вірус Пуумала, хантавіруси, асоційовані з хантавірусним легеневим синдромом, включаючи вірус Бейоу, вірус каналу Блек Крік, вірус Нью-Йорка, вірус Син-Номбре, вірус Андеса, вірус Орана, вірус Юквітіба, вірус чорної лагуни або вірус Лехігуанаса; або родини Flaviviridae, включаючи вірус Денге, вірус хвороби лісу Куасанур, вірус геморагічної пропасниці Омська або вірус жовтої пропасниці.

10. Спосіб за п. 1 лікування або попередження пропасниці Ласса, південноамериканських геморагічних пропасниць, включаючи аргентинську геморагічну пропасницю, болівійську геморагічну пропасницю, венесуельську геморагічну пропасницю або бразильську геморагічну пропасницю, пропасницю, що викликається вірусом білої води Арройо, пропасницю, що викликається вірусом Флексала, геморагічної пропасниці Ебола, геморагічної пропасниці Марбурга, конго-кримської геморагічної пропасниці, пропасниці долини Рифта, геморагічних пропасниць, асоційованих із нирковим синдромом, включаючи геморагічну пропасницю, що викликається вірусом Хантаан, геморагічну пропасницю, що викликається вірусом Сеула, геморагічну пропасницю, що викликається вірусом Добрава, геморагічну пропасницю, що викликається вірусом Пуумала, геморагічні пропасниці, викликувані хантавірусами, асоційованими з хантавірусним легеневим синдромом, включаючи геморагічну пропасницю, що викликається вірусом Бейоу, геморагічну пропасницю, що викликається вірусом каналу Блек Крік, геморагічну пропасницю, що викликається вірусом Нью-Йорка, геморагічну пропасницю, що викликається вірусом Син-Номбре, геморагічну пропасницю, що викликається вірусом Андеса, геморагічну пропасницю, що викликається вірусом Орана, геморагічну пропасницю, що ви-

(13) C2

(11) 92727

(19) UA

кликається вірусом Юквітиба, геморагічну пропасницю, що викликається вірусом чорної лагуни, геморагічну пропасницю, що викликається вірусом

Лехігуанаса, геморагічної пропасниці Денге, синдрому шоку Денге, хвороби лісу Куасанур, геморагічної пропасниці Омська або жовтої пропасниці.

Даний винахід претендує на пріоритет попередньої заявки U.S. серійний номер 60/622,022, яка подана 27 жовтня 2004р. і включена в даний опис.

Даний винахід стосується лікування та попередження геморагічних вірусних інфекцій.

Віруси геморагічної пропасниці (HFV) являють собою віруси, які належать до декількох таксономічних родин. HFV викликають різні синдроми захворювання зі схожими клінічними характеристиками, які називають синдромами гострої геморагічної пропасниці. Патолофізіологічними відмінними ознаками HFV-інфекції є ураження мікросудин і підвищена проникність судин. До HFV, які являють собою РНК-віруси, належать віруси родини *Arenaviridae*, такі як вірус Ласса, а також віруси південноамериканських геморагічних пропасниць, включаючи віруси Юнін, Мачупо, Гуанаріто та Сабіа, які є збудниками пропасниці Ласса й аргентинської, болівійської, венесуельської та бразильської геморагічних пропасниць відповідно, вірус білої води Арройо (*Whitewater Arroyo*) і вірус Флексала; родини *Filoviridae* (віруси Ебола та Марбурга); родини *Bunyaviridae*: вірус конго-кримської геморагічної пропасниці (CCHFV), вірус пропасниці долини Рифта, хантавіруси геморагічної пропасниці, асоційовані із нирковим синдромом, включаючи вірус Хантаан, вірус Сеула, вірус Добрава (який називають також вірусом Добрава-Белграда) і вірус Пуумала, і хантавіруси, асоційовані з хантавірусним легенеvim синдромом, включаючи вірус Бейоу, вірус чорного грецького каналу (*Black Creek Canal*), вірус Нью-Йорка, вірус Син-Номбре, вірус Андеса, вірус Орана, вірус Юквітиба, вірус чорної лагуни та вірус Лехігуанаса; і родини *Flaviviridae* (Денге, пропасниці Денге, геморагічна пропасниця Денге, синдром шоку Денге, хвороба лісу Куасанур, геморагічна пропасниця Омська, жовта пропасниця).

У природних умовах зараження людей відбувається в результаті укусу інфікованого членистоногого або в результаті контакту з інфікованими тваринами-носіями збудника інфекції в природі. Віруси геморагічної пропасниці мають дуже велику інфекційність при переносі у вигляді частинок, що знаходяться у повітрі (аерозоль); вони приводять до високої захворюваності й у ряді випадків до високої смертності; і, очевидно, становлять велику небезпеку як біологічна зброя.

Точний патогенез HFV варіюється залежно від етіологічного агента. Основним органом-мішенню є ендотелій судин. Очевидно, у патогенезі HFV важливу роль відіграють імунологічні та запальні медіатори. Всі HFV можуть викликати тромбоцитопенію, а деякі викликають також тромбоцитарну дисфункцію. Інфекція вірусами Ебола та Марбурга, вірусом пропасниці долини Рифта та вірусом жовтої пропасниці приводить до руйнування інфікованих клітин. Для інфекції, яка викликається вірусами родини *Filoviridae*, характерно дисемінова-

не внутрішньосудинне згортання (DIC). Віруси Ебола та Марбурга можуть викликати геморагічний діатез і некроз тканини внаслідок безпосереднього ураження судинних ендотеліальних клітин і тромбоцитів, що супроводжується погіршенням мікроциркуляції, а також цитопатичними діями на паренхімні клітини з вивільненням імунологічних і запальних медіаторів. З іншого боку, віруси родини *Arenaviridae*, очевидно, опосередковують кровотечу шляхом стимуляції запальних медіаторів макрофагами, тромбоцитопенії і інгібування агрегації тромбоцитів.

Інкубаційний період при зараженні HFV становить від 2 до 21 днів. Клінічні картини цих захворювань є неспецифічними та варіабельними, що затрудняє встановлення діагнозу. Слід зазначити, що не у всіх пацієнтів розвиваються геморагічні прояви. Навіть серед пацієнтів, заражених вірусом Ебола, у значної частини можуть не проявлятися клінічні симптоми кровотечі.

Першими симптомами гострого HFV-синдрому можуть бути пропасниця, головний біль, міалгія, сип, нудота, блювота, діарея, біль в животі, артралгія, міалгія та нездужання. Захворювання, які викликаються вірусом Ебола, Марбурга, вірусом пропасниці долини Рифта, вірусом жовтої пропасниці, вірусом геморагічної пропасниці Омська та вірусом хвороби лісу Куасанур, характеризуються різким початком, в той час як пропасниця Ласса й захворювання, які викликаються вірусами Мачупо, Юнін, Гуанаріто та Сабіа, починаються більш непомітно. Перші ознаки можуть включати пропасницю, тахіпное, відносну брадикардію, гіпотензію (яка може розвиватися до циркуляторного шоку), крововилив під кон'юнктиву, фарингіт і лімфаденопатію. Може виникати енцефаліт, що супроводжується делірієм, епілептичними нападами, церебелярними ознаками та комою. Більшість HFV викликають почервоніння шкіри або плямисту шкіру висипку, хоча сип важко виявляти в темношкірих людей і він варіюється залежно від вірусу-збудника. Геморагічні симптоми, якщо вони виникають, розвиваються пізніше за перебігом хвороби й включають петехію, пурпуру, крововилив у слизові оболонки та кон'юнктиву, справжню гематурію, гематемезис і мелену. Як правило, відбувається ураження печінки й ураження нирок пропорційно серцево-судинної аномалії.

Аномалії, що виявляються у лабораторних умовах, включають лейкопенію (за винятком деяких випадків пропасниці Ласса), анемію або гемоконцентрацію, і підвищений рівень ферментів у печінці; як правило, має місце DIC, що супроводжується аномаліями згортання, і тромбоцитопенію. Рівні смертності становлять від менш ніж 1% для пропасниці долини Рифта до 70-90% для інфекцій, які викликаються вірусами Ебола та Марбурга.

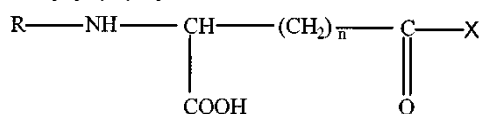
Неспецифічна та варіабельна клінічна картина, що викликається HFV, є суттєвою діагностич-

ною ознакою. Клінічні діагностичні критерії, засновані на затверджених ВОЗ стандартах для контролю синдрому гострої геморагічної пропасниці, включають температуру більше 101°F (38,3°C) протягом менш ніж 3 тижнів; хворобливий стан і відсутність факторів схильності до геморагічних проявів; і принаймні два з наступних геморагічних симптомів: геморагічна або пурпурна висипка, носова кровотеча, гематемезис, гематурія, кровохаркання, присутність крові в випорожненні або інші геморагічні симптоми з не встановленим альтернативним діагнозом. Лабораторні методи діагностики HFV включають виявлення антигену, виявлення антитіла IgM-класу, виділення в клітинній культурі, візуалізацію за допомогою електронної мікроскопії, імуногістохімічні методи та полімеразну ланцюгову реакцію зі зворотною транскриптазою.

Сучасна терапія інфекції, що викликається HFV, в основному є підтримуючою, однак залежно від агента з певним успіхом застосовували рибавірин. Пацієнти, інфіковані HFV, дають слабку реакцію на інфузію рідини й у них швидко розвивається набряк легенів.

Таким чином, у даній галузі зберігається необхідність у розробці способів лікування або попередження геморагічних вірусних інфекцій.

Відповідно до даного винаходу спосіб лікування або попередження геморагічної вірусної інфекції в індивідуума полягає в тому, що індивідуумові вводять в ефективній кількості імуномодулюючу сполуку формули A:



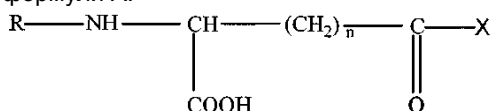
У формулі A, n означає 1 або 2, R означає водень, ацил, алкіл або пептидний фрагмент, і X означає ароматичну або гетероциклічну амінокислоту або її похідну. Бажано X означає L-триптофан або D-триптофан.

Один з варіантів здійснення даного винаходу стосується лікування або попередження геморагічних вірусних інфекцій шляхом введення індивідуумові імуномодулюючої сполуки.

Бажано індивідуум являє собою ссавця, більш краще індивідуум являє собою хвору людину.

Введення з метою попередження можна здійснювати індивідуумам, які мають високий ризик внаслідок контакту з потенційними носіями хвороби або безсимптомними носіями.

Імуномодуляторні сполуки, пропоновані в даному винаході, являють собою імуномодулятори формули A:



(A)

У формулі A, n означає 1 або 2, R означає водень, ацил, алкіл або пептидний фрагмент, і X означає ароматичну або гетероциклічну амінокислоту або її похідну. Бажано X означає L-триптофан або D-триптофан.

Відповідними похідними ароматичних або гетероциклічних амінокислот X є: аміди, моно- або діC₁-C₆алкілзаміщені аміди, ариламіди та складні C₁-C₆алкілові або арилові ефіри. Відповідними ацильними або алкільними фрагментами R є: розгалужені або нерозгалужені алкільні групи, які містять від 1 до приблизно 6 атомів вуглецю, ацильні групи, які містять від 2 до приблизно 10 атомів вуглецю, і блокувальні групи, такі як карбобензилоксигрупа та трет-бутилоксикарбоніл. Краще, якщо n означає 2, атом вуглецю групи CH, представленої у формулі A, має стереоконфігурацію, відмінну від стереоконфігурації X.

В кращих варіантах здійснення винаходу застосовують такі сполуки, як γ-D-глутаміл-L-триптофан, γ-L-глутаміл-L-триптофан, γ-L-глутаміл-N_{in}-форміл-L-триптофан, N-метил-γ-L-глутаміл-L-триптофан, N-ацетил-γ-L-глутаміл-L-триптофан, γ-L-глутаміл-L-триптофан, β-L-аспартил-L-триптофан та β-D-аспартил-L-триптофан. У найбільш кращих варіантах здійснення винаходу застосовують γ-D-глутаміл-L-триптофан, іноді позначуваний також SCV-07. Ці сполуки, методи одержання цих сполук, фармацевтично прийнятні солі цих сполук і їх фармацевтичні композиції описані в US 5916878, включеному в даний опис як посилання.

Винахід можна застосовувати для попередження і/або лікування геморагічних вірусних інфекцій, що включають (але не обмежуючись ними) інфекції, викликані вірусами родини Arenaviridae, такими як вірус Ласса, а також віруси південноамериканських геморагічних пропасниць, включаючи віруси Юнін, Мачупо, Гуанаріто та Сабіа, які є збудниками пропасниці Ласса й аргентинської, болівійської, венесуельської та бразильської геморагічних пропасниць відповідно, вірус білої води Арройо та вірус Флексала; родини Filoviridae (віруси Ебола та Марбурга); родини Bunyaviridae: вірус конго-кримської геморагічної пропасниці (CSHFV), вірус пропасниці долини Рифта, хантавіруси геморагічної пропасниці, асоційовані із нирковим синдромом, включаючи вірус Хантаан, вірус Сеула, вірус Добрава (який називають також вірусом Добрава-Белграда) і вірус Пуумала, і хантавіруси, асоційовані з хантавірусним легеневим синдромом, включаючи вірус Бейоу, вірус чорного грецького каналу, вірус Нью-Йорка, вірус Син-Номбре, вірус Андеса, вірус Орана, вірус Юквітиба, вірус чорної лагуни та вірус Лехігуанаса; і родини Flaviviridae (Денге, пропасниця Денге, геморагічна пропасниця Денге, синдром шоку Денге, хвороба лісу Куасанур, геморагічна пропасниця Омська, жовта пропасниця).

Вірус Пічинда (Pichinde) використовують як прийнята модель для пропасниці Ласса.

Сполуки формули A можна вводити в дозах, що становлять приблизно 0,001-10мг. Дози можна вводити один або декілька разів на тиждень, переважно щодня, шляхом введення доз один або декілька разів на день. Дози можна вводити шляхом внутрішньом'язової ін'єкції, хоча можна застосовувати інші форми ін'єкції та інфузії й інші форми введення, такі як оральна або назальна інгаляція або можна використати прийом усередину оральним шляхом.

У кращих варіантах здійснення винаходу сполуки формули А вводять у дозі, що становить приблизно 0,01-10мг, більш краще в дозі, що становить приблизно 0,1-1мг.

Дози можна вимірювати також у мікрограмах на кілограм ваги тіла індивідуума, у цьому випадку дози становлять приблизно 0,01-100мкг/кг, більш краще приблизно 0,1-10мкг/кг і найбільш краще приблизно 1мкг/кг.

Під обсяг винаходу підпадають аналоги, що мають біологічну активність, які містять фрагменти, що мають заміщення, делеції, подовження, заміни або інші модифікації, які мають практично таку ж біологічну активність, що й SCV-07, наприклад, пептид, що є похідною SCV-07, який має достатній ступінь гомології з SVC-07, так що він функціонує практично в такий же спосіб і має практично таку ж активність, що й SCV-07.

Введення можна здійснювати будь-яким придатним методом, включаючи введення оральним шляхом, шляхом ін'єкції, періодичної інфузії, безперервної інфузії й т.п.

У деяких варіантах здійснення винаходу сполуки формули А є присутніми у фармацевтично прийнятному рідкому носії, такому як вода для ін'єкцій, сольовий розчин, що містить фізіологічні концентрації солей, або т.п.

Ефективні кількості сполуки формули А можна визначати шляхом стандартних експериментів з титрування доз.

Сполуки формули А можна вводити також у сполученні з іншими імуностимуляторами або протівірусними засобами.

Аренавіруси викликають зростаюче занепокоєння суспільної охорони здоров'я як з погляду інфекцій, що виникають природним шляхом, так і можливості застосування як біологічної зброї. Родина *Arenaviridae* включає оболонкові віруси з амбісисловим бісегментним геномом. Його 22 члена підрозділяють на 2 серокомплекси. Комплекс лімфоцитарний хоріоменінгіт-Ласса включає п'ять відомих вірусів «Старого Світу», у той час як комплекс Такариба складається з 17 вірусів «Нового Світу» з Північної та Південної Америки. Кожний вірус пов'язаний з одним видом гризунів або із двома близькородинними видами гризунів-носіїв збудника інфекції в природі (можливим виключенням є вірус Такариба, що єдиний був виділений із двох видів кажанів). Ця тісна асоціація з хазяїном-гризуном обмежує географічне поширення вірусу до географічного поширення резервуара (тварини-носія). Вірус лімфоцитарного хоріоменінгіту (LCMV), асоційований з повсюдно розповсюдженою домашньою мишею (*Mus musculus*), є єдиним аренавірусом, виявленим у всьому світі.

Безсимптомно інфіковані гризуни входять у контакт із людьми, які заражаються в результаті вдихання вірусу, що перебуває в аерозольованих екскретах. Більшість аренавірусів не приводять до інфікування людини й не всі аренавіруси, про які відомо, що вони інфікують людей, викликають захворювання. Однак деякі аренавіруси викликають у людей захворювання від середнього до дуже серйозного ступеня важкості. Найбільш важливими є LCMV, які викликають фатальний ЦНС-синдром, вірус Ласса, що є етіологічним агентом

пропасниці Ласса, і віруси Юнін, Мачупо, Гуанаріто та Сабіа, які є збудниками південноамериканських геморагічних пропасниць.

Пропасниця Ласса, також як і тварина-носіїв вірусу Ласса, *Mastomys* sp., є ендемічним для Західної Африки. Захворювання характеризується пропасницею, слабкістю, хворобливим станом, головним болем і фарингітом і настає через 7-18 днів після зараження. До інших загальних симптомів належать біль у суглобах і спині, кашель, блювота та діарея. На відміну від геморагічних пропасниць вона не супроводжується шкірною висипкою, екхімозом або петехією. Летальність серед госпіталізованих пацієнтів становить 15-20%, але для всіх випадків зараження вірусом Ласса може становити менше 2-3%. Не було виявлено випадків переносу захворювання від людини до людини аерозольним шляхом. Однак контакт із виділеннями інфікованої людини являє собою значний фактор ризику.

Віруси Юнін, Мачупо, Гуанаріто та Сабіа, є етіологічними агентами південноамериканських геморагічних пропасниць: аргентинської, болівійської, венесуельської та бразильської геморагічної пропасниці відповідно. Незважаючи на розходження всі вони характеризуються подібними проявами, які включають пропасницю, хворобливий стан і міалгію, які починаються через 1-2 тижні після зараження. Коли хвороба прогресує, розвиваються додаткові симптоми: шлунково-кишковий дистрес, запаморочення, головний біль, фотофобія, ретроорбітальний біль, тахікардія, петехія та крововилив у кон'юнктиву. Вірус Мачупо, очевидно, найбільш пристосований для переносу захворювання від людини до людини, зафіксований нозокоміальний і внутрішньородинний перенос інфекції. На відміну від інших аренавірусів, які викликають геморагічну пропасницю, після зараження вірусом Гуанаріто відомі випадки розвитку глухоти, як і при зараженні вірусом Ласса. Смертність при зараженні вірусами південноамериканської геморагічної пропасниці становить приблизно 20%.

Внаслідок викликуваного ними високого рівня смертності, інфективності при передачі через частинки, які знаходяться у повітрі, і потенційну загрозу виникнення кризи охорони здоров'я вірусам Ласса, Юнін, Мачупо, Гуанаріто та Сабіа Центром з контролю захворюваності (CDC) була надана категорія А патогенів. Робота із цими агентами повинна виконуватися з дотриманням мер обережності, зазначених в BSL-4.

Вірус Пічинда (PIC) являє собою непатогенний вірус комплексу Такариба. Вірулентність PIC у морських свинках різко зростала в результаті серійних пасажів у селезінку в отриманих після 13 пасажів морських свинок. Інфікування морських свинок адаптованим вірусом викликало захворювання, дуже схоже на пропасницю Ласса у мавп і людини. При цьому виникали наступні симптоми: пропасниця, тромбоцитопенія, тромбоцитарна дисфункція, просочування із судин, респіраторний дистрес, реплікація вірусу в більшості тканин периферичної нервової системи та мінімальні гістологічні зміни в інфікованих тканинах. Оскільки вірус Пічинда не є патогенним для людини, то ця

модель знайшла широке застосування як малонебезпечної моделі при дослідженні пропасниці Ласса й геморагічної пропасниці, що викликається аренавірусами.

Нуклеозидний аналог рибавірин являє собою основний протівірусний терапевтичний засіб при пропасниці Ласса і є перспективним терапевтичним засобом при геморагічній пропасниці, яка викликається аренавірусами. Однак, хоча терапія з використанням рибавірину може попереджати або послабляти гостру геморагічну пропасницю, його застосування при аренавірусній інфекції іноді може приводити згодом до неврологічного захворювання. На моделях інфекції та захворювання, що викликається аренавірусами, у тварин було випробувано також декілька імунологічних методів лікування, але вони не увінчалися успіхом. *In vitro* аренавіруси в 10^3 - 10^4 -разів менш чутливі до IFN β , ніж вірус везикулярного стоматиту. Ця нечутливість підтверджується дослідженнями на інфікованих вірусом Мачупо макака-резус при використанні індукуючих IFN полі(ІСЛС). Загальна смертність і строк смерті не поліпшувалися в результаті терапії, а в деяких групах при обробці істотно підвищувалася віремія. Lucia і ін. досліджували застосування IFN α , рибавірину та імуномодулюючого лікарського засобу C246,783 на моделі з використанням інфікованих PIC морських свинок. До впливів, здійснюваних C246,783, належать індукція IFN і активація NK-клітин і макрофагів. У тварин, оброблених IFN α (аж до $1,7 \times 10^5$ од.) або C246,783, не було виявлено зниження смертності. У цьому дослідженні було виявлене зменшення смертності при введенні рибавірину щодня протягом 28 днів після інфекції; строк смерті пролонгувався при обробці на 14 днів. Відносна нечутливість аренавірусів до IFN типу I, очевидно, зіграла істотну роль у фактичній невдачі цих досліджень.

Незважаючи на ці невдачі ранніх спроб використання імунотерапії для аренавірусів Т-клітинна стимуляція все ще залишається невивченим методом лікування. Тому було проведено пілотне дослідження для вивчення впливу імуномодулюючого лікарського засобу SCV-07 на інфікованих PIC морських свинок. Відомо, що SCV-07 підвищує Th1-відповідь на імунологічні стимули.

SCV-07, γ -D-глутаміл-L-триптофан, є представником класу імуномодулюючих лікарських засобів, що мають γ -глутамільні або β -аспартильні фрагменти, що був відкритий російськими вченими і його ефективністю досліджується у відношенні декількох показників у США фірмою SciClone Pharmaceuticals, Inc. SCV-07 має багато видів імуномодулюючої активності *in vivo* та *in vitro*. SCV-07 підвищує індуковану Con-A проліферацію тимоцитів і лімфоцитів, підвищує індуковане Con виробництво інтерлейкіну-2 (IL-2) і експресію рецептора IL-2 лімфоцитами селезінки, і стимулює експресію Thy-1.2 на клітинах кісткового мозку. *In vivo* SCV-07 здійснює сильну імуностимулюючу дію на підданих імуносупресії за допомогою 5-FU тварин і на моделі імунізації з використанням овечих еритроцитів.

Точний механізм дії SCV-07 до кінця невиявлений. Однак, на основі вищевказаних даних було

зроблене припущення, що дія SCV-07 здійснюється завдяки його впливу на диференціювання плюрипотентних стовбурних клітин у тимоцити і/або диференціювання тимоцитів у Т-клітини. Крім того, оскільки введення SCV-07 приводить до збільшення Th1-цитокінів IL-2 і IFN γ , але не Th2-цитокінів, було зроблене припущення, що дія SCV-07 здійснюється шляхом переважної активації Th1-клітин.

Вся зростаюча кількість даних дозволяє припустити, що CD4⁺-Th1-клітини та асоційовані з ними цитокіни, включаючи IL-2 та IFN γ , відіграють важливу роль у формуванні захисної імунної відповіді на мікобактеріальну інфекцію. У дослідженнях з використанням моделі туберкульозу на мишах було встановлено, що SCV-07 істотно зменшує ураження легень. Продукування IFN γ індукованими за допомогою Con-A клітинами селезінки оброблених SCV-07 тварин було вище, у той час як виробництво IL-4 було нижче, ніж у клітинах необроблених тварин. Фагоцитарна активність перитонеальних макрофагів помітно збільшувалася в порівнянні з необробленими неінфікованими контролями. Ці дані доклінічних досліджень є основою для початку клінічних досліджень з застосування SCV-07. На фазі II клінічного дослідження, проведеної в Росії, було встановлено, що введення SCV-07 приводить до збільшення зустрічальності культур, що є присутніми у слизу, у яких відсутньої мікобактерії, і впливає на загострення каверн і симптом туберкульозу, без яких-небудь побічних дій, що індукуються лікарським засобом. Ефективність SCV-07 відносно випадків туберкульозу в людини підкріплює гіпотезу про його ефективність відносно інших захворювань, для яких встановлено, що Th1-імунітет відіграє важливу роль, включаючи викликане аренавірусами захворювання.

На основі вищевикладеного були розпочаті два пілотні дослідження з метою вивчення ефективності SCV-07 при лікуванні інфікованих PIC морських свинок.

Нижче винахід більш докладно проілюстрований на прикладах, що не обмежують його обсяг.

Приклад 1:

20 самців морських свинок лінії Hartley (вагою 400-450г) розподіляли на групи по п'ятьох особин у кожній.

Тваринам в групі 0 не вводили SCV-07.

Тваринам в групі 1 вводили і.р. по 1мкг/кг SCV-07 щодня протягом п'яти днів до зараження.

Тваринам в групі 2 вводили і.р. по 1мкг/кг SCV-07 один раз на день зараження.

Тваринам в групі 3 вводили і.р. по 1мкг/кг SCV-07 один раз наступного дня після зараження.

Інфекції: тварин інокулювали і.р. 100 БУО адаптованого для морських свинок PIC.

Вагу тіла та температуру, а також опосередковані маркери розвитку захворювання вимірювали принаймні три рази на тиждень. Очевидно, що хворих тварин оцінювали частіше. У попередній роботі постулювалося, що втрата 25% ваги являє кінцеву стадію захворювання тварини. Однак IACUC Медичного відділення Університету Техаса висунув вимогу, щоб як кінцеву втрату ваги визна-

валася втрату ваги, яка складає 20%, після чого тварин умертвляли.

У групі 0 поєднували тварин, що брали участь у двох окремих експериментах; в одному, котрий описаний у даному розділі і який проводили за участю груп обробки 1-3, і в іншому, що описаний нижче і який проводили за участю груп обробки 4-6.

Хоча була тенденція до прояву ефективності, що видно за зменшенням смертності в групах обробки, статистичний аналіз виживаності за методом Каплана-Мейєра з використанням логарифмічного рангового критерію підтвердив очевидний факт, що жодна із кривих виживаності оброблених тварин не мала статистично достовірної відмінності від кривої виживаності контрольних тварин

($p=0,66$, $0,77$ і $0,40$ для груп 1, 2 і 3 відповідно). Додавання ваги протягом 11 днів після зараження (д.п.з.) в оброблених тварин було найбільшим у групі 1 (таблиця 1), однак для жодної із груп додавання ваги не відрізнялося від контролів. Не було виявлено також розходжень температури, які оцінювали на 11 д.п.з., між обробленими та контрольними тваринами (таблиця 2). З таблиць 1 і 2 не видно, що одна контрольна тварина, яка вижила, належала до другої контрольної групи. Ця тварина різка змінила в контрольній групі середню температуру у бік зменшення, а додавання ваги у бік збільшення. Таким чином, вихідні результати дослідження більшою мірою дають підставу припустити наявність ефективності, ніж це можна бачити з об'єднаних даних.

Таблиця 1

Середній відсоток додавання ваги в інфікованих РІС морських свинок на 10-11 д.п.з.

Група	Середнє значення С.К.В.	± Значення Р*
0	1,79±13,50	
1	0,59±10,71	0,48
2	-3,75±12,48	0,92
3	-1,15±12,26	0,65
4	-0,35±20,07	0,64
5	6,73±19,02	0,21
6	5,62±16,78	0,23

* порівняння обробленої групи із групою 0 з використанням t-критерію Ст'юдента.

Таблиця 2

Середня температура (°C) в інфікованих РІС морських свинок на 10-11 д.п.з.

Група	Середнє значення С.К.В.	± Значення Р*
0	40,35±0,63	
1	40,40±1,00	0,72
2	40,48±0,72	0,82
3	40,40±0,69	0,68
4	40,03±0,59	0,23
5	39,38±0,75	0,17
6	40,28±0,63	0,46

* порівняння обробленої групи із групою 0 з використанням t-критерію Ст'юдента.

Хоча результати першого дослідження не виявилися статистично достовірними, вони були достатньою підставою для початку другого дослідження.

Приклад 2:

Знову 20 тварин розподіляли на 4 групи по п'ять особин у кожній.

Тваринам в групі 0 не вводили SCV-07.

Тваринам в групі 4 вводили і.р. по 1мкг/кг SCV-07 щодня протягом п'яти днів після зараження.

Тваринам в групі 5 вводили і.р. по 10мкг/кг SCV-07 щодня протягом п'яти днів після зараження інфекції.

Тваринам в групі 6 вводили і.р. по 100мкг/кг SCV-07 щодня протягом п'яти днів після зараження.

Інфекції: тварин інюкулювали і.р. 100 БУО адаптованого для морських свинок РІС.

Вагу тіла та температуру, а також опосередковані маркери розвитку захворювання вимірювали як описано вище.

Смертність знижувалася в групах 5 і 6, але тільки для групи 5 крива виживаності статистично вірогідно відрізнялася від групи 0 ($p=0,77$, $0,03$ і $0,27$ для груп 4, 5 і 6 відповідно). Додавання ваги тіла після 11 д.п.з. було більше в групах обробки 5 і 6, ніж у контрольних тварин, однак розходження не було статистично достовірним (таблиця 1). Температура тіла у всіх трьох групах обробки була нижче, ніж у контрольних тварин, але розходження також не були достовірним (таблиця 2). В обох експериментах у тварин брали зразки сироватки. У цей час аналіз цих зразків триває, але попередні результати дозволяють припустити наявність віремії, що не виявляється, за ~48год. до гострого захворювання та смерті.

Ці результати дозволяють припустити, що введення SCV-07 здійснює терапевтичну дію на інфікованих PIC морських свинок, про що свідчить тенденція зменшення смертності в декількох гру-

пах обробки та істотне зниження смертності при введенні і.р. лікарського засобу в дозі 10мкг/кг протягом 5 днів після зараження.