

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 962725 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **962725**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
**C07C335/16
C07C335/20
A61K 31/17**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **03.01.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **02.07.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **02.07.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **03.01.1995 PCT/US1995/000118**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

03.01.1994 US 176586

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Merrell Pharmaceuticals, Inc., 2110 East Galbraith Road, Cincinnati, OH 45215, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Dow Global Technologies Inc., Washington Street, 1790 Building, Midland, MI 48674, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Mullins, Michael John, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Fordyce, William Arthur, Midland, MI 48640, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 • Kruper, William Jack, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 • Peet, Norton P., Cincinnati, OH 45241, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

5 • Cardin, Alan Douglas, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Farmaseuttisia formulaatioita, jotka käsittävät polytioureaa sekä mene telmä niiden käyttämiseksi

Farmaceutiska formulationer som omfattar polytiourea samt förfarande för deras användning

Farmaseuttisia formulaatioita, jotka käsittävät polytioureaa sekä menetelmä niiden käyttämiseksi

5 Tämä keksintö koskee farmaseuttisia formulaatioita, jotka käsittävät polytioureaoligomeerejä sekä menetelmää niiden käyttämiseksi. Polytioureaoligomeerit ovat anionisia yhdisteitä, joilla on erityisen arvokas ihmisen immunopuutosviruksen vastainen aktiivisuus, ja nämä oligomeerit ovat tästä syystä käyttökelpoisia hankitun immuunipuutossyndrooman (AIDS) hoidossa.

Keksinnön tausta

Tällä hetkellä suoritetaan paljon tutkimusta ihmisten ja eläinten virusinfektioiden hoitojen ja parannuskeinojen kehittämiseksi. Etenkin AIDS:n ja AIDS:iin liittyvän kompleksin (ARC) esiintyvyys ihmisissä lisääntyy hälyttävällä nopeudella. Viiden vuoden henkiinjäämisluku AIDS'iin sairastuneilla on masentava, ja AIDS-potilaat, joiden immuunijärjestelmät ovat vakavasti heikentyneet infektion takia, kärsivät lukuisista opportunistisista infektioista, jotka käsittävät Kaposin sarkooman ja Pneumocystis carinii pneumonian. Ei tunneta AIDS:n parannusmenetelmää, ja suurimman osan nykyisiä hoitoja tehokkuutta ei ole riittävästi osoitettu ja niillä on useita ei-toivottuja sivuvaikutuksia. Sairauden pelko on johtanut sellaisten henkilöiden, joilla on tai joilla epäillään olevan sairaus, sosiaaliseen hylkäämiseen ja syrjintään.

ZA-patenttijulkaisussa nro 90/0094, myönnetty 31.10.1990, on esitetty, että hepariinin puhdistettu muoto, sulfatoitu polysakkaridi, sitoutuu vuorovaikutusten välityksellä viruksen sellaiseen proteiiniin, joka vastaa solun tunnistamisesta, ja tarjoaa rajoittuneen isäntäsolun infektoitumisen inhibition. Hepariini aiheuttaa kuitenkin joitakin sivuvaikutuksia, etenkin verenvuotoa ja pidentyneen hyytymän muodostumisajan sekä trombosytopeniaa. Hepariinin käyttö on kontraindikoitua potilaissa, jotka vuota-

vat aktiivisesti verta, tai joilla on hemofilia, purppura, trombosytopenia, kallon sisäinen verenvuoto, bakteerin aiheuttama sydämen sisäkalvon tulehdus, aktiivi tuberkuloosi, lisääntynyt hiussuonien läpäisevyys, gastrointestinaalisen kanavan ulseratiivisiä vaurioita, vakava verenpaine, uhkaava keskenmeno tai viskeraalinen karsinooma. Kontraindikaatio hemofiliaa sairastavien käytön kohdalla on erityisen tärkeää, koska useat tällaisista potilaista ovat nyt HIV-positiivisia.

On tiedetty pitkään, että tietyillä synteettisillä, veteenliukenevilla polymeereillä on laaja biologisen aktiivisuuden spektri [R. M. Ottenbrite julkaisussa Biological Activities of Polymers, Amer. Chem. Soc. Symp. Ser., nro 182, ss. 205 - 220, toimittajat C. E. Carraher ja C. G. Gebelein (1982)]. Vaikka tällaisten vesiliukoisten polymeerien vaikutusmekanismia ei tunneta, eräs oletus on, että polymeeri sitoutuu viruksen membraaniin ioniattraktion kautta tehden näin viruksen kykenemättömäksi infektoimaan isäntäsoluja. Valitettavasti näiden polymeerien äärimmäinen toksisuus on estänyt niiden klinisen käytön. Näillä polymeereillä on myös korkea molekyylipaino eivätkä ne pysty kulkemaan munuaismembraanien läpi.

On tehty yrityksiä välttää toksisuus- ja eritysongelmat syntetisoimalla pienimolekyylipainoisia (1 000 - 10 000) alifaattisia polymeerejä [R. M. Ottenbrite julkaisussa Biological Activities of Polymers, Amer. Chem. Soc. Symp. Ser., nro 182, ss. 205 - 220, toimittajat C. E. Carraher ja C. G. Gebelein (1982)]. On havaittu, että tällaiset polymeerit ovat vähemmän toksisia, mutta niillä on paljon vähentynyt antiviraalinen aktiivisuus. Nämä pienimolekyylipainoiset alifaattiset polymeerit voidaan luokitella "umpimähkäisesti kiertyviksi" polymeereiksi. Tällaisilla polymeereillä on konfiguraatio, jota ei voida ennustaa, johtuen runkoa linkittävien ryhmien joustavuudesta. Umpimähkäisesti kiertyvien polymeerien konfiguraatio

liuoksessa voidaan yleisesti kuvata globulaariseksi. Näiden umpimähkäisesti kiertyvien polymeerien vähentyneen antiviraalisen aktiivisuuden uskotaan johtuvan polymeerien matalasta sitoutumisaffiniteetista viruksen membraanin kanssa.

Eräs tapa ratkaista ongelmat umpimähkäisesti kiertyvien polymeerien kyseessä ollessa olisi tarjota polymeerejä, joilla on jäykät rungot, joilla on muutaman asteen vapaus.

Nyt on löydetty tiettyjä kiraalisia anionisia oligomeerejä, jotka inhiboivat viruksen replikoitumista, ilman hepariinin ja tunnettujen polymeerien aiheuttamia sivuvaikutuksia. Näillä anionisilla oligomeereillä on järjestynyt anionien jakautuminen, niillä on jäykkä runko ja ne ovat vesiliuukoisia. Anioniset oligomeerit polydispergoituneina seoksina on kuvattu samanaikaisesti vireillä olevassa US-patenttihakemuksessamme, sarjanro 710 370, haettu 10.6.1991, ja vastaavassa PCT-patenttihakemuksessa, sarjanro PCT/US91/04 804, haettu 8.7.1991, joiden selitysosat liitetään tähän viitteinä. Anioniset oligomeerit kaapaina poly- ja monodispergoituneina oligomeereina on kuvattu US-patenttihakemuksessa, sarjanro 818 753, haettu 9.1.1992, jonka selitysosa liitetään tähän viitteenä.

Tiettyjä akiraalisia anionisia polyureaoligomeerejä, joilla on jäykät rungot ja joilla on muutamien asteiden vapaus, on kuvattu samanaikaisesti jätetyssä patenttihakemuksessa.

Tiettyjä polytioureoita on kuvattu antiviraalisen aktiivisuutensa suhteen BE-patenttijulkaisussa nro 544 868, myönnetty 31.7.1956.

Keksinnön yhteenveto

Nyt on keksitty, että polytioureaoligomeereillä on ihmisen immunopuutosviruksen vastaista aktiivisuutta ja tästä syystä ne ovat käyttökelpoisia AIDS:n ja ARC:n hoi-

dossa. Oligomeerit käsittävät niiden farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat.

Tämä keksintö koskee tästä syystä vesiliukoista, jäykän rungon omaavaa polytioureaoligomeeriä, joka käsittää toistuvia yksiköitä, jotka ovat peräisin yhdisteestä, jolla on kaava:

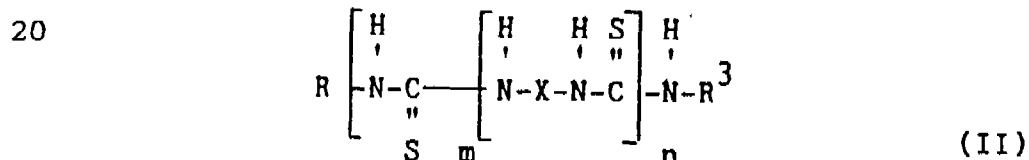


jossa X on divalenttinen aromaattinen hydrokarbyleeniradiikaali, joka on substituoitu vähintään yhdellä sulfonihapporyhmällä.

Keksinnön mukaisilla oligomeereilla on järjestynyt anioninen jaukautuminen anionisten sulfonihapporyhmien välillä. Oligomeerien keskimääräinen molekyylipaino M_n on vähemmän kuin 10 000.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Keksinnön mukaisia oligomeerejä kuvaa kaava:

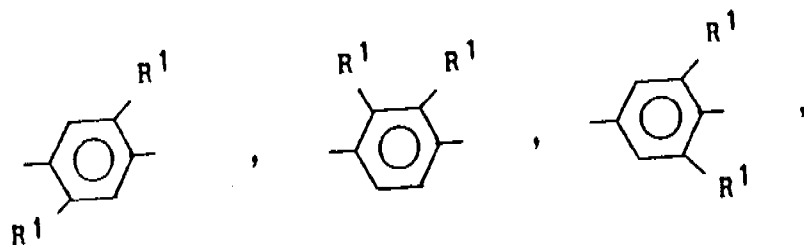


jossa

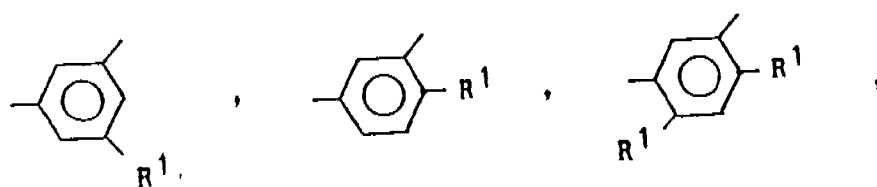
R on vety, C_{1-4} -alkyyli, fenyyli tai fenyyli, joka on substituoitu 0 - 2 R^1 -ryhmällä ja korkeintaan kolmella substituentilla, jotka on toisistaan riippumatta valittu kloori- tai bromiatomista, tai C_{1-4} -alkyyli-ryhmällä;
 R^1 on $-\text{SO}_3\text{R}^2$, $-\text{CO}_2\text{R}^2$, $-\text{PO}_3\text{R}^2$ tai $-\text{OPO}_3\text{R}^2$;
 R^2 on vety tai farmaseuttisesti hyväksyttävä kationi;
 R^3 on $-\text{R}$ tai $-\text{X}-\text{NHR}$, jossa R on kuten edellä on määriteltä;

X on

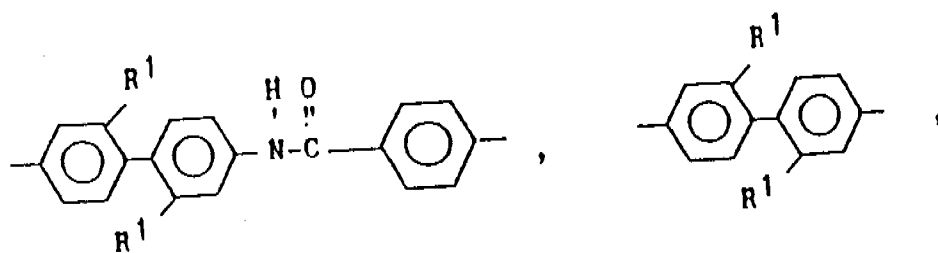
5



10

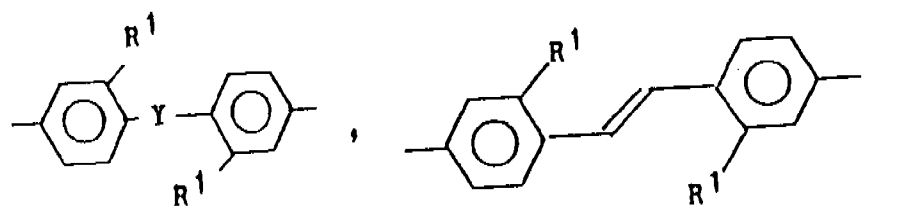


15

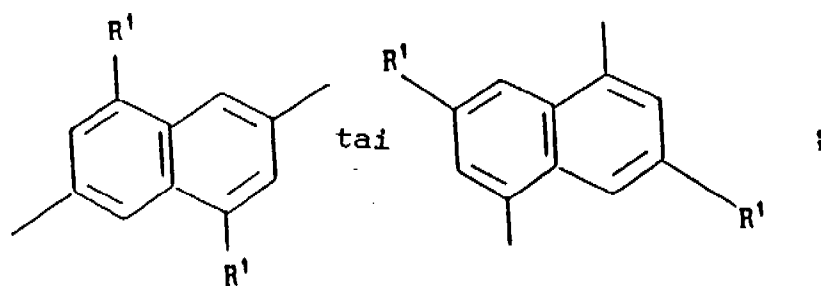


20

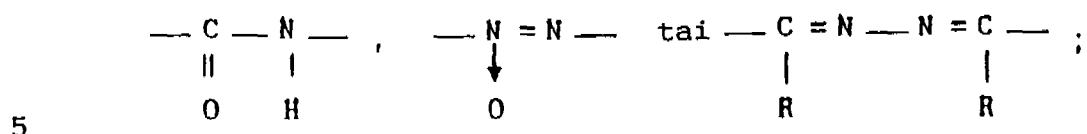
25



30

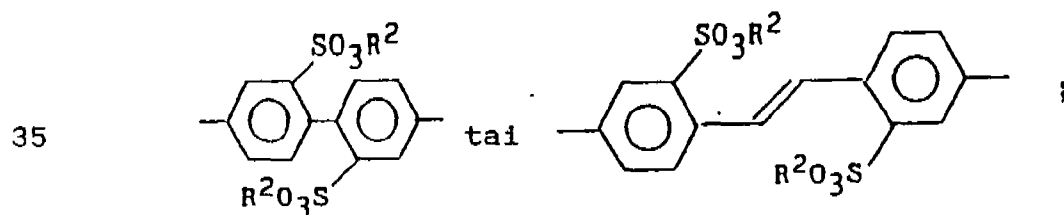
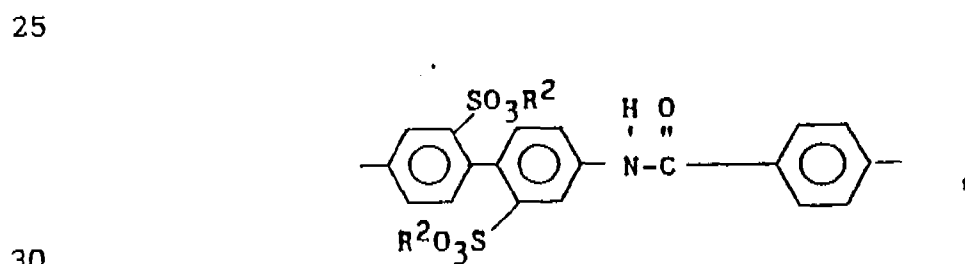
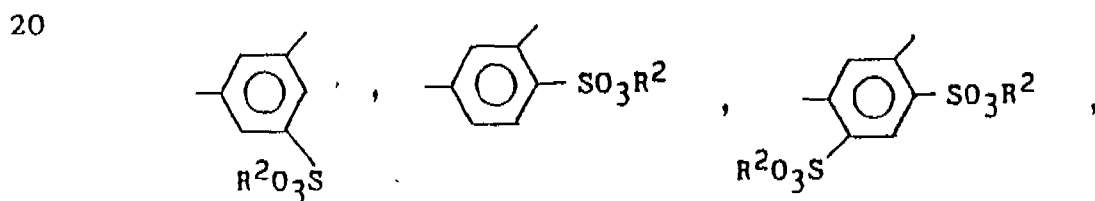
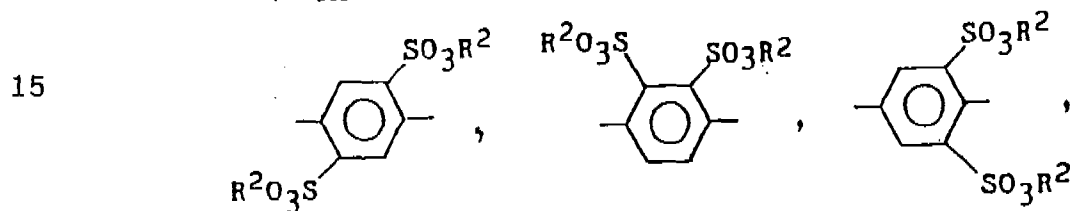


Y on $-\text{CO}_2-$, $-\text{C}\equiv\text{C}-$, $-\text{N}=\text{N}-$,

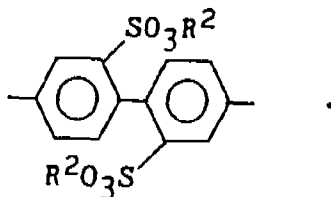


m on kokonaisluku 0 tai 1, sillä ehdolla, että kun m on 0, R^1 on vetyatomi, ja n on kokonaisluku 3 - 50.

10 Edullisia merkityksiä kaavalle I ovat seuraavat:
 R ja R^3 ovat 4-metyylifenyylliryhmä,
 m on 1,
 n on 3 - 15 ja
 X on



vaikka erityisen edullinen on



5

Termi "farmaseuttisesti hyväksyttävä kationi" tarkoittaa kationia, joka on hyväksyttävä farmaseuttiseen käyttöön. Sellaiset kationit, jotka eivät ole olennaisen toksisia annettuina annoksina halutun vaikutuksen aikaansaamiseksi ja jotka eivät riippumattomasti omaa merkittävää farmakologista aktiivisuutta, sisältyvät termiin "farmaseuttisesti hyväksyttävä kationi". Havainnollistaen nämä suolat käsittävät alkalimetallien, sellaista kuten natrium ja kalium, maa-alkalimetallien, sellaista kuten kalsium ja magnesium, ammoniumin, ryhmän IIIA kevyiden metallien, käsittäen aluminiumin, ja orgaanisten primääristen, sekundääristen ja tertiääristen amiinien, sellaista kuten trialkyyliamiinien, käsittäen trietyyliamiinin, prokaiinin, dibentsyyliamiinin, N,N'-dibentsyylietylenidi-amiinin, dihydroabietyyliamiinin, N-(C₁₋₄)alkyyli-piperidiinin ja minkä tahansa sopivan amiinin, suolat. Natrium- ja kaliumsuolat ovaat edullisia.

Termi "farmaseuttisesti hyväksyttävä" tarkoittaa sopivaa annettavaksi lämmilverisille eläimille, erityisesti ihmisille, ja käsittää merkitykset ei-toksinen, esim. sopiva farmaseuttisesti käytettäväksi ja ei ole myrkyllinen lämmilveriselle eläimelle. Tämän keksinnön mukaisten oligomeerien farmaseuttisesti hyväksyttävät kationit valmistetaan tavanomaisilla ioninvaihtomenetelmillä tai käsittelemällä R¹-happo sopivalla emäksellä.

Kun käyttö muuna kuin farmaseuttisina aineina on tämän keksinnön mukaisten oligomeerien tarkoitus, suoloja, jotka eivät muutoin olisi niin hyväksyttäviä farmaseuttisiin käyttötarkoituksiin, voidaan käyttää. Esimerkit täl-

35

laisista muista suoloista käsittävät bariumin, sinkin ja titaniumin.

"Järjestyneellä jakautumisella" tai "säännöllisellä jakautumisella anionisten ryhmien välillä" tarkoitetaan, että anionisia sulfonihapporyhmiä on läsnä polymeerin rungossa sellaisin välimatkoin, jonka käytetty lähtöainereagenssi määrää, ja anionisten ryhmien esiintymistä kontrolloidaan ennustettavalla tavalla. Vaikka minkään teorian ei toivota koskevan oligomeerien sulfonihapporyhmiä, niiden uskotaan olevan se osa, joka sitoutuu HIV:iin ja/tai solumembraaniin ja näin keskeyttää viruksen kyvyn replikoitua.

Tässä käytettynä termi "oligomeeri" käsittää kaikki mahdolliset n:n arvot, esim. 3 - 50. Oligomeerit ovat edullisesti lineaarisia n:n ollessa yhtäsuuri kuin kokonaisluku 3 - 50, edullisesti 3 - 20, edullisemmin 3 - 15. Tietysti n:n arvo liittyy suoraan saatavan oligomeerin molekyylipainoon. On olennaista, että näillä oligomeereilla on riittävän matala molekyylipaino, jotta ne pystyvät kulkemaan munuaisen eritysmembraanin läpi, mutta kykenevät inhiboimaan HIV-viruksen. Keskimääräisen molekyylipainon määrää reagenssien stökiometria. Keskimääräinen molekyylipaino (M_n) on <10 000, edullisesti noin 500 - noin 10 000 ja edullisimmin noin 1 000 - noin 6 000.

Tämän keksinnön tarkoituksia varten tässä kuvattuja oligomeerejä ja niiden fysiologisesti hyväksyttäviä suoloja pidetään ekvivalentteina. Fysiologisesti hyväksyttävät suolat viittaavat sellaisten emästen suoloihin, jotka muodostavat suolan vähintään yhden R^1 -ryhmän happoryhmän kanssa ja jotka eivät aiheuta merkittäviä fysiologisia haittavaikutuksia annettuina kuten tässä on kuvattu. Sopivat emäkset käsittävät esimerkiksi alkalimetalli- ja maaalkalimetallihydroksidit, -karbonaatit ja -bikarbonaatit, sellaiset kuten natriumhydroksidi, kaliumhydroksidi, kalsiumhydroksidi, kaliumkarbonaatti, natriumbikarbonaatti,

magnesiumkarbonaatti ja muut samanlaiset, ja ammoniakkin, primääriset, sekundääriset ja tertiääriset amiinit ja muut samanlaiset. Erityisen edullisia emäksiä ovat alkalimetallihydroksidit, -karbonaatit ja -bikarbonaatit. Fysiologisesti hyväksyttävät suolat voidaan valmistaa tavanomaisilla ioninvaihtomenetelmillä tai käsittelemällä R^1 -happoa sopivalla emäksellä. Esimerkkejä muista suoloista on kuvattu tässä.

Tämän keksinnön mukaiset formulaatiot ovat kiinteässä tai nestemäisessä muodossa. Nämä formulaatiot voivat olla pakkauksen muodossa siten, että komponentit sekoitetaan sopivana ajankohtana ennen käyttöä. Ollessaan joko ennaltasekoitettuja tai pakkauksena formulaatiot tarvitsevat tavallisesti farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan tai apuaineen.

Tämän keksinnön mukaiset oligomeerit ovat liuukoisia veteen ja suolojen liuoksiin, erityisesti fysiologiassa pH:ssa ja suolaliuoksiin. Näin ollen nämä oligomeerit voidaan helposti formuloida sopivaan vesipitoiseen farmaseuttiseen annosmuotoon. Myöskin sen jälkeen kun tämä oligomeeriformulaatio on annettu, oligomeeri pysyy liukoisena in vivo.

Heikkojen, haihtuvien happojen suolaa lisäämällä oligomeerit liuoksessa haihtuvien amiinien ammoniumsuoloina voidaan konvertoida edullisemmiksi farmaseuttisesti hyväksyttäviksi suoloiksi, sellaisiksi kuten natrium- tai kaliumsuolat, käsittelemällä liuos heikon haihtuvan hapon alkalimetallisuolalla. Konsentroidaessa liuos haihduttamalla tai lyofilisoimalla amiini ja heikko happo poistetaan ja oligomeerit eristetään alkalimetallisuoloinaan. Sopivia esimerkkejä ammoniumsuoloista, jotka voidaan konvertoida tässä vaiheessa, ovat ammoniakkin, monoetyyliamiinin, trietyyliamiinin, trimetyyliamiinin tai dimetyyliamiinin suolat (tässä "ammoniumsuolat"). Esimerkkejä alka-

limetallisuoloista ovat natrium- tai kaliumhydroksidi, -bikarbonaatti, -asetaatti, -formaatti tai -propionaatti.

Anionisen oligomeerin valmistus

Anioniset polymeerit valmistetaan käyttämällä kah-
 5 ta menetelmää. Ensimmäinen menetelmä, epäspesifinen mene-
 telmä, jolla saadaan polydispersinen oligomeerien seos,
 käsittää diamiinin yhdistämisen tioureaprekursorin kanssa,
 sellaisen kuten tiofosgeeni tai tiokarbonyylidi-imidatso-
 10 li. Mahdollisesti läsnä on monofunktionaalinen pään peit-
 tävä aine, happoakseptori reaktio-pH:n kontrollointia var-
 ten ja veteensekoittumaton liuotin. Kuvataan myös menetel-
 mä päistä vapaan polytioureaan, jossa on amiinipää, kon-
 vertoimiseksi polymeeriksi, käyttämällä monofunktionaalis-
 ta amiinireaktiivista ainetta, tai yhdistämällä päistä va-
 15 paa polymeeri amiinia sisältävän monofunktionaalisen pään
 peittävän aineen ja tioureaprekursorin kanssa.

Toinen menetelmä käsittää vaiheittaisen polymeeri-
 ketjun rakentamisen bisisotiosyanaatin ja diamiinin peräk-
 käisillä lisäämisillä. Vaikka tämä menetelmä on työläämpi,
 20 saadaan polytioureaa, jolla on vähäinen dispersiivisyys.

Menetelmää polytioureoiden valmistamiseksi kuva-
 taan edelleen seuraavasti.

Diamiinit: Tämän keksinnön mukaiset diamiinit ovat
 primäärisesti aromaattisia, ja niillä on kaavat, jotka on
 25 kuvattu edellisissä osissa. Tällaiset diamiinit on subs-
 tituoitu vähintään yhdellä ryhmällä, joka on varautunut
 neutraalisissa pH:ssa, edullisesti sulfonaatti. Monovalent-
 tiset, alifaattiset substituentit ovat sallittuja. Pieni
 ryhmä alifaattisia liittäviä ryhmiä, jotka yhdistävät aro-
 30 maattisia radikaaleja yhteen, voidaan käyttää, sellaisia
 kuten trans-substituoitu etyleeni ja asetyleeni. Edullisia
 diamiineja ovat sellaiset, joissa hiili-tyyppi -sidokset on
 pakotettu yhdensuuntaisiksi, sellaiset kuten 2,5-diamino-
 1,4-bentseenidisulfonihappo, 4,4'-diamino-(1,1'-bifenyy-
 35 li)-2,2'-disulfonihappo, trans-2,2'-(1,2-eteenidiyyli)bis-

(5-aminobentseenisulfonihappo) ja 2,5-diaminobentseenisulfonihappo.

Tioureaprekursorit: Erilaisia tioureaprekursoreita tai difunktionaalisia elektrofiilejä, sellaisia kuten tiofosgeeni (tiokarbonyylidikloridi), tiokarbonyylidibromidi, ja muita ureaprekursoreita, sellaisia kuten tiokarbonyyli-di-imidatsoli, heksaklooritioasetoni, $\text{Cl}_3\text{CSCOC}_2\text{CCl}_3$, CCl_3CSCl ja Cl_3OCSCl , voidaan käyttää.

Happoakseptorit: Erilaisia epäorgaanisia emäksiä voidaan käyttää, sellaisia kuten alkalimetalli- tai divalenttisten metallien hydroksidit -karbonaatit, -bikarbonaatit, -fosfaatit. Edullisia ovat happoakseptorit, joilla on puskuroivia ominaisuuksia, silloin kun kaikki emäs lisätään ennen difunktionaalisen elektrofiilin lisäämistä. Orgaanisia emäksiä, sellaisia kuten trialkyyliamiinit, voidaan käyttää, mutta ne eivät ole edullisia.

Monofunktionaalinen pään peittävä aine: Erilaisia tällaisia molekyyllipainoa rajoittavia aineita voidaan käyttää. Tällaiset aineet voivat olla alifaattisia tai aromaattisia yhdisteitä, jotka reagoivat diamiinien tai difunktionaalisten elektrofiilien kanssa. Esimerkkejä sopivista monofunktionaalisista aineista ovat amiinit, sellaiset kuten aniliini, metyylianiliini, metyyliamiini, etyyliamiini, butyyliamiini, dietyyliamiini, ammoniakki ja N-metyylaniliini. Esimerkkejä monofunktionaalisista amiinin kanssa reaktiivisista aineista ovat bentsoyylikloridi, metyylibentsoyylikloridi, asetyylikloridi, metyyli-isosyanaatti, metyyli-isotiosyanaatti, fenyyli-isosyanaatti, fenyyli-isotiosyanaatti, p-tolyyli-isotiosyanaatti ja fenyylikloroformaatti. Nämä pään peittävät aineet voivat myös sisältää varautuneita substituentteja, esimerkiksi kalium-2-sulfofenolia tai kalium-4-sulfoaniliinia.

Erilaisia lisäaineita: Pinta-aktiivisten aineiden lisääminen ei ole välttämätöntä eikä edullista, ja se voi komplisoida eristysprosessia.

Liuoittimet: Yksi liuotin, vesi, on edullinen, silloin kun difunktionaalinen elektrofiili on neste reaktiolämpötilassa. Esimerkki tällaisesta difunktionaalisesta eelektrofiilistä on tiofosgeeni. Käytettäessä kiinteitä, veteen liukenemattomia reaktantteja pieni määrä veteensekoittumattomasta koliuotinta on toivottavaa. Esimerkkejä tällaisista veteensekoittumattomista koliuottimista ovat kloroformi, hiilitetrakloridi, tolueeni ja metyleenikloridi. Orgaanisten ja vesipitoisten liuottimien tyypilliset suhteet ovat 0 - 1, 0 - 0,1 on edullinen.

Menetelmä suoritetaan lämpötiloissa, jotka mahdollistavat reaktion etenemisen, tyypillisesti noin 0 - 100 °C:ssa. Edulliset lämpötilat ovat 0 - 25 °C. Käytettäessä tiofosgeenia, kunnan sekoitus on tärkeää. Pienten laboratoriomittakaavan kokeet suoritettiin MixxorTM:ssä, yksinkertaisessa lasilaitteessa, jota käytettiin manuaalisesti, jossa reaktantit pakotetaan edestakaisin kapean kanavan läpi. Paine ei ole tärkeä ja tyypillisesti käytetään ympäristön painetta. Reaktioseoksen pH tulee ylläpitää huolellisesti optimaalisen prosessin saamiseksi. Eräs huomioon otettava seikka on se, että varautuneilla diamiineilla on rajoittunut liuokoisuus happamissa pH-arvoissa, jotka ovat alle 4. Matalassa pH:ssa (< 6) reaktio on myös hyvin hidas, kun taas korkeassa pH:ssa (> 10) difunktionaalinen elektrofiili on epästabiili reagoimaan hydroksidin tai muun emäksen kanssa. Polytioureaan hajoamista voi myös esiintyä korkeassa pH:ssa. pH:ta pidetään edullisesti välillä 6 - 9.

Kun ei käytetä päätä peittävää ainetta, molekyyli-
lipainon kontrollointi voidaan suorittaa reaktanttien
stökiometrian huolellisella säädöllä tai käyttämällä
toista menetelmää. Joko diamiinia tai difunktionaalista
elektrofiiliä voidaan käyttää ylimäärin, esimerkiksi 1 -
100-%:inen molaarinen ylimäärä. Tämän stökiometrian tulee
vastata kaikkea sitä difunktionaalista elektrofiiliä, jo-

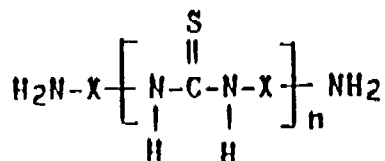
ka tuhoutuu hydrolysoitumalla ennen reaktiota diamiinin kanssa. Esimerkiksi käytettäessä tiofosgeenia korkeassa pH:ssa, tarvitaan suuri ylimäärä kompesnsoimaan nopea reaktio hydroksidin kanssa, joka tuhoaa sitä. Koska tämän sivureaktion laajuutta on vaikea kontrolloida, käytetään edullisesti monofunktionaalista pään peittävää ainetta molekyyli-painon kontrolloimiseksi. Vaikka mainittuja menetelmiä voidaan käyttää kontrolloimaan keskimääräistä molekyyli-painoa käytettäessä ensimmäistä menetelmää, tuotteet ovat useiden eri molekyyli-painoisten polymeerien seoksia, joille on luonteenomaista dispersiivisyys.

Reaktanttien lisäämisjärjestys ei ole kriittinen. Edullinen järjestys on kuitenkin lisätä difunktionaalinen elektrofiili ensin. Käytettäessä happoakseptoreita, jotka eivät ole puskureita, sellaisia kuten hydroksidi, on edullisinta lisätä osa alussa halutun pH:n saavuttamiseksi ja sen jälkeen lisätä loppuosa yhtä aikaa difunktionaalisen elektrofiilin kanssa.

Konsentraatio ei ole kriittinen, ja se voi olla 0,5 - 50 paino-%, ilmaistuna diamiinin painona liuottimen painon suhteen. Edullinen väli on 0,5 - 5 paino-%.

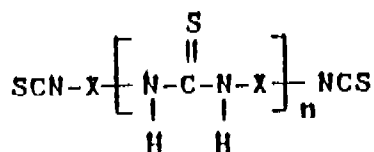
Toinen menetelmä, joka on suunniteltu kapean dispersiivisyyden omaavien polytioureoiden valmistamiseksi, esitetään alla. Tässä menetelmässä ketjun pituutta kasvatetaan kahdella toistoyksiköllä joka kerta kun kaksivaiheista sykliä toistetaan. Havainnollistamiseksi, tarkastellaan tilannetta, jossa lähtöaine on yksinkertainen diamiini ('n' = 0 ylimmäisessä kaavassa). Diamini konvertoidaan tioureaprekursorilla, sellaisella kuten tiofosgeeni, bis-isotiosyanaatiksi (keskimmäinen kaava, jossa 'n' = 0). Bis-isotiosyanaatin käsittely ylimäärällä diamiinia antaa tiureaoligomeerin, jossa on kaksi toistoyksikköä ('n' = 2 alimmassa kaavassa). Tämä sekvenssi toistetaan ketjun pituuden lisäämiseksi sekvenssissä 0, 2, 4, 6 jne.

5



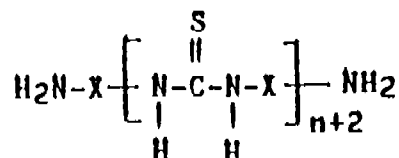
↓ tiourea-
prekursori

10



↓ ylimäärä
diamiinia

15



20

Tässä menetelmässä olosuhteet jokaisessa vaiheessa ovat samanlaiset edellä ensimmäiselle menetelmälle, jossa tuotetaan polydispersistä polytioureaa, kuvattujen kanssa. Ensimmäinen ero on se, että reaktanttien stökiometria aikaisemmassa menetelmässä oli lähes 1:1. Tässä menetelmässä lisättävää reagenssia, tiourea ensimmäisessä vaiheessa ja diamiini toisessa vaiheessa, lisätään suurena ylimääränä. Pidentyvän ketjun molaarinen suhde lisättyyn reagenssiin on karkeasti 1:3 - 1:50, edullisen välin ollessa 1:5 - 1:10.

Ei ole tarpeen eristää pitenevää ketjua missään vaiheessa. Edullinen menetelmä on diamiinin (tai oligomeerin, jossa on amiinipäät) käsitteleminen tioureaprekursorin ylimäärällä riittävän ajan amiinipäiden täydelliseksi konvertoimiseksi isotiosyanaateiksi. Sen jälkeen ylimäärä-

35

räinen tioureaprekursori poistetaan uuttamalla veteensekoittumattomaan liuottimeen, sellaiseen kuten metyleenikloridi. Bis-isotiosyanaatin vesipitoinen liuos käsitellään sen jälkeen ylimäärällä diamiinia. On mahdollista kuitenkin eristää bis-isotiosyanaatti siten kuin eräässä esimerkissä kuvatussa tapauksessa tehtiin.

Tuote voidaan eristää saostamalla reaktioliuos liuottimeen, joka sekoittuu veden kanssa, mutta on huono liuotin tuotteelle. Esimerkkejä tällaisista liuottimista ovat asetoni, metanoli, etanoli, isopropanoli.

Formulaatioita ja käyttömenetelmä

HIV:n vastaisia anionisia oligomeerejä voidaan käyttää ehkäisemään synsytiumin muodostumista soluissa, jotka HIV-I-virus tai jokin muu sille sukua oleva virus, jolla on gp120 pintaproteiinia, on infektoinut. HIV:n vastaisia anionisia oligomeerejä voidaan käyttää AIDSin ja ARC:n ja muiden sairauksien hoidossa, jotka retrovirus HIV-I tai jokin muu sille sukua oleva virus, jolla on gp120 pintaproteiinia, on aiheuttanut.

HIV:n vastaisten anionisten oligomeerien määrä, joka tarvitaan synsytiumin muodostumisen ehkäisemiseksi HIV:n infektoimissa soluissa, voi olla mikä tahansa vaikuttava määrä. Kokeellisesti on määritetty, että HIV:n vastaiset anioniset oligomeerit käytettynä konsentraationa 10 µg/ml vesipitoista formulaatiota johtivat synsytiumin muodostumisen täydelliseen estymiseen sekä vähensivät p24-antigeenin, joka on viruksen replikoitumisen indikaattori, määrää alle 300 pg:aan ml:ssa. HIV:n vastaisten anionisten oligomeerien määrä, joka annetaan AIDS:n tai ARC:n tai muiden HIV-infektion aiheuttamien sairauksien hoitamiseksi, voi vaihdella suuresti tietyn käytetyn annosyksikön, hoitoajan, hoidettavan potilaan iän ja sukupuolen, hoidettavan sairauden luonteen ja laajuuden ja muiden lääkärin-tointa harjoittavien hyvin tuntemien tekijöiden mukaan. Lisäksi HIV:n vastaisia oligomeerejä voidaan käyttää yh-

dessä muiden retrovirusten aiheuttamien sairauksien hoidossa käyttökelpoisiksi tunnettujen aineiden ja retrovirusten aiheuttamiin sairauksiin ja tiloihin liittyvien oireiden ja komplikaatioiden hoitoon käyttökelpoisiksi tunnettujen aineiden kanssa.

HIV:n vastaiseksi tehokas määrä HIV:n vastaisia anionisia oligomeerejä, joita annetaan tämän keksinnön mukaisesti, on tavallisesti välillä noin 0,1 - 500 mg/kg potilaan kehon painoa ja ne voidaan antaa yhden tai useamman kerran päivässä.

HIV:n vastaisia anionisia oligomeerejä voidaan antaa farmaseuttisen kantaja-aineen kanssa käyttämällä tavanomaisia yksikköannosmuotoja joko oraalisesti tai parenteraalisesti.

Oraalisesti annettaviksi HIV:n vastaiset anioniset oligomeerit voidaan formuloida kiinteiksi tai nestemäisiksi valmisteiksi, sellaisiksi kuten kapselit, pillerit, tabletit, lääkeapit, pastillit, sulatteet, jauheet, liuokset, suspensiot tai emulsiot. Kiinteät yksikköannosmuodot voivat olla kapseli, joka voi olla tavanomainen kova tai pehmeäkuorinen gelatiinityyppinen, joka sisältää esimerkiksi pinta-aktiivisia aineita, voiteluaineita ja inerttejä täyteaineita, sellaisia kuten laktoosi, sakkaroosi, sorbitoli, kalsiumfosfaatti ja maissitärkkelys. Toisessa suoritusmuodossa tämän keksinnön mukaisista anionisista oligomeereistä voidaan tehdä tabletteja tavanomaisten tablettiperusaineiden kanssa, sellaisten kuten laktoosi, sakkaroosi ja maissitärkkelys, yhdessä sitovien aineiden, sellaisten kuten akaasia, maissitärkkelys tai gelatiini, disintegroivien aineiden, jotka on tarkoitettu helpottamaan tabletin rikkoutumista ja liukenemista antamisen jälkeen, sellaisia kuten perunatärkkelys, algiinihappo, maissitärkkelys ja guarkumi, voiteluaineita, joiden on tarkoitus parantaa tablettirakeiden virtausta ja estää tablettiaineen adheesio tablettisuuttimien ja -lävistimien

pinnoille, esimerkiksi talkki, steariinihappo tai magnesium-, kalsium- tai sinkkistearaatti, värien, värjäävien aineiden ja flavoriaineiden, joiden on tarkoitus lisätä tablettien esteettisiä ominaisuuksia ja tehdä niistä hyväksyttävämpiä potilaalle, kanssa. Sopivat täyteaineet käytettäväksi oraalisissa nestemäisissä annosmuodoissa käsittävät laimentimet, sellaiset kuten vesi ja alkoholit, esimerkiksi etanoli, bentsyylialkoholi, ja polyetyleeniglykolit, joko lisäten farmaseuttisesti hyväksyttävää pinta-aktiivista ainetta, suspendoivaa ainetta tai emulgoivaa ainetta, tai ilman niitä.

Tämän keksinnön mukaisia HIV:n vastaisia anionisia oligomeerejä voidaan myös antaa parenteraalisesti, eli subkutaanisesti, intravenoosisesti, intramuskulaarisesti tai interperitoneaalisesti, kuten anionisten oligomeerien injektoitavat annokset fysiologisesti hyväksyttävässä laimentimessa farmaseuttisen kantajan kanssa, joka voi olla steriili neste tai nesteseos, sellainen kuten vesi, suolaliuos, vesipitoinen dekstroosi ja läheiset sokeriliuokset, alkoholi, sellainen kuten etanoli, isopropanoli tai heksadekyylialkoholi, glykolit, sellainen kuten propyleeniglykoli tai polyetyleeniglykoli, glyseroliketaalit, sellainen kuten 2,2-dimetyyli-1,3-dioksolaani-4-metanoli, eetterit, sellaiset kuten poly(etyleeniglykoli) 400, öljy, rasvahappo, rasvahappoesteri tai glyseridi tai asetyloitu rasvahappoglyseridi, farmaseuttisesti hyväksyttävää pinta-aktiivista ainetta, sellaista kuten saippua tai detergentti, suspendoivaa ainetta, sellaista kuten pektiini, karbomeerit, metyyliiselluloosa, hyrdoksiopropyylimetyyliiselluloosa, tai karboksimeetyliiselluloosa, tai emulgoivaa ainetta ja muita farmaseuttisia apuaineita lisäämällä tai ilman niitä.

Esimerkkejä öljyistä, joita voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisissa parenteraalisissa formulaatioissa ovat raakaöljy-, eläin-, kasviperäiset tai synteettistä

alkuperää olevat, esimerkiksi maapähkinäöljy, soijaöljy, seesamiöljy, puuvillansiemenöljy, maissiöljy, oliiviöljy, vaseliini ja mineraaliöljy. Sopivat rasvahapot käsittävät oleiinihapon, steariinihapon ja isosteariinihapon. Sopivia rasvahappoestereitä ovat esimerkiksi etyylioleaatti ja isopropyylimyristaatti. Sopivat saippuat käsittävät rasvaiset alkalimetalli-, ammonium- ja trietanoliamiinisuolat ja sopivat detergentit käsittävät kationiset detergentit, esimerkiksi dimetyylidialkyyliammoniumhalidit, alkyylipyridiniumhalidit ja alkyyliamiiniasetaatit; anioniset detergentit, esimerkiksi alkyyli-, aryyli- ja olefiinisulfonaatit, alkyyli-, olefiini-, eetteri- ja monoglyseridisulfaatit ja -sulfosukkinaatit; nonioniset detergentit, esimerkiksi rasvaiset amiinioksidit, rasvahappoalkanoliamiinit ja polyoksietyleenipoly-propyleenikopolymeerit ja amfoteeriset detergentit, esimerkiksi alkyyli-beta-amino-propionaatit ja 2-alkyyli-imidatsoliinin kvaternääriset ammoniumsuolat sekä seokset. Tämän keksinnön mukaiset parenteraaliset koostumukset sisältävät taavallisesti noin 0,5 - noin 25 paino-% HIV:n vastaista anionista oligomeeriä liuoksessa. Säilöntäaineita ja puskuriaineita voidaan myös edullisesti käyttää. Injektiokohdan ärtymisen minimoimiseksi tai eliminoimiseksi tällaiset koostumukset voivat sisältää nonionista pinta-aktiivista ainetta, jonka hydrofiilisyys-lipofiilisyyden tasapaino (HLB) on noin 12 - noin 17. Pinta-aktiivisen aineen määrä tällaisissa formulaatioissa on välillä noin 5 - noin 15 paino-%. Pinta-aktiivinen aine voi olla yksittäinen komponentti, jolla on edellä esitetty HLB tai se voi olla kahden tai useamman komponentin seos, jolla on haluttu HLB. Esimerkkinä parenteraalisissa formulaatioissa käytettävistä pinta-aktiivisista aineista on polyetyleenisorbitaanirasvahappoestereiden luokka, esimerkiksi sorbitaanimono-oleaatti.

Tämän keksinnön mukaisia anionisia oligomeerejä voidaan myös käyttää ennaltaehkäisevinä aineina eli estä-

mään viruksen siirtyminen infektointeesta yksilöstä infektoitumattomaan kohteeseen. Virus leviää suhteellisesti veren välityksellä, mutta se voi siirtyä myös muiden ruumiin nesteiden välityksellä. Näin ollen tämän keksinnön mukaiset oligomeerit voidaan formuloida standardidetergentti-

5 tuotteiden kanssa käytettäväksi puhdistukseen, erityisesti tutkimuslaboratorioissa ja kliinisissä laboratorioissa ja sairaaloissa, joissa käsitellään infektoituneiden potilaiden verituotteita. Tämän keksinnön mukaisia oligomeerejä

10 sisältäviä formulaatioita voidaan käyttää puhdistettaessa lääkärin/kirurgista välineistöä ja tarvikkeita sekä terveydenhoitohenkilöstön käsiä ja muita ihoalueita. Ehkäisyvälineiden käyttäjä tai niiden valmistaja ennen myyntiä voi myös laittaa tämän keksinnön mukaisia oligomeerejä,

15 nestemäisenä tai jauhemaisena koostumuksena, ehkäisyvälineiden, sellaisten kuten kondomit, pinnalle. Tämän keksinnön mukaiset oligomeerit voidaan formuloida suihkekoostumukseksi, jota naiset käyttävät ennen sukupuolista kanssakäymistä infektoituneen ihmisen kanssa. Tämän keksinnön

20 mukaiset oligomeerit voidaan myös formuloida liukastimiin ja spermisidisiin hyytelöihin ja pesunesteisiin. Lopuksi tämän keksinnön mukaiset oligomeerit voidaan myös formuloida koostumuksiksi lisättäviksi kuumiin kylpyihin, pyörrehauteisiin ja uima-altaisiin inaktivoimaan mahdollista

25 viruksen aktiivisuutta.

Keksintöä selvennetään edelleen ottamalla huomioon seuraavat esimerkit, joiden on tarkoitettu olevan ainoastaan kyseessä olevaa keksintöä havainnollistavia.

Määritelmiä

30 Termit, joita käytetään näissä esimerkeissä, on määritelty seuraavasti, jollei toisin osoiteta, ja esimerkiksi kuvaavat sopivan välineen tai hartsin esimerkkejä, mutta samanlaista välinettä tai eroavia parametreja tai hartseja voidaan käyttää:

TCID₅₀ = kudosisviljelmän infektoiva annos, eli se määrä viljelmänestettä, joka on tehokas infektoimaan 50 % soluista (50-%:inen sytopaattinen vaikutus) 7 vuorokauden kuluttua infektion jälkeen;

5 MTT = tetra-atsolium -pelkistysreagenssi; 3-(4,5-dimetyyllitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi;

RPMI = soluviljelmä;

RF ja GB8 tarkoittavat HIV-I -viruskantoja;

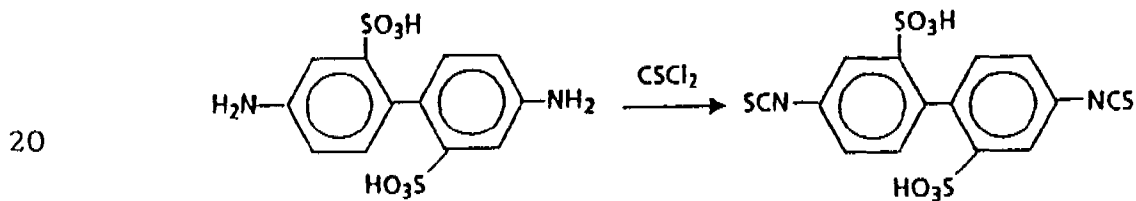
MT4, C8166 ja JM = solulinjoja;

10 P24 Abbott-testi tarkoittaa viruksen kuoren anti-geenin tutkimista käyttämällä testipakkausta, jota Abbott tällä hetkellä myy.

Esimerkki 1A

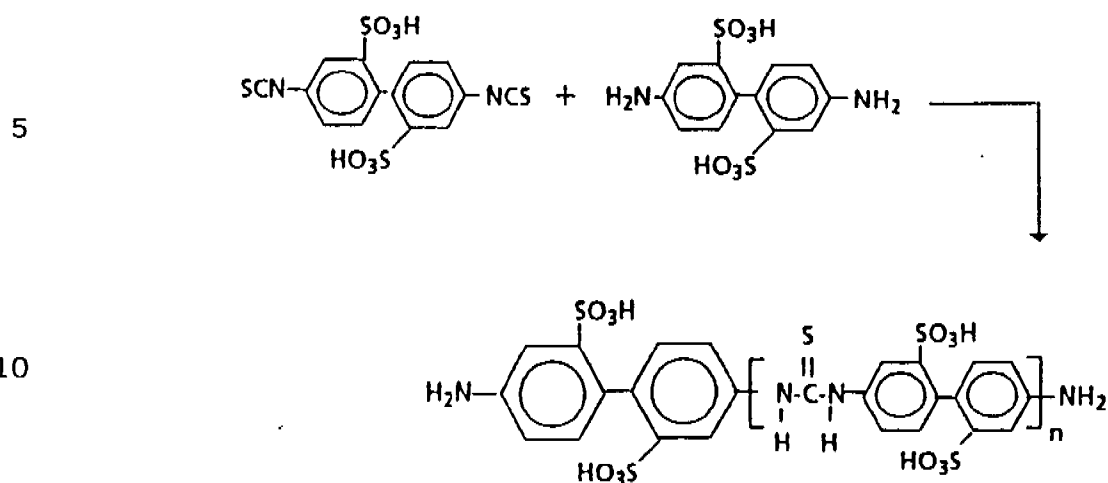
15 Polytioureaan valmistus käyttämällä spesifistä menetelmää

Bis-isotiosyanaatin valmistaminen



4,4'-diaminobifenyyli-2,2'-disulfonihappoa (1,2 g, 3,48 mmol) sekoitettiin kiivaasti 15 ml:n vettä ja 600
 25 µl:n tiofosgeenia kanssa kolme tuntia. Lisättiin enemmän tiofosgeenia (250 µl) ja reaktioseosta sekoitettiin 14 tuntia lisää. Tuote eristettiin suodattamalla mediumhuokoisen sintterilasisuodatinpölyn läpi, jolloin saatiin 70 mg liukenematonta jäännösmonomeeria. Kirkas, purppuranvärinen suodos haihdutettiin alle 50 °C:ssa noin 10 mmHg:n
 30 paineessa, kuivattiin vakuuissa kolme tuntia, jolloin saatiin 1,35 g, 31,5 mmol bisisotiosyanaattidihydraattia vaalean laventelin värisenä, vetistyvänä kiinteänä aineena. Tuote tutkittiin protoni- ja hiiliydinmagneettiresonanssi- sekä savukaasuanalyysillä.
 35

Päästä peittämättömän polytioureaan valmistus



Ylimäärin 4,4'-diaminobifenyyli-2,2'-disulfonihap-
 15 poa (6,0 g, 46,5 mmol) sekoitettiin 2 ekvivalentin kans-
 sa NaHCO_3 :a (8,2 g, 97,6 mmol), mikä aiheutti pH:n nousun
 7,5:een. Tähän sekoitettuun liuokseen lisättiin liuos (30
 ml) edellä valmistettua bis-isotiosyanaattia (2,17 g, 4,67
 mmol, pH 1,5) 10 minuutin aikana. Sen jälkeen kun lisäys
 20 oli suoritettu loppuun, pH oli laskenut 6,5:een ja reak-
 tioseosta sekoitettiin 14 tuntia. pH säädettiin sitten
 1,8:aan 12 M HCl:lla ja 8 tunnin kuluttua valkoinen kiin-
 teä aine, joka muodostui, suodatettiin ja pestiin 25
 ml:lla kylmää 0,1 M HCl:a. Kiinteä aine kuivattiin vakuu-
 25 missa, jolloin saatiin 12,0 g reagoimatonta lähtöainetta
 (4,4'-diaminobifenyyli-2,2'-disulfonihappo) valkoisena
 kiinteänä aineena. Suodos haihdutettiin, jolloin saatiin
 10,0 g tumman purppuran väristä kiinteää ainetta. Tämä
 suodos indentifioitiin spektroskooppisesti melkein puh-
 30 taaksi polytioureaksi (II, $n=0$ kontaminoitunut pienellä
 määrällä lähtödiamiinia (4,4'-diaminobifenyyli-2,2'-disul-
 fonihappo) ja NaCl:a.

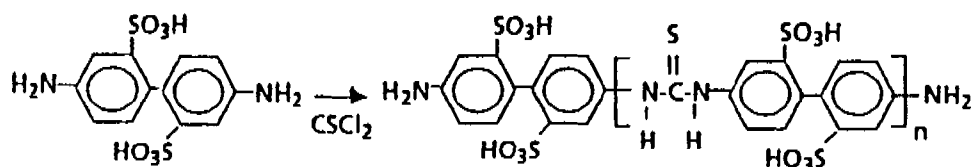
Päästä peittämättömän polytioureaan puhdistaminen

Geelisuodatuspylväs valmistettiin antamalla 115 g
 35 Pharmacia Sephadex^R G-10 (40 - 120 μm täytteen koko) hart-

sin turvota noin 500 ml:ssa tislattua vettä yhden tunnin ajan. Hieno aines dekantoiitiin hartsiseoksesta sen jälkeen kun suspension oli annettu asettua 1 l:n mittalieriössä. Lasipylväs märkäpakattiin hartsilla ja 500 ml tislattua vettä laitettiin pylvään läpi, mikä johti 2,5 x 50 cm täytteeeseen. Tasaista virtausnopeutta ylläpidettiin pylväessä käyttämällä peristallista Gilson Minipuls -pumppua (virtausnopeus noin 3 - 4 ml/minuutti). Eluenttia tarkkailtiin 310 nm:ssä (Isco malli UA-5 -ultraviolettidetektori) tuotteen läsnäolon havaitsemiseksi.

Liuos, jossa oli 50 mg yllä valmistettua polytioureaoligomeeria, liuotettiin 2,5 ml:aan tislattua vettä ja laitettiin varovasti pylvään yläosaan. Pylvästä eluoitiin tislatusella vedellä ja kerättiin kolme tuotefraktiota (15 ml kukin). Fraktioiden analysointi HPLC:lla osoitti, että ensimmäinen fraktio sisälsi polytioureaa, joka oli puhdas lähtödiamiinista ja suolasta.

Esimerkki 1B - Päästä peittämättömän polytioureaan valmistaminen epäspesifisellä menetelmällä käyttämällä tiofosgeenia



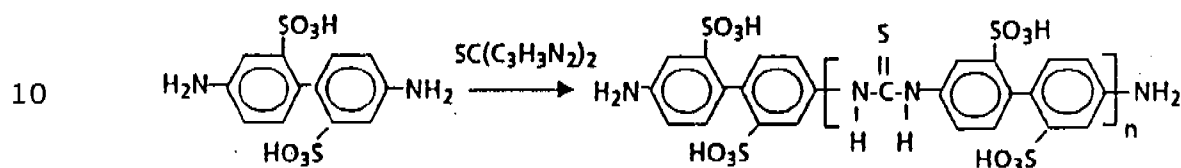
4,4'-diaminobifenyyli-2,2'-disulfonihapponäyte (100 mg, 0,29 mmol) lisättiin 50 ml:aan vettä ja noin 4 ml 0,1 M NaOH:a lisättiin hitaasti kiinteään aineen liuottamiseksi. Liuoksen pH nousi 6,8:aan. Tämä liuos lisättiin MixxorTM:iin, laitteeseen, joka mahdollistaa toisiinsa sekoittumattomien nesteiden tarkoituksenmukaisen kiivaan sekoituksen, ja 2,21 ml (0,29 mmol tiofosgeenia) tiofosgeenin (100 µl) varastoliuosta 10 ml:ssa kloroformia lisättiin. 2 minuutin sekoittamisen jälkeen liuoksen pH säädettiin 6 - 7:ään lisäämällä noin 2,5 ml 0,1 M NaOH:a. Liuos-

ta kuumennettiin 45 °C:ssä öljyhauteessa 16 tuntia ja liuotin haihdutettiin. Saadun kiinteän aineen analysointi HPLC:lla osoitti, että oli tuotettu polytioureaoligomeerien seos.

5

Esimerkki 1C

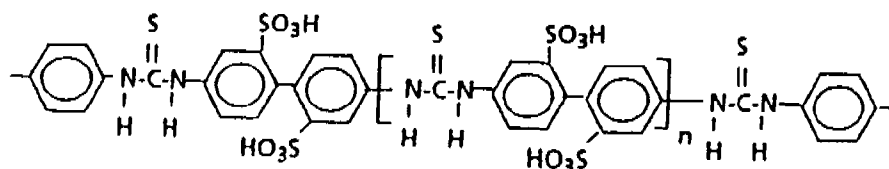
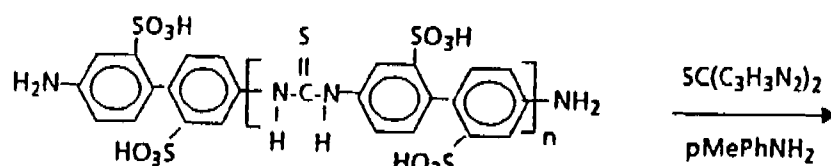
Päästä peittämättömien polytioureaoiden valmistus käyttämällä tiokarbonyylidi-imidatsolia



Uudelleenkiteytettyä 4,4'-diaminobifenyyli-2,2'-disulfonihappoa (1,00 g, 2,91 mmol) lisättiin 50 ml:aan vettä lietteenä, jota seurasi natriumbikarbonaatin (489 mg, 5,82 mmol) lisäys. Kiinteän aineen liuotessa saavutettiin loppu-pH 6,5. Tiokarbonyylidi-imidatsolia (600 mg, 3,37 mmol, Aldrich Chemical Co.) lisättiin sekoitettuun liuokseen kiivaasti sekoittamalla, jolloin kehittyi kirkkaan keltainen väri. Viiden minuutin aikana väri haalistui ja reaktioseosta sekoitettiin 24 tuntia. Tässä vaiheessa HPLC:lla havaittu oligomeerien jakaantuminen ei muuttunut ajan mukana. Liuotin haihdutettiin vakuumissa ($T = 35\text{ °C}$), jolloin saatiin 1,8 g raakoja tioureaoligomeerejä, joiden suurimman komponentin $n = 4$ HPLC:lla määritettynä ($n = 4$ alan 9,9 prosentin osuutena 254 nm:ssä).

Päästä peitettyjen polytioureaoligomeerien valmistus peittämättömistä oligomeereista

30 Päästä peittämätöntä polytioureaoligomeeria (400 mg), joka oli valmistettu kuten edellä on kuvattu, liuotettiin 15 ml:aan vettä. 5-%:ista kloorivetyhappoa käytettiin säätämään pH 4,5:een. Tiokarbonyylidi-imidatsolia (100 mg, Aldrich Chemical Co.) lisättiin sekoittaen ja saavutettiin pH 6,6 15 minuutin sekoittamisen jälkeen.



HPLC-analyysi paljasti, että oligomeerien jakaantuminen oli muuttunut sarjaksi lipofiilisempiä lajeja (päässä isotiosyanaatti). Toluidiinia (80 mg) lisättiin, jolloin heti muodostui valkoinen saostuma (toluidiinitio-urea). Kun lietettä oli sekoitettu 20 minuuttia (pH 7,0), liuos suodatettiin ja emäliuos haihdutettiin (10^{-1} mm, 35 °C), jolloin saatiin 537 mg p-toluidiinilla päästä peitettyjä polytioureaoligomeereja. HPLC-analyysi indikoi prekursorin isotiosyanaattipäätteisen lajin jäämiä (toluidiinilla päästä peitetty aine on vielä lipofiilisempää ja sarja eluoituu vielä pitemmillä retentioajoilla).

Päästä peittämättömien polytioureaoligomeerien fraktiointi

Raaka päästä peittämätön polytiourea (500 mg), joka oli valmistettu kuten edellä on kuvattu, liuotettiin 2 ml:aan vettä ja liuos laitettiin 26 mm x 90 cm G^{-10} -kokoiseen eksluusiogeelipylvääseen (Pharmacia). Kerätyt fraktiot (20 ml) analysoitiin HPLC:lla ja kahden ensimmäisen UV-aktiivisen fraktion (254 nm) arvioitiin omaavan arvon $n = 7,2$. Nämä yhdistettiin ja haihdutettiin, jolloin saatiin 140 mg:aa keskimääräisen dispersiivisyyden $n = 7,2$ omaavaa tuotetta määritettynä pääteryhmän ^1H -NMR-analyysillä. Rakenne oli konsistentti sekä ^{13}C - että ^1H -NMR-analyysillä.

Biologiset tulokset

Esimerkki I

HIV:n vastaisen oligomeerin kyky estää synsytian muodostumista ja viruksen kuoren antigeenin P24 ilmentymistä käyttämällä JM-soluja ja GB8-viruskantaa

Sen osoittamiseksi, että keksinnön mukainen oligomeeri blokkaa HIV-infektion, CD4⁺-T-solut (JM) altistettiin HIV-I:n GB8-kannalle, GB8. Ensin virusta inkuboitiin oligomeerin kanssa 15 minuutin ajan ja sen jälkeen lisättiin solut. Kahden tunnin absorboitumisen jälkeen virusympäysaine poistettiin, solut pestiin kolme kertaa aloitusvirusten jäänteiden poistamiseksi ja soluja inkuboitiin yhdisteen läsnä ollessa. Antiviraalinen aktiivisuus määritettiin kolmen vuorokauden inkuboinnin jälkeen plottaamalla nelinkertaisissa viljelmissä havaitun synsytian keskilukumäärä anionisen polymeerin tai muiden koeyhdisteiden log₁₀ -konsentraatiota vastaan. Oligomeerin voimakkuus määritettiin myös tutkimalla viruksen kuoren antigeeni (P24 Abbott-koe) supernatanttineesteessä. Hepariini-, dekstraanisulfaatti-, rs CD4-, ATZ- ja/tai ddC-tulokset, kun ne esiintyvät missä tahansa seuraavista taulukoista, esitetään positiivisinä kontrolleina.

Tulokset esitetään yhteenvetona taulukossa I.

Taulukko I

	Yhdiste	ED ₅₀ (µg/ml)+
	Esimerkki 1c	1,9
	peittämätön	
30	Esimerkki 1c	0,46
	peitetty	

+ tehokas annos, joka aikaansaa JM-soluissa HIV-1:n GB8-viruskannalla indusoidun synsytian muodostuksen 50-%:isen inhiboitumisen

HIV:n vastaisen oligomeerin kyky ehkäistä HIV:llä indusoitu solukuolema käyttämällä MT-4-soluja ja RF-virus-kantaa

Tässä kokeessa jokaiseen putkeen lisättiin 1,5 ml RPMI-väliainetta koeyhdisteen liuottamiseksi. Sen jälkeen yhdisteistä tutkittiin HIV-1 -aktiivisuus tekemällä liuoksista kaksinkertaiset laimennokset mikrotiitterilevyille. Sen jälkeen lisättiin 5×10^4 solua ja 100 TCID₅₀ yksikköä virusta jokaiseen kuoppaan ja levyjä inkuboitiin 37 °C:ssa 7 vuorokautta. MTT:tä lisättiin jokaiseen kuoppaan ja levyjä inkuboitiin edelleen kaksi tuntia. Siniset formatsaanimikiteet liuotettiin käyttämällä happopitoista isopropanolia ja absorbanssi mitattiin 540 nm:ssä.

Tulokset on havainnollistettu taulukossa II alla.

Taulukko II

	Yhdiste	ED ₅₀ (µg/ml)+	CD ₅₀ (µg/ml)*
	Esimerkki 1c peittämätön	5,1	≥100
20	Esimerkki 1c peitetty	8,5	≥100

+ Tehokas annos, joka aikaansaa HIV-1:n RF -viruskannan indusoiman MT-4-solujen solukuoleman 50-%:isen inhiboimisen MTT-kokeessa.

* Yhdisteen sytotoksinen annos, mikä aikaansaa 50-%:isen toksisuuden MT-4-soluille MTT-kokeessa.

HIV:n vastaisten oligomeerien vaikutus HIV-I_{RF}:n kasvuun C8166 T -solulinjassa

Protokolla: C8166 -soluja infektoitiin HIV-I_{RF}:llä yhden tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Sen jälkeen solut pestiin kahdesti RPMI:ssä ja jaettiin kudosviljelmälevyn kuoppiin, jotka sisälsivät vaihtelevia konsentraatioita koeyhdistettä tai eivät sisältäneet yhdistettä (kontrolli). Kolmen vuorokauden inkuboinnin jälkeen 37 °C:ssa so-

luista tutkittiin synsytian muodostus ja soluvapaasta supernatanttiinesteestä tutkittiin viruksen kuoren antigeenin P24 tasot ELISA:a käyttämällä. Tulokset on esitetty taulukoissa III ja IV alla.

5

Taulukko III

	Yhdiste	konsentr. µg/ml	synsytia	P24 (pg/ml)	% kont- rolli
10	Esimerkki 1C	100	0	negat.	0
	peittämätön	10	+	55950	14
		1	++	241460	59
		0,1	+++	508610	>100
		0,01	+++	376670	93
15	Esimerkki 1C	100	0	negat.	0
	peitetty	10	0	negat.	0
		1	+ / ++	150668	37
		0,1	++	389080	96
		0,01	+++	435450	>100

20

Taulukko IV

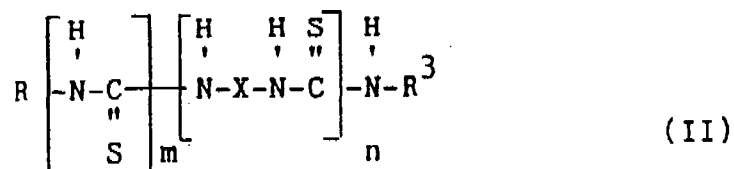
	Yhdiste	ED ₅₀ (µg/ml)+
25	Esimerkki 1C	1,6
	peittämätön	
	Esimerkki 1C	0,6
	peitetty	

30

+ tehokas annos, joka aikaansaa HIV-1:llä indusoidun synsytian muodostuksen ja viruksen kuoren antigeenin P24 määrän 50-%:isen inhiboitumisen C98166-soluissa, jotka on infektoitu viraalisella kannalla RF.

Patenttivaatimukset

1. Vesiliuokoinen, jäykän rungon omaava polytioureaoligomeeri, tunnettu siitä, että se vastaa
5 kaavaa:



10

jossa

R on vety, C₁₋₄-alkyyli, fenyyli tai fenyyli, joka on substituoitu 0 - 2 R¹-ryhmällä ja korkeintaan kolmella substituentilla, jotka on toisistaan riippumatta valittu kloori-
15 tai bromiatomista, tai C₁₋₄-alkyyli-ryhmällä;

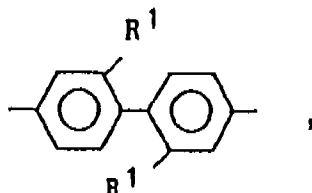
R¹ on -SO₃R², -CO₂R², -PO₃R² tai -OPO₃R²;

R² on vety tai farmaseuttisesti hyväksyttävä kationi;

R³ on -R tai -X-NHR, jossa R on kuten edellä on määritelty;

X on

20

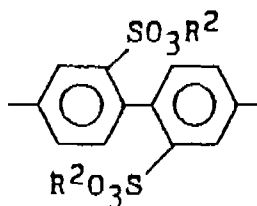


25

m on kokonaisluku 0 tai 1, sillä ehdolla, että kun m on 0, R on vetyatomi, ja n on kokonaisluku 3 - 50.

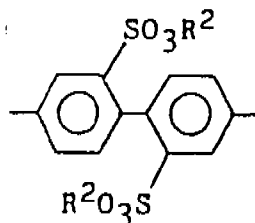
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen oligomeeri, tunnettu siitä, että R on vety tai fenyyli, joka on
30 substituoitu C₁₋₄-alkyyli-ryhmällä, R³ on R, jossa R on kuten edellä on määritelty, sillä ehdolla, että kun m on 0, R ja R³ eivät molemmat ole vetyjä,
ja X on

35



3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen oligomeeri, tunnettu siitä, että m on 1, R ja R³ ovat 4-metyylifenyyli, n on 3 - 15 ja X on

5



10 4. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 3 mukainen oligomeeri, tunnettu siitä, että keskimääräinen molekyylipaino on alempi kuin 10 000.

5. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 4 mukainen oligomeeri, tunnettu siitä, että oligomeeri on suolansa muodossa.

6. Farmaseuttinen formulaatio, tunnettu siitä, että se käsittää jonkin patenttivaatimuksista 1 - 5 mukaisen oligomeerin farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan kanssa.

20 7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen farmaseuttinen formulaatio nesteinä, jauheena, suihkeena, hyytelönä tai liuoksena.

8. Farmaseuttinen formulaatio, tunnettu siitä, että se käsittää jonkin patenttivaatimuksista 1 - 5 mukaisen oligomeerin detergentin kanssa.

25 9. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 5 mukaisen oligomeerin käyttö sellaisen farmaseuttisen koostumuksen valmistukseen, joka koostumus on tarkoitettu sairaustilan diagnosoimiseksi ja/tai hoitamiseen lämmiverisessä nisäkkäissä.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen käyttö, tunnettu siitä, että sairaustila on AIDS ja/tai ARC.

35 11. Menetelmä jonkin patenttivaatimuksista 1 - 5 mukaisen polytioureaoligomeerin valmistamiseksi, tunnettu siitä, että aromaattinen diamiini saatetaan reagoimaan tiokarbonyylidi-imidatsolin kanssa.

PATENTTIHAKEMUS NRO	LUOKITUS
962725	C07C 335/16, 335/20, A61K 31/17

TUTKITTU AINEISTO
Patenttijulkaisukokoelma (FI, SE, NO, DK, DE, CH, EP, WO, GB, US), tutkitut luokat
Tiedonhaut ja muu aineisto

VIITEJULKAISUT		
Kategoria*)	Julkaisun tunnistetiedot	Koskee vaatimuksia
A	WO-A 93/14146 (C08G 71/02)	
A	WO-A 92/00749 (A61K 31/765)	
A	WO-A 93/16992 (C07C 335/20)	
A	US-A 2868834 (260-506)	
*) X Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu yksinään tarkasteltuna Y Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu, kun otetaan huomioon tämä ja yksi tai useampi samaan kategoriaan kuuluva julkaisu A Yleistä tekniikan tasoa edustava julkaisu, ei kuitenkaan patentoitavuuden este		
Päiväys 31.5.2002	Tutkija Eira Ylilammi	