

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 915089 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 915089

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07K 9/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 29.10.1991

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 29.10.1991

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 01.05.1992

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

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

30.10.1990 JP 2-293335 30.10.1990 JP 2-293336

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd., 14-10, Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-8234, JAPAN, (JP)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Oki, Masaharu, Japan, JAPAN, (JP)

2 • Tsuge, Hideya, Japan, JAPAN, (JP)

3 • Ohkuma, Kunio, Japan, JAPAN, (JP)

4 • Oka, Tetsuya, Japan, JAPAN, (JP)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Uusia muramyylidipeptidijohdannaisia ja näitä johdannaisia sisältävä influenssarokote

Nya muramyldipeptidderivat och influenssavaccin innehållande dessa derivat

Uusia muramyylidipeptidijohdannaisia ja näitä johdannaisia sisältävä influenssarokote

5 Tämä keksintö koskee muramyylidipeptidijohdannaisia, joilla on apuaktiivisuus ja jotka ovat käyttökelpoisia influenssaviruspartikkelin tapaisen keinotekoisen membraanirokotteen komponenttina, niin sanottuna virosomirokotteena. Tämä keksintö koskee myös influenssarokotetta, joka käsittää muramyylidipeptidijohdannaisten ja influenssavirusantigeenin kompleksin.

10 Koska nykyisin käytetyn influenssa HA rokotteiden tehokkuus vaihtelee johtuen mutaatioista, joita tapahtuu yleisten virusten hemagglutiniinimolekyyliissä, on erityisen haluttavaa kehittää tehokkaampia rokotteita kuin tavanomaiset.

15 Mitä tulee viimeisimpiin lähestymisiin influenssarokotteen kehittämisessä, tunnetaan komponenttirokote, joka sisältää HA:ta (hemagglutiniini) ja NA:ta (neuraminidaasi) influenssaviruspartikkelin tapaisen keinotekoisen membraanirokotteen pääainesosina, joka rokote tehtiin 6-O-(2-tetradekyyliheksadekanoyyli)-N-asetyyli-muramoyyli-L-alanyyli-D-isoglutamiinista, niin sanottu virosomirokote, [katso japanilainen tutkimaton julkaistu patenttihakemus (viitataan tämän jälkeen "JP KOKAI":na) nro 61-282321]. Tiedetään, että erityisesti jälkimmäinen osoittaa erinomaista parantavaa vasta-ainearvon tehokkuutta veressä ja niiden hyväksikäyttöä siten odotetaan.

25 Kuitenkin tämä rokote ärsyttää sitä osaa ihmiskehossa, johon se laitetaan, mikä aiheuttaa punetumista ei-haluttuna vastakkaisena reaktiona eikä se ole hyväksyttävää lääkkeenä.

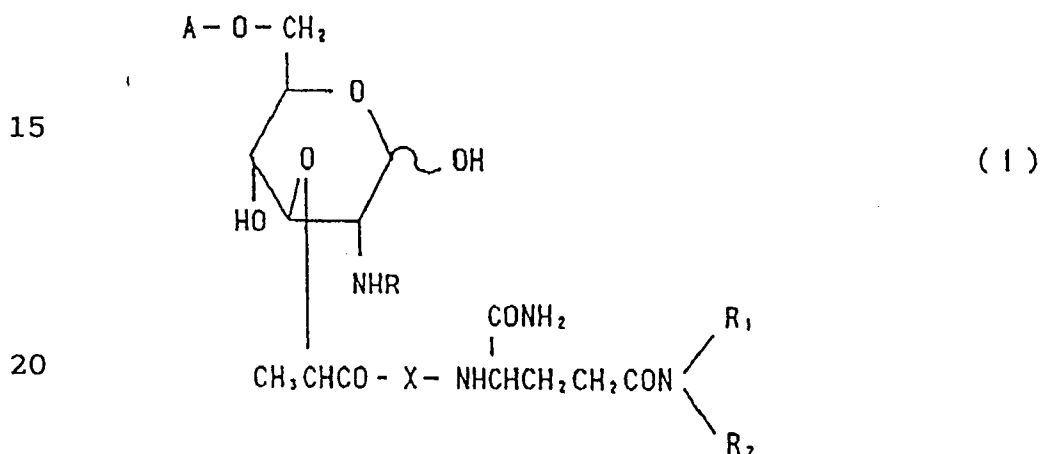
30 Tämän keksinnön kohde on tarjota uusia muramyylidipeptidejä, jotka ovat erityisen käyttökelpoisia virosomirokotteen komponenttina.

Toinen tämän keksinnön kohde on tarjota influenssa-rokote, jolla on erinomainen vasta-aineita tuottava kapasiteetti ja turvallisuus.

5 Nämä ja muut tämän keksinnön kohteet käyvät ilmeiseksi seuraavasta selityksestä ja esimerkeistä.

Intensiivisten tutkimusten jälkeen, joita tehtiin edellä kuvattujen ongelmien ratkaisemiseksi, keksijät ovat päätyneet tähän keksintöön.

10 Ensimmäisen tämän keksinnön mukaisen näkökulman mukaisesti tarjotaan muramyylidipeptidijohdannaisia, joilla on seuraava yleinen kaava (I), ja niiden suoloja:



jossa R esittää asyyliiryhmää, jossa on 2 - 6 hiiliatomia, X esittää L-alaniinitähdettä, L-seriinitähdettä, L-valiinitähdettä tai glysiinitähdettä, A esittää rasvahappotähdettä, jossa on 10 - 60 hiiliatomia, ja R₁ ja R₂ itsenäisesti esittävät vetyatomia, substitutoitua tai substituoimatonta alempaa alkyyliryhmää, substituoitua tai substituoimatonta sykloalkyyliryhmää, substituoitua tai substituoimatonta aralkyyliryhmää, hydroksyyliiryhmää, alempaa alkoksiryhmää, aminoryhmää tai alempaa alkyyliaminoryhmää tai R₁ ja R₂ voivat muodostaa syklisen aminoryhmän yhdessä typpi-

35 piatomin kanssa, johon R₁ ja R₂ kiinnittyvät suoraan, jossa

syklisessä aminoryhmässä voi olla yksi tai useampi hetero-atomi rengasatomina valittuna ryhmästä, joka käsittää happi-, rikki- ja typpiatomit, ja se voi olla substituoitu tai substituimaton.

5 Toisen tämän keksinnön mukaisen näkökulman mukaisesti tarjotaan influenssarokote, joka käsittää edellä mainitun yleisen kaavan (I) mukaisen yhdisteen tai sen susolan ja influenssavirusantigeenin.

10 Kuvio 1 on tämän keksinnön mukaisen näytteen nro 1 rokotteen elektronifotomikrografi (x 95.000)

Kuvio 2 on tämän keksinnön mukaisen näytteen nro 2 rokotteen elektronifotomikrografi (x 95.000)

Kuvataan substituentit edellä olevassa kaavassa (I).

15 Asyyliiryhmät, joissa on 2 - 6 hiiliatomia, käsittää asetyyli-, propionyyli-, butyryyliiryhmät, jne. Rasvahapotähteet käsittävät suoraketjuiset tai haaraketjuiset rasvahajapotähteet, joissa on 20 - 60 hiiliatomia, joissa voi olla yksi tai useampi tyydyttymätön sidos. Niiden esimer-
20 kit käsittävät dekanoyyli-, dodekanoyyli-, tridekanoyyli-, tetradekanoyyli-, heksadekanoyyli-, oktadekanoyyli-, eikosanoyyli-, dokosanoyyli-, tetrakosanoyyli-, heksakosanoyyli-, triakontanoyyli-, tetrakontanoyyli-, 9-heksadekenoyyli-, 9-oktadekenoyyli-, 11,14-eikosadienoyyli-, 11-eikosenoyyli-, 11,14,17-eikosatrienoyyli-, 2-dodekyyliheksadekanoyyli-, 2-tetradekyyliheksadekanoyyli-, 2-dodekyyli-tetradekanoyyli-, 2-tetradekenyyliheksadekanoyyli-, 2-tetradekenyyliheksadekanoyyli-, 2-heksadekyyliopktadekanoyyli-ryhmät ja sellaiset. Ne ovat edullisesti haarautuneita
25 ketjuja, joissa on 20 - 40 hiiliatomia.

Alemmat alkyyliryhmät käsittävät ne, joissa on 1 - 6 hiiliatomia, kuten metyyli-, etyyli-, propyyli-, isopropyyli-, tert-butyyliryhmät ja sellaiset. Alemmilla alkyyliryhmillä voi olla substituentteja kuten halogeeniatome-

ja, hydroksyyli-ryhmä, aminoryhmä ja sellaisia. Substituenttien määrä on tavallisesti edullisesti 1 - 3.

Sykloalkyyli-ryhmät ovat 5 - 7 jäsenisiä kuten syklopropyyli-, syklopentyyli-, sykloheksyyli-, sykloheptyyli-ryhmät ja sellaiset. Sykloalkyyli-ryhmillä voi olla yksi tai useampi substituentti, jotka käsittävät alemman alkyyli-ryhmän, halogeeniatomin, hydroksyyli-ryhmän, aminoryhmän ja sellaiset. Substituenttien lukumäärä on tavallisesti edullisesti 1 - 3.

Esimerkit halogeeniatomeista käsittävät kloori-, bromi-, fluori- ja jodiatomit.

Aryyli-ryhmät käsittävät fenyyli-, naftyyli-, bifenyyli-ryhmät ja sellaiset. Aryyli-ryhmillä voi olla yksi tai useampi substituentti, jotka käsittävät almemman alkyyli-ryhmän, halogeeniatomin, hydroksyyli-ryhmän, aminoryhmän ja sellaiset. Substituenttien lukumäärä on tavallisesti edullisesti 1 - 3.

Aralkyyli-ryhmät käsittävät, esimerkiksi, fenyyli-metyyli-, fenyyli-etyyli-, naftyyli-metyyli-ryhmät ja sellaiset. Aralkyyli-ryhmän aryyliosassa voi olla yksi tai useampi substituentti, jotka käsittävät alemman alkyyli-ryhmän, halogeeniatomian, hydroksyyli-ryhmän, aminoryhmän ja sellaiset. Substituenttien lukumäärä on tavallisesti edullisesti 1 - 3.

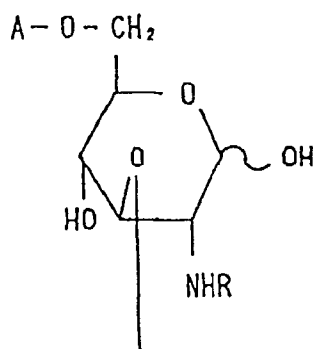
Sykliset aminoryhmät käsittävät 5 - 7 jäseniset sykliset aminoryhmät kuten pyrrolidinyyli-, piperidinyyli-, homopiperidinyyli-ryhmät ja sellaiset. Sykliset aminoryhmät voivat sisältää yhden tai useamman heteroatomin valittuna ryhmästä, joka käsittää happi-, rikki- ja typpi-atomit, rengasatomina. Esimerkit niistä sisältävät 3-oksa-tetrahidopyridinyyli-, 3-tiatsolidinyyli-, morfolino-, tiomorfolino-, 1-pyratsolidinyyli-, 1-imidatsolidinyyli-ryhmät ja sellaiset. Syklisissä aminoryhmissä voi olla yksi tai useampi substituentti, jotka käsittävät alemman alkyyli-ryhmän, halogeeniatomian, hydroksyyli-ryhmän, aminoryhmän

ja sellaiset. Substituenttien lukumäärä on tavallisesti edullisesti 1 - 3. Esimerkit alemmista alkoksiryhmistä sisältävät metoksin, etoksin, propoksin, isopropoksin ja sellaiset. Alkyyliaminoryhmä tarkoittaa mono-alempialkyyliaminoryhmää tai di-alempialkyyliaminoryhmää ja esimerkit niistä käsittävät monometyyliaminon, monoetyyliaminon, dimetyyliaminon, dipropyliaminon, monobutyliaminon ja sellaiset.

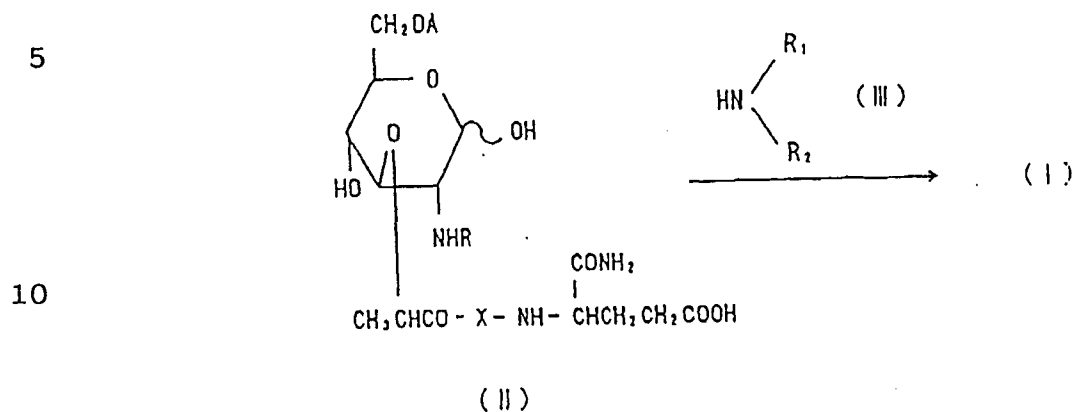
Kaavan (I) mukaisen yhdisteen osarakenteella -NHCH(CONH₂)CH₂CH₂CO- on D- ja L-isomeerit, koska sillä on asymmetrinen hiiliatomi. Tavallisesti D-isomeeri on edullinen.

Mitä tulee kaavan (I) mukaisen yhdisteen sakkarosiosan 1-asemaan, sillä on anomeeriset isomeerit (α - ja β -isomeerit), joista molemmat ovat käyttökelpoisia rokotteen mitä tulee tähän keksintöön.

Tarkoituksenmukaisuuden vuoksi molemmat isomeerit esitetään tässä samanaikaisesti seuraavalla osittaisella rakennekaavalla:



Kuvataan menetelmiä tuottaa kaavan (I) mukaisia yhdisteitä:



15 Nimittäin kaavan (II) mukainen yhdiste voidaan saattaa reagoimaan kaavan (III) mukaisen yhdisteen kanssa kondensaatiomenetelmällä, jota käytetään useasti peptidien synteesistä kuten karbodi-imidimenetelmä, eintopf-menetelmä tai aktiivinen esterimenetelmä, jolloin muodostuu

20 aiottu kaavan (I) mukainen yhdiste. Esimerkiksi, kun aktiivista esterimenetelmää käytetään tavallisesti, kaavan (II) mukainen yhdiste liuotetaan inaktiiviseen orgaaniseen liuottimeen kuten dimetyyliformamidiin, tetrahydrofuraa-

25 saatetaan reagoimaan reagenssin kanssa, jolloin muodostuu aktiivinen esteri kuten N,N-disukkinimidyylikarbonaatti, N,N-karbonyyli-imidatsoli tai N,N-disukkinimidyylioksa-

30 laatti, edullisesti, orgaanisen emäksen läsnäollessa kuten trietyyliamiinin, N-metyylimorfoliinin tai 4-dimetyyliami-

35 nopyridiinin 0 °C:sta noin 60 °C:seen 30 minuutista useisiin tunteihin, jolloin muodostuu aktiivinen esteri, johon kaavan (III) mukainen amiiniyhdiste lisätään emäksen läsnäollessa, kuten edellä kuvatut emäkset, lämpötilassa noin -15 °C:sta noin 60 °C:seen, edullisesti 0 °C:sta 25 °C:seen, ja reaktio voidaan suorittaa useista minuut-

teista noin yhteen päivään. Edellä olevaa reagenssia, joka muodostaa aktiivisen esterin, voidaan käyttää ekvimolaarissa määrässä suhteessa kaavan (II) mukaiseen yhdisteeseen. Edellä mainittua orgaanista emästä voidaan käyttää myös ekvimolaarisesti tai ylimäärin suhteessa kaavan (II) mukaiseen yhdisteeseen. Sitten syntynyt tuote puhdistetaan silikageelikolonnikromatografisesti tai muuten, jolloin saadaan kaavan (I) mukainen yhdiste.

Kaavan (II) mukainen lähtöyhdiste voidaan valmistaa JP-patenttijulkaisussa 6 311 359 kuvatun menetelmän mukaisesti.

Kompleksi, joka muodostaa tämän keksinnön mukaisen rokotteen, on sellainen, että kaavan (I) mukainen yhdiste tai sen suola, kasaantuu, haluttaessa, lipidin kanssa, jolloin muodostuu suljettu endoplastinen retikulum ja influenssavirusantigeeni liitetään sen membraaniin. Tyypillinen esimerkki siitä on viruspartikkelin tapainen rokote, so. niin sanottu virosomi.

Kuvataan antigeeni tämän keksinnön mukaisessa rokotteessa.

Antigeenit, jotka ovat käyttökelpoisia tässä keksinnössä, käsittävät influenssaviruksen HA (hemagglutiini) antigeenin, NA (neuraminidaasi) antigeenin ja sellaiset. Tavallisesti niiden seosta, so. niin sanottu HANA antigeeni, käytetään edullisesti. HANA antigeenia voidaan saada puhdistamalla influenssavirus pieninopeuksisella ja suurinopeuksisella sentrifuugierotuskäsittelyllä tai allantoiininesteen, joka on infektoitu influenssaviruksella, kemiallisella käsittelyllä, liuottamalla puhdistettu virus surfaktantin kanssa kuten Triton X-100, natriumkolaatti tai sellainen, tai erottamalla virus orgaanisen liuottimen kanssa kuten eetteri ja puhdistamalla ja eristämällä sukroosi tiheysgradienttisentrifugoinnilla, affiniteettikromatografialla tai sellaisella. Siten saatua antigeenia käytetään määrissä tavallisesti 1/300 - 10 paino-osaan,

edullisesti 1/100 - 1 paino-osaa, 1 osaa kaavan (I) mukaisen yhdisteen tai sen suolan painosta.

Tämän keksinnön mukainen rokote voidaan tuottaa erilaisilla prosesseilla kuten tavallisella prosessilla liposomien tuottamiseksi. Tyypillisiä prosessiesimerkkejä kuvataan alla.

Influenssavirusantigeeni, kaavan (I) mukainen yhdiste tai sen suola ja edullisesti fosfolipidi sekoitetaan yhdessä sopivaan puskuriliuokseen kuten fosfaattipuskuriliuos tai sellainen ja tehokas määrä (edullisesti 0,1 - 20 paino/tilavuus-%) pinta-ainetta, kuten natriumkolaatti, oktyylyglykosidi tai sellainen, lisätään seokseen liukotamaan se. Sitten seos dialysoidaan käytetyn surfaktantin poistamiseksi, siten saadaan tämän keksinnön mukainen influenssarokote. Sakkaridia kuten glukoosi, maltoosi tai laktoosi, suolaa kuten natriumkloridi, tai niiden seosta voidaan liittää isotonisoijaksi siten saatuun tämän keksinnön mukaiseen rokotteeseen.

Esimerkit fosfolipideistä käsittävät fosfatidyyli-glyserolit kuten dimyristoyylifosfatidyyli-glyseroli ja dipalmitoyylifosfatidyyli-glyseroli; fosfatidyyli-eriniin; fosfatidyylikoliinit kuten dipalmitoyylifosfatidyylikoliini; fosfatidyylietanoliini; fosfatidyyli-inositolin; fosfatidihapon ja sellaiset. Ne voidaan johtaa luonnollisista aineista kuten munankeltuaisesta tai soijapavusta tai ne voivat olla synteettisiä. Niitä voidaan käyttää joko yksittäin tai seoksen muodossa. Niiden käytetty määrä on tavallisesti 1/20 - 20 paino-osaa, edullisesti 1/4 - 3 paino-osaa, 1 paino-osaa kaavan (I) mukaista yhdistettä tai sen suolaa kohti.

Edellä kuvatussa menetelmässä fosfolipidiä voidaan käyttää yhdessä kolesterolin, α - tokoferolin, diasetyyli-fosfaatin, stearyyliamiinin tai sellaisen kanssa, jota käytetään tavallisesti määrässä ei enemmän kuin 2 paino-

osaa, edullisesti 1/10 - 1/2 paino-osaa, 1 paino-osaa kaavan (I) mukaista yhdistettä tai sen suolaa kohti.

Siten tuotettu tämän keksinnön mukainen rokote on tavallisesti sellaisessa muodossa, että kaavan (I) mukainen yhdiste tai sen suola ja fosfolipidi muodostavat partikkeleita ja antigeeni liitetään sen membraaniin, joka on niin sanottu virosomi. Keskimääräistä virosomipartikkelin läpimittaa ja pinnan zeta-potentiaalia voidaan kontrolloida muuttamalla kaavan (I) mukaisen yhdisteen tai sen suolan suhdetta fosfolipidin suhteen. Tavallisesti keskimääräinen virosomipartikkelin läpimitta on edullisesti 40 - 300 nm ja sen zeta-potentiaali on edullisesti -5 - -70 mV.

Tämän keksinnön mukainen rokote annetaan tavallisesti ihonalaisella annostelulla. 350 - 12 µg (antigeeniproteiinin määrä) rokotetta annostellaan yhdestä useisiin kertoihin kaudessa.

Tämän keksinnön mukaisilla muramyylidipeptidijohdannaisilla on erinomainen apuaaineaktiivisuus ja ne ovat erinomaisia virosomirokotteen komponentteja.

Tämän keksinnön mukaisen rokotteen vasta-aineita tuottava kapasiteetti on yhtä suuri tai korkeampi kuin tavanomaisten virosomirokotteiden ja paljon suurempi turvallisuus punehtuvuuden ja kuumeen näkökulmista. Lisäksi tämän keksinnön mukaisella rokotteella on korkea stabiiliisuus myös säilytyksen aikana ja sitä voidaan säilyttää jäädytettynä tai jääkuivatussa muodossa.

Seuraavat esimerkit kuvaavat edelleen tätä keksintöä, jotka ~~esimerkit eivät millään tavalla rajoita keksintöä.~~

Esimerkki 1

1,0 g [6-O-(2-tetradekyyliheksadekanoyyli)-N-asetyyli-muramoyyli)-L-alanyyli-D-isoglutamiinia liuotettiin 100 ml:aan tetrahydrofuraania. 0,3 g N,N-disukkinimidyyli-karbonaattia ja 0,15 ml trietyyliamiinia lisättiin liuokseen ja niitä sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1,5 tuntia.

0,22 ml 28 %:sta ammoniakkin vesiliuosta lisättiin sitten niihin ja niitä sekoitettiin huoneenlämpötilassa vielä 30 minuuttia.

5 Reaktioneste konsentroitiin alennetussa paineessa ja jäännös silikageelikolonnikromatografoitiin. Puhdistuksen jälkeen, eluoimalla kloroformi/metanolilla, mitä seurasi jääkuivatus vesi/dioksaanista, saatiin 0,44 g [6-O-(2-tetradekyyliheksadekanoyyli)-N-asetyylimuramoyyli]-L-alanyyli-D-glutamamidia.

10 Sulamispiste: 155 - 165 °C

Molekyyli massa: 926 (C₄₉H₉₁N₅O₁₁):

FAB massa m/z 927 (M+1)

15 ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 0,85 (6H, t, J = 7 Hz), 1,2 - 1,3, 1,39, 1,50 (58H, m), 1,72 (1H, m), 1,80 (3H, s), 1,93 (1H, m), 2,08 (2H, t, J = 8 Hz), 2,30 (1H, m), 3,28 (1H, t, J = 9 Hz), 3,46 (1H, t, J = 9 Hz), 3,67 (1H, m), 3,81 (1H, m), 4,02 (1H, d-d, J = 12 Hz, 5 Hz), 4,12 (1H, d-q J = 9 Hz, 5 Hz), 4,31 (2H, m), 4,34 (1H, d, J = 10 Hz), 4,44 ja 4,98 (1H), 5,43 (1H, d, J = 4 Hz), 6,67 (1H, d, J = 4), 6,47 (1H, s), 7,01 (1H, s), 7,27 (1H, s), 7,30 (1H, s), 7,65 (1H, d, J = 7 Hz), 8,08 (1H, d, J = 8 Hz), 8,17 (1H, d, J = 8Hz).

Esimerkki 2

25 1,0 g [6-O-(2-tetradekyyliheksadekanoyyli)-N-asetyylimuramoyyli]-L-alanyyli-D-isoglutamiinia liuotettiin 100 ml:aan tetrahydrofuraania. 0,3 g N,N-disukkinimidyyli-karbonaattia ja 0,15 ml trietyyliamiinia lisättiin liuokseen. Niitä sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1,5 tuntia. 0,2 ml 40 %:sta metyyliamiinin vesiliuosta lisättiin ja sekoitettiin huoneenlämpötilassa vielä 30 minuuttia.

Reaktioneste konsentroitiin alennetussa paineessa ja jäännös silikageelikolonnikromatografoitiin. Puhdistuksen jälkeen, eluoimalla kloroformi/metaniolilla, mitä seurasi jäädytyskuivaus vesi/dioksaanista, saatiin 0,5 g [6-

O-(2-tetradekyyliheksadekanoyyli)-N-asetyyylimuramoyyli]-L-alanyyli-N-metyyli-D-glutamamidia.

Sulamispiste: 95 - 100 °C

Molekyyylimassa: 939 (C₅₀H₉₅N₅O₁₁):

5 FAB massa m/z 940 (M+1)

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 0,85 (6H, t, J = 7 Hz), 1,2 - 1,3, 1,39, 1,50 (58H, m), 1,73 (1H, m), 1,79 (3H, s), 1,93 (1H, m), 2,07 (2H, t, J = 8 Hz), 2,30 (1H, m), 2,55 (3H, d, J = 5 Hz), 3,26 (1H, t, J = 9 Hz), 3,46 (1H, t, J = 9 Hz), 10 3,68 (1H, m), 3,82 (1H, m), 4,03 (1H, d-d, J = 12 Hz, 5 Hz), 4,12 (1H, d-q, J = 9 Hz, 5 Hz), 4,30 (2H, m), 4,36 (1H, d, J = 10 Hz), 4,98 (1H, t, J = 3,5 Hz), 5,43 (1H, d, J = 7 Hz), 6,67 (1H, d, J = 3 Hz), 7,01 (1H, s), 7,31 (1H, s), 7,64 (1H, d, J = 7 Hz), 7,71 (1H, d, J = 5 Hz), 8,07 15 (1H, d, J = 8 Hz), 8,17 (1H, d, J = 8 Hz).

Esimerkki 3

[6-O-(2-tetradekyyliheksadekanoyyli)-N-asetyyylimuramoyyli]-L-alanyyli-N-etyyli-D-glutamamidi valmistettiin samalla tavalla kuin esimerkissä 2.

20 Molekyyylimassa: 953 (C₅₁H₉₅N₅O₁₁):

FAB massa m/z 954 (M+1)

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 0,85 (6H, t, J = 7 Hz), 0,99 (3H, t, J = 7 Hz), 1,2 - 1,3, 1,39, 1,50 (58H, m), 1,71 (1H, m), 1,79 (3H, s), 1,93 (1H, m), 2,06 (2H, t, J = 8 Hz), 2,29 25 (1H, m), 3,04 (2H, d-q, J = 3, 5Hz, 7 Hz), 3,28 (1H, t, J = 9 Hz), 3,45 (1H, t, J = 9 Hz), 3,68 (1H, m), 3,81 (1H, m), 4,03 (1H, d-d, J = 12 Hz, 5 Hz), 4,12 (1H, d-q, J = 9 Hz, 5 Hz), 4,29 (2H, m), 4,35 (1H, d, J = 10 Hz), 4,97 (1H, t, J = 3,5 Hz), 5,44 (1H, d, J = 7 Hz), 6,68 (1H, d, J = 4 Hz), 7,01 (1H, s), 7,30 (1H, s), 7,64 (1H, d, J = 7 Hz), 7,76 (1H, d, J = 5,5 Hz), 8,07 (1H, d, J = 8 Hz), 30 8,16 (1H, d, J = 8 Hz).

Esimerkki 4**Influenssa HANA antigeenin valmistaminen**

Puhdistettua virusta saatiin allantoiininesteestä, joka oli infektoitu influenssa A /Yamagata / 120 /86 kannalla korkeanopeussentrifugikäsittelyllä (23 000 rpm, 90 min), pieninopeussentrifugikäsittelyllä (6 000 rpm, 60 min), ja sukroositiheysgradienttisentrifugoinnilla (30 000 rpm, 3 h). Sitten lisättiin Triton X-100:aa virusliuokseen sellaisessa määrässä, että Triton X-100:n konsentraatio olisi 1 %. Niitä sekoitettiin hyvin huolellisesti viruksen liuottamiseksi ja sitten saatiin puhdistettua HANA antigeeniliuosta sukroositiheysgradientti tasapainomenetelmällä.

Virosomirokotteen valmistaminen

Edellä saadusta puhdistetusta HANA antigeeniliuoksesta valmistettiin neljänlaisia rokotenäytteitä, joiden kunkin koostumus on näytetty taulukossa 1: vastaavat ainesosat sekoitettiin keskenään ja sitten lisättiin oktyyliglukosidia seokseen sellaisessa määrässä, että sen konsentraatio olisi 4 % liuottamaan ainesosat. Sitten suoritettiin dialyysi 5 % glukosia sisältävällä fosfaattipurililiuoksella (pH 7,4) tavanomaisten menetelmien mukaisesti. Siten saatujen kunkin näytteen HANA antigeenikonsentraatio säädettiin 70 µg/ml:aan. Virosomin muodostumista havaittiin syntyneessä näytteessä. Virosomit tämän keksinnön mukaisissa näytteissä nro 1 ja 2 on näytetty kuvissa 1 ja 2.

Tämän keksinnön mukainen virosomirokote (nro 1 tai 2) ja kontrollirokote laimennettiin 1/15 konsentraatioon edellisestä rokoteliuoksesta ja ihonalaisesti rokotettiin 10 marsun ryhmän kunkin takamukseen 0,5 ml:n määrässä. Kolme viikkoa rokottamisen jälkeen rokotettiin jälleen sama määrä. 3 viikon ja 5 viikon jälkeen marsuista otettiin verta ja verelle suoritettiin Hemagglutiini inhibitiokoe WHO:n menetelmän mukaisesti vasta-ainetta mudosta-

van kapasiteetin määrittämiseksi. Tulokset on annettu taulukossa 1.

Taulukko 1

Näyte nro	Koostumus		Vasta-aineita muodostava kapasiteetti (HI-arvo)	
			3 viikkoa	5 viikkoa
1	HANA Esimerkin 1 yhdiste 1) = Fosfatidyylikoliini 2) = Fosfatidyyliglyseroli	70 µg 300 µg 225 µg 150 µg	< 80	5120
2	HANA Esimerkin 2 yhdiste 1) = Fosfatidyylikoliini 2) = Fosfatidyyliglyseroli	70 µg 300 µg 225 µg 150 µg	<80	2560
3	HANA Esimerkin 1 yhdiste Dimyristoyylifosfatidyyli- koliini Dimyristoyylifosfatidyyli- glyseroli	70 µg 600 µg 450 µg 300 µg	<80	2560
	HANA Esimerkin 1 yhdiste Dimyristoyylifosfatidyyli- glyseroli Kolesteroli	70 µg 600 µg 600 µg 300 µg	<80	2560
Kontrolli 1	HANA Kontrolliyhdiste Kolesteroli	70 µg 300 µg 300 µg	<80	2560
Kontrolli 2	HANA	70 µg	<80	1280
Kontrolli 3	HANA-rokote	70 µg	<80	1280
Kontrolli 4	Formaliini-inaktivoitu kokonaispartikkelirokote	70 µg	<80	1280

Edellä olevasta taulukosta käy ilmi, että tämän keksinnön mukaiset rokotteen osoittivat vasta-ainetta

tuottavaa kapasiteettia, joka on sama tai suurempi kuin kontrollirokotteiden.

* Kontrolliyhdiste: 6-O-(2-tetradekyyliheksadekanoyyli)-N-asetyylimuramoyyli-L-alanyyli-D-isoglutamiini

5 Punehtuvuusreaktiotesti

Tässä punehtuvuusreaktiotestissä, 0,5 ml näytettä rokotettiin ihonalaisesti kunkin 5 kaniinin takamukseen, kunkin kaniinin punehtunut pinta-ala määritettiin joka päivä, kunkin viiden kaniinin kokonaisalue laskettiin ja sitten kaniinien punehtuneen pinta-alan keskiarvo laskettiin. Tulokset on annettu taulukossa 2.

Taulukko 2

Näyte nro	Koostumus	Punehtuvuusreaktiokoe Positiivinen eläin (Nro)/Testattu eläin (nro)	Punehtuneen pinnan ala		
			1 päivä	2 päivä	3 päivä
25	HANA	70 µg			
	Esimerkin 1 yhdiste	300 µg			
	1) = Fosfatidyylikoliini	225 µg	1,1	0	0
	2) = Fosfatidyyliglyseroli	150 µg			
30	HANA	70 µg			
	Esimerkin 2 yhdiste	300 µg			
	1) = Fosfatidyylikoliini	225 µg	1,0	0	0
	2) = Fosfatidyyliglyseroli	150 µg			
35	Kontrolli	70 µg			
	1	300 µg	5/5	5/7	4,2
	Kontrolliyhdiste	300 µg			8,5
	Kolesteroli	300 µg			
40	Kontrolli	70 µg	3/5	4,5	4,0
	2	HANA-rokote			1,6

pyöreämmän

45 Edellä olevasta taulukosta käy ilmi, että punaisuuden aste, jonka aiheuttaa tämän keksinnön mukaiset rokotteet, oli almpi kuin mitä kontrollirokotteet aiheuttivat.

Kuumekoe

50 Kuumekokeessa 1 ml kutakin näytettä vietiin kaniinin laskimoon biologisten tuotteiden standardin yleisen

koementelmän mukaisesti. Kon kolmen kaniinin reaktion kohonnut kokonaiskuumelä oli 1,3 °C tai vähemmän, kuumekokeen tulokset annettiin negatiivisena ja kun se oli 2,5 °C tai enemmän, tulokset annettiin positiivisena. Tulokset on annettu taulukossa 3.

Taulukko 3

Näyte nro	Koostumus	Kuumekoe (3 kaniinin kehon lämpötilan kokonaiskohoaminen)
1	HANA 70 µg Esimerkin 1 yhdiste 300 µg 1) = Fosfatidyylikoliini 225 µg 2) = Fosfatidyyliglyseroli 150 µg	0,81 °C Tulokset: negatiiviset
2	HANA 70 µg Esimerkin 2 yhdiste 300 µg 1) = Fosfatidyylikoliini 225 µg 2) = Fosfatidyyliglyseroli 150 µg	0,14 °C Tulokset: negatiiviset
Kontrolli 1	HANA 70 µg Kontrolliyhdiste 300 µg Kolesteroli 300 µg	2,66 °C Tulokset: positiiviset

Edellä olevasta taulukosta käy ilmi, että tämän keksinnön mukaisten rokotteiden aiheuttaman kuumelän kohoamisen aste oli alhaisempi kun mitä kontrollirokotteet aiheuttivat.

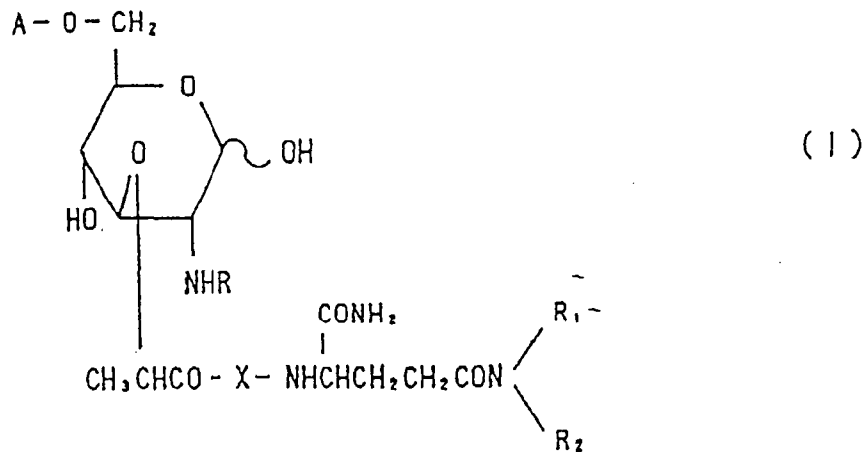
Patenttivaatimukset

1. Muramyylidipeptidijohdannainen tai sen suola, tunnettu siitä, että sillä on yleinen kaava (I):

5

10

15



20

jossa R esittää asyyliiryhmää, jossa on 2 - 6 hiiliatomia, X esittää L-alaniiniryhmää, A esittää rasvahapporyhmää, jossa on 20 - 60 hiiliatomia, ja R₁ ja R₂ itsenäisesti esittävät vetyatomia tai substituoitua tai substituoimantonta alempaa alkyyliryhmää.

25

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen muramyylidipeptidijohdannainen, tunnettu siitä, että A esittää haarautunutta rasvahapporyhmää, jossa on 20 - 40 hiiliatomia.

30

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen muramyylidipeptidijohdannainen, tunnettu siitä, että alempialkyyliryhmässä on 1 - 6 hiiliatomia.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen muramyylidipeptidijohdannainen, tunnettu siitä, että R esittää asyyliiryhmää, jossa on 2 - 6 hiiliatomia, X esittää L-alaniiniryhmää, A esittää haarautunutta rasvahapporyhmää, jossa on 20 - 40 hiiliatomia ja R₁ ja R₂ itsenäisesti esittävät vetyatomia tai alempaa alkyyliryhmää.

35

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen muramyylidipeptidijohdannainen, tunnettu siitä, että se on valit-

tu ryhmästä, joka käsittää [6-O-(2-tetradekyyliheksadekanoyyli)-N-asetyyylimuramoyyli]-L-alanyyli-D-glutamamidin, [6-O-(2-tetradekyyliheksadekanoyyli)-N-asetyyylimuramoyyli]-L-alanyyli-N-metyyli-D-glutamamidin ja [6-O-(2-tetradekyyliheksadekanoyyli)-N-asetyyylimuramoyyli]-L-alanyyli-N-etyyli-D-glutamamidin.

6. Menetelmä influenssarokotteen valmistamiseksi, tunnettu siitä, että

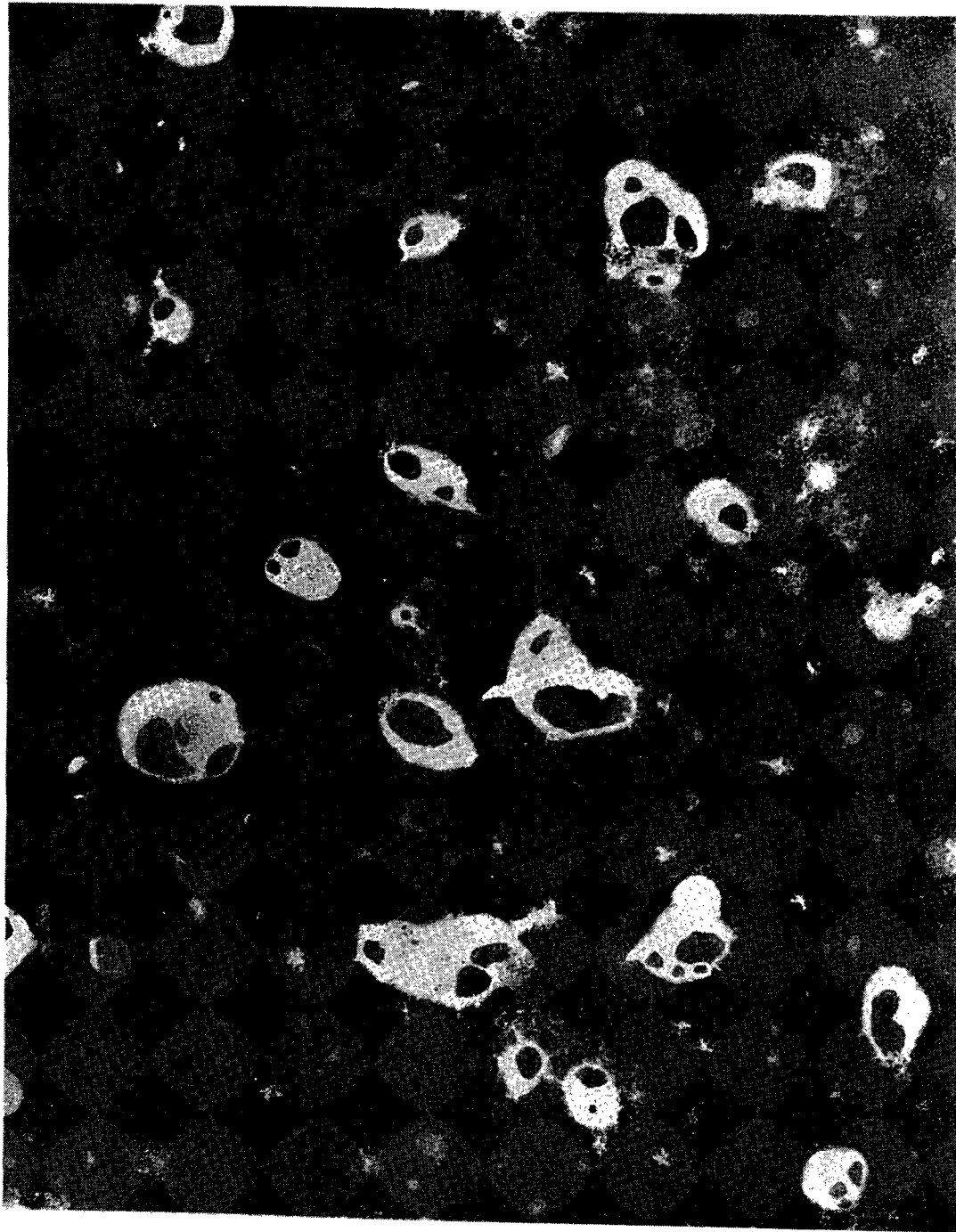
a) influenssavirusantigeeni saatetaan kosketukseen jonkin patenttivaatimuksista 1 - 5 mukaisen muramyylipeptidijohdannaisen tai sen suolan kanssa puskuriliuoksessa,

b) liuotetaan vaiheessa a) saatu tuote tehokkaassa määrässä pinta-aktiivista ainetta, ja

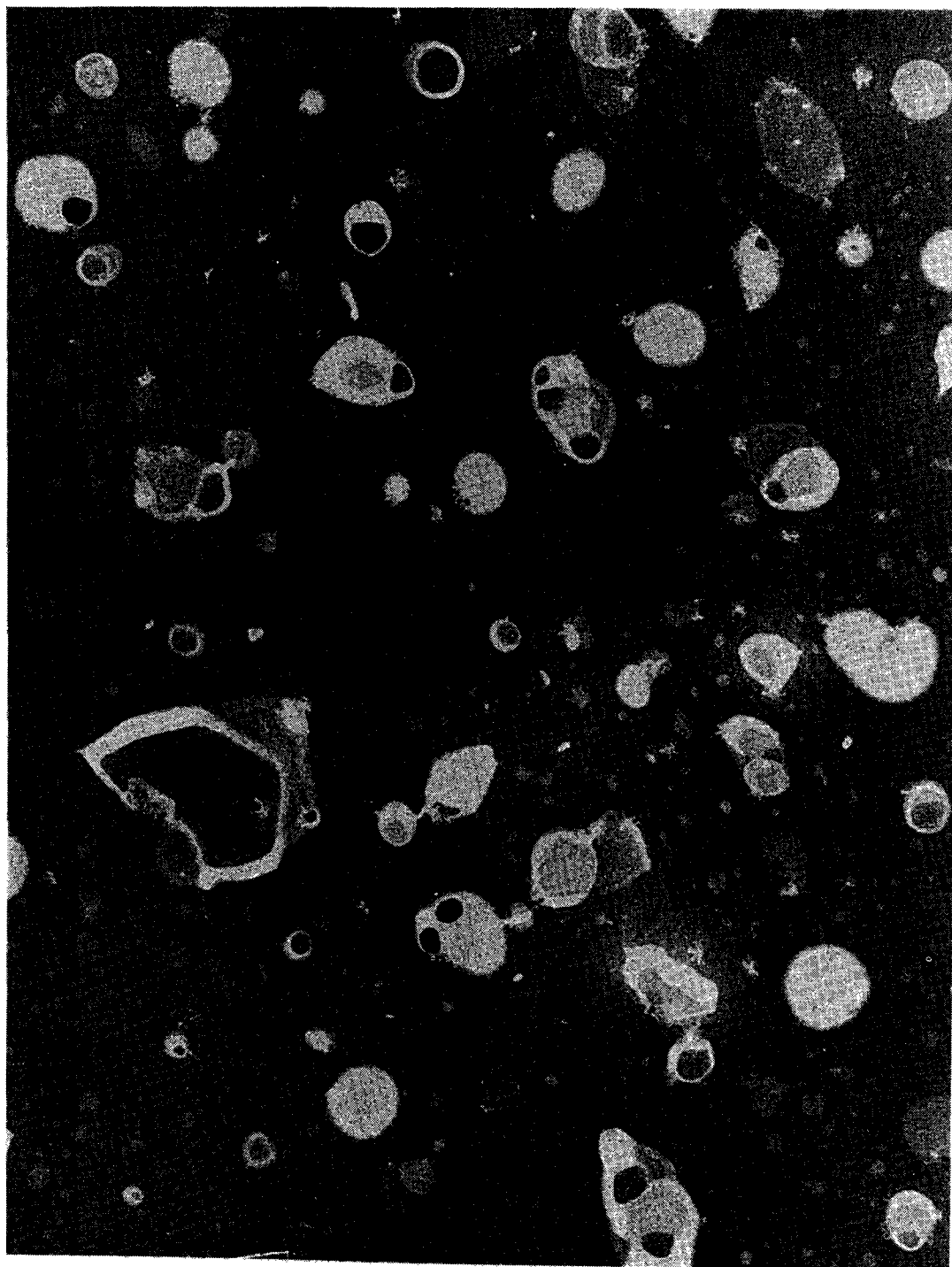
c) dialysoidaan saatu liuos käytetyn pinta-aktiivisen aineen poistamiseksi ja influenssarokotteen saamiseksi, joka sisältää influenssavirusantigeenin ja muramyylipeptidijohdannaisen tai sen suolan välisen kompleksin.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että käytetään 1/300 - 10 paino-osaa antigeenia yhtä paino-osaa muramyylipeptidijohdannaista tai sen suolaa kohti.

FIG. 1



F I G. 2



1000X

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Infection and Immunity 57 (6) 1839-48,
1989 ✓

Vaccine 8 (1990) 503-509

Infection and Immunity 53, 511-16,
1986 ✓

18.5.97 *L. P. P.*

Allekirjoitus