



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **326042**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

C07D 309/28 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C07D 407/06 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

C07D 495/04 (2006.01)

C12R 1/92 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19984004	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1997.02.26 PCT/AU97/00109
(22)	Inng.dag	1998.08.31	(85)	Videreføringsdag	1998.08.31
(24)	Løpedag	1997.02.26	(30)	Prioritet	1996.03.01, AU, 8397/96 1996.09.04, AU, 2131/96 1996.11.14, AU, 3631/96
(41)	Alm.tilgj	1998.11.02			
(45)	Meddelt	2008.09.08			
(73)	Innehaver	Biota Scientific Management Pty Ltd, 616 St. Kilda Road, Level 4, Melbourne, Vic 3004, AU			
(72)	Oppfinner	Betty Jin, Mount Waverley, Vic, AU Wen-Yang Wu, Mount Waverley, Vic, AU Phillip A. Reece, Balwyn, Vic, AU Guy Y. Krippner, Glen Waverley, Vic, AU Keith Geoffrey Watson, Surrey Hills, Vic, AU			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO			
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for påvisning av influensavirus samt neuraminidasebinder og diagnostisk preparat som kan anvendes ved fremgangsmåten			
(56)	Anførte publikasjoner	US-A-4355102, WO-A1-9109971, WO-A1-9206691			
(57)	Sammendrag				

En fremgangsmåte for påvisning av influensavirus som benytter forbindelser som er i stand til å bindes spesifikt til det aktive sete på influensavirus-neuraminidase, og nye forbindelser for anvendelse ved fremgangsmåte.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for påvisning av influensavirus. Oppfinnelsen tilveiebringer en ny diagnostisk fremgangsmåte som kan anvendes for påvisning av alle
5 stammer av influensavirus type A og type B. Fremgangsmåten er basert på anvendelse av forbindelser som er i stand til å bindes spesifikt til det aktive sete på influensavirus-neuraminidase, eller funksjonaliserte derivater av slike forbindelser, som bindings- og/eller påvisningsmidler for å identifisere
10 influensavirus i kliniske prøver. Betegnelsen "neuraminidase-bindere" anvendes i det etterfølgende som en referanse til disse forbindelser og deres funksjonaliserte derivater. Fremgangsmåten og forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan enten virke i nærvær eller fravær av forbindelser som bindes uspesifikt til
15 influensavirus-neuraminidase.

Oppfinnelsen angår spesielt en ny klasse av kjemiske forbindelser og deres anvendelse som diagnostiske midler for visuell eller instrumentell påvisning av influensa A og B. Nærmere bestemt angår oppfinnelsen en gruppe av nye neuramin-
20 syre(sialinsyre)derivater som bindes til influensa A- og B-neuraminidase, og som også har en funksjonalitet som tillater at forbindelsene bindes til en overflate eller til en påvisbar markør. Oppfinnelsen angår også diagnostiske preparater som omfatter forbindelsene.

25

Oppfinnelsens bakgrunn

Influenza A- og B-virus er hovedårsakene til akutt respiratorisk sykdom med anslått 30-50 millioner infeksjoner årlig i USA alene. Influenza A har vært ansvarlig for alvorlige
30 epidemier, slik som "spanskesyken" fra 1919 som drepte millioner av mennesker. Mange virus- og bakterieinfeksjoner kan ha lignende symptomer som influensa. Den hurtige identifikasjon av respiratoriske virus ville sette leger i stand til å anvende den mest velegnede terapi tidlig i sykdommen. En tidlig og nøyaktig
35 diagnose ville tillate avgjørelser angående anvendelse av anti-bakteriell terapi og hospitalisering av barn og eldre mennesker.

Laboratorietester for identifikasjon av virus i klinisk materiale anvendes i stor utstrekning, og mange forskjellige påvisningsmetoder er tilgjengelige. Læreboken, "Laboratory

Diagnosis of Viral Infections", Marcel Dekker 1992, Ed. E. H. Lennette, diskuterer generelt metoder som anvendes for et bredt område av virus, inkludert influensavirus.

Et antall tester er tilgjengelige for diagnose av
5 influensa A og B. Den tradisjonelle metode for identifikasjon av influensavirus har vært anvendelse av cellekultur som er ytterst sensitiv og spesifikk. Uheldigvis kan tiden som fordres for dyrkning, isolering og identifikasjon av influensavirus variere mellom 2 og 10 dager, hvilket således gjør metoden praktisk talt
10 ubrukelig for å veilede legen til en egnet terapi. Fordi influensavirusinfeksjon vanligvis er selvbegrenset må diagnosen være hurtig hvis terapien skal være effektiv. Med andre ord er slike cellekulturmetoder vanligvis kun verdifulle for å tilveiebringe retrospektiv epidemiologisk informasjon.

15 I tillegg til cellekulturmetodene for påvisning av influensa har det nylig blitt tilgjengelig noen få hurtige direkte tester som er spesifikke for influensa A. Det er således rapportert en monoklonal immunfluorescensanalyse (IFA) (Spada, B. et al., J. Virol. Methods, 1991 33 305) og minst én
20 enzymimmunanalyse (EIA) er tilgjengelig (Ryan-Poirier, K. A. et al., J. Clin. Microbiol., 1992 30 1072). Et antall sammenligninger mellom disse hurtige påvisningsmetoder for influensa A er rapportert; se f.eks. Leonardi, G. P. et al., J. Clin. Microbiol., 1994 32 70, som anbefalte at direkte prøvetesting
25 skulle anvendes sammen med kulturisolasjon, for å tillate både identifikasjon av viruset tidnok til å igangsette terapi og infeksjonskontrollmålinger, og overvåke antigenkonstitusjonen av influensastammer utbredt i samfunnet for epidemiologiske formål. IFA-metoden er rapportert å være arbeidsintensiv og fordrer
30 betydelig teknisk ekspertise og der resultatene ofte er vanskelige å tolke. På den annen side ga EIA-metoden (Directigen FLU-A; Becton Dickinson Microbiology Systems) et høyt nivå av falske positive resultater, og det er blitt anbefalt at denne analyse kun burde anvendes i laboratorier i tillegg til, eller
35 som erstatning for, direkte immunfluorescenstester (Waner, J. L. et al., J. Clin. Microbiol., 1991 29 479).

I tillegg til de ovennevnte problemer med de tilgjengelige hurtige analyser for influensa, er det andre fundamentale mangler ved noen av disse metoder. For det første kan

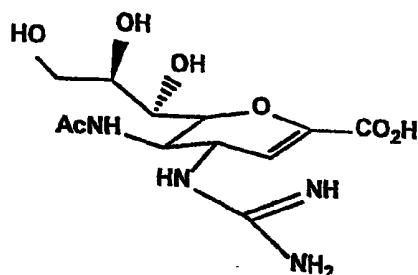
ingen av de tilgjengelige analyser påvise influensa B, hvilket betyr at selv et negativt testresultat ville etterlate legen usikker på hvilken type terapi som skulle anvendes. For det andre, dersom en hurtig immunanalysemetode avhenger av anvendelse av antistoffer mot ett av influensa A-proteinene, kan det være et alvorlig problem ved å påvise nye stammer av viruset der strukturen av det antigene protein er blitt forskjøvet eller endret. Influensa A er beryktet for dets tilbøyelighet til å gjennomgå slike endringer.

En annen type hurtig analyse for influensavirus er blitt beskrevet i en serie patentbeskrivelser (se f.eks. Liav, A. et al., International Patent Application No. WO 92/12256). Metoden involverer anvendelse av et kromogent substrat for influensa-neuraminidaseenzymet. Med andre ord avhenger analysen av visualisering av et fargestoff som dannes når influensa-neuraminidasen spalter et spesielt sialinsyre-fargestoff-konjugatmolekyl. Denne teknikk synes å gi begrenset spesifisitet fordi den ikke lett kunne skjelne mellom tilstedeværelse av virus-neuraminidase og andre former av enzymer, spesielt bakteriell neuraminidase. Det kan også ha lav sensitivitet på grunn av den forholdsvis langsomme aktivitet av virus-neuraminidase.

Neuraminidase er én av nøkkelproteinene som er til stede på overflaten av influensaviruset og det spiller en viktig rolle for virusets evne til å infisere humane celler. Det har lenge vært antatt at midler som bindes til neuraminidaseenzymet kan forhindre infeksjon av influensa, og stor innsats er blitt lagt i leting etter slike bindemidler. Selv om mange forbindelser har vist *in vitro*-aktivitet mot influensa-neuraminidase, er det først nylig fastslått at det er mulig å oppnå beskyttelse mot influensainfeksjon *in vivo* ved anvendelse av en kraftig neuraminidasebinder som bindes til det aktive sete i enzymet (se von Itzstein, M. et al., Nature 1993 363 418 og søkerens tidligere patentsøknader, internasjonal patentsøknad nr. WO 92/06691 og nr. WO 91/16320). Det er spesielt funnet at 2,3-didehydro-2,4-dideokso-4-guanidinyln-acetylneuraminsyre (forbindelse I, betegnet GG167) er en sterk binder av influensa-neuraminidase, og viser også sterk *in vivo*-antivirusaktivitet hos dyr (Ryan, D. M. et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1994 38 2270) og

hos frivillige forsøkspersoner (Hayden, F. G. et al., J. American Medical Assoc., 1996 275 295).

Forbindelse (I) GG167



Mer nylig er det funnet at visse substituerte sykloheksenderivater av sialinsyre også er sterke bindere av influensavirus-neuraminidase (Kim, C. U. et al., J. Amer. Chem. Soc., 1997 119 681), og spesielt forbindelsen (3R,4R,5S)-4-acetamido-5-amino-3-(1-etylpropoksy)-1-sykloheksen-1-karboksytsyre (GS 4071).

Videre beskrives det i US-patentskrift nr. 4 355 102 en fremgangsmåte for påvisning av influensavirus ved hjelp av en agglutinasjonstest, som omfatter å tilsette en prøve som inneholder viruset til et reagens som omfatter et neuraminidasesubstrat som er i stand til å bli hydrolysert av neuraminidase, og som har minst én sialinsyregruppe, inkubere for å la en agglutinasjonsreaksjon skje, og måle graden av agglutinasjon.

I internasjonal patentsøknad WO 91/09971 beskrives en fremgangsmåte for påvisning av humaninfluensaneuraminidaseaktivitet, som omfatter å inkubere prøven med et kromogent modifisert neuraminsyresubstrat som har en homogen gruppe som fremviser en særskilt farge når den spaltes fra derivatet.

Endelig beskrives det i internasjonal patentsøknad nr. WO 92/06691, som også antydte ovenfor, antivirale forbindelser som binder det aktive setet i influensaneuraminidase, som omfatter analoger av neuraminsyre.

Det er foreliggende oppfinnelses formål å overvinne noen av problemene ved metodene ifølge kjent teknikk og tilveiebringe en enkel og sensitiv måte for å påvise influensavirus.

Ved foreliggende oppfinnelse er det således nå funnet at biologisk aktive stoffer som har stereokjemisk komplementaritet til det aktive sete på influensavirus-neuraminidase, som

beskrevet i publikasjonen av von Itzstein et al. referert til ovenfor, slik at IC_{50} for binding er 10^{-6} M eller mindre, og spesielt visse derivater av forbindelse I, kan anvendes for å påvise influensavirus gjennom deres evne til både selektivt å
5 binde influensaviruset og samtidig å bindes til en overflate eller på en påvisbar bindingsgruppe.

Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer derfor i et
10 første aspekt en fremgangsmåte for påvisning av influensavirus som omfatter trinnet med at en prøve som mistenkes for å omfatte viruset eksponeres for en forbindelse (neuraminidasebinder) som er i stand til å bindes spesifikt til det aktive sete på influensavirus-neuraminidase, men som ikke avspaltes av neuraminidase.

15 Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er anvendelig på alle kjente stammer av influensa A og influensa B.

Neuraminidasebinderen er fortrinnsvis bundet via en spacergruppe til en overflate eller en påvisbar markør. Spacergruppen bør være tilstrekkelig lang til at den påvisbare
20 markør er eksponert på overflaten av viruspartikkelen.

Fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvende selektiv innfangelse og konsentrasjon av viruset, etterfulgt av påvisning av viruset ved anvendelse av enhver egnet konvensjonell metode; påvisningsmetoden behøver ikke å ha iboende
25 selektivitet. Neuraminidasebinderen kan f.eks. være bundet til et støttemateriale, slik som en membran eller en polymer, slik at viruspartiklene vil innfanges selektivt og konsentreres når en prøve passerer over eller gjennom støttematerialet. I én foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen ender derfor spacergruppen
30 i en funksjonalitet som er i stand til å bindes til en overflate. Mange egnede funksjonaliteter er kjent i teknikken. Den terminale funksjonalitet kan f.eks. være en biotinyllgruppe som kan anvendes for å teste binderen til en overflate belagt med avidin, streptavidin eller et antistoff rettet mot biotin.

35 Alternativt kan den terminale funksjonalitet f.eks. være en aminogruppe som kan anvendes for å konjugere neuraminidasebinderen til en karboksyomfattende overflate.

Alternativt kan en selektiv påvisningsmetode anvendes; viruspartiklene i en prøve kan f.eks. utsettes for en neuramin-

idasebinder koblet til en påvisbar markør, under betingelser slik at binderen festes selektivt til virusneuraminidasen på overflaten av viruspartikkelen. Den påvisbare markør er fortrinnsvis kovalent koblet til neuraminidasebinderen. Den påvisbare markør

5 påvises deretter ved anvendelse av enhver egnet metode. For noen påvisningssystemer er det passende å fokusere prøven i et avgrenset område, f.eks. en flekk eller linje på en overflate. Dette kan oppnås på mange forskjellige måter; prøven kan f.eks. suspenderes eller uselektivt innfanges på et filter eller et

10 annet støttemateriale og deretter utsettes for den merkede neuraminidasebinder som beskrevet ovenfor. Det finnes flere kjente metoder for uselektiv innfangelse av influensavirus, f.eks. på en fetuinbelagt overflate (J. Virological Methods, 1992 39 111) eller på en egnet membran (J. Virological Methods, 1992

15 40 77). Et annet egnet påvisningssystem kan være en optisk analyseanordning som beskrevet av Miller, B. J. et al., US-patentsøknad nr. 5 418 136.

I et annet alternativt aspekt kan det ved foreliggende oppfinnelse anvendes en kombinasjon av selektiv innfangelse og

20 selektiv påvisning for å tilveiebringe en enkel og sensitiv tottrinns-metode for påvisning av influensavirus. Denne metode benytter det faktum at hver influensaviruspartikkel typisk inneholder ca. 100 neuraminidasemolekyler utspredd over dens sfæriske overflate (White, D. O., Curr. Top. Microbiol. Immunol.,

25 1974 63 1-48), og kan derfor bindes til flere enn ett neuraminidasebinder-molekyl samtidig.

En neuraminidasebinderforbindelse kan således være festet til et støttemateriale, f.eks. som et smalt bånd gjennom en porøs membran. Testprøven appliseres deretter på den andre

30 ende av membranen og tillates å strøme gjennom båndet med bundet forbindelse. Alle influensaviruspartikler i testprøven vil innfanges av den membranbundne forbindelse og således tilbakeholdes i det smale bånd. I det andre trinn av testen tillates en påvisbar markør festet til neuraminidasebinderen å

35 strøme gjennom membranen og båndet med bundne influensaviruspartikler. Tilstedeværelsen av influensavirus vises deretter ved en observerbar endring i membranen på stedet for den bundne forbindelse. Egnede kromatografiske analyseanordninger er blitt beskrevet, f.eks. av Chandler, H. M., internasjonal patentsøknad

nr. WO 92/21977.

Et meget stort antall egnede påvisningssystemer er kjent i teknikken, f.eks. biotin-streptavidin, enzymatiske systemer slik som pepperrotperoksidase eller alkalisk fosfatase, fluorescenssystemer, kjemiluminescenssystemer, kolloidalt gull, radioaktive markører og agglutineringsystemer. Det forventes at kolloidalt gull festet til en neuraminidasebinder via en spacergruppe vil være en spesielt egnet påvisbar markør. Et annet egnet påvisningssystem vil anvende neuraminidasebinderen kovalent koblet til pepperrotperoksidase. En fagperson vil lett være i stand til å velge et egnet påvisningssystem og optimalisere betingelser for påvisning ved anvendelse av vanlig prøve- og feile-eksperimentering.

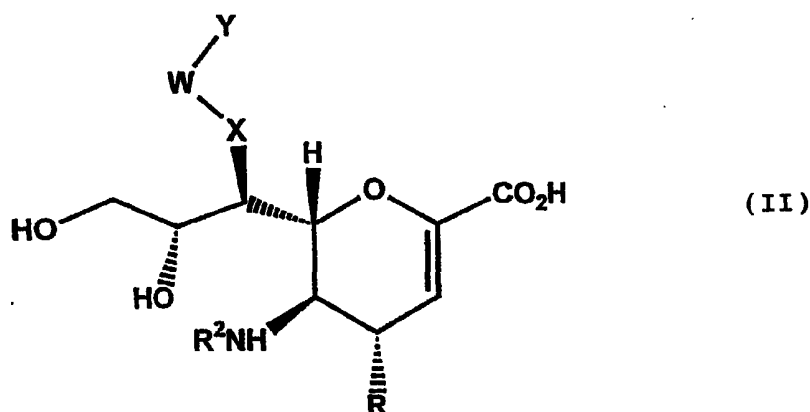
Neuraminidasebinderen kan være ethvert middel som bindes til det aktive sete på influensavirus-neuraminidase, forutsatt at den ikke omfatter en påvisbar markør eller en spacergruppe som spaltes av neuraminidasen. Bindingen behøver ikke å være irreversibel. IC_{50} for binding er fortrinnsvis 10^{-6} M eller bedre.

Egnede midler inkluderer, men er ikke begrenset til, forbindelser med egnet IC_{50} beskrevet i søkerens tidligere patentsøknader, internasjonal patentsøknad nr. WO 92/06691 og WO 91/16320, og også US patent nr. 5 453 533 av Luo et al., US patent nr. 5 512 596 av Gilead Sciences, Inc., og internasjonal patentsøknad nr. WO 96/26933 av Gilead Sciences, Inc. Selv om disse publikasjoner beskriver anvendelse av forbindelser beskrevet deri for behandling eller profylakse av influensavirus-infeksjon, er det ikke antydnet at forbindelsene er anvendelige for diagnostiske formål, ved anvendelse av analyser av typen beskrevet heri.

Ifølge et andre aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en neuraminidasebinder som er egnet for anvendelse ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse, og som omfatter en analog av neuraminsyre (sialinsyre) substituert på C_7 eller en ekvivalent posisjon med en spacergruppe egnet for kobling til en påvisbar markør eller til en overflate, idet analogen ikke omfatter en påvisbar markør eller en spacergruppe som spaltes av neuraminidase.

I en foretrukket utførelsesform tilveiebringer dette

aspekt forbindelser med formel (II):



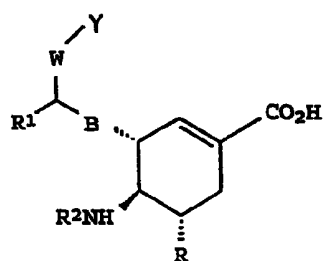
hvor

- 15 R betegner en azidogruppe, en usubstituert eller substituert guanidinogruppe eller en usubstituert eller substituert aminogruppe;
- R² betegner COCH₃, COCF₃ eller SO₂CH₃;
- X betegner O eller NH;
- 20 W betegner en spacergruppe dannet av en kjede atomer med en total lengde mellom 4 og 100 atomer, og omfatter eventuelt også substituerte karbon- og/eller nitrogenatomer og inkluderer eventuelt oksygen- og/eller svovelatomer;
- 25 Y betegner OH, SH, NH₂, CH=O, CH=CH₂, CO₂H, CONHNH₂ eller NH-biotinyl, eller en beskyttet form av én av disse endefunksjonaliteter;
- og hvori substituenten på amino- eller guanidinogruppen, når til stede, er en substituert eller usubstituert C₁₋₆-alkylgruppe, eller en amino-, hydroksy-, cyano- eller alkoksykarbonylgruppe;
- 30

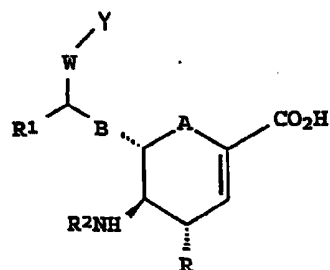
med det forbehold at X-W-Y ikke inkluderer gruppen OC(=Z)NR⁵R⁶, hvori Z betegner O eller S og R⁵ og R⁶ uavhengig av hverandre betegner H eller en hydrokarbongruppe som eventuelt er

35 substituert med NH₂, OH eller SH.

I en annen foretrukket utførelsesform tilveiebringer foreliggende oppfinnelse neuraminidasebindere med formel (IIA) eller (IIB)



(IIA)



(IIB)

hvor R , R^2 , W og Y er som definert ovenfor for formel (II), A og B er oksygen eller CH_2 , eller kan betegne en enkeltbinding, og R_1 er en lipofil C_1 - C_{12} -alkylgruppe som eventuelt er substituert med ett eller flere halogenatomer, sykloalkyl-, alkoksy-, halogen-alkoksy- eller eventuelt substituerte arylgrupper.

Egnede spacergrupper W inkluderer, men er ikke begrenset til, lineære peptider, oligosakkarider, polyoler, polyetylenglykolgrupper, hydrokarbongrupper og hydrokarbongrupper bundet sammen med oksygen- eller svovelatomer eller med karbonyl-, amido-, urea- eller hydrazidfunksjonaliteter. Spacergrupper W kan også omfatte kombinasjoner av disse forskjellige grupper.

Egnede beskyttende grupper for endefunksjonaliteten Y inkluderer, men er ikke begrenset til, estere av OH -, SH - og CO_2H -gruppene, karbamater av NH_2 - og $CONHNH_2$ -gruppene og acetal av $CH=O$ -gruppen.

Som anvendt heri inkluderer betegnelsen "hydrokarbongruppe" mettede og umettede, rettkjedete eller forgrenede hydrokarbongrupper, inkludert arylgrupper og kombinasjoner av slike grupper.

Foretrukne forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse inkluderer forbindelser med formel (II) hvor R betegner guanidino og R^2 betegner acetyl.

En annen gruppe av foretrukne forbindelser ifølge oppfinnelsen med formel (II) er forbindelser hvor X er O og Y er NH_2 eller NH -biotinyl.

En tredje foretrukket gruppe av forbindelser ifølge oppfinnelsen inkluderer neuraminidasebindere med formel (IIA) hvor R er amino, R^2 er acetyl, B er oksygen og R_1 er en

alkylgruppe.

Ytterligere foretrukne forbindelser er forbindelser med formel (II) hvori W er en spacergruppe utvalgt fra $\text{CONH}(\text{CH}_2)_n$, $\text{CONH}(\text{CH}_2)_n\text{NHCONH}(\text{CH}_2)_m$, $\text{CONH}(\text{CH}_2)_n[\text{NHCO}(\text{CH}_2)_5]_m$, $\text{CO}(\text{CH}_2)_n$,

- 5 $\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{NHCONH}(\text{CH}_2)_m$, $\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{NHCO}(\text{CH}_2)_q$, $\text{CONH}(\text{CH}_2)_n\text{NH}(\text{COCH}_2\text{NH})_q\text{COCH}_2$; $\text{CONH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)_q$ og $\text{CONH}(\text{CH}_2)_n\text{NHCO}(\text{CH}_2)_q$, hvori n og m er hele tall mellom 2 og 12 og q er 0 eller et helt tall mellom 1 og 12.

- En fagperson vil være i stand til å utvelge en egnet påvisbar markør og et påvisningssystem, og teste forbindelsene referert til ovenfor for deres egnethet ved anvendelse av rutinemetoder. En fagperson vil således være i stand til å velge et egnet påvisningssystem, slik som selektiv innfangelse eller selektiv påvisning som beskrevet ovenfor. For selektive innfangelsessystemer vil spacergruppen ende i en funksjonalitet som kan bindes til et fast støttemateriale. Mange egnede funksjonaliteter er kjent i teknikken.
- 10
15

- Substitusjonen med gruppen W-Y ved C_7 (eller ekvivalent) bør ikke redusere stamforbindelsens evne til å bindes til neuraminidase i vesentlig grad; fortrinnsvis reduseres ikke binding mer enn 100 ganger. Evnen til å bindes til neuraminidase kan bestemmes ved anvendelse av enhver egnet metode; en egnet metode er *in vitro*-bioanalysen av neuraminidaseaktivitet beskrevet av Warner og O'Brien, Biochemistry, 1979 18 2783-2787.
- 20
25
- In vitro*-bioanalyse er beskrevet i søkerens patentsøknad nr. WO 91/16320. Alternativ binding av en radioaktivt merket binderforbindelse til neuraminidase kan bestemmes ved hjelp av metoder kjent i teknikken.

- Egnede typer av kliniske prøver for anvendelse ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse inkluderer vattutstrykninger fra hals og nese og utskyllinger fra nese-svelg, eller kombinasjoner av disse; hvis nødvendig kan utskyllingene eventuelt konsentreres, f.eks. ved ultrafiltrering, men det forventes at dette kun vil være nødvendig når antallet viruspartikler er lavt.
- 30
35

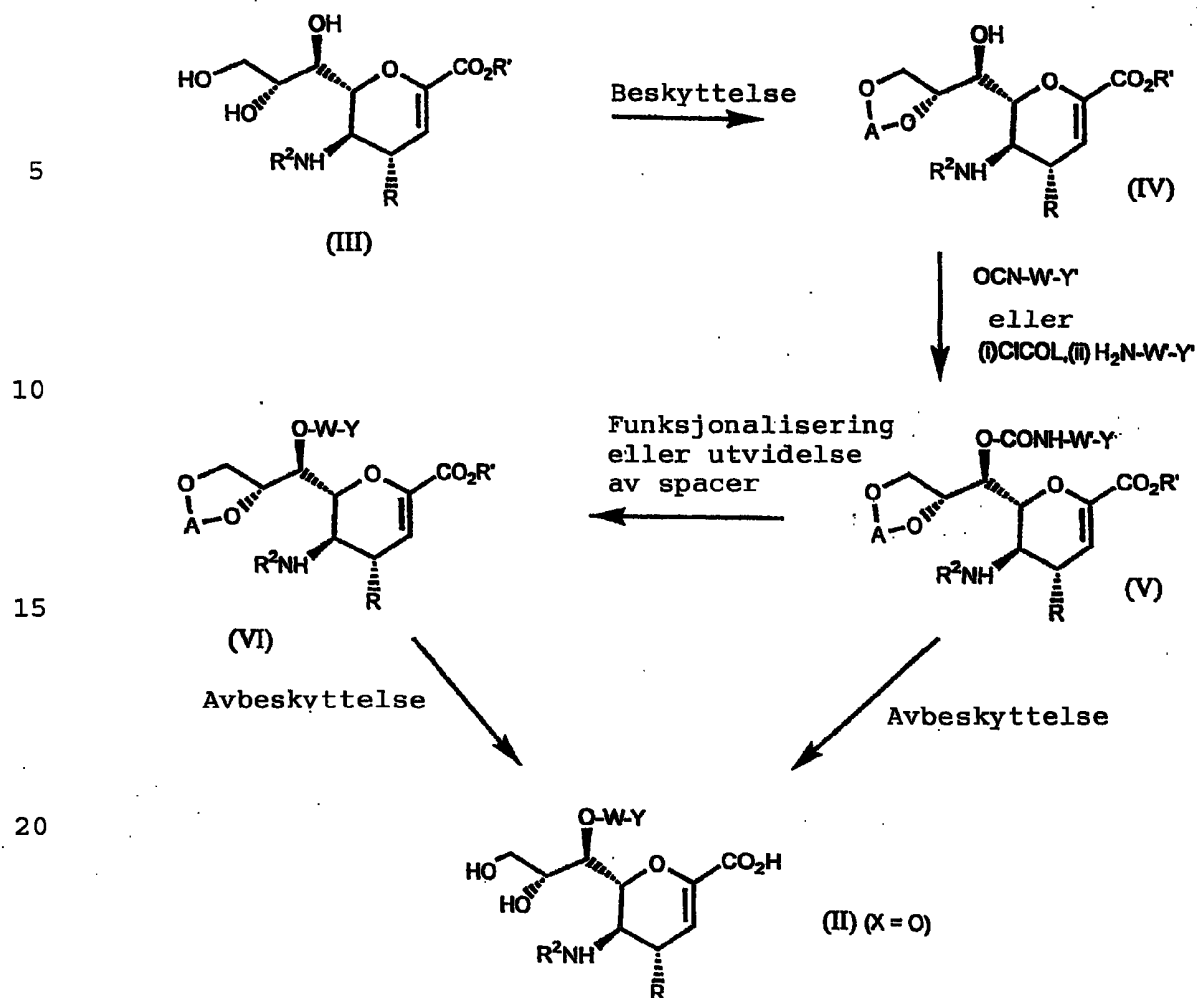
Det er åpenbart innforstått at markøren som er bundet til spacergruppen kan være en epitop egnet for anvendelse i antistoffpåvisningssett, slik som de beskrevet i US patent nr. 4 943 522, Eisinger et al. (overdratt til Quidel); i optiske

analyseanordninger med en aktiv mottakeroverflate, slik som de beskrevet i US patent nr. 5 418 136, Miller et al. (overdratt til Biostar, Inc.); eller i agglutineringspåvisningssystemer, slik som de beskrevet i US patent nr. 4 894 347 og internasjonal patentsøknad nr. WO 91/04492, begge fra Agen Limited. Det forventes også at biosensorsystemer er egnet for anvendelse ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse. En karbohydrat-biosensoroverflate for påvisning av bakterier er f.eks. beskrevet (Nilsson, K. G. I. og C. F. Mandenius; BioTechnology, 1994 12 1376-1378).

Noen forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse bindes spesielt sterkt til influensavirus-neuraminidase, med IC_{50} på 10^{-8} M eller bedre, og disse forbindelser kan også være terapeutisk anvendelige.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan fremstilles ved mange forskjellige metoder. Ved én fremgangsmåte kan fremstillingen av forbindelser ifølge oppfinnelsen hvori X er O utføres som vist i reaksjonsskjemaene nedenfor hvori R, R² og Y er som definert for formel (II), R' er en alkylgruppe og W' er en spacergruppe. Et sialinsyrederivat med formel (III) omdannes således til den 8,9-beskyttede form med formel (IV) som f.eks. kan være et syklisk karbonat (A = C=O) eller et acetonid (A = CMe₂). Den resterende frie 7-hydroksygruppe acyleres med enten en isocyanatgruppe OCN-W'-Y eller et acylklorid (ClCOL), som inneholder en andre forlatende gruppe L og der gruppen L deretter erstattes med et amin H₂N-W'-Y. Gruppen W' er en spacergruppe med vanligvis en lengde på 4 til 10 atomer og ligger generelt innenfor definisjonen av W, og W kan være ekvivalent med CONHW'. Spacergruppen W' kan ytterligere bli utvidet eller funksjonalisert, f.eks. ved addisjon av biotin til enden av kjeden, slik som i (VI).

De beskyttende grupper A, R' og enhver gruppe som er til stede på substituentene R og Y kan til sist fjernes under standard betingelser for å gi forbindelsene med formel (II). Mange forskjellige beskyttende grupper som er egnet for beskyttelse av hydroksy- og karbonylgruppene er kjent i teknikken; se f.eks. "Protecting Groups in Organic Synthesis" av T. H. Greene (Wiley & Sons, 1981).



Forbindelser med formel (III) og (IV) er kjente, og deres fremstilling er f.eks. beskrevet i internasjonal patent-søknad nr. WO 91/16320.

30 En annen fremgangsmåte for fremstilling av forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse hvori X er NH, involverer start med et sialinsyrederivat og utførelse av reaksjoner som gir en dobbel inversjon i C₇-posisjonen. Et mellomprodukt med generell formel (IV) kan f.eks. omsettes under Mitsunobu-reaksjonsbetingelser for å gi en egnet forlatende estergruppe med invertert stereokjemi ved C₇ (Anderson, N. G. et al., J. Org. Chem., 1996 61 7955). Erstatningen av C₇-esteren med en nukleofil, slik som et azid, gir deretter et C₇-nitrogensubstituert derivat med den korrekte stereokjemi. En

alternativ metode for innføring av nitrogen i C₇-posisjonen av sialinsyrederivater er beskrevet (Kong og von Itzstein, Tetrahedron Letters, 1995 36 957).

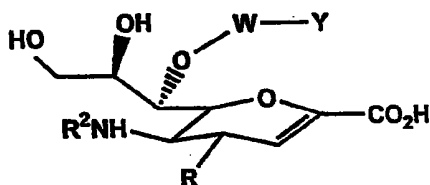
5 De fleste mellomprodukter med formel (V) og (VI) er nye forbindelser og disse omfatter et ytterligere aspekt av foreliggende oppfinnelse.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

10 Foreliggende oppfinnelse vil nå beskrives i detalj med referanse til de etterfølgende eksempler.

Eksempler på forbindelser ifølge oppfinnelsen med formel (II) (X=O) er vist i tabell 1. Eksemplene på substituent Y som inkluderer biotin har biotin festet via en amidbinding til dets karboksygruppe.

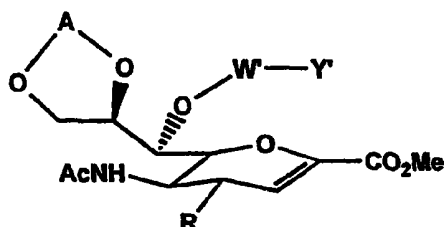
Tabell 1



Forbindelse nr.	R	R ²	W	Y
8	NHC(=NH)NH ₂	Ac	CONH(CH ₂) ₆ NHCONH(CH ₂) ₆	NH ₂
11	NHC(=NH)NH ₂	Ac	CONH(CH ₂) ₆	NH ₂
13	NHC(=NH)NH ₂	Ac	CONH(CH ₂) ₆	NHBoc
17	NHC(=NH)NH ₂	Ac	CONH(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ CH ₂	NH ₂
19	NHC(=NH)NH ₂	Ac	CONH(CH ₂) ₆	NH-Biotin
20	NH ₂	Ac	CONH(CH ₂) ₆ NHCONH(CH ₂) ₆	NHBoc
21	NHC(=NH)NH ₂	Ac	CONH(CH ₂) ₆ (NHCOCH ₂) ₃	NH-Biotin
22	NHC(=NH)NH ₂	Ac	CONH(CH ₂) ₆ NHCO(CH ₂) ₁₁	NH-Biotin
23	NHC(=NH)NH ₂	Ac	CONH(CH ₂) ₆ NHCO(CH ₂) ₅	NH-Biotin
25	NHC(=NH)NH ₂	Ac	CONH(CH ₂) ₆ [NHCO(CH ₂) ₅] ₄	NH ₂
26	NHC(=NH)NH ₂	Ac	CONH(CH ₂) ₆ [NHCO(CH ₂) ₅] ₄	NH-Biotin
27	NHC(=NH)NH ₂	Ac	CONH(CH ₂) ₆ NHCO(CH ₂) ₅ NHCO CH ₂ (OCH ₂ CH ₂) ₁₆	NH-Biotin
28	NHC(=NH)NH ₂	Ac	CONH(CH ₂) ₆ [NHCO(CH ₂) ₅] ₂	NH ₂
29	NHC(=NH)NH ₂	Ac	CONH(CH ₂) ₆ [NHCO(CH ₂) ₅] ₄ N H-COCH ₂ CH ₂	CONHNHBoc
30	NHC(=NH)NH ₂	Ac	CONH(CH ₂) ₆ [NHCO(CH ₂) ₅] ₄ N H-COCH ₂ CH ₂	CONHNH ₂
31	NHC(=NH)NH ₂	Ac	CONH(CH ₂) ₆ NHCOCH ₂ CH ₂	CO ₂ H

Eksempler på mellomprodukter på formel (V) og (VI) er vist i tabell 2. Også her representerer Boc butoksykarbonyl.

Tabell 2



Førbindelse nr.	A	R	W'	Y'
3	C=O N ₃		CONH(CH ₂) ₆	NHBoc
4	C=O N ₃		CONH(CH ₂) ₆	NH ₂
5	C=O N ₃		CONH(CH ₂) ₆ NHCONH(CH ₂) ₆	NHBoc
6	C=O NH ₂		CONH(CH ₂) ₆ NHCONH(CH ₂) ₆	NHBoc
7	C=O NHC(=NH)NH ₂		CONH(CH ₂) ₆ NHCONH(CH ₂) ₆	NHBoc
9	C=O NH ₂		CONH(CH ₂) ₆	NHBoc
10	C=O NHC(=NBoc)NHBoc		CONH(CH ₂) ₆	NHBoc
12	C=O NHC(=NH)NH ₂		CONH(CH ₂) ₆	NHBoc
14	C=O N ₃		CONH(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ CH ₂	NHBoc
15	C=O NH ₂		CONH(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ CH ₂	NHBoc
16	C=O NHC(=NBoc)NHBoc		CONH(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ CH ₂	NHBoc
18	C=O NHC(=NH)NH ₂		CONH(CH ₂) ₆	NH ₂
24	C=O NHC(=NH)NH ₂		CONH(CH ₂) ₆ [NECO(CH ₂) ₅] ₄	NHBoc
32	C=O NHC(=NH)NH ₂		CONH(CH ₂) ₆ NHCOCH ₂ CH ₂	CO ₂ H

Eksempel 1

Fremstilling av 5-acetamido-7-[6'-(6"-aminoheksylureido)-heksyl]-karbamoyloksy-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeksy-D-glysero-D-galakto-non-enopyranosonsyre (8)

(A) Fremstilling av metyl-5-acetamido-4-azido-8,9-mono-karbonyldioksy-2,3,4,5-tetradeksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (2)

Til en suspensjon av metyl-5-acetamido-4-azido-2,3,4,5-tetradeksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (1) (1,32 g, 4,03 mmol) i tørr diklormetan (32 ml) og acetonitril (16 ml) inneholdende N,N-dimetylanilin (1,6 ml, 12,46 mmol) i et isbad under argon, ble det dråpevis tilsatt en 20 % løsning av fosgen i toluen (3 ml, 6,06 mmol) i løpet

av 20 minutter. Den klare reaksjonsblanding ble omrørt ved isbadtemperatur i 2 timer, deretter hensatt ved romtemperatur i 16 timer før den ble inndampet til tørrhet. Resten ble delt mellom etylacetat (300 ml) og vann (50 ml). Det organiske lag
 5 ble vasket suksessivt med 0,5 M HCl-løsning (32 ml) ved 5-10 °C, mettet natriumkloridløsning (3 x 30 ml), tørket over vannfritt Na₂SO₄ og deretter inndampet til tørrhet. Resten ble underkastet flashkolonnekromatografi (kiselgel, etylacetat/heksan = 8/1) for å gi forbindelse (2) (1,035 g, 71 %) som et hvitt skum.

MA (FAB): 357 (M+1)⁺

i.r. (CHCl₃) cm⁻¹: 3314, 2101, 1774, 1734, 1654.

¹H-nmr (CDDl₃) δ (ppm): 2,13 (s, 3H), 3,81 (s, 3H), 3,82 (d, 1H), 3,90 (d, 1H), 4,08 (dd, 1H), 4,21 (dd, 1H), 4,72 (d, 2H),
 15 4,97 (ddd, 1H), 5,95 (d, 1H), 6,55 (d, 1H).

(B) Fremstilling av metyl-5-acetamido-4-azido-7-(6'-tert-butoksykarbonylaminoheksyl)-karbamoyloksy-8,9-mono-karbonyldioksy-2,3,4,5-tetradekoxy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (3)

Til en oppløsning av forbindelse (2) (577 mg, 1,62 mmol) i vannfri pyridin (8 ml) under argon, ble det tilsatt 4-dimetylamino pyridin (DMAP) (275 mg, 2,25 mmol) og 4-nitrofenylklorformiat (424 mg, 2,11 mmol). Reaksjonsblandingen
 25 ble omrørt ved 30-35 °C i 3,5 time. Til denne blanding ble det tilsatt 6-tert-butoksykarbonylaminoheksylamin (567 mg, 2,63 mmol) og DMAP (405 mg, 3,32 mmol). Blandingen ble omrørt ved romtemperatur under argon i 24 timer og deretter fortynnet med etylacetat (400 ml). Etylacetatløsningen ble vasket
 30 suksessivt med vann (3 x 40 ml), 2 M HCl (40 ml) ved 5-10 °C, og deretter vann (3 x 20 ml). Det organiske lag ble inndampet til tørrhet for å gi råproduktet (1,103 g) som deretter ble flashkromatografert (kiselgel, først etylacetat/heksan = 2/1, deretter etylacetat) for å gi tittelforbindelsen (3) (726 mg, 75 %) som et hvitt skum.

MS (FAB): 599 (M+1)⁺, 607 (m+9)⁺, (M+1+2H₂O-N₂)

i.r. (CHCl₃) cm⁻¹: 3328, 2734, 2099, 1799, 1732, 1682.

¹H-nmr (CDCl₃) δ (ppm): 1,20-1,40 (m, 4H), 1,40-1,60 (m, 13H), 2,07 (s, 3H), 3,01-3,42 (m, 5H), 3,84 (s, 3H), 4,50-4,85 (m,

4H), 4,93 (m, 2H), 5,03 (m, 1H), 5,41 (m, 1H), 5,95 (d, 1H), 6,48 (d, 1H).

(C) Fremstilling av metyl-5-acetamido-7-[6'-(6"-tert-butoksykarbonylaminoheksylureido)-heksyl]-karbamoyl-
oksy-4-azido-8,9-monokarbonyldioksy-2,3,4,5-tetrad-
oksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (5)

En oppløsning av forbindelse (3) (200 mg, 0,334 mmol) i trifluoreddiksyre (2 ml) ble omrørt under argon ved romtemperatur i én time og deretter inndampet under redusert trykk til tørrhet. Resten ble oppløst i metanol (5 ml) og inndampet på nytt til tørrhet for å gi forbindelse (4) som et hvitt skum.

¹H-nmr (CDCl₃) δ (ppm): 1,25-1,70 (m, 8H), 2,08 (s, 3H), 3,0-3,5 (m, 4H), 3,81 (s, 3H), 3,88 (dd, 1H), 4,4-4,8 (m, 4H), 5,01 (ddd, 1H), 5,30 (dd, 1H), 5,51 (dd, 1H), 5,86 (d, 1H), 6,73 (d, 1H), 7,34 (d, 1H).

Forbindelse (4) ble deretter oppløst i pyridin (2 ml) inneholdende en blanding av DMAP (30 mg, 0,246 mmol) og 6-tert-butoksykarbonylaminoheksylisocyanat (0,15 ml, 0,434 mmol). Reaksjonsblandingen ble omrørt under argon ved 18-20 °C i 72 timer og deretter omrørt med metanol (0,2 ml) ved romtemperatur i 3 timer. Den resulterende reaksjonsblanding ble inndampet til tørrhet og delt mellom etylacetat (200 ml) og 1 M NaH₂PO₄-løsning (50 ml). Det organiske lag ble vasket suksessivt med 1 M NaH₂PO₄ (2 x 50 ml), vann (3 x 25 ml) og vakuuminndampet til tørrhet. Resten ble flashkromatografert (kiselgel, ved anvendelse av etylacetat/heksan = 8/1, deretter etylacetat/metanol = 10/1) for å gi tittelforbindelsen (5) (180 mg, 72 %) som et hvitt skum.

MS (FAB): 741 (m+1)⁺, 749 (m+9)⁺

i.r. (CHCl₃) cm⁻¹: 3356, 2934, 2098, 1801, 1732, 1654.

¹H-nmr (CDCl₃+CD₃OD) δ (ppm): 1,12-1,42 (m, 25H), 1,80 (s, 3H), 2,90-3,18 (m, 9H), 3,70 (s, 3H), 3,90 (dd, 1H), 4,18 (dd, 1H), 4,32 (dd, 1H), 4,55 (d, 2H), 4,91 (m, 1H), 5,21 (br, 1H), 5,35 (dd, 1H), 5,45 (br d, 1H), 5,82 (d, 1H), 6,05 (dd, 1H), 7,82 (d, 1H).

(D) Fremstilling av metyl-5-acetamido-4-amino-7-[6'-(6"-tert-butoksykarbonylaminoheksylureido)-heksyl]-karbamoyloksy-8,9-monokarbonyldioksy-2,3,4,5-tetradeksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (6)

- 5 En blanding av forbindelse (5) (180 mg, 0,246 mmol), eddiksyre (35 mg, 0,58 mmol) og Pd/C (10 %) (30 mg) ble omrørt i en blanding av metanol (10 ml) og toluen (6 ml) under hydrogen ved romtemperatur i én time. Reaksjonsblandingen ble filtrert gjennom celitt, filterkaken ble vasket med metanol
- 10 (30 ml) og filtratet og vaskeløsningene ble kombinert og vakuuminndampet til tørrhet. Resten ble underkastet flash-kolonnekromatografi (kiselgel, etylacetat/2-propanol/vann = 5/2/1) for å gi forbindelse (6) (46 mg, 47,5 %) som et hvitt skum, så vel som gjenvunnet startmateriale (80 mg, 44 %).
- 15 ¹H-nmr (CD₃OD) δ (ppm): 1,15-1,55 (m, 25H), 1,87 (s, 3H, AcOH), 1,92 (s, 3H), 2,90-3,10 (m, 8H), 3,56 (dd, 1H), 3,69 (s, 3H), 3,91 (dd, 1H), 4,20 (dd, 1H), 4,62 (d, 2H), 5,05 (dd, 1H), 5,46 (dd, 1H), 5,85 (dd, 1H).

20 (E) Fremstilling av metyl-5-acetamido-7-[6'-(6"-tert-butoksykarbonylaminoheksylureido)-heksyl]-karbamoyloksy-4-[2,3-bis(tert-butoksykarbonyl)-guanidino-8,9-monokarbonyldioksy-2,3,4,5-tetradeksy-D-glyko-D-galakto-non-2-enopyranosonat (7)

- 25 En oppløsning av forbindelse (6) (46 mg, 0,065 mmol) i metanol (10 ml) ble behandlet med Amberlite IRA-400 (OH)-resin (100 mg) i 30 sekunder og filtrert. Resinen ble vasket med metanol (20 ml). Filtratet og vaskeløsningen ble kombinert, inndampet til tørrhet for å gi 41 mg fast stoff som deretter
- 30 etter ble blandet med N,N'-bis-tert-butoksykarbonyl-1H-pyrazol-1-karboksamidin (103 mg, 0,332 mmol) i metanol (5 ml). Blandingen ble omrørt under argon ved 30-35 °C i 5 dager og deretter inndampet til tørrhet. Resten ble flashkromatografert (kiselgel, først etylacetat/heksan = 8/1, deretter etylacetat)
- 35 for å gi forbindelse (7) (47 mg, 88,8 %) som et hvitt skum. i.r. (CHCl₃) cm⁻¹: 3312, 2933, 1802, 1728, 1643, 1564.
- ¹H-nmr (CDCl₃) δ (ppm): 1,20-1,60 (m, 43H), 1,87 (s, 3H), 2,19 (s, 1H), 2,90-3,20 (m, 8H), 3,73 (s, 3H), 4,17 (dd, 1H), 4,33 (br d, 1H), 4,53-5,20 (m, 8H), 5,51 (br, 1H), 5,88 (d, 1H),

6,66 (br, 1H), 8,38 (d, 1H).

(F) Fremstilling av 5-acetamido-7-[6'-(6"-aminoheksyl-ureido)-heksyl]-karbamoyloksy-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre (8)

En oppløsning av forbindelse (7) (47 mg, 0,058 mmol) i en blanding av metanol (5 ml) og vann (5 ml) inneholdende trietylamin (0,8 ml), ble omrørt under argon ved romtemperatur i 6 timer og deretter inndampet under redusert trykk til tørrhet. Resten ble oppløst i en blanding av metanol (5 ml) og vann (5 ml), deretter omrørt med Dowex 50WX8 (H⁺)-resin (1 g) ved romtemperatur i én time. Resinen ble filtrert og vasket med en blanding av metanol og vann (1:1), deretter omrørt ved 2 M NH₄OH-løsning (20 ml) ved romtemperatur i 2 timer og filtrert. Filtratet ble inndampet til tørrhet. Resten ble oppløst i vann (5 ml) og inndampet til tørrhet på nytt. Det resulterende faste materiale ble oppløst i vann (2 ml) og frysetørket for å gi forbindelse (8) (16 mg, 45,7 %) som et hvitt, fast materiale med en positiv guanidin(Sakaguchi)reaksjon.

MS (FAB): 617 (M+1)⁺

¹H-nmr (D₂O) δ (ppm): 1,10-1,17 (m, 18H), 2,07 (s, 3H), 2,85-3,20 (m, 6H), 3,50 (dd, 1H), 3,70 (dd, 1H), 4,10 (m, 2H), 4,45 (dd, 1H), 4,52 (dd, 1H), 4,95 (dd, 1H), 5,65 (d, 1H).

Eksempel 2

Fremstilling av 5-acetamido-7-(6'-aminoheksyl)-karbamoyloksy-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre som trifluoreddiksyresalt (11)

(A) Fremstilling av metyl-5-acetamido-4-amino-7-(6'-tert-butoksykarbonylaminoheksyl)-karbamoyloksy-8,9-mono-karbonyldioksy-2,3,4,5-tetradeksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (9)

Forbindelse (3) (eksempel 1, del (B)) (500 mg, 0,836 mmol) ble hydrogenert, i overensstemmelse med prosedyren beskrevet i eksempel 1, del (D), for å gi forbindelse (9) (285 mg, 59,6 %) som et hvitt skum.

MS (FAB): 573 (M+1)⁺

i.r. (CHCl_3) cm^{-1} : 3385, 2935, 1794, 1725, 1670, 1542.

^1H -nmr (CD_3OD) δ (ppm): 1,15-1,48 (m, 17H), 1,91 (s, 3H), 2,96 (m, 4H), 3,51 (dd, 1H), 3,70 (s, 3H), 3,88 (dd, 1H), 4,21 (dd, 1H), 4,62 (d, 2H), 5,05 (ddd, 1H), 5,45 (dd, 1H), 5,87 (d, 1H).

(B) Fremstilling av metyl-5-acetamido-7-(6'-tert-butoksy-karbonylaminoheksyl)-karbamoyloksy-4-[2',3"-bis(tert-butoksy-karbonyl)]-guanidino-8,9-monokarbonyldioksy-2,3,4,5-tetrad-
oksi-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (10)

Tittelforbindelsen (10) (149 mg, 83,4 %) ble oppnådd som et hvitt skum fra forbindelse (9) (125 mg, 0,219 mmol) ved å følge prosedyren beskrevet i eksempel 1, del (E).

MS (FAB): 815 ($\text{M}+1$)⁺

i.r. (CHCl_3) cm^{-1} : 3313, 2978, 1805, 1727, 1643, 1610, 1558.
 ^1H -nmr (CDCl_3) δ (ppm): 1,11-1,82 (m, 35H), 1,91 (s, 3H), 2,98-3,21 (m, 4H), 4,13 (dd, 1H), 4,32 (dd, 1H), 4,50-4,80 (m, 3H), 4,91-5,22 (m, 3H), 5,45 (dd, 1H), 5,89 (d, 1H), 6,69 (br d, 1H), 7,63 (d, 1H), 8,48 (d, 1H).

(C) Fremstilling av 5-acetamido-7-(6'-aminoheksyl)-karbamoyloksy-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeksi-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre som tri-fluoreddiksyresalt (11)

Forbindelse (10) (54 mg, 0,066 mmol) ble omrørt i en blanding av metanol (25 ml) og vann (25 ml) inneholdende trietylamin (5 ml) under argon ved romtemperatur i 6 timer og deretter inndampet under vakuum til tørrhet. Resten ble kromatografert (kiselgel, etylacetat/2-propanol/vann = 5/2/1) og fraksjonene med R_f -verdi på 0,4 ble kombinert og inndampet til tørrhet. Resten ble omrørt i trifluoreddiksyre (2 ml) under argon ved romtemperatur i én time og deretter inndampet til tørrhet. Resten ble oppløst i vann (3 ml) og frysetørket for å gi tittelforbindelsen (11) (27 mg, 69 %).

MS (FAB): 475 ($\text{M}+1$)⁺, 589 ($\text{M}+1+\text{TFA}$)⁺.

^1H -nmr (D_2O) δ (ppm): 1,27-1,81 (m, 8H), 1,98 (s, 3H), 2,89-3,21 (m, 4H), 3,51 (dd, 1H), 3,69 (dd, 1H), 4,04 (m, 1H), 4,18 (dd, 1H), 4,46 (dd, 1H), 4,57 (dd, 1H), 4,96 (dd, 1H), 6,01 (d, 1H).

Eksempel 3

Fremstilling 5-acetamido-7-(6'-tert-butoksykarbonylamino-heksyl)-karbamoyloksy-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre (13)

- 5 Til en oppløsning av forbindelse (9) (24 mg, 0,042 mmol) i vann (5 ml) ble det tilsatt 1H-pyrazol-1-karboksamidin (44 mg, 0,30 mmol) og imidazol (43 mg, 0,63 mmol) ved romtemperatur. Den resulterende blanding ble omrørt under argon ved 90-95 °C i 22 timer og deretter inn-
- 10 dampet til tørrhet for å gi råprodukt (12) som ga en sterk positiv Sakaguchi-reaksjon, hvilket indikerte tilstedeværelse av en guanidingruppe. Resten ble omrørt i vann (5 ml) inneholdende trietylamin (0,5 ml) under argon ved romtemperatur i 16 timer før inndamping til tørrhet. Resten ble underkastet
- 15 kromatografi (kiselgel, 2-propanol/vann = 3/1). Fraksjonene med R_f -verdi på 0,2 ble kombinert og inndampet til tørrhet og deretter frysetørket for å gi tittelforbindelsen (13) (9 mg, 37 %) som et hvitt, fast materiale.

MS (FAB): 575 (M+1)⁺

- 20 ¹H-nmr (D₂O) δ (ppm): 1,25-1,83 (m, 17H), 1,95 (s, 3H), 2,95-3,25 (m, 4H), 3,52 (dd, 1H), 3,63 (dd, 1H), 3,72 (dd, 1H), 3,98 (dd, 1H), 4,10 (m, 1H), 4,46 (dd, 1H), 4,52 (dd, 1H), 5,62 (d, 1H).

25 Eksempel 4

Fremstilling av 5-acetamido-7-{2-[2-(2-aminoetoksy)-etoksy]-etyl}-karbamoyloksy-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre (17)

- (A) 30 Fremstilling av metyl-5-acetamido-4-azido-7-{2'-[2''-(2'''-tert-butoksykarbonylaminoetoksy)-etoksy]-etyl}-karbamoyloksy-8,9-monokarbonyldioksy-2,3,4,5-tetradeksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (14)

- Ved å følge en lignende prosedyre som beskrevet i eksempel 1, del (B), ble forbindelse (14) (420 mg, 67 %) opp-
- 35 nådd som et hvitt skum fra forbindelse (2) (356 mg, 1 mmol) og 2-[2'-(2''-tert-butoksykarbonylamino-etoksy)etoksy]-etylamin.

MS (FAB): 631 (M+1)⁺ 639 (M+9)⁺

i.r. (CHCl₃) cm⁻¹: 3328, 2934, 2099, 1802, 1734, 1658, 1537.

¹H-nmr (CDCl₃) δ (ppm): 1,41 (s, 9H), 1,97 (s, 3H), 3,12-3,64 (m, 12H), 3,78 (s, 3H), 4,41-4,71 (m, 4H), 5,01 (d, 2H), 5,12 (m, 1H), 5,43 (dd, 1H), 5,67 (br, 1H), 5,91 (d, 1H), 6,83 (br d, 1H).

5

(B) Fremstilling av metyl-5-acetamido-4-amino-7-{2'-[2''-(2'''-tert-butoksykarbonylaminoetoksy)-etoksy]-etyl}-karbamoyloksy-8,9-monokarbonyldioksy-2,3,4,5-tetra-
deoksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (15)

10 Katalytisk hydrogenering av forbindelse (14) (400 mg, 0,634 mmol), som beskrevet i eksempel 1, del (D), ga forbindelse (15) (144 mg, 37,5 %) som et hvitt skum etter kromatografi (kiselgel, etylacetat/2-propanol/vann = 5/2/1).

¹H-nmr (CD₃OD) δ (ppm): 1,32 (s, 9H), 1,82 (s, 3H), 1,89 (s, 3H, AcOH), 3,04-3,22 (m, 4H), 3,36-3,53 (m, 8H), 3,68 (s, 3H), 3,72 (br d, 1H), 3,98 (dd, 1H), 4,25 (dd, 1H), 4,62 (d, 2H), 5,03 (ddd, 1H), 5,43 (dd, 1H), 5,84 (d, 1H).

(C) Fremstilling av metyl-5-acetamido-7-{2'-[2''-(2'''-tert-butoksykarbonylaminoetoksy)-etoksy]-etyl}-karbamoyloksy-4-[2',3''-bis(tert-butoksykarbonyl)]-guanidino-8,9-monokarbonyldioksy-2,3,4,5-tetrad-
eoksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (16)

20 Forbindelse (15) (101 mg, 0,167 mmol) ble guanidinert ved hjelp av prosedyren beskrevet i eksempel 1, del (E), for å gi forbindelse (16) (72 mg, 51 %) som et hvitt skum.

¹H-nmr (CDCl₃) δ (ppm): 1,42 (s, 9H), 1,49 (br s, 18H), 1,89 (s, 3H), 3,12-3,65 (m, 12H), 3,78 (s, 3H), 4,07 (m, 1H), 4,32 (br d, 1H), 4,55-4,75 (m, 2H), 4,90-5,35 (m, 3H), 5,40-5,68 (m, 2H), 5,91 (d, 1H), 6,38 (d, 1H), 8,42 (d, 1H).

(D) Fremstilling av 5-acetamido-7-{2'-[2''-(2'''-amino-etoksy)-etoksy]-etyl}-karbamoyloksy-4-guanidino-2,3,4,5-tetrad-
eoksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre (17)

35

Avbeskyttelse av forbindelse (16) (70 mg, 0,082 mmol) ved hjelp av prosedyren beskrevet i eksempel 1, del (F), ga tittelforbindelsen (17) (25 mg, 60 %) som et hvitt, fast materiale som ga en positiv Sakaguchi-reaksjon.

MS (FAB): 507 (M+1)⁺

¹H-nmr (D₂O) δ (ppm): 1,96 (s, 3H), 3,14-3,78 (m, 14H), 4,12 (m, 2H), 4,41 (dd, 1H), 4,52 (dd, 1H), 4,93 (dd, 1H), 5,68 (d, 1H).

5

Eksempel 5

Fremstilling av 5-acetamido-7-(6'-biotinylaminoheksyl)-
karbamoyloksy-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeksy-D-glysero-D-
galakto-non-2-enopyranosonsyre (19)

10 Forbindelse (10) (176 mg, 0,216 mmol) ble omrørt i
trifluoreddiksyre (5 ml) under argon ved romtemperatur i
én time og deretter vakuuminndampet til tørrhet for å gi for-
bindelse (18) som deretter ble tillatt å reagere med N-
hydroksysuccinimidester av biotin (110 mg, 0,324 mmol) i
15 vandig aceton (7,5 ml vann og 15 ml aceton) inneholdende en
blanding av NaHCO₃ (27 mg, 0,32 mmol) og Na₂CO₃ (34 mg,
0,32 mmol), ved romtemperatur i 3 timer. Den resulterende
blanding ble inndampet til tørrhet. Resten ble omrørt i en
blanding av metanol (25 ml) og vann (25 ml) inneholdende tri-
20 etylamin (4 ml) under argon ved romtemperatur i 16 timer.
Blandingen ble vakuuminndampet til tørrhet og resten ble
underkastet kromatografi (først etylacetat/2-propanol/vann =
5/2/1, deretter 2-propanol/vann = 3/1). Fraksjonene med R_f-
verdi på 0,25 i det andre løsningsmiddelsystem ble oppsamlet
25 og inndampet til tørrhet.

Resten ble oppløst i vann og behandlet med Dowex 50X8
(H⁺)-resin (0,5 g) i en halv time ved romtemperatur. Resinen
ble vasket suksessivt med vann (50 ml), metanol (20 ml), vann
(10 ml) og deretter eluert med 2 M NH₄OH. Eluatet ble inndampet
30 til tørrhet og frysetørket for å gi tittelforbindelsen (19),
(60 mg, 39,7 %) som et hvitt skum som ga en positiv Sakaguchi-
reaksjon.

MS (FAB): 701 (M+1)⁺

i.r. cm⁻¹: 3330, 2934, 1674, 1616, 1429.

35 ¹H-nmr (D₂O) δ (ppm): 1,25-1,80 (m, 14H), 2,01 (s, 3H), 2,23
(dd, 2H), 2,78 (d, 1H), 2,98 (dd, 1H), 3,08-3,26 (m, 4H), 3,35
(m, 1H), 3,51 (dd, 1H), 3,68 (dd, 1H), 4,02-4,28 (m, 2H),
4,32-4,08 (m, 4H), 4,92 (dd, 1H), 5,76 (d, 1H).

Eksempel 6

Fremstilling av 5-acetamido-4-amino-7-[6'-(6"-tert-butoksy-karbonyl-aminoheksylureido)-heksyl]-karbamoyloksy-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre (20)

5 Forbindelse (6) (50 mg, 0,07 mmol) ble omrørt i en blanding av metanol (30 ml) og vann (15 ml) inneholdende trietylamin (4 ml) under argon ved romtemperatur i 16 timer. Den resulterende blanding ble vakuuminndampet til tørrhet. Resten ble kromatografert (kiselgel 2-propanol/vann = 3/1) for å gi
10 tittelforbindelsen (20) (30 mg, 63,5 %) som et hvitt skum.

MS (FAB) : 675 (M+1)⁺

i.r. cm⁻¹: 3333, 2932, 1710, 1633, 1557.

¹H-nmr (D₂O) δ (ppm): 1,22-1,57 (m, 25H), 1,98 (s, 3H), 2,98-3,18 (m, 8H), 3,49 (dd, 1H), 3,64 (dd, 1H), 4,02-4,28 (m, 3H),
15 4,53 (br d, 1H), 4,92 (dd, 1H), 5,72 (d, 1H).

Eksempel 7

Fremstilling av 5-acetamido-7-(6'-biotinylamino-triglysin-amidoheksyl)-karbamoyloksy-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre (21)

20 Til en oppløsning av 6-biotinylaminotriglysin (101,2 mg, 0,24 mmol) i en blanding av vann (0,4 ml) og aceton (4 ml) ved -10 °C, ble det suksessivt tilsatt trietylamin (24,6 mg, 0,24 mmol), N-metylmorfolin (7 mg, 0,06 mmol) og
25 isobutylklorformiat (35 mg, 0,256 mmol). Hele blandingen ble omrørt under argon ved -10 °C i 12 minutter før den ble kombinert med en oppløsning av forbindelse (18) (92 mg, 0,156 mmol) i en blanding av vann (1 ml) og aceton (1 ml) inneholdende trietylamin (24,6 mg, 0,24 mmol) ved 0-5 °C. Den
30 resulterende reaksjonsblanding ble omrørt ved 15-20 °C i 4 timer og deretter inndampet under redusert trykk til tørrhet. Resten ble oppløst i aceton (2 x 25 ml) og filtrert for å gi et fast materiale (69 mg) som deretter ble omrørt i en blanding av metanol (10 ml) og vann (10 ml) inneholdende trietylamin (5 ml), under argon ved romtemperatur i 16 timer.
35 Oppløsningen ble inndampet til tørrhet og gjenoppløst i vann (20 ml) og deretter inndampet til tørrhet på nytt. Denne prosedyre ble gjentatt 5 ganger for å produsere råprodukt (21) (60 mg), som deretter ble underkastet flashkolonnekromatografi

(kiselgel, først 2-propanol/vann = 5/1, og deretter 2-propanol/vann = 3/1) for å gi tittelforbindelse (21) (17 mg, 12,5 %) som et hvitt, fast materiale som ga en positiv Sakaguchi-reaksjon (guanidinfargereaksjon) og en positiv bio-

5 tinfargereaksjon.

MS (FAB): 872 (M+1)⁺, 871 (M⁺)

i.r. cm⁻¹: 3287 (br), 1651 (br).

¹H-nmr (D₂O) δ (ppm): 1,22-1,81 (m, 14H), 1,98 (s, 3H), 2,37 (m, 2H), 2,78 (d, 1H), 2,95-3,55 (m, 7H), 3,61-4,16 (m, 9H),
10 4,39-4,67 (m, 4H), 4,92 (dd, 1H), 5,67 (d, 1H).

Eksempel 8

5-acetamido-7-(6'-biotinylamino-dodekanoyl-aminoheksyl)-
karbamoyl-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeksoxy-D-glysero-D-galakto-
15 non-2-enopyranosonsyre (22)

Denne forbindelse ble fremstilt ved kobling av biotinylaminododekansyre og forbindelse (18) ved anvendelse av karbonyldiimidazol, som beskrevet i Methods in Enzymology, 1990 184 664.

20 ¹H-nmr (CD₃OD) δ (ppm): 1,28-1,85 (m, 33H), 1,98 (s, 3H), 2,22 (m, 4H), 2,75 (d, 1H), 2,97 (dd, 1H), 3,03-3,28 (m, 6H), 3,49 (dd, 1H), 3,64 (dd, 1H), 4,07 (m, 1H), 4,20 (m, 1H), 4,34 (m, 2H), 4,50 (m, 2H), 5,57 (d, 1H).

25 Eksempel 9

5-acetamido-7-(6'-biotinylamino-kaproylaminoheksyl)-karbamoyl-
4-guanidino-2,3,4,5-tetradeksoxy-D-glysero-D-galakto-non-2-eno-
pyranosonsyre (23)

Denne forbindelse ble fremstilt ved kobling av biotinylaminokapronsyre og forbindelse (18) ved anvendelse av lignende betingelser som beskrevet i eksempel 8.

¹H-nmr (CD₃OD) δ (ppm): 1,30-1,85 (m, 21H), 1,99 (s, 3H), 2,24 (m, 4H), 2,76 (d, 1H), 2,98 (dd, 1H), 3,05-3,3 (m, 7H), 3,50 (dd, 1H), 3,66 (m, 1H), 4,07 (m, 1H), 4,21 (m, 1H), 4,37 (m,
35 2H), 4,52 (m, 2H), 5,58 (d, 1H).

Eksempel 10

Fremstilling av 5-acetamido-7-(6'-(6''-(6'''-aminokaproyl)-tri-aminokaproyl)-aminoheksyl)-karbamoyloksy-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre (25)

- 5 (A) Fremstilling av metyl-5-acetamido-7-(6'-[6''-(6'''-tert-butoksykarbonylaminokaproyl)-triaminokaproyl]-aminoheksyl)-karbamoyloksy-4-guanidino-8,9-monokarbonyldioksy-2,3,4,5-tetradeksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (24)

10 Til en oppløsning av 6-[6'-(6''-tert-butoksykarbonylaminokaproyl)-diaminokaproyl]-aminokapronsyre (150 mg, 0,263 mmol) i metanol (5 ml) ved -20 °C, ble det tilsatt suksessivt kalium-t-butoksid (30 mg, 0,267 mmol), N-metylmorfolin (15 mg, 0,148 mmol) og isobutylklorformiat (40 mg, 15 0,293 mmol). Hele blandingen ble omrørt under argon ved -15 til -20 °C i 20 minutter før den ble kombinert med en løsning av forbindelse (18) (140 mg, 0,238 mmol) i en blanding av metanol (1,5 ml) og vann (1,5 ml) inneholdende trietylamin (38 mg, 0,372 mmol) ved 0-5 °C. Den resulterende reaksjons-
20 blanding ble omrørt ved 15-20 °C i 4 timer og deretter inndampet under redusert trykk til tørrhet. Resten ble oppløst i aceton (50 ml x 2) og filtrert for å gi et hvitt, fast materiale (224 mg etter lufttørking) som deretter ble kromatografert på kiselgel (etylacetat/2-propanol/vann = 5/2/1) for å gi forbindelse (24) (80 mg, 31,5 %).

25 MS (FAB) 1068 (M+1)⁺ 1067 (M⁺)

¹H-nmr (CD₃OD) δ 1,21-1,72 (m, 41H), 1,99 (s, 3H), 2,18 (t, 8H), 2,92-3,24 (m, 12H), 3,79 (s, 3H), 4,14 (dd, 1H), 4,51-4,78 (m, 4H), 5,19 (ddd, 1H), 5,59 (dd, 1H), 5,92 (d, 1H).

30

- (B) Fremstilling av forbindelse (25)

Forbindelse (24) (29,5 mg, 0,027 mmol) ble oppløst i trifluoreddiksyre (2 ml) under argon. Denne blanding ble omrørt ved romtemperatur i én time og deretter inndampet under
35 redusert trykk til tørrhet. Resten ble oppløst i vann (5 ml) og vakuuminndampet til tørrhet på nytt før den ble gjenoppløst i vann (2 ml) og frysetørket for å danne et hvitt, fast materiale. Det faste materiale ble oppløst i en blanding av metanol (10 ml), vann (10 ml) og trietylamin (5 ml). Den

resulterende løsning ble omrørt under argon ved romtemperatur i 16 timer før den ble inndampet til tørrhet. Resten ble oppløst i vann (10 ml) og inndampet til tørrhet på nytt.

Resten ble suksessivt finpulverisert i aceton (20 ml x 3) og etanol (20 ml), deretter frysetørket for å gi forbindelse (25) (14 mg, 56 %) som et hvitt, fast materiale som ga en positiv Sakaguchi-reaksjon og en positiv ninhydrinreaksjon.

MS (FAB) 927 (M+1)⁺

¹H-nmr (D₂O) δ 1,15-1,69 (m, 32H), 1,90 (s, 3H), 2,11-2,23 (m, 8H), 2,91-3,21 (m, 12H), 3,41-3,70 (m, 2H), 3,85-4,12 (m, 2H), 4,48-4,52 (m, 2H), 4,92 (dd, 1H), 5,58 (d, 1H).

Eksempel 11

Fremstilling av 5-acetamido-7-{6'-[6"-(6'"-biotinylamino-kaproyl)-triaminokaproyl]-aminoheksyl}-karbamoyloksy-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeksy-D-glysero-D-galakto-non-2-eno-pyranosonsyre (26)

En oppløsning av forbindelse (24) (71,4 mg, 0,0667 mmol) i trifluoreddiksyre (2 ml) ble omrørt under argon ved romtemperatur i én time og deretter vakuuminndampet til tørrhet. Resten ble oppløst i vann (5 ml) og inndampet under redusert trykk til tørrhet. Den resulterende rest ble oppløst i pyridin (6 ml) inneholdende biotin-N-hydroksysuccinimidester (36 mg, 0,105 mmol). Reaksjonsblandingen ble omrørt under argon ved 40-50 °C i 48 timer og deretter inndampet under redusert trykk til tørrhet. Den resulterende rest ble omrørt i aceton (30 ml) ved romtemperatur i 4 timer og deretter filtrert. Bunnfallet ble vasket med aceton (10 ml x 2) og lufttørket for å gi et hvitt, fast materiale (72 mg). Dette faste materiale ble omrørt i en blanding av metanol (25 ml) og vann (25 ml) inneholdende trietylamin (5 ml) under argon ved romtemperatur i 16 timer før inndamping i vakuum til tørrhet. Resten ble underkastet kromatografi (kiselgel, den første eluering med etylacetat/2-propanol/vann = 5/2/1 og den andre eluering med 2-propanol/vann = 3/1) for å gi tittelforbindelsen (26) (30,4 mg, 39,5 %) som et hvitt, fast materiale som ga en positiv Sakaguchi-reaksjon og en positiv biotinfarge-reaksjon.

MS (FAB): 1153 (M+1)⁺

Infrarødt spektrum: 3292, 2931, 1638, 1541 cm^{-1} .

^1H -nmr (D_2O) δ (ppm) 1,12-1,62 (m, 38H), 1,91 (s, 3H), 2,12 (m, 10H), 2,65 (d, 1H), 2,82-3,15 (m, 13H), 3,30-3,62 (m, 3H), 3,81-4,18 (m, 3H), 4,25-4,56 (m, 4H), 5,51 (d, 1H).

5

Eksempel 12

Fremstilling av 5-acetamido-7-{6'-[6''-(6'''-hydrazidosuksinyl-aminokaproyl)-triaminokaproyl]-aminoheksyl}-karbamoyloksy-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeksy-D-glysero-D-galakto-non-2-eno-pyranosonsyre (30)

Til en oppløsning av 6-{6'-[6''-(N-Boc-hydrazido-suksinyl)-aminokaproyl]-diaminokaproyl}-aminokapronsyre (100 mg, 0,146 mmol) i vannfri metanol (4 ml) ved -20°C , ble det suksessivt tilsatt kalium-tert-butoksid (16,4 mg, 0,146 mmol), N-metylmorfolin (14,7 mg, 0,146 mmol), og isobutylklorformiat (24 mg, 0,176 mmol). Hele blandingen ble omrørt ved -15°C i 12 minutter før den ble blandet med en oppløsning av 5-acetamido-7-(6'-aminoheksyl)-karbamoyloksy-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre-trifluoreddiksyresalt (11) (76,6 mg, 0,13 mmol) i en blanding av metanol (1,5 ml) og vann (1,5 ml) inneholdende trietylamin (16 mg, 0,158 mmol) ved 5°C . Den resulterende reaksjonsblanding ble omrørt ved romtemperatur i 2 timer og deretter inndampet under redusert trykk til tørrhet. Resten ble oppløst i aceton (50 ml) og filtrert. Det faste materiale ble vasket med aceton (10 ml) og deretter lufttørket. Det faste materiale ble underkastet kolonnekromatografi (kiselgel, først etylacetat/2-propanol/vann = 5/2/1, deretter 2-propanol/vann = 3/1) for å gi forbindelse (29) (63 mg, 42,5 %) som et hvitt, fast materiale.

^1H -nmr (CD_3OD) δ (ppm) 1-21-1,72 (m, 41H), 1,95 (s, 3H), 2,17 (m, 8H), 2,48 (AB, 4H), 3,0-3,28 (m, 12H), 3,51 (dd, 1H), 3,62 (dd, 1H), 4,13 (m, 1H), 4,17 (dd, 1H), 4,35 (dd, 1H), 4,46 (dd, 1H), 4,98 (dd, 1H), 5,56 (d, 1H).

Forbindelse (29) (60 mg, 0,0526 mmol) ble omrørt i trifluoreddiksyre (2 ml) under argon ved romtemperatur i én time og deretter vakuuminndampet til tørrhet. Resten ble oppløst i vann (5 ml) inndampet under redusert trykk til tørrhet

og deretter lyofilisert for å gi forbindelse (34) trifluoracetat som et hvitt, fast materiale. Dette ble oppløst i vann (10 ml), behandlet med Amberlite IRA-400 (OH⁻)-resin for å fjerne trifluoreddiksyre og filtrert. Resten ble finpulverisert i aceton (15 ml) og deretter frysetørket for å gi tittelforbindelsen (30) (40 mg, 73 %) som et hvitt, fast materiale som ble lagret under argon.

MS (FAB) 1041 (M+1)⁺ 1042 (M+2)⁺

¹H-nmr (D₂O) δ (ppm) (trifluoreddiksyresalt)

10 1,15~1,68 (m, 32H), 1,93 (s, 3H), 2,18 (m, 8H), 2,52 (AB, 4H), 2,98~3,23 (m, 12H), 3,40~4,20 (m, 4H), 4,42 (dd, 1H), 4,52 (dd, 1H), 4,92 (dd, 1H), 5,88 (d, 1H).

Eksempel 13

15 Fremstilling av metyl-5-acetamido-7-[6'-(3"-hydroksykarbonylpropionyl)-aminoheksyl]-karbamoyloksy-4-guanidino-8,9-monokarbonyldioksy-2,3,4,5-tetradeksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (32)

Til en oppløsning av metyl-5-acetamido-7-(6'-aminoheksyl)-karbamoyloksy-4-guanidino-8,9-monokarbonyldioksy-2,3,4,5-tetradeksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonat-trifluoracetat (18) (100 mg, 0,159 mmol) i vannfri pyridin (2,5 ml), ble det tilsatt dimetylaminopyridin (24 mg, 0,195 mmol) og ravsyreanhydrid (19,5 mg, 0,195 mmol). Blandingen ble omrørt under argon ved 45 °C i 20 timer og deretter vakuuminndampet for å fjerne pyridin. Resten ble oppløst i metanol (10 ml) og surgjort til pH 2 med 2 N HCl, og deretter ble den sure løsning inndampet til tørrhet. Den resulterende rest ble underkastet flashkromatografi (først etylacetat/metanol = 10/1, deretter etylacetat/2-propanol/vann = 5/2/1, kiselgel) for å gi forbindelse (32) (40 mg, 40 %).

MS (FAB) 615 (M+1)⁺

¹H-nmr (CD₃OD) δ (ppm)

1,25~1,62 (m, 8H), 1,93 (s, 3H), 2,48 (AB, 4H), 2,95~3,21 (m, 4H), 3,80 (s, 3H), 4,10~4,30 (m, 1H), 4,50~4,80 (m, 3H), 5,0~5,25 (m, 2H), 5,59 (dd, 1H), 5,92 (dd, 1H).

Eksempel 14Bestemmelse av binding av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse til influensavirus

To influenza A-virusstammer og ett influenza B-virus ble anvendt for å teste forbindelsenes evne til å bindes til komplett influensavirus-neuraminidase. Influenza A-stammene var NWS/G70 C og NWS/Tokyo og influenza B-stammen var B/Vic/02/87. Neuraminidaseanalysen ble utført i overensstemmelse med en publisert prosedyre (Potier, M. et al., Anal. Biochem., 1979 94 287), og de målte inhiberingskonstanter (IC_{50}) er oppsummert i tabell 3.

Tabell 3

Bindingskonstanter (M) for binding av influensa-virusforbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse

Forbindelse nr.	NWS/Tokyo	NWS/G70C	B/Vic/02/87
8	4×10^{-8}	1×10^{-8}	7×10^{-8}
11	2×10^{-8}	2×10^{-8}	ikke utført
13	2×10^{-8}	2×10^{-8}	8×10^{-8}
17	2×10^{-8}	2×10^{-8}	5×10^{-7}
19	1×10^{-8}	5×10^{-9}	2×10^{-8}
20	1×10^{-5}	1×10^{-5}	ikke utført
21	4×10^{-8}	2×10^{-8}	1×10^{-7}
22	3×10^{-8}	5×10^{-9}	5×10^{-8}
23	2×10^{-8}	5×10^{-9}	6×10^{-8}
25	5×10^{-8}	4×10^{-8}	1×10^{-7}
26	2×10^{-8}	2×10^{-8}	4×10^{-8}
DANA	4×10^{-5}	1×10^{-5}	2×10^{-5}
GG167 (I)	1×10^{-9}	1×10^{-9}	3×10^{-9}

Eksempel 15Innfangelse av influensavirus på avidinbelagte ELISA-brønner ved anvendelse av forbindelse nr. 21

En 96-brønners ELISA-plate ble belagt over natten med
5 en avidinløsning (Sigma) ($10 \mu\text{g/ml}$). Platebrønnene ble deretter blokkert med en PBS (fosfatbufret saltløsning)-Tween 20-oppløsning. Forbindelse nr. 21 ble tilsatt i en mengde på 1 og $10 \mu\text{m}$ til alle brønner i hver to rekker nedover platen. Forbindelse nr. 8 (kontroll) ble tilsatt en mengde på $10 \mu\text{m}$ til
10 alle brønner i en annen rekke. Etter inkubasjon i én time ved romtemperatur ble ubundet konjugat fjernet og platene ble vasket i PBS-Tween 20. NWS/70C-influensa A-virus (H1N9-under-type) ble tilsatt, med start fra $2,5 \times 10^6$ viruspartikler i den første brønn (ekvivalent med 5×10^7 pfu/ml), og fortynning i
15 dobbelte seriefortynninger over platen. Viruset ble inkubert i ca. 30 minutter og ubundet virus ble fjernet ved vask. Bundet virus ble omsatt med et polyklonalt kanin-antihemagglutinin-antistoff og deretter ble det bundne antihemagglutinin-antistoff påvist med et sau-anti-kanin-antistoff-pepperrotper-
20 oksidase (Ab-HRPO)-konjugat, under vasking ved hvert trinn. Virusbundet Ab-HRPO ble påvist ved tilsetning av ABTS (Sigma) i form av HRPO-substratet og inkubasjon i ca. 30 minutter.

Begge konsentrasjoner (1 og $10 \mu\text{m}$) av forbindelse nr. 21 ga lignende resultater; et sterkt absorpsjonssignal ved den
25 høyeste viruskonsentrasjon og deretter et minskende signal med virusoppfinning, hvilket således klart viser innfangelse av virus og påvisning ned til $1,6 \times 10^5$ pfu pr. test. I motsetning til dette viste den ikke-biotinylerte kontrollforbindelse nr. 8 kun en svak, uforanderlig absorpsjon ved alle viruskonsen-
30 trasjoner.

Eksempel 16Påvisning av influensavirus på ELISA-plater ved anvendelse av forbindelse nr. 21

35 Med start med en virusløsning på ca. 1×10^8 pfu/ml ble dobbelte seriefortynninger av NWS/G70C-influensa A-virus i PBS tilsatt direkte til en ELISA (Dynatech)-plate og tillatt å bindes ved henstand over natten (alle ELISA-brønnene inneholdt $50 \mu\text{l}$). Etter vask ble platene blokkert med PBS-Tween 20 og

forbindelse nr. 21 ble deretter tilsatt i en mengde på 1 og 10 μM til to separate rader, og kontrollforbindelse nr. 8 ble tilsatt i en mengde på 10 μM til en annen rad. Etter inkubasjon i én time ble platene vasket for å fjerne ubundet forbindelse, og viruset ble deretter påvist med streptavidin-HRP
5 (Boehringer-Mannheim), også her ved anvendelse av ABTS som kromogent substrat med inkubasjon på ca. 30 minutter.

Begge konsentrasjoner av forbindelse nr. 21 tillot påvisning av viruset og ga en økende sterk absorpsjon
10 parallelt med økende viruskonsentrasjon. Minimum ca. 10^5 viruspartikler pr. brønn kunne lett påvises med forbindelse nr. 21. I motsetning til dette ga ikke-biotin-kontrollforbindelse nr. 8 intet signal ved noen konsentrasjon av viruset.

15 Eksempel 17

Innfangelse og påvisning av et kompleks mellom influensavirus og forbindelse nr. 21

For å tillate belegging av viruspartikler med GG167-biotinderivatet ble 10, 2,5 og 0,625 μl av en løsning av
20 NWS/G70C-influensa A-virus (1×10^8 pfu/ml) preinkubert i én time i hver brønn på separate rader på ELISA-plate. Halvlog₁₀-fortynninger av forbindelse nr. 21 ble tilsatt, med start fra 1 μM og reduksjon ned til 0,00001 μM . Kompleksene virusforbindelse ble deretter overført til en ELISA-plate som var
25 forhåndsbelagt med avidin (som i eksempel 15) og inkubert i én time for å tillate innfangelse. Platene ble vasket i PBS-Tween 20 og innfanget virus ble påvist med et polyklonalt kanin-antistoff rettet mot virus-hemagglutinin (som i eksempel 15).

30 Det beste resultat ble funnet med en 0,01 μM konsentrasjon av forbindelse nr. 21, hvilket klart tillot påvisning av virus ned til $0,625 \times 10^5$ pfu. Ved høyere konsentrasjoner av forbindelsen var signalet svakere, antakeligvis på grunn av at den frie forbindelse nr. 21 blokkerte noen avidinseter, mens
35 ved lavere konsentrasjoner ($< 0,0001 \mu\text{M}$) var påvisningssignalet også svakere, antakeligvis på grunn av at det var utilstrekkelig mengde forbindelse til fullt ut å bindes til alle viruspartiklene.

Direkte påvisning av bundet virus med streptavidin-HRPO ble også funnet mulig, selv om det var et lavere signalnivå i dette tilfelle.

5 Eksempel 18

Innfangelse og påvisning av et kompleks mellom influensavirus og forbindelse nr. 26

Ved å følge den samme prosedyre som er vist i eksempel 17, men ved anvendelse av GG167-derivatforbindelse nr. 26, ble det funnet at de to undertyper av influensa A, NWS/670C og NWS/Tokyo (H1N2) begge lett ble påvist når de var til stede i en mengde av $2,5 \times 10^5$ pfu/brønn. Konsentrasjonene av den testede forbindelse nr. 26 var fra 0,001 nM til 10 μ M; de beste resultater ble oppnådd ved 0,1 μ M for begge virus-
15 undertyper.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for påvisning av influensavirus,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at en prøve som mistenkes
for å omfatte viruset eksponeres for en forbindelse (neuramin-
idasebinder) som er i stand til å bindes spesifikt til det aktive
sete på influensavirus-neuraminidase, men som ikke avspaltes av
neuraminidase.
10
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at neuraminidasebinderen
er festet til et støttemateriale slik at viruspartiklene vil
bli selektivt innfanget og konsentrert når en prøve passerer
15 over, eller gjennom, støttematerialet.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at neuraminidasebinderen
er festet via en spacergruppe til en overflate, idet spacer-
20 gruppen ender i en funksjonalitet som er i stand til å bindes
til overflaten.
4. Fremgangsmåte ifølge krav 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den terminale funksjon-
25 alitet er en biotinyllgruppe og overflaten er belagt med
avidin, streptavidin eller et antistoff rettet mot biotin,
eller at den terminale funksjonalitet er en aminogruppe og
overflaten omfatter karboksygrupper.
- 30 5. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at neuraminidasebinderen
er festet til en påvisbar markør som er kovalent koblet til
neuraminidasebinderen.
- 35 6. Fremgangsmåte ifølge krav 5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at viruspartiklene i en
prøve eksponeres for en neuraminidasebinder koblet til en
påvisbar markør, under betingelser slik at binderen selektivt
bindes til virusneuraminidasen på overflaten av viruspartiklen.

7. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 5,
karakterisert ved at viruset innfanges og
konsentreres selektivt.

5

8. Fremgangsmåte ifølge krav 7,
karakterisert ved trinnene:

a) eksponering av prøven for en neuraminidasebinder
bundet til et støttemateriale, og

10 b) eksponering av influensaviruspartikler bibeholdt
på støttematerialet for en neuraminidasebinder bundet til en
påvisbar markør.

9. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
15 karakterisert ved at neuraminidasebinderen
har en IC_{50} for binding lavere enn 10^{-6} M.

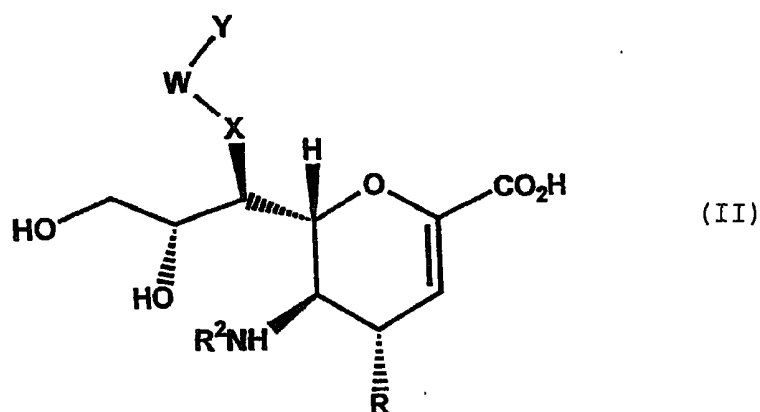
10. Neuraminidasebinder,
karakterisert ved at den omfatter en analog
20 av neuraminsyre (sialinsyre) substituert på C_7 eller en
ekvivalent posisjon med en spacergruppe som er egnet for
kobling til en påvisbar markør, eller på en overflate, idet
analogen ikke omfatter en påvisbar markør eller en
spacergruppe som spaltes av neuraminidase.

25

11. Neuraminidasebinder ifølge krav 10,
karakterisert ved at analogen av neuramin-
syre er en forbindelse med formel (II):

30

35

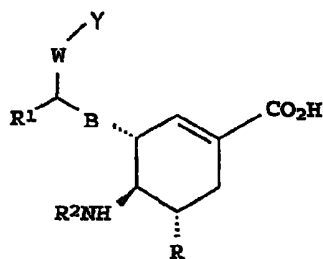


hvor

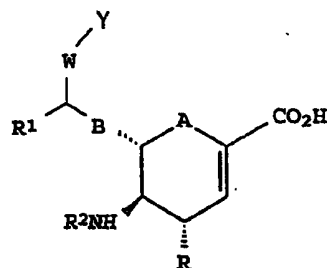
- R betegner en azidogruppe, en usubstituert eller substituert guanidinogruppe eller en usubstituert eller substituert aminogruppe;
- 5 R² betegner COCH₃, COCF₃ eller SO₂CH₃;
- X betegner O eller NH;
- W betegner en spacergruppe dannet av en kjede av atomer med en total lengde mellom 4 og 100 atomer, og eventuelt også omfattende substituerte karbon- og/eller nitrogenatomer og eventuelt inkludert oksygen- og/eller svovelatomer;
- 10 Y betegner OH, SH, NH₂, CH=O, CH=CH₂, CO₂H, CONHNH₂ eller NH-biotinyl, eller en beskyttet form av én av disse endefunksjonaliteter;
- 15 og hvori substituenten på amino- eller guanidinogruppen, når til stede, er en substituert eller usubstituert C₁₋₆-alkylgruppe, eller en amino-, hydroksy-, cyano- eller alkoksykarbonylgruppe;
- med det forbehold at X-W-Y ikke inkluderer gruppen
- 20 OC(=Z)NR⁵R⁶, hvori Z betegner O eller S og R⁵ og R⁶ uavhengig av hverandre betegner H eller en hydrokarbongruppe som eventuelt er substituert med NH₂, OH eller SH.

12. Neuraminidasebinder ifølge krav 11,
- 25 k a r a k t e r i s e r t v e d at X-W-Y-gruppen festet i 7-posisjonen er et terminalt funksjonalisert N-substituert alkylkarbamat.

13. Neuraminidasebinder ifølge krav 10,
- 30 k a r a k t e r i s e r t v e d at analogen av neuraminsyre er en forbindelse med formel (IIA) eller (IIB)



(IIA)



(IIB)

hvor R , R^2 , W og Y er som definert for formel (II) i krav 11, A og B er oksygen eller CH_2 , eller kan betegne en enkeltbinding, og R_1 er en lipofil C_1 - C_{12} -alkylgruppe som eventuelt er substituert med ett eller flere halogenatomer, sykloalkyl-, alkoksy-,
 5 halogenalkoksy- eller eventuelt substituerte arylgrupper.

14. Neuraminidasebinder ifølge krav 13,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at spacergruppen W er
 utvalgt fra lineære peptider; oligosakkarider; polyoler; poly-
 10 etylenglykolgrupper; og hydrokarbongrupper bundet sammen med
 oksygen- eller svovelatomer eller med karbonyl-, amido-, urea-
 eller hydrazidfunksjonaliteter eller kombinasjoner av disse
 grupper.

15. Neuraminidasebinder ifølge ethvert av kravene 11 til
 14,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at den beskyttende gruppe
 for endefunksjonaliteten Y er utvalgt fra gruppen bestående av
 estere av OH -, SH - og CO_2H -gruppene, karbamater av NH_2 - og
 20 $CONHNH_2$ -gruppene og acetalder av $CH=O$ -gruppen.

16. Neuraminidasebinder ifølge krav 11,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at R er guanidino og R^2 er
 acetyl og/eller at X er O og Y er NH_2 eller NH -biotinyl.
 25

17. Neuraminidasebinder ifølge ethvert av kravene 11 og
 16,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at W er en spacergruppe
 utvalgt $CONH(CH_2)_n$, $CONH(CH_2)_nNHCONH(CH_2)_m$,
 30 $CONH(CH_2)_n[NHCO(CH_2)_5]_m$, $CO(CH_2)_n$, $CO(CH_2)_nNHCONH(CH_2)_m$,
 $CO(CH_2)_nNHCO(CH_2)_q$, $CONH(CH_2)_nNH(COCH_2NH)_qCOCH_2$;
 $CONH(CH_2CH_2O)_nCH_2NHCO(CH_2)_q$ og $CONH(CH_2)_nNHCO(CH_2)_q$, hvor n og m
 er hele tall mellom 2 og 12 og q er 0 eller et helt tall
 mellom 1 og 12.

18. Neuraminidasebinder ifølge ethvert av kravene 10 til
 14,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at den har en IC_{50} lavere
 enn 10^{-6} M, fortrinnsvis lavere enn 10^{-8} M.
 35

19. Neuraminidasebinder ifølge ethvert av kravene 10 til 13, karakterisert ved at den er utvalgt fra forbindelsene ifølge tabell 1 unntatt forbindelse 11, fortrinnsvis

5-acetamido-7-(6'-biotinylamino-triglysinamido-heksyl)-karbamoyloksy-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre (21),

10 5-acetamido-7-(6'-(6''-(6'''-aminokaproyl)-triaminokaproyl)-aminoheksyl)-karbamoyloksy-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre (25),

15 5-acetamido-7-{6'-[6''-(6'''-biotinylaminokaproyl)-triaminokaproyl]-aminoheksyl}-karbamoyloksy-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre (26), og

5-acetamido-7-{6'-[6''-(6'''-hydrazidosuksinylaminokaproyl)-triaminokaproyl]-aminoheksyl}-karbamoyloksy-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glysero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre (30).

20. Neuraminidasebinder ifølge ethvert av kravene 10 til 19, karakterisert ved at den er kovalent bundet til en påvisbar markør.

21. Neuraminidasebinder ifølge krav 20, karakterisert ved at den påvisbare markør er en epitop egnet for anvendelse i et antistoffpåvisningssett, i en optisk analyseanordning med en aktiv mottakeroverflate, eller i et agglutineringspåvisningssystem.

22. Neuraminidasebinder ifølge krav 10 som er bundet til en påvisbar markør, karakterisert ved at neuraminidasebinderen er (3R,4R,5S)-4-acetamido-5-amino-3-(1-etylpropoksy)-1-sykloheksen-1-karboksylsyre (GS4071).

23. Diagnostisk preparat, karakterisert ved at det omfatter en for-

bindelse ifølge ethvert av kravene 10 til 22 sammen med en diagnostisk egnet bærer.