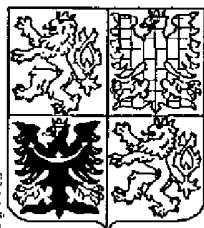


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 28.02.94
(32) 03.03.93
(31) 93/025540
(33) US
(40) 14.02.96

(21) 2242-95

(13) A3

6(51)

C 07 K 5/103
C 07 K 7/06
A 61 K 38/07
A 61 K 38/08
A 61 K 7/00

(71) BIO-MEGA/BOEHRINGER INGELHEIM RESEARCH
INC., Quebec, CA;

(72) Deziel Robert, Quebec, CA;
Moss Neil, Quebec, CA;

(54) **Peptid, farmaceutický prostředek a kosmetický
prostředek s obsahem peptidu a způsob výroby
peptidu**

(57) Vynález předkládá peptidové deriváty o vzorci A-B-D-
NHCH/CH₂C(O)R¹/C(O)NHCH/CR²(R³)C(O)OH/C(O)-
E, kde A je nižší alkynoyl, nesoucí dva substituenty a každý
ze substituentů je nezávisle zvolený z fenylu a monosubsti-
tuovaného fenylu, jehož substituent je alkyl, halový radikál,
hydroxyl a nižší alkoxy; B je zbytek N-methylaminokyseliny;
D je zbytek aminokyseliny; R¹ je alkyl, cykloalkyl,
mono nebo disubstituovaná aminoskupina; R² je vodíkový
atom nebo alkyl a R³ je alkyl, nebo jsou R² a R³ spojeny a
tvoří cykloalkyl; a E je koncová jednotka, například alkyla-
minoskupina nebo jednomocný aminokyselinový radikál
jako NHCH(alkyl)C(O)OH. Deriváty jsou použitelné k
léčbě herpetických infekcí.

Peptid, farmaceutický prostředek a kosmetický prostředek s obsahem peptidu a způsob výroby peptidu.

Oblast techniky

Vynález se týká peptidových derivátů s antivirovými účinky a prostředků k využití derivátů k léčbě virových onemocnění. Přesněji se vynález týká peptidových derivátů (zde nazývaných "peptidy"), které jsou aktivní vůči herpetickým virům (virům oparu), farmaceutických prostředků, obsahujících peptidy a způsobů použití peptidů k inhibování replikace herpetického viru a k léčbě herpetických infekcí.

Dosavadní stav techniky

Herpetické viry působí širokou škálu onemocnění lidí i zvířat. Například viry Herpes simplex, typy 1 a 2, (HSV-1 a HSV-2) jsou zodpovědné za opar na rtech a genitální leze, viry Varicella zoster (VZV) působí kuřecí mor a pásový opar, a virus Epstein-Barr (EBV) vyvolává infekční mononukleózu.

V průběhu posledních dvou dekad si při hledání látek k léčbě herpetických infekcí získaly největší pozornost výzkumných pracovníků analogy purinových a pyrimidinových nukleosidů. Výsledkem bylo rozvinutí několika nukleosidových analogů do podoby protivirových činidel. Současně nejúspěšnější je acyklovir, který je doporučovaným činidlem pro léčbu genitálních infekcí, působených virem Herpes simplex.

I přes některé významné výhody však přetrvává potřeba účinných, bezpečných léčebných látek k léčbě herpetických virových infekcí. Přehled současných léčebných látek z této oblasti uvádí M.C. Nahata v článku "Antiviral drugs": Pharmacokinetics, Adverse Effects and Therapeutic Use", J. Pharm. Technol. 3, 100, 1987.

Tato přihláška předkládá skupinu peptidových derivátů, vykazujících aktivitu vůči herpetickým virům. Selektivní účinek těchto peptidů vůči herpetickým virům, spojený s širokým rozpětím bezpečnosti, předurčuje tyto peptidy jako žádoucí látky k boji s herpetickými infekcemi.

Následující odkazy předkládají peptidy nebo peptidové deriváty , spojované s protitherpetickým působením:

- B.M. Dutia se spol., Nature 321, 439 1986,
E.A. Cohen se spol., Nature 321, 441, 1986,
J.H. Shubak-Sharpe se spol., UK patentová přihláška 2185024, uveřejněná 8. 7. 1987,
P. Gaudreau se spol., J. Biol. Chem. 262, 12413, 1987,
E.A. Cohen se spol., US patent 4 795 740, 3. 1. 1989,
R. Freidinger se spol., US patent 4 814 432, 21. 3. 1989,
V.M. Garskey se spol., US patent 4 837 304, 6. 6. 1989,
R. Colonno se spol., US patent 4 845 195, 4. 7. 1989,
P. Gaudreau se spol., J. Med. Chem. 33, 723, 1990,
J. Adams se spol., Evropská patentová přihláška 408 973, uveřejněná 23. 1. 1991,
P.L. Beaulieu se spol., Evropská patentová přihláška 411 332, uveřejněná 6. 2. 1991,
J. Adams se spol., Evropská patentová přihláška 411 333, uveřejněná 6. 2. 1991,
J. Adams se spol., Evropská patentová přihláška 411 334, uveřejněná 6. 2. 1991,
R.L. Tolman se spol., Evropská patentová přihláška 412 595, uveřejněná 13. 2. 1991,
W.T. Ashton se spol., Evropská patentová přihláška 438 873, uveřejněná 31. 7. 1991,
P.L. Beaulieu se spol., Evropská patentová přihláška 461 546, uveřejněná 18. 12. 1991,
P. Gaudreau se spol., J. Med. Chem. 35, 346, 1992,

R. Déziel a Y. Guindon, Kanadská patentová přihláška 2 033 488, zveřejněná 1. 7. 1992,

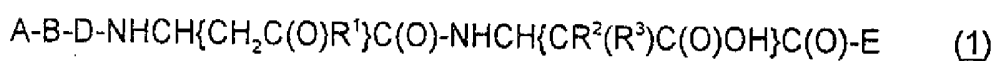
L.L. Chang se spol., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2, 1207, 1992.

Peptidy, které jsou předmětem výše uvedených prací, je možné od peptidů podle předkládané přihlášky odlišit na základě charakteristických strukturních a biologických rozdílů.

Zkratky a symboly, užívané v této přihlášce jsou uvedeny v oddílu "Podstata vynálezu".

Podstata vynálezu

Peptidy podle vynálezu jsou vyjádřeny vzorcem 1



kde

A je dvojnásobně substituovaný nižší alkanoyl, kde každý ze substituentů je nezávisle zvolen ze skupiny, skládající se z fenylu a jednonásobně substituovaného fenylu, jehož substituent je zvolen ze skupiny, zahrnující nižší alkyl, halový radikál, hydroxyl a nižší alkoxy;

B je $N(CH_3)CHR^4C(O)$, kde R^4 je nižší alkyl; D je $NH-CHR^5C(O)$, kde R^5 je nižší alkyl nebo nižší alkyl, substituovaný jednou karboxylovou skupinou, hydroxylovou skupinou, merkaptoskupinou nebo benzyloxyskupinou;

R^1 je nižší alkyl, nižší cykloalkyl, $\{1-(\text{nižší alkyl})-(\text{nižší cykloalkyl})\}$, nebo NR^6R^7 , kde R^6 je vodík nebo nižší alkyl a R^7 je nižší alkyl, nebo R^6 a R^7 společně s dusíkovým atomem, na který jsou připojeny, tvoří pyrrolidinovou, piperidinovou, morfolinovou nebo 4-methylpiperazinovou skupinu;

R^2 je vodík nebo nižší alkyl a R^3 je nižší alkyl, nebo R^2 a R^3 společně s uhlíkovým atomem, na který jsou připojeny, tvoří nižší cykloalkyl; a E je NHR^8 , kde R^8 je C_{4-9} alkyl; nižší cykloalkyl; nižší cykloalkyl, substituovaný jednonásobně nebo

dvojnásobně nižším alkylem nebo substituentem (nižší alkyl)-(nižší cykloalkyl); nebo E je $\text{NHCH}(\text{R}^9)\text{-Z}$, kde R^9 je C_{4-9} alkyl, nižší cykloalkyl nebo (nižší cykloalkyl)-(nižší alkyl) a Z je CH_2OH , $\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ nebo $\text{C}(\text{O})\text{OR}^{10}$, kde R^{10} je nižší alkyl; nebo jde o terapeuticky přijatelnou sůl takové látky.

Upřednostňovaná skupina peptidů podle tohoto vynálezu je představována vzorcem 1, kde A je nižší alkanoyl, dvojnásobně substituovaný fenylem, 4-(nižší alkyl)fenylem, 4-halofenylem nebo 4-(nižší alkoxy)fenylem; B je (N-Me)Val, (N-Me)Ile nebo (N-Me)Tbg; D je aminokyselinový zbytek kyseliny (S)-2-amino-3-hydroxy-3-methylmáselné nebo kyseliny (R)-2-amino-3-merkapt-3-methylmáselné, nebo aminokyselinový zbytek, zvolený z Val, Ile a Tbg;

R^1 je nižší alkyl, nižší cykloalkyl, $\{1\text{-(nižší alkyl)-(nižší cykloalkyl)}\}$, N,N-dimethylaminová skupina, N,N-diethylaminová skupina, pyrrolidinová nebo morfolinová skupina; R^2 a R^3 odpovídají dříve uvedené definici; a E je NHR^8 , kde R^8 je C_{4-9} alkyl; nižší cykloalkyl, nižší cykloalkyl, jednonásobně nebo dvojnásobně substituovaný nižším alkylem; nebo substituent (nižší alkyl)-(nižší cykloalkyl); nebo E je $\text{NHCH}(\text{R}^9)\text{-Z}$, kde R^9 je C_{4-9} alkyl nebo (nižší cykloalkyl)methyl a Z odpovídá dříve uvedené definici; nebo jde o terapeuticky přijatelnou sůl takové látky.

Preferovanější skupina peptidů je představována vzorcem 1, kde A je 2-(fenylmethyl)-3-fenylpropionyl, 2-[(4-fluorofenyl)-methyl]-3-(4-fluorofenyl)-propionyl, 2-[(4-methoxyfenyl)methyl]-3-fenylpropionyl nebo 2-[(4-methoxyfenyl)-methyl]-3-(4-methoxyfenyl)propionyl; B je (N-Me)-Val nebo (N-Me)-Ile; D je Val, Ile nebo Tbg; R^1 je 1-methylethyl, 1,1-dimethylethyl, 1,1-dimethylpropyl, cyklobutyl, cyklopentyl, cyklohexyl, 1-methylcyklopentyl, N,N-dimethylaminoskupina, N,N-diethylaminoskupina, pyrrolidinová nebo morfolinová skupina; R^2 je vodík a R^3 je methyl, ethyl, 1-methylethyl, 1,1-dimethylethyl nebo propyl, a uhlíkový atom, nesoucí R^2 a R^3 je v konfiguraci (R), nebo jsou R^2 a R^3 každý nezávisle methyl nebo ethyl, nebo R^2 a R^3 tvoří společně s uhlíkovým atomem, na který jsou navázány, cyklobutyl, cyklopentyl nebo cyklohexyl; a E je NHR^8 , kde R^8 je 2,2-dimethylpropyl,

1(R),2,2-trimethylpropyl, 1(R)-ethyl-2,2-dimethylpropyl, 2,2-dimethylbutyl, 3,3-dimethylbutyl, 1(R),2,2-trimethylbutyl, 1(R),3,3-trimethylbutyl, 1(R)-ethyl-3,3-dimethyl, nebo cyklohexylmethyl; nebo E je $\text{NHCH(R}^9\text{)-Z}$, kde uhlíkový atom, nesoucí R^9 , je v konfiguraci (S), R^9 je 1,1-dimethylethyl, 1-methylpropyl, 2-methylpropyl, 2,2-dimethylpropyl nebo cyklohexylmethyl a Z je CH_2OH , C(O)OH , C(O)NH_2 nebo C(O)OR^{10} , kde R^{10} je methyl, ethyl, nebo propyl; nebo se jedná o terapeuticky přijatelnou sůl takové látky.

Nejpreferovanější skupina peptidů je představována vzorcem 1, kde A je 2-(fenylmethyl)-3-fenylpropionyl; B je (N-Me)Val; D je Tbg; R^1 je 1-methylethyl, 1,1-dimethylethyl, 1-methylpropyl, 1,1-dimethylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, cyklobutyl, cyklopentyl, cyklohexyl, 1-methylcyklopentyl, pyrrolidinová nebo morfolinová skupina; R^2 je vodík a R^3 je methyl, ethyl, 1-methylethyl nebo propyl, a uhlíkový atom, nesoucí R^2 a R^3 , je v konfiguraci (R), nebo R^2 a R^3 je každý nezávisle methyl nebo ethyl, nebo R^2 a R^3 dohromady s uhlíkovým atomem, na který jsou navázány, tvoří cyklobutyl, cyklopentyl či cyklohexyl; a E je NHR^8 , kde R^8 je 2,2-dimethylpropyl, 1(R),2,2-trimethylpropyl, 1(R)-ethyl-2,2-dimethylpropyl, 2,2-dimethylbutyl nebo 1(R)-ethyl-3,3-dimethylbutyl, nebo E je $\text{NHCH(R}^9\text{)-Z}$, kde uhlíkový atom, nesoucí R^9 , je v konfiguraci (S), R^9 je 2,2-dimethylpropyl a Z je CH_2OH , C(O)OH , C(O)NH_2 nebo C(O)OR^{10} , kde R^{10} je methyl, ethyl, nebo propyl; nebo jde o terapeuticky přijatelnou sůl takových látek.

Do rozsahu tohoto vynálezu je zahrnut farmaceutický prostředek, obsahující vzhledem k viru Herpes protivirově účinné množství peptidu o vzorci 1, nebo jeho terapeuticky přijatelné sole, a farmaceuticky nebo veterinárně přijatelný nosič.

V rozsahu tohoto vynálezu je zahrnut také kosmetický prostředek, obsahující peptid o vzorci 1, nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl, a fyziologicky přijatelný nosič, vhodný k místnímu nanášení.

Důležitým aspektem vynálezu je způsob léčby herpetických virových infekcí

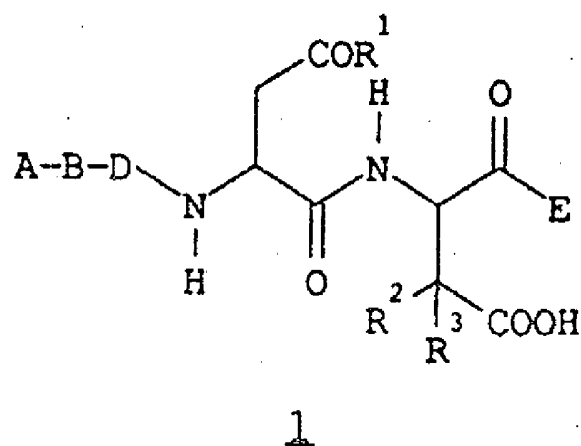
u savců, který představuje podávání vzhledem k viru Herpes protivirově účinného množství peptidu o vzorci 1, nebo jeho terapeuticky přijatelné sole, savcům.

Jiný důležitý aspekt zahrnuje způsob inhibování replikace herpetického viru, při němž je virus uveden do kontaktu s takovým množstvím peptidu o vzorci 1, nebo jeho terapeuticky přijatelné sole, které inhibuje ribonukleotidreduktázu herpetického viru.

Ještě další aspekt zahrnuje způsob léčby herpetických virových infekcí u savců, při němž se jim podává vzhledem k viru Herpes protivirově účinné množství kombinace peptidu o vzorci 1, nebo jeho terapeuticky přijatelné sole, a protivirového nukleosidového analogu. Do rozsahu vynálezu spadá rovněž farmaceutický prostředek, obsahující tuto kombinaci.

Způsoby výroby peptidů o vzorci 1 jsou popsány následovně.

Vzorec 1 může být jiným způsobem znázorněn jako:



Výraz "zbytek" ve vztahu k aminokyselině nebo derivátu aminokyseliny označuje radikál, odvozený od odpovídající α -aminokyseliny eliminací hydroxylu karboxylové skupiny a jednoho vodíkového atomu α -aminoskupiny.

Zkratky, používané zde k označení aminokyselin a chránících skupin,

obecně odpovídají doporučením Komise pro biochemického názvosloví IUPAC- IUB, (IUPAC-IUB Commision of Biochemical Nomenclature), viz European Journal of Biochemistry 138, 9, 1984. Například Val, Ile, Asp a Leu představují zbytky L-valinu, L-isoleucinu, kyseliny L-asparagové a L-leucinu.

Asymetrické uhlíkové atomy, umístěné v hlavních přímých osách (tj. v hlavním řetězci, páteři) peptidů o vzorci 1, nepočítaje v to koncové skupiny A a Z (z E), ale včetně uhlíkového atomu nesoucího " R^9 ", pokud E je $NHCH(R^9)-Z$ jak bylo dříve uvedeno, mají konfiguraci S.

Asymetrické uhlíkové atomy, umístěné ve vedlejším řetězci aminokyseliny nebo odvozeného aminokyselinového zbytku, v koncové skupině A, a v koncové skupině E, pokud E představuje NHR^9 jak bylo dříve definováno, mohou mít konfiguraci S nebo R.

Označení "Tbg" představuje aminokyselinový zbytek kyseliny (S)-2-amino-3,3-dimethylbutanové. Označení " γ MeLeu" představuje aminokyselinový zbytek kyseliny (S)-2-amino-4,4-dimethylpentanové. Označení " γ MeLeucinol" představuje (S)-2-amino-4,4-dimethylpentanol s jedním vodíkovým atomem odestraněným z α -aminoskupiny.

Dalšími, zde používanými označeními, jsou: (N-Me)Val pro zbytek kyseliny (S)-3-methyl-2-(methylamino)-butanové; (N-Me)Ile pro zbytek kyseliny (S)-3-methyl-2-(methylamino)-pentanové; (N-Me)Tbg pro zbytek kyseliny (S)-2-(methylamino)-3,3-dimethylbutanové; Asp(cyBu) pro zbytek kyseliny (S)- α -amino-1-karboxycyklobutanocové; Asp(cyPn) pro zbytek kyseliny (S)- α -amino-1-karboxycyklopentanocové a Asp{(R)-Me} pro zbytek kyseliny 3-(R)-methyl-L-asparagové (tj. {S-(R*,S*)}-2-amino-3-methylbutandiové kyseliny).

Výraz "halový", jak je zde používán, znamená halový radikál, zvolený z bromového, chlorového, fluorového nebo iodového radikálu.

Výraz "nižší alkanoyl", jak je zde používán, označuje 1-oxoalkyl s rovným řetězcem, obsahující dva až šest uhlíkových atomů, nebo 1-oxoalkyl s větveným řetězcem, obsahující dva až šest uhlíkových atomů; například acetyl, propionyl(1-oxopropyl) a 2-methyl-1-oxopropyl.

Výraz " C_{4-9} alkyl", jak je zde používán, označuje alkylové radikály s rovným nebo větveným řetězcem, obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů, a zahrnuje například 1-methylpropyl, 2-methylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, 1,2,2-trimethylpropyl, 3,3-dimethylbutyl, 1-ethyl-2,2-dimethylbutyl a 4,4-dimethylpentyl.

Výraz "nižší alkyl", jak je zde používán, buď samotný nebo v kombinaci s jiným radikálem, označuje alkylové radikály s rovným řetězcem, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a alkylové radikály s větveným řetězcem, obsahující 3 až 6 uhlíkových atomů a zahrnuje methyl, ethyl, propyl, butyl, hexyl, 1-methylethyl, 1-methylpropyl, 2-methylpropyl a 1,1-dimethylethyl.

Výraz "{1-(nižší alkyl)-(nižší cykloalkyl)}", jak je zde používán, označuje nižší cykloalkylový radikál, nesoucí nižší alkylový substituent v poloze 1; například 1-ethylcyklopropyl, 1-propylcyklopentyl a 1-propylcyklohexyl.

Výraz "nižší cykloalkyl", jak je zde používán, buď samotný nebo v kombinaci s jiným radikálem, buď samotný nebo v kombinaci s jiným radikálem, označuje nasycené cyklické uhlovodíkové radikály, obsahující tři až šest uhlíkových atomů a zahrnuje cyklopropyl, cyklobutyl, cyklopentyl a cyklohexyl.

Výraz "nižší alkoxy", jak je zde používán, označuje alkoxylové radikály s rovným řetězcem, obsahující jeden až čtyři atomy uhlíku a alkoxylové radikály s větveným řetězcem, obsahující tři až čtyři atomy uhlíku, a zahrnuje methoxylový, ethoxylový, propoxylový, 1-methylethoxylový, butoxylový a 1,1-dimethylethoxylový radikál. Posledně uvedený radikál je obecně známý jako terciární butoxyl.

Výraz "farmaceuticky přijatelný nosič" nebo "veterinárně přijatelný nosič", jak je zde používán, označuje netoxické, obecně inertní pojídlo (vehikulum) aktivní přísady, které přísadu zpětně neovlivňuje.

Výraz "fyziologicky přijatelný nosič", jak je zde používán, označuje přijatelné kosmetické pojídlo (vehikulum) o jedné nebo více netoxických pomocných látkách, které nesnižují účinnost aktivní přísady obsažené v pojídle, ani s ní nereagují.

Výraz "veterinárně přijatelný nosič", jak je zde používán, označuje fyziologicky přijatelné pojídlo (vehikulum) pro podávání léčebných látek domácím zvířatům, které obsahuje jednu nebo více netoxických pomocných látek, které nesnižují účinnost aktivní přísady obsažené v pojídle, ani s ní nereagují.

Výraz "účinné množství" označuje předem stanovené protivirově působící množství protivirového činidla, tj. množství činidla, dostačující k tomu, aby bylo činidlo účinné vůči virovým organismům *in vitro*.

Výraz "kopulační činidlo", jak je zde používán, označuje činidlo schopné uskutečnit navázání volné karboxylové skupiny aminokyseliny nebo peptidu na volnou aminoskupinou jiné aminokyseliny nebo peptidu za uvolnění vody a vzniku amidové vazby mezi reagujícími látkami. Podobně může takové činidlo uskutečnit vazbu mezi kyselinou a alkoholem za vzniku odpovídajících esterů. Činidla umožňují nebo usnadňují dehydratační navázání aktivací karboxylové skupiny. Popisy takových kopulačních činidel a aktivovaných skupin jsou obsaženy v obecných učebnicích chemie peptidů; například v knize E. Schrödera a K.L. Lübkeho "The Peptides", díl 1, Academic Press, New York, N. Y., z roku 1965, str. 2-128, a v knize K. D. Koppleho "Peptides and Amino acids", vyd. W. A. Benjamin, Inc., New York, N.Y., 1966, str. 33-51. K příkladům kopulačních činidel patří difenylfosforylazid, 1,1'-karbonyldiimidazol, dicyklohexylkarbodiimid, N-hydroxysukcinimid nebo 1-hydroxybenzotriazol v přítomnosti dicyklohexylkarbodiimidu. Velmi praktickým a užitečným vazebným činidlem je hexafluorofosfát (benzotriazol-1-yloxy)-tris-

(dimethylamino)fosfonia, popsaný B. Castrem a spoluautory v Tetrahedron Letters 1219, 1975, viz také práci D. Hudsona v J. Org. Chem. 53, 617, 1988, a to buď samotný, nebo v přítomnosti 1-hydroxybenzotriazolu. Ještě dalším velmi praktickým a užitečným vazebným činidlem je komerčně dostupný tetrafluoroboritan 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethylmočoviny.

Postup

Peptidy o vzorci 1 lze připravit postupy, které v sobě zahrnují metody obecně používané při synthese peptidů, jako je klasické spojování aminokyselinových zbytků a/nebo peptidových fragmentů v roztoku. Takové metody jsou popsány například E. Schröderem a K. Lüblem, viz výše uvedená citace, v řadě učebnic "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", editorů E. Grosse a spol., Academic Press, New York, N. Y., 1979-1987, díly 1 až 8, a J.M. Stewartem a J.D. Youngem v knize "Solid Phase Peptide Synthesis", 2. vydání, Pierce Chem. Co., Rockford, IL, USA, 1984.

Obecným rysem shora zmíněných postupů, týkajících se peptidů, je ochrana reaktivních skupin různých aminokyselinových zbytků, nebo odvozených aminokyselinových zbytků (nebo, pokud je to žádoucí, nepeptidových fragmentů peptidu) v postranním řetězci vhodnými chránicími skupinami, které budou na daném konci zabraňovat vzniku chemické reakce, dokud nedojde ke konečnému odstranění chránicí skupiny. Běžná je rovněž ochrana α -aminoskupiny aminokyseliny nebo fragmentu, po dobu, kdy tato částice reaguje prostřednictvím své karboxylové skupiny, a následné selektivní odstranění ochranné skupiny α -aminoskupiny, aby mohlo na tomto místě dojít k následné reakci. Jiným běžným rysem je počáteční ochrana C-koncového karboxylu aminokyselinového zbytku nebo peptidového fragmentu, pokud je přítomen, který se má stát C-koncovou funkční skupinou peptidu, pomocí vhodné ochranné skupiny, která bude na tomto místě zabraňovat vzniku chemické reakce až do odstranění chránicí skupiny po sestavení požadované peptidové sekvence.

Obecně tedy může být peptid o vzorci 1 připraven navázáním po jednotlivých krocích, v pořadí podle sekvence peptidu, příslušných aminokyselin nebo odvozených aminokyselinových zbytků a nepeptidových fragmentů peptidu (jako jsou klíčové meziprodukty), které jsou v případě potřeby vhodně chráněny, a odstraněním všech ochranných skupin, pokud jsou přítomny, při dokončení vícekrokového navázání k zisku peptidu o vzorci 1. Specifičtější postupy jsou znázorněny v dále uvedených příkladech.

Většina meziproduktů a postupy k přípravě některých z nich byly popsány J. Adamsem a spoluautory v evropské patentové přihlášce č. 411 332, zveřejněné 6. února 1991, J. Adamsem a spoluautory v evropské patentové přihlášce č. 411 334, zveřejněné 6. února 1991 a R. Dézielem a Y. Guindonem v Kanadské patentové přihlášce č. 2 033 448, zveřejněné 1. července 1992.

Nižší alkanové kyseliny, disubstituované fenylem nebo monosubstituované fenylem, potřebné k vytvoření N-konce předkládaných peptidů, jsou známé nebo mohou být připraveny známými metodami; například viz L.L. Chang se spoluautory, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2**, 1207, 1992. Kyselina dibenzylactová byla popsána M.R. Doliquem v *Ann. Chim. (Paris)* **15** (10), 425, 1931 a F. Krollpfeifferem a A. Rosenbergem, *Chem. Ber.* **69**, 465, 1936.

Peptid o vzorci 1 podle tohoto vynálezu lze získat ve formě terapeuticky přijatelné sole. V případě, že konkrétní peptid má zbytek, který působí jako base, jsou příkladem takových solí této base sole s organickou kyselinou, například octová, mléčná, jantarová, methansulfonová nebo p-toluensulfonová, stejně jako polymerní kyseliny jako kyselina tříslová či karboxymethylcelulóza, a také sole s anorganickými kyselinami jako s halogenvodíkovými kyselinami, například s kyselinou chlorovodíkovou, nebo s kyselinou sírovou či fosforečnou. Pokud je to žádoucí, je konkrétní kyselá adiční sůl přeměněna na jinou kyselou adiční sůl, jako na netoxickou, farmaceuticky přijatelnou sůl, ovlivněním příslušnou iontově výměnnou pryskyřicí způsobem, popsaným R. A. Boissonnasem a spoluautory v

Helv. Chim. Acta 43, 1849 (1960).

V případě, že má konkrétní peptid jednu nebo více volných karboxylových skupin, jsou příkladem takových solí karboxylové skupiny sole se sodnými, draselnými nebo vápenatými kationty, nebo s organickými basemi, například triethylaminem nebo N-methylmorfolinem.

Protiherpetická aktivita

Protivirová aktivita peptidů o vzorci 1 může být prokázána biochemickými, mikrobiologickými a biologickými postupy; ukazujícími inhibiční účinek sloučenin na replikaci virů Herpes simplex (prostého oparu) typu 1 a 2 (HSV-1 a HSV-2) a na další viry Herpes, například viry Varicella zoster (pásového oparu) (VZV) a viry Epstein-Barr (EBV).

V dále uvedených příkladech je uveden inhibiční účinek herpetické ribonukleotidreduktázy příkladnými peptidy o vzorci 1. Ve spojitosti s uvedenou specifickou inhibicí herpetické ribonukleotidreduktázy je pozoruhodé poměrně velmi malé nebo nulové působení peptidů na aktivitu buněčné ribonukleotidreduktázy, která je vyžadována pro replikaci normálních buněk.

Metodou k prokázání inhibičního účinku peptidů o vzorci 1 na virovou replikaci je technika buněčné kultury; viz například kanadskou patentovou přihlášku č. 2 033 488 R. Déziela a Y. Guindona, zveřejněnou 1.7. 1992.

Léčebný účinek peptidů může být prokázán na laboratorních zvířatech, například za použití stanovení pro testování protivirových léků, založeného na modelu očního onemocnění u myší, indukovaného virem herpes simplex, které popsal C.R. Brandt se spoluautory v J. Virol. Meth. 36, 209, 1992.

Pokud jsou peptid podle vynálezu, či jedna z jeho terapeuticky přijatelných

solí, použity jako protivirové činidlo, podávají se místně nebo systémově teplokrevným živočichům, například člověku, vepřům nebo koním, ve vehikulu obsahujícím jeden nebo více farmaceuticky přijatelných nosičů, jejichž podíl je vymezen rozpustností a chemickou povahou peptidu, zvolenou cestou podání a standardní biologickou praxí. K místnímu podání může být peptid upraven ve farmaceuticky přijatelných vehikulech, obsahujících 0,1 až 5 % a lépe 0,5 až 2 % aktivního činidla. Takové přípravky mohou být ve formě roztoku, krému nebo emulze.

Při systémovém podávání je peptid o vzorci 1 podáván intravenosní (do žíly), subkutání (podkožní) či intramuskulární (do svalu) injekcí, v prostředcích s farmaceuticky přijatelnými vehikuly nebo nosiči. Při injekčním podávání se dává přednost použití peptidu v roztoku ve sterilním vodném vehikulu, které může rovněž obsahovat další rozpuštěné látky, jako jsou pufrý či konzervační látky, stejně jako dostatečná množství farmaceuticky přijatelných solí nebo glukózy k zajištění isotoničnosti roztoku.

Vhodná vehikula nebo nosiče pro výše uvedené přípravky jsou popsány ve standardních farmaceutických textech, například v knize "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18. vydání, Mack Publishing Company, Easton, Penn., 1990.

Dávkování peptidu se bude lišit podle formy podávání a konkrétního zvoleného aktivního činidla. Nadto se bude lišit podle konkrétního hostitele, který je léčen. Obecně se léčba zahajuje malými přírůstky, dokud se v daných podmínkách nedosáhne optimálního účinku. Peptid se nejvhodněji podává v koncentraci, která obecně zajišťuje protivirové působení, aniž by vyvolávala jakékoli škodlivé nebo zhoubné vedlejší účinky.

Pokud jde o místní podání, aplikuje se peptid na pokožku ve vhodném, místně podávaném přípravku na infikovanou část těla, např. na kůži nebo část

ústní či genitální dutiny, v dostatečném množství k pokrytí infikované plochy. Léčba se musí opakovat, např. po každých 4 nebo 6 hodinách, dokud se leze nezahojí.

Pokud jde o systémové podávání, peptid o vzorci 1 se podává v dávce 10 μg až 500 μg na kilogram tělesné hmotnosti a den, ačkoli se mohou vyskytovat i výše zmíněné obměny. Ovšem k dosažení účinných výsledků je nevhodnější použít dávkování přibližně od 10 do 200 μg na kilogram tělesné hmotnosti za den.

Jiný aspekt tohoto vynálezu zahrnuje kosmetické přípravky, obsahující takové množství peptidu o vzorci 1, nebo jeho terapeuticky působící soli, které působí profylakticky vůči viru Herpes, spolu s fyziologicky přijatelným kosmetickým nosičem. V přípravku mohou být zahrnuty i přídavné složky, například změkčovadla pokožky. Kosmetický přípravek podle tohoto vynálezu se používá profylakticky k předcházení projevům herpetických lézí na pokožce. Přípravek může být aplikován na noc na příslušné oblasti pokožky. Obecně kosmetický přípravek obsahuje méně peptidu než odpovídající farmaceutické prostředky k místnímu nanášení. Upřednostňované množství peptidu v kosmetickém přípravku leží v rozmezí od 0,01 do 0,2 hmotnostního procenta.

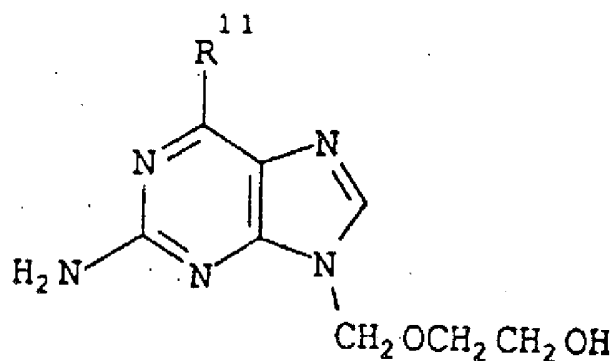
Ačkoli jsou výše popsané prostředky označovány jako účinná a poměrně bezpečná léčiva k léčbě herpetických virových infekcí, není vyloučena možnost současného podávání těchto prostředků s jinými protivirovými léčivy nebo činidly k dosažení výhodnějších výsledků. K takovým dalším protivirovým léčivům nebo činidlům patří protivirové nukleosidy, například acyklovir, a protivirová povrchově aktivní činidla nebo protivirové interferony, jako jsou ty, které popsali S.S. Asculai a F. Rapp v US patentu č. 4 507 281, 26.3. 1985.

Konkrétněji bylo, vzhledem k léčbě herpetických virových infekcí souběžným podáváním, zjištěno, že protiherpetická aktivita protivirových nukleosidových analogů může být synergicky zvýšena bez průvodního zvýšení toxických účinků jejich kombinováním s peptidem o vzorci 1. V souhlasu s tím je zde předkládán

farmaceutický prostředek k léčbě herpetických infekcí savců, obsahující farmaceuticky nebo veterinárně přijatelný nosič a účinné množství kombinace protivirového nukleosidového analogu nebo jeho terapeuticky přijatelné sole s peptidem o vzorci 1, inhibující ribonukleotidreduktázu, nebo jeho terapeuticky přijatelnou solí.

Je zde rovněž předkládán způsob léčby herpetických virových infekcí u savců. Způsob zahrnuje podávání kombinace sloučeniny o vzorci 1 nebo její terapeuticky přijatelné sole a protivirového nukleosidového analogu nebo jeho terapeuticky přijatelné sole v množství, účinném vůči viru Herpes, savcům.

Protivirový nukleosidový analog, používaný v kombinaci, je takový analog, který lze enzymaticky převést (*in vivo*) na virový DNA-polymerázový inhibitor, a/nebo na alternativní substrát herpetické DNApolymerázy. Protivirový nukleosidový analog může být zvolen ze známých nukleosidových analogů. K upřednostňovaným nukleosidovým analogům podle vynálezu patří acyklovir a jeho analogy; například sloučeniny o vzorci 2



kde R¹¹ je vodíkový atom hydroxyskupina nebo aminoskupina, nebo terapeuticky přijatelná sůl takové látky. (Vzorec 2, kde R¹¹ je hydroxyskupina, představuje acyklovir).

K dalším upřednostňovaným protivirovým nukleosidovým analogům pro

použití podle předkládaného vynálezu patří vidarabin, idoxuridin, trifluridin, ganciclovir, edoxudin, brovavir, fiacitabin, penciclovir, famciclovir a rociclovir.

Výraz "synergický účinek", použitý ve vztahu k protivirové nebo protiherpetické aktivitě výše definovaných kombinací nukleosidového analogu a peptidu o vzorci 1, označuje protivirový nebo protiherpetický účinek, který je vyšší než předpokládaný součet účinků dvou jednotlivých složek kombinace.

Při použití kombinace podle tohoto vynálezu k léčbě herpetických infekcí se kombinace podává teplokrevným živočichům, např. člověku, vepřům nebo koním, ve vehikulu, obsahujícím jeden nebo více farmaceuticky přijatelných nosičů, jejichž poměr je určen rozpustností a chemickou povahou nukleosidového analogu a peptidu o vzorci 1, zvoleným způsobem podání, standardní biologickou praxí a poměrnými množstvími dvou aktivních přísad k zajištění synergického protivirového účinku. Kombinace se přednostně nanáší místně. Dvě aktivní činidla (tj. protivirový nukleosidový analog a peptid o vzorci 1, nebo jejich terapeuticky přijatelné sole) mohou být například upravena do formy roztoků, emulsí, krémů, nebo lotionů ve farmaceuticky přijatelných vehikulech. Takové přípravky mohou obsahovat 0,01 až 1,0 hmotnostních procent nukleosidového analogu, nebo jeho terapeuticky přijatelné sole, a asi 0,05 až 1 hmotnostní procento peptidu o vzorci 1, nebo jeho terapeuticky přijatelné sole.

Dvě aktivní činidla jsou v každém případě ve farmaceutickém prostředku přítomna v takových množstvích, aby byl zajištěn synergický protiherpetický účinek.

Následující příklady dále dokreslují vynález. Teploty jsou udané ve stupních Celsia. Procentní údaje či poměry u roztoků vyjadřují vztah objemu vůči objemu, pokud není uvedeno jinak. Spektra nukleární magnetické resonance byla získána za použití spektrometru Bruker 200 nebo 400 MHz (400 MHz se uvádí v úvodu); chemické posuny (δ) jsou uvedeny v ppm, částech v milionu. Zkratky použité v Příkladech zahrnují Boc: *tert*-butyloxykarbonyl; Bzl: benzyl; EtOH: ethanol; EtOAc:

octan ethylnatý; Et₂O: diethylether; HPLC: vysokoúčinná kapalinová chromatografie; MeOH: methanol; THF: tetrahydrofuran.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Obecný postup kopulačních reakcí

{Viz také R. Knorr se spol., Tetrahedron Letters 30, 1927, 1989}

První reagující látka, tj. volný amin (nebo jeho hydrochloridová sůl), se rozpustí v dichlormethanu nebo acetonitrilu a roztok se ochladí na 4°C. Pod dusíkovou atmosférou se k míchanému roztoku přidají 4 ekvivalenty N-methylmorfolinu. Po 20 minutách se přidá jeden ekvivalent druhé reagující látky, tj. volné karboxylové kyseliny, a 1,05 ekvivalentu kopulačního činidla. (Praktickými a účinnými kopulačními činidly jsou pro tento účel hexafluorofosfát (benzotriazol-1-yloxy)tris-(dimethylamino)fosfonia nebo lépe tetrafluoroboritan 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethylmočoviny). Reakce se sleduje pomocí TLC (chromatografie na tenké vrstvě). Po dokončení reakce se dichlormethan (nebo acetonitril) odpaří za sníženého tlaku. Zbytek se pak rozpustí v EtOAc. Roztok se následně promyje 1N vodnou kyselinou citronovou, 10% vodným Na₂CO₃ a solným roztokem. Organická fáze se vysuší (MgSO₄), zfiltruje a zahustí do sucha za sníženého tlaku. Zbytek se čistí na silikagelu (SiO₂) podle Stillsova bleskového chromatografického postupu (W.C. Still se spoluautory, J. Org. Chem. 43, 2923, 1978).

Příklad 2

Příprava meziprojektu H-Asp(cyPn)(Bzl)-NH-(S)-CH{CH₂C(CH₃)₃}CH₂OBzl

(a) Kyselina (S)-α-azido-1-((fenylmethoxy)karbonyl)-cyklopentanocetová:

Tato sloučenina byla připravena z 2-oxospiro[4,4]nonan-1,3-dionu, popsaného M.N. Aboul-Eneinem a spol. v *Pharm. Acta Helv.* **55**, 50, 1980, podle asymetrické azidační metody, využívající Evansovy pomocné látky, viz D.A. Evans se spol., *J. Amer. Chem. Soc.* **112**, 4011, 1990.

Konkrétněji byl pod argonovou atmosférou po kapkách přidán 1,6 M hexanový roztok butyllithia (469 ml, 750 mmol) k roztoku chirální pomocné látky, 4(S)-(1-methylethyl)-2-oxazolidinonu (96,8 g, 750 mmol, popsané L.N. Pridgenem a J. Prolem v *J. Org. Chem.* **54**, 3231, 1989) v suchém THF při -40°C. Směs byla při -40°C míchána 30 minut a poté ochlazena na -78°C. Ke studené směsi byl po kapkách přidán 2-oxospiro[4,4]nonan-1,3-dion. Pak byla směs míchána 1 hodinu při 0°C a následně k ní byl přidán 20% (hmot./objem) vodný roztok kyseliny citronové (600 ml). Organická fáze byla oddělena a vodná fáze byla extrahována EtOAc. Spojené organické fáze byly promyty solným roztokem, vysušeny (MgSO₄) a zahuštěny za sníženého tlaku za vzniku 3-{2-(1-karboxycyklopentyl)-1-oxoethyl}-4-(S)-(1-methylethyl)-2-oxazolidinonu jako růžové pevné látky (300 g).

Tato pevná látka (ca 750 mmol) byla rozpuštěna v acetonitrilu (1l). K roztoku byly přidány benzylbromid (128,3 g, 89,2 ml, 750 mmol) a 1,8-diazabicyklo[5,4,0]-undek-7-en (114 g, 112 ml, 750 mmol). Směs byla míchána 16 hodin pod argonovou atmosférou. Za sníženého tlaku byly odstraněny těkavé složky a zbytek byl rozpuštěn v soustavě H₂O/EtOAc. Pak byla oddělena organická fáze, promyta 10% (hmot./objem) vodným roztokem kyseliny citronové a solným roztokem, vysušena (MgSO₄) a za sníženého tlaku zahuštěna do sucha za vzniku oleje. Krystalizací oleje z hexanu/EtOAc byl získán odpovídající benzylester jako bílá pevná látka (204 g, 73 %).

Roztok takto získané látky (70 g, 137 mmol) ve vysušeném THF (200 ml) byl ochlazen na -78°C. K chladnému roztoku byl během 15 minut přidán 0,66 M THF roztok 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazanu (286 ml, 189 mmol), obsahující 6 % (hm./objem) kumenu. Směs byla při teplotě -78°C míchána 45 minut. Ke studené

směsi byl v jedné dávce přidán roztok 2,4,6-triisopropylbenzensulfonylazidu (67 g, 216 mmol) v suchém THF (100 ml) a po dvou minutách následovalo přidání ledové kyseliny octové (50 ml, 860 mmol). Směs byla zahřáta a míchána 1 hodinu při teplotě 35-45°C. Těkavé složky byly odstraněny za sníženého tlaku. Žlutý zbytek byl rozmělněn v soustavě hexan/EtOH (4:1, 1,7 l). Vzniklá bílá pevná látka byla shromážděna na filtru. Filtrát byl smíchán s SiO₂ (sířovitost 230-240). Těkavé složky byly odstraněny za sníženého tlaku a zbylá pevná látka byla vysušena při 35°C za sníženého tlaku k odstranění kumenu. Zbylá pevná látka pak byla umístěna na sloupec SiO₂. Elucí této pevné látky a SiO₂ soustavou hexan-EtOAc, 9:1, a zahuštěním eluentu byl získán 3-{2(S)-azido-1-oxo-2-{1-[(fenylmethoxy)-karbonyl]cyklopentyl}-ethyl}-4(S)-(1-methylethyl)-2-oxazolidinon (66 g, 86 %).

Roztok výše uvedené látky (13,42 g, 32,4 mmol) v THF/H₂O (3:1, 608 ml) byl ochlazen na 0°C. K němu byl přidán peroxid vodíku/H₂O (3:7, 16,3 ml, 518 mmol peroxidu vodíku) a následně LiOH.H₂O (2,86 g, 68,2 mmol). Směs byla míchána 45 minut při 0°C a poté "zhašena" (quenched) 10% (hm./objem) vodným roztokem sulfitu sodného (400 ml). Po přidání NaHCO₃ (1,93 g) byla směs zahuštěna za sníženého tlaku. Chirální pomocná látka byla znovu získána (regenerována) kontinuální extrakcí po dobu 20 hodin (soustavou vodný NaHCO₃/chloroform). Poté byla vodná fáze ochlazená na 0°C, okyselena přidavkem koncentrované HCl a následně extrahována EtOAc. Extrakt byl promyt solným roztokem, vysušen (MgSO₄) a za sníženého tlaku zahuštěn za vzniku požadované sloučeniny jako bílé pevné látky (8,2 g, 84 %). ¹H NMR (CDCl₃) sloučeniny prokázala: δ 1,6-1,8(m, 5H), 1,95-2,05 (m, 2H), 2,20-2,30 (m, 1H), 4,55 (s, 1H), 5,12 (s, 2H) a 7,4 (m, 5H).

Sloučenina je použita v oddílu (c) tohoto příkladu.

(b) NH₂-(S)-CH{CH₂C(CH₃)₃}CH₂OBzl: H-γMeLeu-OH byl redukován pomocí LiBH₄/Me₃SiCl podle metody A. Giannise a K. Sandhoffa, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 28, 218, 1989, k vytvoření aminoalkoholu NH₂-(S)-CH{CH₂C(CH₃)₃}CH₂OH. Směs takto vzniklé sloučeniny (812 mg, 6,51 mmol) a

di-*tert*-butyldikarbonátu (1,42 g, 6,51 mmol) ve vysušeném THF (15 ml) byla míchána 15 minut pod dusíkovou atmosférou při 4°C a poté 4 hodiny při laboratorní teplotě. THF byl odpařen za sníženého tlaku a vzniklý zbytek byl rozpuštěn v EtOAc. Roztok byl promyt 10% vodnou kyselinou citronovou, 5% vodným NaHCO₃ a solným roztokem. Organický podíl byl vysušen (MgSO₄) a zahuštěn do sucha za sníženého tlaku. Zbytek byl vyčištěn bleskovou chromatografií (SiO₂, eluent: hexan-EtOAc, 2:1) za vzniku Boc-NH-(S)-CH{CH₂C(CH₃)₃}CH₂OH (1,23 g, 86 %).

Bisulfát tetrabutylamonia (106 mg) a 50% vodný NaOH (3 ml) byly postupně přidány k roztoku Boc-NH-(S)-CH{CH₂C(CH₃)₃}CH₂OH (1,23 g, 5,35 mmol) v benzylchloridu (13 ml). Výsledná směs byla míchána 90 minut při teplotě 35-40°C, naředěna-EtOAc-a promyta H₂O-a solným roztokem. Organický podíl byl vysušen (MgSO₄) a těkavé složky byly odstraněny za sníženého tlaku. Vzniklý zbytek byl rozpuštěn v hexanu a roztok byl nalit na sloupec SiO₂. Sloupec byl eluován hexanem k odstranění benzylchloridu a poté soustavou hexan-EtOAc (2:1) k vytvoření Boc-NH-(S)-CH{CH₂C(CH₃)₃}CH₂OBzl. ¹H NMR (CDCl₃) vzniklé sloučeniny prokázala: δ 0,95 (s, 9H), 1,42 (s, 9H), 1,30-1,55 (m, 2H), 3,42 (d, J=4 Hz, 2H), 3,88 (široký, 1H), 4,54 (m, 3H), 7,23-7,4 (m, 5H). Tato sloučenina (1,28 g, 3,99 mmol) byla rozpuštěna v 6 N roztoku HCl/dioxan (10 ml). Roztok byl pod dusíkovou atmosférou míchán 45 minut při 4°C. Odpařením rozpouštědla vznikla hydrochloridová sůl požadované sloučeniny (1,05 g). Sloučenina se používá bez dalšího čištění v dalším oddílu tohoto příkladu.

(c) Sloučenina, uvedená v nadpisu tohoto příkladu: Uskutečňováním kopulačního postupu podle příkladu 1 a za použití hydrochloridové soli NH₂-(S)-CH{CH₂C(CH₃)₃}CH₂OBzl z předcházejícího oddílu jako první reagující látky a (S)-α-azido-1-((fenylmethoxy)karbonyl)cyclopentanocetové kyseliny z oddílu (a) tohoto příkladu jako druhé reagující látky byl získán N-((S)-1-benzyloxymethyl-3,3-dimethylbutyl)-(S)-α-azido-1-((fenylmethoxy)karbonyl)cyclopentanacetamid. Redukcí této sloučeniny chloridem cínatým v MeOH, metodou N. Maitiho a spol., popsanou v Tetrahedron Letters 27, 1423, 1986, byla získána sloučenina, uvedená v nadpisu.

tohoto příkladu. ^1H NMR (CDCl_3) této sloučeniny prokázala: δ 0,98 (s, 9H), 1,22-2,25 (m, 12H), 3,4 (d, $J = 4$ Hz, 2H), 3,64 (s, 1H), 4,18 (široký m, 1H), 4,52 (s, 2H), 5,12 (s, 2H), 7,18 (d, $J = 7$ Hz, 1H), 7,22-7,38 široký m, 10H).

Příklad 3

Příprava $(\text{PhCH}_2)\text{CHC}(\text{O}) - (\text{N-Me}) - \text{Val} - \text{Tbg-Asp}(\text{pyrrolidino}) - \text{Asp}(\text{cyPn}) - \gamma\text{MeLeucinolu}$ (vzorec 1, $A = 2$ -(fenylmethyl)-3-fenylpropionyl, $B = \text{N-Me-Val}$, $D = \text{Tbg}$, $R^1 = \text{pyrrolidinová skupina}$, R^2 a R^3 spolu s uhlíkovým atomem, na něž jsou navázány, tvoří cyklopentyl a $E = \text{NHCH}(\text{R}^9) - \text{Z}$, kde R^9 je 2,2-dimethylpropyl a $\text{Z} = \text{CH}_2\text{OH}$).

(a) Příprava meziprojektu $\text{Boc}-(\text{N-Me})-\text{Val}-\text{Tbg-Asp}(\text{pyrrolidino})-\text{Asp}(\text{cyPn})(\text{Bzl})-\text{NH}-(\text{S})-\text{CH}\{\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3\}\text{CH}_2\text{OBzl}$: Uskutečňováním kopulačního postupu podle příkladu 1 byla v nadpisu uvedená sloučenina z příkladu 2 (první reagující látka) spojena se sloučeninou $\text{Boc-Asp}(\text{pyrrolidino})-\text{OH}$ (druhou reagující látkou), kterou popsal P.L. Beaulieu se spoluautory v evropské patentové přihlášce č. 461 546, zveřejněné 18. 12. 1991, za vzniku $\text{Boc-Asp}(\text{pyrrolidino})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\text{NH}-(\text{S})-\text{CH}\{\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3\}\text{CH}_2\text{OBzl}$. Tato sloučenina byla obratem zbavena ochranné skupiny (6 N HCl/dioxan, 45 minut, 4°C) a za podobných podmínek spojena s Boc-Tbg-OH za vzniku $\text{Boc-Tbg-Asp}(\text{pyrrolidino})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\text{NH}-(\text{S})-\text{CH}\{\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3\}\text{CH}_2\text{OBzl}$. Po odstranění chránící skupiny Boc (6 N HCl/dioxan, 45 minut, 4°C) vznikl z této sloučeniny odpovídající aminový derivát s volným N-koncem ve formě příslušné adiční sole kyseliny chlorovodíkové. Poté byl aminový derivát za podobných podmínek spojen s $\text{Boc}-(\text{N-Me})-\text{Val-OH}$ za vzniku požadovaného meziprojektu.

(b) Příprava v nadpisu uvedené sloučeniny: Produkt z předcházejícího oddílu (a) byl přeměněn na odpovídající aminový derivát s volným N-koncem v soustavě 6 N HCl/dioxan (4°C , 45 minut). Chlorovodíková adiční sůl aminového derivátu (447 mg, 0,490 mmol) byla rozpuštěna v CH_2Cl_2 (1,5 ml). K roztoku byly pod

dusíkovou atmosférou přidány N-methylmorpholin (200 μ l, 1,83 mmol) a dibenzylacetylchlorid (269 mg, 1,04 mmol). Směs byla 7 hodin míchána při laboratorní teplotě a poté byly těkavé složky odpařeny za sníženého tlaku. Vzniklý zbytek byl rozpuštěn v EtOAc. Roztok byl postupně promyt 1 N vodným roztokem HCl, nasyceným vodným roztokem NaHCO₃ a solným roztokem, vysušen (MgSO₄) a zahuštěn za sníženého tlaku. Vzniklý zbytek byl rozpuštěn v EtOH (5 ml) a roztok byl v přítomnosti 10% (hmot./hmot.) Pd(OH)₂/C (100 mg) míchán 22 hodin (magnet. míchadlem) pod vodíkovou atmosférou (1 atm). Katalyzátor byl pak shromážděn na filtr a filtrát byl zahuštěn do sucha. Zbytek byl čištěn HPLC na sloupci reverzní fáze C-18 za použití gradientu acetonitrilu a vody, přičemž každé z rozpouštědel obsahovalo 0,06 % kyseliny trifluorooctové, k získání v nadpisu uvedené sloučeniny jako bílé pevné látky (220 mg); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, s tím, že tato sloučenina existuje v DMSO jako směs rotamerů v poměru 4:1) δ 0,16 (d, J=6,5 Hz, 0,6H), 0,22 (d, J = 6,5 Hz, 2,4H), 0,71 (d, J = 6,5 Hz, 2,4H), 0,75 (d, J = 6,5 Hz, 0,6H), 0,80 (s, 1,8H), 0,82 (s, 7,2H), 0,87 (s, 9H), 1,40-1,55 (m, 7H), 1,65-2,00 (m, 8H), 2,52-3,90 (m, 13H), 2,70 (s, 2,4H), 2,89 (s, 0,6H), 4,21 (d, J = 9,5 Hz, 0,8H), 4,34 (d, J = 9,5 Hz, 0,2H), 4,43 (d, J = 11 Hz, překryv se signálem méně zastoupeného rotameru, 1H), 4,65-4,73 (m, 1H), 4,82 (d, J = 10 Hz, překryv se signálem méně zastoupeného rotameru, 1H), 7,04-7,40 (m, 10,8H), 7,57 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 8,01 (d, J = 10 Hz, překryv se signálem méně zastoupeného rotameru, 1H), 8,25 (d, J = 9,5 Hz, 0,2H), 8,30 (d, J = 7,5 Hz, 0,8H), 8,51 (d, J = 7,5 Hz, 0,2 H); FAB hmotnostní spektrum m/z: 939 (M + Na)⁺.

Příklad 4

Příprava některých příkladných meziproduktů k vypracování C-konce peptidů o vzorci 1.

(a) NH₂-(R)-CH(C₂H₅)C(CH₃)₃: K ochlazenému roztoku (0°C), obsahujícím

4,4-dimethyl-3-pentanon (106 g, 0,928 mol), triethylamin (513 ml, 3,68 mol) a (R)- α -methylbenzylamin (114 g, 0,940 mol) ve vysušeném benzenu (1 l) byl přidán roztok TiCl_4 (50,5 ml, 0,459 mol) v benzenu (200 ml) takovou rychlostí, aby teplota směsi nepřesáhla 10°C . Směs byla poté mechanicky míchána 3 hodiny při 40°C , ochlazená na laboratorní teplotu a filtrována přes křemelinu. Ta pak byla promyta Et_2O . Filtrát spojený s promývacím roztokem byl zahuštěn. Vzniklý zbytek byl rozpuštěn ve vysušeném MeOH (2 l). Roztok byl ochlazen na 0°C a po částech byl přidáván NaBH_4 (20 g, 0,53 mol) za stálého udržování teploty směsi pod 5°C . Po přidavku přibližně 2 ml 10% vodné HCl byl MeOH odpařen. Zbytek byl rozpuštěn v Et_2O a roztok byl promyt solným roztokem, vysušen (MgSO_4) a odpařen de sucha za vzniku načervenalého oleje (směsi diastereoisomerů v poměru 18:1 podle údajů NMR). Olej byl čištěn bleskovou chromatografií (SiO_2 , eluent EtOAc/hexan, 7:93) k získání N-(1(R)-fenylethyl)-1(R)-ethyl-2,2-dimethylpropylaminu ve formě kapaliny (110 g, 54 %). Tato látka byla rozpuštěna v hexanu (1,5 l). K roztoku byla během 15 minut přidána 6N HCl v dioxanu (90 ml), výsledná bílá pevná látka byla shromážděna na filtru a promyta hexanem k získání N-(1(R)-fenylethyl)-1(R)-ethyl-2,2-dimethylpropylhydrochloridu (125 g, 97 %). ^1H NMR (CDCl_3): δ 0,55 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H), 1.14 (s, 9H), 1.54–1.95 (m, 2H), 2.23 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 2.36–2.44 (m, 1H), 4.31–4.49 (m, 1H), 7.30–7.48 (m, 3H), 7.74–7.79 (m, 2H).

Roztok této sloučeniny (41,5 g) v MeOH (120 ml) byl smísen s 10% (hm./hm.) Pd/C (4,0 g) a směs byla protřepávána pod tlakem vodíku 50 psi na Parrově hydrogenčním přístroji 48 hodin při laboratorní teplotě. Směs pak byla zfiltrována a filtrát byl zahuštěn k získání požadované sloučeniny $\text{NH}_2\text{-(R)-CH(C}_2\text{H}_5\text{)C-(CH}_3\text{)}_3$ ve formě její adiční sole, odvozené od kyseliny chlorovodíkové, jako bílé pevné látky (25 g, 100 %). ^1H NMR (CDCl_3): δ 1,10 (s, 9H), 1,22 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 1,58–1,90 (m, 2H), 2,70–2,85 (m, 1H), 8,10–8,40 (široký s, 3H).

Stejným způsobem, kdy však byl ve výše popsaném postupu 4,4-dimethyl-

-3-pentanon nahražen 3,3-dimethyl-2-butanonem, byl získán
 $\text{NH}_2\text{-(R)-CH(CH}_3\text{)C(CH}_3\text{)}_3\text{.HCl.}$

Příklad 5

Inhibice ribonukleotidreduktázy viru Herpes simplex (HSV-1)

(a) Příprava enzymu

Ribonukleotidreduktáza HSV-1 (částečně vyčištěná) byla získána z klidových buněk BHK-21/C13, infikovaných virem kmene F HSV-1 v množství 10 plaky tvořících jednotek/buňku, podle popisu E. A. Cohena se spoluautory v J. Gen. Virol. 66, 733, 1985.

(b) Stanovení

Stanovení, popsané P. Gaudreauem se spol. v J. Biol. Chem. 262, 12413, 1987, se používá k určení schopnosti sloučenin podle tohoto vynálezu inhibovat aktivitu ribonukleotidreduktázy HSV-1. Výsledky jsou vyjádřeny koncentrací sloučeniny, která vyvolá 50 % maximální inhibice (IC_{50}) enzymové aktivity. Počet jednotek enzymového preparátu, použitých v každém stanovení, byl konstantní a zakládal se na specifické aktivitě enzymového preparátu. Výsledky jsou poměrné vzhledem k aktivitě, zjištěné v kontrolních pokusech bez přítomnosti testované látky a představují průměr čtyř stanovení, která se od sebe vzájemně odlišovala o méně než 10 %.

Když byla podle výše popsaného stanovení testována sloučenina $(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC(O) - (N-Me) - Val - Tbg - Asp(pyrrolidino) - Asp(cyPn) - } \gamma \text{ MeLeucinol}$ z příkladu 3, byla zjištěná koncentrace této sloučeniny, vyvolávající 50% snížení aktivity ribonukleotidreduktázy HSV-1, tj. IC_{50} , rovna 0,17 μM .

Příklad 6

Inhibice replikace viru Herpes simplex (HSV-2) v buněčné kultuře

Stanovení:

Buňky BHK-21/C13 (ATCC CCL 10) byly inkubovány dva dny v T-baňkách o objemu 150 cm² (1,5 x 10⁶ buněk/baňku) v médiu α -MEM (Gibco, Canada Inc., Burlington, Ontario, Kanada), doplněném 8% (obj./obj.) fetálním hovězím sérem (FBS, Gibco Canada Inc.). Buňky byly trypsinizovány a poté převedeny do čerstvého média ve 24 jamkových plotnách k získání 2,5 x 10⁵ buněk v 750 μ l média na jamku. Buňky byly inkubovány 6 hodin při 37°C k umožnění jejich adheze (přichycení) na plotnu. Poté byly jednou promyty 500 μ l média α -MEM, doplněného 0,5% (obj./obj.) FBS a inkubovány se 750 μ l stejného média (s malým obsahem séra) po 3 dny. Po této době "sérového vyhladovění" bylo médium s malým obsahem séra odstraněno a buňky byly inkubovány v 500 μ l BBMT po 2-3 hodiny. [Médium BBMT popsal P. Brazeau se spoluautory v Proc. natl. Acad. Sci. USA 79, 7909, 1982]. Poté byly buňky infikovány virem HSV-2 (násobnost infekce = 0,02 PFU/buňku, PFU = plaky tvořící jednotky) ve 100 μ l média BBMT. (Poznámka: použitým virem HSV-2 byl kmen HG-52, viz Y. Langelier a G. Buttin, J. Gen. Virol. 57, 21, 1981; virus byl skladován při -80°C). Po 1 hodině adsorpce viru při 37°C bylo médium odstraněno a buňky byly promyty BBMT (3 x 250 μ l). Buňky v každé jamce byly inkubovány v přítomnosti příslušné koncentrace testovaného činidla, rozpuštěného ve 200 μ l média BBMT nebo v nepřítomnosti činidla (kontrola). Po 29 hodinách inkubace při 37°C byly infikované buňky odebrány pomocí zmrazení plotny na -80°C a jejím následným rozmražením. Buňky v každé jamce byly z jejího povrchu uvolněny účinkem tajících ledových fragmentů. Po úplném roztátí byly buněčné suspenze spojeny a každá jamka byla promyta 150 μ l média BBMT. Virový vzorek (suspenze a promývací tekutina) byl mírně dezintegrován ultrazvukem (sonikován) po 4 minuty při 4°C. Trosky buněk byly odstraněny odstředěním (1000 g po 10 minut při 4°C). Supernatant byl spojen a uchováván při -80°C až do stanovení

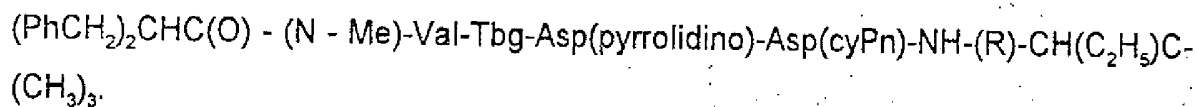
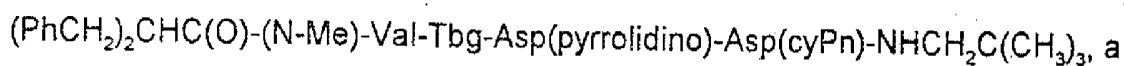
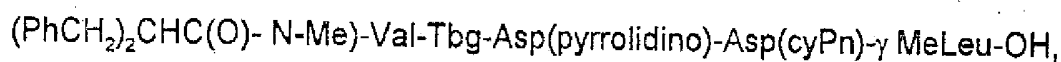
virového titru.

Virová titrace byla prováděna modifikovanou metodou kolorimetrického stanovení M. Langloise a spol., Journal of Biological Standardization 14, 201, 1986, popsaného podrobně R. Dézielem a Y. Guindonem, viz výše.

Procenta inhibice virového nárůstu mohou být tedy stanovena při různých koncentracích testovaného činidla a lze vypočítat koncentraci testovaného činidla (tj. peptidu o vzorci 1), působící 50% inhibici replikace viru, tj. EC_{50} .

Když byla podle výše popsaného stanovení v buněčné kultuře testována sloučenina $(PhCH_2)_2CHC(O)-(N-Me)-Val-Tbg-Asp(pyrrolidino)-Asp(cyPn)-\gamma$ MeLeucinol z příkladu 3, byla zjištěná koncentrace této sloučeniny, vyvolávající 50% inhibici replikace viru HSV-1, tj. EC_{50} rovna 3 μM .

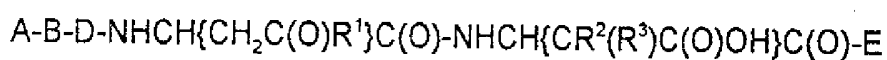
Jinými specifickými příklady sloučenin o vzorci 1 pro použití podle předkládaného vynálezu jsou:



Zastupuje:

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Peptid o vzorci 1



1

kde

A je 2-methyl-1-oxopropylový radikál disubstituovaný fenylem nebo monosubstituovaným fenylem, jehož monosubstituent je zvolen ze skupiny, skládající se z nižšího alkylu, halového radikálu, hydroxylu a nižšího alkoxyly;

B je $N(CH_3)CHR^4C(O)$, kde R^4 je nižší alkyl; D je $NH-CHR^5C(O)$, kde R^5 je nižší alkyl nebo nižší alkyl, substituovaný jednou karboxylovou skupinou, hydroxylovou skupinou, merkaptoskupinou nebo benzyloxyskupinou;

R^1 je nižší alkyl, nižší cykloalkyl, $\{1-(\text{nižší alkyl})-(\text{nižší cykloalkyl})\}$, nebo NR^6R^7 , kde R^6 je vodík nebo nižší alkyl a R^7 je nižší alkyl, nebo R^6 a R^7 společně s dusíkovým atomem, na který jsou připojeny, tvoří pyrrolidinovou, piperidinovou, morfolinovou nebo 4-methylpiperazinovou skupinu;

R^2 je vodík nebo nižší alkyl a R^3 je nižší alkyl, nebo R^2 a R^3 společně s uhlíkovým atomem, na který jsou připojeny, tvoří nižší cykloalkyl; a E je NHR^8 , kde R^8 je C_{4-9} alkyl; nižší cykloalkyl; nižší cykloalkyl, substituovaný jednonásobně nebo dvojnásobně nižším alkylem nebo substituentem $(\text{nižší alkyl})-(\text{nižší cykloalkyl})$; nebo E je $NHCH(R^9)-Z$, kde R^9 je C_{4-9} alkyl, nižší cykloalkyl nebo $(\text{nižší cykloalkyl})-(\text{nižší alkyl})$ a Z je CH_2OH , $C(O)OH$, $C(O)NH_2$ nebo $C(O)OR^{10}$, kde R^{10} je nižší alkyl; nebo jde o terapeuticky přijatelnou sůl takové látky;

kde výraz "nižší alkyl", buď samotný nebo v kombinaci s jiným radikálem, označuje alkylový radikál s rovným řetězcem, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, nebo alkylový radikál s větveným řetězcem, obsahující 3 až 6 uhlíkových atomů; výraz "nižší cykloalkyl", buď samotný nebo v kombinaci s jiným radikálem, označuje nasycený cyklický uhlovodíkový radikál, obsahující tři až šest uhlíkových atomů; výraz "nižší alkoxy", označuje alkoxylový radikál s rovným řetězcem, obsahující jeden až čtyři atomy uhlíku a alkoxylový radikál s větveným řetězcem, obsahující

tři až čtyři atomy uhlíku; výraz "1-(nižší alkyl)-(nižší cykloalkyl)", označuje nižší cykloalkylový radikál, nesoucí nižší alkylový substituent v poloze 1.

2. Peptid podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že A je 2-methyl-1-oxopropylový radikál, dvojnásobně substituovaný fenylem, 4-(nižší alkyl)fenylem, 4-halofenylem nebo 4-(nižší alkoxy)fenylem; B je (N-Me)Val, (N-Me)Ile nebo (N-Me)Tbg; D je aminokyselinový zbytek kyseliny (S)-2-amino-3-hydroxy-3-methylmásečné nebo kyseliny (R)-2-amino-3-merkapt-3-methylmásečné, nebo aminokyselinový zbytek; zvolený z Val, Ile a Tbg; R^1 je nižší alkyl, nižší cykloalkyl, {1-(nižší alkyl)-(nižší cykloalkyl)}, N,N-dimethylaminová skupina, N,N-diethylaminová skupina, pyrrolidinová nebo morfolinová skupina; R^2 a R^3 odpovídají definici uvedené v nároku 1; E je NHR^8 , kde R^8 je C_{4-9} alkyl; nižší cykloalkyl, nižší cykloalkyl, jednonásobně nebo dvojnásobně substituovaný nižším alkylem; nebo substituent (nižší alkyl)-(nižší cykloalkyl); nebo E je $NHCH(R^9)-Z$, kde R^9 je C_{4-9} alkyl nebo (nižší cykloalkyl)methyl a Z odpovídá definici uvedené v nároku 1; nebo jde o terapeuticky přijatelnou sůl takové látky.

3. Peptid podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že A je 2-(fenylmethyl)-3-fenylpropionyl, 2-((4-fluorofenyl)-methyl)-3-(4-fluorofenyl)-propionyl, 2-((4-methoxyfenyl)methyl)-3-fenylpropionyl nebo 2-((4-methoxyfenyl)-methyl)-3-(4-methoxyfenyl)propionyl; B je (N-Me)-Val nebo (N-Me)-Ile; D je Val, Ile nebo Tbg; R^1 je 1-methylethyl, 1,1-dimethylethyl, 1,1-dimethylpropyl, cyklobutyl, cyklopentyl, cyklohexyl, 1-methylcyklopentyl, N,N-dimethylaminoskupina, N,N-diethylaminoskupina, pyrrolidinová nebo morfolinová skupina; R^2 je vodík a R^3 je methyl, ethyl, 1-methylethyl, 1,1-dimethylethyl nebo propyl, a uhlíkový atom, nesoucí R^2 a R^3 je v konfiguraci (R), nebo jsou R^2 a R^3 každý nezávisle methyl nebo ethyl, nebo R^2 a R^3 tvoří společně s uhlíkovým atomem, na který jsou navázány, cyklobutyl, cyklopentyl nebo cyklohexyl; a E je NHR^8 , kde R^8 je 2,2-dimethylpropyl, 1(R),2,2 - trimethylpropyl, 1(R) - ethyl - 2,2 - dimethylpropyl, 2,2 - dimethylbutyl, 3,3 - dimethylbutyl, 1(R),2,2 - trimethylbutyl, 1(R),3,3 - trimethylbutyl,

1(R)-ethyl-3,3-dimethyl, nebo cyklohexylmethyl; nebo E je $\text{NHCH(R}^9\text{)-Z}$, kde uhlíkový atom, nesoucí R^9 , je v konfiguraci (S), R^9 je 1,1-dimethylethyl, 1-methylpropyl, 2-methylpropyl, 2,2-dimethylpropyl nebo cyklohexylmethyl a Z je CH_2OH , C(O)OH , C(O)NH_2 nebo C(O)OR^{10} , kde R^{10} je methyl, ethyl, nebo propyl; nebo se jedná o terapeuticky přijatelnou sůl takové látky.

4. Peptid podle nároku 3, vyznačující se tím, že A je 2-(fenylmethyl)-3-fenylpropionyl; B je (N-Me)Val; D je Tbg; R^1 je 1-methylethyl, 1,1-dimethylethyl, 1-methylpropyl, 1,1-dimethylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, cyklobutyl, cyklopentyl, cyklohexyl, 1-methylcyklopentyl, pyrrolidinová nebo morfolinová skupina; R^2 je vodík a R^3 je methyl, ethyl, 1-methylethyl nebo propyl, a uhlíkový atom, nesoucí R^2 a R^3 , je v konfiguraci (R), nebo R^2 a R^3 je každý nezávisle methyl nebo ethyl, nebo R^2 a R^3 dohromady s uhlíkovým atomem, na který jsou navázány, tvoří cyklobutyl, cyklopentyl či cyklohexyl; a E je NHR^8 , kde R^8 je 2,2-dimethylpropyl, 1(R),2,2-trimethylpropyl, 1(R)-ethyl-2,2-dimethylpropyl, 2,2-dimethylbutyl nebo 1(R)-ethyl-3,3-dimethylbutyl, nebo E je $\text{NHCH(R}^9\text{)-Z}$, kde uhlíkový atom, nesoucí R^9 , je v konfiguraci (S), R^9 je 2,2-dimethylpropyl a Z je CH_2OH , C(O)OH , C(O)NH_2 nebo C(O)OR^{10} , kde R^{10} je methyl, ethyl, nebo propyl; nebo jde o terapeuticky přijatelnou sůl takové látky.

5. Peptid podle nároku 1, vyznačující se tím, že je zvolen ze skupiny, zahrnující:

$(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC(O)-N-Me-Val-Tbg-Asp(pyrrolidino)-Asp(cyPn)-}\gamma\text{ MeLeucinol}$,

$(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC(O)-N-Me-Val-Tbg-Asp(pyrrolidino)-Asp(cyPn)-}\gamma\text{ MeLeu-OH}$,

$(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC(O)-(N-Me)-Val-Tbg-Asp(pyrrolidino)-Asp(cyPn)-NHCH}_2\text{C(CH}_3)_3$, a

$(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC(O)-(N-Me)-Val-Tbg-Asp(pyrrolidino)-Asp(cyPn)-NH-(R)-CH(C}_2\text{H}_5\text{)C-}$
 $(\text{CH}_3)_3$.

č.j.	0 7 7 1 2 8
DOŠLO	
0 5. XII 9 5	
URAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	
PŘÍL.	

6. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje protivirově účinné (vzhledem k viru herpes) množství peptidu o vzorci 1, nebo jeho terapeuticky přijatelné sole, a farmaceuticky nebo veterinárně přijatelný nosič.

7. Farmaceutický prostředek podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že peptid je zvolen ze skupiny, zahrnující:

$(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC}(\text{O})\text{-N-Me-Val-Tbg-Asp(pyrrolidino)-Asp(cyPn)-}\gamma\text{ MeLeucinol,}$

$(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC}(\text{O})\text{-N-Me-Val-Tbg-Asp(pyrrolidino)-Asp(cyPn)-}\gamma\text{ MeLeu-OH,}$

$(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC}(\text{O})\text{-(N-Me)-Val-Tbg-Asp(pyrrolidino)-Asp(cyPn)-NHCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3, \text{ a}$

$(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC}(\text{O})\text{-(N-Me)-Val-Tbg-Asp(pyrrolidino)-Asp(cyPn)-NH-(R)-CH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{C-}(\text{CH}_3)_3.$

8. Kosmetický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje peptid podle nároku 1, nebo jeho terapeuticky přijatelnou sůl, a fyziologicky přijatelný nosič, vhodný k místní aplikaci.

9. Použití peptidu podle kteréhokoli z nároků 1 až 4, nebo jeho terapeuticky přijatelné sole, pro výrobu farmaceutických prostředků k léčbě herpetických virových infekcí u savců.

10. Použití podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že peptid je zvolen ze skupiny, zahrnující:

$(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC}(\text{O})\text{-N-Me-Val-Tbg-Asp(pyrrolidino)-Asp(cyPn)-}\gamma\text{ MeLeucinol,}$

$(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC}(\text{O})\text{-N-Me-Val-Tbg-Asp(pyrrolidino)-Asp(cyPn)-}\gamma\text{ MeLeu-OH,}$

$(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC}(\text{O})\text{-(N-Me)-Val-Tbg-Asp(pyrrolidino)-Asp(cyPn)-NHCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3, \text{ a}$

$(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC}(\text{O}) - (\text{N} - \text{Me})\text{-Val-Tbg-Asp(pyrrolidino)-Asp(cyPn)-NH-(R)-CH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{C-}(\text{CH}_3)_3$.

11. Použití peptidu podle kteréhokoli z nároků 1 až 4, nebo jeho terapeuticky přijatelné sole, pro výrobu farmaceutických prostředků k inhibování replikace herpetického viru.

12. Použití podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, že peptid je zvolen ze skupiny, zahrnující:

$(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC}(\text{O})\text{- N-Me)-Val-Tbg-Asp(pyrrolidino)-Asp(cyPn)-}\gamma \text{ MeLeucinol,}$

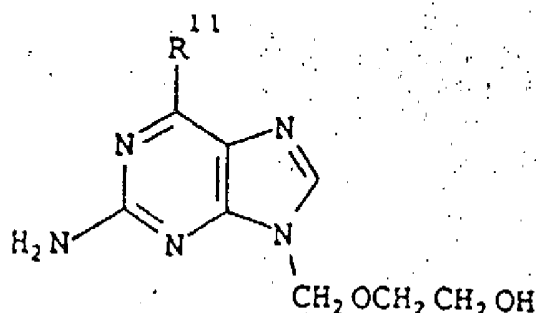
$(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC}(\text{O})\text{- N-Me)-Val-Tbg-Asp(pyrrolidino)-Asp(cyPn)-}\gamma \text{ MeLeu-OH,}$

$(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC}(\text{O})\text{-(N-Me)-Val-Tbg-Asp(pyrrolidino)-Asp(cyPn)-NHCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$, a

$(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC}(\text{O}) - (\text{N} - \text{Me})\text{-Val-Tbg-Asp(pyrrolidino)-Asp(cyPn)-NH-(R)-CH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{C-}(\text{CH}_3)_3$.

13. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje farmaceuticky nebo veterinárně přijatelný nosič a účinné množství kombinace protivirového nukleosidového analogu nebo jeho terapeuticky přijatelné soli a peptidu podle nároku 1, inhibujícího ribonukleotid reduktázu, nebo jeho terapeuticky přijatelné soli.

14. Farmaceutický prostředek podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že nukleosidový analog je sloučeninou o vzorci 2



kde R^{11} je vodíkový atom hydroxyskupina nebo aminoskupina, nebo terapeuticky přijatelnou solí takové látky.

15. Farmaceutický prostředek podle nároku 13, vyznačující se tím, že protivirový nukleosidový analog je zvolen ze skupiny vidarabinu, idoxuridinu, trifluridinu, gancicloviru, edoxudinu, brovaviru, fiacitabinu, pencicloviru, famcicloviru a rocicloviru.

16. Farmaceutický prostředek podle kteréhokoli z nároků 6, 7, 13, 14 a 15, vyznačující se tím, že prostředek je ve formě přípravku pro místní aplikaci.

17. Použití kombinace protivirového nukleosidového analogu, nebo jeho terapeuticky přijatelné soli, a peptidu o vzorci 1 podle nároku 1, inhibujícího ribonukleotidreduktázu, či jeho terapeuticky přijatelné soli, pro výrobu farmaceutických prostředků k léčbě herpetických virových infekcí u savců.

18. Použití podle nároku 17, vyznačující se tím, že protivirový nukleosidový analog je zvolen ze skupiny zahrnující acyklovir, 6-deoxyacyklovir, 2,6-diamino-9-((2-hydroxyethoxy)methyl)purin, vidarabin, idoxuridin, trifluridin, ganciclovir, edoxudin, brovavir, fiacitabin, penciclovir, famciclovir a rociclovir.

19. Použití $(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC}(\text{O}) - \text{N-Me} - \text{Val-Tbg-Asp}(\text{pyrrolidino}) - \text{Asp}(\text{cyPn}) - \gamma\text{MeLeucinolu}$ pro výrobu farmaceutických prostředků k léčbě infekcí, vyvolaných u savců virem Herpes simplex typu 1 nebo typu 2.

20. Způsob výroby peptidu podle nároku 1, nebo jeho terapeuticky přijatelné soli, vyznačující se tím, že zahrnuje:

(a) víceukrokové spojování, v pořadí podle sekvence peptidu, aminokyseliny nebo odvozených aminokyselinových zbytků, a nepeptidových fragmentů peptidu, kde

- i) reaktivní skupiny vedlejšího řetězce zbytku nebo fragmentů jsou chráněny vhodnými chránicími skupinami, bránícími vzniku chemických reakcí v tomto místě, do té doby, než je chránicí skupina po dokončení vícekrokového spojování nakonec odstraněna;
 - ii) α -aminoskupina spojujícího se reaktantu je chráněna chránicí skupinou α -aminoskupiny, zatímco volná karboxylová skupina tohoto reaktantu se spojuje s volnou α -aminoskupinou druhého reaktantu; chránicí skupina α -aminoskupiny je jednou ze skupin, které lze snadno odstranit k umožnění průběhu následujícího spojovacího kroku na této α -aminoskupině; a
 - iii) C-koncová karboxylová skupina aminokyselinového zbytku nebo peptidového fragmentu, která má vytvářet C-koncovou funkci chráněného peptidu, pokud je přítomna, je chráněna vhodnou chránicí skupinou, která zabrání vzniku chemické reakce na tomto místě až do doby, než bude vytvořena požadovaná aminokyselinová sekvence peptidu; a
- (b) po dokončení spojování eliminaci jakýchkoli chránících skupin a, pokud je to žádoucí, uskutečnění standardních přeměn k získání peptidu o vzorci 1; a pokud je to žádoucí, přeměnu peptidu na terapeuticky přijatelnou sůl.

Zastupuje: