



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94192662.1

[51]Int.Cl⁶

A61K 38/04

[43]公开日 1996 年 7 月 10 日

[22]申请日 94.4.29

[30]优先权

[32]93.5.3 [33]CA[31]2,095,408

[86]国际申请 PCT/CA94/00242 94.4.29

[87]国际公布 WO94/25046 英 94.11.10

[85]进入国家阶段日期 96.1.2

[71]申请人 比奥-梅加/贝林格尔·英格海姆研究
公司

地址 加拿大魁北克

[72]发明人 詹姆斯·G·查弗里斯
罗伯特·德齐尔

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

代理人 巫肖南

权利要求书 17 页 说明书 40 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 抗击具无环鸟苷抗性的单纯性疱疹病毒
感染的方法

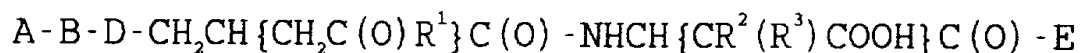
[57]摘要

本发明公开了一种治疗哺乳动物的具无环鸟苷抗性的疱疹感染的方法。该方法包括给受感染哺乳动物施用一种肽衍生物或该肽衍生物和一种抗病毒核苷的组合物。本方法中使用的肽衍生物其代表通式为

$$A-B-D-CH_2CH\{CH_2C(O)R^1\}C(O)-NHCH\{CR^2(R^3)COOH\}C(O)-E。$$

权 利 要 求 书

1、一种肽衍生物在给哺乳动物治疗具无环鸟苷抗性的单纯性疱疹病毒感染中的应用，其中，所述肽衍生物是结构式1表示的化合物或其治疗学上可接受的盐



1

其中A是苯乙酰基，苯丙酰基，(4-氨基苯基)丙酰基，(4-氟苯基)丙酰基，(4-羟基苯基)丙酰基，(4-甲氧基苯基)丙酰基，2-(苯甲基)-3-苯丙酰基，2-[(4-氟苯基)甲基]-3-(4-氟苯基)丙酰基，2-[(4-甲氧基苯基)甲基]-3-(4-甲氧基苯基)丙酰基或苄基氨基羧基；B是(N-Me)-Val或(N-Me)-Ile；或A和B一起形成一种饱和的烷基氨基羧基，它选自于下列基团：丁基氨基羧基，1-甲基乙基氨基羧基，1-甲基丙基氨基羧基，1-乙基丙基氨基羧基，1,1-二甲基乙基丁基氨基羧基，1-乙基丁基氨基羧基，1-丙基丁基氨基羧基，1-乙基戊基氨基羧基，1-丁基戊基氨基羧基，1-乙基丁基氨基羧基，2-乙基戊基氨基羧基，1-甲基-1-丙基丁基氨基羧基，1-乙基-1-丙基丁基氨基羧基，1,1-二丙基丁基氨基羧基，(1-丙基环戊基)氨基羧基以及(1-丙基环己基)氨基羧基；D是Val，Ile或Tbg；R¹是1-甲基乙基，1,1-二甲基乙基，1-甲基丙基，1,1-二甲基丙基，2,2-二甲基丙基，环丁基，环戊基，环己基，1-甲基环戊基，NR⁴R⁵其中R⁴是氢或低级烷基，而R⁵是低级烷基，或者R⁴和R⁵与其结合的氮原子一起形成吡咯烷基，

哌啶子基，吗啉代或者4-甲基-1-哌嗪基； R^2 是氢， R^3 是甲基，乙基，1-甲基乙基，1,1-二甲基乙基，丙基，2-丙烯基或苄基，携带 R^2 和 R^3 的碳原子具有(R)-构型，或者 R^2 和 R^3 各自单独是甲基或乙基，或者 R^2 和 R^3 与其结合的碳原子一起形成环丁基，环戊基或环己基；而E是 NHR^6 其中 R^6 是2-甲基丙基，2,2-二甲基丙基，1(R),2,2-三甲基丙基，1,1,2,2-四甲基丙基，1(R)-乙基-2,2-二甲基丙基，2-(R,S)-甲基丁基，2,2-二甲基丁基，3,3-二甲基丁基，1(R),2,2-三甲基丁基，1(R),3,3-三甲基丁基，2-乙基丁基，2,2-二乙基丁基，2-乙基-1(R)-甲基丁基，2-乙基-2-甲基丁基，1(R)-乙基-3,3-二甲基丁基，2,2-二甲基戊基，顺式或反式-2-甲基环己基，2,2-二甲基环己基或环己基甲基；或者E是 $NHCH(R^7)-Z$ 其中携带 R^7 的碳原子具有(S)-构型， R^7 是1,1-二甲基乙基，1-甲基丙基，2-甲基丙基，2,2-二甲基丙基或环己基甲基，以及Z是 CH_2OH ， $C(O)OH$ ， $C(O)NH_2$ 或 $C(O)OR^8$ 其中 R^8 是甲基，乙基或丙基。

2、如权利要求1所述肽衍生物的应用，其中，该肽衍生物是结构式1的化合物或其治疗学上可接受的盐，其中A是苯丙酰基，2-(苯甲基)-3-苯丙酰基或苄基氨基羧基；B是(N-Me)Val；D是Tbg； R^1 是1-甲基乙基，1,1-二甲基乙基，1-甲基丙基，1,1-二甲基丙基，2,2-二甲基丙基，环丁基，环戊基，环己基或者1-甲基环戊基； R^2 是氢， R^3 是甲基，乙基，1-甲基乙基，丙基或苄基，以及携带 R^2 和 R^3 的碳原子具有(R)构型，或者 R^2 和 R^3 各自单独是甲基或乙基，或者 R^2 和 R^3 与其结合的碳原子一起形成环丁基，环戊基或环己基；E是 NHR^6 ，其中 R^6 是2,2-二甲基丙基，1(R),2,2-三甲基丙基，1(R)

- 乙基 - 2,2 - 二甲基丙基, 2,2 - 二甲基丁基或 1(R) - 乙基 - 3,3 - 二甲基丁基或者 E 是 $\text{NHCH}(\text{R}^7) - \text{Z}$ 其中携带 R^7 的碳原子具有 (S) 构型, R^7 是 2,2 - 二甲基丙基, Z 是 CH_2OH , $\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 或 $\text{C}(\text{O})\text{OR}^8$, 其中 R^8 是甲基, 乙基或丙基。

3、如权利要求 1 所述肽衍生物的应用, 其中该肽衍生物是结构式 1 所述化合物或其治疗学上可接受的盐, 其中 A 和 B 一起形成一种饱和的烷基氨基羧基, 它选自于下组: 1 - 乙基丙基氨基羧基, 1 - 乙基丁基氨基羧基, 1 - 丙基丁基氨基羧基, 2 - 乙基戊基氨基羧基, 1 - 甲基 - 1 - 丙基丁基氨基羧基, 1 - 乙基 - 1 - 丙基丁基氨基羧基, 1,1 - 二丙基丁基氨基羧基以及 (1 - 丙基环戊基) 氨基羧基; D 是 Tbg; R^1 是 1 - 甲基乙基, 1,1 - 二甲基乙基, 1 - 甲基丙基, 1,1 - 二甲基丙基, 2,2 - 二甲基丙基, 环丁基, 环戊基, 环己基或 1 - 甲基环戊基; R^2 是氢和 R^3 是甲基, 乙基, 1 - 甲基乙基, 丙基或苄基, 携带 R^2 和 R^3 的碳原子具有 (R) - 构型, 或者 R^2 和 R^3 各自单独是甲基或乙基, 或者 R^2 和 R^3 与其结合的碳原子一起形成环丁基, 环戊基或环己基; E 是 NHR^6 其中 R^6 是 2,2 - 二甲基丙基, 1(R), 2,2 - 三甲基丙基, 1(R) - 乙基 - 2,2 - 二甲基丙基, 2,2 - 二甲基丁基或者 1(R) - 乙基 - 3,3 - 二甲基丁基或者 E 是 $\text{NHCH}(\text{R}^7) - \text{Z}$, 其中携带 R^7 的碳原子具有 (S) 构型, R^7 是 2,2 - 二甲基丙基; Z 是 CH_2OH , $\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 或者 $\text{C}(\text{O})\text{OR}^8$, 其中 R^8 是甲基, 乙基或丙基。

4、权利要求 1 所述的肽衍生物的应用, 其中该肽衍生物选自下组:

$\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-(\text{N-Me})\text{Val-Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\gamma\text{MeLeucinol},$

$\text{Et}_2\text{CHNHC}(\text{O})-\text{Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\gamma\text{MeLeucinol},$

$\text{Pr}_2\text{CHNHC}(\text{O})-\text{Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\text{NH}-(\text{R})-\text{CH}(\text{Et})\text{CMe}_3,$

$\text{Pr}_2\text{CHNHC}(\text{O})-\text{Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\text{NHCH}_2\text{CMe}_3,$

$\text{EtPr}_2\text{CNHC}(\text{O})-\text{Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\text{NH}-(\text{R})-\text{CH}(\text{Et})\text{CMe}_3,$ 和

$\text{EtPr}_2\text{CNHC}(\text{O})-\text{Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\text{NHCH}_2\text{CMe}_3.$

5、权利要求1所述肽衍生物，或其治疗学上可接受的盐与一种抗病毒核苷类似物，或其治疗学上可接受的盐的组合物在治疗哺乳动物的具无环鸟苷抗性的单纯性疱疹病毒感染中的应用。

6、根据权利要求5所述的组合物的应用，其中该肽衍生物是一种结构式1的化合物或其治疗学上可接受的盐，其中A是苯丙酰基，2-(苯甲基)-3-苯丙酰基或苄基氨基羧基；B是(N-Me)Val；D是Tbg； R^1 是1-甲基乙基，1,1-二甲基乙基，1-甲基丙基，1,1-二甲基丙基，2,2-二甲基丙基，环丁基，环戊基，环己基或1-甲基环戊基； R^2 是氢和 R^3 是甲基，乙基，1-甲基乙基，丙基或苄基，携带 R^2 和 R^3 的碳原子具有(R)-构型，或者 R^2 和 R^3 各自单独是甲基或乙基，或者 R^2 和 R^3 与其结合的碳原子一起形成环丁基，环戊基或环

己基；以及E是 NHR^6 其中 R^6 是2,2-二甲基丙基，1(R),2,2-三甲基丙基，1(R)-乙基-2,2-二甲基丙基，2,2-二甲基丁基或1(R)-乙基-3,3-二甲基丁基或者E是 $\text{NHCH(R}^7\text{)-Z}$ ，其中携带 R^7 的碳原子具有(S)构型， R^7 是2,2-二甲基丙基，Z是 CH_2OH ， C(O)OH ， C(O)NH_2 或者 C(O)OR^8 其中 R^8 是甲基，乙基或丙基。

7、根据权利要求5所述组合物的应用，其中该肽衍生物是结构式1的化合物或其治疗学上可接受的盐，该结构式1中A和B一起形成一种饱和的烷基氨基羧基，它选自于下组：1-乙基丙基氨基羧基，1-乙基丁基氨基羧基，1-丙基丁基氨基羧基，2-乙基戊基氨基羧基，1-甲基-1-丙基丁基氨基羧基，1-乙基-1-丙基氨基羧基，1,1-二丙基丁基氨基羧基以及(1-丙基环戊基)氨基羧基；D是Tbg； R^1 是1-甲基乙基，1,1-二甲基乙基，1-甲基丙基，1,1-二甲基丙基，2,2-二甲基丙基，环丁基，环戊基，环己基或者1-甲基环戊基； R^2 是氢和 R^3 是甲基，乙基，1-甲基乙基，丙基或苄基，以及携带 R^2 和 R^3 的碳原子具有(R)-构型，或者 R^2 和 R^3 各自单独是甲基或乙基，或者 R^2 和 R^3 与其结合的碳原子一起形成环丁基，环戊基或环己基；E是 NHR^6 其中 R^6 是2,2-二甲基丙基，1(R),2,2-三甲基丙基，1(R)-乙基-2,2-二甲基丙基，2,2-二甲基丁基或者1(R)-乙基-3,3-二甲基丁基或者E是 $\text{NHCH(R}^7\text{)-Z}$ 其中携带 R^7 的碳原子具有(S)构型， R^7 是2,2-二甲基丙基，Z是 CH_2OH ， C(O)OH ， C(O)NH_2 或者 C(O)OR^8 ，其中 R^8 是甲基，乙基或丙基。

8、根据权利要求5所述组合物的应用，其中该肽衍生物选自下组：

$\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-(\text{N-Me})\text{Val-Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\gamma\text{MeLeucinol},$

$\text{Et}_2\text{CHNHC}(\text{O})-\text{Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\gamma\text{MeLeucinol},$

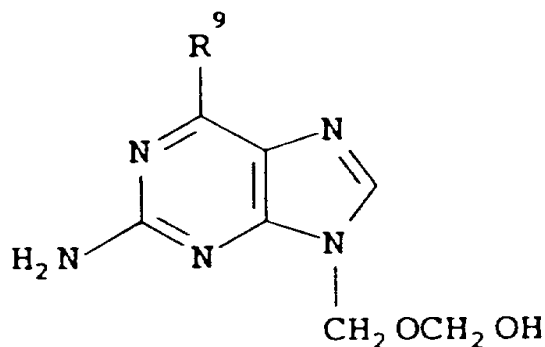
$\text{Pr}_2\text{CHNHC}(\text{O})-\text{Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\text{NH}-(\text{R})-\text{CH}(\text{Et})\text{CMe}_3,$

$\text{Pr}_2\text{CHNHC}(\text{O})-\text{Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\text{NHCH}_2\text{CMe}_3,$

$\text{EtPr}_2\text{CNHC}(\text{O})-\text{Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\text{NH}-(\text{R})-\text{CH}(\text{Et})\text{CMe}_3,$ 和

$\text{EtPr}_2\text{CNHC}(\text{O})-\text{Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\text{NHCH}_2\text{CMe}_3.$

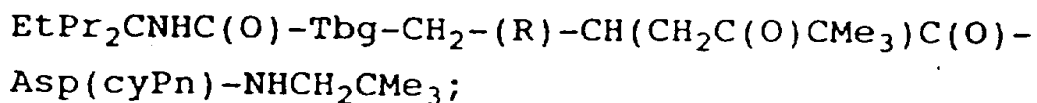
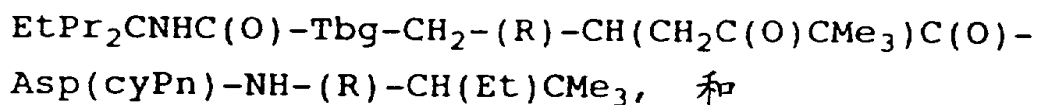
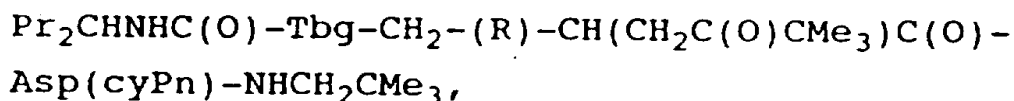
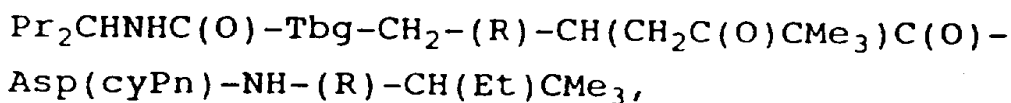
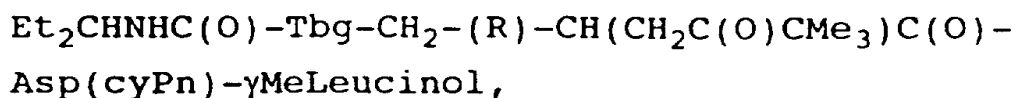
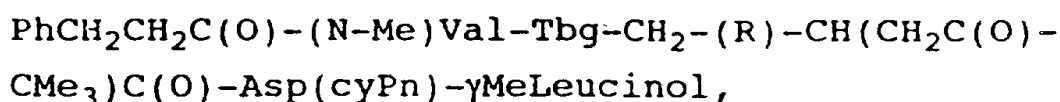
9、根据权利要求5所述组合物的应用，其中该核苷类似物是结构式2的化合物或其治疗学上可接受的盐，结构式2中 R^9 是氢，羟基或氨基。



2

10、根据权利要求5所述的组合物的应用，其中该核苷类似物选自下组：阿糖腺苷，碘脱氧尿苷，三氟尿苷，丙氧鸟苷，edoxudine, broavir, fiacitabine, penciclovir, famciclovir和roxiclovir。

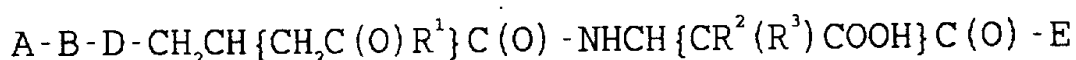
11、根据权利要求5所述的组合物的应用，其中该肽衍生物选自下组



以及其中该核苷类似物是无环鸟苷。

12、一种肽衍生物在制备一种药剂中的应用，所述药剂用于治疗哺乳动物的具无环鸟苷抗性的单纯性疱疹病毒感染，其中该肽衍

生物是结构式1的化合物或其治疗学上可接受的盐， 结构式(1)为



1

其中A是苯乙酰基， 苯丙酰基， (4-氨基苯基)丙酰基， (4-氟苯基)丙酰基， (4-羟基苯基)丙酰基， (4-甲氧基苯基)-丙酰基， 2-(苯甲基)-3-苯丙酰基， 2-{(4-氟苯基)甲基}-3-(4-氟苯基)丙酰基， 2-{(4-甲氧基苯基)甲基}-3-(4-甲氧基苯基)丙酰基或苄基氨基羧基； B是(N-Me)-Val或(N-Me)-Ile； 或A和B一起形成一种饱和的烷基氨基羧基， 它选自于下列基团： 丁基氨基羧基， 1-甲基乙基氨基羧基， 1-甲基丙基氨基羧基， 1-乙基丙基氨基羧基， 1,1-二甲基丁基氨基羧基， 1-乙基丁基氨基羧基， 1-丙基丁基氨基羧基， 1-乙基戊基氨基羧基， 1-丁基戊基氨基羧基， 1-乙基丁基氨基羧基， 2-乙基戊基氨基羧基， 1-甲基-1-丙基丁基氨基羧基， 1-乙基-1-丙基丁基氨基羧基， 1,1-二丙基丁基氨基羧基， (1-丙基环戊基)氨基羧基以及(1-丙基环己基)氨基羧基； D是Val, Ile或Tbg； R^1 是1-甲基乙基， 1,1-二甲基乙基， 1-甲基丙基， 1,1-二甲基丙基， 2,2-二甲基丙基， 环丁基， 环戊基， 环己基， 1-甲基环戊基， NR^4R^5 其中 R^4 是氢或低级烷基， 而 R^5 是低级烷基， 或者 R^4 和 R^5 与其结合的氮原子一起形成吡咯烷基， 哌啶子基， 吗啉代或者4-甲基-1-哌嗪基； R^2 是氢， R^3 是甲基， 乙基， 1-甲基乙基， 1,1-二甲基乙基， 丙基， 2-丙烯基或苄基， 携带 R^2 和 R^3 的碳原子具有(R)构型， 或者 R^2 和 R^3 各自单独是甲基或乙基， 或者 R^2 和 R^3 与其结合的碳原子一起形成环丁基， 环戊基， 或环己基； 而E是 NHR^6 其中 R^6 是2-甲基丙基， 2,2-二甲基丙基， 1(R), 2,2-三

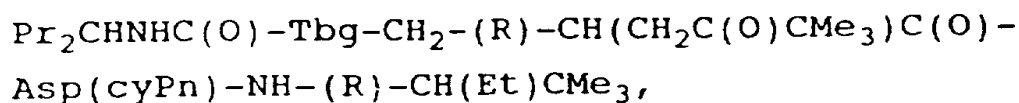
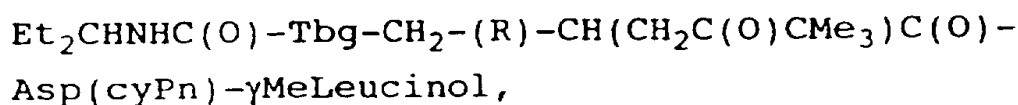
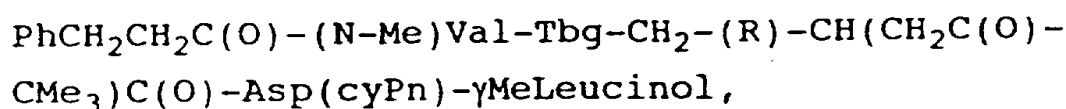
甲基丙基, 1,1,2,2-四甲基丙基, 1(R)-乙基-2,2-二甲基丙基, 2(R,S)-甲基丁基, 2,2-二甲基丁基, 3,3-二甲基丁基, 1(R),2,2-三甲基丁基, 1(R),3,3-三甲基丁基, 2-乙基丁基, 2,2-二乙基丁基, 2-乙基-1(R)-甲基丁基, 2-乙基-2-甲基丁基, 1(R)-乙基-3,3-二甲基丁基, 2,2-二甲基戊基, 顺式或反式-2-甲基环己基, 2,2-二甲基环己基或环己基甲基; 或者E是NHCH(R⁷)-Z其中携带R⁷的碳原子具有(S)构型, R⁷是1,1-二甲基乙基, 1-甲基丙基, 2-甲基丙基, 2,2-二甲基丙基或环己基甲基, 以及Z是CH₂OH, C(O)OH, C(O)NH₂或C(O)OR⁸其中R⁸是甲基, 乙基或丙基。

13、根据权利要求12所述的肽衍生物的应用, 其中该肽衍生物是结构式1的化合物或其治疗学上可接受的盐, 结构式1中A是苯丙酰基, 2-(苯甲基)-3-苯丙酰基或苄基氨基羧基; B是(N-Me)Val; D是Tbg; R¹是1-甲基乙基, 1,1-二甲基乙基, 1-甲基丙基, 1,1-二甲基丙基, 2,2-二甲基丙基, 环丁基, 环戊基, 环己基或1-甲基环戊基; R²是氢, R³是甲基, 乙基, 1-甲基乙基, 丙基或苄基, 以及携带R²和R³的碳原子具有(R)构型, 或者R²和R³各自单独是甲基或乙基, 或者R²和R³与其结合的碳原子一起形成环丁基, 环戊基或环己基; E是NHR⁶, 其中R⁶是2,2-二甲基丙基, 1(R),2,2-三甲基丙基, 1(R)-乙基-2,2-二甲基丙基, 2,2-二甲基丁基或1(R)-乙基-3,3-二甲基丁基或者E是NHCH(R⁷)-Z, 其中携带R⁷的碳原子具有(S)构型, R⁷是2,2-二甲基丙基, Z是CH₂OH, C(O)OH, C(O)NH₂或C(O)OR⁸其中R⁸是甲基, 乙基或丙基。

14、根据权利要求12所述的肽衍生物的应用, 其中该肽衍生物是结构式1的化合物或其药理学上可接受的盐, 其中结构式1中A和B

一起形成一种饱和的烷基氨基羧基，它选自于下组：1-乙基丙基氨基羧基，1-乙基丁基氨基羧基，1-丙基丁基氨基羧基，2-乙基戊基氨基羧基，1-甲基-1-丙基丁基氨基羧基，1-乙基-1-丙基丁基氨基羧基，1,1-二丙基丁基氨基羧基以及(1-丙基环戊基)氨基羧基；D是Tbg；R¹是1-甲基乙基，1,1-二甲基乙基，1-甲基丙基，1,1-二甲基丙基，2,2-二甲基丙基，环丁基，环戊基，环己基或1-甲基环戊基；R²是氢和R³是甲基，乙基，1-甲基乙基，丙基或苄基，携带R²和R³的碳原子具有(R)-构型，或者R²和R³各自单独是甲基或乙基，或者R²和R³与其结合的碳原子一起形成环丁基，环戊基或环己基；E是NHR⁶其中R⁶是2,2-二甲基丙基，1(R),2,2-三甲基丙基，1(R)-乙基-2,2-二甲基丙基，2,2-二甲基丁基，或者1(R)-乙基-3,3-二甲基丁基或者E是NHCH(R⁷)-Z，其中携带R⁷的碳原子具有(S)构型，R⁷是2,2-二甲基丙基，Z是CH₂OH，C(O)OH，C(O)NH₂或者C(O)OR⁸，其中R⁸是甲基，乙基或丙基。

15、根据权利要求12所述肽衍生物的应用，其中该肽衍生物选自于下组：



$\text{Pr}_2\text{CHNHC(O)-Tbg-CH}_2\text{-(R)-CH(CH}_2\text{C(O)CMe}_3\text{)C(O)-}$
 $\text{Asp(cyPn)-NHCH}_2\text{CMe}_3$,

$\text{EtPr}_2\text{CNHC(O)-Tbg-CH}_2\text{-(R)-CH(CH}_2\text{C(O)CMe}_3\text{)C(O)-}$
 $\text{Asp(cyPn)-NH-(R)-CH(Et)CMe}_3$, 和

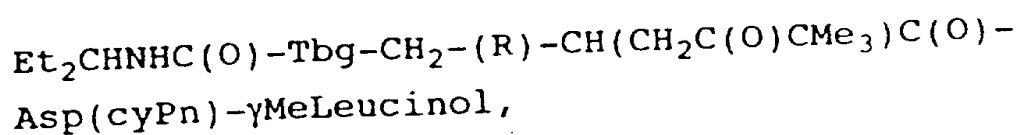
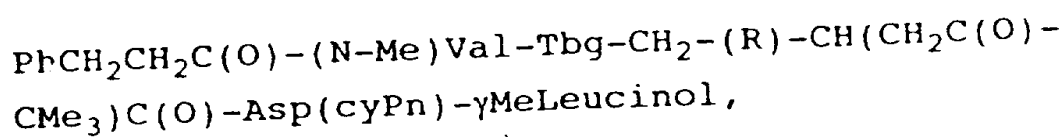
$\text{EtPr}_2\text{CNHC(O)-Tbg-CH}_2\text{-(R)-CH(CH}_2\text{C(O)CMe}_3\text{)C(O)-}$
 $\text{Asp(cyPn)-NHCH}_2\text{CMe}_3$.

16、权利要求12所述肽衍生物或其治疗学上可接受盐和一种抗病毒核苷类似物，或其治疗学上可接受的盐的组合物，用于制备一种药剂的应用，该药剂用于治疗哺乳动物的具无环鸟苷抗性的单纯性疱疹病毒感染。

17、根据权利要求16所述的组合物的应用，其中该肽衍生物是结构式1的肽衍生物或其治疗学上可接受的盐，结构式1中A是苯丙酰基，2-(苯甲基)-3-苯丙酰基或苄基氨基羧基；B是(N-Me)Val；D是Tbg； R^1 是1-甲基乙基，1,1-二甲基乙基，1-甲基丙基，1,1-二甲基丙基，2,2-二甲基丙基，环丁基，环戊基，环己基或1-甲基环戊基； R^2 是氢和 R^3 是甲基，乙基，1-甲基乙基，丙基或苄基，携带 R^2 和 R^3 的碳原子具有(R)-构型，或者 R^2 和 R^3 各自独立是甲基或乙基，或者 R^2 和 R^3 与其结合的碳原子一起形成环丁基，环戊基或环己基；以及E是 NHR^6 其中 R^6 是2,2-二甲基丙基，1(R),2,2-三甲基丙基，1(R)-乙基-2,2-二甲基丙基，2,2-二甲基丁基或1(R)-乙基-3,3-二甲基丁基或者E是 $\text{NHCH(R}^7\text{)-Z}$ 其中携带 R^7 的碳原子具有(S)构型， R^7 是2,2-二甲基丙基，Z是 CH_2OH ， C(O)OH ， C(O)NH_2 或者 C(O)OR^8 ，其中 R^8 是甲基，乙基或丙基。

18、根据权利要求16所述组合物的应用，其中该肽衍生物是结构式1的化合物或其治疗学上可接受的盐，结构式1中A和B一起形成一种饱和的烷基氨基羰基，它选自于下组：1-乙基丙基氨基羰基，1-乙基丁基氨基羰基，1-丙基丁基氨基羰基，2-乙基戊基氨基羰基，1-甲基-1-丙基丁基氨基羰基，1-乙基-1-丙基氨基羰基，1,1-二丙基丁基氨基羰基以及(1-丙基环戊基)氨基羰基；D是Tbg； R^1 是1-甲基乙基，1,1-二甲基乙基，1-甲基丙基，1,1-二甲基丙基，2,2-二甲基丙基，环丁基，环戊基，环己基或者1-甲基环戊基； R^2 是氢和 R^3 是甲基，乙基，1-甲基乙基，丙基或苄基，以及携带 R^2 和 R^3 的碳原子具有(R)构型，或者 R^2 和 R^3 各自独立是甲基或乙基，或者 R^2 和 R^3 与其结合的碳原子一起形成环丁基，环戊基或环己基；E是 NHR^6 ，其中 R^6 是2,2-二甲基丙基，1(R),2,2-三甲基丙基，1(R)-乙基-2,2-二甲基丙基，2,2-二甲基丁基或者1(R)-乙基-3,3-二甲基丁基或者E是 $NHCH(R^7)-Z$ 其中携带 R^7 的碳原子具有(S)构型， R^7 是2,2-二甲基丙基，Z是 CH_2OH ， $C(O)OH$ ， $C(O)NH_2$ 或者 $C(O)OR^8$ ，其中 R^8 是甲基，乙基或丙基。

19、根据权利要求16所述的组合物的应用，其中该肽衍生物选自下组：



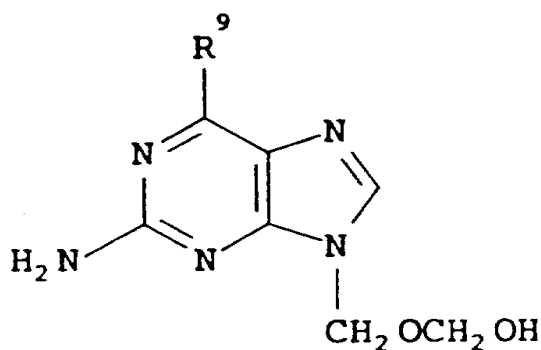
$\text{Pr}_2\text{CHNHC(O)-Tbg-CH}_2\text{-(R)-CH(CH}_2\text{C(O)CMe}_3\text{)C(O)-}$
 $\text{Asp(cyPn)-NH-(R)-CH(Et)CMe}_3\text{,}$

$\text{Pr}_2\text{CHNHC(O)-Tbg-CH}_2\text{-(R)-CH(CH}_2\text{C(O)CMe}_3\text{)C(O)-}$
 $\text{Asp(cyPn)-NHCH}_2\text{CMe}_3\text{,}$

$\text{EtPr}_2\text{CNHC(O)-Tbg-CH}_2\text{-(R)-CH(CH}_2\text{C(O)CMe}_3\text{)C(O)-}$
 $\text{Asp(cyPn)-NH-(R)-CH(Et)CMe}_3\text{, 和}$

$\text{EtPr}_2\text{CNHC(O)-Tbg-CH}_2\text{-(R)-CH(CH}_2\text{C(O)CMe}_3\text{)C(O)-}$
 $\text{Asp(cyPn)-NHCH}_2\text{CMe}_3\text{.}$

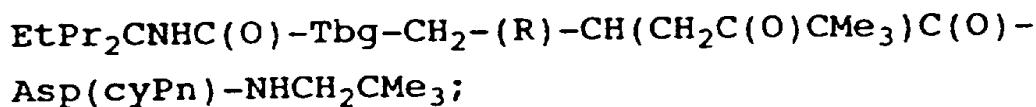
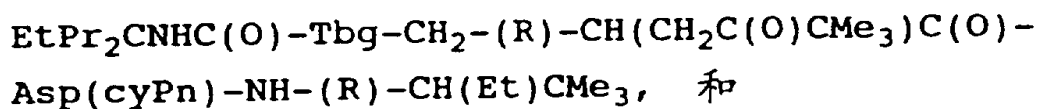
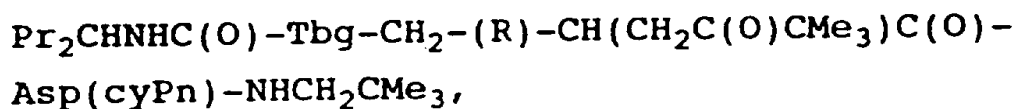
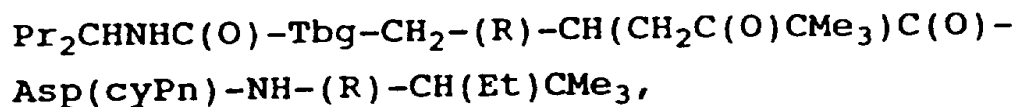
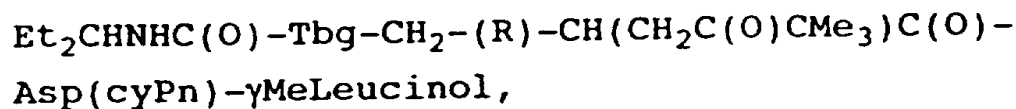
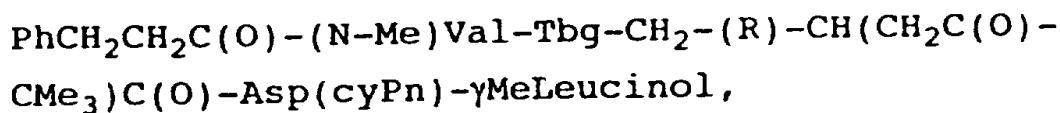
20、根据权利要求16所述组合物的应用，其中该核苷类似物是结构式2的化合物或其治疗学上可接受的盐，结构式2中 R^9 是氢，羟基或氨基。



2

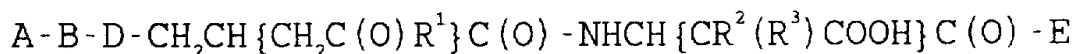
21、根据权利要求16所述组合物的应用，其中该核苷类似物选自下组：阿糖腺苷，碘脱氧尿苷，三氟尿苷，丙氧鸟苷，edoxudine, broavir, fiacitabine, penciclovir, famciclovir和rociclovir。

22、根据权利要求16所述组合物的应用，其中该肽衍生物选自下组：



其中该核苷类似物是无环鸟苷。

23、一种治疗具无环鸟苷抗性的单纯性疱疹病毒感染的药物组合物，包括作为活性成分的结构式(1)的肽衍生物，或其治疗学上可接受的盐以及一种药物学上可接受载体



1

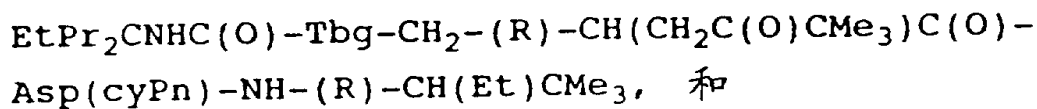
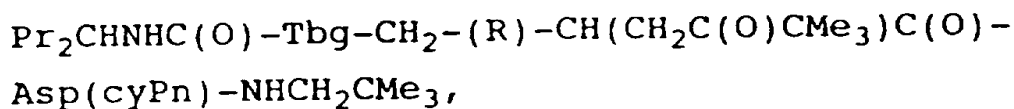
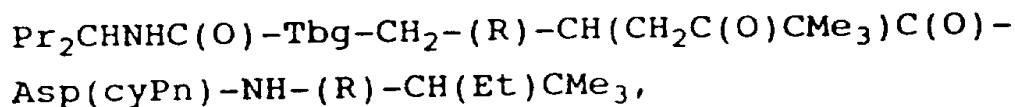
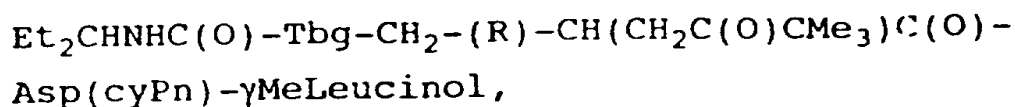
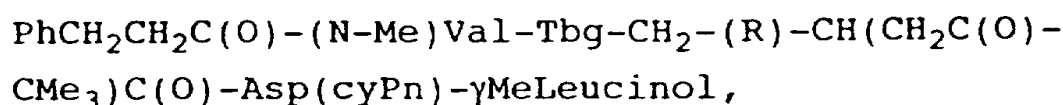
其中A是苯乙酰基，苯丙酰基，(4-氨基苯基)丙酰基，(4-氟苯基)丙酰基，(4-羟基苯基)丙酰基，(4-甲氧基苯基)-丙酰基，2-(苯

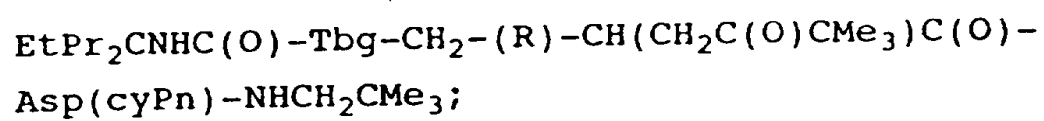
甲基)-3-苯丙酰基, 2-{(4-氟苯基)甲基}-3-(4-氟苯基)丙酰基, 2-{(4-甲氧基苯基)甲基}-3-(4-甲氧基苯基)丙酰基或苄基氨基羧基; B是(N-Me)-Val或(N-Me)-Ile; 或A和B一起形成一种饱和的烷基氨基羧基, 它选自于下列基团: 丁基氨基羧基, 1-甲基乙基氨基羧基, 1-甲基丙基氨基羧基, 1-乙基丙基氨基羧基, 1,1-二甲基乙基丁基氨基羧基, 1-乙基丁基氨基羧基, 1-丙基丁基氨基羧基, 1-乙基戊基氨基羧基, 1-丁基戊基氨基羧基, 1-乙基丁基氨基羧基, 2-乙基戊基氨基羧基, 1-甲基-1-丙基丁基氨基羧基, 1-乙基-1-丙基丁基氨基羧基, 1,1-二丙基丁基氨基羧基, (1-丙基环戊基)氨基羧基, 以及(1-丙基环己基)氨基羧基; D是Val, Ile或Tbg; R^1 是1-甲基乙基, 1,1-二甲基乙基, 1-甲基丙基, 1,1-二甲基丙基, 2,2-二甲基丙基, 环丁基, 环戊基, 环己基, 1-甲基环戊基, NR^4R^5 其中 R^4 是氢或低级烷基, 而 R^5 是低级烷基, 或者 R^4 和 R^5 与其结合的氮原子一起形成吡咯烷基, 哌啶子基, 吗啉代或者4-甲基-1-哌嗪基; R^2 是氢, R^3 是甲基, 乙基, 1-甲基乙基, 1,1-二甲基乙基, 丙基, 2-丙烯基或苄基, 携带 R^2 和 R^3 的碳原子具有(R)-构型, 或者 R^2 和 R^3 各自独立地是甲基或乙基, 或者 R^2 和 R^3 与其结合的碳原子一起形成环丁基, 环戊基, 或环己基; 而E是 NHR^6 其中 R^6 是2-甲基丙基, 2,2-二甲基丙基, 1(R),2,2-三甲基丙基, 1,1,2,2-四甲基丙基, 1(R)-乙基-2,2-二甲基丙基, 2-(R,S)-甲基丁基, 2,2-二甲基丁基, 3,3-二甲基丁基, 1(R),2,2-三甲基丁基, 1(R),3,3-三甲基丁基, 2-乙基丁基, 2,2-二乙基丁基, 2-乙基-1(R)-甲基丁基, 2-乙基-2-甲基丁基, 1(R)-乙基-3,3-二甲基丁基, 2,2-二甲

基戊基，顺式或反式-2-甲基环己基，2,2-二甲基环己基或环己基甲基；或者E是 $\text{NHCH(R}^7\text{)-Z}$ 其中携带 R^7 的碳原子具有(S)构型， R^7 是1,1-二甲基乙基，1-甲基丙基，2-甲基丙基，2,2-二甲基丙基或环己基甲基，以及Z是 CH_2OH ， C(O)OH ， C(O)NH_2 或者 C(O)OR^8 其中 R^8 是甲基，乙基或丙基。

24、根据权利要求23所述的药物组合物，其中该活性成分包括权利要求23定义的结构式1的肽衍生物或其治疗学上可接受的盐，与一种抗病毒核苷类似物或其治疗学上可接受的盐组成的组合物，用于治疗具无环鸟苷抗性的单纯性疱疹病毒感染。

25、根据权利要求24所述的药物组合物，其中该肽衍生物选自下组：





其中该核苷类似物是无环鸟苷。

说明书

抗击具无环鸟苷抗性的单纯 性疱疹病毒感染的方法

本发明涉及一种给哺乳动物治疗对无环鸟苷具抗性的疱疹感染的方法。该方法包括施用一种肽衍生物或将该肽衍生物与一种抗病毒核苷类似物结合给药。

无环鸟苷是在治疗疱疹感染中使用最广泛的药物。但是近年来,有关对无环鸟苷具抗性的疱疹感染的报道次数一直在上升;参见,例如P.A.Chatis et al., N.Engl.J.Med., 320, 297(1989)以及S.Safrin, Res.Virol., 143, 125(1992)。最近,在患有严重的人免疫缺陷病毒(HIV)感染的患者中越来越多地观察到这种具抗性感染的类型。后一种患者免疫受损后,结果导致他们非常易于受到单纯性疱疹病毒(HSV)1型并且尤其是2型的感染。

对具无环鸟苷抗性的HSV分离株特性的生化特征进行描述已受到极大关注;参见由C.S.Crumpacker, J.Am.Acad.Dermatol., 18 190(1988)发表的有关抗无环鸟苷HSV的综述。简而言之,具抗性的病毒株的一种或二种由病毒编码的酶,胸苷激酶(TK)或DNA聚合酶(POL)发生了功能性变化。

当将已感染了野生型HSV的细胞与无环鸟苷接触时,病毒TK与细胞酶相比能在更大程度上催化无环鸟苷的一磷酸化作用。随后由细胞酶将产生的该一磷酸化物转化成三磷酸无环鸟苷。这后者三磷

酸化物与病毒DNA聚合酶之间发生的相互作用比它与细胞DNA聚合酶之间发生的相互作用更易于进行。因此，该三磷酸化物由于成了该病毒酶的一种替换底物，以及由于具有链终止子的作用而能够降低病毒DNA的合成。

已有人描述了涉及病毒胸苷激酶的两抗性机理：(1)选择胸苷激酶缺陷型突变株，该突变株在感染后诱导的酶活性非常低，以及(b)选择具有其底物特异性被改变的胸苷激酶的突变株，该激酶能将胸苷磷酸化而不能将无环鸟苷磷酸化。

第三种抗性机理涉及DNA聚合酶，该抗性机理是选择其编码的聚合酶发生了变化的突变体，即该变异的酶对三磷酸无环鸟苷的失活作用具抗性。

基于上述抗性机理，可以将对无环鸟苷具抗性的HSV分离株划分为：胸苷缺陷型(TK^D)毒株，胸苷变异型(TK^A)毒株或DNA聚合酶变异型(POL^A)毒株。

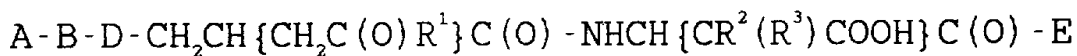
尽管已有人报道了一些用抗病毒剂膦甲酸成功地治疗抗无环鸟苷HSV感染的病例，但抗无环鸟苷型感染出现的频率一直在上升。这种现象在艾滋病患者中是普遍存在的问题；参见K.S.Erlich et al., N.Engl.J.Med., 320, 293(1989)以及S.Safrin, J.Acquired Immun.Defic.Syndr., 5 (Suppl.1), s29(1992)。因此迫切需要一种治理这种现象的方法。

本发明提供了一种用于治疗抗无环鸟苷疱疹感染的有效的，比较安全的方法。

该方法包括使用由P.L.Beaulieu, R.Deziel, N.Moss 以及R.Plante在1993年3月12日递交的共同在审专利申请PCT/CA/93/0095

中描述的肽衍生物，该在审专利申请涉及使用该化合物治疗疱疹感染。但是，已知能有效地抵抗疱疹感染的抗病毒剂不一定能有效地抵抗具无环鸟苷抗性的单纯性疱疹病毒；例如参见J. J. O'Brien and D.M.Campoli-Richards, *Drugs* 37, 233(1989), pp 252-253。因此发现本发明所述肽衍生物能有效地抵抗具无环鸟苷抗性的单纯性疱疹病毒是令人惊奇的并且是有益的。

本发明提供了一种给哺乳动物治疗具无环鸟苷抗性的单纯性疱疹病毒感染的方法。该方法包括给哺乳动物施用抵抗具无环鸟苷抗性的疱疹病毒有效量的结构式1的肽衍生物或其药用可接受盐：



1

其中A是苯乙酰基，苯丙酰基，(4-氨基苯基)丙酰基，(4-氟苯基)丙酰基，(4-羟苯基)丙酰基，(4-甲氧基苯基)-丙酰基，2-(苯甲基)-3-苯丙酰基，2-{(4-氟苯基)甲基}-3-(4-氟苯基)丙酰基，2-{(4-甲氧基苯基)甲基}-3-(4-甲氧基苯基)丙酰基或苄基氨基羧基；B是(N-Me)-Val或(N-Me)-Ile；或者A和B结合在一起形成一种饱和的烷基氨基羧基，它选自于下列基团：丁基氨基羧基，1-甲基乙基氨基羧基，1-甲基丙基氨基羧基，1-乙基丙基氨基羧基，1,1-二甲基乙基丁基氨基羧基，1-乙基丁基氨基羧基，1-丙基丁基氨基羧基，1-乙基戊基氨基羧基，1-丁基戊基氨基羧基，1-乙基丁基氨基羧基，2-乙基戊基氨基羧基，1-甲基-1-丙基丁基氨基羧基，1-乙基-1-丙基丁基氨基羧基，1,1-二丙基丁基氨基羧基，(1-丙基环戊基)氨基羧基以及(1-丙基环己基)氨基羧基；D是Val, Ile或Tbg；R¹是1-甲基乙基，1,

1-二甲基乙基, 1-甲基丙基, 1,1-二甲基丙基, 2,2-二甲基丙基, 环丁基, 环戊基, 环己基, 1-甲基环戊基, NR^4R^5 其中 R^4 是氢或低链烷基而 R^5 是低链烷基, 或者 R^4 和 R^5 与结合它们的氮原子一起形成吡咯烷基 (pyrrolidino), 哌啶子基 (piperidino), 吗啉代 (morpholino) 或者4-甲基-1-哌嗪基 (4-methylpiperazino); R^2 是氢以及 R^3 是甲基, 乙基, 1-甲基乙基, 1,1-二甲基乙基, 丙基, 2-丙烯基或苄基, 携带 R^2 和 R^3 的碳原子具有(R)-构型, 或者 R^2 和 R^3 各自是甲基或乙基, 或者 R^2 和 R^3 与结合它们的碳原子一起形成环丁基, 环戊基或环己基; 而E是 NHR^6 其中 R^6 是2-甲基丙基, 2,2-二甲基丙基, 1(R), 2,2-三甲基丙基, 1,1,2,2-四甲基丙基, 1(R)-乙基-2,2-二甲基丙基, 2-(R,S)-甲基丁基, 2,2-二甲基丁基, 3,3-二甲基丁基, 1(R), 2,2-三甲基丁基, 1(R), 3,3-三甲基丁基, 2-乙基丁基, 2,2-二乙基丁基, 2-乙基-1(R)-甲基丁基, 2-乙基-2-甲基丁基, 1(R)-乙基-3,3-二甲基丁基, 2,2-二甲基戊基, 顺式或反式-2-甲基环己基, 2,2-二甲基环己基或环己基甲基; 或E是 $\text{NHCH(R}^7\text{)-Z}$ 其中携带 R^7 的碳原子具有(S)-构型, R^7 是1, 1-二甲基乙基, 1-甲基丙基, 2-甲基丙基, 2,2-二甲基丙基或环己基甲基和Z是 CH_2OH , C(O)OH , C(O)NH_2 或 C(O)OR^8 其中 R^8 是甲基, 乙基或丙基。

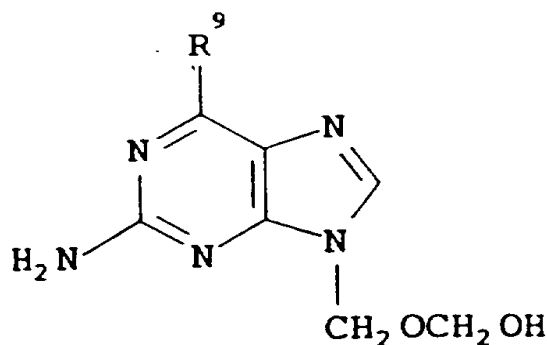
本发明用于治疗抗无环鸟苷单纯性疱疹感染的优选的方法包括施用结构式1所述肽或其药物学上可接受的盐, 结构式1中A是苯丙酰基, 2-(苯甲基)-3-苯丙酰基或苄氨基羧基; B是(N-Me)Val; D是Tbg; R^1 是1-甲基乙基, 1,1-二甲基乙基, 1-甲基丙基, 1,1-二甲基丙基, 2,2-二甲基丙基, 环丁基, 环戊基, 环己基或1-甲基环戊基; R^2 是氢并且 R^3 是甲基, 乙基, 1-甲基乙基, 丙基或苄基,

并且携带 R^2 和 R^3 的碳原子具有(R)-构型, 或者 R^2 和 R^3 各自单独是甲基或乙基, 或者 R^2 和 R^3 与结合它们的碳原子一起形成环丁基, 环戊基或环己基; 并且E是 NHR^6 其中 R^6 是2,2-二甲基丙基, 1(R),2,2-三甲基丙基, 1(R)-乙基-2,2-二甲基丙基, 2,2-二甲基丁基或者1(R)-乙基-3,3-二甲基丁基或者E是 $NHCH(R^7)-Z$, 其中携带 R^7 的碳原子具有(S)-构型, R^7 是2,2-二甲基丙基并且Z是 CH_2OH , $C(O)OH$, $C(O)NH_2$ 或者 $C(O)OR^8$ 其中 R^8 是甲基, 乙基或丙基。

用于治疗抗无环鸟苷的单纯性疱疹感染的另一种优选方法包括施用结构式1所述的肽衍生物或该肽衍生物的药物学上可接受的盐, 其中结构式1中的A和B结合在一起形成一种饱和的烷基氨基羰基, 它选自于下列一组基团: 1-乙基丙基氨基羰基, 1-乙基丁基氨基羰基, 1-丙基丁基氨基羰基, 2-乙基戊基氨基羰基, 1-甲基-1-丙基丁基氨基羰基, 1-乙基-1-丙基丁基氨基羰基, 1,1-二丙基丁基氨基羰基以及(1-丙基环戊基)氨基羰基; 以及D, R^1 , R^2 , R^3 和E都按照上例中的定义。

本发明的另一方面涉及一种给哺乳动物治疗抗无环鸟苷疱疹病毒感染的方法, 该方法包括将能有效地抵抗具无环鸟苷抗性的疱疹所需量的结构式1所述肽衍生物或其药物学上可接受盐, 和一种抗病毒核苷类似物或其药物学上可接受盐联合施药给所述哺乳动物。

联合给药时使用到的抗病毒核苷类似物是一种可以酶促转变(体内)为疱疹DNA聚合酶抑制剂的一种病毒DNA聚合酶抑制剂, 和/或转变为该酶的一种替换底物的物质。该抗病毒核苷类似物可选自于已知的核苷类似物。本发明所述的优选的核苷类似物包括无环鸟苷和其类似物; 例如结构式2的化合物:



2

其中R⁹是氢, 羟基或氨基, 或该化合物的药物学上可接受的盐。

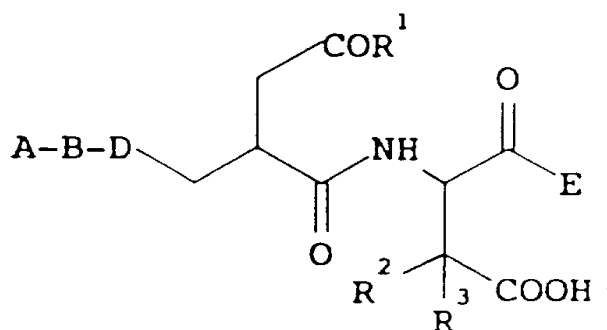
(结构式2中R⁹是羟基时该化合物为无环鸟苷。)

根据本发明使用的其他优选的抗病毒核苷类似物包括阿糖腺苷, 碘脱氧尿苷, 三氟尿苷, 丙氧鸟苷, edoxudine, brovavir, fiacitabine, penciclovir, famciclovir和rociclovir。

附图描述

图1和2图解表示应用isobole方法证明一个研究过程中的增效性时获得的结果, 所述研究是涉及将无环鸟苷和通式1的肽衍生物联合给药用于抵抗具无环鸟苷抗性的单纯性疱疹病毒时显示的作用。

换一种方式, 结构式1可以按如下描述



1

术语“残基”在专指一种氨基酸或氨基酸衍生物时是指通过从其相应的 α -氨基酸中去除羧基上的羟基和 α -氨基的一个氢以后得到的基团。

总的来说，在本文中用于命名氨基酸和保护性基团的缩写是以IUPAC-IUB生化命名委员会推荐内容为依据，参见European Journal of Biochemistry 138, 9(1984)。例如Val, Ile, Asp和Leu分别代表L-缬氨酸残基，L-异亮氨酸残基，L-天冬氨酸残基和L-亮氨酸残基。

位于结构式1肽衍生物的主线性轴(即主链)(末端基团A和(E的)Z除外，但包括当E为如本文中定义的 $\text{NHCH}(\text{R}^7)\text{-Z}$ 时携带 R^7 的碳原子)上的不对称碳原子具有S构型。但有一种情况除外，即对于携带 $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}^1$ 侧链的碳原子而其中 R^1 为本文中定义的低级烷基或低级环烷基时。对于这种例外情况，该碳原子具有R构型。

位于一个氨基酸或衍生的氨基酸残基的侧链上，以及位于末端A基团，和末端E基团(当E代表如本文中定义的 NHR^6)上的不对称碳原子可具有S或R构型。

“Me”，“Et”，“Pr”和“Bu”代号分别表示烷基基团甲基，乙基，丙基和丁基。

例如，代号“ MeEt_2C ”和“ EtPr_2C ”分别表示1-乙基-1-甲基丙基和1-乙基-1-丙基丁基基团。

代号“Tbg”代表氨基酸残基(S)-2-氨基-3,3-二甲基丁酸。
“ γMeLeu ”代表氨基酸残基(S)-2-氨基-4,4-二甲基戊酸。代号“ $\gamma\text{MeLeucinol}$ ”代表(S)-2-氨基-4,4-二甲基戊醇，该戊醇 α -氨基上移去一个氢。

在本文中使用的其它代号是：(N-Me)Val表示(S)-3-甲基-2-(甲氨基)-丁酸残基；(N-Me)Ile表示残基(S)-3-甲基-2(甲氨基)戊酸；(N-Me)₃Tbg表示残基(S)-2(甲氨基)-3,3-二甲基丁酸；ASP(cyBu)表示残基(S)- α -氨基-1-羧基环丁烷乙酸；以及Asp(cyPn)表示残基(S)- α -氨基-1-羧基环戊烷乙酸。

本文中使用的术语“低级烷基”，单独形式或与其他基团相结合形式，是指含有1-6个碳原子的直链烷基基团以及含有3-6个碳原子的支链烷基基团，并且包括甲基，乙基，丙基，丁基，己基，1-甲基乙基，1-甲基丙基，2-甲基丙基和1,1-二甲基乙基。

本文中使用的术语“1-(低级烷基)-(低级环烷基)”是指一种低级环烷基基团，它在1位上携带一个低级烷基取代基；例如，1-乙基环丙基，1-丙基环戊基和1-丙基环己基。

本文中使用的术语“低级环烷基”，单独形式或与其他残基结合在一起形式是指含有3-6个碳原子的饱和的环状烃基团，包括环丙基，环丁基，环戊基和环己基。

本文中使用的术语“药学上可接受载体”是指作为活性成分赋剂的一种无毒的，通常为惰性的材料，该赋形剂并不会对该活性成分产生有害影响。

本文中使用的术语“生理学上可接受的载体”是指一种或多种非毒性赋形剂的一种可接受的化妆品用的赋形剂，所述赋形剂不会与所包含的活性成分发生反应或降低其活性。

术语“有效量”指该抗病毒剂的预先测定的抗病毒量，即足以在体内有效地抵抗病毒生物体的试剂的量。

本文中所用的术语“偶联剂”是指能使一种氨基酸或肽的羧基

与另一种氨基酸或肽的游离氨基发生脱水偶合从而在两种反应物之间形成酰胺键的试剂。同样，这样的试剂能使一种酸和一种醇发生偶合而形成相应的酯。这些试剂通过激活羧基而促使或有助于发生脱水偶合。通常在有关肽化学的课本中描述这些偶联剂和活化基团；例如，E.Schroder and K.L.Lubke, "The Peptides", Vo.1, Academic Press, New York, N.Y., 1965, pp 2-128, and K.D.Kopppe, "Peptides and Amino acids", W.A.Benjamin, Inc., New York, N.Y., 1966, pp 33-51。偶联剂的例子有二苯基磷酰叠氮，1,1'-羰基二咪唑，二环己基碳化二亚胺，N-羟基琥珀酰亚胺，或者有二环己基碳化二亚胺存在时的1-羟基-苯并三唑。一种非常可行的和有用的偶联剂是由B.Castro等人在Tetrahedron Letters, 1219 (1975)，也可参见D.Hudson, J.Org.Chem., 53, 617 (1988)描述的(苯并三唑-1-基氧)-三个-(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐，可以单独使用该化合物或者在1-羟基苯并三唑存在下使用。还有另一种非常可行的和有用的偶联剂是可通过商业途径购买的2(1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐。

本发明中使用的抗病毒核苷类似物及其药物学上可接受的盐是本领域内熟知的一类化合物。正如上文所述，这类化合物成员的特征在于其介导抵抗疱疹病毒的抗病毒作用的方式，即通过体内抑制病毒DNA聚合酶来实现抗病毒效果。这类化合物的重要成员有无环鸟苷以及由H.J.Schaeffer在美国专利4,199,574(1980年4月22日公布)中描述的，也可参见H.J.Schaeffer等人，Nature (London), 272, 583 (1978)和T.A.Krenitsk等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 81, 3209 (1984)中描述的无环鸟苷类似物。其中R⁹为羟基时，结构式2

的化合物为“无环鸟苷”，其还有熟知的化学命名9-[(2-羟基-乙氧基)甲基]鸟嘌呤。其中R⁹为氢时的结构式2的各称为6-脱氧无环鸟苷和2-氨基-9-[(2-羟基乙氧基)甲基]腺嘌呤；当R⁹是氨基时通式2的化合物的化学名称为2,6-二氨基-9-[(2-羟基乙氧基)甲基]嘌呤。

当R⁹是羟基时结构式2的化合物以其互变异构形式即2-氨基-1,9-二氢-9-[(2-羟基乙氧基)甲基]-6H-嘌呤-6-酮形式存在是不言而喻的，并且该化合物可以是两种互变异构形式的混合物，在该混合物中各种互变异构体的百分比依据该化合物的自然环境而定。对于具有可烯醇化羰基的其他抗病毒核苷类似物也可能有互变异构形式。

本发明中考虑使用的其他抗病毒核苷包括阿糖腺苷(9-β-D-阿拉伯呋喃糖基腺嘌呤一水化合物)，参见R.J.Whitley等人，N. Engl. J. Med., 307, 971 (1982)；碘脱氧尿苷(2'-脱氧-5-碘尿苷)，参见W.H.Prusoff, Biochim. Biophys. Acta, 32, 295 (1959)；三氟尿苷[2'-脱氧-5-(三氟甲基)尿苷]，参见C.Heidelberger, 美国专利3,201,387 (1965年8月17日颁发)；丙氧鸟苷9-[(1,3-二羟基-2-丙氧基)甲基]-鸟嘌呤，参见J.P.Verheyden 和 J.C. Martin, 美国专利4,355,032 (1982年10月19日颁发)；edoxudine (5-乙基-2'-脱氧尿苷)，参见K.K.Gauri, US专利3,553,192 (1971年1月5日颁发)；brovavir [(E)-5-(2-溴乙烯基)-2-脱氧尿苷]，参见Y.Benoit等人，Eur. J. Pediatrics, 143, 198 (1985)；fiacitabine (2'-氟-脱氧-5-碘尿苷)，参见B.Leyland-Jones等人，J. Infect. Dis., 154, 430 (1986)；penciclovir

(9-[4-羟基-3-(羟基-甲基)-丁基]鸟嘌呤, 参见S.E.Fowler等人, Br.J.Clin.Pharmacol., 28, 2369 (1989); famciclovir (9-[4-乙酰氧基-3-(乙酰氧基甲基)丁基]腺嘌呤, 参见P.A.V.Hodge等人, Antimicrob.Agents Chemotherap., 33, 1765 (1989); 以及rociclovir (9-[(1,3-二异丙氧基-2-丙氧基)甲基]腺嘌呤, 参见E.Winklemann等人, Arzneim.-Forsch., 38, 1545 (1988)。

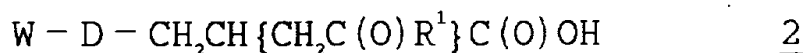
制备结构式1肽衍生物的方法

使用与肽合成中普遍采用的方法 (例如偶合氨基酸残基和/或肽片段的标准液相方法) 可以制备结构式1的肽衍生物。有关对这些方法的描述可参见例如, E.Schroder and K.Lubke, 上文描述的教科书丛书, “The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology”, E.Gross等人编辑, Academic Press, New York, N.Y., 1979-1987, Vol.1-8, 以及J.M.Stewart以及J.D.Young; “Solid Phase Peptide Synthesis”, 2nd ed., Pierce Chem.Co.Rockford, IL, USA, 1984。

上面介绍的用于合成肽衍生物的方法的共同特征是用合适的保护性基团保护各种氨基酸残基或衍生的氨基酸残基 (或者, 如果需要, 该肽衍生物的非肽片段) 的反应性侧链基团, 其中所述保护性基团可以防止在所述位点上发生化学反应, 直至最后去除该保护基团。另一共同点是当一个氨基酸或一个片段的羧基发生反应时保护其 α -氨基, 随后选择性地去除该 α -氨基其保护性基团, 以便在该位点上发生后面的反应。还有一个共同特征是用一个合适的保护性基团在起始时保护该氨基酸残基或肽片段上的C-末端羧基 (如果存

在, 该羧基是该肽衍生物的C-末端功能基团), 该保护性基团阻止在该位点上发生化学反应, 直至所需的肽衍生物序列装配完之后去除该保护性基团。

结构式1的肽的一个关键的中间产物是结构式2的中间产物。



其中W是一个 α -氨基保护性基团, 例如, 叔-丁基-氧-羰基(BOC), 苄基-氧-羰基(Z)或芴-9-基甲氧基羰基(Fmoc), 以及D和 R^1 按本文中定义的内容。通过采用迈克尔(Michael)加成法将结构式 $W-D-CH_2C(O)OCH_2CH=CH^2$ 的烯丙基酯加到结构式(低级烷基)- $OC(O)CH=CHC(O)R^1$ 的富马酰衍生物上得到结构式为 $W-D-CH\{C(O)-OCH_2CH=CH_2\}CH\{CH_2C(O)R^1\}C(O)O-(\text{低级烷基})$ 的迈克尔加合物, 从而可以制备该化合物。

此后, 根据R.Deziel, Tetrahedron Letters, 28, 4371 (1987)的方法在吡咯烷存在下用四个三苯基膦钯以及三苯基膦处理得到的该化合物, 这种处理作用导致烯丙基酯发生水解并且接着去羧基得到关键的中间产物相应的烷基酯。这后一种酯在碱例如氢氧化钠或氢氧化锂存在下发生水解得到关键中间产物非对映异构体的混合物。

另一种可采用的方法, 是采用下列步骤制备通式2所示的关键中间产物, 其中W和D是按照上面举例中定义的内容, 而 R^1 是 NR^4R^5 其中 R^4 和 R^5 各自是低级烷基或者 R^4 和 R^5 与它们相结合的氮原子一起形成吡咯烷基, 哌啶子基, 吗啉代或者4-甲基-1-哌嗪基: 采用迈克尔反应发生的条件将结构式 $BzlOC(O)CH=CHC(O)OBzl$ {(E)-2-丁烯二酸二苄酯的富马酰衍生物与上面介绍的结构式 $W-D-CH_2C(O)O-$

$\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ (其中W和D都按本文中定义内容) 的烯丙基酯发生反应得到相应的结构式为 $\text{W}-\text{D}-(\text{RS})-\text{CH}\{\text{CH}\{\text{C}(\text{O})\text{OBzl}\}\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OBzl}\}\text{C}(\text{O})-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ 的迈克尔加合物。在吡咯烷存在下用四个三苯基膦铯以及三苯基膦处理这后一种加合物 (Deziel, vide 文献同上) 得到结构式为 $\text{W}-\text{D}-\text{CH}_2-(\text{R},\text{S})-\text{CH}\{\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OBzl}\}\text{C}(\text{O})\text{OBzl}$ 的相应的二苄基酯。随后在氢氧化铯存在下在碳上发生氢解, 得到相应的二羧酸, 将它与过量的乙酸酐一起加热而转化为相应的酸酐。在吡啶存在下将该酸酐与合适的二级胺发生反应, 得到各种部位异构体 (regioisomer) 的混合物, 该混合物中结构式为 $\text{W}-\text{D}-\text{CH}_2-(\text{RS})-\text{CH}\{\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NR}^4\text{R}^5\}-\text{C}(\text{O})-\text{OH}$ (其中W, D和 NR^4R^5 是按照本文中定义内容) 的所需要的异构体占优势。将这一产物转化为苄基酯, 并且采用高效液相色谱法将得到的部位异构体混和物进行分离, 得到作为优势产物的所需的异构体。在氢氧化铯存在下将这一产物的碳原子随后发生氢化产生关键中间产物结构式2, 其中W和D都按本文中定义, R^1 和 NR^4R^5 也按本文定义。

因此, 一般来说, 采用次序为肽序列, 将合适的氨基酸或衍生的氨基酸残基, 以及该肽的非肽片段 (例如关键中间产物) (如果需要, 可合适地保护这些片段) 逐步偶合, 以及在逐步偶合完成之后消除所有保护基因 (如果存在), 从而制备得到结构式1的肽。更具体的方法将在下文实施例部分描述。

可以制备本发明的结式1肽的治疗学上可接受的盐形式。对于一种特定的肽含有具碱作用的残基的情况, 该碱的这样的盐的例子有那些有机酸盐例如乙酸盐, 乳酸盐, 琥珀酸盐, 甲烷磺酸盐或对-甲苯磺酸盐, 以及聚合酸例如丹宁酸盐或者羧甲基纤维素盐, 还

可以是无机酸盐如与氢卤酸，例如盐酸，或硫酸，或磷酸所形成的盐。如果需要，可按R.A.Boissonnas等人，*Helv.Chim.Acta*, 43, 1849 (1960)描述的方法用适当的离子交换树脂处理，将特定的酸加成盐转变为另一种酸加成盐，例如一种无毒的，药物学上可接受的盐。

对于一种特定的肽含有一个或多个游离羧基团的情况，该羧基的所述盐的例子有钠盐，钾盐或钙盐，或者有机碱盐，例如与三乙胺或N-甲基吗啉所形成的盐。

抗疱疹活性

采用显示结构式1的肽衍生物对具无环鸟苷抗性单纯性疱疹病毒1型和2型(HSV-1和HSV-2)的抑制作用的生化学、微生物学以及生物学方法可以证明该化合物的抗病毒活性。

用于证明结构式1的肽衍生物对病毒复制的抑制作用的方法是细胞培养技术，参见例如，T.Spector等人，*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 82, 4254 (1985)。

可用实验动物证明该肽衍生物的治疗效果，例如通过以患有单纯性疱疹病毒诱导的眼睛疾病的鼠模型进行抗病毒药物检测为依据实施的检测方法，参见C.R.Brandt等人，*J.Virol.Meth.*, 36, 209 (1992)描述。

当将本发明的一种肽衍生物或其一种治疗学上可接受的盐用作一种抗病毒剂时，可将它包含于一种赋形剂中给温血动物例如人，猪或马局部或全身给药，该赋形剂含有一种或多种药物学上可接受载体，该药剂各成份比例由该肽衍生物的溶解性和化学性质以及所选择的给药途径和标准的生物学惯例决定。对于局部给药，可将该

衍生物与药物学上可接受赋形剂一起配制，活性成分含量为0.1-5%，优选为0.5-2%。这种药剂可以是溶液，乳膏或洗剂。

对于全身给药，可将结构式1的肽衍生物与药学上可接受的赋形剂或载体结合成组合物形式给患者口服或者静脉注射、皮下注射或肌肉内注射。注射给药时，优选的是使用该肽溶于一种无菌水相赋形剂形成的溶液，该赋形剂也可以含有其他溶质如缓冲剂或防腐剂以及用于保持该溶液等渗性的足够量的药物学上可接受的盐或足够量的葡萄糖。

用于上面介绍的药剂中的适当的赋形剂或载体描述于经典的药理学课本中，例如“Remington's Pharmaceutical Sciences”，18th ed, Mack Publishing Company, Easton, Penn., 1990。

该肽衍生物的剂量随给药方式和所选择的特定的活性试剂而变化。此外，也随进行治疗的特定的患病个体而变化。通常，开始治疗时给药量呈小幅增长，直到达到该条件下的最大效果。一般来讲，最令人满意的是将该肽衍生物以某一浓度水平给药，在这一浓度水平时通常能有效地抗病毒，但不会产生任何有害或有毒的副作用。

至于局部使用该药，将该肽衍生物的合适的局部用制剂直接施用到身体的受感染区，例如皮肤，眼睛或口腔或生殖腔部位，所施用该药剂的量足于覆盖该受感染区。这种过程应重复进行，例如每隔4-6小时重复一次直到损伤痊愈。

至于全身用药，将结构式1所述肽衍生物以每天每公斤体重施用1.0 mg-10 mg的剂量给药，尽管会出现前面介绍的变化。但是，最令人满意的剂量水平是每天每千克体重使用1.0 mg-5 mg的范围，从而获得有效结果。

虽然上文中公开的制剂用于治疗疱疹病毒感染时显示出它是一种有效和相对安全的药剂，但是并不排除将这些制剂与其他抗病毒药剂或试剂合理地同时给药时会得到更有效的结果。这样的抗病毒药物或试剂包括前面描述的抗病毒核苷，抗病毒表面活性试剂或抗病毒干扰素例如由S. S. Asculai 和F. Rapp 在美国专利4,507,281 (1985年3月26日) 中公开的内容。

更具体地讲，对于采用同时给药方法治疗具无环鸟苷抗性的疱疹病毒感染，已经发现将一种抗病毒核苷类似物与结构式1的肽衍生物结合起来使用时可协同地增强该类似物的抗疱疹活性，而没有伴随毒副作用的增加。因此，本发明提供了一种给哺乳动物治疗具无环鸟苷抗性的疱疹感染的药物组合物，该药物组合物含有一种药物学上或兽医学上可接受的载体，以及有效量的一种抗病毒核苷类似物或其药物学上可接受的盐，与结构式1的肽衍生物或其药物学上可接受的盐的组合物。

当术语“协同效应”用于表示上文中所定义的核苷类似物与结构式1的肽衍生物的组合物抗病毒或抗疱疹活性时，它是指该抗病毒或抗疱疹效应大于预定的两种单独成分结合后的加和作用。

在用本发明的组合物治疗具无环鸟苷抗性的疱疹感染时，将该组合物包含于含有一种或多种药物学上可接受载体的赋形剂中给温血动物例如人，猪或马给药，该组合物中各成分的比例由该核苷类似物和结构式1的肽衍生物的溶解性和化学特性，以及所选择的给药途径，经典的生物学惯例决定，也取决于该两种活性成分的相对含量能否提供协同的抗病毒效应。在一种优选的方法中，将该组合物局部给药。例如，将该两种活性试剂（即抗病毒核苷类似物和结

构式1的肽衍生物或其治疗学上可接受的盐)与药物学上可接受的赋形剂配制成溶液形式,乳剂形式,乳油形式或洗剂形式。这种制剂中可以含有重量百分率为0.01-1.0%的核苷类似物或其治疗学上可接受的盐,以及含有约0.05-1%重量的结构式1的肽衍生物或其治疗学上可接受的盐。

在任何情况下,该两种活性试剂都以能提供协同抗疱疹效应的量存在于该药物组合物中。

下面的实施例进一步描述本发明。所述温度是指摄氏温度。溶液百分比或比例表示体积与体积的相对比值,除非另有说明。核磁共振光谱是由Bruker 200 MHz或400 MHz分光计记录的(在开头记载了400 MHz光谱);所记录的化学位移(δ)是指在一百万中所占比例。在实施例中使用的缩写包括Boc:叔-丁氧羰基;Bu:丁基;Bzl:苄基;DMF:二甲基甲酰胺;Et:乙基;EtOH:乙醇;EtOAc:乙酸乙酯;Et₂O:二乙基醚;Me:甲基;MeOH:甲醇;Pr:丙基;TLC:薄层层析;THF:四氢呋喃。

实施例1

偶合反应的总方案

{也可参见R.Knorr.等人, Tetrahedron Letters, 30, 1927 (1989).}

将第一种反应物,即一种游离胺(或其盐酸盐)溶于CH₂Cl₂或乙腈中,将该溶液冷却至4°C。在氮气存在下,将4当量的N-甲基吗啉加到该振动的溶液中。在20分钟之后,加入1当量的第二种反应物即一种游离羧酸,以及1.05当量的偶联剂。为了上述目的,实用和有效的偶联试剂是(苯并三唑-1-基氧)三-(二甲基胺)磷六氟

磷酸盐或者优选的是2-(1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N',-四甲基脲四氟硼酸盐。用TLC法监控该反应进程。在反应完成之后,在减压下蒸发CH₂Cl₂ (或乙腈)。将残留物溶于EtOAc。用1N柠檬酸水溶液, 10% Na₂CO₃水溶液和盐水依次洗涤该溶液。在减压下将有机相干燥(MgSO₄), 过滤并浓缩至干。按照Still的急聚色谱法(flash chromatography technique) {W.C.Still等人, J.Org.Chem., 43, 2923 (1978)}在硅胶(SiO₂)上纯化该残留物。

实施例2

中间产物H-Asp(cyPn)(Bzl)-NH-(S)-CH(CH₂CMe₃)CH₂OBzl的制备

(a) (s)- α -叠氮基-1-{(苯甲氧基)羰基}-环戊烷乙酸: 按照利用Evan的辅助物(参见D.A.Evans等人, J.Amer.Chem.Soc., 112, 4011 (1990)]的不对称叠氮化方法, 以及M.N.Aboul-Enein等人, Pharm.Acta Helv., 55, 50 (1980)的描述, 由2-氧代螺旋[4.4]壬烷-1,3-双酮制备该化合物。

更明确地说, 在氩气存在, -40°C条件下将丁基锂(469 ml, 750 mmol)的1.6 M 己烷溶液逐滴加到存在于无水THF中的手性辅助物4(S)-(1-甲基乙基)-2-噁唑烷酮(4(S)-(1-methylethyl)-2-Oxazolidinone) {96.8 g, 750 mmol, 由L.N.Pridgen和J.Prol., J.Org.Chem., 54, 3231 (1989)}中。将该混合物在-40°C摇动30分钟, 然后冷却至-78°C。将2-氧代螺旋[4.4]壬烷-1,3-双酮滴加到该冷却的混合物中。然后将该混合物在0°C振荡1小时。此后, 将20% (w/v) 柠檬酸水溶液(600 ml)加到该混合物中。将有机相分离开, 用EtOAc萃取水相。将合并起来的有机相用盐水洗涤,

干燥(MgSO_4)并在减压条件下浓缩,得到一种粉红色固体(300 g)形式的3 - {2 - (1 - 羧基 - 环戊基) - 1 - 氧代乙基} - 4(S) - (1 - 甲基乙基) - 2 - 噁唑烷酮。

将这一种粉红色固体(约750 mmol)溶解于乙腈(1升)中。将苺基溴(128.3克, 89.2 ml, 750 mmol)和1,8 - 二氮杂双环[5.4.0] - 7 - 十一烯(114克, 112 ml, 750 mmol)加到该溶液中。将该混合物在氩气中振动16小时。在减压条件下除去挥发物。将残留物溶解于 H_2O /EtOAc中。分离出有机相,用10% (w/v)柠檬酸水溶液和盐水洗涤,干燥(MgSO_4)并在减压条件下浓缩至干燥,得到一种油。将该油从己烷/EtOAc中结晶出来得到一种白色固体(204克, 73%)形式的相应苺基酯。

将最后得到的化合物(70克, 187 mmol)溶于无水THF(200 ml)中的溶液冷却至 -78°C 。将含有6% (w/v)异丙基苯的钾1,1,1,3,3,3 - 六甲基二硅氮烷(286 ml, 189 mmol)的0.66 M THF溶液在15分钟内加入到该冷却溶液中。将该混合物在 -78°C 振动45分钟。将溶于无水THF (100 ml)中的叠氮化2,4,6 - 三异丙基苯磺酸(67克, 216 mmol)一次加入该冷却混合物中,接着在二分钟之后,加入冰醋酸(50 ml, 860 mmol)。将该混合物加热,在 $35 - 45^\circ\text{C}$ 振动1小时。在减压条件下除去挥发物。用己烷/EtOH (4:1, 1.7升)将该黄色残留物磨碎。将得到的白色固体收集到一张滤纸上。将滤液与 SiO_2 (230 - 240目过筛)混合。在减压条件下除去挥发物,并在减压条件下将得到的固体在 35°C 干燥以便除去异丙基苯。然后将残留的固体置于一个 SiO_2 柱子中。用9:1的己烷 - EtOAc洗脱残留的固体和 SiO_2 ,并将洗脱液浓缩后得到3 - {[2(S) - 叠氮基 - 1 - 氧代 - 2 - {1 - {(苯

基甲氧基)羰基}环戊基}-乙基}-4(S)-(1-甲基乙基)-2-噁唑烷酮(66克, 86%)。

将最后得到的化合物(13.42克, 32.4 mmol)溶于THF/H₂O(3:1, 608 ml)中的溶液冷却到0°C。将H₂O₂/H₂O(3:7, 16.3 ml, 518 mmol的H₂O₂)加到该冷却溶液中; 随后加入LiOH·H₂O(2.86克, 68.2 mmol)。将该混合物在0°C振荡45分钟, 然后用10% (w/v)的硫酸钠的水溶液(400 ml)猝灭。在加入NaHCO₃(1.93克)之后在减压条件下将该混合物浓缩。通过连续萃取(NaHCO₃水溶液/氯仿)20小时回收手性辅助物。此后, 将该水相冷却至0°C并加入浓HCl使其呈酸性, 然后用EtOAc提取。用盐水洗涤提取物, 干燥(MgSO₄)并在减压条件下浓缩得到白色固体(8.2克, 84%)形式的所需化合物。该化合物的¹H NMR (CDCl₃)结果显示: 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)以及7.4 (m, 5H)。

在本实施例的(C)部分中使用了该化合物。

(b) NH₂-(S)-CH(CH₂CMe₃)CH₂OBzl: 根据A.Giannis和K.Sandhoff, Angew.Chem.Int.Ed.Engl., 28, 218 (1989)的方法用LiBH₄/Me₃SiCl还原H-γ MeLeu-OH得到氨基醇NH₂-(S)-CH(CH₂CMe₃)CH₂OH。在氮气中, 4°C条件下将前一化合物(812 mg, 6.2 mmol), 三乙胺(659 mg, 6.51 mmol)以及二叔丁基重碳酸盐(1.42克, 6.51 mmol)溶于无水THF(15 ml)中得到的混合物振荡15分钟, 然后在室温下振荡4小时。在减压条件下将THF蒸发。将残留物溶于EtOAc中。用10%柠檬酸水溶液, 5% NaHCO₃水溶液以及盐水洗涤该溶液。将该有机相干燥(MgSO₄)并在减压条件下浓缩至干。通过急聚色谱法(SiO₂,

洗脱液己烷 - EtOAc, 2:1) 将该残留物进行纯化。得到 Boc - NH - (S) - CH(CH₂CMe₃) - CH₂OH (1.23克, 86%)。

将二硫酸四丁基铵(106 mg)和50% MaOH水溶液(3 ml)依次加入到 Boc - NH - (S) - CH(CH₂CMe₃)CH₂OH (1.23克, 5.35 mmol)的苄基氯(13 ml)溶液中。将得到的混合物在35 - 40°C振动90分钟。用 EtOAc稀释, 并用H₂O和盐水洗涤。将有机相干燥(MgSO₄)并在减压条件下浓缩至干燥状态。将残留物溶解于己烷中。将该溶液注入到 SiO₂柱中。用己烷洗脱该柱, 以便除去苄基氯, 然后用己烷 - EtOAc (2:1)洗脱至得到 Boc - NH - (S) - CH(CH₂CMe₃)CH₂OBzl。这后一化合物的¹H NMR (CDCl₃)结果显示 δ 0.95 (s, 9H), 1.42 (s, 9H), 1.30 - 1.55 (m, 2H), 3.42 (d, J = 4 Hz, 2H), 3.88 (宽, 1H), 4.54 (m, 3H), 7.23 - 7.4 (m, 5H)。将这后一化合物(1.28克, 3.99 mmol)溶于6N HCl/二噁烷(10 ml)中。将该溶液在氮气, 4°C条件下振动45分钟。蒸发掉溶剂得到所需化合物的盐酸盐(1.05克)。在本实施例的下一节中将使用不经进一步纯化的该化合物。

(c) 本实施例的标题化合物: 按照实施例1的偶合步骤, 利用前面章节中的NH₂ - (S) - CH(CH₂CMe₃)CH₂OBzl的盐酸盐作为第一反应物, 以本实施例(a)节中的(S) - α - 叠氮 - 1 - {(苯基甲氧基) - 羰基}环戊烷乙酸作为第二反应物, 得到N - {(S) - 1 - 苄氧基甲基 - 3,3 - 二甲基丁基} - (S) - α - 叠氮 - 1 - {(苯甲氧基)羰基}环戊烷乙酰胺。采用N.Maiti等人, Tetrahedron Letters, 27, 1423 (1986)的方法将得到的化合物在MeOH中用氯化锡(II)还原得到本实施例的标题化合物。该化合物的¹H NMR (CDCl₃)分析结果显示: δ 0.98 (s, 9H), 1.22 - 2.25 (m, 12H), 3.4 (d, J = 4 Hz, 2H), 3.64

(s, 1H), 4.18 (宽m, 1H), 4.52 (s, 2H), 5.12 (s, 2H), 7.18 (d, $J = 7$ Hz, 1H), 7.22 - 7.38 (宽m, 10H)。

实施例3

中间产物Boc - Tbg - CH_2 - (RS) - $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 的制备:

(a) 丙二酸烯丙单酯的镁盐: 在回流装置中, 将2,2-二甲基-1,3-二噁烷-4,6-双酮(100克, 0.69 mol)和烯丙醇(47 ml, 0.69 mol)溶于苯(800 ml)得到的溶液加热24小时。在减压条件下将溶剂蒸发掉。将残留物在减压条件下蒸馏得到丙二酸烯丙单酯(71克, 71%, 沸点 $123 - 127^\circ / 2.7$ mmHg)。将该酯(71克, 0.48 mol)溶于无水THF(300 ml)中。将乙醇镁(28.5克, 0.245 mol)加入到该溶液中。在氩气和室温($20 - 22^\circ\text{C}$)下将该混合物振动4小时。在减压下蒸发掉溶剂, 用 Et_2O 磨碎该残留物得到一种棕褐色固体。将该固体研磨成微小颗粒并在减压条件下干燥得到所需镁盐(56克, 73%)。在本实施例的下一节中使用该盐。

(b) Boc - Tbg - $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2 = \text{CH}_2$: 向Boc - Tbg - OH (15克, 64 mmol)溶于无水乙腈(150 ml)中的溶液中加入1,1-羰基二咪唑(12.6克, 78 mmol)。在氩气、室温条件下, 将该混合物振荡2小时。将丙二酸烯丙酯的镁盐(24克, 78 mmol)和4-(N,N-二甲基胺)吡啶(100 mg)加入到该混合物中。将该混合物在回流装置中加热1小时, 然后在室温下振荡18小时。此后, 将该混合物在减压条件下浓缩。将残余物溶于EtOAc(300 ml)中。用10%柠檬酸水溶液(2×100 ml)和盐水(2×100 ml)洗涤该溶液, 干燥(MgSO_4)并蒸发至干。用急聚色谱法(flash chromatography) (SiO_2 , 洗脱液: 己烷 - EtOAc, 9:1)纯化该残余物得到所需的烯丙酯(19.4克, 96%), 该酯为一种

棕色油。持续一段时间后该油结晶。进行¹H NMR (CDCl₃)分析发现该化合物在氯仿中以酮基-烯醇互变异构体混合形式存在, 两者的比较为3:1, δ 0.96 (s, 9H, 烯醇形式), 1.04 (s, 9H), 1.46 (s, 9H), 3.65 (s, 2H), 3.90 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 烯醇形式), 4.20 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 4.65 (m, 2H), 5.10 (宽d, J = 7.5 Hz, 1H), 5.20 - 5.40 (m, 2H), 5.80 - 6.05 (m, 1H), 12 (s, 1H 烯醇形式)。在本实施例的(d)节中使用该烯丙酯。

(c) (E)-5,5-二甲基-4-氧代-2-己烯酸乙酯: 按照S. Manfredini等人, Tetrahedron Letters, 29, 3997 (1988)的方法制备该乙酯。将该油性的粗制产品用急聚色谱法(SiO₂, 洗脱液: 己烷)纯化得到黄色油状物形式的所需的乙酸。该化合物的¹H NMR (CDCl₃)分析结果为δ 1.21 (s, 9H), 1.33 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 4.28 (q, J = 7.5 Hz, 2H), 6.78 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 15.5 Hz, 1H)。在本实施例的下一节中使用该乙酯。

(d) 本实施例的标题化合物: 将本实施例(b)章节中描述的Boc-Tbg-CH₂C(O)OCH₂=CH₂ (0.67克, 2.1 mmol)在氩气存在下溶于无水THF (25 ml)中。将氢化钠(60%油悬液, 0.095克, 2.4 mmol)加到该溶液中。将该混合物在室温下振荡30分钟。将本实施例(c)节中描述的(E)-5,5-二甲基-4-氧代-2-己烯酸乙酯(0.435克, 2.36 mmol)加入该混合物。振荡该反应混合物直到由TLC监测判断反应已经完成(约6小时)。此后, 用10%柠檬酸水溶液淬灭该混合物。在减压条件下除去THF, 将得到的浓缩物用EtOAc (3×25 ml)萃取。用水洗涤该提取物, 干燥(MgSO₄)并在减压条件下浓缩。将残余物用急聚色谱法(SiO₂, 洗脱液: 己烷-EtOAc, 9:1)纯化得到

相应的迈克尔反应加合物(Michael reaction adduct) (1.06克, 100%)。

按下列方法将该迈克尔加合物转化为Boc-Tbg-CH₂-(RS)-CH(CH₂C(O)CMe₃)C(O)OH: 在氩气中将四个三苯基膦钯(0) (0.20克, 0.18 mmol)和三苯基膦(0.060克, 0.23 mmol)溶解于CH₂Cl₂(10 ml)中。将乙腈(20 ml)加入到溶液中, 将该溶液冷却至0°C。向该溶液中加入吡咯烷(0.28 ml, 2.7 mmol), 然后加入迈克尔加合物(1.06克, 2.1 mmol)。将该混合物在1小时内降至室温, 然后摇动20小时。之后在氩气中于回流装置中将该反应混合物加热1小时完成该反应。蒸发掉溶剂, 用急聚色谱法(SiO₂, 洗脱液: 己烷-EtOAc, 9:1)纯化残余物, 得到Boc-Tbg-CH₂-(RS)-CH(CH₂C(O)CMe₃)C(O)OEt (0.77克, 83%)。此后, 得到的后一化合物(0.77克, 1.7 mmol)溶解于乙二醇二甲醚-H₂O(1:1, 10 ml)中。将一水合氢氧化锂(0.31克, 7.4 mmol)加入到该溶液中。将该混合物在室温下振动4小时, 用10%柠檬酸水溶液(20 ml)使之呈酸性, 并用EtOAc(3×25 ml)提取。将提取物干燥(MgSO₄)并在减压条件下浓缩, 得到本实施例的标题化合物, 一种棕色固体(0.69克, 从Boc-Tbg-CH₂C(O)O-CH₂CH=CH₂的总产率为80%)。该产物是一种比例为55:45的非对映异构体的混合物(由NMR证明)。¹H NMR (CDCl₃)的结果为δ 0.97 (s, 9H, 次要异构体), 0.99 (s, 9H, 主要异构体), 1.14 (s, 18H), 1.48 (s, 18H), 2.68-3.12 (m, 8H), 3.30 (m, 2H), 4.08 (d, J=9 Hz, 1H, 次要异构体), 4.10 (d, J=9 Hz, 1H, 主要异构体), 5.11 (d, J=9 Hz, 2H)。

实施例4

中间产物 $\text{H-Tbg-CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})(\text{Bzl})-\text{NH}-(\text{S})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{Me}_3)\text{CH}_2\text{OBzl}$ 的制备

按照实施例1的偶合步骤，利用实施例2的标题化合物(3.42克, 7.13 mmol)作为第一反应物，利用实施例3的标题化合物(2.50克, 6.48 mmol)作为第二反应物，将粗制产品物进行急聚色谱法(SiO_2 , 洗脱剂: 己烷-EtOAc, 4:1)得到相应的标题化合物的N-Boc衍生物(4.64克, 84%; $R_f=0.21$, 己烷-EtOAc, 7:3)。将该衍生物(4.64克, 5.44 mmol)溶于6N HCl/二噁烷(50 ml)中的溶液在室温下振动1小时，然后在减压条件下浓缩。将残余物溶于 Et_2O 中。用饱和的 NaHCO_3 水溶液和盐水洗涤得到的溶液，将它干燥(MgSO_4)，并浓缩得到由两种非对映异构体组成的黄色油。采用急聚色谱法(SiO_2 , 洗脱液: 己烷-EtOAc-MeOH, 5:4.5:0.5)分离这二种异构体。得到无色油状物形式(2.52克, 52%)的所需异构体(即更极化(the more polar); $R_f=0.18$, EtOAc-己烷-MeOH, 7:3:0.5)。在下面实施例中直接使用该异构体: 本实施例的标题化合物，而没有进一步纯化。

实施例5

$\text{Boc}-(\text{N-Me})\text{Val-Tbg-CH}_2(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{ASP}(\text{cyPn})(\text{Bzl})-\text{NH}-(\text{S})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CMe}_3)\text{CH}_2\text{OBzl}$ 的制备

按照实施例1的偶合步骤方法，利用实施例4的标题化合物(4.45克, 5.95 mmol)作为第一反应物并且以N-甲基缬氨酸(4.41克, 17.9 mmol)作为第二反应物，将粗制产物进行急聚色谱法分析(SiO_2 , 洗脱液: 己烷-EtOAc, 7:3)得到本实施例的标题化合物(4.02克, 72%产率), $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ 0.87 (d, $J=7$ Hz, 6H),

0.90 (s, 18H), 1.10 (s, 9H), 1.48 (s, 9H), 1.5 – 2.0 (m, 10H), 2.30 (m, 1H), 2.5 – 3.1 (m, 5H), 2.80 (s, 3H), 3.30 (m, 2H), 4.0 (d, J = 12.5 Hz, 1H), 4.20 (m, 1H), 4.32 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.49 (d, J = 4.5 Hz, 2H), 4.64 (d, J = 11 Hz, 1H), 5.18 (d, J = 5 Hz, 2H), 6.78 (宽d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.11 (宽d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.18 (宽d, J = 11 Hz, 1H), 7.2 – 7.45 (m, 10H)。

实施例6

PhCH₂CH₂C(O) – (N – Me)Val – Tbg – CH₂ – (R) – CH(CH₂C(O)CMe₃)C(O) – Asp (cyPh) – γ MeLeucinol的制备

将实施例5的标题化合物(4.02克, 4.25 mmol)溶于6N HCl/二噁烷(30 ml)中得到的溶液在室温下振荡1小时, 然后在减压下浓缩得到其盐酸盐形式的实施例5的标题化合物的具游离N – 末端氨基的衍生物。此后, 按照实施例1的偶合步骤, 并以该氨基衍生物作为第一反应物并以苯丙酸(2.00克, 13.3 mmol)作为第二反应物, 采用急聚色谱法(SiO₂, 洗脱液: 己烷 – EtOAc, 3:2)将粗产品纯化得到PhCH₂CH₂C(O) – N – Me – Val – Tbg – CH₂ – (R) – CH(CH₂C(O)CMe₃)C(O) – Asp – (cyPn) (OBzl) – NH – (S) – CH(CH₂CMe₃)CH₂OBzl, 一种白色沫剂形式(4.00克, 94%; R_f = 0.35, 己烷 – EtOAc, 1:1)。

将得到的化合物(4.00克, 4.03 mmol)氢解{20% Pd(OH)₂/C (200 mg), 1大气压的H₂, EtOH, 5小时}。在该反应完成之后, 通过用45 μm 膜过滤而将催化剂从反应混合物中除去。在减压条件下将滤液浓缩得到一种透明油。将该油溶于Et₂O (100 ml)。在减压条件下将该溶液蒸发至干。将溶解和蒸发步骤重复进行, 直至得到

一种白色固体。用己烷磨碎该固体，过滤，并在减压条件下干燥得到标题化合物(3.12克，95%)。其 ^1H NMR (d_6 -DMSO)为400 MHz；
注：该化合物以两种旋转异构体比例为50:50的混合物形式存在于DMSO中，其 δ 0.71-0.92 (m, 24H), 1.05 (s, 4.5H), 1.06 (s, 4.5H), 1.20-1.78 (m, 10H), 1.93-2.16 (m, 2H), 2.48-2.83 (m, 6H), 2.84 (s, 1.5H), 2.92 (s, 1.5H), 2.96-3.06 (m, 1H), 3.10-3.23 (m, 2H), 3.72-3.81 (m, 1H), 4.09-4.14 (m, 1H), 4.22 (d, 8 Hz, 0.5H), 4.54-4.62 (宽m, 1H), 4.73-4.81 (m, 1.5H), 7.12-7.29 (m, 6H), 7.94 (d, $J=10$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J=8$ Hz, 0.5H), 8.32 (d, $J=8.5$ Hz, 0.5H)。

按照实施例6的步骤，但以2-(苯甲基)-3-苯丙酸(二苄基乙酸)代替苯丙酸，得到 $(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC}(\text{O})-(\text{N-Me})\text{Val-Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPh})-\gamma\text{MeLeucinol}$ 。

实施例7

制备 $\text{Et}_2\text{CHNHC}(\text{O})-\text{Tbg-CH}_2-\text{R}-(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-\text{CMe}_3)\text{CO}-\text{Asp}(\text{cyPn})-\gamma\text{MeLeucinol}$

将异氰酸1-乙基丙酯(28 mg, 0.248 mmol)加到实施例4的标题化合物(23 mg, 0.030 mmol)和三乙胺(6 mg, 0.057 mmol)溶于无水 CH_2Cl_2 中得到的溶液中。在氩气， 0°C 下将该反应混合物振动1小时，然后在室温下振动18小时。TLC (EtOAc-己烷, 1:1)指示该反应的完成。在减压条件下将溶剂蒸发掉。采用急聚色谱法(SiO_2 , 洗脱液: 己烷-EtOAc, 6:4)将残余物纯化得到本实施例标题化合物的相应的二苄基衍生物(16 mg)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.9 (t, $J=7$ Hz, 3H), 0.92 (t, $J=7$ Hz, 3H), 0.94 (s, 9H),

0.95 (s, 9H), 1.10 (s, 9H), 1.25–1.90 (m, 14H), 2.52 (m, 1H), 2.68 (m, 1H), 2.81 (m, 1H), 2.94–3.07 (m, 2H), 3.27 (dd, $J = 7.2, 9$ Hz, 1H), 3.36 (dd, $J = 5.5, 9$ Hz, 1H), 3.46 (m, 1H), 4.07 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 4.23 (m, 1H), 4.28 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 4.48 (dd, $J = 10$ Hz, 2H), 4.66 (d, $J = 10$ Hz, 1H), 4.74 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 5.17 (dd, $J = 14$ Hz, 2H), 7.10 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.2–7.45 (m, 11H)。

将得到的二苄基衍生物氢解(10% 负载于碳上的钨, 1个大气压, EtOH)得到该主题化合物。质谱: $703 (M + Na)^+$ 。

实施例8

用于制作结构式1的肽的C-末端的其他代表性中间体的制备

(a) $NH_2 - (R) - CH(Et)CMe_3$: 向4,4-二甲基-3-戊酮(106克, 0.92 mmol)和(R)- α -甲苄胺(111克, 0.92 mmol)溶于苯(1升)中得到的冷却溶液中(0°C)加入 $TiCl_4$ (50.5 ml, 0.46 mmol)溶于苯(200 ml)中的溶液, 添加的速率应保持该混合物的温度低于10° 以下。此后, 将该混和物在40°C机械振动3小时, 冷却到室温, 并用硅藻土过滤。用 Et_2O 洗涤硅藻土。将合并的滤液和洗涤液浓缩。将残留物溶于无水MeOH(2升)中。将该溶液冷却到0°C, 在将混合物温度维持于5°C以下时将 $NaBH_4$ (20克, 0.53 mmol)分成几部分加入。将甲醇蒸发掉。将残余物溶于 Et_2O 中。用盐水洗涤该溶液, 干燥($MgSO_4$)并蒸发至干, 得到一种红色油(由NMR鉴别指示这是一种比例为18:1的非对映异构体的混合物)。将该油用急聚色谱法(SiO_2 , 洗脱液: EtOAc/己烷, 7:93)纯化得到一种液体形式的N-(1(R)-苄乙基)-1(R)-乙基-2,2-二甲基丙胺(110克, 54%)。将该物质溶于己烷

(1.5升)中。将溶于二噁烷(90 ml)中的6N HCl在15分钟期间内加入该溶液中。用滤纸收集得到的白色固体, 然后用二噁烷洗涤得到N-(1(R)-苯乙基)-1(R)-乙基-2,2-二甲基丙基盐酸化物(125克, 97%)。¹H NMR (CDCl₃) 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)。

将得到的化合物(41.5克)溶于MeOH (120 ml)中得到的溶液与10% (w/w) Pd/C混合, 在室温下, 在一个Parr氢化器, 以及50 psi氢气条件下振动该混合物48小时。将该混合物过滤, 将滤液浓缩至一种白色固体形式的所需的NH₂-(R)-CH(Et)CMe₃, 其盐酸加成盐形式(25 g, 100%)。 ¹H NMR (CDCl₃) 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 (宽s, 3H)。

以同样的方法, 但是在前面的步骤中用3,3-二甲基-2-丁酮代替4,4-二甲基-3-戊酮, 得到NH₂-(R)-CH(Me)CMe₃·HCl。

实施例9

按照实施例7的步骤制备用于构建结构式1的肽衍生物的N-末端的其他代表性中间体

(a) 异氰酸1-丙基丁酯: 采用V.S.Goldesmidt和M.Wick, Liebigs Ann.Chem., 575, 217 (1952)的方法从购买到的4-氨基庚烷制备该中间体。

(b) 异氰酸1-乙基-1-(2-丙烯基)-3-丁烯酯:

将丙腈(14.5克, 264 mmol)溶于无水Et₂O (40 ml)得到的溶液

滴加到1.0 M烯丙基溴化镁/ Et_2O (880 ml)中。将该反应混合物在回流装置中机械振动2小时。此后将它冷却到 0°C 。将 NH_4Cl 饱和水溶液 (320 ml)小心地加到该冷却反应混合物中。分离有机相,干燥(MgSO_4),冷至 0°C ,然后在相同温度下与1M $\text{HCl}/\text{Et}_2\text{O}$ (200 ml)混合。收集得到的固体,在减压下干燥(约27克)。将得到的物质溶于 CH_2Cl_2 (200 ml)中。用10% (w/v)的 Na_2CO_3 (2 $\times$)水溶液洗涤该溶液,然后用盐水洗,干燥(MgSO_4)并浓缩至干,得到一种黄色油。将该油蒸馏($82-85^\circ/20\text{ Torr}$)得到1-乙基-1-(2-丙烯基)-3-丁烯胺 (11.6克, 34%),它是一种无色液体; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3), 400 MHz) δ 0.89 (t, $J=7\text{ Hz}$, 3H), 1.39 (q, $J=7\text{ Hz}$, 2H), 2.11 (d, $J=7\text{ Hz}$, 2H), 5.06-5.14 (m, 4H), 5.80-5.89 (m, 2H)。

采用上文中描述的V.S.Goldesmidt和M.Wick的方法将上面得到的化合物转化为异氰酸1-乙基-1-(2-丙烯基)-3-丁烯酯。

前面b节方法的第一个步骤,即制备1-乙基-1-(2-丙烯基)-3-丁烯胺,是基于由G.Alvernhe和A.Laurent, *Tetrahedron Lett.*, 1057 (1973)描述的综合方法。利用该综合方法,以及适当地选择反应物,可以制备其他必需的异氰酸酯中间体,这些中间体适用于最终制备在N-末端未饱和的肽衍生物,即一种未饱和的烷基氨基羧基例如1-甲基-1-(2-丙烯基)-3-丁烯基。但是值得注意的是,当将必需的异氰酸酯中间体用于实施例7的方案中时,那么最后的产物将是结构式1的相应的肽衍生物,其中N-末端是饱和的。而且该最后的步骤是一种制备这样的相应肽;例如, $\text{Pr}_2\text{CHNHC}(\text{O})-\text{Tbg}-\text{CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\text{NH}-(\text{R})-\text{CH}(\text{Et})\text{CMe}_3$, (FAB/质谱 (m/z): 693 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 下文中实施例

10中注明的主题肽衍生物) 的有效方法。

因此, 使用合适的中间体, 使用实施例1-7的一系列偶合步骤以及去保护步骤, 可以制备结构式1的其它化合物, 例如在下面实施例的表中列举的那些。在某些情况下, 终产物的沉淀没有提供纯化物质, 这样就可以在C-18反相柱上利用各含0.06% TFA的乙腈和水梯度进行半制备HPLC分析将该产品纯化。为了完成这一过程, 将粗产物溶于0.1M NH_4OH 水溶液中并在纯化前用0.1M AcOH 水溶液将该溶液的pH调回至约7。如果适用, 可用该方式将非对映异构体混合物分离开。

可以制备的结构式1的其他化合物的几个例子是 $(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC}(\text{O}) - (\text{N-Me})\text{Val} - \text{Tbg} - \text{CH}_2 - (\text{R}) - \text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O}) - \text{Asp}(\text{cyPn}) - \text{NHCH}_2\text{CMe}_3$ 和 $(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC}(\text{O}) - (\text{N-Me})\text{Val} - \text{Tbg} - \text{CH}_2 - (\text{R}) - \text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O}) - \text{Asp}(\text{cyPn}) - \text{NH} - (\text{R}) - \text{CH}(\text{Me})\text{CMe}_3$ 。

结构式1的化合物的另外几个例子是: $\text{Pr}_2\text{CHNHC}(\text{O}) - \text{Tbg} - \text{CH}_2 - (\text{R}) - \text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O}) - \text{Asp}(\text{cyPn}) - \text{NHCH}_2\text{CMe}_3$, FAB/质谱 (m/z): 665 $[\text{M} + \text{H}]^+$;

$\text{EtPr}_2\text{CNHC}(\text{O}) - \text{Tbg} - \text{CH}_2 - (\text{R}) - \text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O}) - \text{Asp}(\text{cyPn}) - \text{NH} - (\text{R}) - \text{CH}(\text{Et})\text{CMe}_3$, FAB/质谱 (m/z): 722 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 以及

$\text{EtPr}_2\text{CNHC}(\text{O}) - \text{Tbg} - \text{CH}_2 - (\text{R}) - \text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O}) - \text{Asp}(\text{cyPn}) - \text{NHCH}_2\text{CMe}_3$, FAB/质谱 (m/z): 693 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

实施例10

显示肽衍生物, $\text{Pr}_2\text{CHNHC}(\text{O}) - \text{Tbg} - \text{CH}_2 - (\text{R}) - \text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O}) - \text{Me}_3) - \text{C}(\text{O}) - \text{Asp}(\text{cyPn}) - \text{NH} - (\text{R}) - \text{CH}(\text{Et})\text{CMe}_3$, 以及该衍生物和无环鸟苷的结合物抵抗一种野生型HSV-1临床分离株, 以及两种无环鸟苷

抗性HSV-1临床分离株的效果的研究。

病毒：这些临床分离株已由S.L.Sacks等人, *Annals of Internal Medicine*, 111, 893 (1989)描述。它们来自于一名患有急性骨髓性白血病并且在同种异体骨髓移植后第一次复发的25岁妇女。在骨移植后第8天发现单纯性疱疹病毒的起始培养物呈阳性 (294分离株, 定义为野生型HSV-1)。然后开始用无环鸟苷治疗, 第36天该病毒培养物仍呈阳性 (615分离株, 表示HSV-1抗性株)。对一种亚分离株615.9 (ACV^r TK临床分离株)进行特性分析发现其对无环鸟苷具抗性, 但对膦甲酸敏感并且其胸苷激酶(TK)活性也受到削弱。随后证实615.9是一种TK缺陷型突变株。相反, 615.8亚分离株 (ACV^r POL临床分离株)的特性是对无环鸟苷和膦甲酸具抗性并且其胸苷激酶活性接近于在治疗前的294分离株中观察到的活性。随后证实615.8是一种DNA聚合酶突变体。

分析:

在150 cm² T-烧瓶 (1.5×10⁶个细胞/瓶) 中将BHK-21/C13细胞 (ATCC CCL 10) 培养2天, 该培养瓶中装有补充了8% (v/v) 胎牛血清 (FBS, Gibco Canada Inc.) 的 α -MEM培养基 (Gibco Canada Inc., Burlington, Ontario, Canada)。将细胞用胰蛋白酶消化, 然后转移到一块有24孔的平板的新鲜培养基中, 使得每个孔的750 μ l培养基中含有2.5×10⁵个细胞。将细胞在37°C培养6小时, 以便使细胞粘附到该平板上。此后, 用补充了0.5% (v/v) FBS (胎牛血清) 的500 μ l α -MEM将细胞洗涤一次, 然后用750 μ l 的相同培养基 (低血清) 培养3天。在忍受这一血清饥饿阶段之后, 除去该低血清培养基并将细胞在500 μ l的BBMT中培养2-3小时。[BBMT培养基由P.Braz-

eau等人, Proc.Natl.Acadl.Sci.USA, 79, 7909 (1982)描述]。此后, 在100 μ l的BBMT培养基中用HSV-2感染细胞 (感染复数 = 0.02 PFU/细胞)。(注意: 使用的HSV-2是HG-52株, 参见Y.Langelier and G.Buttin, J.Gen.Virol., 57, 21 (1981); 该病毒贮存于-80°C)。在37°C病毒吸收1小时之后, 除去培养基并用BBMT洗涤细胞(3 $\times$ 250 μ l)。将每个孔中的细胞用或不用(对照)适当浓度的溶于200 μ l BBMT培养基中的检测试剂一起培养。在37°C培养29小时之后, 首先在-80°C冷冻细胞, 随后将细胞冻融, 从而收集受感染细胞。在融化的冰片帮助下将每个孔中的细胞从孔表面上刮下来。在完全冻融后, 收集细胞悬液并用150 μ l BBMT的培养基浸洗每个孔。在4°C将该病毒样品(悬液+洗液)轻缓地超声处理4分钟。通过离心(在4°C以1000 $\times$ g离心10分钟)除去细胞碎片。收集上清液, 并贮存于-80°C, 直到用于测定病毒效价。

将M.Langlois等人, Journal of Biological Standardization, 14, 201 (1986)的比色分析法加以修改后用于测定病毒效价。

更具体地讲, 在上面描述的同样方式中, 用胰蛋白酶处理BHK-21/C13细胞, 并转移到一个96孔微滴平板的新鲜培养基中, 以使每个孔中的100 μ l培养基中含20,000个细胞。将在该制备好的平板中的细胞在37°C培养2小时。在该期间, 将病毒样品冻融, 然后将它轻微地超声处理15秒, 并制备该样品的等级稀释液(1/5稀释度: 50 μ l的样本加上200 μ l的BBMT培养基, 用一个多通道的移液管完成连续稀释过程)。

上面所述的将BHK-21/C13细胞培养2小时完成之后, 用补充了3% (V/V) FBS的 α -MEM培养基替代其中的培养基。这时细胞已准

备好接受各种不同的病毒样品稀释液的感染。将各种稀释度的等分样品 ($50\mu\text{l}$) 转移至平板的合适孔中。将得到的受感染细胞在 37°C 培养2天。然后将溶于Hank平衡盐溶液 (pH 7.3, Gibco Canada Inc.) 中的0.15% (V/V) 中性红染料溶液 $50\mu\text{l}$ 加到各个孔中。将该制备好的平板在 37°C 培养45分钟。然后从每个孔中吸出培养基, 用 $200\mu\text{l}$ 的Hank平衡盐溶液将细胞洗涤一次。在洗涤之后, 加入0.1 M Sorensen柠檬酸盐缓冲液 (pH 4.2) 和乙醇的1:1混合物 $100\mu\text{l}$, 使染料从细胞中释放出来。[Sorensen柠檬酸盐缓冲液按如下方法制备: 首先, 将柠檬酸一水合物 (21克) 溶于1N NaOH水溶液 (200 ml) 中并加入足够量的过滤过的水达到1升体积, 从而制备了0.1 M柠檬酸二钠溶液。第二步, 将0.1M柠檬酸二钠溶液 (61.2 ml) 与0.1N HCl水溶液 (38.8 ml) 混合, 如果必要, 将得到的溶液的pH调整至4.2]。将孔中的混合物接受轻缓振荡, 以确保恰当地混合。用一个分光光度计平板读数器对平板上的孔在540 nm处扫描, 估计存活细胞数。以这种方式检测各种浓度的测试试剂对病毒生长抑制百分率, 并且可以计算出导致50%的病毒复制受抑制的测试试剂的浓度即 IC_{50} 。

前述分析方法用于对无环鸟苷和肽衍生物进行单独的、和它们各种不同的组合物进行估测。由此, 可以证明两种化合物抗去病毒株的比较效果。再者, 将这些研究中获得的结果应用isobole的方法评估和证实两种化合物的协同效果; 参见J. Suhnel, J. Antiviral Research, 13, 23 (1990) 描述的isobole方法。

对isobole方法的更清楚的描述, 该方法需要由两种测试化合物单独使用时产生的, 以及具有相等效应水平的两种化合物的不同

剂量的结合物产生的实验数据。根据这种方法，加入选定浓度的主题肽衍生物 (IC_{50} , IC_{10} , IC_{20} 和 IC_{30}) 与不同剂量的无环鸟苷的组合物，估测 IC_{50} 。在该实验中，主题肽衍生物的 IC_{50} , IC_{20} 和 IC_{30} 以及无环鸟苷的剂量都来自于前面得到的曲线。利用称为 FIC_{60} (无环鸟苷) 的值 (该值是在固定浓度的主题肽衍生物存在的情况下抑制60%的HSV所需的无环鸟苷的浓度与没有该肽衍生物存在时所需的浓度的比例) 产生等效线图解法 (isobologram)。将它相对于代表肽衍生物的固定浓度与在没有无环鸟苷时降低60%的HSV复制的肽衍生物的浓度之比的值来绘制图谱。方程式：

X轴：

$$= \frac{[\text{所加入的肽衍生物的固定浓度}]}{\text{仅用肽衍生物的 } IC_{60}}$$

Y轴：

$$FIC_{60}(\text{无环鸟苷}) = \frac{IC_{60}(\text{无环鸟苷} + X \mu M \text{ 的肽衍生物})}{IC_{60}(\text{仅用无环鸟苷})}$$

结果：

表1列举了在前面所述的用野生型HSV-1临床分离株和两种具无环鸟苷抗性的HSV-1临床分离株进行的细胞培养检测法中仅用无环鸟苷和本实施例的主题肽进行检测时获得的结果。

表 1

分离株 化合物	分离株 294	分离株 615.8	分离株 615.9
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
无环鸟苷	1.1	19	55
主题肽衍生物	2.0	2.0	6.2

表1所述结果证明了结构式1所述化合物具有抗野生型HSV-1的活性，并且这些化合物对具无环鸟苷抗性的HSV-1，例如POL突变株以及TK缺陷型突变株具有同样的抵抗效果；而用无环鸟苷抵抗这些突变株时其效率降低很多(比上述效率低20-40倍)。

下面的表II，III和IV表示根据用野生型HSV-1临床分离株和两种具无环鸟苷抗性HSV-1临床分离株进行的前面所述细胞培养检测法，估测无环鸟苷和本实施例的主题肽衍生物的组合物时获得的结果。

表 II

抗病毒活性
协同增效研究

分离株294
(治疗前临床分离株)

主题肽衍生物 的固定浓度 (μM)	与主题肽衍生物组合 时无环鸟苷的 $\text{IC}_{50}^{(1)}$ (μM)
0.3	0.85
0.5	0.70
0.7	0.35
0.9	0.30
1.0	0.30
1.2	0.22
1.4	0.10
1.6	0.13

表 III

抗病毒活性
协同增效研究

分离株615.8

(ACV^rPOL治疗分离株)

主题肽衍生物 的固定浓度 (μM)	与主题肽衍生物组合 时无环鸟苷的 $\text{IC}_{50}^{(2)}$ (μM)
0.3	15.0
0.5	13.0
0.7	7.0
0.9	8.0
1.0	5.3
1.2	5.0
1.4	1.7
1.6	2.4

表 IV

抗病毒活性
协同增效研究

分离株615.9
(ACV^rTK治疗分离株)

主题肽衍生物 的固定浓度 (μM)	与主题肽衍生物组合 时无环鸟苷的 $\text{IC}_{50}^{(2)}$ (μM)
1.0	33.0
2.0	17.0
3.0	5.5
4.0	5.6
5.0	2.0
6.0	0.9
7.0	< 0.02
8.0	< 0.02

关于前面四个表中的注释:

- IC_{50} 值没有针对溶解性进行校正。
- 所有贮存溶液在使用之前都在4°C以100,000×g进行超离心

30分钟。

- 该标题肽衍生物在20 μ M时的溶解度是85%。
- 该标题肽衍生物的细胞毒性是89 μ M (该值未进行校正)。

(1) 在左边栏中显示的相应的固定浓度的主题肽衍生物存在下, 当无环鸟苷的浓度为 7.6×10^{-4} 至 1.5×10^{-1} 范围内时产生的剂量应答曲线上获得 IC_{50} 。

(2) 在左边栏中显示的相应的固定浓度的标题肽衍生物存在下, 当无环鸟苷的浓度为 1.5×10^{-4} 至 1.5×10^{-2} 范围内时产生的剂量应答曲线上获得的 IC_{50} 。

表II, III和IV显示, 当将两种试剂结合使用时, 结构式1的肽能够加强无环鸟苷抵抗野生型HSV-1和具无环鸟苷抗性的HSV-1突变株的活性。该结果显示当肽与无环鸟苷浓度比增加时, 无环鸟苷的 IC_{50} 成比例降低。

附图1是图解表示应用isobole方法研究时获得的阳性结果 (协同增效), 该研究是用无环鸟苷和本实施例的标题肽, 以及亚分离株615.8 (ACV^rPOL临床分离株)进行的。

同样, 附图2是图解表示在用无环鸟苷和本实施例的标题肽, 以及亚分离株615.9 (ACV^rTK)进行的研究中获得的阳性结果。

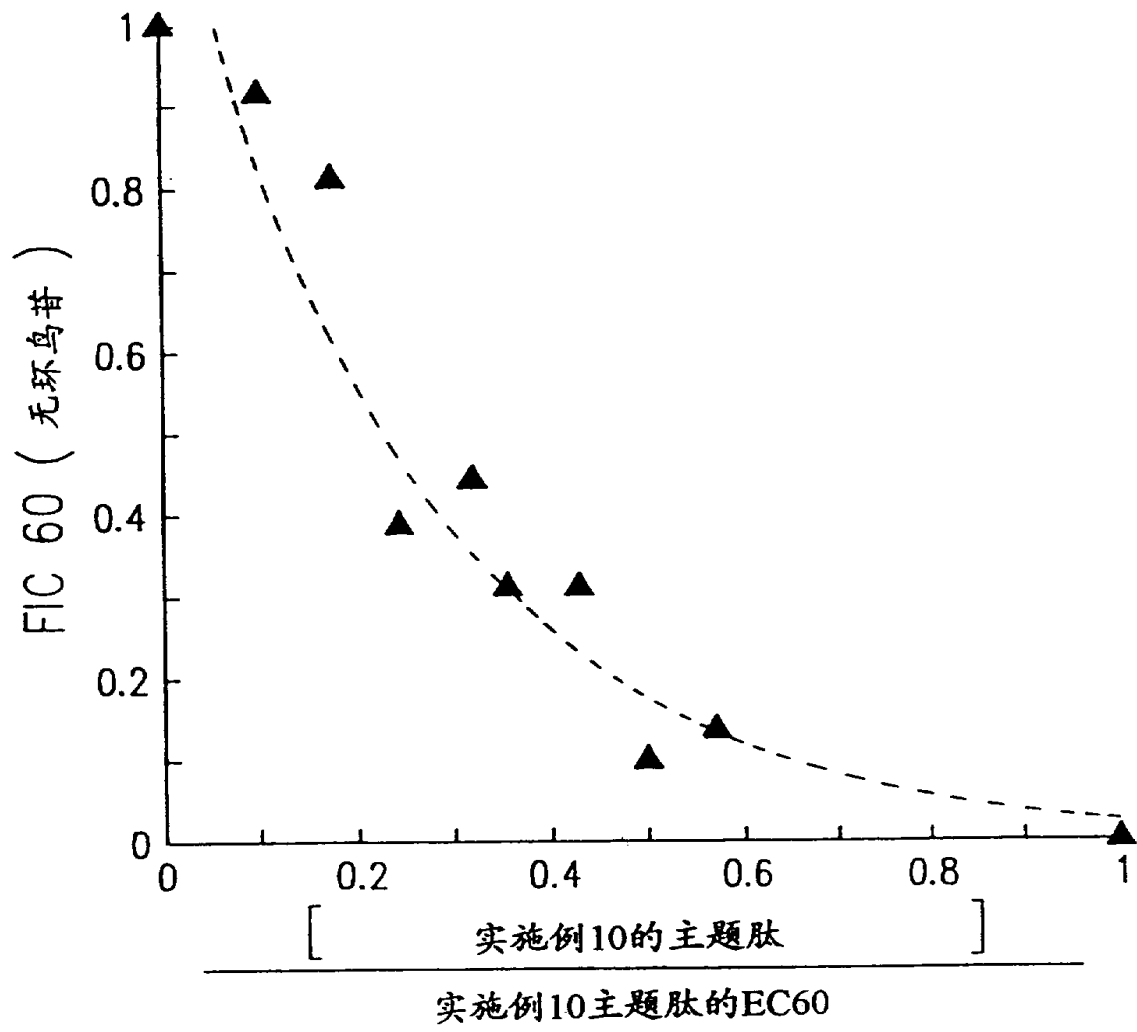


图 1

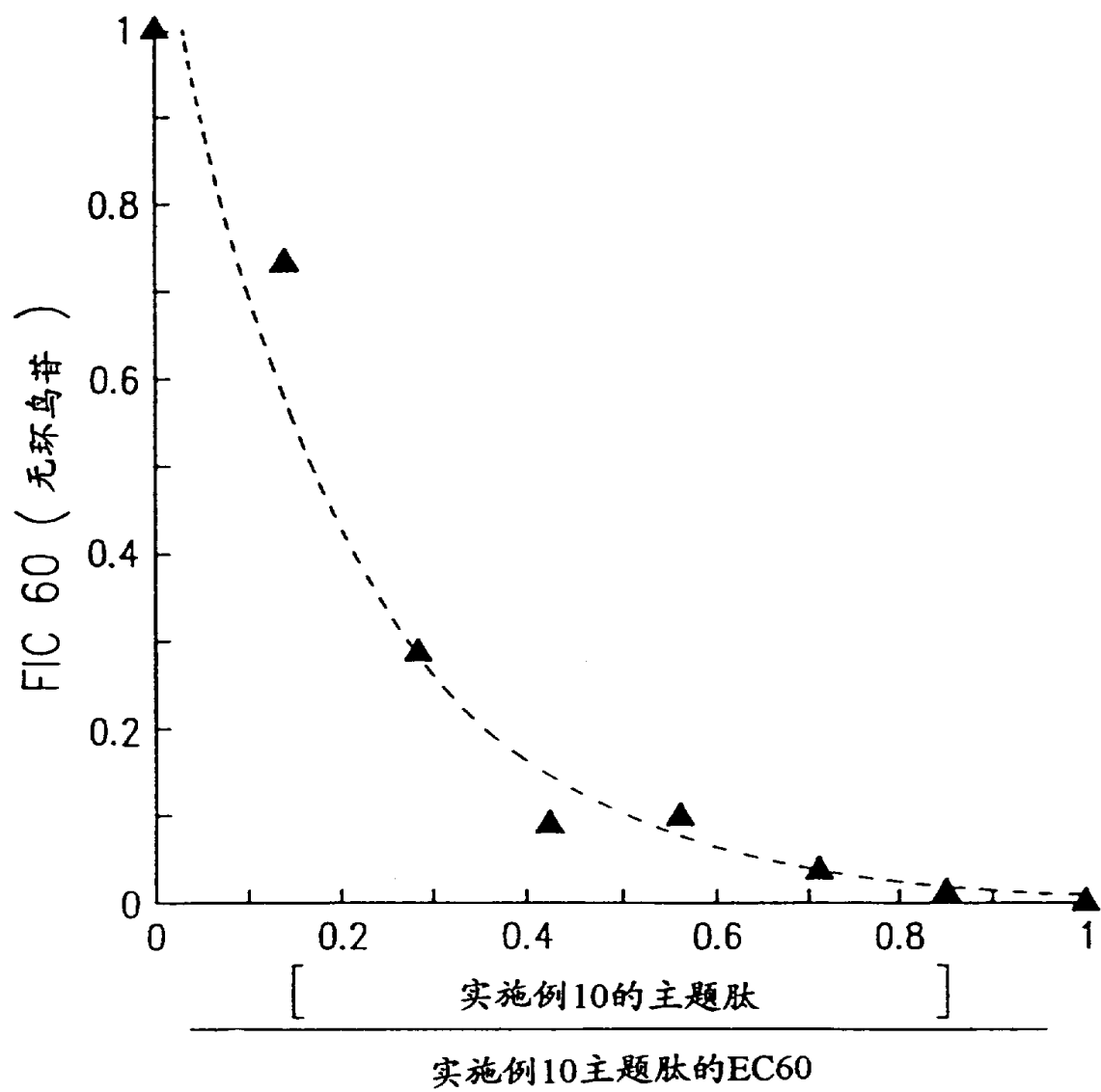


图 2