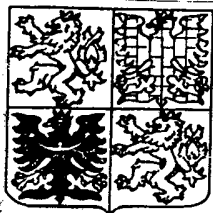


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA
VYNÁLEZU

(12)

(21) 2877-95

(13) A3

6(51)

A 61 K 38/04

(22) 29.04.94

(32) 03.05.93

(31) 93/095408

(33) CA

(40) 12.06.96

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

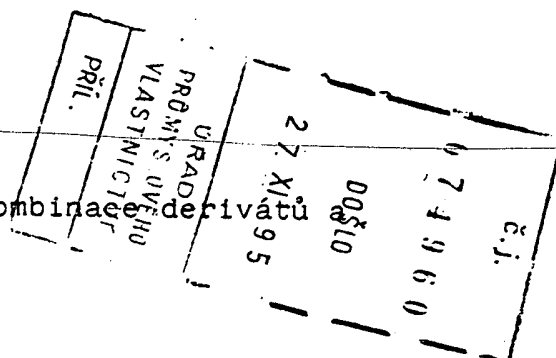
(72) Chafouleas James Gus, Quebec, CA;
Deziel Robert, Quebec, CA;

(54) Použití peptidového derivátu a kombinace
derivátů a farmaceutický prostředek

(57) Peptidové deriváty obecného vzorce 1, : A-B-D-
CH₂CH/CH₂C(O) R¹/C(O)-NHCH/CR² (R³) COOH/C(O)-
E v němž jednotlivé symboly mají význam, uvedený v
hlavním nároku, pro použití k léčení infekcí herpes simplex,
odolným proti acycloviru. Součástí řešení tvoří také použití
kombinace peptidových derivátů obecného vzorce 1 a
nukleosidových analogů s protivirovým účinkem k těmž
účelům. Uvedené látky se spolu s farmaceutickým nosičem
zpracovávají na farmaceutické prostředky, které rovněž
tvoří součást řešení.

- 1 -

Použití peptidového derivátu a kombinace derivátů
farmaceutický prostředek



Oblast techniky

Vynález se týká použití peptidového derivátu s protivirovým účinkem a kombinace tohoto derivátu s dalšími protivirovými látkami a také farmaceutického prostředku, který tyto látky obsahuje.

Dosavadní stav techniky

Acyclovir je nejrozšířenější účinnou látkou, užívanou pro léčení infekcí virem oparu. Avšak v poslední době jsou stále častější zprávy o herpetických virech, které jsou odolné proti uvedené látce, tyto poznatky jsou uvedeny například v P. A. Chatis a další, N. Engl. J. Med., 320, 297, 1989 a S. Safrin, Res. Virol., 143, 125, 1992. V poslední době je tento typ odolného viru stále častěji nalézán u nemocných se závažnou infekcí virem HIV. V důsledku své snížené odolnosti se tito nemocní velmi snadno nakazí virem herpes simplex, HSV typ 1 a zvláště typ 2.

Byla věnována velká pozornost biochemickým vlastnostem, které charakterizují izoláty HSV, odolné proti acycloviru. Získané poznatky jsou uvedeny v souhrnné publikaci, týkající se HSV, odolného proti acycloviru, C. S. Crumpacker, J. Am. Acad. Dermatol., 18, 190, 1988. Odolné kmeny mají funkční změny v jednom nebo v obou enzymech, pro něž je virus kódem, těmito enzymy jsou thymidinkináza TK a DNA polymeráza POL.

V případě, že se buňky, infikované divokým typem HSV vystaví působení acycloviru, katalyzuje TK, produkovaná virem

monofosforylaci acycloviru v daleko větším měřítku než buněčné enzymy. Výsledný monofosfát je pak převáděn buněčnými enzymy na trifosforylovaný acyclovir. Tato látka pak reaguje daleko snadněji s virovou DNA polymerázou než s buněčnou DNA polymerázou. V důsledku toho dochází ke snížení syntézy DNA viru, která se tak stává náhradním substrátem pro acyclovir a tímto způsobem pak dochází k tomu, že se tato DNA stává terminátorem řetězce.

Byly popsány dva mechanismy resistance při použití thymidinkinázy viru: 1) selekce mutant, u nichž nedochází k produkci thymidinkinázy, takže účinnost enzymu po infekci je velmi malá a 2) selekce mutant, produkujících thymidinkinázu s pozměněnou specificitou pro substrát, při níž je enzym schopen fosforylovat thymidin, avšak nikoliv acyclovir.

Třetím mechanismem, jímž může dojít ke vzniku odolnosti a který zahrnuje DNA polymerázu je výsledek selekce mutant, které jsou kódem pro pozměněný enzym, odolný proti inaktivaci acyclovirtrifosfátem.

Na základě mechanismu vzniku resistance je možno izoláty HSV, odolné proti acycloviru klasifikovat jako thymidindeficientní (TK^D) kmeny, kmeny s pozměněným enzymem (TK^A) nebo kmeny s pozměněnou DNA polymerázou (POL^A).

Přestože bylo dosaženo určitých úspěchů při léčení infekcí, způsobených virem, odolným proti acycloviru při použití protivirové látky foscernetu, je infekce odolným typem viru zaznamenávána stále častěji. Jde o závažný problém zvláště u nemocným se syndromem AIDS, jak bylo popsáno v K. S. Erlich a další, N. Engl. J. Med., 320, 293, 1989 a S. Safrin, J. Acquired Immun. Defic. Syndr., 5, suppl. 1, str. 29, 1992. Bylo by tedy zapotřebí nalézt prostředek k léčení těchto stavů.

Vynález si klade za úkol navrhnout poměrně bezpečný prostředek pro léčení herpetických infekcí, vyvolaných typy viru, odolnými proti acycloviru.

K tomuto účelu je možno použít peptidové deriváty, popsané autory P. L. Beaulieu, R. Déziel, N. Möss a R. Plante v současně projednávané mezinárodní patentové přihlášce č. PCT/CA/93/0095, podané 12. března 1993. Přihláška se týká použití různých látek k léčení herpetických infekcí. Je však známo, že protivirové látky, účinné proti herpetickým infekcím nemusí být účinné proti viru herpes simplex, odolnému proti acycloviru, jak bylo popsáno například v publikaci J.J. O'Brien a D. M. Campoli-Richards, Drugs 37, 233, 1989, str. 252 - 253. Zjištění, že uvedené peptidové deriváty jsou skutečně účinné proti infekcím virem herpes simplex, odolným proti acycloviru, bylo proto překvapující.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří peptidové deriváty obecného vzorce 1



kde

- A znamená fenylacetyl, fenylpropionyl, (4-aminofenyl)propionyl, (4-fluorfenyl)propionyl, (4-hydroxyfenyl)propionyl, (4-methoxyfenyl)propionyl, 2-(fenylmethyl)-3-fenylpropionyl, 2-/(4-fluorfenyl)methyl/-3-(4-fluorfenyl)propionyl, 2-/(4-methoxyfenyl)methyl/-3-(4-methoxyfenyl)propionyl nebo benzylaminokarbonyl,
- B znamená (N-Me)-Val nebo (N-Me)-Ile nebo spolu tvoří

A a B nasycenou alkylaminokarbonylovou skupinu, a to butylaminokarbonyl, 1-methylethylaminokarbonyl, 1-methylpropylaminokarbonyl, 1-ethylpropylaminokarbonyl, 1,1-dimethylbutylaminokarbonyl, 1-ethylbutylaminokarbonyl, 1-propylbutylaminokarbonyl, 1-ethylpentylaminokarbonyl, 1-butylpentylaminokarbonyl, 1-ethylbutylaminokarbonyl, 2-ethylpentylaminokarbonyl, 1-methyl-1-propylbutylaminokarbonyl, 1-ethyl-1-propylbutylaminokarbonyl, 1,1-di-propylbutylaminokarbonyl, (1-propylcyklopentyl)aminokarbonyl nebo (1-propylcyklohexyl)aminokarbonyl,

D znamená Val, Ile nebo Tbg,

R^1 znamená 1-methylethyl, 1,1-dimethylethyl, 1-methylpropyl, 1,1-dimethylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, cyklobutyl, cyklopentyl, cyklohexyl, 1-methylcyklopentyl, skupinu NR^4R^5 , kde R^4 znamená atom vodíku nebo nižší alkyl a R^5 znamená nižší alkyl nebo tvoří R^4 a R^5 společně s atomem dusíku, na nějž jsou vázány pyrrolidinový, piperidinový, morfolinový nebo 4-methylpiperazinový kruh,

R^2 znamená atom vodíku a

R^3 znamená methyl, ethyl, 1-methylethyl, 1,1-dimethylethyl, propyl, 2-propenyl nebo benzyl, přičemž atom uhlíku, na nějž jsou vázány skupiny R^2 a R^3 má konfiguraci R, nebo

R^2 a R^3 nezávisle znamenají methyl nebo ethyl nebo tvoří společně s atomem uhlíku, na nějž jsou vázány cyklobutyl, cyklopentyl nebo cyklohexyl a

E znamená skupinu NHR^6 , kde R^6 znamená 2-methylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, 1(R),2,2-trimethylpropyl, 1,1,2,2-tetramethylpropyl, 1(R)-ethyl-2,2-dimethylpropyl, 2-(R,S)-methylbutyl, 2,2-dimethylbutyl, 3,3-dimethyl-

butyl, 1(R),2,2-trimethylbutyl, 1(R),3,3-trimethylbutyl, 2-ethylbutyl, 2,2-diethylbutyl, 2-ethyl-1(R)-methylbutyl, 2-ethyl-2-methylbutyl, 1(R)-ethyl-3,3-dimethylbutyl, 2,2-dimethylpentyl, cis- nebo trans-2-methylcyklohexyl, 2,2-dimethylcyklohexyl nebo cyklohexylmethyl nebo znamená E skupinu $\text{NHCH}(\text{R}^7)$ -Z, kde atom uhlíku, na nějž je vázána skupina R^7 má konfiguraci S, R^7 znamená 1,1-dimethylethyl, 1-methylpropyl, 2-methylpropyl, 2,2-dimethylpropyl nebo cyklohexylmethyl a Z znamená skupinu CH_2OH , $\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ nebo $\text{C}(\text{O})\text{OR}^8$, kde R^8 znamená methyl, ethyl nebo propyl,

jakož i farmaceuticky přijatelné soli těchto sloučenin

pro použití k léčení infekcí herpes simplex, odolným proti acycloviru.

Ve výhodném provedení vynálezu jde o peptidové deriváty obecného vzorce 1, v němž

- A znamená fenylpropionyl, 2-(fenylmethyl)-3-fenylpropionyl nebo benzylaminokarbonyl,
- B znamená (N-Me)Val,
- D znamená Tbg,
- R^1 znamená 1-methylethyl, 1,1-dimethylethyl, 1-methylpropyl, 1,1-dimethylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, cyklobutyl, cyklopentyl, cyklohexyl, nebo 1-methylcyklopentyl,
- R^2 znamená atom vodíku a
- R^3 znamená methyl, ethyl, 1-methylethyl, propyl nebo benzyl, přičemž atom uhlíku, na nějž jsou vázány skupiny R^2 a R^3 má konfiguraci R, nebo

R^2 a R^3 nezávisle znamenají methyl nebo ethyl nebo tvoří společně s atomem uhlíku, na nějž jsou vázány cyklobutyl, cyklopentyl nebo cyklohexyl a

E znamená skupinu NHR^6 , kde R^6 znamená 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 znamená E skupinu $NHCH(R^7)-Z$, kde uhlíkový atom, na nějž je vázána skupina R^7 má konfiguraci S, R^7 znamená 2,2-dimethylpropyl a Z znamená CH_2OH , $C(O)OH$, $C(O)NH_2$ nebo skupinu $C(O)OR^8$, kde R^8 znamená methyl, ethyl nebo propyl,

jakož i farmaceuticky přijatelné soli těchto sloučenin, pro použití k léčení infekcí herpes simplex, odolným proti acycloviru.

V dalším výhodném provedení jde o peptidové deriváty obecného vzorce 1, v nichž

A a B společně tvoří nasycený alkylaminokarbonyl ze skupiny 1-ethylpropylaminokarbonyl, 1-ethylbutylaminokarbonyl, 1-propylbutylaminokarbonyl, 2-ethylpentylaminokarbonyl, 1-methyl-1-propylbutylaminokarbonyl, 1-ethyl-1-propylbutylaminokarbonyl, 1,1-dipropylbutylaminokarbonyl a (1-propylcyklopentyl)aminokarbonyl a

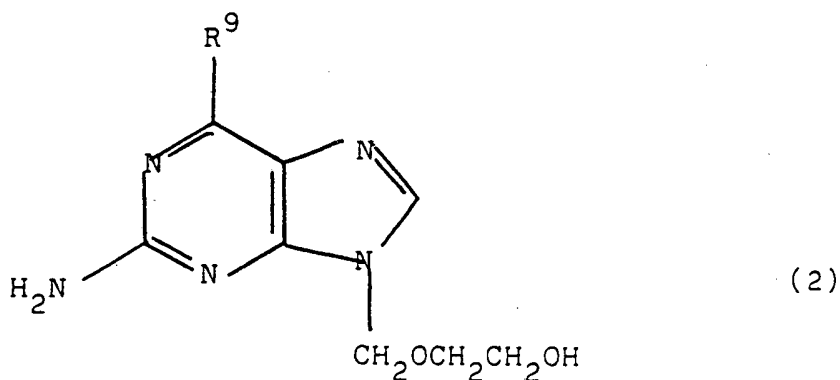
D, R^1 , R^2 , R^3 a E mají význam, uvedený v předchozím odstavci,

jakož i farmaceuticky přijatelné soli těchto sloučenin, pro použití k léčení infekcí herpes simplex, odolným proti acycloviru.

Je také možno použít kombinaci peptidového derivátu obecného vzorce 1 nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli

s nukleosidovým analogem s protivirovým účinkem nebo s jeho solí, přijatelnou z farmaceutického hlediska.

V kombinaci je možno užít nukleosidový analog s protivirovým účinkem, který je možno enzymaticky převést (in vivo) na inhibitor DNA polymerázy viru a/nebo na alternativní substrát pro DNA polymerázu viru. Nukleosidový analog s protivirovým účinkem je možno volit ze známých nukleosidových analogů. Výhodnými nukleosidovými analogy pro kombinaci s peptidovým derivátem podle vynálezu jsou například acyclovir a jeho analogy, například sloučeniny obecného vzorce 2



kde R^9 je atom vodíku, hydroxyskupina nebo aminoskupina, jakož i soli těchto látek, přijatelné z farmaceutického hlediska. Sloučenina vzorce 2, v níž R^9 znamená hydroxyskupinu je acyclovir.

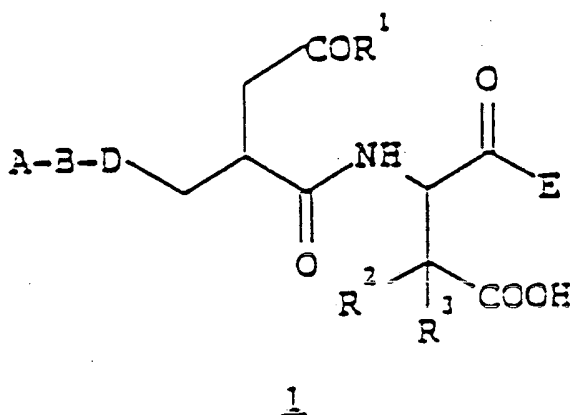
Dalšími výhodnými nukleosidovými analogy s protivirovým účinkem, použitelnými k uvedenému účelu jsou například vidarabin, idoxuridin, trifluridin, ganciclovir, edoxudin, brovavir, fiacitabin, penciclovir, famciclovir a rociclovir.

Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1 a 2 jsou graficky znázorněny výsledky, získané aplikací metody isobol pro průkaz synergie při zkouškách, při nichž byla zkoumána účinnost kombinace acycloviru a peptidového derivátu obecného vzorce 1 proti virům herpes simplex, odolným proti acycloviru.

Podrobný popis výhodných provedení

Sloučeniny obecného vzorce 1 je možno vyjádřit také vzorcem 1



Pojem "zbytek" aminokyseliny nebo derivátu aminokyseliny znamená zbytek, odvozený od alfa-aminokyseliny odstraněním hydroxylové skupiny z karboxylové skupiny a jednoho vodíkového atomu z alfa-aminoskupiny.

Obecně jsou použité zkratky pro označení aminokyselin a ochranných skupin v souladu s doporučením komise IUPAC-IUB pro biochemické názvosloví, tak jak bylo uvedeno v European Journal of Biochemistry 138, 9, 1984. Například Val, Ile,

Asp a Leu znamenají zbytky L-valínu, L-isoleucinu, kyseliny L-asparagové a L-leucinu.

Asymetrické atomy uhlíku v základní lineární ose, to znamená v kostře peptidového derivátu vzorce 1 s výjimkou koncových skupin A a Z (ve skupině E), avšak včetně uhlíkového atomu, nesoucího skupinu R^7 v případě, že E znamená skupinu $NHCH(R^7)-Z$ mají konfiguraci S. K výjimkám však dochází v případě atomu uhlíku, nesoucího postranní řetězec $CH_2C(O)R^1$ v případě, že R^1 znamená nižší alkyl nebo nižší cykloalkyl, jak bylo svrchu uvedeno. V případě této výjimky má atom uhlíku konfiguraci R.

Asymetrický atom uhlíku v postranním řetězci aminokyseliny nebo derivátu aminokyseliny, v koncové skupině A a koncové skupině E v případě, že E znamená skupinu NHR^6 , může mít konfiguraci S nebo R.

Symbole Me, Et, Pr a Bu znamenají alkylové zbytky methyl, ethyl, propyl a butyl.

Skupiny $MeEt_2C$ a $EtPr_2C$ tedy například znamenají 1-ethyl-1-methylpropyl a 1-ethyl-1-propylbutyl.

Skupina Tbg znamená zbytek kyseliny (S)-2-amino-3,3-dimethylbutanové. Skupina $\gamma MeLeu$ znamená zbytek kyseliny (S)-2-amino-4,4-dimethylpentanové. Skupina $\gamma MeLeucinol$ znamená (S)-2-amino-4,4-dimethylpentanol z jehož alfa-amino-skupiny byl odstraněn jeden atom vodíku.

V průběhu přihlášky jsou užity ještě některé další symboly: (N-Me)Val pro zbytek kyseliny (S)-3-methyl-2-(methylamino)butanové, (N-Me)Ile pro zbytek kyseliny (S)-3-methyl-2-(methylamino)pentanové, $(N-Me_3)Tbg$ pro zbytek kyseliny

(S)-2-(methylamino)-3,3-dimethylbutanové, Asp(cyBu) pro zbytek kyseliny (S)-alfa-amino-1-karboxycyklobutanocetové a Asp(cyPh) pro zbytek kyseliny (S)-alfa-amino-1-karboxycyklopentanocetové.

Nižší alkyl, tak jak je v průběhu přihlášky užíván jako samostatný zbytek nebo v kombinaci s dalšími zbytky znamená uhlovodíkový zbytek s přímým řetězcem o 1 až 6 atomech uhlíku nebo rozvětvený zbytek, obsahující 3 až 6 atomů uhlíku, například methyl, ethyl, propyl, butyl, hexyl, 1-methylethyl, 1-methylpropyl, 2-methylpropyl a 1,1-dimethylethyl.

1-(nižší alkyl)-(nižší cykloalkyl) znamená v průběhu přihlášky nižší cykloalkylový zbytek s nižším alkylovým substituentem v poloze 1, například 1-ethylcyklopropyl, 1-propylcyklopentyl a 1-propylcyklohexyl.

Nižší cykloalkyl, užitý jako samostatný zbytek nebo v kombinaci s jiným zbytkem znamená nasycený cyklický uhlovodíkový zbytek, obsahující 3 až 6 atomů uhlíku a jde tedy o cyklopropyl, cyklobutyl, cyklopentyl nebo cyklohexyl.

Farmaceuticky přijatelným nosičem je netoxický, obvykle inertní nosič pro účinnou složku, který účinnou složku nepříznivě neovlivní.

Fyziologicky přijatelný nosič je přijatelné kosmetické nosné prostředí, obsahující jednu nebo větší počet netoxických pomocných látek, které nereagují s účinnou složkou a nesnižují její účinnost.

Účinným množstvím se rozumí předem stanovené protivirové množství látky s protivirovým účinkem, dostatečné pro účinnost proti virům in vivo.

Po pojmem "vazné činidlo" se rozumí činidlo, které napomáhá vzniku dehydrativní vazby volné karboxylové skupiny v aminokyselině nebo peptidu s volnou aminoskupinou jiné aminokyseliny nebo peptidu za vzniku amidové vazby mezi oběma reakčními složkami. Obdobně může takové činidlo napomáhat vzniku vazby mezi kyselinou a alkoholem za vzniku odpovídajících esterů. Uvedená činidla vyvolávají nebo mohou usnadnit dehydrativní vazbu aktivací karboxylové skupiny. Popis vhodných činidel tohoto typu a skupin, aktivovaných těmito činidly se uvádí v běžných učebnicích peptidové chemie, například v E. Schröder a K. L. Lübke, "The Peptides", sv. 1, Academic Press, New York, N. Y., 1965, str. 2 až 128 a K. D. Kopple, "Peptides and Amino acids", W. A. Benjamin, Inc., New York, N. Y., 1966, str. 33 až 51. Jako příklad vazných činidel je možno uvést difenylfosforylazid, 1,1'-karbo-nyldiimidazol, dicyklohexylkarbodiimid, N-hydroxysukcinimid nebo 1-hydroxybenzothiazol v přítomnosti dicyklohexylkarbodiimidu. Velmi vhodným a použitelným vazným činidlem je (benzotriazol-1-yloxy)tris-(dimethylamino)fosfoniumhexafluorofosfát, popsáný v publikaci B. Castro a další, Tetrahedron Letters, 1219, 1975 a také v D. Hudson, J. Org. Chem., 53, 617, 1988; činidlo se užívá jako takové nebo v přítomnosti 1-hydroxybenzotriazolu. Další použitelné a vhodné činidlo je běžně dodávaný 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluorboritan.

Nukleosidové analogy s protivirovým účinkem a jejich farmaceuticky přijatelné soli pro použití podle vynálezu jsou známe látky. Jak již bylo uvedeno svrchu, jsou jednotlivé sloučeniny z této skupiny charakterizovány způsobem, kterým mohou zprostředkovat protivirovou účinnost proti herpetickým virům, to znamená svou schopností způsobit in vivo inhibici DNA polymerázy viru. Důležitými sloučeninami z této skupiny jsou acyclovir a jeho analogy, tyto látky byly

popsány v US patentovém spisu č. 4 199 574 (H. J. Schaeffer) z 22. dubna 1980 a také v publikacích H. J. Schaeffer a další, Nature (Londýn), 272, 573, 1978 a T. A. Krenitsk a další, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 3209, 1984. Sloučenina obecného vzorce 2, v němž R^9 znamená hydroxyskupinu je acyclovir, s chemickým názvem 0-/(2-hydroxyethoxy)methyl/guanin. Sloučenina obecného vzorce 2, v němž R^9 znamená atom vodíku, je 6-deoxyacyclovit, chemickým názvem 2-amino-9-/(2-hydroxyethoxy)methyl/adenin, a sloučenina obecného vzorce 2, v němž R^9 znamená aminoskupinu, je chemicky 2,6-diamino-9-/(2-hydroxyethoxy)methyl/purin.

Je zřejmé, že sloučenina obecného vzorce 2, v němž R^9 znamená hydroxyskupinu, může existovat ve své tautomerní formě, to znamená jako 2-amino-1,9-dihydro-9-/(2-hydroxyethoxy)methyl/-6H-purin-6-on, sloučenina může být směsí obou tautomerních forem, přičemž procentuální zastoupení každého tautomeru ve směsi závisí na fyzikálních podmínkách. Tautomerní formy se vyskytují také u jiných nukleosidových analogů s protivirovým účinkem, které obsahují enolizovatelnou karbonylovou skupinu.

Další nukleosidy s protivirovým účinkem, které je možno ke svrchu uvedenému účelu použít, jsou například vidarabin, 9-beta-D-arabinofuranosiladeninmonohydrát podle R. J. Whitley a další, N. Engl. J. Med., 307, 971, 1982, idoxudin, 2'-deoxy-5-joduridin podle W. H. Prusoff, Biochim. Biophys. Acta, 32, 295, 1959, trifluridin, 2'-deoxy-5-(trifluormethyl)uridin podle US patentového spisu č. 3 201 387 (C. Heidelberger) ze 17. srpna 1965, ganciclovir, 9-/(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl/guanin, podle US patentového spisu č. 4 355 032 (J. P. Verheyden a J. C. Martin) ze dne 19. října 1982, edoxudin, 5-ethyl-2'-deoxyuridin podle US patentového spisu č. 3 553 192 (K. K. Gauri) z 5. ledna 1971, brovavir, (E)-5-(2-bromvinyl)-2'-deoxyuridin podle Y. Benoit a další,

Eur. J. Pediatrics, 143, 198, 1985, fiacitabin, 2'-fluor-deoxy-5-jodiuridin podle B. Leyland-Jones a další, J. Infect. Dis., 154, 430, 1986, penciclovir, 9-/4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)butyl/guanin podle S. E. Fowler a další, Br. J. Clin. Pharmacol., 28, 236P, 1989, famciclovir, 9-/4-acetoxy-3-(acetoxymethyl)butyl/adenin podle R. A. V. Hodge a další, Antimicrob. Agents Chemotherap., 33, 1765, 1989 a rociclovir, 9-/((1,3-diisopropoxy-2-propoxy)methyl)adenin podle E. Winklemann a další, Arzneim.-Forsch., 38, 1545, 1988.

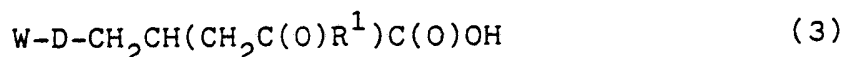
Výroba peptidových derivátů obecného vzorce 1

Peptidové deriváty obecného vzorce 1 je možno připravit postupy, jejichž součástí jsou běžné metody, užívané při syntéze peptidů, například klasická vazba zbytků aminokyselin a/nebo peptidových fragmentů v roztoku. Tyto postupy byly popsány například ve svrchu uvedené publikaci E. Schröder a K. Lübke, Tje Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, učebnicové povahy a dále v publikacích E- Gross a další, Eds., Academic Press, New York, N.Y., 1979 - 1987, sv. 1 až 8 a J. M. Stewart a J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2. vydání, Pierce Chem. Co., Rockford, IL, USA, 1984.

Společnou vlastností svrchu uvedených postupů pro výrobu peptidových derivátů je ochrana reaktivních skupin v postranním řetězci různých zbytků aminokyselin nebo jejich derivátů nebo popřípadě nepeptidových fragmentů peptidového derivátu při použití vhodných ochranných skupin, které zabrání chemické reakci v uvedeném místě až do odstranění použité ochranné skupiny. Běžná je také ochrana alfa-amino-skupiny na aminoskupině nebo fragmentu peptidu, přičemž zbytek molekuly reaguje na karboxylové skupině a po ukončení reakce se selektivně odstraní ochranná skupina na alfa-aminoskupině, takže může proběhnout další reakce v tomto místě.

Dalším běžným postupem je počáteční ochrana C-terminální karboxylové skupiny v aminokyselině nebo v peptidovém fragmentu, jde o karboxylovou skupinu, která má později být C-terminální funkcí peptidového derivátu. K ochraně se užije ochranná skupina, která zabrání chemické reakci v tomto místě až do odstranění ochranné skupiny po ukončení syntézy požadovaného peptidového derivátu.

Klíčovým meziproduktem pro peptidové deriváty obecného vzorce 1 je meziprodukt obecného vzorce 3



kde

W znamená ochrannou skupinu na alfa-aminoskupně, například terc.butyloxykarbonyl (Boc), benzyloxykarbonyl (Z) nebo fluoren-9-ylmethoxykarbonyl (Fmoc) a

D a R^1 mají svrchu uvedený význam.

Tuto látku je možno připravit Michaelovou adicí allyl-esteru obecného vzorce $W-D-CH_2C(O)OCH_2CH=CH_2$ na fumaroylový derivát obecného vzorce (nižší alkyl)- $OC(O)CH=CHC(O)R^1$ za vzniku Michaelovy adiční sloučeniny vzorce $W-D-CH(C(O)OCH_2CH=CH_2)CH(CH_2C(O)R^1)C(O)O$ -nižší alkyl.

V případě, že se na tuto látku působí tetrakistrifenylfosfinpaladiem a trifenylfosfinem v přítomnosti pyrrolidinu způsobem podle publikace R- Déziel, Tetrahedron Letters, 28, 4371, 1987, dojde k hydrolýze a pak s dekarboxylací allyl-esteru za vzniku odpovídajícího alkylesteru klíčového meziprodktu. Hydrolýzou tohoto esteru v přítomnosti baze, například hydroxidu sodného nebo hydroxidu lithného se získá klíčový meziprodukt jako směs diastereoisomerů.

Klíčový meziprodukt obecného vzorce 3, v němž W a D mají význam, uvedený v předchozím odstavci a R^1 znamená skupinu NR^4R^5 , kde R^4 a R^5 znamenají nižší alkylové zbytky nebo tvoří společně s atomem dusíku, na nějž jsou vázány pyrrolidinový, piperidinový, morfolinový nebo 4-methylpiperazinový zbytek je také možno připravit tak, že se svrchu uvedený allylester obecného vzorce $W-D-CH_2C(O)OCH_2-CH=CH_2$, v němž W a D mají svrchu uvedený význam, uvede do reakce za podmínek Michaelovy reakce s fumaroylovým derivátem vzorce $Bz1OC(O)CH=CHC(O)OBz1$, to znamená s dibenzylesterem kyseliny (E)-2-butendikarboxylové za vzniku odpovídajícího Michaelova adičního produktu obecného vzorce $W-D-(RS)-CH(CH(C(O)OBz1)CH_2C(O)OBz1)C(O)-OCH_2CH=CH_2$.

V případě, že se tento adiční produkt zpracovává působením tetrakistriphenylfosfinpaladia a triphenylfosfinu v přítomnosti pyrrolidinu podle Dézielovy svrchu uvedené publikace, získá se odpovídající dibenzylester vzorce $W-D-CH_2-(R,S)-CH(CH_2C(O)OBz1)C(O)OBz1$. Následnou hydrogenolýzou v přítomnosti hydroxidu paladnatého na aktivním uhlí se získá odpovídající dikarboxylová kyselina, která se zahříváním s anhydridem kyseliny octové v přebytku převede na odpovídající anhydrid. Tento anhydrid se nechá reagovat s příslušným sekundárním aminem v přítomnosti pyridinu, čímž se získá směs isomerů s převahou požadovaného isomeru obecného vzorce $W-D-CH_2-(RS)-CH(CH_2C(O)NR^4R^5)-C(O)-OH$, v němž jednotlivé symboly mají svrchu uvedený význam. Tato látka se pak převede na benzylester a isomery se rozdělí pomocí HPLC, čímž se jako požadovaný produkt získá převážně požadovaný isomer. Hydrogenací tohoto produktu v přítomnosti hydroxidu paladnatého na aktivním uhlí se získá klíčový meziprodukt obecného vzorce 3, v němž W a D mají svrchu uvedený význam a R^1 znamená skupinu NR^4R^5 ve svrchu uvedeném významu.

Obecně je tedy možno připravit peptid obecného vzorce 1 tak, že se postupně v pořadí podle požadovaného peptidu navazují zbytky aminokyselin nebo jejich derivátů nebo nepeptidové fragmenty peptidu, například klíčové meziprodukty, popřípadě chráněné a po ukončení vazby za vzniku peptidu vzorce 1 se pak odstraní všechny ochranné skupiny. V následující příkladové části je uvedena řada specifických postupů.

Peptidy obecného vzorce 1 je možno připravit ve formě farmaceuticky přijatelných solí. V případě, že určitý peptid obsahuje skupinu bazické povahy, mohou být příkladem takových solí soli s organickými kyselinami, například s kyselinou octovou, mléčnou, jantarovou, methansulfonovou nebo p-toluensulfonovou nebo také s polymerními kyselinami, jako je kyselina tříslová nebo karboxymethylcelulosa, mimoto může jít o soli s anorganickými kyselinami, jako jsou halogenovodíkové kyseliny, například kyselina chlorovodíková, nebo kyselina sírová nebo fosforečná. V případě potřeby je možno adiční sůl určité kyseliny převést na adiční sůl jiné kyseliny, například na netoxickou, farmaceuticky přijatelnou sůl působením iontoměničové pryskyřice způsobem podle publikace R. A. Boissonnas a další, *Helv. Chim. Acta*, 43, 1849, 1960.

V případě, že určitý peptid obsahuje jednu nebo větší počet volných karboxylových skupin, mohou být příkladem solí na karboxylové skupině soli s kationty sodíku, draslíku nebo vápníku nebo soli s organickými bazemi, například triethylaminem nebo N-methylmorfolinem.

Účinnost proti herpetickému viru

5 Antivirovou účinnost peptidových derivátů obecného vzorce 1 lze prokázat biochemickými, mikrobiologickými a biologickými zkouškami inhibice replikace acyklovir-rezistentních virů herpes simplex typu 1 a 2 (HSV-1, HSV-2).

10 Jednu ze zkoušek inhibice virové replikace peptidovými deriváty obecného vzorce 1 při použití buněčných kultur popsal T.Spector a spol. v Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4254 (1985).

15 Terapeutický efekt peptidových derivátů lze doložit zkouškou na naočkovaných zvířatech (například myších) virem herpes simplex, vyvolávajícího vznik očního herpetického onemocnění a používaného při testování antivirových látek. Tuto zkoušku popsal C.R.Brandt a spol. v J. Virol. Meth., 36,209 (1992).

20 Peptidové deriváty podle vynálezu nebo jejich soli s terapeutickými účinky se podávají lokálně nebo celkově teplokrevným zvířatům (prasatům, koním nebo lidem) vázané na nosné prostředí obsahujícího takové množství jednoho nebo více nosičů, které odpovídá rozpustnosti a chemickým vlastnostem peptidového derivátu, cestě podání a současné praxi. Na
25 farmaceuticky přijatelný nosič je při lokálním použití v lékové formě vázáno 0,1 až 5 procent, respektive 0,5 až 2 procenta účinné látky. Vhodnými lékovými formami pro lokální použití jsou roztoky, masti a lotiony.

30 Při celkovém podání se peptidové deriváty podávají buď orálně nebo intravenózně, podkožně, nitrosvalově vázané na farmaceuticky vhodná nosná prostředí nebo nosiče. K injekčnímu podání je nejvhodnější peptidový roztok ve sterilní vodě, který obsahuje další rozpuštěné látky jako např. pufrý,

konzervační činidla a odpovídající množství farmaceuticky vhodných solí nebo glukózy k dosažení izotonického roztoku.

5 Vhodná vehikula nebo nosiče ve shora popsaných lékových formách jsou popsána v Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. vydání, Mack Publishing Company, Easton, Penn., 1990.

10 Dávkování peptidových derivátů závisí na cestě podání, na výběru aktivní látky obsažené v lékové formě a na druhu vyvolatele onemocnění. Pro léčbu platí, že se začíná pomalým zvyšováním dávek dokud se nedosáhne požadovaného efektu. Peptidový derivát se podává v takové koncentraci, která zajišťuje dostatečný antivirový efekt a ještě nezpůsobuje nežádoucí vedlejší účinky.

15 Při lokálním podání se lékové formy aplikují přímo na infikovanou oblast těla, tzn. kůži, oko, ústa nebo na genitální krajinu v množství dostatečně zakrývajícím celou infikovanou oblast. Tento postup se opakuje po 4-6 hodinách do vymizení léze.

20 Při celkovém podání se velikost denní dávky peptidového derivátu obecného vzorce 1 pohybuje v rozmezí 1,0 mg až 10 mg na kilogram tělesné hmotnosti a den. Optimální je rozmezí 1,0 mg až 5 mg na kilogram tělesné hmotnosti a den.

25 Pro léčení herpetických virových onemocnění jsou shora uvedené přípravky bezpečné a dostatečně efektivní. Je možná i současná aplikace jiných antivirových preparátů, jako jsou antivirové nukleosidy, přípravky s povrchově vázanou účinnou látkou nebo antivirové interferony, které popsal S.S.Asculai a F.Rapp v US patentu 4, 507, 281, 26.března 1985.

Při léčbě acyklovir-rezistentních herpetických

virových onemocnění se zjistilo, že současná aplikace analogů antivirových nukleosidů synergicky zvyšuje účinek účinné látky podle současného patentu bez nežádoucích toxických vedlejších účinků. Proto se při léčbě acyklovir-rezistentních herpetických infekcí u savců na farmaceuticky a veterinárně vhodný nosič naváže ve vhodných množstvích kombinace analogů antivirových nukleosidů nebo jejich terapeuticky účinných solí s peptidovými deriváty obecného vzorce 1 nebo jejich terapeuticky účinnými solemi.

Termín "synergický účinek", použitý pro vztah antivirové a antiherpetické účinnosti shora uvedených kombinací analogu nukleosidu a peptidového derivátu obecného vzorce 1, znamená, že antivirový a antiherpetický účinek této kombinace je vyšší než předpokládaný účinek daný součtem účinků jednotlivých složek kombinace.

Při aplikaci kombinace účinných látek při terapii acyklovir-rezistentních herpetických onemocnění teplokrevným zvířatům (koním, prasatům, nebo lidem) se použije vehikulum složené z jednoho nebo více nosičů v množství určeném požadovanou rozpustností, chemickými vlastnostmi analogu nukleosidu a peptidového derivátu obecného vzorce 1, vybrané formě podání a poměrnému množství obou aktivních složek zaručujícím jejich synergický antivirový účinek. Vhodnější cestou podání je lokální aplikace kombinace obou aktivních složek (tj. analogu antivirového nukleosidu a peptidového derivátu obecného vzorce 1 nebo jejich terapeuticky účinné soli) ve formě roztoků, emulzí, mastí nebo lotion ve farmaceuticky přijatelných nosičích. Takové lékové formy mohou obsahovat 0,01 - 1,0 hmotnostní procento analogu nukleosidu nebo jeho terapeuticky

účinné soli nebo přibližně 0,05 až 1 hmotnostní procento peptidového derivátu obecného vzorce 1 nebo jeho terapeuticky účinné soli.

5 V každém jiném případě jsou aktivní složky v kombinaci v množství, které zaručuje synergický antiherpetický efekt.

Následující příklady dále popisují současný vynález. Teploty jsou uvedeny ve stupních Celsia.

U roztoků jsou uvedena objemová procenta nebo jejich

10 rozmezí, pokud není uvedeno jinak. Spektrum nukleární magnetické rezonance se zjišťovalo na Brukerově

spektrometru při 200 MHz nebo 400 MHz (uvedené údaje byly získány při 400 MHz). Chemický posun (δ) je uváděn v ppm. Používané zkratky: BOC - terc.butyloxykarbonyl;

15 Bu - butyl; Bzl - benzyl; DMF - dimethylformamid;

Et - etyl; EtOH - etanol; EtOAc - etylacetát;

Et₂O - diethyleter; Me - metyl; MeOH - metanol;

Pr - propyl; TLC - chromatografie na tenké vrstvě;

THF - tetrahydrofuran.

20

Příklad 1

Obecný postup pro vaznou reakci

(viz také R.Knorr a spol., Tetrahedron Letters, 30, 1927 (1989).

25

První reakční činidlo, t.j. volný amin (nebo jeho hydrochlorid) se rozpustí v metylenchloridu nebo acetnitrilu a vzniklý roztok se zchladí na teplotu -4°C.

Do míchaného roztoku se pod dusíkem přidají 4 ekv.

30

N-metylmorfolinu. Po 20 minutách se přidá 1 ekv.

druhého reakčního činidla, t.j. volné kyseliny karboxylové, a 1,05 ekv. vazného činidla. (Vhodnými a účinnými vazným činidly jsou v tomto případě (benz-

triazol-1-yloxy) tris(dimetylamino) fosfonium hexafluor-
fosfátu nebo lépe 2-(1H-benztriazol-1-yl)-N,N,N',N'-
tetrametyluroniumtetrafluorboritan. Reakce se sleduje
chromatografií na tenké vrstvě. Po dokončení reakce se
5 metylenchlorid (nebo acetonitril) odpaří za sníženého
tlaku. Vzniklý zbytek se rozpustí v etylacetátu a
roztok se dostatečně promyje 1N vodným roztokem
kyseliny citronové, 10% vodným roztokem unilicitanu
sodného a nasyceným roztokem chloridu sodného.
10 Organický podíl se suší nad síranem hořečnatým,
filtruje se a zahustí dosucha za sníženého tlaku.
Zbytek se po absorpci na silikagel čistí rychlou
chromatografií podle postupu uvedeného W.C Stillem a
spol v J. Org. Chem, 43, 2923 (1978).

15

Příklad 2

Příprava meziprojektu H-Asp(cyPn)(Bzl)-NH-(S)-
-CH(CH₂CMe₃)CH₂OBzl

20 Část a): (S)- α -Azido-1-((fenylmetoxy)karbonyl)-
-cyklopentanooctová kyselina

Sloučenina se připraví z 2-oxospiro[4,4]-
nonan-1,3-dionu podle postupu uvedeného M.N. Aboul-
-Eneinem a spol. ve Pharm. Acta Helv., 55, 50 (1980) a
25 za použití asymetrické azidace popsané D.A.Evansem a
spol. J. Amer. Chem. Soc., 112, 4011 (1990).

Konkrétní postup spočívá v přidání po
kapkách 469 ml (750 mmol) 1,6 M roztoku butyllithia v
hexanu do roztoku 96,8 g (750 mmol) roztoku 4(S)-(1-
30 -metyletyl)-2-oxazolidinonu v tetrahydrofuranu
(popsaného L.Pridgenem a J. Prol. v J Org. Chem., 54,
3231 (1989)) v atmosféře argonu při teplotě -40°C. Směs
se 30 minut míchá při teplotě -40°C, a pak se zchladí na

teplotu -78°C . Do chlazené směsi se po kapkách přidá 2-oxospiro[4,4]nonan-1,3-dion a směs se míchá 1 hodinu při teplotě 0°C . Do směsi se přidá (600 ml) 20%

objemových vodného roztoku kyseliny citronové, organický podíl se oddělí a vodný podíl se extrahuje

5 etylacetátem. Sloučené organické podíly se promyjí

nasyceným roztokem chloridu sodného, suší se nad

síranem hořečnatým a zahustí se za sníženého tlaku za

vzniku 300-g růžové pevné látky 3-(2-(1-karboxycyklo-

10 pentyl)-1-oxoethyl)-4(S)-(1-metyletyl)-2-oxazolidinonu.

Asi 750 mmol této pevné látky se rozpustí v

1 l acetonitrilu a po přidání 128,3 g (89,2 ml, 750

mmol) benzylbromidu a 114 g (112 ml, 750 mmol)

1,8-diazobicyklo[5.4.0]-undec-7-enu se vzniklá směs 16

15 hodin pod argonem míchá. Podíl těkavých látek se

odstraní za sníženého tlaku a zbytek se rozpustí ve

směsi vody a etylacetátu. Organický podíl se oddělí,

promyje se 10% vodným roztokem kyseliny citronové,

nasyceným roztokem chloridu sodného a suší se nad

20 síranem hořečnatým a zahustí se dosucha za sníženého

tlaku za vzniku oleje. Krystalizací oleje ze směsi

hexanu a etylacetátu vznikne 204 g bílé pevné látky

odpovídajícího benzylesteru s výtěžkem 73%.

Roztok 70 g (187 mmol) této látky ve 200 ml

25 tetrahydrofuranu se zchladí na teplotu -78°C . Do

chlazeného roztoku se během 15 minut přidá 286 ml

(189 mmol) 0,66 M roztoku 1,1,1,3,3,3-hexametyl-

disilazanu v tetrahydrofuranu obsahujícího 6% roztok

kumenu. Vzniklá směs se 45 minut míchá při teplotě

30 -78°C a do chlazeného roztoku se najednou přidá roztok

67 g (216 mmol) 2,4,6-triisopropylbenzensulfonylazidu

ve 100 ml bezvodého tetrahydrofuranu a po 2 minutách se

přidá 50 ml (860 mmol) ledové kyseliny octové. Směs se

ohřeje a míchá 1 hodinu v rozmezí teplot 35-45°C. Podíl
těkavých látek se odstraní za sníženého tlaku a vzniklý
žlutý zbytek se rozetře se 1,7 l směsí hexanu a etanolu
v poměru 4:1 za vzniku bílé pevné látky, která se
5 oddělí filtrací. Filtrát se smíchá s oxidem křemičitým
o velikosti ok 230-240 mesh. Podíl těkavých látek se
odstraní za sníženého tlaku a sušením vzniklé pevné
látky za sníženého tlaku při teplotě 35°C se odstraní
kumen. Po absorpci na sloupec oxidu křemičitého se
10 pevný podíl eluuje směsí hexanu a etylacetátu v poměru
9:1. Po zahuštění eluátu vznikne 66 g 3-((2(S)-azido-
-1-oxo-2-(1-((fenylmetoxy)karbonyl)cyklopentyl)etyl)-
-4(S)-(1-metyletyl-2-oxazolidinonu s výtěžkem 86%.

Roztok 13,42 mg (32,4 mmol) této sloučeniny
15 v 608 ml směsí tetrahydrofuranu a vody v poměru 3:1 se
zchladí na teplotu 0°C. Do chlazeného roztoku se přidá
16,3 ml (518 mmol peroxidu vodíku) směsí peroxidu
vodíku a vody v poměru 3:7, a pak 2,86 g (68,2 mmol)
směsí hydroxidu lithného a vody. Po 45 minutách míchání
20 při teplotě 0°C se reakce zastaví přidáním 400 ml 10%
vodného roztoku siřičitanu sodného. Po přidání 1,93 g
hydrogenuhličitanu sodného se směs zahustí za sníženého
tlaku. Chirální pomocná látka se obnoví během 20 hodin
kontinuální extrakcí ze směsí vodného roztoku hydrogen-
25 uhličitanu sodného a chloroformu. Po zchlazení vodného
podílu na teplotu 0°C se přidáním koncentrované kyseliny
chlorovodíkové přivede na kyselé pH a následně se
extrahuje etylacetátem. Extrakt se promyje nasyceným
roztokem chloridu sodného, suší se nad síranem
30 hořečnatým a zahustí se za sníženého tlaku za vzniku
8,2 g bílé pevné látky výsledné sloučeniny s výtěžkem
84%. ¹H NMR (CDCl₃): 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). Tato sloučenina se použije v pro syntézu výsledné sloučeniny části c) tohoto příkladu.

Část b): $\text{NH}_2\text{-(S)-CH(CH}_2\text{CMe}_3\text{)CH}_2\text{OBzl}$

5 Redukce H- γ MeLeu-OH se provede použitím směsi hydroborátu lithia (LiBH_4) a trimetylsiliciumchloridu

(Me_3SiCl) podle postupu uvedeného A.Giannisem a

K. Sandhoffem v Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 28, 218

(1989) za vzniku aminoalkoholu vzorce $\text{NH}_2\text{-(S)-CH(CH}_2\text{-}$

10 $\text{CMe}_3\text{)CH}_2\text{OH}$. Směs 812 mg (6,2 mmol) výše uvedené

sloučeniny, 659 mg (6,51 mmol) triethylaminu a 1,42 g

(6,51 mmol) di-terc.-butyl-bikarbonátu v 15 ml

tetrahydrofuranu se míchá v atmosféře dusíku 15 minut

při teplotě 4°C, a pak 4 hodiny při teplotě místnosti.

15 Po odpaření tetrahydrofuranu za sníženého tlaku se

vzniklý zbytek rozpustí v etylacetátu a vzniklý roztok

se promyje 10% vodným roztokem kyseliny citronové, 5%

vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a nasyceným

roztokem chloridu sodného. Organický podíl se suší nad

20 síranem hořečnatým a zahustí se dosucha za sníženého

tlaku. Vzniklý zbytek se po absorpci na oxid křemičitý

čistí rychlou chromatografií při eluci směsí hexanu a

ethylacetátu v poměru 2:1 za vzniku 1,23 g Boc-NH-(S)-

-CH(CH₂CMe₃)CH₂OH s výtěžkem 86%.

25 Do roztoku 1,23 g (5,35 mmol) Boc-NH-(S)-

-CH(CH₂CMe₃)CH₂OH ve 13 ml benzylchloridu se postupně

přidá 106 mg tetrabutylamoniumbisulfátu a 3 ml 50%

30 vodného roztoku hydroxidu sodného. Vzniklá směs se 90

minut míchá v rozmezí teplot 35-40°C, zředí se

ethylacetátem a promyje se vodou a nasyceným roztokem

chloridu sodného. Organický podíl se suší nad síranem

hořečnatým a zahustí dosucha za sníženého tlaku. Po

rozpuštění zbytku v hexanu se vzniklý roztok vlije na

sloupec oxidu křemičitého a sloupec se eluuje hexanem k

odstranění benzylchloridu. Po eluci směsí hexanu a
etylacetátu v poměru 2:1 vznikne Boc-NH-(S)-CH-

-(CH₂CMe₃)CH₂OBzl. ¹H NMR (CDCl₃) této sloučeniny:

δ 0,95 (s, 9H), 1,42 (s, 9H), 1,30 - 1,55 (m, 2H), 3,42
5 (d, J = 4 Hz, 2H), 3,88 (br. 1H), 4,54 (m, 3H),
7,23 - 7,4 (M, 5H).

V 10 ml 6N roztoku kyseliny chlorovodíkové v dioxanu se
rozpustí 1,28 g (3,99 mmol) této sloučeniny a vzniklý
roztok se 45 minut míchá pod dusíkem při teplotě 4°C.

10 Po odstranění rozpouštědla odpařováním vznikne 1,05 g
chloridu výsledné sloučeniny, který se bez dalšího
čištění použije v následující části tohoto příkladu.

Část c): Příprava výsledné sloučeniny tohoto příkladu-

15 H-Asp(cyPn)(Bzl)-NH-(S)-CH(CH₂CMe₃)CH₂OBzl

Sloučenina se připraví vaznou reakcí, kde
je výchozí sloučeninou výsledná sloučenina připravená
v příkladu 1, prvním reakčním činidlem je NH₂-(S)-CH-
(CH₂CMe₃)CH₂OBzl a druhým reakčním činidlem je výsledná
20 sloučenina části a) tohoto příkladu, t.j. (S)-α-Azido-
-1-((fenylmetoxy)karbonyl)cyklopentanooctová kyselina.
Vznikne N-((S)-1-benzyloxymetyl-3,3-dimetylbutyl)-
-(S)-α-azido-1-((fenylmetoxy)karbonyl)cyklopentan-
acetamid. Redukcí této sloučeniny za přítomnosti
25 chloridu cínatého v metanolu vznikne podle postupu
uvedeného N.Maitim a spol. v Tetrahedron Letters, 27,
1423 (1986) výsledná sloučenina tohoto příkladu. ¹H NMR

(CDCl₃) této sloučeniny: δ 0,98 (s, 9H), 1,22 - 2,25
(s, 12H), 3,4 (d, J = 4 Hz, 2H), 3,64 (s, 1H), 4,18
30 (br. m, 1H), 4,52 (m, 2H), 5,12 (s, 2H), 7,18 (d, J = 7
Hz, 1H), 7,22 - 7,38 (br. m, 10H).

Příklad 3

Příprava meziprojektu Boc-Tbg-CH₂-(RS)-CH(CH₂C(O)-
CMe₃)C(O)OH

Část a): hořečnatá sůl monoalylmalonátu

Roztok 100 g (0,69 mol) 2,2-dimetyl-1,3-
-dioxan-4,6-dionu a 47 ml (0,69 mol) alylalkoholu

7-300 ml benzenu se 24 hodin zahřívá pod refluxem

Po odstranění rozpouštědla za sníženého tlaku se

vzniklý zbytek destiluje za sníženého tlaku za vzniku

71 g monoalylmalonátu s výtěžkem 71% a o teplotě tání

123-127°C při tlaku 7,02 kPa. Ve 300 ml bezvodého

tetrahydrofuranu se rozpustí 71 g (0,48 mol) tohoto

esteru a do vzniklého roztoku se přidá 28,5 g (0,245

mol) etoxidu hořčíku. Směs se 4 hodiny míchá pod

argonem při teplotě místnosti (20-22°C), rozpouštědlo

se odstraní odpařováním za sníženého tlaku a zbytek se
rozetře s etyleterem za vzniku žlutohnědé pevné látky.

Po rozemletí pevné látky na jemné částice a sušení za

sníženého tlaku vznikne 56 g hořečnaté soli

monoalylmalonátu s výtěžkem 73%. Tato sloučenina se

použije v následující části příkladu.

Část b): Boc-Tbg-CH₂C(O)OCH₂=CH₂

Do roztoku 15 g (64 mmol) Boc-Tbg-OH

ve 150 ml bezvodého acetonitrilu se přidá 12,6 g (78

mmol) 1,1-karbonyldiimidazolu. Po 2 hodinách míchání

směsi při teplotě místnosti pod argonem se do směsi

přidá 24 g (78 mmol) hořečnaté soli monoalylmalonátu a

100 mg 4-(N,N-dimetylamino)pyridinu. Směs se 1 hodinu

zahřívá pod refluxem a při teplotě místnosti se 18

hodin míchá. Směs se zahustí za sníženého tlaku a

vzniklý zbytek se rozpustí ve 300 ml etylacetátu.

Roztok se promyje dvakrát 100 ml 10% vodného roztoku

kyseliny citronové a dvakrát 100 ml nasyceného roztoku
chloridu sodného, suší se nad síranem hořečnatým a
zahustí se odpařováním dosucha. Vzniklý zbytek se po
absorbci na oxid křemičitý čistí rychlou chromatografií
5 při eluci směsí hexanu a etylacetátu v poměru 9 : 1
za vzniku 19,4 g hnědého oleje výsledné sloučeniny,
který stáním krystalizuje o výtěžku 96%.

¹H NMR (CDCl₃): Sloučenina je směsí keto-enolových
tautomerů v chloroformu v poměru 3 : 1. δ 0,96 (s,
10 9H, enol forma), 1,04 (s, 9H), 1,46 (s, 9H), 3,65 (s,
2H), 3,90 (d, J = 8,5 Hz, 1H, enol forma), 4,20 (d, J =
7,5 Hz, 1H), 4,65 (s, 2H), 5,10 (br. d, J = 7,5 Hz,
1H), 5,20 - 5,40 (m, 2H), 5,80 - 6,05 (m, 1H), 12 (s,
15 1H, enolforma). Tento alylester se použije pro přípravu
výsledné sloučeniny v části d) tohoto příkladu.

Část c): Etylester kyseliny (E)-5,5-dimetyl-4-oxo-
-2-hexenové

Postup syntézy je popsán S. Manfredinim a
20 spol. v Tetrahedron Letters, 29, 3997 (1988). Surový
produkt jako olej se čistí po absorbci na oxid
křemičitý rychlou chromatografií při eluci hexanem za
vzniku žlutého oleje výsledného etylesteru, který se
použije v další části tohoto příkladu.
25 ¹H NMR (CDCl₃) této sloučeniny: 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).

Část d): Boc-Tbg-CH₂-(RS)-CH(CH₂C(O)-CMe₃)C(O)OH
- výsledná sloučenina tohoto příkladu

30 Ve 25 ml bezvodého tetrahydrofuranu se
v atmosféře argonu rozpustí 0,67 g (2,1 mmol)
Boc-Tbg-CH₂C(O)O-CH₂=CH₂ (výsledná sloučenina částí b)).
Do roztoku se přidá 0,095 g (2,4 mmol) 60% disperze

hydridu sodného v oleji. Směs se 30 minut míchá při teplotě místnosti, a pak se přidá 0,435 g (2,36 mmol) etylesteru kyseliny (E)-5,5-dimetyl-4-oxo-2-hexenové (popsané v části c) tohoto příkladu). Reakční směs se míchá do ukončení reakce (asi 6 hodin), které se prokáže chromatografií na tenké vrstvě. Reakce se ukončí přidáním 10% vodného roztoku kyseliny citronové, tetrahydrofuran se odstraní za sníženého tlaku a vzniklý zbytek se třikrát extrahuje 25 ml etylacetátu. Extrakt se promyje vodou, suší se nad síranem hořečnatým a zahustí se za sníženého tlaku. Vzniklý zbytek se po absorpci na oxid křemičitý čistí rychlou chromatografií při eluci směsí hexanu a etylacetátu v poměru 9 : 1 za vzniku 1,06 g adičního produktu Michaelovy reakce s výtěžkem 100%.

Přeměna adičního produktu Michaelovy reakce na Boc-Tbg-CH₂-(RS)-CH(CH₂C(O)-CMe₃)C(O)OH:

V atmosféře argonu se v 10 ml metylenchloridu rozpustí 0,20 g (0,18 mmol) tetrakistrifenylofosfinpaladia(0) a 0,060 g (0,23 mmol) trifenylofosfinu. Po přidání 20 ml acetonitrilu se roztok zchladí na teplotu 0°C, a pak se přidá 0,28 ml (2,7 mmol) pyrolidinu a 1,06 g adičního produktu Michaelovy reakce. Vzniklá směs se nechá během 1 hodiny ohřát na teplotu místnosti, a pak se míchá 20 hodin. V atmosféře argonu se směs refluxuje do ukončení reakce 1 hodinu. Rozpuštědlo se odstraní odpařováním a vzniklý zbytek se po absorpci na oxid křemičitý čistí rychlou chromatografií při eluci směsí hexanu a etylacetátu v poměru 9 : 1 za vzniku 0,77 g (1,7 mmol) Boc-Tbg-CH₂-(RS)-CH(CH₂C(O)CMe₃)C(O)OEt s výtěžkem 83%. Celé množství této sloučeniny se rozpustí v 10 ml směsi etylenglykoldimetyleru a vody v poměru 1 : 1, a pak

se do roztoku přidá 0,31 g (7,4 mmol) monohydrátu
hydroxidu lithného. Směs se 4 hodiny míchá při teplotě
místnosti, přidáním 20 ml 10% vodného roztoku kyseliny
citronové se přivede na kyselé pH a třikrát se
5 extrahuje 25 ml etylacetátu. Extrakt se suší nad
síranem hořečnatým a zahustí se za sníženého tlaku za
vzniku 0,69 g žlutohnědé pevné látky výsledné
sloučeniny s výtěžkem 80% (vztaheno na Boc-Tbg-CH₂C-
-(O)O-CH₂CH=CH₂. Podle NMR jde o směs diastereomerů v
10 poměru 55 : 45. ¹H NMR (CDCl₃) této sloučeniny: δ 0,97
(s, 9H, druhý isomer), 0,99 (s, 9H, hlavní isomer), 1,14
(s, 18 h), 1,48 (s, 18 H), 2,68 - 3,12 (m, 8H), 3,30
(m, 2H), 4,08 (d, J = 9 Hz, 1H, druhý isomer), 4,10 (d,
J = 9 Hz, 1H, hlavní isomer), 5,11 (d, J = 9 Hz, 2H).

15

Příklad 4

Příprava meziprojektu H-Tbg-CH₂CH(CH₂C(O)CMe₃)C(O)-
-Asp(cyPn)(Bzl)-NH-(S)-CH(CH₂C(O)Me₃)CH₂OBzl

20 Sloučenina se připraví vaznou reakcí, která je popsána
v příkladě 1 z 3,42 g (7,13 mmol) výsledné sloučeniny
příkladu 2 jako prvního reakčního činidla a 2,50 g
(6,48 mmol) výsledné sloučeniny příkladu 3 jako druhého
reakčního činidla. Vzniklá surová sloučenina se po
25 absorpci na oxid křemičitý čistí rychlou chromatografií
při eluci směsí hexanu a etylacetátu v poměru 4 : 1 za
vzniku 4,64 g N-Boc derivátu výsledné sloučeniny s
výtěžkem 84% (R_f = 0,21 ; směs hexanu a etylacetátu v
poměru 7 : 3). Roztok 4,64 g (5,44 mmol) tohoto
30 derivátu v 50 ml 6 N roztoku kyseliny chlorovodíkové v
dioxanu se 1 hodinu míchá při teplotě místnosti, a pak
se zahustí za sníženého tlaku. Vzniklý zbytek se
rozpustí v etyleteru a vzniklý roztok se promyje

nasyceným vodným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného,
nasyceným roztokem chloridu sodného, suší se nad
síranem hořečnatým a zahustí se za vzniku žlutého oleje
obsahujícího dva diastereomery. Rychlou chromatografií
5 na oxidu křemičitém při eluci směsí hexanu, etylacetátu
a metanolu v poměru 5 : 4,5 : 0,5 se oddělí dva
isomery. Výsledný isomer o vyšší polaritě ($R_f = 0,18$;
směs etylacetátu, hexanu a metanolu v poměru 7 : 3 :
0,5) vznikne jako 2,52 g bezbarvého oleje s výtěžkem
10 52%. Tento výsledný isomer - výsledná sloučenina
příkladu - se použije bez dalšího čištění v
následujícím příkladu.

Příklad 5

15 Příprava Boc-(N-Me)Val-Tbg-CH₂(R)CH(CH₂C(O)CMe₃)C(O)-
-Asp(cyPn)(Bzl)-NH-(S)-CH(CH₂CMe₃)CH₂OBzl

Výsledná sloučenina se připraví vaznou reakcí, která je
popsána v příkladě 1 z 4,45 g (5,95 mmol) výsledné
sloučeniny příkladu 4 jako prvního reakčního činidla a
20 z 4,41 g (17,9 mmol) N-metylvalinu jako druhého
reakčního činidla. Rychlou chromatografií surového
produktu na oxidu křemičitém a při eluci směsí hexanu a
ethylacetátu v poměru 7 : 3 vznikne 4,02 g výsledné
sloučeniny s výtěžkem 72%.

25 ¹H NMR (CDCl₃): δ 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, H
= 8,5 Hz, 1H), 4,49 (d, J = 4,5 Hz, 2H), 4,64 (d, J =
30 11 Hz, 1H), 5,18 (d, J = 5 Hz, 2H), 6,78 (br d, J =
8,5 Hz, 1H), 7,11 (broad d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,18
(br d, J = 11 Hz, 1H), 7,2 - 7,45 (m, 10H).

Příklad 6

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

5 Roztok 4,02 (4,25 mmol) výsledné sloučeniny příkladu 5 ve 30 ml 6 N roztoku kyseliny chlorovodíkové v dioxanu se 1 hodinu míchá při teplotě místnosti, a pak se zahustí za sníženého tlaku za vzniku volného

10 N-terminalního aminoderivátu výsledné sloučeniny příkladu 5 jako jejího hydrochloridu. Po vazné reakci popsané v příkladě 1 za použití tohoto derivátu jako prvního reakčního činidla a 2,00 g (13,3 mmol)

15 kyseliny benzenpropionové jako druhého činidla se surový produkt čistí po absorpci na oxid křemičitý rychlou chromatografií při eluci směsí hexanu a etylacetátu v poměru 3 : 2 za vzniku 4,00 g bílé pěny

$\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-(\text{N-Me})\text{Val-Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$
 $-\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})(\text{OBzl})-\text{NH}-(\text{S})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CMe}_3)\text{CH}_2\text{OBzl}$
($R_f = 0,35$; směs hexanu a etylacetátu v poměru 1 : 1)
20 s výtěžkem 94%.

Za přítomnosti 200 mg 20% hydroxidu paladnatého na aktivním uhlí se při tlaku 0,1 MPa vodíku 5 hodin hydrogenolyzuje v etanolovém roztoku 4,00 g (4,03 mmol) této sloučeniny. Po ukončení reakce se reakční směs

25 filtruje přes membránu o velikosti otvorů 45 μm . Filtrát se zahustí za sníženého tlaku za vzniku čirého oleje, který se následně rozpustí ve 100 ml etyleteru.

Roztok se odpaří dosucha za sníženého tlaku.

30 Rozpouštění a odpařování se opakuje tak dlouho, dokud nevznikne bílá pevná látka. Tato látka se rozetře s hexanem, filtruje se a suší za sníženého tlaku za vzniku 3,12 g výsledné sloučeniny s výtěžkem 95%.

^1H NMR (d_6 -DMSO), 400 MHz: Sloučenina v DMSO je směsí

dvou rotamerů v poměru 50 : 50.

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 (m, 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, $H = 8$ Hz, 0,5H), 4,54 - 4,62 (broad m, 1H), 4,73 - 4,81 (m, 1,5 H), 7,12 - 7,29 (m, 6H), 7,94 (d, $J = 10$ Hz, 1H), 8,34 (s, $J = 10$ Hz, 0,5H), 8,32 (d, $J = 8,5$ Hz, 0,5H).

Podle postupu uvedeného v příkladě 6 a za použití kyseliny 2-(fenylmetyl)-3-fenylpropionové (dibenzyl-octové kyseliny) namísto kyseliny benzenpropionové se připraví $(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC}(\text{O})-(\text{N-Me})\text{Val-Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\gamma\text{MeLeucinol}$.

Příklad 7

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

Do roztoku 23 mg (0,030 mmol) výsledné sloučeniny příkladu 4 a 6 mg (0,057 mmol) triethylaminu v bezvodém metylenchloridu se přidá 28 mg (0,248 mmol) 1-ethyl-propylisokyanátu. Reakční směs se 1 hodinu míchá při teplotě 0°C a v atmosféře argonu a následně 18 hodin při teplotě místnosti. Ukončení reakce se prokáže chromatografií na tenké vrstvě při eluci směsí etylacetátu a hexanu v poměru 1 : 1. Rozpouštědlo se oddělí odpařováním za sníženého tlaku a zbytek se čistí rychlou chromatografií po absorpci na oxid křemičitý při eluci směsí hexanu a etylacetátu v poměru 6 : 4 za vzniku 16 mg dibenzylderivátu výsledné sloučeniny.

$^1\text{H NMR}$ (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),
5 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, 1H).

10 Hydrogenolýzou této sloučeniny při tlaku 0,1 MPa v
etanolovém roztoku a za přítomnosti 10% paladia na
aktivním uhlí vznikne výsledná sloučenina. Hmotové
spektrum: 703 (M + Na)⁺.

Příklad 8

15 Příprava ostatních meziproductů pro přípravu radikálů
na C-zakončení peptidů obecného vzorce 1:

Část a): $\text{NH}_2\text{-(R)-CH(Et)CMe}_3$

20 Do chlazeného roztoku o teplotě 0°C 106 g
(0,92 mmol) 4,4-dimetyl-3-pentanonu a 111 g (0,92 mmol)
(R)- α -methylbenzylaminu v 1 l benzenu se přidá 50,5 ml
(0,46 mmol) chloridu titaničitého ve 200 ml benzenu
tak, aby teplota směsi se během přidávání nezvýšila nad
10°C. Směs se 3 hodiny míchá při teplotě 40°C, zchladí
25 se na teplotu místnosti a filtruje se přes infusiorovou
hlínku, která se pak promyje etyleterem. Sloučený
filtrát a promývací kapalina se zahustí a vzniklý
zbytek se rozpustí ve 2 l bezvodého metanolu. Roztok se
zchladí na teplotu 0°C, a pak se po částech přidá 20 g
30 (0,53 mmol) borhydridu sodného tak, aby se teplota
směsi nezvýšila nad 5°C. Po odpaření metanolu se vzniklý
zbytek rozpustí v etyleteru a roztok se promyje
nasyceným roztokem chloridu sodného, suší se nad

síranem hořečnatým a odpařuje se dosucha za vzniku
načervenalého oleje, který je podle NMR směsí dvou
diastereoisomerů v poměru 18 : 1. Tento olej se po
absorbci na oxid křemičitý čistí rychlou chromatografií
5 při eluci směsí etylacetátu a hexanu v poměru 7 : 93 za
vzniku 110 g kapaliny N-(1(R)-fenyletyl)-1-(R)-etyl-
-2,2-dimetylpropylaminu s výtěžkem 54%. tato kapalina
se rozpustí v 1,5 l hexanu a do vzniklého roztoku se
během 15 minut přidá 90 ml 6N roztoku kyseliny

10 chlorovodíkové v dioxanu. Vzniklá pevná látka se sebere
filtrací a promyje se hexanem za vzniku 125 g N-(1(R)-
fenyletyl)-1-(R)-etyl-2,2-dimetylpropylhydrochloridu.

^1H NMR (CDCl_3): δ 0,55 (t, J = 7,5 Hz, 3H),
1,14 (m, 9H), 1,54 - 1,95 (m, 2H), 2,23 (d, J = 6,5 Hz,
15 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 41,5 g této sloučeniny ve 120 ml metanolu se
smíchá s 10% roztokem paladia na aktivním uhlí a
vzniklá směs se míchá 48 hodin v Parrově hydrogenačním
20 přístroji při teplotě místnosti a tlaku vodíku 0,35
MPa. Vzniklá směs se filtruje a filtrát se zahustí za
vzniku 25 g adičního chlorovodíku výsledné sloučeniny -
NH₂-(R)-CH(Et)CMe₃ - v podobě bílé pevné látky s
výtěžkem 100%.

25 ^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 (br s, 3H)

Podle stejného postupu, ale za použití 3,3-dimetyl-
30 -2-butanonu namísto 4,4-dimetyl-3-pentanonu vznikne
NH₂-(R)-CH(Me)CMe₃.HCl.

Příklad 9

Příprava ostatních meziproduktů pro přípravu radikálů na N-zakončení peptidů obecného vzorce 1 podle postupu uvedeného v příkladě 7:

5

Část a): 1-propylbutylisokyanát

Tato sloučenina se připraví z běžně
dodávaného 4-aminohexanu podle postupu uvedeného
V.S.Goldesmidtem a M.Wickem v Liebigs Ann. Chem., 575,
217 (1952).

10

Část b): 1-etyl-1-(2-propenyl)-3-butenylisokyanát

Do 880 ml 1,0 M roztoku alylbromidu
hořečnatého v etyleteru se po kapkách přidá roztok 14,5
g (264 mmol) propionitrilu ve 40 ml bezvodého
15 etyleteru. Reakční směs se refluxuje a míchá
mechanickým míchadlem 2 hodiny, a pak se zchladí na
teplotu 0°C. Do zchlazené směsi se opatrně přidá 320 ml
nasyceného vodného roztoku chloridu amonného. Organický
podíl se oddělí, suší se nad síranem hořečnatým,
20 zchladí se na teplotu 0°C a při stejné teplotě se smísí
s 200 ml 1 M roztokem kyseliny chlorovodíkové v
etyleteru. Vzniklá pevná látka se sebere a suší se za
sníženého tlaku (asi 27 g). Vzniklý produkt se rozpustí
ve 200 ml metylenchloridu a roztok se dvakrát promyje
25 10% vodným roztokem uhličitanu sodného, a pak nasyceným
roztokem chloridu sodného. Po sušení nad síranem
hořečnatým a zahuštění dosucha vznikne žlutý olej,
který se destiluje při teplotě 82-85°C a tlaku 52 kPa
za vzniku 11,06 g bezbarvé kapaliny 1-etyl-1-(2-
30 -propenyl)-3-butenylaminu s výtěžkem 34%.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) této sloučeniny: δ 0,89 (t, J =
7 Hz, 3H), 1,39 (q, J = 7 Hz, 2H), 2,11 (d, J = 7Hz,
2H), 5,06 - 5,14 (m, 4H), 5,80 - 5,89 (m, 2H).

Shora uvedená sloučenina se převede na 1-etyl-1-(2-propenyl)-3-butenylisokyanát výše uvedeným postupem podle V.S.Goldsmidta a M.Wicka.

5 První část předchozí části b), t.j. příprava 1-etyl-1-(2-propenyl)-3-butenylaminu, vychází z metody popsané G.Alvernhem a A.Laurentem v Tetrahedron Lett., 1057

(1973). Podle tohoto obecného postupu za použití odpovídajících reakčních činidel lze připravit ostatní potřebné isokyanátové meziprodukty přípravy peptidových 10 derivátů s nenasycenou vazbou na N-zakončení, tzn.

nenasycené alkylaminokarbonyly jako je např. 1-metyl-1-(2-propenyl)-3-butenyl. Upozorňujeme, že pokud budou potřebné isokyanátové meziprodukty připravené podle postupu uvedeného v příkladě 7, pak konečným produkt 15 bude odpovídat peptidovému derivátu obecného vzorce 1, který má N-zakončení nasycené. Navíc, podle postupu v příkladě 7 lze připravit takto si odpovídající peptidy, jako např. $\text{Pr}_2\text{CHNHC(O)-Tbg-CH}_2\text{-(R)-CH(CH}_2\text{C(O)CMe}_3\text{)-}$
20 $\text{-C(O)-Asp(cyPn)-NH-(R)-CH(Et)CMe}_3$, FAB hmotové spektrum (m/z): $[\text{M} + \text{H}]^+$ - výsledný derivát peptidu zmíněný v příkladě 10.

Za použití vhodných meziproduktů lze podle uvedených postupů v příkladech 1 až 7 připravit sloučeniny podle 25 obecného vzorce 1, z nichž některé jsou uvedeny v tabulce následujícího příkladu. Při vzniku sraženiny není porušen surový produkt. V některých případech může být sloučenina čištěna semipreparativní HPLC v reversní fázi na sloupci C-18 při eluci gradientem acetonitrilu a 30 vody obsahujících 0,06% roztok kyseliny trifluoroctové. V tomto případě se před čištěním provede rozpuštění surového produktu v 0,1 M vodném roztoku hydroxidu amonného a převedení pH roztoku na pH = 7 přidáním 0,1

M vodného roztoku kyseliny octové. Pokud je to vhodné,
pak se diastereomerické směsi rozdělí tímto postupem.

5 Příkladem dalších látek obecného vzorce 1, které je
možno připravit uvedeným způsobem, mohou být $(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC(O)}-$
 $(\text{N-Me})\text{Val-Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C(O)CMe}_3)\text{C(O)-Asp(cyPn)-NHCH}_2\text{CMe}_3$
a $(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC(O)}-(\text{N-Me})\text{Val-Tbg-CH}_2(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C(O)CMe}_3)\text{C(O)-}$
 $\text{Asp(cyPn)-NH-(R)-CH(Me)CMe}_3$.

10 Dále jsou uvedeny ještě další příklady sloučenin obec-
ného vzorce 1:

$\text{Pr}_2\text{CHNHC(O)-Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C(O)CMe}_3)\text{C(O)-Asp(cyPn)-NHCH}_2\text{CMe}_3$,
FAB/hmotové spektrum m/z : 665 /M + H/⁺,

15 $\text{EtPr}_2\text{CNHC(O)-Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C(O)CMe}_3)\text{C(O)-Asp(cyPn)-NH-}$
 $-(\text{R})-\text{CH}(\text{Et})\text{CMe}_3$,
FAB/hmotové spektrum m/z : 722 /M + H/⁺ a

$\text{EtPr}_2\text{CNHC(O)-Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C(O)CMe}_3)\text{C(O)-Asp(cyPh)-}$
 $\text{NHCH}_2\text{CMe}_3$,
20 FAB/hmotové spektrum m/z : 693 /M + H/⁺.

Příklad 10

25 Dále budou uvedeny pokusy, při nichž byl sledován
účinek peptidového derivátu vzorce 1 podle vynálezu,
 $\text{Pr}_2\text{CHNHC(O)-Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C(O)-CMe}_3)\text{C(O)-Asp(cyPn)-}$
 $\text{NH-(R)-CH(Et)CMe}_3$, a kombinací této látky s acyclovirem
proti klinickému izolátu HSV-1 divokého typu a proti dvěma
klinickým izolátům HSV-1, odolným proti acycloviru.

Viry

Klinické izoláty byly popsány v publikaci S. L. Sacks a další, *Annals of Internal Medicine*, 111, 893, 1989. Izoláty byly získány od ženy ve stáří 25 let s akutní myelogenní leukemií v průběhu prvního relapsu z allogenního transplantátu kostní dřeně. Počáteční kultury viru herpes simplex, pěstované z materiálu, odebraného osm dnů po transplantaci kostní dřeně, byly pozitivní (izolát 294, definovaný jako HSV-1 divokého typu). Pak byla zahájena léčba acyclovirem, avšak virové kultury byly ve dni 36 stále ještě pozitivní (izolát 615, jde o HSV-1, který již je odolný proti acycloviru. Bylo rovněž prokázáno, že subizolát 615.9 (ACV^rTK) je odolný proti acycloviru i proti forcanetu a má sníženou účinnost thymidinkinázy TK. Později bylo prokázáno, že subizolát 615.9 je TK-deficientní mutanta. Na rozdíl od tohoto izolátu bylo prokázáno, že subizolát 615.8 (ACV^rPOL) je odolný proti acycloviru i proti forcanetu, avšak účinnost thymidinkinázy se blíží účinnosti, prokázané pro původní izolát 294. Subizolát 615.8 je, jak bylo později potvrzeno, mutanta DNA-polymerázy.

Provedení zkoušky

Buňky BHK-21/C13 se inkubují dva dny v T-lahvích na ploše 150 cm² (1,5 x 10⁶ buněk/lahev) při použití prostředí alfa-MEM (Gibco Canada Inc., Burlington, Ontario, Kanada), doplněném 8 % objemovými fetálního telecího séra (FBS, Gibco Canada Inc.). Buněčný materiál byl uvolněn působením trypsinu a pak byly buňky přeneseny do čerstvého živného prostředí na plotny s 24 vyhloubeními, v každém vyhloubení bylo 2,5 x 10⁵ buněk v 750 mikrolitrech živného prostředí. Buněčný materiál byl inkubován 6 hodin při teplotě 37 °C tak, aby buňky mohly přilnout k podkladu. Pak byl buněčný materiál

jedenkrát promyt 500 mikrolitry prostředí alfa-MEM, doplněným 0,6 % objemovými FBS a pak byl materiál inkubován v 750 mikrolitrech téhož živného prostředí s nízkým obsahem séra celkem 3 dny. Po této době se prostředí s nízkým obsahem séra odstraní a buněčný materiál se inkubuje v 500 mikrolitrech prostředí BBMT celkem 2 až 3 hodiny. Prostředí BBMT je popsáno v publikaci P. Bratton a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 7909, 1982. Pak se buňky infikují HSV-2 při použití 0,02 PFU/buňka ve 100 mikrolitrech prostředí BBMT. Použitým kmenem HSV-2 byl kmen HG-52 podle publikace Y. Langelier a G. Buttin, J. Gen. Virol., 57, 21, 1981, virus byl skladován při teplotě -80°C . Po jedné hodině adsorpce viru při teplotě 37°C bylo prostředí odstraněno a buněčný materiál byl promyt 3 x 250 mikrolitry BBMT. Buněčný materiál v každém vyhloubení byl inkubován v přítomnosti nebo v nepřítomnosti (kontroly) určité koncentrace zkoumané látky, rozpuštěné ve 200 mikrolitrech prostředí BBMT. Po inkubaci 29 hodin při teplotě 37°C byly infikované buňky odděleny zmrazením plotny na -80°C s následným rozmrazením. Buněčný materiál z každého vyhloubení byl oddělen od povrchu pomocí tajících fragmentů ledu. Po úplném rozmrazení byla suspenze buněk oddělena a každé vyhloubení bylo vypláchnuto 150 mikrolitry prostředí BBMT. Vzorek viru (suspenze a promývací kapalina) byl opatrně zpracováván ultrazvukem 4 minuty při teplotě 4°C . Buněčná drť byla oddělena odstředěním (1000 g, 10 minut při 4°C). Supernatant byl oddělen a uložen při teplotě -80°C až do stanovení titru viru.

Titrace viru byla uskutečněna při použití modifikace kolorimetrické zkoušky podle publikace M. Langlois a další, Journal of Biological Standardization, 14, 201, 1986.

Podobným způsobem jako svrchu se buněčný materiál BHK-21/C13 zpracuje trypsinem a přenesení do čerstvého prostředí v mikrotitrační plotně s 96 vyhloubeními, jedno

vyhloubení obsahuje 20 000 buněk ve 100 mikrolitrech živného prostředí. Buněčný materiál se inkubuje 2 hodiny při teplotě 37 °C. V průběhu této doby se vzorek viru rozmrazí a opatrně zpracuje působením ultrazvuku celkem 15 sekund a pak se připraví logaritmické ředění vzorku (1/5 postupně: 50 mikrolitrů vzorku a 200 mikrolitrů prostředí BBMT, postupné ředění se uskuteční vícekanálovou pipetou).

Po ukončení inkubace buněk BWK-21/C13 po 2 hodinách se živné prostředí nahradí prostředím alfa-MEM, doplněným 3 % objemovými FBS. Nyní je možno buněčný materiál infikovat různými vzorky viru v různém ředění. Podíly různého zředění s objemem 50 mikrolitrů se přenesou do příslušného vyhloubení plotny. Výsledné infikované buňky se inkubují dva dny při teplotě 37 °C. Pak se přidá 50 mikrolitrů roztoku s obsahem 0,15 % neutrální červeně (jde o % objemová) v Hankově vyváženém roztoku solí (pH 7,3, Gibco Canada Inc.) do každého vyhloubení. Takto připravená plotna se inkubuje 45 minut při teplotě 37 °C. Pak se z každého vyhloubení odebere živné prostředí a buněčný materiál se promyje 200 mikrolitry Hankova vyváženého roztoku solí. Po promytí se uvolní barvivo z buněk přidáním 100 mikrolitrů směsi 0,1 M Sorensenova citrátového pufru o pH 4 a ethanolu v poměru 1 : 1. Sorensenův citrátový pufr se připraví tak, že se nejprve připraví 0,1 M roztok disodné soli kyseliny citronové rozpustěním 21 g monohydrátu kyseliny citronové ve 200 ml 1M vodného roztoku hydroxidu sodného a přidá se dostatečné množství vody do 1 litru. Pak se 61,2 ml, 0,1 M roztoku disodné soli kyseliny citronové smísí s 38,8 ml, 0,1 M vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové a popřípadě se pH upraví na 4,2. Pak se směs ve vyhloubeních opatrně promíchá míchacím zařízením a pak se vyhloubení odečítají pomocí spektrofotometru při 540 nm, aby bylo možno zjistit počet životoschopných buněk. Tímto způsobem je možno stanovit inhibici

růstu viru v procentech pro různé koncentrace zkoumané látky a vypočítat hodnotu IC_{50} , to znamená takovou koncentraci zkoumané látky, která vyvolá 50% inhibici replikace viru.

Tento postup byl použit k vyhodnocení acykloviru a peptidového derivátu jednotlivě a pak v různých kombinacích. Byla proto prokázána účinnost obou uvedených látek proti jednotlivých izolátům. Mimoto bylo možno vyhodnotit synergní účinek obou sloučenin a potvrdit jej použitím metody isobol pro hodnocení výsledků, získaných při těchto zkouškách, postup je popsán v publikaci J. Sühnel, J. Antiviral Research, 13, 23, 1990.

Pokud jde o postup s použitím isobol, vyžaduje tato metoda experimentální údaje od dvou zkoumaných látek jednotlivě a v různých kombinacích dávek s přibližně stejnou úrovní účinnosti. Zvolené koncentrace peptidového derivátu (IC_5 , IC_{10} , IC_{20} a IC_{30}) byla proto smíseny s různými dávkami acycloviru a byla zjištěna hodnota IC_{50} . Uvedené hodnoty pro peptidový derivát i stejné hodnoty pro acyclovir byly odvozeny z křivek, získaných v předběžných pokusech. Isobologram je možno vytvořit při použití hodnoty, označené FIC_{60} (acyclovir), jde o poměr koncentrace acycloviru, jehož je zapotřebí k inhibici replikace HSV o 60 % v přítomnosti určité koncentrace peptidového derivátu, ke koncentraci, již je zapotřebí v nepřítomnosti peptidového derivátu. Tato hodnota se vynese proti hodnotě, která je poměrem pevné koncentrace peptidového derivátu k té koncentraci peptidového derivátu, která vyvolá 60% inhibici replikace HSV v nepřítomnosti acycloviru. K výpočtu je možno použít následujících rovnic:

Osa X:

pevná koncentrace peptidového derivátu

$$= \frac{\text{IC}_{60} \text{ pro peptidový derivát}}{\text{IC}_{60} \text{ (acyclovir + X-mikromol peptidového derivátu)}}$$

Osa Y:

$$\text{FIC}_{60} \text{ (acyclovir)} = \frac{\text{IC}_{60} \text{ (acyclovir + X-mikromol peptidového derivátu)}}{\text{IC}_{60} \text{ pro samotný acyclovir}}$$

Výsledky:

V následující tabulce I jsou uvedeny výsledky, získané v případě, že acyclovir a peptidový derivát byly zkoumány jednotlivě při použití klinického izolátu HSV-1 divokého typu a dvou svrchu uvedených klinických izolátů HSV-1, odolných proti acycloviru.

T a b u l k a I

sloučenina	izolát 294 IC ₅₀ /μM	izolát 615,8 IC ₅₀ /μM	izolát 615.9 IC ₅₀ /μM
acyclovir	1,1	19	55
peptidový derivát	2,0	2,0	6,2

Výsledky z tabulky I prokazují, že sloučeniny vzorce 1 jsou účinné proti divokému typu HSV-1, přičemž podobnou účinnost mají také proti HSV-1, odolnému proti acycloviru,

například proti POL-mutantům a TK-deficientním mutantům, kde acyclovir ztrácí velkou část své účinnosti a je proti těmto mutovaným kmenům 20x až 40x méně účinným.

V následujících tabulkách II, III a IV jsou uvedeny výsledky, které byly získány při použití kombinací acycloviru a peptidového derivátu proti klinickému izolátu divokého typu HSV-1 a proti dvěma svrchu uvedeným klinickým izolátům HSV-1, odolným proti acycloviru.

T a b u l k a II

Protivirová účinnost - zkoušky na synergní účinek

Klinický izolát 294

pevná koncentrace peptidového derivátu (μM)	acyclovir IC_{50}^1 v kombi- naci s peptidovým derivátem (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

T a b u l k a III

Protivirová účinnost - zkoušky na synergní účinek.

Izolát 615.8 (ACV^rPOL)

pevná koncentrace peptidového derivátu (μM) acyclovir IC₅₀² v kombinaci s peptidovým derivátem (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

T a b u l k a IV

Protivirová účinnost - zkoušky na synergní účinek

Izolát 615.9 (ACV^rTK)

pevná koncentrace peptidového derivátu (μM) acyclovir IC₅₀² v kombinaci s peptidovým derivátem (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

Poznámky:

- Hodnoty IC_{50} nejsou opraveny na rozpustnost.
 - Všechny zásobní roztoky byly odstředěny v ultraodstředivce při 100 000 g po dobu 30 minut při teplotě 4 °C před použitím.
 - Rozpustnost peptidového derivátu při koncentraci 20 mikromol je 85 %.
 - Cytotoxicita peptidového derivátu je 89 mikromol (hodnota je uvedena bez opravy).
- 1) Hodnoty IC_{50} , získaná z křivky závislosti odpovědi na koncentraci pro acyclovir v rozmezí $7,6 \times 10^{-4}$ až $1,5 \times 10^1$ mikromol v přítomnosti pevné koncentrace peptidového derivátu v levém sloupci.
 - 2) Hodnoty IC_{50} , získané z křivky závislosti odpovědi na dávce pro acyclovir v rozmezí $1,5 \times 10^{-4}$ až $1,5 \times 10^2$ mikromol v přítomnosti pevné koncentrace peptidového derivátu v levém sloupci.

Výsledky, které jsou uvedeny v tabulkách II, III a IV prokazují, že peptidy vzorce 1 mohou způsobit potenciaci účinnosti acycloviru proti divokému typu viru HSV-1 a proti mutantům viru HSV-1, odolným proti acycloviru v případě, že jsou obě uvedené látky použity ve vzájemné kombinaci. Výsledky prokazují, že dochází k proporcionalnímu snížení hodnoty IC_{50} pro acyclovir v případě, že se zvyšuje poměr koncentrace peptidového derivátu podle vynálezu k acycloviru.

Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1 jsou graficky znázorněny pozitivní výsledky, prokazující synergický účinek použitých látek a získané aplikací postupu s použitím isobol při zkouškách s acyclovirem a peptidovým derivátem proti klinickému subizolátu 615.8 (ACV^rPOL).

Na obr. 2 jsou graficky znázorněny pozitivní výsledky, které prokazují synergický účinek při zkouškách, při nichž byl použit acyclovir v kombinaci s peptidovým derivátem proti klinickému subizolátu 615.9 (ACV^rTK).

Zastupuje:

PRÍL.	URČ. D. PRŮM. S. ÚVĚHO VLASTN. CTV	12. III. 96	018139	č.j.
-------	--	-------------	--------	------

P A T E N T O V Ě N Á R O K Y

1. Peptidové deriváty obecného vzorce 1



kde

A znamená fenylacetyl, fenylpropionyl, (4-aminofenyl)propionyl, (4-fluorfenyl)propionyl, (4-hydroxyfenyl)propionyl, (4-methoxyfenyl)propionyl, 2-(fenylmethyl)-3-fenylpropionyl, 2-/(4-fluorfenyl)methyl/-3-(4-fluorfenyl)propionyl, 2-/(4-methoxyfenyl)methyl/-3-(4-methoxyfenyl)propionyl nebo benzylaminokarbonyl,

B znamená (N-Me)-Val nebo (N-Me)-Ile nebo spolu tvoří

A a B nasycenou alkylaminokarbonylovou skupinu, a to butylaminokarbonyl, 1-methylethylaminokarbonyl, 1-methylpropylaminokarbonyl, 1-ethylpropylaminokarbonyl, 1,1-dimethylbutylaminokarbonyl, 1-ethylbutylaminokarbonyl, 1-propylbutylaminokarbonyl, 1-ethylpentylaminokarbonyl, 1-butylpentylaminokarbonyl, 1-ethylbutylaminokarbonyl, 2-ethylpentylaminokarbonyl, 1-methyl-1-propylbutylaminokarbonyl, 1-ethyl-1-propylbutylaminokarbonyl, 1,1-di-propylbutylaminokarbonyl, (1-propylcyklopentyl)aminokarbonyl nebo (1-propylcyklohexyl)aminokarbonyl,

D znamená Val, Ile nebo Tbg,

R^1 znamená 1-methylethyl, 1,1-dimethylethyl, 1-methylpropyl, 1,1-dimethylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, cyklobutyl, cyklopentyl, cyklohexyl, 1-methylcyklopentyl, skupinu NR^4R^5 , kde R^4 znamená atom vodíku nebo nižší alkyl a R^5 znamená nižší alkyl nebo tvoří R^4 a R^5 společně s atomem dusíku, na nějž jsou vázány pyrrolidinový, piperidinový, morfolinový nebo 4-methylpiperazinový kruh,

R^2 znamená atom vodíku a

R^3 znamená methyl, ethyl, 1-methylethyl, 1,1-dimethylethyl, propyl, 2-propenyl nebo benzyl, přičemž atom uhlíku, na nějž jsou vázány skupiny R^2 a R^3 má konfiguraci R, nebo

R^2 a R^3 nezávisle znamenají methyl nebo ethyl nebo tvoří společně s atomem uhlíku, na nějž jsou vázány cyklobutyl, cyklopentyl nebo cyklohexyl a

E znamená skupinu NHR^6 , kde R^6 znamená 2-methylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, 1(R),2,2-trimethylpropyl, 1,1,2,2-tetramethylpropyl, 1(R)-ethyl-2,2-dimethylpropyl, 2-(R,S)-methylbutyl, 2,2-dimethylbutyl, 3,3-dimethylbutyl, 1(R),2,2-trimethylbutyl, 1(R),3,3-trimethylbutyl, 2-ethylbutyl, 2,2-diethylbutyl, 2-ethyl-1(R)-methylbutyl, 2-ethyl-2-methylbutyl, 1(R)-ethyl-3,3-dimethylbutyl, 2,2-dimethylpentyl, cis- nebo trans-2-methylcyklohexyl, 2,2-dimethylcyklohexyl nebo cyklohexylmethyl nebo znamená E skupinu $NHCH(R^7)-Z$, kde atom uhlíku, na nějž je vázána skupina R^7 má konfiguraci S, R^7 znamená 1,1-dimethylethyl, 1-methylpropyl, 2-methylpropyl, 2,2-dimethylpropyl nebo cyklohexylmethyl a Z znamená skupinu CH_2OH , $C(O)OH$, $C(O)NH_2$ nebo $C(O)OR^8$, kde R^8 znamená methyl, ethyl nebo propyl,

jakož i farmaceuticky přijatelné soli těchto sloučenin, pro použití k léčení infekcí herpes simplex, odolných proti acycloviru.

2. Peptidové deriváty obecného vzorce I podle nároku 1, v nichž

- A znamená fenylpropionyl, 2-(fenylmethyl)-3-fenylpropionyl nebo benzylaminokarbonyl,
- B znamená (N-Me)Val,
- D znamená Tbg,
- R¹ znamená 1-methylethyl, 1,1-dimethylethyl, 1-methylpropyl, 1,1-dimethylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, cyklobutyl, cyklopentyl, cyklohexyl, nebo 1-methylcyklopentyl,
- R² znamená atom vodíku a
- R³ znamená methyl, ethyl, 1-methylethyl, propyl nebo benzyl, přičemž atom uhlíku, na nějž jsou vázány skupiny R² a R³ má konfiguraci R, nebo
- R² a R³ nezávisle znamenají methyl nebo ethyl nebo tvoří společně s atomem uhlíku, na nějž jsou vázány cyklobutyl, cyklopentyl nebo cyklohexyl a
- E znamená skupinu NHR⁶, kde R⁶ znamená 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 znamená E skupinu NHCH(R⁷)-Z, kde uhlíkový atom, na nějž je vázána skupina R⁷ má konfiguraci S, R⁷ znamená 2,2-dimethylpropyl a Z znamená CH₂OH, C(O)OH, C(O)NH₂ nebo skupinu C(C)OR³, kde R³ znamená methyl, ethyl nebo propyl,

jakož i farmaceuticky přijatelné soli těchto sloučenin,

pro použití k léčení infekcí herpes simplex, odolným proti acycloviru.

3. Peptidové deriváty podle nároku 1, obecného vzorce 1, v němž

A a B společně tvoří nasycený alkylaminokarbonyl ze skupiny 1-ethylpropylaminokarbonyl, 1-ethylbutylaminokarbonyl, 1-propylbutylaminokarbonyl, 2-ethylpentylaminokarbonyl, 1-methyl-1-propylbutylaminokarbonyl, 1-ethyl-1-propylbutylaminokarbonyl, 1,1-dipropylbutylaminokarbonyl a (1-propylcyklopentyl)aminokarbonyl,

D znamená Tbg,

R^1 znamená 1-methylethyl, 1,1-dimethylethyl, 1-methylpropyl, 1,1-dimethylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, cyklobutyl, cyklopentyl, cyklohexyl, nebo 1-methylcyklopentyl,

R^2 znamená atom vodíku a

R^3 znamená methyl, ethyl, 1-methylethyl, propyl nebo benzyl, přičemž atom uhlíku, na nějž jsou vázány skupiny R^2 a R^3 má konfiguraci R, nebo

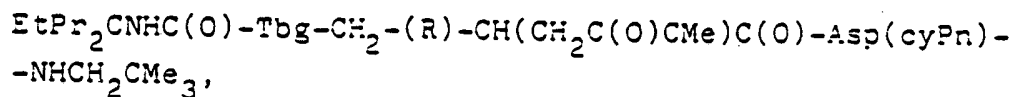
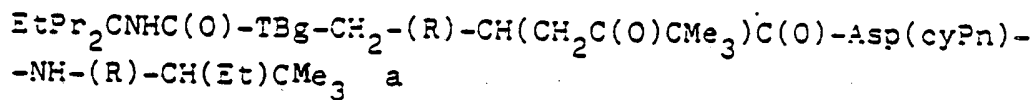
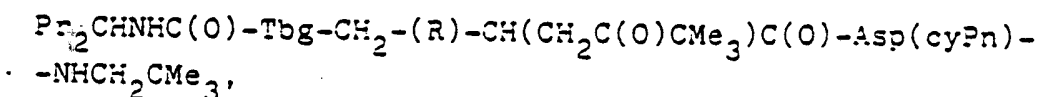
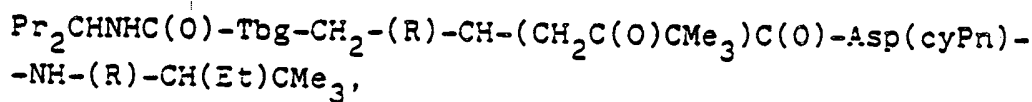
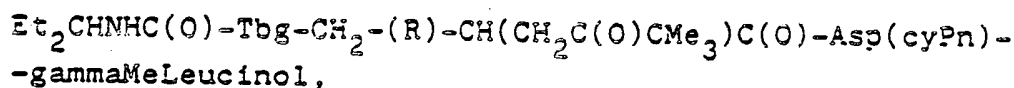
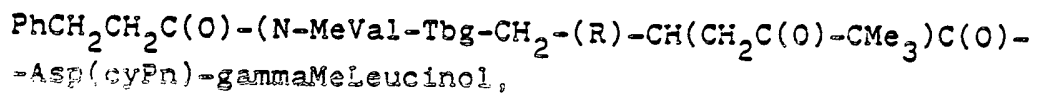
R^2 a R^3 nezávisle znamenají methyl nebo ethyl nebo tvoří společně s atomem uhlíku, na nějž jsou vázány cyklobutyl, cyklopentyl nebo cyklohexyl a

E znamená skupinu NHR^6 , kde R^6 znamená 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 znamená E skupinu $NHCH(R^7)-Z$, kde uhlíkový atom, na nějž je vázána skupina R^7 má konfiguraci S, R^7 znamená 2,2-dimethylpropyl a Z znamená CH_2OH , $C(O)OH$, $C(O)NH_2$ nebo skupinu $C(O)OR^8$, kde R^8 znamená methyl, ethyl nebo propyl,

jakož i farmaceuticky přijatelné soli těchto sloučenin,

pro použití k léčení infekcí herpes simplex, odolným proti acycloviru.

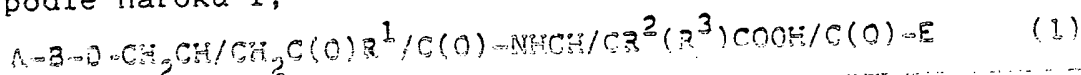
4. Peptidové deriváty obecného vzorce 1 podle nároku 1 ze skupiny:



jakož i farmaceuticky přijatelné soli těchto sloučenin,
pro použití k léčení infekcí herpes simplex, odolným proti
acycloviru.

5. Použití peptidových derivátů obecného vzorce I

podle nároku 1,



kde

A znamená fenylacetyl, fenylpropionyl, (4-aminofenyl)propionyl, (4-fluorfenyl)propionyl, (4-hydroxyfenyl)propionyl, (4-methoxyfenyl)propionyl, 2-(fenylmethyl)-3-fenylpropionyl, 2-/(4-fluorfenyl)methyl/-3-(4-fluorfenyl)propionyl, 2-/(4-methoxyfenyl)methyl/-3-(4-methoxyfenyl)propionyl nebo benzylaminokarbonyl,

B znamená (N-Me)-Val nebo (N-Me)-Ile nebo spolu tvoří

A a B nasycenou alkylaminokarbonylovou skupinu, a to butylaminokarbonyl, 1-methylethylaminokarbonyl, 1-methylpropylaminokarbonyl, 1-ethylpropylaminokarbonyl, 1,1-dimethylbutylaminokarbonyl, 1-ethylbutylaminokarbonyl, 1-propylbutylaminokarbonyl, 1-ethylpentylaminokarbonyl, 1-butylpentylaminokarbonyl, 1-ethylbutylaminokarbonyl, 2-ethylpentylaminokarbonyl, 1-methyl-1-propylbutylaminokarbonyl, 1-ethyl-1-propylbutylaminokarbonyl, 1,1-dipropylbutylaminokarbonyl, (1-propylcyklopentyl)aminokarbonyl nebo (1-propylcyklohexyl)aminokarbonyl,

D znamená Val, Ile nebo Tbg,

R^1 znamená 1-methylethyl, 1,1-dimethylethyl, 1-methylpropyl, 1,1-dimethylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, cyklobutyl, cyklopentyl, cyklohexyl, 1-methylcyklopentyl, skupinu NR^4R^5 , kde R^4 znamená atom vodíku nebo nižší alkyl a R^5 znamená nižší alkyl nebo tvoří R^4 a R^5 společně s atomem dusíku, na nějž jsou vázány pyrrolidinový, piperidinový, morfolinový nebo 4-methylpiperazinový kruh,

- R^2 znamená atom vodíku a
- R^3 znamená methyl, ethyl, 1-methylethyl, 1,1-dimethylethyl, propyl, 2-propenyl nebo benzyl, přičemž atom uhlíku, na nějž jsou vázány skupiny R^2 a R^3 má konfiguraci R, nebo
- R^2 a R^3 nezávisle znamenají methyl nebo ethyl nebo tvoří společně s atomem uhlíku, na nějž jsou vázány cyklobutyl, cyklopentyl nebo cyklohexyl a
- E znamená skupinu NHR^6 , kde R^6 znamená 2-methylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, 1(R),2,2-trimethylpropyl, 1,1,2,2-tetramethylpropyl, 1(R)-ethyl-2,2-dimethylpropyl, 2-(R,S)-methylbutyl, 2,2-dimethylbutyl, 3,3-dimethylbutyl, 1(R),2,2-trimethylbutyl, 1(R),3,3-trimethylbutyl, 2-ethylbutyl, 2,2-diethylbutyl, 2-ethyl-1(R)-methylbutyl, 2-ethyl-2-methylbutyl, 1(R)-ethyl-3,3-dimethylbutyl, 2,2-dimethylpentyl, cis- nebo trans-2-methylcyklohexyl, 2,2-dimethylcyklohexyl nebo cyklohexylmethyl nebo znamená E skupinu $NHCH(R^7)-Z$, kde atom uhlíku, na nějž je vázána skupina R^7 má konfiguraci S, R^7 znamená 1,1-dimethylethyl, 1-methylpropyl, 2-methylpropyl, 2,2-dimethylpropyl nebo cyklohexylmethyl a Z znamená skupinu CH_2OH , $C(O)OH$, $C(O)NH_2$ nebo $C(O)OR^3$, kde R^3 znamená methyl, ethyl nebo propyl,

nebo farmaceuticky přijatelných solí těchto sloučenin pro výrobu farmaceutických prostředků, určených k léčení infekcí virem herpes-simplex, odolným proti acycloviru u savců.

6. Použití peptidových derivátů obecného vzorce I v nichž

A znamená fenylpropionyl, 2-(fenylmethyl)-3-fenylpropionyl nebo benzylaminokarbonyl,

B znamená (N-Me)Val,

D znamená Tbg,

R^1 znamená 1-methylethyl, 1,1-dimethylethyl, 1-methylpropyl, 1,1-dimethylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, cyklobutyl, cyklopentyl, cyklohexyl, nebo 1-methylcyklopentyl,

R^2 znamená atom vodíku a

R^3 znamená methyl, ethyl, i-methylethyl, propyl nebo benzyl, přičemž atom uhlíku, na nějž jsou vázány skupiny R^2 a R^3 má konfiguraci R, nebo

R^2 a R^3 nezávisle znamenají methyl nebo ethyl nebo tvoří společně s atomem uhlíku, na nějž jsou vázány cyklobutyl, cyklopentyl nebo cyklohexyl a

E znamená skupinu NHR^6 , kde R^6 znamená 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 znamená E skupinu $NHCH(R^7)-Z$, kde uhlíkový atom, na nějž je vázána skupina R^7 má konfiguraci S, R^7 znamená 2,2-dimethylpropyl a Z znamená CH_2OH , $C(O)OH$, $C(O)NH_2$ nebo skupinu $C(O)OR^8$, kde R^8 znamená methyl, ethyl nebo propyl,

nebo farmaceuticky přijatelných solí těchto sloučenin pro výrobu farmaceutických prostředků, určených k léčení infekcí virem herpes simplex, odolným proti acycloviru u savců.

7. Použití peptidových derivátů obecného vzorce 1, v nichž

- A a B společně tvoří nasycený alkylaminokarbonyl ze skupiny 1-ethylpropylaminokarbonyl, 1-ethylbutylaminokarbonyl, 1-propylbutylaminokarbonyl, 2-ethylpentylaminokarbonyl, 1-methyl-1-propylbutylaminokarbonyl, 1-ethyl-1-propylbutylaminokarbonyl, 1,1-dipropylbutylaminokarbonyl a (1-propylcyklopentyl)aminokarbonyl,
- D znamená Tbg,
- R^1 znamená 1-methylethyl, 1,1-dimethylethyl, 1-methylpropyl, 1,1-dimethylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, cyklobutyl, cyklopentyl, cyklohexyl, nebo 1-methylcyklopentyl,
- R^2 znamená atom vodíku a
- R^3 znamená methyl, ethyl, 1-methylethyl, propyl nebo benzyl, přičemž atom uhlíku, na nějž jsou vázány skupiny R^2 a R^3 má konfiguraci R, nebo
- R^2 a R^3 nezávisle znamenají methyl nebo ethyl nebo tvoří společně s atomem uhlíku, na nějž jsou vázány cyklobutyl, cyklopentyl nebo cyklohexyl a
- E znamená skupinu NHR^6 , kde R^6 znamená 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 znamená E skupinu $NHCH(R^7)-Z$, kde uhlíkový atom, na nějž je vázána skupina R^7 má konfiguraci S, R^7 znamená 2,2-dimethylpropyl a Z znamená CH_2OH , $C(O)OH$, $C(O)NH_2$ nebo skupinu $C(O)OR^8$, kde R^8 znamená methyl, ethyl nebo propyl,

nebo farmaceuticky přijatelných solí těchto sloučenin pro výrobu farmaceutických prostředků, určených k léčení infekcí virem herpes simplex, odolným proti acycloviru u savců.

8. Použití podle nároků 5 až 7, při němž se peptidový derivát volí ze skupiny

$\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-(\text{N-MeVal-Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-$
 $-\text{Asp}(\text{cyPn})-\text{gammaMeLeucinol},$

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

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

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

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

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

9. Použití peptidového derivátu podle nároku 1 nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli a nukleosidového analogu s protiviropým účinkem nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli v kombinaci pro výrobu farmaceutického prostředku, určeného pro léčení infekce virem herpes simplex, odolným proti acycloviru u ssavců.

10. Použití kombinace podle nároku 9, při němž je složkou kombinace peptidový derivát obecného vzorce 1, v němž

- A znamená fenylpropionyl, 2-(fenylmethyl)-3-fenylpropionyl nebo benzylaminokarbonyl,
- B znamená (N-Me)Val,
- D znamená Tbg.

R^1 znamená 1-methylethyl, 1,1-dimethylethyl, 1-methylpropyl, 1,1-dimethylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, cyklobutyl, cyklopentyl, cyklohexyl, nebo 1-methylcyklopentyl,

R^2 znamená atom vodíku a

R^3 znamená methyl, ethyl, 1-methylethyl, propyl nebo benzyl, přičemž atom uhlíku, na nějž jsou vázány skupiny R^2 a R^3 má konfiguraci R, nebo

R^2 a R^3 nezávisle znamenají methyl nebo ethyl nebo tvoří společně s atomem uhlíku, na nějž jsou vázány cyklobutyl, cyklopentyl nebo cyklohexyl a

E znamená skupinu NHR^6 , kde R^6 znamená 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 znamená E skupinu $NHCH(R^7)-Z$, kde uhlíkový atom, na nějž je vázána skupina R^7 má konfiguraci S, R^7 znamená 2,2-dimethylpropyl a Z znamená CH_2OH , $C(O)OH$, $C(O)NH_2$ nebo skupinu $C(O)OR^8$, kde R^8 znamená methyl, ethyl nebo propyl,

nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

11. Použití kombinace podle nároku 9, při němž je složkou kombinace peptidový derivát obecného vzorce I, v němž

A a B společně tvoří nasycený alkylaminokarbonyl ze skupiny 1-ethylpropylaminokarbonyl, 1-ethylbutylaminokarbonyl, 1-propylbutylaminokarbonyl, 2-ethylpentylaminokarbonyl, 1-methyl-1-propylbutylaminokarbonyl, 1-ethyl-1-propylbutylaminokarbonyl, 1,1-dipropylbutylaminokarbonyl a (1-propylcyklopentyl)aminokarbonyl,

D znamená Tbg,

R^1 znamená 1-methylethyl, 1,1-dimethylethyl, 1-methylpropyl, 1,1-dimethylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, cyklobutyl, cyklopentyl, cyklohexyl, nebo 1-methylcyklopentyl,

R^2 znamená atom vodíku R,

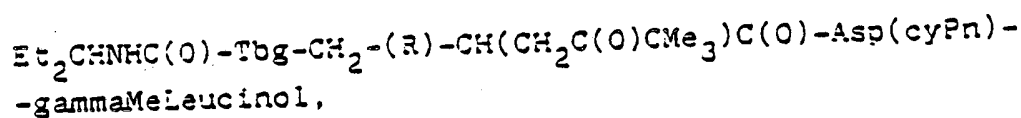
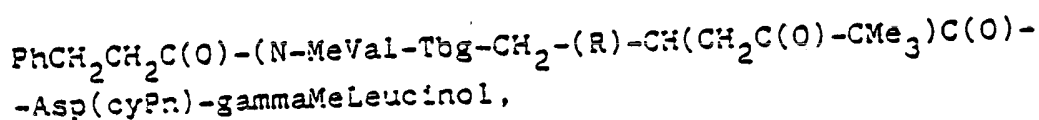
R^3 znamená methyl, ethyl, 1-methylethyl, propyl nebo benzyl, přičemž atom uhlíku, na nějž jsou vázány skupiny R^2 a R^3 má konfiguraci R, nebo

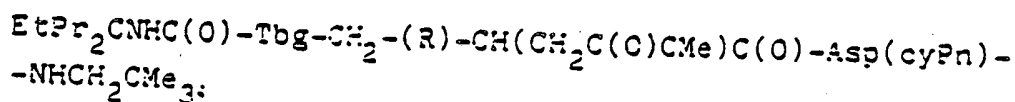
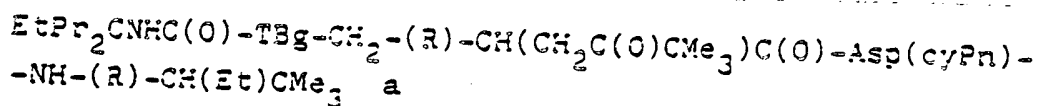
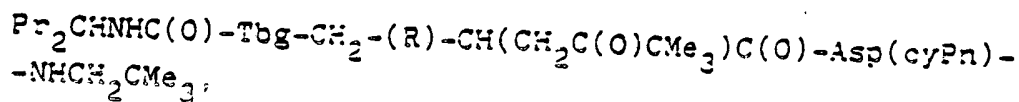
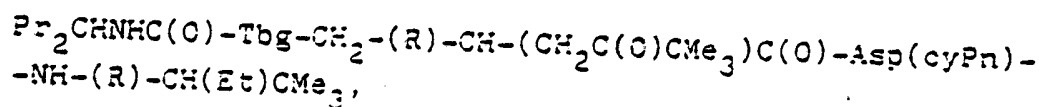
R^2 a R^3 nezávisle znamenají methyl nebo ethyl nebo tvoří společně s atomem uhlíku, na nějž jsou vázány cyklobutyl, cyklopentyl nebo cyklohexyl a

E znamená skupinu NHR^6 , kde R^6 znamená 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 znamená E skupinu $NHCH(R^7)-Z$, kde uhlíkový atom, na nějž je vázána skupina R^7 má konfiguraci S, R^7 znamená 2,2-dimethylpropyl a Z znamená CH_2OH , $C(O)CH$, $C(O)NH_2$ nebo skupinu $C(O)OR^3$, kde R^3 znamená methyl, ethyl nebo propyl,

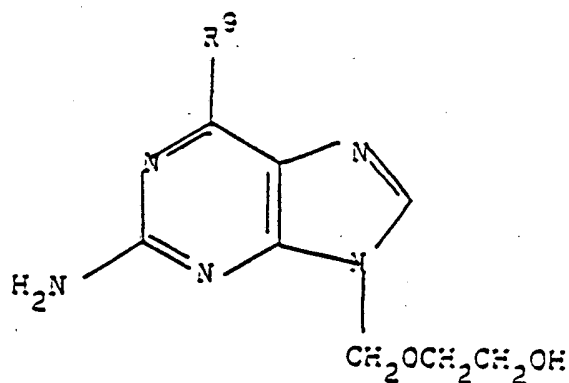
nebo jeho sůl, přijatelná z farmaceutického hlediska.

12. Použití kombinace podle nároku 9, při němž je složkou kombinace peptidový derivát obecného vzorce I ze skupiny





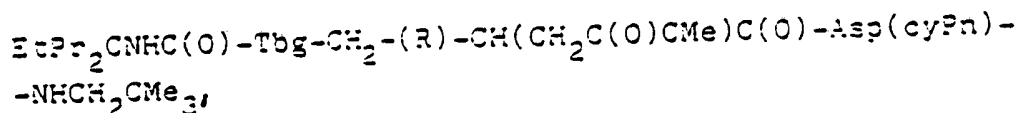
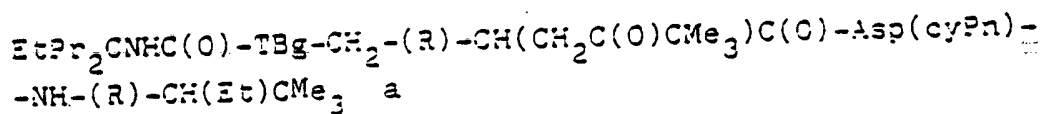
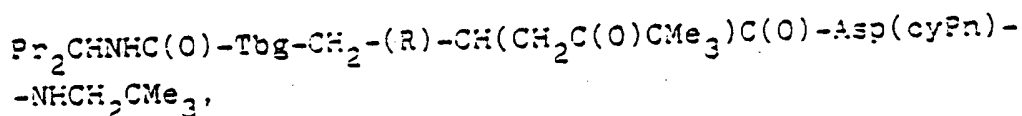
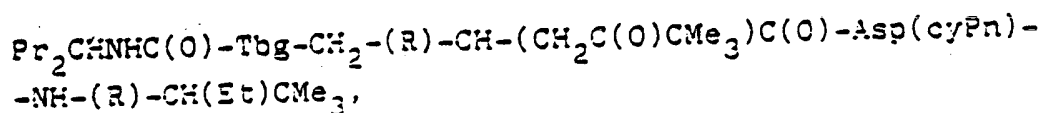
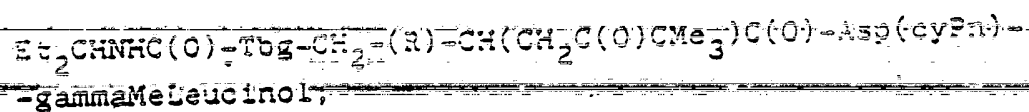
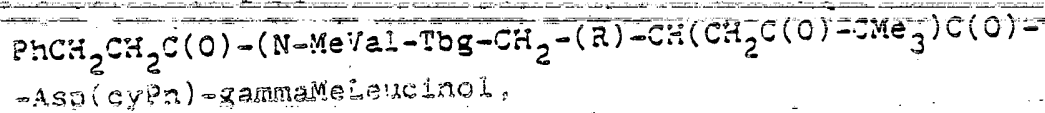
13. Použití kombinace podle nároku 9, při němž je složkou kombinace nukleosidový analog obecného vzorce 2



kde R^9 je atom vodíku, hydroxyskupina nebo aminoskupina, nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

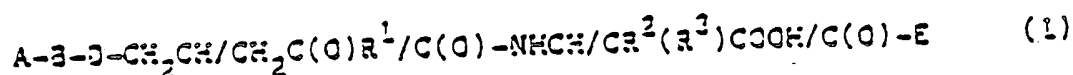
14. Použití kombinace podle nároku 9, při němž je složkou kombinace nukleosidový analog ze skupiny vidarabin, idoxuridin, trifluoridin, ganciclovir, edoxudin, broavir, fiacitabin, penciclovir, famciclovir a rociclovir.

15. Použití kombinace podle nároku 9, při němž je složkou kombinace peptidový derivát ze skupiny



a nukleosidovým analogem je acyclovir.

16. Farmaceutický prostředek pro léčení infekcí virem herpes simplex, odolným proti acycloviru, v y z n a č u -
j í c í s e t ě m , že jako svou účinnou složku obsahuje
peptidový derivát obecného vzorce 1



kde

A znamená fenylacetyl, fenylpropionyl, (4-aminofenyl)-propionyl, (4-fluorfenyl)propionyl, (4-hydroxyfenyl)-propionyl, (4-methoxyfenyl)propionyl, 2-(fenylmethyl)-3-fenylpropionyl, 2-/(4-fluorfenyl)methyl/-3-(4-fluorfenyl)propionyl, 2-/(4-methoxyfenyl)methyl/-3-(4-methoxyfenyl)propionyl nebo benzylaminokarbonyl,

B znamená (N-Me)-Val nebo (N-Me)-Ile nebo spolu tvoří

A a B nasycenou alkylaminokarbonylovou skupinu, a to butylaminokarbonyl, 1-methylethylaminokarbonyl, 1-methylpropylaminokarbonyl, 1-ethylpropylaminokarbonyl, 1,1-dimethylbutylaminokarbonyl, 1-ethylbutylaminokarbonyl, 1-propylbutylaminokarbonyl, 1-ethylpentylaminokarbonyl, 1-butylpentylaminokarbonyl, 1-ethylbutylaminokarbonyl, 2-ethylpentylaminokarbonyl, 1-methyl-1-propylbutylaminokarbonyl, 1-ethyl-1-propylbutylaminokarbonyl, 1,1-dipropylbutylaminokarbonyl, (1-propylcyklopentyl)aminokarbonyl nebo (1-propylcyklohexyl)aminokarbonyl,

D znamená Val, Ile nebo Tbg,

R^1 znamená 1-methylethyl, 1,1-dimethylethyl, 1-methylpropyl, 1,1-dimethylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, cyklobutyl, cyklopentyl, cyklohexyl, 1-methylcyklopentyl, skupinu NR^4R^5 , kde R^4 znamená atom vodíku nebo nižší alkyl a R^5 znamená nižší alkyl nebo tvoří R^4 a R^5 společně s atomem dusíku, na nějž jsou vázány pyrrolidinový, piperidinový, morfolinový nebo 4-methylpiperazinový kruh,

R^2 znamená atom vodíku a

R^3 znamená methyl, ethyl, 1-methylethyl, 1,1-dimethylethyl, propyl, 2-propenyl nebo benzyl, přičemž atom uhlíku na nějž jsou vázány skupiny R^2 a R^3 má konfiguraci R, nebo

R^2 a R^3 nezávisle znamenají methyl nebo ethyl nebo tvoří společně s atomem uhlíku, na nějž jsou vázány cyklobutyl, cyklopentyl nebo cyklohexyl a

E znamená skupinu NHR^6 , kde R^6 znamená 2-methylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, 1(R),2,2-trimethylpropyl, 1,1,1,2,2-tetramethylpropyl, 1(R)-ethyl-2,2-dimethylpropyl, 1(R,3)-methylbutyl, 2,2-dimethylbutyl, 3,3-dimethylbutyl, 1(R),2,2-trimethylbutyl, 1(R),3,3-trimethylbutyl, 2-ethylbutyl, 2,2-diethylbutyl, 2-ethyl-1(R)-methylbutyl, 2-ethyl-2-methylbutyl, 1(R)-ethyl-3,3-dimethylbutyl, 2,2-dimethylpentyl, cis- nebo trans-2-methylcyklohexyl, 2,2-dimethylcyklohexyl nebo cyklohexylmethyl nebo znamená E skupinu $NHCH(R^7)-Z$, kde atom uhlíku, na nějž je vázána skupina R^7 má konfiguraci S, R^7 znamená 1,1-dimethylethyl, 1-methylpropyl, 2-methylpropyl, 2,2-dimethylpropyl nebo cyklohexylmethyl a Z znamená skupinu CH_2OH , $C(O)OH$, $C(O)NH_2$ nebo $C(O)OR^8$, kde R^8 znamená methyl, ethyl nebo propyl,

nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl, spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem.

17. Farmaceutický prostředek podle nároku 16, v y - z n a č u j í c í s e t í m , že jako svou účinnou složku obsahuje kombinaci peptidového derivátu obecného vzorce I podle nároku 23 nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli a nukleosidového analogu s protivirovým účinkem nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli.

18. Farmaceutický prostředek podle nároku 16, v y - z n a č u j í c í s e t í m , že jako svou účinnou složku obsahuje kombinaci peptidového derivátu obecného vzorce I ze skupiny

$\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{C(O)-(N-MeVal-Tbg-CH}_2\text{-(R)-CH(CH}_2\text{C(O)-CMe}_3\text{)C(O)-}$
 $\text{-Asp(cyPn)-gammaMeLeucinol,}$

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

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

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

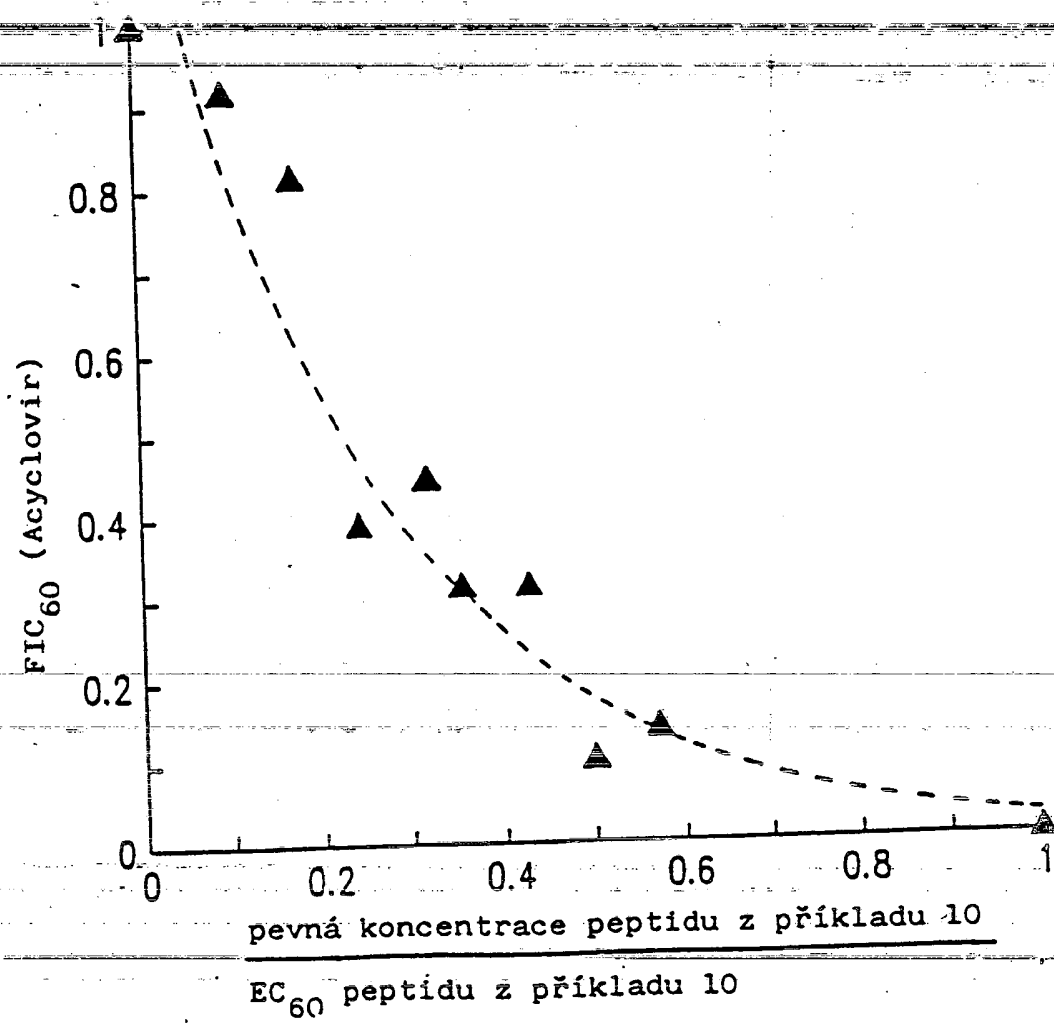
$\text{EtPr}_2\text{CNHC(O)-Tbg-CH}_2\text{-(R)-CH(CH}_2\text{C(O)CMe}_3\text{)C(O)-Asp(cyPn)-}$
 $\text{-NH-(R)-CH(Et)CMe}_3 \text{ a}$

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

a acycloviru jako nukleosidového analogu.

Zastupuje:

1/2



Obr.1