

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

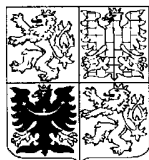
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1574-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **04. 11. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **08.11.96, 08.11.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/747103, 96/029746**

(33) Země priority: **US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 11. 99**
(Věstník č. 11/99)

(86) PCT číslo: **PCT/US97/20036**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/20009**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 D 403/06
A 61 K 31/55

(71) Přihlášovatel:

DUPONT PHARMACEUTICALS COMPANY,
Wilmington, DE, US;

(72) Původce:

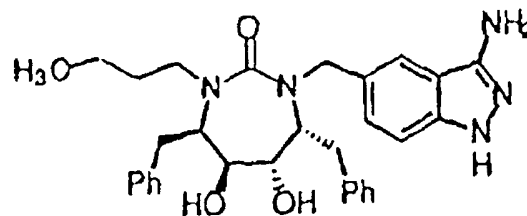
Rodgers James David, Landenberg, PA, US;
Lam Patrick Yuk-Sun, Chadds Ford, PA, US;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1,
11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

(4S, 5S, 6S, 7R)-Hexahydro-1-[5-(3-aminoindazol)methyl]-3-butyl-5,6-dihydroxy-4,7-bis [fenylmethyl]-2H-1,3-diazepin-2-on, způsob jeho přípravy a jeho použití jako inhibitor HIV proteázy



(57) Anotace:

Nové sloučeniny vzorce /I/ nebo formy jejich farmaceuticky přijatelných solí nebo jejich proléčiva, které jsou vhodné jako inhibitory HIV proteázy, a farmaceutické prostředky a diagnostické kity je obsahující, způsoby jejich použití pro léčení virových infekcí nebo jako testovací standard nebo reakční činidlo.

CZ 1574-99 A3

01-735-99-Če

PV 1574-99

(4S, 5S, 6S, 7R)-Hexahydro-1-[5-(3-aminoindazol)methyl]-3-butyl-5,6-dihydroxy-4,7-bis[fenylmethyl]-2H-1,3-diazepin-2-on, způsob jeho přípravy a jeho použití jako inhibitoru HIV proteázy

Oblast techniky:

Tento vynález se týká obecně 1-(3-aminoindazol-5-yl)-3-butyl-cyklické močoviny, která je vhodná jako inhibitor HIV proteázy, farmaceutických prostředků a diagnostických kitů, které ji obsahují, a způsobů jejich použití pro léčení virové infekce nebo jako testovací standardy nebo reakční činidla.

Dosavadní stav techniky:

Dva rozlišné retroviry, lidský vir nedostatečnosti (HIV) typu 1 (HIV-1) nebo typu 2 (HIV-2) byly etiologicky svázány s imunosupresivní nemocí, získaným syndromem imunitní nedostatečnosti (AIDS). HIV seropozitivní jednotlivci jsou původně asymptomatictí, ale typicky rozvíjejí k AIDS se vztahující komplex (ARC), po němž následuje AIDS. Ovlivnění jednotlivci vykazují řadu imunosupresí, které je předurčují k oslabení, a nakonec ke smrtelným příležitostným infekcím.

Nemoc AIDS je konečným důsledkem virů HIV-1 nebo HIV-2, které sledují svůj vlastní životní cyklus. Životní cyklus virionu začíná atakem virionu na hostitelskou lidskou imunitní buňku T-4 lymfocyt přes vazbu glykoproteinu na povrch virionového chránícího povlaku s CD4 glykoproteinem na buňku lymfocytu. Při připojení ztrácí virion svůj glykoproteinový povlak, proniká do membrány hostitelské buňky a neobaluje svou RNA. Enzym virionu, reverzní transkriptáza, řídí postup transkripce RNA do jednořetězové DNA. Virová DNA je štěpena a tvoří se druhý řetězec DNA. Nyní je dvojřetězová DNA integrovaná do lidských buněčných genů a tyto geny jsou

použity pro reprodukci buněk.

Z tohoto hlediska provádí lidská buňky svůj reprodukční proces použitím své vlastní RNA polymerázy pro transkripci integrované DNA do virové RNA. Virová RNA je translatována do prekurzoru gag-pol fúzního polyproteinu. Potom je polyprotein štěpen HIV proteázovým enzymem za získání zralých virových proteinů. HIV proteáza je takto odpovědná za regulaci kaskády kroků štěpení, které vedou ke zrání virových částic na vir, který je schopný úplné infekčnosti.

Na typickou reakci lidského imunitního systému, zabíjení invalidních virionů, jsou kladeny příliš velké požadavky, protože velkou část životního cyklu stráví virion v latentním stavu v imunitní buňce. Dále, virová zpětná transkriptáza, enzym použitý při přípravě nové částice virionu, není velmi specifická, a způsobuje chyby v transkripci, které vedou ke kontinuálně měněným glykoproteinům na povrchu virového chránícího obalu. Tento nedostatek specifičnosti snižuje účinnost imunitního systému, protože protilátky, specificky produkované proti jednomu glykoproteinu, mohou být neúčinné proti jiným, čímž se snižuje počet protilátek schopných zápasit s virem. Vir pokračuje v reprodukci, zatímco systém imunitní odpovědi pokračuje k oslabení. HIV ovládá z velké části tělesný imunitní systém, což umožňuje zachycení příležitostných infekcí, a bez podávání protivirových látek, imunomodulátorů, nebo obou, může dojít až k smrti.

V životním cyklu virů jsou alespoň tři kritické body, které byly identifikovány jako možné cíle pro protivirová léčiva: (1) počáteční připojení virionu na místo T-4 lymfocytu nebo makrofágu, (2) transkripci virové RNA na virovou DNA (reverzní transkriptáza, RT), a (3) komplexaci nové virové částice během reprodukce (například HIV proteáza kyseliny aspartové nebo HIV proteáza).

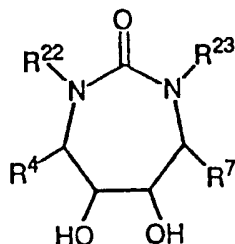
Genomy retrovirů kodují proteázu, která je odpovědná za

proteolytické zpracování jednoho nebo více polyproteinových prekurzorů, jako jsou *pol* a *gag* genové produkty. Viz Wellink, *Arch. Virol.* 98 1 (1988). Retrovirové proteázy nejčastěji zpracovávají *gag* prekurzor na proteiny, a také zpracovávají *pol* prekurzor na reverzní transkriptázu a retrovirovou proteázu.

Správné zpracování prekurzorů polyproteinů retrovirovou proteázou je nezbytné pro testování infekčních virionů. Bylo zjištěno, že *in vitro* mutagenese, která produkuje defektní virus proteázy, vede k produkci nezralých forem jádra, které postrádají infekčnost. Viz Crawford a kol., *J. Virol.* 53 899 (1985); Katoh a kol., *Virology* 145 280 (1985). Inhibice retrovirové infekce tudíž poskytuje atraktivní cíl pro protivirovou terapii. Viz Mitsuya, *Nature* 325 775 (1987).

Schopnost inhibovat virovou proteázu poskytuje způsob blokování virové replikace a tudíž léčení virových onemocnění, jako je AIDS, které mohou mít vedlejší horečnaté účinky, větší působení, a menší náchylnost k odolnosti vůči léčivům, při porovnání s běžnými léčbami. Výsledkem je, že jsou v současné době prodávány tři HIV inhibitory, Roche(ho) saquinavir, Abbott(ův) ritonavir, a Merck(ův) indinavir, a klinicky se testuje řada potenciálních inhibitorů proteázy, například VX-478 od Vertex, nelfinavir od Agouron, KNI-272 Japan Energy, a CGP 61755 od Ciba-Geigy.

Jak dokládají v současnosti prodávané inhibitory proteázy a prováděné klinické testy, byla studována široká řada sloučenin jako potenciálních inhibitorů HIV proteáz. Výrazné pozornosti se těší jedno jaderné, cyklické močoviny. Například v PCT patentových přihláškách W094/19329 a W093/07128, popisují Lam a kol. obecně cyklické močoviny vzorce:



a způsoby přípravy těchto močovin. Ačkoliv předložené sloučeniny spadají do rozsahu popisu Lam(a) a kol., nejsou v něm konkrétně popsány.

Další cyklické močoviny jsou popsány v Lam a kol., *J. Med. Chem* 1996, 39, 3514-3522. Ačkoliv je v této publikaci popsána řada cyklických močovin, nejsou zde popsány žádné sloučeniny obsahující indazolmethyl.

Při současném úspěchu inhibitorů proteázy bylo zjištěno, že se pacienti HIV mohou stát rezistentními vůči jednotlivému inhibitoru proteázy. Proto je vhodné rozvíjet další inhibitory proteáz k dalšímu boji proti HIV infekci.

Podstata vynálezu:

Jedním předmětem předloženého vynálezu je poskytnout nové inhibitory proteáz.

Dalším předmětem předloženého vynálezu je poskytnout farmaceutické prostředky s inhibiční aktivitou proteázy obsahující farmaceuticky přijatelný nosič a terapeuticky účinné množství alespoň jedné ze sloučenin podle předloženého vynálezu nebo farmaceuticky přijatelné soli nebo formy jeho proléčiva.

Dalším předmětem předloženého vynálezu je poskytnout nový

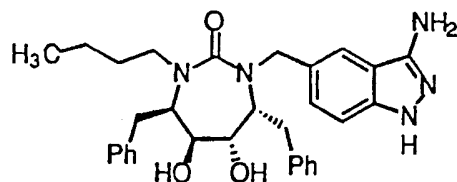
způsob léčení HIV infekce, který obsahuje podávání hostiteli, který potřebuje takové léčení, terapeuticky účinného množství alespoň jedné ze sloučenin podle předloženého vynálezu nebo farmaceuticky přijatelné soli nebo formy jeho proléčiva.

Dalším předmětem předloženého vynálezu je poskytnout nový způsob léčení HIV infekce, který zahrnuje podávání hostiteli, který to potřebuje, terapeuticky účinné kombinace (a) jedné ze sloučenin podle předloženého vynálezu a (b) jedné nebo více sloučenin vybraných ze skupiny sestávající z inhibitorů HIV reverzní transkriptázy a inhibitorů HIV proteázy.

Dalším předmětem podle předloženého vynálezu je poskytnout způsob inhibice HIV přítomného ve vzorku tělesné kapaliny, který zahrnuje léčení vzorku tělesné tekutiny účinným množstvím sloučeniny podle předloženého vynálezu.

Další předmět podle předloženého vynálezu poskytuje kit nebo kontejner obsahující alespoň jednu ze sloučenin podle předloženého vynálezu v množství účinném pro použití jako standard nebo reagens v testu nebo zkoušce pro stanovení schopnosti možného farmaceutika inhibovat HIV proteázu, HIV růst nebo oboje.

Těchto a dalších předmětů, které budou ozřejmeny během následujícího podrobného popisu, bylo dosaženo objevením vynálezce, že sloučeniny vzorce I:

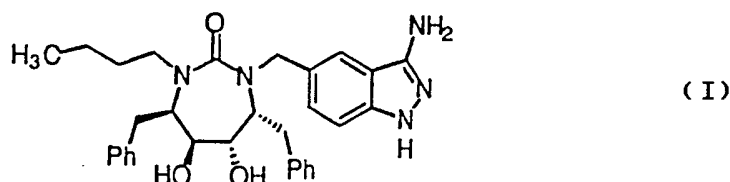


(I)

nebo farmaceuticky přijatelné soli nebo jejich formy proléčiv, jsou účinnými inhibitory proteázy.

Podrobný popis výhodných provedení

Proto poskytuje předložený vynález v prvním provedení novou sloučeninu vzorce I:



nebo farmaceuticky přijatelnou sůl nebo jejich formu pro léčiva.

Ve druhém provedení poskytuje předložený vynález novou farmaceutickou kompozici obsahující farmaceuticky přijatelný nosič a terapeuticky účinné množství sloučeniny vzorce I nebo farmaceuticky přijatelné soli nebo jejich formy pro léčiva.

Ve třetím provedení poskytuje předložený vynález nový způsob léčení HIV infekce, který zahrnuje podávání hostiteli, který potřebuje takové léčení, terapeuticky účinného množství sloučeniny vzorce I nebo farmaceuticky přijatelné soli nebo jejich formy pro léčiva.

Ve čtvrtém provedení poskytuje předložený vynález nový způsob léčení HIV infekce, který zahrnuje podávání, v kombinaci, hostiteli, který potřebuje takové léčení, terapeuticky účinného množství:

- (a) sloučeniny vzorce I, a
- (b) alespoň jedné sloučeniny vybrané ze skupiny sestávající z inhibitorů HIV reverzní transkriptázy a inhibitorů HIV proteázy.

V jiném výhodném provedení je inhibitorem reverzní

transkriptázy nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy.

V ještě dalším výhodném provedení je nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy vybrán z AZT, 3TC, ddI, ddC a d4t, a inhibitor proteázy je vybrán ze saquinaviru, ritonaviru, indinaviru, VX-478, nelfinaviru, KNI-272, CGP-61755 a U-103017.

V nejvýhodnějším provedení je nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy vybrán z AZT a 3TC a inhibitor proteázy je vybrán ze saquinaviru, ritonaviru a indinaviru.

A v ještě dalším výhodném provedení je nukleosidovým inhibitorem reverzní transkriptázy AZT.

V ještě dalším výhodném provedení je proteázovým inhibitorem indinavir.

V pátém provedení poskytuje předložený vynález farmaceutický kit vhodný pro léčení HIV infekce, který zahrnuje terapeuticky účinné množství:

- (a) sloučeniny vzorce I, a
- (b) alespoň jednu sloučeninu vybranou ze skupiny sestávající z inhibitorů HIV reverzní transkriptázy a inhibitorů HIV proteázy, v jednom nebo více sterilních kontejnerech.

V šestém provedení poskytuje předložený vynález nový způsob inhibice HIV přítomného ve vzorku tělesné tekutiny, který zahrnuje zpracování vzorku tělesné tekutiny účinným množstvím sloučeniny vzorce (I)

V sedmém provedení poskytuje předložený vynález nový kit nebo kontejner obsahující sloučeninu vzorce (I) nebo (II) v množství účinném pro použití jako standard nebo reagens v testu nebo zkoušce na stanovení schopnosti potenciálního farmaceutika inhibovat HIV proteázu, HIV růst, nebo oboje.

Definice

Následující termíny a výrazy, které se zde užívají, mají uvedené významy. Je zřejmé, že sloučeniny podle předloženého vynálezu obsahují asymetricky substituovaný atom uhlíku, a mohou být izolovány v opticky aktivních nebo racemických formách. Je velmi dobře známo ze stavu techniky, jak připravit opticky aktivní formy, jako např. rezolucí racemických forem, nebo syntézou, z opticky aktivních výchozích materiálů. Možné jsou všechny chirální, diastereomerické, racemické formy a všechny geometrické isomerní formy struktury, pokud není specifická stereochemie nebo isomerní forma indikována konkrétně.

Jak se zde používá, "inhibitor HIV reverzní transkriptázy" označuje oba, nukleosidové a nenukleosidové, inhibitory HIV reverzní transkriptázy (RT). Příklady nukleosidových RT inhibitorů zahrnují, ale neomezují se na ně, AZT, ddC, ddI, d4T, a 3TC. Příklady nenukleosidových RT inhibitorů zahrnují, ale neomezují se na ně, viviradin (Pharmacia und Upjohn U90152S), deriváty TIBO, BI-RG-587, nevirapin, L-697, 661, LY 73497 a Ro 18,893 (Roche).

Jak se zde používá, "inhibitor HIV proteázy" označuje sloučeniny, které inhibují HIV proteázu. Příklady zahrnují, ale neomezují se na ně, saquinavir (Roche, R031-8959), ritonavir (Abbott, ABT-538), indinavir (Merck, MK-639), VX-478 (Vertex/Glaxo Wellcome), nelfinavir (Agouron, AG-1343), KNI-272 (Japan Energy), CGP-61755 (Ciba-Geigy) a U-103017 (Pharmacia und Upjohn). Další příklady zahrnují cyklické proteázové inhibitory popsané ve W093/07128, W0 94/19329, W0 94/22840, a PCT přihlášce č. US96/03526.

Jak se zde používá, označuje termín "farmaceuticky přijatelné soli" deriváty popsaných sloučenin, kde je výchozí látka modifikována převedením na své kyselé nebo bázičké soli. Příklady farmaceuticky přijatelných solí zahrnují, ale

neomezují se na ně, soli minerálních nebo organických kyselin s bázičnými zbytky, jako jsou aminy; alkalické nebo organické soli kyselých zbytků, jako jsou karboxylové kyseliny; a podobně. Farmaceuticky přijatelné soli zahrnují běžné netoxické soli kvarterních amonných solí výchozích látek, vytvořených například z netoxických anorganických nebo organických kyselin. Například zahrnují tyto běžné netoxické soli takto odvozené z anorganických kyselin, jako je chlorovodík, bromovodík, kyselina sírová, sulfamová, fosforečná, dusičná a podobné; a soli připravené z organických kyselin, jako je kyselina octová, propionová, jantarová, glykolová, stearová, mléčná, jablečná, vinná, citronová, askorbová, pamoová, maleinová, hydroxymaleinová, fenylactová, glutamová, benzoová, salicylová, sulfanilová, 2-acetoxybenzoová, fumarová, toluensulfonová, methansulfonová, ethandisulfonová, oxalová, 2-hydroxyethansulfonová, a podobné.

Farmaceuticky přijatelné soli podle předloženého vynálezu mohou být syntetizovány z výchozí látky, která obsahuje bázičnou nebo kyselou část, běžnými chemickými postupy. Obecně mohou být tyto soli připraveny reakcí volných kyselinových nebo bázičných forem těchto sloučenin se stechiometrickým množstvím příslušné báze nebo kyseliny ve vodě nebo v organickém rozpouštědle, nebo ve směsi dvou; obecně nevodného media, jako je ether, ethylacetat, ethanol, isopropanol, nebo je výhodný acetonitril. Seznam vhodných solí je možno nalézt v *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17.vyd., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, str. 1418, jeho popis je zde uveden jako odkaz.

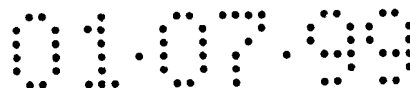
Sousloví " farmaceuticky přijatelný" se zde používá k označení těch sloučenin, materiálů, kompozicí a/nebo dávkových forem, které jsou, podle lékařského mínění, vhodné pro užití v kontaktu s lidskou tkání i zvířat, bez nadměrné toxicity, dráždění, alergické odezvy, nebo jiných problémů nebo komplikací, odpovídajících přiměřenému poměru

zisku/riziku.

"Proléčivo" je uvažováno, že zahrnuje jakékoliv kovalentně vázané nosiče, které uvolňují účinné výchozí léčivo vzorce (I) nebo jiných vzorců nebo sloučeniny podle předloženého vynálezu *in vivo*, když je takové proléčivo podáváno savci. Proléčiva sloučeniny podle předloženého vynálezu, například vzorce (I), jsou připraveny modifikací funkčních skupin přítomných ve sloučenině takovým způsobem, že se modifikované látky rozštěpí, buď rutinní manipulací, nebo *in vivo*, na výchozí látku. Proléčiva zahrnují sloučeniny podle předloženého vynálezu, kde je hydroxyskupina nebo aminoskupina vázána na jinou skupinu tak, že když se proléčivo podá savci, rozštěpí se za tvorby volného hydroxylylu nebo aminu. Příklady proléčiv zahrnují, ale neomezují se na ně, acetátové, formiatové nebo benzoátové deriváty alkoholových a aminových funkčních skupin ve sloučenině vzorce (I), fosfátové estery, dimethylglycinestery, aminoalkylbenzylestery, aminoalkylestery a karboxyalkylestery alkoholových funkčních skupin ve sloučeninách vzorce (I); a podobné. Další příklady zahrnují sloučeniny, kde se dvě hydroxyskupiny ze vzorce (I) spojují za vzniku epoxidu: -OCH₂SCH₂O-; -OC(=O)O-; -CH₂O-; -OC(=S)O-; -OC(=O)C(=O)O-; -OC(CH₃)₂O-; -OC((CH₂)₃NH₂)(CH₃)O-; -OC(OCH₃)(CH₂CH₂CH₃)O-; nebo -OS(=O)O-.

"Stabilní sloučenina" a "stabilní struktura" označují sloučeninu, která je dostatečně pevná, aby "přežila" izolaci z reakční směsi na vhodný stupeň čistoty, a formulaci na účinné terapeutické činidlo. Podle předloženého vynálezu se uvažuje pouze se stabilními sloučeninami.

"Substituovaný" označuje, že jeden nebo více vodíků na atomu, uvažovaném k vyjádření použitím "substituovaný", se nahradí výběrem z označené skupiny / skupin, s tím, že není překročeno normální mocenství označeného atomu, a že výsledkem substituce je stabilní sloučenina. Když je



substituentem ketoskupina (tedy =O), potom jsou nahrazeny na atomu dva vodíky.

Termínem "terapeuticky účinné množství" se míní, že zahrnuje množství sloučeniny podle předloženého vynálezu nebo množství kombinace nárokovaných sloučenin, které je schopné účinně inhibovat HIV infekci nebo léčit symptomy HIV infekce v hostiteli. Kombinace sloučenin je přednostně synergická kombinace. Synergie, jak je popsána například Chou a Talalay, Adv. Enzyme Regul. 22:75-55 (1984), nastává, když účinek (v tomto případě inhibice HIV replikace) sloučenin, když se podávají v kombinaci, je vyšší, než aditivní účinek sloučenin, když se podávají samotné jako jednotlivé látky. Obecně je synergický účinek nejjasněji demonstrován při suboptimálních koncentracích sloučenin. Synergie může být i v termínech nižší cytotoxicity, zvýšeného protivirového účinku, nebo některého jiného výhodného účinku kombinace ve srovnání se samostatnými složkami.

Další znaky vynálezu se stanou zřejmými vzhledem k následujícím popisům příkladných provedení, které jsou uvedeny pro ilustraci vynálezu.

Příklady provedení vynálezu:

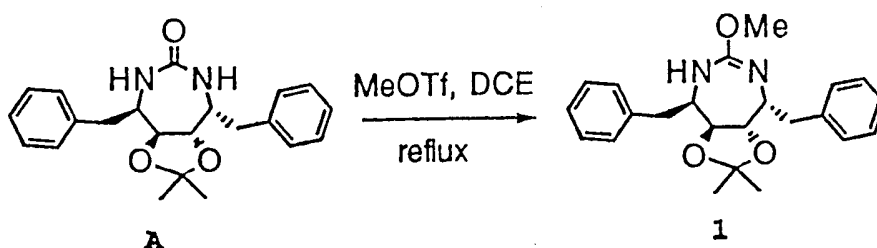
Zkratky používané v příkladech provedení jsou definovány takto:

"°C" pro stupně Celsia, "d" pro dublet, "dd" pro dublet dubletů, "ekv." pro ekvivalent nebo ekvivalenty, "g" pro gram nebo gramy, "mg" pro miligram nebo miligramy, "ml" pro mililitr nebo mililitry, "H" pro vodík nebo vodíky, "h" pro hodinu nebo hodiny, "m" pro multiplet, "M" pro molaritu, "min" pro minutu nebo minuty, "MHz" pro megahertz, "HMS" pro hmotovou spektroskopii, "nmr" nebo "NMR" pro nukleární magnetickou rezonanční spektroskopii, "t" pro triplet, a "TLC"

pro tenkovrstvou chromatografií.

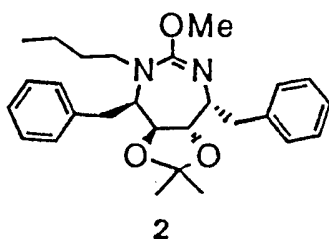
Příklad 1

Příprava (4S, 5S, 6S, 7R) -Hexahydro-1-[5-(3-aminoindazol)-methyl]-3-butyl-5,6-dihydroxy-4,7-bis[fenylmethyl]-2H-1,3-diazepin-2-onu (I)



Sloučeninu A lze připravit známými postupy. Například příprava sloučeniny A je znázorněna schématem 1 od Rossana a kol. (*Tetr. Lett.* 1995, 36 (28), 4967, 4968), jejichž obsah je zde začleněn jako odkaz. Další postup přípravy sloučeniny A je znázorněn v příkladu 6 patentu US 5 530 124, jehož obsah je zde začleněn jako odkaz.

ČÁST A: Do suspenze sloučeniny 1 (10,0 g; 27,3 mmol) v 1,2-dichlorethanu (100 ml) byl přidán methyl-trifluormethansulfonát (3,4 ml, 30 mmol). Po refluxování přes noc byla reakční směs promyta nasyceným NaHCO₃, nasyc. NaCl, sušena (Na₂SO₄) a odpařena za získání 12,5 g žlutého oleje. Kolonovou chromatografií (vrstva SiO₂, 25% EtOAc/hexan) se získalo 7,86 g sloučeniny 2 jako bledě žlutého olej, který při stání krystalizoval (75% výtěžek).
b.t. = 97-100 °C. MH⁺ = 381

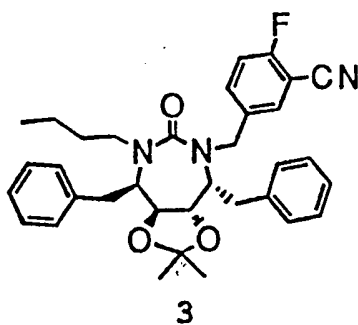


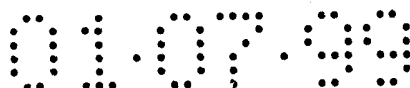
ČÁST B: Do roztoku 1 (10,0 g, 36,3 mmol) v bezvodém DMF (30 ml) byl přidán hydrid sodný (1,58 g, 65,8 mmol). Reakční směs byla míchána při teplotě místnosti po 45 min, následovalo přidávání po kapkách roztoku 1-jodobutanu (9,68 g, 52,6 mmol) v bezvodém DMF (10 ml). Po přidávání pokračovalo míchání při teplotě místnosti přes noc. Reakční směs byla ochlazena na 0 °C a byl přidán methanol (5 ml) ke zchlazení přebytku hydridu sodného. Směs byla rozdělena mezi ethylacetat (200 ml) a vodu (150 ml). Organická fáze byla oddělena a promyta vodou (4 x 100 ml), solankou (100 ml) a sušena nad síranem sodným. Purifikace mžikovou chromatografií (25% EtoAc/Hex.) poskytla n-butylisomočovinu 2 (10,5 g, 92% výtěžek):

HMS (NH₃-Cl/DDIP) (M+H⁺) 437,2 (100%);

¹HNMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ 7,23 (m, 10H), 4,19 (m, 3H), 3,64 (m, 1H), 3,44 (s, 3H), 3,36 (m, 1H), 3,02 (m, 2H), 2,76 (m, 2H), 2,04 (m, 1H), 1,52 (s, 3H), 1,49 (s, 3H), 1,21 (m, 4H), 0,82 (t, J = 7,0 Hz, 3H).

ČÁST C: (4R,5S,6S,7R)-Hexahydro-1-[(3-kyano-4-fluorfenyl)-methyl]-5,6-0-isopropyliden-4,7-bis-(4-fenylmethyl)-3-fenylmethyl-2H-1,3-diazepin-2-on (3).





Do roztoku 2 (5,0 g, 11,5 mmol) v acetonitrilu (40 ml) byl přidán 4-fluor-3-kyanobenzylbromid (3,68 g, 17,25 mmol). Reakční směs byla refluxována přes noc. Po odstranění rozpouštědla za sníženého tlaku přes noc byl zbytek purifikován použitím mžikové chromatografie (35% EtOAc/Hex.) za vzniku cyklické močoviny 3 jako bílé pevné látky (4,5 g, 71% výtěžek):

HMS (NH₃-CI/DDIP) (M+H⁺) 556,3 (100%); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ 7,41 (m, 1H), 7,28 (m, 7H), 7,13 (d, J=9,2 Hz, 2H), 7,05 (t, J = 8,8 Hz, 1H), 6,95 (d, J=9,2 Hz, 2H), 4,50 (d, J=14,0 Hz, 1H), 4,07 (m, 2H), 3,70 (m, 3H), 3,44 (t, J=7,7 Hz, 1H), 2,90 (m, 4H), 2,12 (m, 1H), 1,50 (s, 6H), 1,26 (m, 4H), 0,83 (t, J=7,0 Hz, 3H).

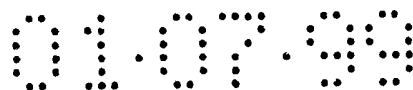
ČÁST D: (4R,5S,6S,7R)-Hexahydro-1-[5-(3-aminoindazol)-methyl]-3-butyl-5,6-dihydroxy-4,7-bis-(4-fenylmethyl)-2H-1,3-diazepin-2-on (I).

Do roztoku 3 (4,5 g, 8,11 mmol) v n-butanolu (20 ml) se přidá hydrazin hydrát (0,82 g, 16,2 mmol). Směs se refluxuje po 6 h. Rozpouštědlo a přebytek hydrazinu se byly odebrány za sníženého tlaku. Zbytek byl rozpuštěn v bezvodém methanolu (20 ml), následovalo přidání 4 M HCl v dioxanu (2 ml). Reakční směs byla míchána při teplotě místnosti po asi 2 h. Methanol byl odstraněn a zbytek byl rozdělen mezi ethylacetát (80 ml) a hydrogenuhličitan sodný (nasyc.) 50 ml. Organická fáze byla oddělena, promyta vodou (2 x 50 ml) a sušena nad bezvodým síranem sodným. Purifikací mžikovou chromatografií se získala (I) (3,0 g, 72% výtěžek) jako bílá pevná látka: b. t. 129-131 °C;

HMS (NH₃-CI/DDIP) (M+H⁺) 528,3 (100%);

HRMS vypočt. pro C₃₁H₃₇N₅O₃+1 528,2975, nalezeno 528,2958;

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, 25 °C) δ 7,19 (m, 12H), 6,98 (d, J=1,5 Hz, 2H), 4,74 (d, J=13,9 Hz, 1H), 3,85 (dd, J=10,25, 4,76 Hz, 1H), 3,65 (m, 1H), 3,56 (m, 4H), 3,15 (m, 2H), 2,96 (m, 3H), 2,07 (m, 2H), 1,37 (m, 2H), 1,22 (m, 2H), 0,84 (t, J=7,0, 3H).



Využitelnost

Sloučeniny vzorce I vykazují inhibiční aktivitu k HIV proteáze a jsou tudíž vhodné jako protivirové látky pro léčení HIV infekce a spojených chorob. Sloučeniny vzorce I vykazují inhibiční aktivitu k HIV proteáze a jsou účinné jako inhibitory HIV růstu. Schopnost sloučenin podle předloženého vynálezu inhibovat růst virů nebo infekčnosti je demonstrována standardními zkouškami na růst virů nebo infekčnosti, například použitím testu popsaného dále.

Sloučeniny vzorce I podle předloženého vynálezu jsou také vhodné pro inhibici HIV v *ex vivo* vzorku obsahujícím HIV, nebo předpokládaném, že byl vystaven HIV. Proto mohou být sloučeniny podle předloženého vynálezu použity k inhibici HIV přítomného ve vzorku tělesné tekutiny (například ve vzorku séra nebo semene), která obsahuje, nebo se předpokládá, že obsahuje, nebo byla vystavena vlivu, HIV.

Sloučeniny poskytnuté tímto předloženým vynálezem jsou také vhodné jako standardní nebo referenční sloučeniny pro použití v testech nebo zkouškách na stanovení schopnosti látky inhibovat replikaci virových klonů a/nebo HIV proteázy, například ve farmaceutických výzkumných programech. Proto mohou být sloučeniny podle předloženého vynálezu použity v těchto testech jako kontrolní nebo referenční sloučeniny a jako standardy kontroly kvality. Sloučeniny podle předloženého vynálezu mohou být uloženy v komerčním kitu nebo kontejneru pro použití takového standardu nebo referenční sloučeniny.

Jelikož sloučeniny podle předloženého vynálezu vykazují specifickou k HIV proteáze, mohou být sloučeniny podle předloženého vynálezu vhodné také jako diagnostické látky v diagnostických zkouškách pro detekci HIV proteázy. Proto inhibice proteázové aktivity ve zkoušce (jako je zde popsána zkouška) sloučeninou podle předloženého vynálezu může

indikovat přítomnost HIV proteázy a HIV virů.

Jak se zde používá, znamená "µg" mikrogram, "mg" znamená miligram, "g" označuje gram, "µl" označuje mikrolitr, "ml" označuje mililitr, "l" označuje litr, "nM" označuje nanomolární, "µM" označuje mikromolární, "mM" označuje milimolární, "M" označuje molární a "nm" označuje nanometr. "Sigma" je označení pro Sigma-Aldrich Corp. ze St. Louis, MO.

Zkouška na HIV RNA

DNA plasmidy a *in vitro* RNA transkripty:

Plasmid pDAB 72 obsahující obě sekvence gag a pol z BH10 (bp 113-1816) klonovaný na PTZ 19R bxl připraven podle Erickson-Viitanena a kol., *AIDS Research and Human Retroviruses* 1989, 5, 577. Plasmid byl linearizován Bam HI před generováním *in vitro* RNA transkriptů použitím kitu "Riboprobe Gemini II" (Promega) s T7 RNA polymerázou. Syntetizovaná RNA byla purifikována zpracováním s RNazou bez DNazy (Promega), extrakcí fenol-chloroformem, a vysrážením ethanolem. RNA transkripty byly rozpuštěny ve vodě a uskladněny při -70 °C. Koncentrace RNA byly stanoveny z A₂₆₀.

Sondy:

Biotinylované záchytné sondy byly purifikovány HPLC po syntéze na "Applied Biosystems" (Foster City, CA) DNA syntetizéru přidáním biotinu na 5' terminální konec oligonukleotidu, použitím biotin-fosforamiditové reakční látky od Cocuzza, *Tet. Lett.* 1989, 30, 6287. Gag biotinylovaná záchytná sonda (5-biotin-CTAGCTCCCTGCTTGCCCATACTA 3') byla komplementární k nukleotidům 889-912 z HXB2 a pol biotinylovaná záchytná sonda (5'-biotin-CCCTATCATTTTTGGTTTCCAT 3') byla komplementární k nukleotidům 2374-2395 z HXB2. Alkalické fosfatázové

konjugované oligonukleotidy použité jako reporterové sondy byly připraveny v Syngene (San Diego, CA). Pol reporterová sonda (5' CTGTCTTACTTTGATAAACCTC 3') byla komplementární k nukleotidům 2403-2425 z HXB2). Gag reporterová sonda (5' - CCCAGTATTTGTCTACAGCCTTCT 3') byla komplementární k nukleotidům 950-973 HXB2. Všechny pozice nukleotidů jsou z GenBank Genetic Sequence Data Bank, jak jsou dostupné přes "Genetics Computer Group Sequence Analysis Software Package" (Devereau *Nucleic Acids Research* 1984, 12, 387). Reporterové sondy byly připraveny jako 0,5 μ M zásobní roztoky ve 2 X SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M citrát sodný), 0,05 M Tris pH 8,8, 1 mg/ml BSA. Biotinylované záchytné sondy byly připraveny jako 100 μ M zásoby ve vodě.

Streptavidinem potažené desky:

Streptavidinem potažené desky byly získány od Du Pont Biotechnology Systems (Boston, MA).

Buněčné a virové zásobní roztoky:

Buňky MT-2 a MT-4 byly uchovávány v RPMI 1640 doplněném 5% fetálním telecím sérem (FCS) pro MT-2 buňky nebo 10% FCS pro MT-4 buňky, 2 mM L-glutaminu a 50 μ g/ml gentamycinu, vše od Gibco. HIV-1 RF byl propagován v MT-4 buňkách ve stejném médiu. Zásoby virů byly připraveny přibližně 10 dní po akutní infekci MT-4 buněk a uskladněny jako podíly při -70 °C. Zásoby infekčních titerů HIV-1 (RF) byly $1-3 \times 10^7$ PTJ (plak tvořících jednotek) / ml, jak se naměří testem na plak na MT-2 buňkách (viz dále). Každý podíl zásobních virů použitých pro infekci byl ponechán roztát pouze jednou.

Pro hodnocení protivirové účinnosti byly buňky, které měly být infikovány, subkultivovány jeden den před infekcí. Den po infekci byly buňky resuspendovány na 5×10^5 buněk/ ml v RPMI 1640, 5% FCS pro rozsáhlé infekce nebo na 2×10^6 /ml v modifikovaném orlím médiu od Dulbecco s 5% FCS pro infekci

mikrotitračních desek. Byly přidány viry a kultivace pokračovala po 3 dny při 37 °C.

Test HIV RNA:

Buněčné lyzáty nebo purifikovaná RNA ve 3 M nebo 5 M GED byly smíseny s 5 M GED a záchytnou sondou na finální 3M koncentraci guanidinium-isothiokyanátu a finální 30 nM koncentraci biotin-oligonukleotidu. Hybridizace se prováděla v utěsněných 96ti prohlubňových kultivačních deskách s U-dnem (Nunc nebo Costar) po 16 až 20 hodin při 37 °C. RNA hybridizační reakční směsi byly trojnásobně zředěny deionizovanou vodou na finální koncentraci guanidinium-isothiokyanátu 1 M a podíly (150 µl) byly přeneseny na streptavidinem potažené prohlubně mikrotitračních desek. Vázání záchytné sondy a záchytná sonda-RNA hybrid na imobilizovaný streptavidin bylo ponecháno probíhat po 2 hodiny při teplotě místnosti a potom byly desky promyty 6 krát promývacím pufrem desek ELISA od DuPont (fosfatem pufrovaný fyziologický roztok (PBS), 0,05% Tween 20). Druhá hybridizace reporterové sondy na imobilizovaném komplexu záchytné sondy a hybridizace cílové RNA se prováděla v promytých streptavidinem potažených prohlubních přidáním 120 µl hybridizačního koktejlu obsahujícího 4 X SSC, 0,66 % Triton X 100, 6,66% deionizovaného formamidu, 1 mg/ml BSA a 5 nM reporterové sondy. Po hybridizaci po jednu hodinu při 37 °C byla deska opět 6krát promyta. Aktivita imobilizované alkalické fosfatázy byla stanovena přidáním 100 µl 0,2mM 4-methylumbelliferylfosfatu (MUBP, JBL Scientific) v pufru δ (2,5 M diethanolamin pH 8,9 (JBL Scientific), 10 mM MgCl₂, 5 mM dihydrátu octanu zinečnatého a 5 mM N-hydroxyethyl-ethylen-diamin-trioctové kyseliny). Desky byly inkubovány při 37 °C. Byla měřena fluorescence při 450 nM použitím mikrodoskového fluorometru (Dynateck) excitací při 365 nM.

Hodnocení sloučenin v buňkách MT-2 infikovaných HIV-1 v mikrodiskách

Hodnocené sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO a zředěny v kultivačním mediu na dvakrát nejvyšší koncentraci, která se má testovat, a maximální DMSO koncentraci 2 %. Další řada trojnásobných ředění sloučeniny v kultivačním mediu byla prováděna přímo v mikrotitračních deskách s U dnem (Nunc). Po zředění sloučeniny byly přidány MT-2 buňky (50 μ l) na finální koncentraci 5×10^5 na ml (1×10^5 na prohlubeň). Buňky byly inkubovány se sloučeninami po 30 min při 37 °C v CO₂ inkubátoru. Pro zjištění protivirové aktivity bylo přidáno do kultivačních nádobek, obsahujících buňky a naředění testovaných sloučenin, příslušné zředění HIV-1 (RF) virové zásoby (50 μ l). Finální objem v každé prohlubni byl 200 μ l. Osm prohlubní na desku bylo ponecháno neinfikovaných 50 μ l media přidaného namísto virů, zatímco osm prohlubní bylo infikováno za nepřítomnosti jakékoliv protivirové sloučeniny. Pro zkoumání toxicity sloučeniny byly kultivovány paralelní desky bez virové infekce.

Po 3 dnech kultivace všech při 37 °C ve zvlhčené komoře uvnitř CO₂ inkubátoru bylo odebráno z HIV infikovaných desek 25 μ l media/ prohlubeň. Do usazených buněk bylo přidáno 37 μ l 5 M GED obsahujícího biotinylovanou záchytnou sondu, a zbývající medium do každé prohlubně na finální koncentraci 3 M GED a 30 nM záchytné sondy. Hybridizace záchytné sondy na HIV RNA v buněčném lyzátu se prováděla ve stejné mikrodiskové prohlubni, jako byla použita pro kultivaci virů utěsněním desky těsnícím prostředkem pro utěsnění desky (Costar) a inkubací po 16-20 hodin ve 37 °C inkubátoru. Potom byla do každé prohlubně přidána destilovaná voda ke zředění hybridizační reakční směsi trojnásobně a 150 μ l této zředěné směsi bylo přeneseno na streptavidinem potaženou mikrotitrační desku. HIV RNA byl kvantifikován, jak popsáno výše. Standardní křivka, připravená přidáním známých množství pDAB 72 v *in vitro* RNA transkriptu do prohlubní obsahujících

lyzované neinfikované buňky, probíhala každou mikrotitrační deskou, aby se stanovilo množství virové RNA vyrobené během infekce.

Aby se standardizovalo virové inokulum použité při zkoumání sloučeniny z hlediska protivirové aktivity, bylo vybráno ředění virů, které dospělo do hodnoty IC₉₀ (koncentrace sloučeniny požadovaná pro redukci hladiny HIV RNA o 90 %) pro dideoxycytidin (ddC), 0,2 µg/ml. Hodnoty IC₉₀ jiných protivirových sloučenin, více či méně silnějších, než je ddC, byly reprodukovatelné použitím řady zásob HIV-1 (RF), pokud tento postup následoval. Tato koncentrace virů odpovídala asi 3×10^5 PTJ (plak tvořících jednotek, měřeno testem na plak na MT-2 buňkách) na testovací prohlubeň a typicky produkovala přibližně 75% maximální hladiny virové RNA dosažitelné virovým inokulem. Pro test HIV RNA byly stanoveny hodnoty IC₅₀ z procentického snížení čistého ("net") signálu (signál ze vzorků infikovaných buněk minus signál ze vzorků neinfikovaných buněk) v RNA testu vztaženo na čistý ("net") signál z infikovaných neošetřených buněk na stejné kultivační desce (průměr z osmi prohlubní). Platné provedení jednotlivé infekce a testů RNA zkoušek bylo posuzováno podle tří kritérií. Bylo požadováno, aby měla virová infekce v RNA testu signál ekvivalentní nebo větší než je signál vytvořený 2 ng pDAB *in vitro* RNA transkriptu. Hodnota IC₉₀ u ddC, stanovená v každé řadě testů, by měla být mezi 0,1 a 0,3 µg/ml. A nakonec, hodnota plata virové RNA produkované účinným inhibitorem proteázy by měla být menší než 10 % z hodnoty dosažené v neinhibované infekci. Sloučenina je považována za aktivní, jestliže bylo její IC₉₀ stanoveno jako nižší než 1 µM.

Při testování protivirového působení byly všechny manipulace v mikrotitračních deskách, následovaných výchozím přidáním 2X koncentrovaného roztoku sloučeniny do jednotlivé řady prohlubní, prováděny použitím Perkin Elmer/Cetus Pro Pette.

Dávkování a složení:

Protivirové sloučeniny z tohoto vynálezu mohou být podávány jako léčivo na virové infekce jakýmkoliv způsobem, který zajišťuje kontakt účinné látky s místem působení látky, tedy virovou proteázou, v těle savce. Mohou být podávány jakýmkoliv běžnými postupy možnými pro použití ve spojení s farmaceutiky, buď jako samostatná terapeutická látka nebo v kombinaci terapeutických látek. Mohou být podávány samotné, ale přednost se dává podávání s farmaceutickým nosičem vybraným na základě zvolené cesty podávání a standardní farmaceutické praxe.

Dávka podávání se bude samozřejmě měnit v závislosti na mnoha faktorech, jako jsou farmakodynamické charakteristiky konkrétní látky a její druh a cesta podání; věk, zdravotní stav a hmotnost příjemce; povaha a rozsah symptomů, druh dalšího léčení; frekvence léčby; a požadovaný účinek. Denní dávka účinné látky je přijatelná od asi 0,001 do asi 1000 miligramů na kilogram tělesné hmotnosti, přičemž preferovaná dávka je asi 0,1 až asi 30 mg/kg.

Dávkové formy prostředků vhodných pro podávání obsahují od asi 1 mg do asi 100 mg účinné látky na jednotku. V těchto farmaceutických prostředcích bude účinná látka obvykle přítomna v množství kolem 0,5 až 95% hmotn. vztaženo na celkovou hmotnost prostředku. Účinná složka může být rovněž podávána orálně v pevných dávkových formách, jako jsou kapsle, tablety a prášky, nebo v kapalných dávkových formách, jako jsou elixíry, sirupy a suspenze. Může být rovněž podávána parenterálně ve sterilních kapalných dávkových formách.

Želatinové kapsle obsahují účinnou složku a práškové nosiče, jako je laktoza, škrob, deriváty celulozy, stearat hořečnatý, kyselina stearová, a podobné. Pro přípravu lisovaných tablet mohou být použita obdobná ředidla. Jak

tablety, tak kapsle mohou být vyráběny jako produkty s postupným uvolňováním, které zajišťují kontinuální uvolňování léčiva v rozpětí hodin. Lisované tablety mohou být potažené cukrem nebo potažené filmem, aby se zamaskovala jakákoliv nepříjemná chuť a tableta byla chráněna před vlivem vzduchu, nebo entericky potažené pro selektivní dezintegraci v gastrointestinálním traktu. Kapalně dávkované formy pro orální podání mohou obsahovat barviva a ochucovadla ke zvýšení přijatelnosti pro pacienta.

Obecně jsou vhodnými nosiči po parenterální roztoky voda, vhodný olej, fyziologický roztok, vodná dextroza (glukoza), a podobné cukerné roztoky a glykoly, jako je propylenglykol nebo polyethylenglykoly. Roztoky pro parenterální podání obsahují přednostně ve vodě rozpustné soli účinné látky, vhodné stabilizující látky, a, pokud je to nezbytné, pufrovací látky. Antioxidační látky, jako je hydrogensířičitan sodný, sířičitan sodný nebo kyselina askorbová, buď jednotlivě nebo v kombinaci, jsou vhodnými stabilizačními látkami. Rovněž se používají kyselina citronová a její soli a EDTA sodný. Dále mohou parenterální roztoky obsahovat konzervační látky, jako je benzalkonium chlorid, methyl- nebo propylparaben a chlorbutanol. Vhodné farmaceutické nosiče jsou popsány v *Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*, standardním odkazovém textu v této oblasti techniky.

Vhodné farmaceutické dávkované formy pro podávání sloučenin podle tohoto vynálezu mohou být doloženy následovně:

Kapsle

Velký počet jednotkových kapslí lze připravit plněním standardních dvoukusových tvrdých želatinových kapslí, každá se 100 mg práškové účinné složky, 150 mg laktozy, 50 mg celulozy, a 6 mg stearatu hořečnatého.

Měkké želatinové kapsle

Směs účinné látky v požitelném oleji, jako je sojový olej, olej bavlníkových semen nebo olivový olej, může být připravena a vstříkována prostřednictvím pozitivního vytlačovacího čerpadla do želatiny za vzniku měkkých želatinových kapslí obsahujících 100 mg účinné složky. Kapsle se potom omyjí a suší.

Tablety

Velký počet tablet lze připravit běžnými postupy tak, že dávkovou jednotkou je 100 mg účinné látky, 0,2 mg koloidního oxidu křemičitého, 5 miligramů stearátu hořečnatého, 275 mg mikrokryystalické celulozy, 11 mg škrobu a 98,8 mg laktozy. Ke zlepšení chutnosti a postupné absorpci mohou být naneseny příslušné povlaky.

Suspenze

Vodná suspenze může být připravena pro orální podání tak, že každých 5 ml obsahuje 25 mg jemně dělené účinné látky, 200 mg karboxymethylcelulozy sodné, 5 mg benzoátu sodného, 1,0 g roztoku sorbitolu, U.S.P., a 0,025 mg vanilinu.

Injekční roztoky

Parenterální prostředek vhodný pro injekční podávání lze připravit smícháním 1,5% hmotn. účinné látky v 10% obj. propylenglykolu a vodě. Roztok je sterilizován běžně používanými technikami.

Kombinace složek (a) a (b)

Každá složka léčebné látky podle tohoto vynálezu může být nezávisle v jakékoliv dávkové formě, jako jsou ty popsány výše, a rovněž může být podávána různými postupy, jak je

popsáno výše. V následujícím popisu je třeba složku (b) chápat tak, že reprezentuje jednu nebo více látek, jak byly popsány výše. Proto, pokud složky (a) a (b) mají být zpracovány stejně nebo nezávisle, každá látka složky (b) může být také zpracována stejně nebo nezávisle.

Složky (a) a (b) podle předloženého vynálezu mohou být formulovány společně, v jednotlivé dávkové jednotce (to jest společně kombinovány v jedné kapsli, tabletě, prášku, kapalině, atd) jako kombinační produkt. Pokud nejsou složka (a) a (b) formulovány společně do jednotlivé dávkové formy, složka (a) může být podávána ve stejnou dobu, jako složky (b), nebo v jakémkoliv pořadí; například složka (a) podle tohoto vynálezu může být podána první, následuje podání složky (b), nebo mohou být podávány v opačném pořadí. Pokud složka (b) obsahuje více než jednu látku, například jeden RT inhibitor a jeden inhibitor proteázy, mohou být tyto účinné látky podávány dohromady nebo v jakémkoliv pořadí. Pokud se nepodávají ve stejnou dobu, přednostně probíhá podávání složek (a) a (b) v rozmezí menším než kolem jedné hodiny od sebe. Výhodně je cesta podávání složky (a) a (b) orální. Termíny orální látka, orální inhibitor, orální sloučenina, nebo podobné, jak se zde používají, označují sloučeniny, které mohou být podávány orálně. Ačkoliv je výhodné, aby byly obě složky (a) a (b) podávány stejnou cestou (to jest, například, obě orálně), pokud je to žádoucí, mohou být podávány každá různými cestami (to jest, například, jedna složka kombinačního produktu může být podávána orálně, a druhá složka může být podávána intravenózně) nebo dávkovými formami.

Lékařský praktik jakožto odborník ve stavu techniky bude předpokládat, že se dávka při kombinační terapii podle vynálezu mění v závislosti na různých faktorech, jako jsou farmakodynamické charakteristiky konkrétní látky a její typ a cesta podání, věk, zdravotní stav a hmotnost příjemce, povaha a rozsah symptomů, druh ostatního léčení, frekvence

lčeni a požadovaný účinek, jak je popsáno výše.

Vlastní dávkování složek (a) a (b) podle předloženého vynálezu bude pro lékařského praktika znalého dané oblasti na základě daného popisu snadno zjistitelné. Jako obecný návod lze uvést typické denní dávkování, které může být kolem 100 miligramů až asi 1,5 gramu každé složky. Pokud složka (b) označuje více než jednu sloučeninu, potom může být typické denní dávkování kolem 100 miligramů až asi 1,5 gramu každé látky ze složky (b). Jako obecný návod, pokud jsou sloučeniny složky (a) a složky (b) podávány v kombinaci, potom může být dávkové množství každé složky zredukováno asi 70-80% vzhledem k obvyklému dávkování složky, když je podávána samotná jako jednotlivá látka pro léčení HIV infekce.

Kombinační produkty podle tohoto vynálezu mohou být formulovány tak, že ačkoliv jsou účinné složky kombinovány do jediné dávkové jednotky, je fyzický kontakt mezi účinnými složkami minimální. Aby se minimalizoval kontakt, například když je produkt podáván orálně, má být jedna účinná složka entericky potažena. Enterickým potažením jedné z účinných složek je možné nejen minimalizovat kontakt mezi kombinovanými účinnými složkami, ale také je možné regulovat uvolňování jedné z těchto složek v gastrointestinálním traktu tak, že jedna z těchto složek není uvolňována v žaludku, ale spíše se uvolňuje ve střevech.

Jiné provedení tohoto vynálezu, kde je požadováno orální podávání, poskytuje kombinační produkt, kde je jedna nebo více účinných složek potažena materiálem s pozvolným uvolňováním, který způsobuje postupné uvolňování v gastrointestinálním traktu a rovněž slouží k minimalizaci fyzického kontaktu mezi kombinovanými účinnými složkami. Dále může být složka s pozvolným uvolňováním přídatně entericky potažena tak, že k uvolňování této složky dochází pouze ve střevech. Ještě další pojetí je zahrnuto ve formulování kombinačního produktu, v němž jedna složka je potažena

polymerem s nepřetržitým a/nebo enterickým uvolňováním, a druhá složka je také potažena polymerem, jako je hydroxypropylmethylceluloza s nízkou viskozitou nebo jiné vhodné materiály známé ze stavu techniky, aby se více oddělily účinné složky. Polymerní povlak slouží k tomu, aby vytvořil další bariéru proti vzájemnému působení s jinou složkou. V každém složení, kde je zabráněno kontaktu mezi složkami (a) a (b) prostřednictvím povlaku nebo nějakého jiného materiálu, může být také zamezeno kontaktu mezi jednotlivými látkami složky (b).

Dávkové formy kombinačních produktů podle předloženého vynálezu, kde jedna entericky potažená účinná složka může být ve formě tablet, tak, že entericky potažená složka a další účinná složka jsou smíseny dohromady a potom slisovány do tablety, nebo tak, že entericky potažená složka je slisována do jedné tabletové vrstvy a další účinná složka je slisována do další vrstvy. Popřípadě k tomu, aby se dále oddělily dvě vrstvy, může být přítomna jedna nebo více vrstev placeba, takže mezi vrstvami účinných složek je vrstva placeba. Dále, dávkové formy podle předloženého vynálezu mohou být ve formě kapslí, kde jedna účinná složka je slisována do tablety nebo do formy více mikrotablet, částic, granulí, které jsou potom entericky potaženy. Tyto entericky potažené mikrotablety, částice, granule jsou pak vloženy do kapsle nebo slisovány do kapsle během granulace další účinné složky.

Tyto, stejně jako další postupy k minimalizování kontaktu mezi složkami kombinačních produktů podle předloženého vynálezu, kdy jsou podávány v jednotkové dávkové formě nebo podávány v oddělených formách, ale ve stejnou dobu nebo souběžně stejným způsobem, jsou pro odborníka v dané oblasti techniky na základě uvedeného popisu snadno představitelné.

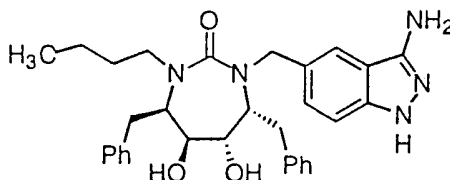
Farmaceutické kity vhodné pro léčení HIV infekce, které zahrnují terapeuticky účinné množství farmaceutické kompozice obsahující sloučeninu ze složky (a) a jednu nebo více

sloučenin ze složky (b), v jednom nebo více sterilních zásobnicích /kontejnerech, jsou také v rozsahu předloženého vynálezu. Sterilizace kontejneru se může provádět běžným sterilizačním postupem velmi dobře známým odborníkům ze stavu techniky. Složka (a) a složka (b) může být ve stejném sterilním kontejneru nebo v oddělených sterilních kontejnerech. Sterilní kontejnery s materiály mohou zahrnovat samostatné kontejnery, nebo jeden nebo více vícedílných kontejnerů, jak je potřeba. Složka (a) a složka (b) mohou být oddělené nebo fyzicky spojené do jednotlivé dávkové formy nebo jednotky, jak je popsáno výše. Tyto kity mohou dále zahrnovat, pokud je to vhodné, jednu nebo více různých běžných složek farmaceutických kitů, jako je například jeden nebo více farmaceuticky přijatelných nosičů, další nádoby pro míchání složek, atd., jak je pro odborníka ze stavu techniky nasnadě. Instrukce, buď jako letáky nebo jako nálepky, které uvádějí množství složek, jaké se má podávat, návody na podávání a/nebo návody pro míchání složek, mohou být rovněž součástí kitu.

Samozřejmě je vzhledem k výše uvedenému popisu možná řada modifikací a variací předloženého vynálezu. Je tudíž zřejmé, že v rozsahu připojených patentových nároků může být vynález prakticky proveden i jinak, než je konkrétně uvedeno zde.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Sloučenina vzorce I



(I)

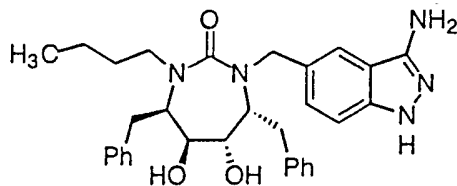
nebo farmaceuticky přijatelná sůl nebo jejich forma pro léčiva, kde pro léčivem vzorce I je sloučenina, kde se dvě hydroxyskupiny spojují za vzniku epoxidu: $-OCH_2SCH_2O-$; $-OC(=O)O-$; $-CH_2O-$; $-OC(=S)O-$; $-OC(=O)C(=O)O-$; $-OC(CH_3)_2O-$; $-OC((CH_2)_3NH_2)(CH_3)O-$; $-OC(OCH_3)(CH_2CH_2CH_3)O-$; nebo $-OS(=O)O-$ skupiny.

2. Sloučenina podle nároku 1, kde sloučenina je vzorce (I).

3. Farmaceutická kompozice vyznačující se tím, že obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič a terapeuticky účinné množství sloučeniny podle nároku 1 nebo farmaceuticky přijatelnou sůl nebo jejich formu pro léčiva.

4. Kompozice podle nároku 3 vyznačující se tím, že sloučenina je vzorce (I).

5. Použití sloučeniny vzorce I nebo farmaceuticky přijatelné soli nebo formy pro léčiva pro výrobu léčiva pro léčení HIV infekce, kde



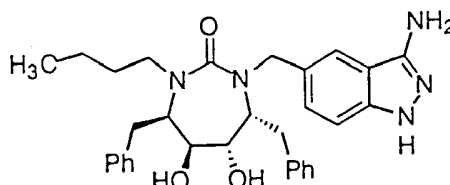
(I)

proléčivo vzorce I je sloučenina, kde se dvě hydroxyskupiny spojují za vzniku epoxidu; $-OCH_2SCH_2O-$; $-OC(=O)O-$; $-CH_2O-$; $-OC(=S)O-$; $-OC(=O)C(=O)O-$; $-OC(CH_3)_2O-$; $-OC((CH_2)_3NH_2)(CH_3)O-$; $-OC(OCH_3)(CH_2CH_2CH_3)O-$; nebo $-OS(=O)O-$ skupiny.

6. Použití podle nároku 5 kde sloučenina je vzorce (I).

7. Použití kombinace (a) a (b) pro výrobu léčiva pro léčení HIV infekce, kde

(a) je sloučenina vzorce (I) nebo farmaceuticky přijatelná sůl nebo jejich forma proléčiva:



(I)

kde proléčivo vzorce I je sloučenina, kde se dvě hydroxyskupiny spojují za vzniku epoxidu; $-OCH_2SCH_2O-$; $-OC(=O)O-$; $-CH_2O-$; $-OC(=S)O-$; $-OC(=O)C(=O)O-$; $-OC(CH_3)_2O-$; $-OC((CH_2)_3NH_2)(CH_3)O-$; $-OC(OCH_3)(CH_2CH_2CH_3)O-$; nebo $-OS(=O)O-$ skupiny, a

(b) je alespoň jedna sloučenina vybraná ze skupiny sestávající z inhibitorů HIV reverzní transkriptázy a HIV inhibitorů proteázy.

8. Použití podle nároku 7, kde sloučenina je vzorce (I).

9. Použití podle nároku 7, kde inhibitor reverzní transkriptázy je nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy.

10. Použití podle nároku 9, kde nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy je vybrán z AZT, 3TC, ddI, ddC a d4T,

a inhibitor proteázy je vybrán ze saquinaviru, ritonaviru, indinaviru, VX-478, nelfinaviru, KNI-272, CGP-61755, a U-103017.

11. Použití podle nároku 10, kde nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy je vybrán z AZT a 3TC a inhibitor proteázy je vybrán ze saquinaviru, ritonaviru a indinaviru.

12. Použití podle nároku 11, kde nukleosidovým inhibitorem reverzní transkriptázy je AZT.

13. Použití podle nároku 11, kde proteázovým inhibitorem je indinavir.

14. Farmaceutický kit vhodný pro léčení HIV infekce v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahuje terapeuticky účinné množství:

(a) sloučeniny podle nároku 1, a

(b) alespoň jedné sloučeniny vybrané ze skupiny sestávající z inhibitorů HIV reverzní transkriptázy a inhibitorů HIV proteázy, v jednom nebo více sterilních kontejnerech.

15. Kit podle nároku 14 v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e složkou (a) je sloučenina vzorce (I).