

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

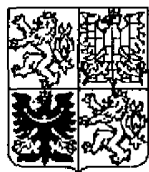
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

51-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17. 07. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **17.07.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/95111162**

(33) Země priority: **EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 04. 98**
(Věstník č. 4/98)

(86) PCT číslo: **PCT/EP96/03129**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/04005**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 7/64
C 12 P 21/04
A 61 K 38/13

(71) Přihlašovatel:

C-CHEM AG, Binnibgen, CH;

(72) Původce:

Lüchinger Jean M., Basel, CH;

(74) Zástupce:

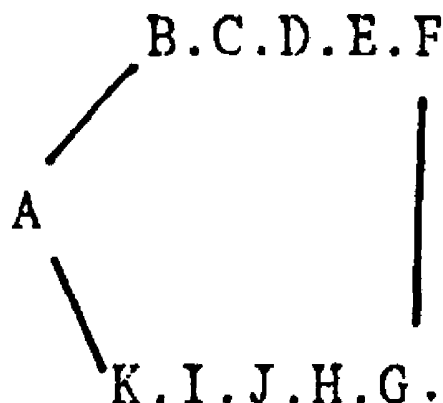
Kalenský Petr JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Cyklosporinové deriváty s anti-HIV účín-
kem**

(57) Anotace:

Cyklické peptidy obecného vzorce I, kde A až K znamenají zbytky následujících aminokyselin: A je substituovaný homothreonin obecného vzorce II $R_1-CH_2CH/CH_3/-CH/OH/-CH/NHCH_3/-COOH$, ve kterém je R_1 n-propyl nebo propenyl a dvojná vazba je preferovaně ve trans-konfiguraci, B je kyselina alfa aminomáselná, valín, norvalín nebo threonín, C je /D/-aminokyselina obecného vzorce III $CHNH_3-CH/R/-COOH$, ve kterém R je C_2-C_6 alkyl, alkenyl, alkynyl, s přímým řetězcem nebo rozvětvený, kde tyto skupiny mohou být substituovány, D je N-methyl-gamma-hydroxyleucin nebo N-methyl-gamma-acetyloxuleucin, E je valín, F, I a J jsou v každém případě N-methyleucin, G je alanín, H je /D/-alanín nebo /D/-serin, a K je N-methylvalín. Vynález se také týká přípravků takových peptidů a jejich použití v prevenci infekce virem lidské imunodeficiency /HIV/.



CZ 51-98 A3

Cyklosporinové deriváty s anti-HIV účinkem

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nových cyklických peptidů se serie cyklosporinů, které mají silný inhibiční účinek na virus lidské imunodeficiency (HIV), bez jakýchkoli imunosupresivních aktivit.

Dosavadní stav techniky

Takové cyklické peptidy jsou chráněny, inter alia, v EP 484 281. Jednou substancí, která je specificky chráněna v této patentové přihlášce, je (gamma-hydroxy-N-methyllleucin)cyklosporin. Ačkoliv může být tato substance velmi snadno připravena z cyklosporinu A pomocí mikrobiální hydroxylace, EP 484 281 ukazuje, že tato substance má aktivitu proti HIV, která je asi 5 - 6 slabší než je aktivita neaktivnějších substancí, jmenovitě MeIle-4-cyklosporinu a MeVal-4-cyklosporinu. Všechny tři substance nemají prakticky žádnou imunosupresivní aktivitu. Neočekávaně bylo zjištěno, že anti-HIV účinek (gamma-hydroxy-MeLeu-4)cyklosporinu může být významně vylepšen, bez nárůstu jakýchkoli imunosupresivních aktivit, zavedením vhodných substituentů do methylenové skupiny aminokyseliny sarkosinu v pozici 3 uvedeného cyklosporinu. Protože terapeutické dávky cyklosporinu A, které jsou používány po orgánových transplantacích pro prevenci rejekce transplantovaných orgánů jsou velmi vysoké, a podobně vysoké dávky jsou očekávány pro anti-HIV terapii, která využívá cyklosporinových derivátů, je hodnota předkládaného vynálezu v tom, že poskytuje nový cyklosporinový derivát, který má vysokou

anti-HIV aktivitu a že tento cyklosporinový derivát může být připraven simultánně, v několika málo krocích, z cyklosporinu A, což je produkt, který je již připraven v tunách.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se v důsledku toho týká nových cyklických peptidů obecného vzorce



kde A až K znamenají zbytky následujících aminokyselin:

- A je substituovaný homothreonin obecného vzorce



ve kterém je R_1 n-propyl nebo propenyl a dvojná vazba je preferovaně v trans-konfiguraci;

- B je kyselina alfa-aminomáselná, valin, norvalin nebo threonin,

- C je (D)-aminokyselina obecného vzorce



ve kterém

R je C₂-C₆ alkyl, alkenyl, alkinyl, s přímým řetězcem nebo rozvětvený, kde tyto skupiny mohou dále být substituovány hydroxy, amino, C₁-C₄ alkylamino, C₁-C₄ dialkylamino, alkoxy nebo acyloxy,

COOR₂, CONHR₂, kde R₂ může být C₁-C₄ alkyl, s přímým řetězcem nebo rozvětvený,

X-R₃, kde X je O nebo S a R₃ je C₁-C₄ alkyl, alkenyl nebo alkinyl, s přímým řetězcem nebo rozvětvený, a kde, pokud X je S, může být R₃ také aryl nebo heteroaryl,

halogen, preferovaně fluor,

kyano,

nebo CHR₄R₅, kde R₄ je vodík, methyl, ethyl nebo fenyl, a R₅ je vodík, hydroxyl nebo halogen, preferovaně fluor, a dále amino, C₁-C₄ alkylamino, C₁-C₄ dialkylamino, acyloxy, preferovaně acetyloxy, a dále terc.butoxykarbonyl-aminoethoxy-ethoxy-acetyloxy, nebo alkoxykarbonyl, preferovaně butoxykarbonyl,

- D je N-methyl-gamma-hydroxyleucin nebo N-methyl-gamma-acetyloxuleucin,

- E je valin,

- F, I a J jsou v každém případě N-methylleucin,

- G je alanin,

- H je (D)-alanin nebo (D)-serin, a

- K je N-methylvalin.

Významným prvkem v předkládaném vynálezu je variace radikálu R ve vzorci III aminokyseliny C.

Příklady radikálu R ve vzorci III jsou $C_1 - C_6$ alkyl, alkenyl nebo alkinyl, s přímým řetězcem nebo rozvětvený, kde mohou být tyto skupiny dále substituovány hydroxylem, alkyloxy, acyloxy, $C_1 - C_4$ alkylamino nebo $C_1 - C_4$ dialkylamino. Příklady jsou methyl, ethyl, propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, terc.butyl, pentyl, isopentyl, neopentyl, terc.pentyl, hexyl, cyklopropylmethyl, allyl, butenyl, pentenyl, isopentenyl, propargyl a butinyl. Příklady alkyloxy a acyloxy substituentů v radikálu R jsou methoxy, ethoxy, propyloxy, beta-methoxy a také acetoxi nebo pivaloxyloxy. Příklady $C_1 - C_4$ alkylamino a $C_1 - C_4$ dialkylamino substituentů v radikálu R jsou methylamino, dimethylamino, ethylamino, diethylamino, propylamino, isopropylamino, dipropylamino, diisopropylamino a tertbutylamino. Radikál R_2 v R může znamenat methyl, ethyl, propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl nebo terc.butyl. Kromě toho, R také může znamenat halogen nebo kyano. Radikál R_3 v $X-R_3$ může být $C_1 - C_4$ alkyl, alkenyl nebo alkinyl, s přímým řetězcem nebo rozvětvený, a, pokud X je S, pak to může být také aryl nebo heteroaryl. Příklady arylů jsou fenyl, 1-naftyl a 2-naftyl, a příklady heteroarylů jsou 2-pyridyl, 3-pyridyl, 4-pyridyl, 2-pyrimidinyl, 4-pyrimidinyl, pyrazinyl a benzothiazol-2-yl.

Preferované sloučeniny jsou ty, ve kterých je radikál R_1 v A propenyl, B je kyselina alfa-máselná, D je N-methyl-gamma-hydroxyleucin, E je valin, F, I a J jsou v každém případě N-methylleucin, G je alanin, H je (D)-alanin a K je N-methylvalin.

37.01.99

V této konfiguraci je radikál R ve vzorci III methyl, ethyl, propyl, allyl, propargyl, hydroxymethyl, hydroxyethyl, hydroxybenzyl, aminomethyl, methylaminomethyl, dimethylaminomethyl, ethylaminomethyl, diethylaminomethyl, propylaminomethyl, isopropylaminomethyl, dipropylaminomethyl, diisopropylaminomethyl, terc.butylaminomethyl, fluoromethyl, methoxymethyl, ethoxymethyl, methoxykarbonyl, ethoxykarbonyl, propoxykarbonyl, isobutyloxykarbonyl, methylaminokarbonyl, ethylaminokarbonyl, propylaminokarbonyl, isopropylaminokarbonyl, fenylaminokarbonyl, methoxykarbonylmethyl, ethoxykarbonylmethyl, propoxykarbonylmethyl, terc.butoxykarbonylmethyl, methoxy, ethoxy, propoxy, isopropoxy, n-butoxy, isobutoxy, terc.butoxy, hydroxyethoxy, methylthio, ethylthio, hydroxyethylthio, propylthio, isopropylthio, n-butylthio, isobutylthio, terc.butylthio, fenylthio, 2-pyridylthio, benzothiazol-2-ylthio, kyano nebo fluor.

Nové sloučeniny mohou být připraveny za použití vhodných bází pro přípravu polyaniontů z cyklických peptidů podle obecného vzorce I, kde D znamená N-methyllleucin, reagováním tohoto polyaniontu s vhodnými elektrofilny a, pokud to je vhodné, podrobení nově zavedeného radikálu další transformaci tak, aby byla získána požadovaná substituce v aminokyselině C. Vzniklé produkty jsou potom hydroxylovány prostředky mikrobiální transformace. Jiná možnost pro přípravu nových sloučenin spočívá, jak je popsáno výše, v použití vhodné báze pro přípravu polyaniontu z cyklických peptidů podle obecného vzorce I, kde D znamená N-methyl-gamma-hydroxyleucin, reagováním tohoto polyaniontu s vhodnými elektrofilny a, pokud to je vhodné, podrobení nově zavedeného radikálu další transformaci tak, aby byla získána požadovaná substituce v aminokyselině C.

Polyanionty jsou připraveny reagováním počáteční sloučeniny ve vhodném nevodném rozpouštědle, jako je tetrahydrofuran, při nízkých teplotách, preferovaně při teplotách nižších než je minus čtyřicet stupňů, s přebytkem vhodné báze, preferovaně lithiundiisopropylamid, rozpuštěném ve bezvodém tetrahydrofuranu a vychytáním vzniklého polyaniontu vhodným elektrofilem. Tato metoda v podstatě koresponduje metodě, kterou popsal Seebach (D. Seebach et al., Helv. Chim. Acta, svazek 76, 1564 - 1590, 1993). Další báze, které jsou vhodné, jsou jiné amidy alkalických kovů, jako je lithumdiethylamid nebo lithiumhexamethyldisilazid, a také alkoholáty alkalických kovů, jako je methoxid draselný, terc.butoxid draselný, tert.amoxid draselný a methoxid sodný. Příklady vhodných elektrofilů jsou alkylhalogenidy, jako je methyljodid, ethyljodid, allylbromid a benzylbromid, alkoxyethylhalogenidy, jako je methoxymethyl chlorid, methoxyethoxymethyl chlorid a benzyloxymethylchlorid, nebo dále karbonylové sloučeniny, jako jsou aldehydy nebo některé ketony, například formaldehyd, acetaldehyd, benzaldehyd, aceton nebo cyklické ketony jako je cyklopropanon a jeho vyšší homologa, a také reaktivní deriváty kyseliny uhličitě, jako jsou isokyanáty a organických karboxylových kyselin, jako jsou estery, např. ethylformiat, diethyloxalat, ethylbenzoaty a ethylnikotiny. Jinými vhodnými elektrofilů jsou halogeny a také jiné zdroje pozitivních halogenů jako je N-chlorsukcinimid, N-bromsukcinimid, N-fluoro-N-neopentyl-p-toluensulfonamid, perchlorylfluorid, N-halogenkyany, jako je chlorkyan a také disulfidy a jejich sulfoniové sole, jako je dimethylsulfid, dimethylthiomethylsulfonium jodid, difenyldisulfid, dipyridyldisulfid a 2,2'-benzothiazolyldisulfid. Reakce těchto elektrofilů vedou ke tvorbě nových center chiralit. Směsi, ve

kterých převládá jeden ze dvou možných diastereomerů, jsou získány v závislosti na reakčních podmínkách. Tyto nově tvořené diastereomery se jeden od druhého liší v tom, že aminokyselina C podle obecného vzorce I má (D) konfiguraci v jednom případě, a (L) konfiguraci ve druhém případě. V předkládaném vynálezu jsou preferovány ty diastereomery, ve kterých je aminokyselina C podle obecného vzorce I v (D) konfiguraci. Faktory, které vedou k preferované tvorbě (D) diastereomerů nebo (L) diastereomerů, a také vliv použité báze, a mnoho elektrofilů, byly zkoumány podrobně Seebachem pro případ, kdy je cyklosporin A počáteční sloučeninou, jak je popsáno v literatuře (D. Seebach et al., *Helv. Chim. Acta*, svazek 76, 1564 - 1590, 1993), a jak bylo kriticky komentováno jinými autory (S. David, *Chemtracts Organic Chemistry*, svazek 6, 303 - 306, 1993). Pokusné podmínky, které jsou posány v předkládaném vynálezu, vedou k predominantní tvorbě těch diastereomerů, ve kterých má nově vytvořené centrum chiralit aminokyseliny C (D) konfiguraci. Bylo demonstrováno v předkládaném vynálezu, že tak je tomu také v případě 4-(gamma-hydroxy)-N-methyl-leucincyklosporinu, když je použit jako počáteční-sloučenina místo cyklosporinu A. Použití 4-(gamma-hydroxy)-N-methyl-leucincyklosporinu jako počáteční sloučeniny pro takové transformace je nové a je předmětem předkládaného vynálezu.

Obecně, produkty, které jsou získány v těchto případech mají také predominantně konfiguraci (D) aminokyselin.

Mikrobiální hydroxylace gamma polohy aminokyseliny v poloze D může být provedena za použití různých mikroorganismů rodu *Actinomyces*, například za použití *Sebekia benihana*, jak je popsáno v *Eur. J. Immunol.*, 1987, 17, 1359. Význam této

transformace je zásadní v tom, že imunosupresivní účinek cyklosporinu je téměř kompletně eliminován v jednom kroku.

Protože jsou málo toxické, mají sloučeniny podle vzorce I výhodné biologické vlastnosti, zejména v to, že vykazují inhibiční účinek na virus lidské imunodeficiency (HIV), a mohou proto být použity jako léky u HIV infekce. Tento inhibiční účinek byl pozorován ve vhodných in vitro pokusech při koncentracích od 0,05 do 50 mg/l. Sloučeniny podle vzorce I, a pokud je to vhodné, tak její soli, mohou být použity jako léčiva buď samostatně, nebo ve vhodných medicínálních formách spolu s anorganickými nebo organickými farmakologicky indiferentními přídavnými substancemi.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava 3-N-methyl-(D)-serin-4-(gamma-hydroxy)-
N-methylleucincyklosporinu

Eur. J. Immunol., 1987, svazek 17, 1359, popisuje použití *Sebekia benihana* pro zavedení hydroxylové skupiny do gamma polohy N-methylleucinu v poloze 4 cyklosporinu A prostředky mikrobiální transformace. Tato biotransformace může být použita pro přípravu 3-N-methyl-(D)-serin-4-gamma-hydroxy-N-methylleucincyklosporinu z 3-N-methyl-(D)-serincyklosporinu. Kmen, který je použit, má označení NRLL 11111 a patří do rodiny Actinoplanaceae.

Počáteční kultura:

Agarové kultury NRLL 11111 byly kultivovány při 27 °C po 10 dní ve sterilizovaném mediu, které bylo upraveno na pH 7 a skládalo se z 20 g glukosy, 10 g kvasinkového extraktu (Gistex), 10 g peptonu, 40 g škrobu, 2 g uhličitanu vápenatého, 40 g agaru a 1 l vody.

Předběžná kultura

Předběžné kultivační medium se skládalo z 35 g glukosy, 50 g škrobu, 12,5 g peptonu, 50 g sladového extraktu, 22,5 g kvasinkového extraktu a 5 g uhličitanu vápenatého ve 5 l vody. Kromě toho toto medium obsahovalo 5 ml roztoku stopových prvků (1 ml koncentrované kyseliny sírové, 5 g heptahydrátu síranu železnatého, 50 mg KI, 100 mg kyseliny borité, 4 g heptahydrátu síranu zinečnatého, 200 mg pentahydrátu síranu měďnatého a 2 g hexahydrátu chloridu hexahydrátu chloridu kobaltu v 1 l destilované vody). Spory a mycelium počáteční kultury byly suspendovány v 10 ml 0,9% salinického roztoku a suspenze byla přidána ke 100 ml sterilizovaného předběžného kultivačního media. Tato kultura byla třepána při 27 °C po 4 dny na orbitální třepače při 200 otřesech/minutu. Po 4 dnech byla předběžná kultura ředěna (1:10) sterilizovaným předběžným kultivačním mediem a třepána po další 3 dny.

Hlavní kultura

Fermentační medium pro hlavní kulturu (1 l destilované vody, 1 ml výše popsaného roztoku stopových prvků, 200 mg molybdátu amonného, 255 mg hydrogenfosforečnanu draselného, 120 mg

dihydrogenfosforečnanu draselného, 100 mg heptahydrátu síranu hořečnatého, 50 mg hexahydrátu chloridu vápenatého, 12,5 g sojové moučky, 2,5 g kvasinkového extraktu, 10 g škrobu, 10 g dextrinu a 10 g cerelosy) bylo upraveno na pH 7,3 a sterilizováno při 120 °C po 20 minut. 10 ml předběžné kultury získané výše bylo potom přidáno a směs byla třepána při 27 °C po 24 hodin na orbitální třepačce a, po přidání 100 mg 3-N-methyl-(D)-serincyklosporinu, byla třepána po další 3 dny.

Izolace 3-N-methyl-(D)-serin-4-(gamma-hydroxy)-N-methylleucincyklosporinu

Hlavní kultura je zbavena mycelia filtrací a filtrát je extrahován 5x dichlormethanem. Kombinované extrakty jsou koncentrovány na rotační odparce a zbytek je chromatografován na 250 g silikagelu (Merck silikagel, velikost částic 0,4 - 0,063 mesh). Další chromatografie cyklosporinových frakcí na 70 g silikagelu dávala 15 mg 3-N-methyl-(D)-serin-4-(gamma-hydroxy)-N-methylleucincyklosporinu jako amorfního prášku. Optická otáčivost této substance je $(\alpha)_D = -166^\circ$ ($c = 0,5$, dichlormethan). Tento produkt může být krystalizován z methanolu, se vzniklými krystaly tajícími při 150 - 152 °C. V ^1H NMR spektru, v deuterizovaném DMSO, se dvě methylové skupiny N-methyl-gamma-hydroxyleucinu jeví jako singlety při 1,05 ppm.

Příklad 2

Příprava 3-N-methyl-(D)-serincyklosporinu

Příprava této substance je popsána v literatuře, D. Seebach

et al., *Helv. Chim. Acta*, svazek 76, 1564 - 1590, 1993.

Tato substance může být získána následujícím způsobem:

2a) 3-alfa-methoxykarbonylcyklosporin

30 ml 1,6 molárního roztoku n-butyllithia v hexanu je přidáno po kapkách, při 0 °C a za atmosféry inertního plynu (argonu), do roztoku 8,7 ml diisopropylamidu v 800 ml sušeného THF. Po 20 minutách při 0 °C je roztok ochlazen na -78 °C a roztok 10,0 g cyklosporinu A ve 150 ml sušeného tetrahydrofuranu, který byl předem ochlazen na -78 °C, je k němu po částech přidán. Vzniklá směs je míchána při -78 °C po 1 hodinu a potom jí prochází proud suchého CO₂ plynu. 6,4 ml methyl chloroformiátu je potom přidáno po kapkách a směs je mísená při -78 °C po 2 hodiny. Poté, co byl přidán 1,1-diisopropylamin, je teplota zvýšena na 20 °C a směs je míchána při této teplotě po 14 hodin; potom je zahřívána pod refluxem po 45 minut. Poté, co byla směs ochlazená na 20 °C je přidáno 100 ml fosforečné kyseliny a vodná fáze je extrahována 600 ml ethylacetátu. Vodná fáze je opakovaně extrahována několikrát ethylacetátem. Organické extrakty jsou kombinovány, sušeny síranem hořečnatým a vysušeny ve vakuu. Vzniklý olej je chromatografován na 500 g silikagelu (0,02 - 0,05 mesh) za použití směsi 4:1 ethylacetátu a cyklohexanu. Frakce, které obsahují produkt, jsou kombinovány a rozpouštědlo je odstraněno ve vakuu. 1,9 g 3-alfa-methoxykarbonylcyklosporinu je takto získáno jako bezbarvý prášek mající teplotu tání 138 °C.

2b) 3-N-methyl-D-serincyklosporin

2,4 ml 2,0 molárního roztoku borohydridu lithného v THF je

přidáno po kapkách, při 0 °C, k roztoku 1,0 g 3-alfa-methoxykarbonocyklosporinu ve 30 ml suchého tetrahydrofuranu. Tato směs je míchána při 0 °C po 22 hodin. Potom jsou přidány 2 ml destilované vody, potom 10% kyselina chlorovodíková, která je přidána po kapkách, a potom dalších 10 ml destilované vody. Tato směs je třepána s 25 ml ethylacetatu, potom jsou separovány fáze a vodná fáze je následně extrahována 3x 50 ml ethylacetatu pokaždé. Kombinované extrakty jsou sušeny síranem hořečnatým a vysoušeny ve vakuu. Zbytek je chromatografován na 300 g silikagelu za použití ethylacetatu jako elučního činidla. Frakce, které obsahují produkt, jsou kombinovány a koncentrovány ve vakuu, a je získáno 401 mg 3-N-methyl-(D)-serincyklosporinu jako bezbarvého prášku majícího teplotu tání 128 - 130 °C.

Příklad 3:

Příprava 3-N-methyl-(D)-serin-4-(gamma-hydroxy)-N-methylleucincyklosporinu ze 4-(gamma-hydroxy)-N-methylleucincyklosporinu

5 ml 1,6 molárního roztoku n-butyllithia v hexanu je přidáno po kapkách, při 0 °C za atmosféry inertního plynu, do roztoku 1,12 ml diisopropylaminu v 50 ml suchého THF. Po 20 minutách při 0 °C je roztok ochlazen na -78 °C a roztok 4-(gamma-hydroxy)-N-methylleucincyklosporinu v 50 ml suchého tetrahydrofuranu, který byl předem ochlazen na -78 °C, je do něj přidán po částech. Vzniklá směs je mísená při -78 °C po 1 hodinu, potom je monomerní formaldehyd zaveden do reakční směsi za použití mírného proudu argonu. Směs je mísená při -78 °C po další 2 hodiny. Teplota je potom zvýšena na 20 °C, potom

je přidáno 10 ml kyseliny fosforečné a vodná fáze je extrahována 100 ml ethylacetatu. Vodná fáze je opakovaně extrahována několikrát ethylacetatem. Organické extrakty jsou kombinovány, sušeny síranem hořečnatým a vysušeny ve vakuu. Vzniklý olej je chromatografován na 100 g silikagelu (0,02 - 0,05 mesh) za použití ethyl acetatu jako elučního činidla. Frakce, které obsahují produkt, jsou kombinovány a rozpouštědlo je odstraněno ve vakuu. Tímto způsobem je získáno 5 mg 3-N-methyl-(D)-serin-4-(gamma-hydroxy)-N-methylleucincyklosporinu. Podle všech fyzikálně chemických kritérií je substance připravená tímto způsobem identická se substancí, která byla připravena podle příkladu 1.

Test protivirové aktivity

T-buňky linie MT4, které popsali I. Myoshi et al., (Nature 294, str 770 - 771, 1981) byly použity pro tento test. HIV-1 (kmen IIIB) byl adsorbován na buňky po dobu dvou hodin při 37 °C. Inokulum bylo potom odstraněno a infikované buňky byly přeneseny do tkáňových kultivačních ploten, které obsahovaly testovanou sloučeninu v různých koncentracích. V tomto kontextu bylo virové inokulum vybráno tak, aby se koncentrace virového p24 antigenu zvyšovala exponenciálně v buněčném supernatantu do čtvrtého dne infekce. Třetí a čtvrtý den po infekci byly buněčné supernatanty analyzovány ELISA na antigen p24. Byly určeny IC₅₀ hodnoty srovnáním koncentrací p24 v supernatantech infikovaných, substancí ošetřených buněk a v supernatantech neošetřených infikovaných kontrolních buněk. V tomto testu byla hodnota IC₅₀ pro 3-N-methyl-(D)-serin-4-(gamma-hydroxy)-N-methylleucincyklosporinu 0,1 mg/ml. Pro srovnání, korespondující hodnota pro cyklosporin A je 0,5 mg/ml.

JUDr. Petr KALENSKY
advokát

SPOLEČNÁ ADVOKÁTNÍ KANCELÁŘ
VŠETEČKA ZELENÝ ŠVORČÍK KALENSKÝ
A PARTNEŘI
120 00 Praha 2, Hájkova 2
Česká republika

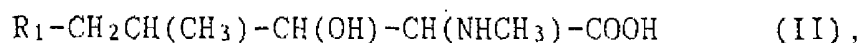
Patentové nároky

1. Nový cyklický peptid obecného vzorce I



kde A až K znamenají zbytky následujících aminokyselin:

- A je substituovaný homothreonin obecného vzorce II



ve kterém je R_1 n-propyl nebo propenyl a dvojná vazba je preferovaně ve trans-konfiguraci,

- B je kyselina alfa aminomáselná, valin, norvalin nebo threonin,

- C je (D)-aminokyselina obecného vzorce III



ve kterém

- H je (D)-alanin nebo (D)-serin, a

- K je N-methylvalin.

2. Cyklický peptid obecného vzorce I podle nároku 1, kde radikál R₁ v A je propenyl, B je kyselina alfa-máselná, D je N-methyl-gamma-hydroxyleucin, E je valin, F, I a J jsou v každém případě N-methyllleucin, G je alanin, H je (D)-alanin a K je N-methylvalin.

3. Cyklický peptid obecného vzorce I podle nároku 2, kde radikál R ve vzorci III je methyl, ethyl, propyl, allyl, propargyl, hydroxymethyl, hydroxyethyl, hydroxybenzyl, aminomethyl, methylaminomethyl, dimethylaminomethyl, ethylaminomethyl, diethylaminomethyl, propylaminomethyl, isopropylaminomethyl, dipropylaminomethyl, diisopropylaminomethyl, terc.butylaminomethyl, fluoromethyl, methoxymethyl, ethoxymethyl, methoxykarbonyl, ethoxykarbonyl, propoxykarbonyl, isobutyloxykarbonyl, methylaminokarbonyl, ethylaminokarbonyl, propylaminokarbonyl, isopropylaminokarbonyl, fenylaminokarbonyl, methoxykarbonylmethyl, ethoxykarbonylmethyl, propoxykarbonylmethyl, terc.butoxykarbonylmethyl, methoxy, ethoxy, propoxy, isopropoxy, n-butoxy, isobutoxy, terc.butoxy, hydroxyethoxy, methylthio, ethylthio, hydroxyethylthio, propylthio, isopropylthio, n-butylthio, isobutylthio, terc.butylthio, fenylthio, 2-pyridylthio nebo benzothiazol-2-yl-thio.

4. 3-N-methyl-(D)-serin-4-(gamma-hydroxy)-N-methyl-leucincyklosporin.

5. Způsob přípravy sloučenin obecného vzorce I, ve kterých má C výše uvedený význam a D znamená N-methyl-gamma-hydroxyleucin, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že zahrnuje hydroxylaci cyklického peptidu obecného vzorce I, ve kterém D znamená N-methylleucin, za použití mikroorganismu.

6. Způsob podle nároku 5, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že mikroorganismus je Sebekia benihana.

7. Způsob přípravy sloučenin obecného vzorce I, ve kterých D znamená N-methyl-gamma-hydroxyleucin, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že zahrnuje konvertování cyklického peptidu obecného vzorce I, kde C je sarkosin a D je N-methyl-gamma-hydroxyleucin na polyanion za použití vhodných bází a transformování tohoto polyanionu na produkt podle nároku 1 jeho regováním s vhodnými elektrofilny.

JUDr. Petr KALENSKY
advokát

SPOLEČNÁ ADVOKÁTNÍ KANCELÁŘ
VŠETEČKA ZELENÝ ŠVORČÍK KALENSKÝ
A PARTNEŘI
120 00 Praha 2, Hájkova 2
Česká republika

27.01.99

~~Změna podle čl. 34
náhradní list~~

8. Farmaceutická kompozice, která obsahuje jeden nebo více cyklických peptidů podle nároku 1 spolu s farmaceuticky přijatelným ředidlem nebo přísadou.

9. Použití sloučeniny podle nároku 1 pro přípravu farmaceutik pro léčbu nebo prevenci infekcí virem lidské imunodeficiency (HIV).

10. Polyanion obecného vzorce I, kde v tomto vzorci je C sarkosin a D je N-methyl-gamma-hydroxyleucin.

11. Polyanion 4-(gamma-hydroxy)-N-methyllleucin-cyklosporinu.

JUDr. Petr KALENSKY
advokát



SPOLEČNÁ ADVOKÁTNÍ KANCELÁŘ
VŠETEČKA ZELENÝ ŠVORČÍK KALENSKÝ
A PARTNEŘI
120 00 Praha 2, Hájkova 2
Česká republika