

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 944187 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **944187**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07K 5/02

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **12.03.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **12.09.1994**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **12.09.1994**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **12.03.1993 PCT/CA1993/000095**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

12.03.1992 US 849918

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Boehringer Ingelheim (Canada) Ltd., 2100 Cunard, Laval Quebec H7S 2G5, Canada, KANADA, (CA)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Bealieu, Pierre-Louis, Canada, KANADA, (CA)

2 •Deziel, Robert, Canada, KANADA, (CA)

3 •Moss, Neil, Canada, KANADA, (CA)

4 •Plante, Raymond, Canada, KANADA, (CA)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Leitzinger Oy, High Tech Center, Tammasaarenkatu 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Isosteeriset antiherpespeptidijohdannaiset

Isoteriska antiherpestidderivat

Isosteeriset antiherpespeptidijohdannaiset. - Isosteriska antiherpespeptidderivat.

Keksintö koskee peptidijohdannaisia, joilla on antiviraalisia ominaisuuksia, ja tapoja johdannaisten käyttämiseksi virusinfektioiden hoitamiseksi. Erityisemmin keksintö koskee peptidijohdannaisia (kutsutaan tämän jälkeen "peptideiksi"), joilla on aktiivisuutta herpesviruksia vastaan, peptidejä sisältäviä farmaseuttiset koostumuksia, ja menetelmiä peptidien käyttämiseksi estämään herpesviruksen replikoitumista, ja herpesinfektioiden hoitoon.

Herpesvirukset aiheuttavat ihmisille ja eläimille suuren joukon sairauksia. Esimerkiksi; herpes simplex-virukset, tyypit 1 ja 2 (HSV-1 ja HSV-2), ovat vastuussa huulirokahtumista ja sukuelinten haavaumista, vastaavasti; varicella zoster -virus (VZV) aiheuttaa vesirokkoa ja vyöruusua; ja Epstein-Barr -virus (EBV) aiheuttaa mononukleoosia.

Viimeisten kahden vuosikymmenen aikana yhdisteiden luokka, joka tunnetaan puriini- ja pyrimidiininukleosidianalogeina, on saanut osakseen paljon tutkijoiden huomiota etsittäessä uusia terapeuttisia aineita herpesvirusinfektioiden hoitoon. Tuloksena on kehitetty useita nukleosidianalogeja antiviraalisiksi aineiksi. Menestyksekkäin tähän mennessä on asikloviiri, joka on paras aine sukuelinten herpes simplex -infektioiden hoitoon.

Kuitenkin joistain merkittävistä edistysaskelista huolimatta on olemassa tarvetta tehokkaille, turvallisille terapeuttisille aineille herpesvirusinfektioiden hoitamiseksi. Katsausta varten nykyisistä tämän alan terapeuttisista aineista katso M.C. Nahata, "Antiviral Drugs: Pharmacokinetics, Adverse Effects and Therapeutic Use", J. Pharm. Technol., 3, 100 (1987).

Tässä patenttihakemuksessa kuvataan ryhmä peptidijohdannaisia, joilla on herpesvirusten vastaista aktiivisuutta. Näiden

peptidien selektiivinen vaikutus herpesviruksia vastaan, yhdistettynä laajan turvallisuusmarginaalin kanssa, tekee peptidit haluttaviksi aineiksi herpesinfektioiden vastustamisessa.

Seuraavissa viitteissä kuvataan peptidejä tai peptidijohdannaisia, jotka on yhdistetty antiherpesaktiivisuuden kanssa:

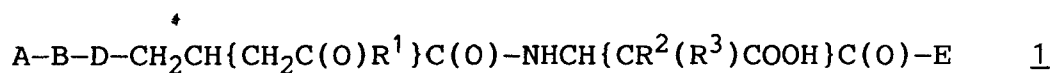
- B.M. Dutia et al., *Nature*, 321, 439 (1986),
 E.A. Cohen et al., *Nature*, 321, 441 (1986),
 J.H. Subak-Sharpe et al., GB-patenttihakemus 2185024, julkaistu 8. heinäkuuta 1987,
 P. Gaudreau et al., *J. Biol. Chem.*, 262, 12413 (1987),
 E.A. Cohen et al., US-patenttijulkaisu 4,795,740, 3. tammikuuta 1989,
 R. Freidinger et al., US-patenttijulkaisu 4,814,432, 21. maaliskuuta 1989,
 V.M. Garskey et al., US-patenttijulkaisu 4,837,304, 6. kesäkuuta 1989,
 R. Colonno et al., US-patenttijulkaisu 4,845,195, 4. heinäkuuta 1989,
 P. Gaudreau et al., *J. Med. Chem.*, 33, 723 (1990),
 J. Adams et al., EP-patenttihakemus 408,973, julkaistu 23. tammikuuta 1991,
 P.L. Beaulieu et al., EP-patenttihakemus 411,332, julkaistu 6. helmikuuta 1991,
 J. Adams et al., EP-patenttihakemus 411,333, julkaistu 6. helmikuuta 1991,
 J. Adams et al., EP-patenttihakemus 411,334, julkaistu 6. helmikuuta 1991,
 R.L. Tolman et al., EP-patenttihakemus 412, 595, julkaistu 13. helmikuuta 1991,
 W.T. Ashton et al., EP-patenttihakemus 438,873, julkaistu 31. heinäkuuta 1991,
 P.L. Beaulieu et al., EP-patenttihakemus 461,546, julkaistu 18. joulukuuta 1991, ja
 P. Gaudreau et al., *J. Med. Chem.*, 35, 346 (1992).

Aikaisempien kuvauksien kohdepeptidit voidaan erottaa tämän patenttihakemuksen peptideistä tunnusomaisilla rakenteellisilla ja biologisilla eroilla.

Eräs mainitsemisen arvoinen rakenteellinen ominaispiirre, joka erottaa keksinnön mukaiset peptidit tavallisesta peptidistä on, että ne sisältävät sisäisesti sijaitsevan amidiryhmän sijasta ketometyleeniryhmän. Siten keksinnön mukaisia peptidejä voidaan pitää ketometyleeni-isosteereinä.

Tässä käytetyt lyhenteet ja symbolit määritellään tämän patenttihakemuksen "Keksinnön yksityiskohdat" -kappaleessa.

Keksinnön mukaiset peptidit ovat kaavan 1 mukaisia



jossa

A on fenyyli(alempi)alkanoyyli; fenyyli(alempi)alkanoyyli, joka on monosubstituoitu aromaattiseen osaan alemmalla alkyyllillä, aminolla, halogeenillä, hydroksilla tai alemmalla alkoksilla; alempi alkanoyyli, joka on substituoitu fenyyllillä tai monosubstituoidulla fenyyllillä, jolloin monosubstituentti on alempi alkyyli, halogeeni, hydroksi tai alempi alkoksi; tai {fenyyli(alempi)alkyyli}aminokarbonyyli; ja B on $N(CH_3)-CHR^4C(O)$, jossa R^4 on alempi alkyyli; tai

A ja B yhdessä otettuna muodostavat tyydyttyneen tai tyydyttymättömän alkylaminokarbonyylin, jolla on kaava $R^5-NH-C(O)$, jossa R^5 on (2-10C)-alkyyli, alempi sykloalkyyli, 1-(alempi alkyyli)-(alempi sykloalkyyli), 1-(2-propenyyli)-3-butenyyli, 1-metyyli-1-(2-propenyyli)-3-butenyyli tai 1-etyyli-1-(2-propenyyli)-3-butenyyli;

D on $NH-CHR^6C(O)$, jossa R^6 on alempi alkyyli tai alempi alkyyli, joka on monosubstituoitu karboksilla, hydroksilla, merkaptolla tai bentsyylioksilla;

R^1 on alempi alkyyli, alempi sykloalkyyli, 1-(alempi alkyyli)-(alempi sykloalkyyli), tai NR^7R^8 , jossa R^7 on vety tai alempi

alkyyli ja R^8 on alempi alkyyli, tai R^7 ja R^8 yhdessä typpi-
 atomin kanssa, johon ne ovat kiinnittyneet, muodostavat pyrroli-
 dinon, piperidinon, morfolinon tai 4-metyylipiperatsinon;
 R^2 on vety tai alempi alkyyli ja R^3 on alempi alkyyli, tai R^2 on
 vety ja R^3 on alempi alkenyyli tai fenyyli-(1-4C)alkyyli, tai R^2
 ja R^3 yhdessä hiiliatomin kanssa, johon ne ovat kiinnittyneet,
 muodostavat alemman sykloalkyylin; ja
 E on NHR^9 , jossa R^9 on (4-9C)alkyyli; alempi sykloalkyyli;
 alempi sykloalkyyli, joka on monosubstituoitu tai disubstituoitu
 alemmalla alkyyllillä tai (alempi alkyyli)-(alempi sykloal-
 kyyllillä); tai E on $NHNR^{10}R^{11}$, jossa R^{10} on vety tai alempi
 alkyyli ja R^{11} on (4-9C)alkyyli; tai E on $NHCH(R^{12})-Z$, jossa R^{12}
 on (4-9C)alkyyli, alempi sykloalkyyli tai (alempi sykloalkyy-
 li)-(alempi alkyyli) ja Z on CH_2OH , $C(O)OH$, $C(O)NH_2$ tai
 $C(O)OR^{13}$, jossa R^{13} on alempi alkyyli;
 tai niiden terapeuttisesti hyväksyttävää suolaa.

Eräs edullinen keksinnön mukaisten peptidien ryhmä on kaavan 1
 mukaiset peptidit, jossa A on fenyyli(alempi)alkanoyyli; (4-
 aminofenyyli)-(alempi)-alkanoyyli; (4-halogeenifenyyli)-(alem-
 pi)alkanoyyli, (4-hydroksifenyyli)-(alempi)alkanoyyli; (4-
 (alempi alkoksi)fenyyli)-(alempi)alkanoyyli; alempi alkanoyyli,
 joka on disubstituoitu fenyyllillä, 4-halogeenifenyyllillä tai 4-
 (alempi alkoksi)fenyyllillä; tai fenyyli(alempi)alkyyliamino-
 karbonyyli; ja B on (N-Me)Val, (N-Me)Ile tai (N-Me)Tbg; tai A
 ja B muodostavat yhdessä tyydyttyneen tai tyydyttymättömän
 alkyyliaminokarbonyylin, jolla on kaava $R^5-NH-C(O)$, jossa R^5 on
 tässä edellä määritelty; D on (S)-2-amino-3-hydroksi-3-metyy-
 livoihapon tai (R)-2-amino-3-merkpto-3-metyyllivoihapon amino-
 happotähde, tai aminohappotähde, joka on Val, Ile, Tbg tai β -
 EtNva, R^1 on alempi alkyyli, alempi sykloalkyyli, 1-(alempi
 alkyyli)-(alempi sykloalkyyli), NMe_2 , NEt_2 , pyrrolidino tai
 morfolino; R^2 ja R^3 ovat tässä edellä määritellyt; ja E on NHR^9 ,
 jossa R^9 on (4-9C)alkyyli; alempi sykloalkyyli; alempi syklo-
 alkyyli, joka on monosubstituoitu tai disubstituoitu alemmalla
 alkyyllillä; tai (alempi alkyyli)-(alempi sykloalkyyli); tai E
 on $NHNR^{10}R^{11}$, jossa R^{10} on vety, metyyli tai etyyli ja R^{11} on

(4-9C)alkyyli; tai E on $\text{NHCH}(\text{R}^{12})-\text{Z}$, jossa R^{12} on (4-9C)alkyyli tai (alempi sykloalkyyli)-metyyli ja Z on tässä edellä määriteltä; tai niiden terapeuttisesti hyväksyttävä suola.

Eräs edullisempi peptidien ryhmä on kaavan 1 mukaiset peptidit, jossa A on fenyyliasetyyli, fenyylipropionyyli, (4-aminofenyyli)propionyyli, (4-fluorofenyyli)propionyyli, (4-hydroksifenyyli)propionyyli, (4-metoksifenyyli)propionyyli, 2-(fenyylimetyyli)-3-fenyylipropionyyli, 2-((4-fluorifenyyli)metyyli)-3-(4-fluorifenyyli)propionyyli, 2-((4-metoksifenyyli)metyyli)-3-(4-metoksifenyyli)propionyyli tai bentsyyliaminokarbonyyli; B on (N-Me)-Val tai (N-Me)-Ile; D on Val, Ile tai Tbg; R^1 on 1-metyylietyyli, 1,1-dimetyylietyyli, 1-metyyllipropyyli, 1,1-dimetyyllipropyyli, 2,2-dimetyyllipropyyli, syklobutyli, syklopentyyli, sykloheksyyli, 1-metyylisyklopentyyli, NMe_2 , NEt_2 , pyrrolidino tai morfolino; R^2 on vety ja R^3 on metyyli, etyyli, 1-metyylietyyli, 1,1-dimetyylietyyli, propyyli, 2-propenyyli tai bentsyyli, ja hiiliatomilla, jossa R^2 ja R^3 ovat, on (R)-konfiguraatio, tai R^2 ja R^3 on kumpikin toisesta riippumatta metyyli tai etyyli, tai R^2 ja R^3 yhdessä hiiliatomin kanssa, johon ne ovat kiinnittyneet, muodostavat syklobutyylin, syklopentyylin tai sykloheksyylin; ja E on NHR^9 , jossa R^9 on 2-metyyllipropyyli, 2,2-dimetyyllipropyyli, 1(R),2,2-trimetyyllipropyyli, 1,1,2,2-tetrametyyllipropyyli, 1(R)-etyyli-2,2-dimetyyllipropyyli, 2-(R,S)-metyyllibutyli, 2,2-dimetyyllibutyli, 3,3-dimetyyllibutyli, 1(R),2,2-trimetyyllibutyli, 1(R),3,3-trimetyyllibutyli, 2-etyyllibutyli, 2,2-dietyyllibutyli, 2-etyyli-1(R)-metyyllibutyli, 2-etyyli-2-metyyllibutyli, 1(R)-etyyli-3,3-dimetyyllibutyli, 2,2-dimetyyllipentyyli, cis- tai trans-2-metyylisykloheksyyli, 2,2-dimetyylisykloheksyyli tai sykloheksyylimetyyli; tai E on $\text{NHN}^{\text{R}^{10}}\text{R}^{11}$, jossa R^{10} on vety, metyyli tai etyyli ja on 1,1-dimetyylietyyli; tai E on $\text{NHCH}(\text{R}^{12})-\text{Z}$, jossa hiiliatomilla, jossa R^{12} on, on (S)-konfiguraatio, R^{12} on 1,1-dimetyylietyyli, 1-metyyllipropyyli, 2-metyyllipropyyli, 2,2-dimetyyllipropyyli tai sykloheksyylimetyyli ja Z on CH_2OH , $\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ tai $\text{C}(\text{O})\text{OR}^{13}$, jossa R^{13} on metyyli, etyyli tai propyyli; tai niiden terapeuttisesti hyväksyttävää suolaa.

Eräs toinen edullisempi peptidien ryhmä ovat kaavan 1 mukaiset peptidit, jossa A ja B yhdessä muodostavat tyydyttyneen tai tyydyttymättömän alkylaminokarbonyylin, joka on butyyliamino-karbonyyli, 1-metyylietyyliaminokarbonyyli, 1-metyylipropyyliaminokarbonyyli, 1-etyylipropyyliaminokarbonyyli, 1,1-dimetyyllibutyliaminokarbonyyli, 1-etyyli-butyliaminokarbonyyli, 1-propyylibutyliaminokarbonyyli, 1-etyylipentyliaminokarbonyyli, 1-butyylipentyliaminokarbonyyli, 2-etyyllibutyliaminokarbonyyli, 2-etyylipentyliaminokarbonyyli, 1-metyyli-1-propyylibutyliaminokarbonyyli, 1-etyyli-1-propyylibutyliaminokarbonyyli, 1,1-dipropyylibutyliaminokarbonyyli, (1-propyyli-syklopentyyli)aminokarbonyyli, (1-propyyli-sykloheksyyli)-aminokarbonyyli, 1-(2-propenyyli)-3-butenyyliaminokarbonyyli, 1-metyyli-1-(2-propenyyli)-3-butenyyliaminokarbonyyli tai 1-etyyli-1-(2-propenyyli)-3-butenyyliaminokarbonyyli; ja D, R¹, R², R³ ja E ovat viimeisessä tilanteessa määritellyt; tai sen terapeuttisesti hyväksyttävä suola.

Eräs edullisin peptidien ryhmä ovat kaavan 1 mukaiset peptidit, jossa A on fenyylipropionyyli, 2-(fenyylimetyyli)-3-fenyyli-propionyyli tai bentsyyliaminokarbonyyli; B on (N-Me)Val; D on Tbg; R¹ on 1-metyylietyyli, 1,1-dimetyylietyyli, 1-metyylipropyyli, 1,1-dimetyylipropyyli, 2,2-dimetyylipropyyli, syklobutyyli, syklopentyyli, sykloheksyyli tai 1-metyylisyklopentyyli; R² on vety ja R³ on metyyli, etyyli, 1-metyylietyyli, propyyli tai bentsyyli, ja hiiliatomilla, jossa R² ja R³ ovat, on (R)-konfiguraatio, tai R² ja R³ ovat kumpikin toisesta riippumatta metyyli tai etyyli, tai R² ja R³ yhdessä hiiliatomin kanssa, johon ne ovat kiinnittyneet, muodostavat syklobutyylin, syklopentyylin tai sykloheksyylin; ja E on NHR⁹, jossa R⁹ on 2,2-dimetyylipropyyli, 1(R),2,2-trimetyylipropyyli, 1(R)-etyyli-2,2-dimetyylipropyyli, 2,2-dimetyyllibutyyli tai 1(R)-etyyli-3,3-dimetyyllibutyyli tai E on NHCH(R¹²)-Z, jossa hiiliatomilla, jossa R¹² on, on (S)-konfiguraatio, R¹² on 2,2-dimetyylipropyyli ja Z on CH₂OH, C(O)OH, C(O)NH₂ tai C(O)OR¹³, jossa R¹³ on metyyli, etyyli tai propyyli; tai niiden terapeuttisesti hyväksyttävää suolaa.

Eräs toinen edullisin peptidien ryhmä ovat kaavan 1 mukaiset peptidit, jossa A ja B yhdessä muodostavat tyydyttyneen tai tyydyttymättömän alkyyliaminokarbonyyliin, joka on 1-etyyli-propyyliaminokarbonyyli, 1-etyyllibutyliaminokarbonyyli, 1-propyylibutyliaminokarbonyyli, 2-etyyli-pentyyliaminokarbonyyli, 1-metyyli-1-propyylibutyliaminokarbonyyli, 1-etyyli-1-propyyliaminokarbonyyli, 1,1-dipropyylibutyliaminokarbonyyli, (1-propyylisyklopentyyli)-aminokarbonyyli, 1-(2-propenyli)-3-butenyyliaminokarbonyyli tai 1-etyyli-1-(2-propenyli)-3-butenyyliaminokarbonyyli; ja D, R¹, R², R³ ja E ovat viimeisessä tilanteessa määritellyt; tai niiden terapeuttisesti hyväksyttävää suolaa.

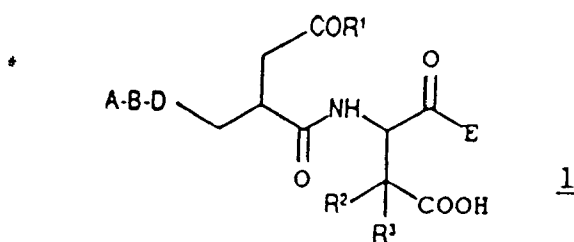
Keksinnön suoja-alaan kuuluu farmaseuttinen koostumus, joka sisältää herpesviruksen vastaisesti tehokas määrä kaavan 1 mukaista peptidiä, tai sen terapeuttisesti hyväksyttävää suolaa, ja farmaseuttisesti tai eläinlääketieteellisesti hyväksyttävää väliainetta.

Keksinnön suoja-alaan kuuluu myös kosmeettinen koostumus, joka sisältää kaavan 1 mukaista peptidiä, tai sen terapeuttisesti hyväksyttävää suolaa, ja fysiologisesti hyväksyttävää väliainetta, joka soveltuu paikalliseen antoon.

Keksinnön erääseen tärkeään näkökantaan liittyy menetelmä herpesvirusinfektion hoitaminen nisäkkäällä antamalla nisäkkäälle herpesviruksen vastaisesti tehokkaan määrän kaavan 1 mukaista peptidiä, tai sen terapeuttisesti hyväksyttävää suolaa.

Keksinnön erääseen toiseen tärkeään näkökantaan liittyy menetelmä herpesviruksen replikaation estämiseksi saattamalla viruksen kontaktiin herpesviruksen ribonukleotidireduktaasia estävän määrän kanssa kaavan 1 mukaista peptidiä tai sen terapeuttisesti hyväksyttävää suolaa.

Vaihtoehtoisesti kaava 1 voidaan kuvata seuraavasti:



Yleensä tässä aminohappojen ja suojaryhmien merkitsemiseen käytetyt lyhenteet perustuvat laitoksen the IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature suositukseen, katso julkaisua European Journal of Biochemistry 138, 9 (1984). Esimerkiksi, Val, Ile, Asp, ja Leu edustavat tähteitä L-valiini, L-isoleusiini, L-asparagiinihappoa ja L-leusiini, vastaavasti.

Asymmetrisillä hiiliatomeilla, jotka sijaitsevat kaavan 1 mukaisten peptidien lineaarisella pääakselilla (ts. rungolla), lukuun ottamatta pääteryhmiä A ja Z (ryhmän E), mutta mukaan lukien hiiliatomin, joka sisältää " $R^{12}:n$ " kun E on tässä

määritelty $\text{NHCH}(\text{R}^{12})-\text{Z}$, on S-konfiguraatio. Poikkeuksia esiintyy kuitenkin hiiliatomilla, jossa on $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}^1$ -sivuketju, jossa R^1 on alempi alkyyli, alempi sykloalkyyli tai 1-(alempi alkyyli)-(alempi sykloalkyyli), ja hiiliatomilla, jossa on 2-merkaptot-alkyylisivuketju tapauksessa, jossa D:n R^6 on viimeksi mainittu sivuketju. Viimeksi mainituilla kahdella poikkeuksella hiili-atomeilla on R-konfiguraatio.

Asymmetrisillä hiiliatomeilla, jotka sijaitsevat aminohapon tai johdetun aminohappotähteen sivuketjussa, pääteryhmässä A, ja pääteryhmässä E kun E on tässä määritelty NHR^9 , voi olla S- tai R-konfiguraatio.

Symbolit "Me", "Et", "Pr" ja "Bu" edustavat alkyyli-radikaaleja metyyli-, etyyli-, propyyli ja butyyli, vastaavasti.

Esimerkiksi symbolit " MeEt_2C " ja " EtPr_2C " edustavat radikaaleja 1-etyyli-1-metyylipropyyli ja 1-etyyli-1-propyylibutyyli, vastaavasti.

Symboli "Tbg" edustaa (S)-2-amino-3,3-dimetyyllivoihapon aminohappotähdettä. Symboli "Cpg" edustaa (S)- α -aminosyklopentaanietikkahapon aminohappotähdettä. Symboli " γMeLeu " edustaa (S)-2-amino-4,4-dimetyyllipentaanihapon aminohappotähdettä. Symboli " $\gamma\text{MeLeusinoli}$ " edustaa (S)-2-amino-4,4-dimetyyllipentanolia, josta on poistettu yksi vety α -aminoryhmästä. Symboli " $\beta\text{-EtNva}$ " edustaa (S)-2-amino-3-etyyllipentaanihapon aminohappotähdettä.

Muut tässä käytetyt symbolit ovat: (N-Me)Val tähteelle (S)-3-metyyli-2-(metyyliamino)-vohappo; (N-Me)Ile tähteelle (S)-3-metyyli-2-(metyyliamino)pentaanihappo; (N-Me)Tbg tähteelle (S)-2-(metyyliamino)-3,3-dimetyyllivohappo; Asp(cyBu) tähteelle (S)- α -amino-1-karboksisyklobutaanietikkahappo; Asp(cyPn) tähteelle (S)- α -amino-1-karboksisyklopentaanietikkahappo; Asp{(R)-Me} tähteelle 3-(R)-metyyli-L-asparagiinihappo (ts. $\{\text{S}-(\text{R}^*, \text{S}^*)\}$ -2-amino-3-metyyllibutaanidihappo), Asp{(R)-Pr} tähteelle 3-(R)-propyyli-L-asparagiinihappo (ts. $\{\text{S}-(\text{R}^*, \text{S}^*)\}$ -2-amino-3-propyyli-

butaanidihappo), ja Asp{(R)-allyyli} tähteelle 3-(R)-allyyli-L-asparagiinihappo (ts. {S-(R*,S*)}-2-amino-3-(2-propenyli)-butaanidihappo).

Käsite "halogeeni" tarkoittaa tässä käytettäessä halogeeniradikaalia, joka on bromi, kloori, fluori tai jodi.

Käsite "(2-10C)alkyyli" tarkoittaa tässä käytettäessä suoraketjuisia ja haaroittuneita alkyyli-radikaaleja, jotka sisältävät 2 - 10 hiiliatomia, ja niitä ovat mm. etyyli, butyyli, 1-metyyllipropyli, 1-etyyllipropyli, 1-propyylibutyyli, 2-propyyli-pentyli ja vastaavat.

Käsite "(4-9C)alkyyli" tarkoittaa tässä käytettäessä suoraketjuisia ja haaroittuneita alkyyli-radikaaleja, jotka sisältävät 4 - 9 hiiliatomia, ja niitä ovat esimerkiksi 1-metyyllipropyli, 2-metyyllipropyli, 2,2-dimetyyllipropyli, 1,2,2-trimetyyllipropyli, 3,3-dimetyyllibutyyli, 1-etyyli-2,2-dimetyyllibutyyli ja 4,4-dimetyyllipentyli.

Käsite "alempi alkyyli" tässä käytettäessä, joko yksinään tai yhdistelmänä toisen radikaalin kanssa tarkoittaa suoraketjuisia alkyyli-radikaaleja, jotka sisältävät 1 - 6 hiiliatomia, ja haaroittuneita alkyyli-radikaaleja, jotka sisältävät 3 - 6 hiiliatomia, ja niitä ovat mm. metyyli, etyyli, propyyli, butyyli, heksyyli, 1-metyylietyyli, 1-metyyllipropyli, 2-metyyllipropyli ja 1,1-dimetyylietyyli.

Käsite "1-(alempi alkyyli)-(alempi sykloalkyyli)" tässä käytettäessä tarkoittaa alempaa sykloalkyyli-radikaalia, jossa on 1-asemassa substituenttina alempi alkyyli; esimerkiksi 1-etyyli-syklopropyyli, 1-propyyli-syklopentyli ja 1-propyyli-sykloheksyyli.

Käsite "alempi sykloalkyyli" tässä käytettäessä, joko yksinään tai yhdistelmänä toisen radikaalin kanssa, tarkoittaa tyydyttyneitä syklisiä hiilivetyradikaaleja, jotka sisältävät 3 - 6

hiiliatomia, ja niitä ovat mm. syklopropyyli, syklobutyyli, syklopentyyli ja sykloheksyyli.

Käsite "alempi alkenyyli" tässä käytettäessä tarkoittaa suoraketjuisia alkenyyli-*radikaaleja*, jotka sisältävä 2 - 6 hiiliatomia, ja haarautuneita alkenyyli-*radikaaleja*, jotka sisältävät 3 - 6 hiiliatomia, ja niitä ovat mm. vinyyli, 1-propenyyli, 2-propenyyli, 1-metyyli-etenyyli, 2-metyyli-1-propenyyli, 2-metyyli-2-propenyyli ja 2-butenyyli.

Käsite "alempi alkoksi" tässä tarkoitettaessa tarkoittaa suoraketjuisia alkoksiradikaaleja, jotka sisältävät 1 - 4 hiiliatomia, ja haaroittuneet alkoksiradikaalit, joissa on 3 - 4 hiiliatomia ja niitä ovat mm. metoksi, etoksi, propoksi, 1-metyylietoksi, butoksi ja 1,1-dimetyylietoksi. Viimeksi mainittu radikaali tunnetaan yleisesti nimellä tert-butoksi.

Käsite "fenyyli-(1-4C)alkyyli" tässä käytettäessä tarkoittaa fenyylialkyyli-*radikaaleja*, joiden alkyyliosaa on suoraketjuinen tai haaroittunut alkyyli, joka sisältää 1 - 4 hiiliatomia, ja ne ovat mm. bentsyyli, 2-fenyylietyyli, 3-fenyylipropyyli, 2-metyyli-2-fenyylietyyli ($\text{PhCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$), 1-etyyli-2-fenyylietyyli ($\text{PhCH}_2\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)$) ja vastaavat.

Käsite "alempi alkanoyyli" tässä käytettäessä, joko yksinään tai yhdistelmänä toisen radikaalin kanssa, tarkoittaa 1-oksoalkyyli-*radikaalia*, jonka 1-oksoalkyyliosaa on suoraketjuinen tai haaroittunut 1-oksoalkyyli, jossa on 2 - 6 hiiliatomia; esimerkiksi asetyyli, propionyyli (1-oksopropyyli) ja 1-okso-5-metyyliheksyyli.

Käsite "farmaseuttisesti hyväksyttävä väliaine" tai "eläinlääketieteellisesti hyväksyttävä väliaine" tässä käytettäessä tarkoittaa aktiivisen valmistusaineen ei-toksista, yleensä inerttiä väliainetta, joka ei vaikuta valmistusaineeseen haitallisesti.

Käsite "fysiologisesti hyväksyttävä väliaine" tässä käytettäessä tarkoittaa hyväksyttävää kosmeettista väliainetta yhdestä tai useasta ei-toksisesta täyteaineesta, jotka eivät reagoi sen sisältämän aktiivisen valmistusaineen kanssa tai vähennä sen tehokkuutta.

Käsite "eläinlääketieteellisesti hyväksyttävä väliaine" tässä käytettäessä tarkoittaa kotieläimille lääkeaineiden antoon tarkoitettua fysiologisesti hyväksyttävää vehiikkeliä, joka sisältää yhtä tai useaa ei-toksista farmaseuttisesti hyväksyttävä täyteainetta, jotka eivät reagoi lääkeaineen kanssa tai vähennä sen tehokkuutta.

Käsite "tehokas määrä" tarkoittaa ennalta määrättyä antiviraalisen aineen antiviraalista määrää, ts. aineen määrää, joka on riittävä ollakseen tehokas virusorganismeja vastaan in vivo.

Käsite "liittämisreagenssi" tässä käytettäessä tarkoittaa ainetta, joka pystyy aikaansaamaan aminohapon tai peptidin vapaan karboksiryhmän vedenpoistolla tapahtuvan liittämisen toisen aminohapon tai peptidin vapaan aminoryhmän kanssa muodostamaan reaktanttien välille amidisidokseni. Samalla lailla tällaiset aineet voivat aikaansaada hapon ja alkoholin liittymisen vastaavien esterien muodostamiseksi. Aineet edistävät tai helpottavat vedenpoistolla tapahtuvaa liittymistä aktivoimalla karboksiryhmän. Kuvauksia sellaisista liittämisreagensseista ja aktivoituista ryhmistä sisältyy peptidikemian yleisiin oppikirjoihin; esimerkiksi E. Schröder ja K.L. Lübke, "The Peptides", vol. 1, Academic Press, New York, N.Y., 1965, s. 2-128, ja K.D. Kopple, "Peptides and Amino acids", W.A. Benjamin, Inc., New York, N.Y., 1966, s. 33-51. Esimerkkejä liittämisreagensseista ovat difenyyllifosforyyliatsidi, 1,1'-karbonyyliidi-imidatsoli, disykloheksyylikarbodi-imidi, N-hydroksisukkinimidi tai 1-hydroksibentsotriatsoli disykloheksyylikarbodi-imidin läsnä ollessa. Eräs hyvin käytännöllinen ja käyttökelpoinen liittämisreagenssi on (bentsotriatsol-1-yylioksi)tris-(dimetyyliamino)-fosfoniumheksafluorifosfaatti, joka kuvataan julkaisussa B.

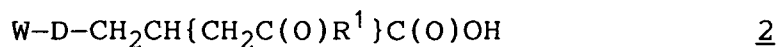
Castro et al., Tetrahedron Letters, 1219 (1975), katso myös D. Hudson, J. Org. Chem., 53, 617 (1988), joko yksinään tai 1-hyd-roksibentsotriatsolin läsnä ollessa. Edelleen toinen hyvin käyttökelpoinen ja käytännöllinen liittämisreagenssi on kaupallisesti saatava 2-(1H-bentsotriatsol-1-yyli)-N,N,N',N'-tetrametyyliuroniumtetrafluoriboraatti.

Prosessi

Kaavan 1 mukaiset peptidit voidaan valmistaa prosessilla, joka sisältää menetelmät, joita tavallisesti käytetään peptidisyn-teesissä, kuten aminohappotähteiden ja/tai peptidifragmenttien klassista liuosliitosta. Sellaiset menetelmät kuvaavat esimerkiksi E. Schröder ja K. Lübke, mainittu yllä, oppikirjasarjoissa, "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", E. Gross et al., toimittajat, Academic Press, New York, N.Y., 1979-1987, vol. 1 - 8, ja J.M. Stewart ja J.D. Young teoksessa "Solid Phase Peptide Synthesis", 2. painos, Pierce Chem. Co., Rockford, IL, USA, 1984.

Edellä mainittujen peptidejä varten tarkoitettujen prosessien eräs yhteinen ominaispiirre on eri aminohappotähteiden tai johdettujen aminohappotähteiden (tai, vaadittaessa, peptidin ei-peptidifragmenttien) reaktiivisten sivvuketjuryhmien suojaaminen sopivalla suojaryhmällä, jotka estävät kemiallisen reaktion tapahtumisen siinä paikassa, kunnes suojaryhmä lopulta poistetaan. Myös yhteinen on aminohapossa tai fragmentissa olevan α -aminoryhmän suojaus samalla kun tämä kokonaisuus reagoi karboksiryhmässä, minkä jälkeen α -aminosuojaryhmä poistetaan selektiivisesti sallimaan seuraavan reaktion tapahtumisen tuossa paikassa. Eräs toinen yhteinen ominaispiirre on aminohappotähteen tai peptidifragmentin C-terminaalisen karboksyylin alkusuojaus, mikäli sellainen on läsnä, josta on määrä tulla peptidin C-terminaalinen funktio, sopivalla suojaryhmällä, joka estää kemiallisen reaktion tapahtumisen tuossa paikassa kunnes suojaryhmä poistetaan sen jälkeen kun haluttu peptidisekvenssi on koottu.

Kaavan 1 mukaisten peptidien eräs avainvälituote on kaavan 2 mukainen välituote



jossa W on α -aminosuojaryhmä, esimerkiksi tert-butyylisoksykarbonyyli (Boc), bentsyylioksikarbonyyli (Z) tai fluoren-9-yylihetoksikarbonyyli (Fmoc), ja D ja R^1 ovat tässä määritellyt. Yhdiste voidaan valmistaa kaavan $\text{W-D-CH}_2\text{C(O)OCH}_2\text{CH=CH}_2$ mukaisen allyyliesterin Michael-additiolla kaavan (alempi alkyylis)-OC(O)CH=CHC(O) R^1 mukaiseen fumaroyylijohtannaiseen, jolloin saadaan Michael-additiotuote, jolla on kaava $\text{W-D-CH}\{\text{C(O)OCH}_2\text{CH=CH}_2\}\text{CH}\{\text{CH}_2\text{C(O)R}^1\}\text{C(O)O-}$ (alempi alkyylis).

Käsittelmällä tämän jälkeen viimeksi mainitun yhdisteen tetra-kistrifenyylifosfiinipalladiumilla ja trifenyylifosfiinilla pyrrolidiinin läsnä ollessa, menetelmällä, jonka on kuvannut R. Déziel, Tetrahedron Letters, 28, 4371 (1987), aikaansaadaan allyyliesterin hydrolyysi ja seuraava dekarboksyloituminen, jolloin saadaan avainvälituotteen vastaava alkyylisesteri. Viimeksi mainitun esterin hydrolyysi emäksen, esimerkiksi natriumhydroksidin tai litiumhydroksidin läsnä ollessa saadaan avainvälituote diastereoisomeeriseoksena.

Vaihtoehtoisesti kaavan 2 mukainen avainvälituote, jossa W ja D ovat viimeisessä tapauksessa määritellyt ja R^1 on NR^7R^8 , jossa R^7 ja R^8 ovat kumpikin alempi alkyylis tai R^7 ja R^8 yhdessä typpi-atomin kanssa, johon ne ovat kiinnittyneet, muodostavat pyrrolidinon, piperidinon, morfolinin tai 4-metyylipiperatsinon, voidaan valmistaa seuraavasti: Edellä mainittu kaavan $\text{W-D-CH}_2\text{C(O)OCH}_2\text{CH=CH}_2$ mukainen allyyliesteri, jossa W ja D ovat tässä määritellyt, saatetaan reagoimaan Michael-reaktion olosuhteissa fumaroyylijohtannaisen kanssa, jolla on kaava $\text{BzLOC(O)CH=CHC(O)OBzl}$ {(E)-2-buteenidihappodibentsyyliesteri}, jolloin saadaan kaavan $\text{W-D-(RS)-CH}\{\text{CH}\{\text{C(O)OBzl}\}\text{CH}_2\text{C(O)-OBzl}\}\text{C(O)-OCH}_2\text{CH=CH}_2$ mukainen vastaava Michael-additiotuote.

Viimeksi mainitun adduktin käsittelyllä tetrakistrifenyyli-fosfiinipalladiumilla ja trifenyylifosfiinilla pyrrolidiinin läsnä ollessa (Déziel, katso yllä) saadaan kaavan $W-D-CH_2-(R,S)-CH\{CH_2C(O)OBzl\}C(O)OBzl$ mukainen vastaava dibentsyyliesteri. Seuraavalla hydrogenolyysillä palladiumhydroksidi/C:n läsnä ollessa saadaan vastaava dikarboksyylihappo, joka muutetaan vastaavaksi anhydridiksi kuumentamalla ylimäärässä etikkahappoanhydridiä. Anhydridin reaktiolla sopivan sekundaarisen amiinin kanssa pyridiinin läsnä ollessa saadaan regioisomeerien seos, jossa vallitsevana on kaavan $W-D-CH_2-(RS)-CH\{CH_2C(O)NR^7R^8\}C(O)-OH$ mukainen haluttu isomeeri, jossa W, D ja NR^7R^8 ovat tässä määritellyt. Viimeksi mainittu tuote muutetaan bentsyyliesterikseen, ja tulokseksi saatu regioisomeerien seos erotetaan HPLC:llä (high performance liquid chromatography), jolloin saadaan haluttu isomeeri vallitsevana tuotteena. Viimeksi mainitun tuotteen seuraavalla hydrogenoinnilla palladiumhydroksidi/C:n läsnä ollessa saadaan kaavan 2 mukainen avainvälituote, jossa W ja D ovat tässä määritellyt ja R^1 on tässä määritelty NR^7R^8 .

Yleensä kaavan 1 mukainen peptidi voidaan sen vuoksi valmistaa vaiheittain tapahtuvalla liittämällä, peptidin tai johdettujen aminohappotähteiden ja peptidin ei-peptidifragmenttien (kuten avainvälituotteiden), jotka ovat vaadittaessa sopivasti suojattuja, sekvenssin järjestyksessä ja poistetaan kaikki suojaryhmät, mikäli niitä on läsnä, vaiheittain tapahtuvan liittämisen lopussa, jolloin saadaan kaavan 1 mukainen peptidi. Yksityiskohtaisempia prosesseja kuvataan esimerkeissä tämän jälkeen.

Keksinnön kaavan 1 mukainen peptidi voidaan saada terapeuttisesti hyväksyttävän suolan muodossa. Tapauksessa, jossa erityisessä peptidissä on tähde, joka toimii emäksenä, esimerkkejä sellaisista emäksen suoloista ovat suolat orgaanisten happojen kanssa, esimerkiksi etikka-, maito-, meripihka-, metaanisulfoni- tai p-tolueenisulfonihappo, samoin kuin polymeeristen happojen kuten tanniinihapon tai karboksimeetyyliselluloosan, ja

myös suolat epäorgaanisten happojen kanssa, kuten vetyhalogenidihappojen, esimerkiksi suojahapon, tai rikkihapon tai fosforihapon. Haluttaessa erityinen happoadtiosuola muutetaan toiseksi happoadditiosuolaksi, kuten ei-toksiseksi, farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi, käsittelemällä sopivalla ioninvaihtohartsilla tavalla, jonka on kuvannut R.A. Boissonnas et al., *Helv. Chim. Acta*, 43, 1849 (1960).

Tapauksessa, jossa erityisessä peptidissä on yksi tai useita vapaita karboksiryhmiä, esimerkiksi sellaisista karboksiryhmän suoloista ovat suolat natrium-, kalium- tai kalsiumkationien kanssa, tai orgaanisten emästen, esimerkiksi trietyyliamiinin tai N-metyylimorfoliinin kanssa.

Herpeksenvastainen aktiivisuus

Kaavan 1 mukaisten peptidien antiviraalinen aktiivisuus voidaan osoittaa biokemiallisilla, mikrobiologisilla ja biologisilla menettelytavoilla, jotka osoittavat yhdisteiden estovaikutuksen herpes simplex -virusten, tyyppien 1 ja 2 (HSV-1 ja HSV-2), ja muiden herpesvirusten, esimerkiksi, varicella zoster -viruksen (VZV) ja Epstein-Barr -viruksen (EBV) replikaatioon.

Tämän jälkeen olevissa esimerkeissä esitetään kaavan 1 mukaisten esimerkinomaisten peptidien estovaikutus herpesribonukleotidireduktaasiin. Merkittävää herpesribonukleotidireduktaasin tämän spesifisen eston yhteydessä on peptidien suhteellisen minimaalinen vaikutus tai sellaisen vaikutuksen puute solun ribonukleotidireduktaasiaktiivisuuteen, jota vaaditaan normaaliin solureplikaatioon.

Erää tapa osoittaa kaavan 1 mukaisten peptidien estovaikutus viraaliseen replikaatioon on solukasvatustekniikka; katso esimerkiksi T. Spector et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 4254 (1985).

Peptidien terapeuttinen teho voidaan osoittaa laboratorioeläimillä, esimerkiksi käyttämällä määritystä, joka perustuu herpes simplex -viruksen aiheuttaman silmänsairauden hiirimallia viruslääketestaukseen, jonka on kuvannut C.R. Brandt et al., J. Virol. Meth., 36, 209 (1992).

Kun keksinnön mukaista peptidiä tai yhtä sen terapeuttisesti hyväksyttävistä suoloista käytetään viruslääkkeenä, sitä annetaan paikallisesti tai systeemisesti lämminverisille eläimille, esimerkiksi ihmisille, sioille tai hevosille väliaineessa, joka sisältää yhtä tai useaa farmaseuttisesti hyväksyttävää väliainetta, jonka osuuden määrää peptidin liukoisuus ja kemiallinen luonne, valittu antotapa ja biologinen standardikäytäntö. Paikalliseen antoon peptidi voidaan formuloida farmaseuttisesti hyväksyttäviin väliaineisiin, jotka sisältävät 0,1 - 5 %, edullisesti 0,5 - 2 %, aktiivista ainetta. Sellaiset formulaatiot voivat olla liuoksen, voiteen tai pesunesteen muodossa.

Systeemiseen antoon kaavan 1 mukainen peptidi annetaan joko laskimonsisäisellä, ihonalaisella tai lihaksensisäisellä injektioilla, koostumuksissa farmaseuttisesti hyväksyttävien vehiikkeleiden tai väliaineiden kanssa. Injektioilla antoon on edullista käyttää peptidiä steriilin vesipohjaisen vehiikkelin liuoksessa, joka voi sisältää myös muita liuenneita aineita, kuten puskureita tai säilöntäaineita, samoin kuin riittävät määrät farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja tai glukoosia liuoksen tekemiseksi isotooniseksi.

Sopivia vehiikkeleitä tai väliaineita edellä mainittuja formulaatioita varten kuvataan farmaseuttisissa standarditeksteissä, esimerkiksi teoksessa "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18. painos, Mack Publishing Company, Easton, Penn., 1990.

Peptidin annostelu vaihtelee antomuodon ja erityisen valitun aktiivisen aineen mukaan. Lisäksi se vaihtelee erityisen hoidettavan isännän mukaan. Yleensä hoito aloitetaan määrien pienin lisäyksin kunnes saavutetaan olosuhteissa optimaalinen

vaikutus. Yleensä peptidiä annetaan toivottavimmin konsentraatiotasolla, jotka yleisesti antavat viruksenvastaisesti tehokkaat tulokset aiheuttamatta mitään haitallisia tai turmiollisia sivuvaikutuksia.

Paikallisen käytön suhteen peptidi annetaan iholle sopivassa paikallisesti käytettävässä formulaatiossa kehon infektoidulle alueelle, esimerkiksi iholle suuontelon tai sukuelinten onteloon, riittävän määrän infektoidun alueen peittämiseksi. Käsitely olisi toistettava esimerkiksi joka 4. - 6. tunti kunnes haavauma paranee.

Systeemisen annon suhteen kaavan 1 mukaista peptidiä annetaan annostelu 10 - 500 µg/kg kehonpainoa/päivä, vaikka edellä mainittuja vaihteluita esiintyy. Toivottavimmin käytetään kuitenkin annostelutasoa alueella noin 10 - 200 µg/kg kehonpainoa/päivä tehokkaiden tulosten saavuttamiseksi.

Keksinnön eräs toinen näkökanta käsittää kosmeettisen koostumuksen, joka sisältää herpesvirusta ennaltaestävän määrän kaavan 1 mukaista peptidiä, tai sen terapeuttisesti hyväksyttävää suolaa, yhdessä fysiologisesti hyväksyttävän kosmeettisen väliaineen kanssa. Formulaatioon voidaan sisällyttää muita komponentteja, esimerkiksi ihonpehmentysaineita. Keksinnön mukaista kosmeettista formulaatiota käytetään profylaktisesti estämään ihon herpeettisten haavaumien ilmaantuminen. Formulaatiota voidaan lisätä ihon alttiille alueille öisin. Yleensä kosmeettinen koostumus sisältää vähemmän peptidiä kuin vastaavat paikalliseen käyttöön tarkoitetut farmaseuttiset koostumukset. Eräs edullinen peptidin määrän alue kosmeettisessa koostumuksessa on 0,01 - 0,2 paino-%.

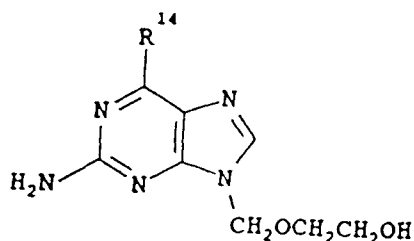
Vaikka tässä yllä kuvattujen formulaatioiden esitetään olevan tehokkaita ja suhteellisen turvallisia lääkityksiä herpesvirusinfektioiden hoitoon, ei suljeta pois näiden formulaatioiden mahdollista samanaikaista antoa muiden antiviraalisten lääkitysten tai aineiden kanssa edullisten tulosten saamiseksi.

Tällaisia muita antiviraalisia lääkityksiä tai aineita ovat mm. antiviraaliset nukleosidit, esimerkiksi asikloviiri, ja antiviraaliset pinta-aktiiviset aineet tai antiviraaliset interferonit, kuten ne, jotka kuvataan US-patenttijulkaisussa 4,507,281, S.S. Asculai ja F. Rapp, 26. maaliskuuta 1985.

Erityisemmin liittyen herpesvirusinfektioiden hoitoon samanaikaisella annolla on keksitty, että antiviraalisen nukleosidianalogin antiherpesaktiivisuutta voidaan lisätä synergistisesti, ilman samanaikaista toksisten vaikutusten lisääntymistä, yhdistämällä sen kaavan 1 mukaisen peptidin kanssa. Niinpä täten annetaan käyttöön farmaseuttinen koostumus herpesinfektioiden hoitamiseksi nisäkkäällä, joka sisältää farmaseuttisesti tai eläinlääketieteellisesti hyväksyttävää väliainetta, ja tehokkaan määrän antiviraalisen nukleosidianalogin tai sen terapeuttisesti hyväksyttävän suolan ja kaavan 1 mukaisen, ribonukleotidireduktaasia estävän peptidin tai sen terapeuttisesti hyväksyttävän suolan yhdistelmää.

Täten aikaansaadaan myös menetelmä herpesvirusinfektioiden hoitamiseksi nisäkkäällä. Menetelmässä misäkkäälle annetaan herpesviruksen vastaisesti tehokas määrä kaavan 1 mukaisen yhdisteen tai sen terapeuttisesti hyväksyttävän suolan ja antiviraalisen nukleosidianalogin tai sen terapeuttisesti hyväksyttävän suolan yhdistelmää.

Yhdistelmässä käytetty antiviraalinen nukleosidianalogi on sellainen, joka on entsymaattisesti muutettavissa (in vivo) herpes-DNA-polymeraasin viraalisen DNA-polymeraasin estäjäksi ja/tai vaihtoehtoiseksi herpes-DNA-polymeraasin substraatiksi. Antiviraalinen nukleosidianalog voi olla tunnettuja nukleosidianalogeja. Edullisia keksinnön mukaisia nukleosidianalogeja ovat mm. asikloviiri ja sen analogit; esimerkiksi kaavan 2 mukaiset yhdisteet

2

jossa R^{14} on vety, hydroksi tai amino, tai niiden terapeuttisesti hyväksyttävä suola. (Kaavan 2 mukainen yhdiste, jossa R^{14} on hydroksi, on asikloviiri.)

Muita edullisia keksinnön mukaisesti käytettäviä antiviraalisia nukleosidianalogeja ovat mm. vidarabiini, idoksuridiini, trifluriidiini, gansikloviiri, edoksudiini, brovaviiri, fiasitabiini, pensikloviiri, famsikloviiri ja rosikloviiri.

Käsite "synergistinen vaikutus" käytettäessä suhteessa nukleosidianalogin ja kaavan 1 mukaisen peptidin edellä määritellyn yhdistelmän antiviraaliseen - tai antiherpesaktiivisuuteen tarkoittaa antiviraalista - tai antiherpesvaikutusta, joka on suurempi kuin yhdistelmän kahden yksittäisen komponentin ennustettavissa oleva additiivinen vaikutus.

Keksinnön mukaista yhdistelmää herpesinfektioiden hoitoon käytettäessä yhdistelmää annetaan lämmiverisille eläimille, esimerkiksi ihmisille, sioille tai hevosille, vehiikkelissä, joka sisältää yhtä tai useaa farmaseuttisesti hyväksyttävää väliainetta, jonka osuuden määrää nukleosidianalogin ja kaavan 1 mukaisen peptidin liukoisuus ja kemiallinen luonne, valittu antoreitti, biologinen standardikäytäntö, ja kahden aktiivisen valmistusaineen suhteelliset määrät synergistisen antiviraalisen vaikutuksen aikaansaamiseksi. Edullisesti yhdistelmää annetaan paikallisesti. Kaksi aktiivista ainetta (ts. antiviraalinen nukleosidianalogi ja kaavan 1 mukainen peptidi, tai niiden terapeuttisesti hyväksyttävät suolat) voidaan formuloida esimerkiksi liuosten, emulsioiden, voiteiden tai pesunesteiden

muotoon farmaseuttisesti hyväksyttäviin vehiikkeleihin. Sellainen formulaatio voi sisältää 0,01 - 1,0 paino-% nukleosidi-analogia tai sen terapeuttisesti hyväksyttävää suolaa, ja noin 0,05 - 1 paino-% kaavan 1 mukaista peptidiä, tai sen terapeuttisesti hyväksyttävää suolaa.

Joka tapauksessa kahta aktiivista ainetta on farmaseuttisessa koostumuksessa läsnä määrät, jotka aikaansaavat synergistisen antiherpesvaikutuksen.

Seuraavat esimerkit kuvaavat keksintöä edelleen. Lämpötilat esitetään yksikössä °C. Liuosten %-osuudet tai suhteet ovat tilavuus/tilavuus-suhteessa, ellei muuta mainita. NMR-spektrit rekisteröitiin Bruker 200 MHz- tai 400 MHz-spektrometrillä (jolloin, 400 MHz-spektri on mainitaan alussa); kemialliset siirtymät (δ) esitetään yksikössä ppm (parts per million). Esimerkeissä käytettyjä lyhenteitä ovat mm. Boc: tert-butyylioksikarbonyyli; Bu: butyyli; Bzl: bentsyyli; DMF: dimetyylliformamidi; Et: etyyli; EtOH: etanoli; EtOAc: etyyliasetaatti; Et:O: dietyylieetteri; Me: metyyli; MeOH: metanoli; Pr: propyyli; TLC: ohutlevykromatografia; THF: tetrahydrofuraani.

Esimerkki 1

Liittämisreaktioiden yleinen menettelytapa

{Katso myös R. Knorr et al., Tetrahedron Letters, 30, 1927 (1989).}

Ensimmäinen reaktantti, ts. vapaa amiini (tai sen hydrokloridisuola), liuotetaan CH_2Cl_2 :een tai asetonitriiliin, ja liuos jäädytetään 4°C:seen. Sekoitettuun liuokseen lisätään typpi-kehässä 4 ekvivalenttia N-metyylimorfoliinia. 20 minuutin kuluttua lisätään 1 ekvivalentti toista reaktanttia, ts. vapaata karboksyylihappoa, ja 1,05 ekvivalenttia liittämisreagenssia. (Käytännöllisiä ja tehokkaita liittämisreagensseja tähän tarkoitukseen ovat (bentsotriatsol-1-yylioksi)tris-(dime-

tyyliamino)fosfoniumheksafluorifosfaatti tai edullisesti 2-(1H-bentsotriatsol-1-yyli)-N,N,N',N'-tetrametyyliuroniumtetrafluoriboraatti. Reaktiota tarkkaillaan TLC:llä. Reaktion edettyä loppuun CH_2Cl_2 (tai asetonitriili) haihdutetaan alennetussa paineessa. Jäännös liuotetaan EtOAc:hen. Liuos pestään peräkkäin 1 N sitruunahapon vesiliuoksella, 10-%:isella Na_2CO_3 :n vesiliuoksella ja suolaliuoksella. Orgaaninen faasi kuivataan (MgSO_4), suodatetaan ja konsentroidaan kuiviin alennetussa paineessa. Jäännös puhdistetaan silikageelillä (SiO_2) flash-kromatografiatekniikalla, jonka on kuvannut Still (W.C. Still et al., J. Org. Chem., 43, 2923 (1978)).

Esimerkki 2

H-Asp(cyPn)(Bzl)-NH-(S)-CH(CH₂CMe₂)CH₂OBzl-välituotteen valmistus

(a) (S)- α -Azido-1-((fenyylietoksi)karbonyyli)-syklopentaanietikkahappo: Tämä yhdiste valmistettiin 2-oksospiro[4.4]nonaani-1,3-dionista, jonka on kuvannut M.N. Aboul-Enein et al., Pharm. Acta Helv., 55, 50 (1980), asymmetrisellä atsidointimenetelmällä käyttäen Evan'in apuainetta, katso D.A. Evans et al., J. Amer. Chem. Soc., 112, 4011 (1990).

Täsmällisemmin, 1,6 M butyllitiumin (469 ml, 750 mmol) heksaaniliuosta lisättiin tipoittain argonilmakehässä liuokseen, jossa oli kiraalista apuainetta, 4(S)-(1-metyylietyyli)-2-oksatsolidinonia, (96,8 g, 750 mmol, kuvanneet L. N. Pridgen ja J. Prol., J. Org. Chem., 54, 3231 (1989)) kuivassa THF:ssä -40°C . Seosta sekoitettiin -40°C :ssa 30 min ajan, ja jäähdytettiin sitten -78°C :seen. 2-oksospiro[4.4]nonaani-1,3-dionia lisättiin tipoittain jäähdytettyyn seokseen. Sitten seosta sekoitettiin 0°C :ssa 1 tunnin ajan. Sen jälkeen seokseen lisättiin 20-%:ista (paino/tilavuus) sitruunahapon vesiliuosta (600 ml). Orgaaninen faasi erotettiin, ja vesifaasi uutettiin EtOAc:llä. Yhdistetyt orgaaniset faasit pestiin suolaliuoksella, kuivattiin (MgSO_4) ja konsentroitiin alennetussa pai-

neessa, jolloin saatiin 3-{2-(1-karboksisyklopentyyli)-1-okso-etyyli}-4(S)-(1-metyylietyyli)-2-oksatsolidinoni vaaleanpunaisena liinteänä aineena (300 g).

Jälkimmäinen kiinteä aine (n. 750 mmol) liuotettiin asetonitriiliin (1 l). Liuokseen lisättiin bentsyylibromidia (128,3 g, 89,2 ml, 750 mmol) ja 1,8-diatsabisyklo[5.4.0]undek-7-eeniä (114 g, 112 ml, 750 mmol). Seosta sekoitettiin argonin alla 16 tuntia. Haihtuvat aineet poistettiin alipaineessa. Jäännös liuotettiin H₂O/EtOAc:iin. Orgaaninen faasi erotettiin, pestiin 10 % (w/v) sitruunahapon vesiliuoksella, kyllästetyllä suolaliuoksella, kuivattiin (MgSO₄) ja väkevöitiin kuiviin alipaineessa, jolloin saatiin öljyä. Kiteyttämällä öljy heksaani-/EtOAc:sta saatiin vastaavaa bentsyyliesteriä valkoisena kiinteänä aineena (204 g, 73 %).

Jälkimmäisen yhdisteen liuos (70 g, 187 mmol) kuivassa THF:ssa (200 ml) jäähdytettiin -78°C:een. 0,66M THF-liuos, jossa oli kalium-1,1,1,3,3,3-heksametyylidisilatsaania (286 ml, 189 mmol) joka sisälsi 6 % (w/v) kumeenia lisättiin yli 15 minuutin jakson ajan jäähdytettyyn liuokseen. Seosta sekoitettiin -78°C:ssa 45 minuuttia. Liuos, jossa oli 2,4,6-tri-isopropyylibentseeni-sulfonyyliatsidia (67 g, 216 mmol) kuivassa THF:ssa (100 ml) lisättiin yhtenä annoksena kylmään seokseen, kaksi minuuttia myöhemmin lisättiin jäätikkoa (50 ml, 860 mmol). Seosta lämmitettiin ja sekoitettiin 35-45°C:ssa yhden tunnin ajan. Haihtuvat aineet poistettiin alipaineessa. Keltaista jäännöstä hierrettiin heksaani/EtOH:lla (4:1, 1,7 l). Saatu valkoinen kiinteä aine otettiin talteen suodattimeen. Suodosta sekoitettiin SiO₂:n (230-240 mesh) kanssa. Haihtuvat aineet poistettiin alipaineessa, ja jäljelle jäänyt kiinteä aine kuivattiin 35°C:ssa alipaineessa kumeenin poistamiseksi. Sitten jäljelle jäänyt kiinteä aine asetettiin SiO₂-pylvääseen. Eluoimalla jäljelle jäänyt kiinteä aine ja SiO₂ heksaani-EtOAc:lla 9:1 ja väkevöimällä eluointiaine saatiin 3-{{2(S)-atsido-1-okso-2-{1-{{(fenyyli)metoksi}karbonyyli}syklopentyyli}etyyli}-4(S)-(1-metyylietyyli)-2-oksatsolidinonia (66 g, 86 %).

Liuos, jossa oli jälkimmäistä yhdistettä (13,42 g, 32,4 mmol) THF/H₂O:ssa (3:1, 608 ml) jäädytettiin 0°C:een. Vetyperoksiidi/H₂O:a (3:7, 16,3 ml, 518 mmol H₂O₂:a) lisättiin jäädytettyyn liuokseen; tämän jälkeen lisättiin LiOH.H₂O:a (2,86 g, 68,2 mmol). Seosta sekoitettiin 0°C:ssa 45 minuuttia ja sitten sammutettiin natriumsulfiitin 10 % (w/v) vesiliuoksella (400 ml). Kun NaHCO₃ (1,93 g) oli lisätty, seos väkevöitiin alipaineessa. Kiraalista apuainetta saatiin jatkuvalla uutamisella (vesipitoinen NaHCO₃/kloroformi) 20 tunnin ajan. Tämän jälkeen vesifaasi jäädytettiin 0°C:een, tehtiin happameksi lisäämällä väkevöityä HCl:a ja sitten uutettiin EtOAc:lla. Uute pestiin kyllästetyllä suolaliuoksella, kuivattiin (MgSO₄) ja väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin haluttua yhdistettä valkoisena kiinteänä aineena (8,2 g, 84 %). Esitetyn yhdisteen 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) ja 7,4 (m, 5H).

Yhdistettä käytetään tämän esimerkin kohdassa (c).

(b) NH₂-(S)-CH(CH₂CMe₃)CH₂OBzl: H-γMeLeu-OH pelkistettiin LiBH₄/Me₃SiCl:lla menetelmän A. Giannis ja K. Sandhoff, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**, 218 (1989) mukaisesti, jolloin saatiin aminoalkoholi NH₂-(S)-CH(CH₂CMe₃)CH₂OH:a. Seosta, jossa oli jälkimmäistä yhdistettä (812 mg, 6,2 mmol), trietyyliamiinia (659 mg, 6,51 mmol) ja di-tert-butyylidikarbonaattia (1,42 g, 6,51 mmol) kuivassa THF:ssa (15 ml) sekoitettiin typpikehässä 4°C:ssa 15 minuuttia ja sitten huoneenlämpötilassa 4 tuntia. THF haihdutettiin alipaineessa. Jäännös liuotettiin EtOAc:iin. Liuos pestiin 10 % vesipitoisella sitruunahapolla, 5 % vesipitoisella NaHCO₃:lla ja kyllästetty suolaliuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin (MgSO₄) ja väkevöitiin kuiviin alipaineessa. Jäännös puhdistettiin flash-kromatografisesti (SiO₂, eluointiaine: heksaani-EtOAc, 2:1), jolloin saatiin Boc-NH-(S)-CH(CH₂CMe₃)CH₂OH:a (1,23 g, 86 %).

Tetrabutyyliammoniumbisulfaattia (106 mg) ja 50 % vesipitoista NaOH:a (3 ml) lisättiin peräkkäin liuokseen, jossa oli Boc-NH-

(S)-CH(CH₂CMe₃)CH₂OH:a (1,23 g, 5,35 mmol) bentsyylikloridissa (13 ml). Saatua seosta sekoitettiin 35–40°C:ssa 90 minuuttia, laimennettiin EtOAc:lla ja pestiin H₂O:lla ja kyllästetyllä suolaliuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin (MgSO₄) ja väkevöitiin kuiviin alipaineessa. Jäännös liuotettiin heksaaniin. Liuos kaadettiin SiO₂-pylvääseen. Pylväs eluoitiin heksaanilla bentsyylikloridin poistamiseksi ja sitten heksaani-EtOAc:lla (2:1), jolloin saatiin Boc-NH-(S)-CH(CH₂CMe₃)CH₂OBzl. Jäljempänä esitetyn yhdisteen ¹H NMR (CDCl₃) δ 0,95 (s, 9H), 1,42 (s, 9H), 1,30–1,55 (m, 2H), 3,42 (d, J = 4 Hz, 2H), 3,88 (leveä, 1H), 4,54 (m, 3H), 7,23–7,4 (m, 5H). Jälkimmäinen yhdiste (1,28 g, 3,99 mmol) liuotettiin 6N HCl/dioksaaniin (10 ml). Liuosta sekoitettiin tyypikehässä 4°C:ssa 45 minuuttia. Haihduttamalla liuotin saatiin halutun yhdisteen vetykloridisuolaa (1,05 g). Yhdistettä käytetään tämän esimerkin seuraavassa osassa puhdistamatta sitä enempää.

(c) Tämän esimerkin otsikkoyhdiste: Noudattamalla esimerkin 1 liitântämenetelmää ja käyttämällä edellisen kohdan NH₂-(S)-H(CH₂CMe₃)CH₂OBzl:n vetykloridisuolaa ensimmäisenä reaktiokomponenttina ja tämän esimerkin kohdan (a) (S)-α-atsido-1-((fenyyli)metoksi)karbonyyli)syklopentaanietikkahappoa toisena reaktiokomponenttina saatiin N-((S)-1-bentsyylioksimetyyli-3,3-dimetyyli)butyyli)-(S)-α-atsido-1-((fenyyli)metoksi)karbonyyli)syklopentaaniasetamidia. Pelkistämällä jälkimmäinen yhdiste tina(II)kloridilla MeOH:ssa menetelmän N. Maiti et al., Tetrahedron Letters, 27, 1423 (1986) mukaisesti saatiin tämän esimerkin otsikkoyhdistettä. Esitetyn yhdisteen ¹H NMR (CDCl₃) δ 0,98 (s, 9H), 1,22–2,25 (m, 12H), 3,4 (d, J = 4 Hz, 2H), 3,64 (s, 1H), 4,18 (leveä m, 1H), 4,52 (s, 2H), 5,12 (s, 2H), 7,18 (d, J = 7 Hz, 1H), 7,22–7,38 (leveä m, 10H).

Esimerkki 3

Boc-Tbq-CH₂-(RS)-CH(CH₂C(O)CMe₃)C(O)OH-väliuotteen valmistus

(a) Monoallyylimalonaatin magnesiumsuola: Liuosta, jossa oli 2,2-dimetyyli-1,3-dioksaani-4,6-dionia (100 g, 0,69 mol) ja allyylialkoholia (47 ml, 0,69 mol) bentseenissä (800 ml) kuumennettiin refluksoiden 24 tuntia. Liuotin haihdutettiin alipaineessa. Tislaamalla jäännös alipaineessa saatiin monoallyylimalonaattia (71 g, 71 %, kp.: 123–127°C/2,7 mmHg). Jälkimäinen esteri (71 g, 0,48 mol) liuotettiin kuivaan THF:iin (300 ml). Magnesiumetoksidia (28,5 g, 0,245 mol) lisättiin liuokseen. Seosta sekoitettiin argonin alla 4 tuntia huoneenlämpötilassa (20–22°C). Liuotin haihdutettiin alipaineessa, ja jäännöstä hierrettiin Et₂O:lla, jolloin saatiin ruskeahkoa kiinteää ainetta. Kiinteäaine jauhettiin hienoiksi osasiksi ja kuivattiin alipaineessa, jolloin saatiin haluttua magnesiumsuolaa (56 g, 73 %). Suolaa käytetään tämän esimerkin seuraavaan kohtaan.

(b) Boc-Tbg-CH₂C(O)OCH₂=CH₂: 1,1-Karboxyylidi-imidatsolia (12,6 g, 78 mmol) lisättiin liuokseen, jossa oli Boc-Tbg-OH:a (15 g, 64 mmol) kuivassa asetonitriilissä (150 ml). Seosta sekoitettiin argonin alla 2 tuntia huoneenlämpötilassa. Monoallyylimalonaatin magnesiumsuolaa (24 g, 78 mmol) ja 4-(N,N-dimetyyliamino)pyridiiniä (100 mg) lisättiin seokseen. Seosta kuumennettiin refluksoiden yhden tunnin ajan ja sitten sekoitettiin huoneenlämpötilassa 18 tuntia. Tämän jälkeen seos väkevöitiin alipaineessa. Jäännös liuotettiin EtOAc:iin (300 ml). Liuos pestiin 10 % vesipitoisella sitruunahapolla (2 x 100 ml) ja kyllästetyllä suolaliuoksella (2 x 100 ml), kuivattiin (MgSO₄) ja haihdutettiin kuiviin. Jäännös puhdistettiin flash-kromatografoimalla (SiO₂, eluointiaine: heksaani-EtOAc, 9:1), jolloin saatiin haluttua allyyliesteriä (19,4 g, 96 %) ruskeana öljynä, joka kiteytyi seisoessaan. ¹H NMR (CDCl₃), huomaa, että tämä yhdiste on keto-enolitauteerien seoksena suhteessa 3:1 kloroformissa, δ 0,96 (s, 9H, enolimuoto), 1,04 (s, 9H), 1,46 (s, 9H), 3,65 (s, 2H), 3,90 (d, J = 8,5 Hz, 1H, enolimuoto), 4,20 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 4,65 (m, 2H), 5,10 (leveä d, J = 7,5 Hz, 1H), 5,20–5,40 (m, 2H), 5,80–6,05 (m, 1H), 12 (s, 1H,

enolimuoto). Alkyyliliesteriä käytetään tämän esimerkin kohdassa (d).

(c) (E)-5,5-Dimetyyli-4-okso-2-heksenoinihappoetyyliesteri:

Tämä etyyliesteri valmistettiin menetelmän S. Manfredini et al., Tetrahedron Letters, 29, 3997 (1988) mukaisesti.

Öljymäinen raakatuote puhdistettiin flash-kromatografisesti (SiO_2 , eluointiaine: heksaani), jolloin saatiin haluttua etyyliesteriä keltaisena öljynä. ^1H NMR (CDCl_3) 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). Etyyliesteriä käytetään tämän esimerkin seuraavassa kohdassa.

(d) Tämän esimerkin otsikkoyhdiste: tämän esimerkin kohdassa

(b) kuvattu Boc-Tbg- $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2=\text{CH}_2$ (0,67 g, 2,1 mmol) liuotettiin vedettömään THF:iin (25 ml) argonkehän alla. Natriumhydridiä (60 % öljydispersio, 0,095 g, 2,4 mmol) lisättiin liuokseen. Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 30 minuuttia. Tämän esimerkin kohdassa (c) kuvattua (E)-5,5-dimetyyli-4-okso-2-heksenoinihappoetyyliesteriä (0,435 g, 2,36 mmol) lisättiin seokseen. Reaktioseosta sekoitettiin kunnes reaktio päättyi kuten TLC:lla voidaan havaita (noin 6 tuntia). Tämän jälkeen seos sammutettiin 10 % vesipitoisella sitruunahapolla. THF poistettiin alipaineessa, ja saatu konsentraatti uutettiin EtOAc:lla (3 x 25 ml). Uute pestiin H_2O :lla, kuivattiin (MgSO_4) ja väkevöitiin alipaineessa. Jäännös puhdistettiin flash-kromatografisesti (SiO_2 , eluointiaine: heksaani-EtOAc, 9:1), jolloin saatiin vastaava Michael-reaktion additiotuote (1,06 g, 100 %).

Michael-additiotuote siirrettiin

Boc-Tbg- $\text{CH}_2-(\text{RS})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})\text{OH}$:iin seuraavasti:

Tetrakistrifenyylifosfiinipalladium(0)ia (0,20 g, 0,18 mmol) ja trifenyylifosfiinia (0,060 g, 0,23 mmol) liuotettiin CH_2Cl_2 :iin (10 ml) argonkehässä. Asetonitriiliä (20 ml) lisättiin ja liuos jäädytettiin 0°C :een. Pyrrolidiiniä (0,28 ml, 2,7 mmol) ja sitten Michael-additiotuote (1,06 g, 2,1 mmol) lisättiin liuokseen. Seoksen annettiin palutua huoneenlämpötilaan yli

yhden tunnin ajan ja sitten sekoitettiin 20 tuntia. Tämän jälkeen reaktioseosta kuumennettiin refluksoiden yhden tunnin ajan argonin alla reaktion saattamiseksi loppuun. Liuotin haihdutettiin, ja jäännös puhdistettiin flash-kromatografisesti (SiO_2 , eluointiaine: heksaani-EtOAc, 9:1), jolloin saatiin Boc-Tbg- CH_2 -(RS)- $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})\text{OEt}$ (0,77 g, 83 %). Tämän jälkeen jälkimmäinen yhdiste (0,77 g, 1,7 mmol) liuotettiin etyleeniglykolidimetyylieetteri - H_2O :een (1:1, 10 ml). Litiumhydroksidimonohydraattia (0,31 g, 7,4 mmol) lisättiin liuokseen. Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 4 tuntia. tehtiin happameksi 10 % vesipitoisella sitruunahapolla (20 ml) ja uutettiin EtOAc:lla (3x25 ml). Uute kuivattiin (MgSO_4) ja väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin tämän esimerkin otsikkoyhdistettä ruskeahkona kiinteänä aineena (0,69 g, 80 % kokonaissaanto Boc-Tbg- $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$):sta. Tuote oli diastereoisomeerien 55:45-seos (esitetty NMR:lla). ^1H NMR (CDCl_3) δ 0,99 (s, 9H, pienempi isomeeri), 1,14 (s, 9H, suurempi isomeeri), 1,43 (s, 9H), 2,68–3,12 (m, 4H), 3,30 (m, 1H), 4,09 (d, J = 9 Hz, 1H), 5,11 (d, J = 9 Hz, 1H).

Esimerkki 4

H-Tbg- $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})$ -Asp(cyPn)(Bzl)-NH-(S)- $\text{CH}(\text{CH}_3\text{CMe}_3)\text{CH}_2\text{OBzl}$ -välituotteen valmistus

Noudattamalla esimerkin 1 liitântämenetelmää ja käyttämällä esimerkin 2 otsikkoyhdistettä (3,42 g, 7,13 mmol) ensimmäisenä reaktiokomponenttina ja esimerkin 3 otsikkoyhdistettä (2,50 g, 6,48 mmol) toisena reaktiokomponenttina, flash-kromatografoidulla (SiO_2 , eluointiaine: heksaani-EtOAc, 4:1) raakatuote saatiin vastaava otsikkoyhdisteen N-Boc-johdannainen (4,64 g, 84 %; R_f = 0,21, heksaani-EtOAc, 7:3). Liuosta, jossa oli jälkimmäistä johdannaista (4,64 g, 5,44 mmol) 6N HCl/dioksaanissa (50 ml) sekoitettiin huoneenlämpötilassa yhden tunnin ajan ja sitten väkevöitiin alipaineessa. Jäännös liuotettiin Et_2O :iin. Jälkimmäinen liuos pestiin NaHCO_3 :n kyllästetyllä vesiliuoksella ja kyllästetyllä suolaliuoksella, kuivattiin (MgSO_4) ja

väkevöitiin, jolloin saatiin keltaista öljyä, joka sisälsi kahta diastereoisomeeria. Kaksi isomeeria erotettiin flash-kromatografoimalla (SiO_2 , eluointiaine: heksaani-EtOAc-MeOH, 5:4,5:0,5). Haluttua isomeeria (ts. polaarisempaa; $R_f = 0,18$, EtOAc-heksaani-MeOH, 7:3:0,5) saatiin värittömänä öljynä (2,52 g, 52 %). Isomeeria, tämän esimerkin otsikkoyhdistettä, käytetään seuraavassa esimerkissä puhdistamatta enempää.

Esimerkki 5

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

Noudattamalla esimerkin 1 liitântämenetelmää ja käyttämällä esimerkin 4 otsikkoyhdistettä (4,45 g, 5,95 mmol) ensimmäisenä reaktiokomponenttina ja N-metyylivaliinia (4,41 g, 17,9 mmol) toisena reaktiokomponenttina, flash-kromatografoimalla (SiO_2 , eluointiaine: heksaani-EtOAc, 7:3) raakatuote saatiin tämän esimerkin otsikkoyhdistettä (4,02 g, 72% saanto). ^1H NMR (CDCl_3) 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, $J = 8,5$ Hz, 1H), 4,49 (d, $J = 4,5$ Hz, 2H), 4,64 (d, $J = 11\text{Hz}$, 1H), 5,18 (d, $J = 5\text{Hz}$, 2H), 6,78 (leveä d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 7,11 (leveä d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 7,18 (leveä d, $J = 11$ Hz, 1H), 7,2–7,45 (m, 10H).

Esimerkki 6

PhCH₂CH₂C(O)-(N-Me)Val-Tbg-CH₂-(R)-CH(CH₂C(O)CMe₃)C(O)-Asp(cyPn)- γ MeLeusinolin valmistus

Liuosta, jossa oli esimerkin 5 otsikkoyhdistettä (4,02 g, 4,25 mmol) 6N HCl/dioksaanissa (30 ml) sekoitettiin huoneenlämpötilassa yhden tunnin ajan ja sitten väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin esimerkin 5 otsikkoyhdisteen vapaata

N-terminaalista aminojohdannaista sen hydrokloridisuolan muodossa. Tämän jälkeen noudattamalla esimerkin 1 liitännämenetelmää ja käyttämällä jälkimmäistä aminojohdannaista ensimmäisenä reaktiokomponenttina ja bentseenipropionihappoa (2,00 g, 13,3 mmol) toisena reaktiokomponenttina, puhdistamalla raakatuote flash-kromatografoimalla (SiO_2 , eluointiaine: heksaani-EtOAc, 3:2) saatiin $\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{C(O)-N-Me-Val-TbgCH}_2\text{-(R)-CH(CH}_2\text{C(O)CMe}_3\text{)C(O)-Asp-(cyPn)(OBzl)-NH(S)-CH(CH}_2\text{CMe}_3\text{)CH}_2\text{OBzl}$:a valkoisena vaahtona (4,00 g, 94 %; $R_f = 0,35$, heksaani-EtOAc, 1:1). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 0,79 (d, $J = 7$ Hz, 3H), 0,91 (s, 9H), 0,93 (s, 9H), 1,08 (s, 9H), 1,5 – 1,9 (m, 10H), 2,27 (m, 1H), 2,5 – 2,85 (m, 7H), 2,90 (s, 3H), 2,97 (m, 4H), 3,27 (dd, $J = 11, 7$ Hz, 1H), 3,55 (dd, $J = 11, 4,5$ Hz, 1H), 3,48 (q, $J = 7,5$ Hz, 2H), 4,22 (m, 1H), 4,27 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 4,48 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H), 4,53 (d, $J = 11$ Hz, 1H), 4,63 (d, $J = 0,5$ Hz, 1H), 5,16 (q, $J = 13$ Hz, 2H), 6,72 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 7,02 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 7,17 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H), 7,18 – 7,4 (m, 10H).

Jälkimmäinen yhdiste (4,00 g, 4,03 mmol) saatettiin hydrogenolyysiin {20% $\text{Pd(OH)}_2/\text{C}$ (200 mg), H_2 :n 1 ilmakehässä, EtOH, 5 tuntia}. Reaktion tapahduttua loppuun katalyytti poistettiin reaktioseoksesta suodattamalla 45 μm membraanin läpi. Suodos väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin puhdasta öljyä. Öljy liuotettiin Et_2O :iin (100 ml). Liuos haihdutettiin kuiviin alipaineessa. Liuotus- ja haihdutusmenetelmä toistettiin, jolloin saatiin valkoista kiinteää ainetta. Kiinteää ainetta hierrettiin heksaanilla, suodatettiin ja kuivattiin alipaineessa, jolloin saatiin otsikkoyhdistettä (3,12 g, 95 %)

$^1\text{H NMR}$ (d_6 -DMSO), 400 MHz; huomaa: yhdiste on DMSO:ssa kahden rotameerin 50:50-seoksena δ 0,71–0,92 (m, 24H), 1,05 (s, 4,5H), 1,06 (s, 4,5H), 1,20–1,78 (m, 10H), 1,93–2,16 (m, 2H), 2,48–2,83 (m, 6H), 2,84 (s, 1,5H), 2,92 (s, 1,5H), 2,96–3,06 (m, 1H), 3,10–3,23 (m, 2H), 3,72–3,81 (m, 1H), 4,09–4,14 (m, 1H), 4,22 (d, 8 Hz, 0,5H), 4,54–4,62 (leveä m, 1H), 4,73–4,81 (m, 1,5H), 7,12–7,29 (m, 6H), 7,94 (d, $J = 10$ Hz, 1H), 8,04 (d, $J = 8$ Hz, 0,5H), 8,32 (d, $J = 8,5$ Hz, 0,5H).

Noudattamalla esimerkin 6 menetelmää, mutta korvaamalla bentseenipropionihappo 2-(fenyyylimetyyli)-3-fenyylipropionihapolla (dibentsyylietikkahappo) saatiin $(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC}(\text{O})-(\text{N-Me})\text{Val-Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\gamma\text{MeLeusinolia}$.

Esimerkki 7

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

1-Etyylipropyyli-isosyanaattia (28 mg, 0,248 mmol) lisättiin liuokseen, jossa oli esimerkin 4 otsikkoyhdistettä 4 (23 mg, 0,030 mmol) ja trietyyliamiinia (6 mg, 0,057 mmol) vedettömässä CH_2Cl_2 :ssa. Reaktioseosta sekoitettiin argonkehän alla 0°C :ssa yhden tunnin ajan ja sitten huoneenlämpötilassa 18 tunnin ajan. TLC (EtOAc-heksaani, 1:1) osoitti reaktion päättyneen. Liuotin haihdutettiin alipaineessa. Jäännös puhdistettiin flash-kromatografoimalla (SiO_2 , eluointiaine: heksaani-EtOAc, 6:4), jolloin saatiin tämän esimerkin otsikkoyhdisteen vastaavaa dibentsyylijohdannaisista (16 mg). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0,9 (t, J = 7 Hz, 3H), 0,92 (t, J = 7 Hz, 3H), 0,94 (s, 9H), 0,95 (s, 9H), 1,10 (s, 9H), 1,25–1,90 (m, 14H), 2,52 (m, 1H), 2,68 (m, 1H), 2,81 (m, 1H), 2,94–3,07 (m, 2H), 3,27 (dd, J = 7,2, 9 Hz, 1H), 3,36 (dd, J = 5,5, 9 Hz, 1H), 3,46 (m, 1H), 4,07 (d, J = 9 Hz, 1H), 4,23 (m, 1H), 4,28 (d, J = 9 Hz, 1H), 4,48 (dd, J = 10 Hz, 2H), 4,66 (d, J = 10 Hz, 1H), 4,74 (d, J = 9 Hz, 1H), 5,17 (dd, J = 14 Hz, 2H), 7,10 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,2–7,45 (m, 11H).

Jälkimmäinen dibentsyylijohdannainen saatettiin hydrogenolyyysiin (10 % palladium/hiili, 1 ilmakehä, EtOH), jolloin saatiin otsikkoyhdistettä. Massaspektri: 703 (M + Na)⁺.

Esimerkki 8

Muiden edustavien välituotteiden valmistus kaavan 1 mukaisten peptidien C-päättteen käsittelemiseksi

(a) $\text{NH}_2\text{-(R)-CH(Et)CMe}_3$: Jäähdytettyyn liuokseen (0°C), jossa oli 4,4-dimetyyli-3-pentanonia (106 g, 0,92 mmol) ja (R)- α -metyyli-bentsyyliamiinia (111 g, 0,92 mmol) bentseenissä (1 l) lisättiin liuos, jossa oli TiCl_4 :a (50,5 ml, 0,46 mmol) bentseenissä (200 ml) sellaisella nopeudella, että seoksen lämpötila pysyi alle 10°C . Tämän jälkeen seosta sekoitettiin mekaanisesti 3 tuntia 40°C :ssa, jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja suodatettiin piimaan läpi. Piimaa pestiin Et_2O :lla. Yhdistetty suodos ja pesuneste väkevöitiin. Jäännös liuotettiin kuivaan MeOH :iin (2 l). Liuos jäähdytettiin 0°C :een ja NaBH_4 :a (20 g, 0,53 mmol) lisättiin annoksittain samalla kun seoksen lämpötilaa pidettiin alle 5°C :ssa. Metanoli haihdutettiin. Jäännös liuotettiin Et_2O :iin. Liuos pestiin kyllästetyllä suolaliuoksella, kuivattiin (MgSO_4) ja haihdutettiin kuiviin, jolloin saatiin puneratavaa öljyä (distereoisomeerien 18:1-seos kuten NMR:lla osoitettiin). Öljy puhdistettiin flash-kromatografomalla (SiO_2 , eluointiaine: EtOAc /heksaani, 7:93), jolloin saatiin N-(1(R)-fenyylietyyli)-1(R)-etyyli-2,2-dimetyylipropyyliamiinia nesteenä (110 g, 54 %). Tämä aines liuotettiin heksaaniin (1,5 l). 6N HCl dioksaanissa (90 ml) lisättiin liuokseen yli 15 minuutin jakson ajan. Saatu valkoinen kiinteä aine otettiin talteen suodattimeen ja sitten pestiin heksaanilla, jolloin saatiin N(1(R)-fenyyli-etyyli)-1(R)-etyyli-2,2-dimetyyli-propyylihydrokloridia (125 g, 97 %). ^1H NMR (CDCl_3) δ 0,55 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H), 1,14 (s, 9H), 1,54–1,95 (m, 2H), 2,23 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H), 2,36–2,44 (m, 1H), 4,31–4,49 (m, 1H), 7,30–7,48 (m, 3H), 7,74–7,79 (m, 2H).

Liuosta, jossa oli jälkimmäistä yhdistettä (41,5 g) MeOH :ssa (120 ml) sekoitettiin 10 % (w/w) Pd/C :lla, ja seosta ravisteltiin vedyn 50 psi:ssa Parr-hydrogenaattorissa huoneenlämpötilassa 48 tunnin ajan. Seos suodatettiin, ja suodos väkevöitiin, jolloin saatiin haluttua $\text{NH}_2\text{-(R)-CH(Et)CMe}_3$:a sen suolahappo-additiosuolan muodossa valkoisena kiinteänä aineena (25 g, 100 %). ^1H NMR (CDCl_3) δ 1,10 (s, 9H), 1,22 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 1,58–1,90 (m, 2H), 2,70–2,85 (m, 1H), 8,10–8,40 (leveä s, 3H).

Noudattamalla edellistä menetelmää, mutta korvaamalla 4,4-dimetyyli-3-pentanoni 3,3-dimetyyli-2-butanonilla saatiin $\text{NH}_2\text{-(R)-CH(Me)CMe}_3\text{.HCl:a}$.

(b) $\text{NH}_2\text{N(Me)CMe}_3$: NaOH (3,3 g, 82 mmol) lisättiin liuokseen, jossa oli tert-butyylilihydratsiinihydrokloridia (5,1 g, 41 mmol). 15 minuutin kuluttua seokseen lisättiin liuos, jossa oli ditert-butyylidikarbonaattia (9,0 g, 42 mmol) THF:ssä (15 ml). Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 15 tuntia ja sitten uutettiin Et_2O :lla (3 X 20 ml). Yhdistetyt uutteen pestiin Na_2CO_3 :n kyllästetyllä vesiliuoksella, kuivattiin (MgSO_4) ja väkevöitiin, jolloin saatiin valkoista kiinteää ainetta (7,6 g). Jälkimmäinen aines (1,3 g, 6,9 mmol) liuotettiin kuivaan DMF:iin. NaH:n 60 % (w/w) dispersiota mineraaliöljyssä (0,28 g, ts. 6,9 mmol NaH:a) ja sitten DMF:a (1,5 ml) lisättiin liuokseen. Seosta sekoitettiin 20 minuuttia, minkä jälkeen lisättiin puhdasta metyylijodidia (0,97 g, 6,9 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 15 tuntia ja sitten jaettiin H_2O :n ja Et_2O :n kesken. Orgaaninen faasi erotettiin ja pestiin 0,5N vesipitoisella HCl:lla (2 x). Yhdistetyt vesifaa-sit tehtiin emäksiseksi NaHCO_3 :lla ja uutettiin EtOAc :lla (3 x). EtOAc -uute kuivattiin (MgSO_4) ja väkevöitiin kuiviin, jolloin saatiin Boc-NHN(Me)CMe₃:a valkoisena kiinteänä aineena (0,9 g, 64 %); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1,07 (s, 9H), 1,44 (s, 9H), 2,43 (s, 3H), 5,29 (s, 1H). Jälkimmäinen kiinteä aine (0,9 g) liuotettiin 6N HCl/dioksaaniin (5 ml). Liuoksen annettiin seistä huoneenlämpötilassa 30 minuuttia ja sitten väkevöitiin kuiviin. Hiertämällä jäännöstä heksaanilla saatiin $\text{NH}_2\text{N(CH}_3\text{)CMe}_3\text{.HCl:a}$ valkoisena kiinteänä aineena (0,5 g).

Noudattamalla edellistä menetelmää, mutta korvaamalla metyylijodidi etyylijodidilla saatiin $\text{NH}_2\text{N(Et)CMe}_3\text{.HCl}$, sp.: 129–134°C.

Esimerkki 9

Muiden edustavien välituotteiden valmistus kaavan 1 mukaisten peptidien N-päättien käsittelemiseksi esimerkin 7 menetelmän mukaisesti

(a) 1-Propyylibutyryyli-isosyanaatti: Tämä välituote valmistettiin kaupallisesti saatavissa olevasta 4-aminoheptaanista menetelmän V.S. Goldesmidt ja M. Wick, Liebigs Ann. Chem., 575, 217 (1952) mukaisesti.

(b) 1-Etyyli-1-(2-propenyryyli)-3-butenyryyli-isosyanaatti: Liuos, jossa oli propioninitriiliä (14,5 g, 264 mmol) kuivassa Et₂O:ssa (40 ml) lisättiin tipoitain 1,0M allyylimagnesiumbromidi/Et₂O:iin (880 ml). Reaktioseosta sekoitettiin mekaanisesti refluksoiden kahden tunnin ajan, minkä jälkeen se jäähdytettiin 0°C:een. NH₄Cl:n kyllästettyä vesiliuosta (320 ml) lisättiin varovaisesti jäähdytettyyn reaktioseokseen. Orgaaninen faasi erotettiin, kuivattiin (MgSO₄), jäähdytettiin 0°C:een ja sitten sekoitettiin samassa lämpötilassa 1M HCl/Et₂O:n (200 ml) kanssa. Saatua kiinteä aine otettiin talteen ja kuivattiin alipaineessa (n. 27 g). Jälkimmäinen aines liuotettiin CH₂Cl₂:iin (200 ml). Liuos pestiin Na₂CO₃:n 10 % (w/v) vesiliuoksella (2 x) ja sitten kyllästetyllä suolaliuoksella, kuivattiin (MgSO₄) ja väkevöitiin kuiviin, jolloin saatiin keltaista öljyä. Öljy tislattiin (82-85°C/20 Torr), jolloin saatiin 1-etyyli-1-(2-propenyryyli)-3-butenyryyliamiinia värittömänä nesteenä (11,6 g, 34 %); ¹H NMR (CDCl₃), 400 MHz) δ 0,89 (t, J = 7Hz, 3H), 1,39 (q, J = 7 Hz, 2H), 2,11 (d, J = 7 Hz, 2H), 5,06-5,14 (m, 4H), 5,80-5,89 (m, 2H).

Jälkimmäinen yhdiste muunnettiin 1-etyyli-1-(2-propenyryyli)-3-butenyryyli-isosyanaatiksi menetelmän V.S. Goldesmidt ja M. Wick, supra mukaisesti.

Edeltävän kappaleen b. prosessin ensimmäinen vaihe, ts. 1-etyyli-1-(2-propenyryyli)-3-butenyryyliamiinin valmistaminen, perustuu yleiseen menetelmään, jonka ovat kuvanneet G. Alvernhe ja A. Laurent, Tetrahedron Lett., 1057 (1973). Kokonaisprosessia,

sopivan reagoiviern aineiden valinnan kanssa, voidaan käyttää valmistettaessa muita vaadittavia isosyanaattivälituotteita lopulta tapahtuvaan kaavan 1 mukaisten peptidien valmistukseen, joissa on tyydyttymättömyyttä N-terminaalisessa päässä, ts. kaavan 1 mukaisia peptidejä, joissa A-B on tyydyttymätön alkyyliaminokarbonyyli, jolla on kaava $R^5-NH-C(O)$, jossa R^5 on haaroittunut tyydyttymätön hiilivetyradikaali kuten 1-metyyli-1-(2-propenyli)-3-butenyyli. Huomaa kuitenkin, että kun vaadittavia isosyanaattivälituotteita käytetään esimerkin 7 menettelytavan mukaan, niin lopullinen tuote on kaavan 1 mukainen vastaava peptidi, jossa N-terminaalinen pää on tyydyttynyt. Lisäksi viimeksi mainittu menettelytapa edustaa käytännön prosessia sellaisten vastaavien peptidien valmistamiseksi; esimerkiksi $MePr_2CNHC(O)-$ tai $EtPr_2-CNHC(O)-Tbg-CH_2-(R)-CH(CH_2C(O)CMe_3)C(O)-Asp(cyPn)-NHCH_2CMe_3$, katso esimerkin 13 taulukossa IV lueteltuja 8. ja 5. yhdistettä, vastaavasti.

Toisaalta kun on toivottavaa säilyttää tyydyttymättömyys N-terminaalisessa päässä, kaavan 1 mukaisia N-terminaalisia tyydyttymättömiä peptidejä voidaan valmistaa samalla tavalla kuin vastaavia tyydyttyneitä peptidejä edellyttäen, että käytetään karboksisuojaryhmiä, jotka voidaan poistaa selektiivisesti tyydyttymättömyyden läsnä ollessa. Eräs käytännöllinen karboksisuojaryhmä tähän tarkoitukseen on allyyliryhmä. Niinpä halutut N-terminaalisesti tyydyttymättömät peptidit voidaan valmistaa noudattamalla esimerkkien 2 - 4 ja 7 menettelytapaa mutta korvaamalla esimerkin 2 (S)- α -atsido-1-((fenyylimetoksi)-karbonyyli)syklopentaanihapon (S)- α -atsido-1-(2-propenylioksikarbonyyli)-syklopentaanihapolla. Viimeksi mainittu yhdiste on valmistettu täsmälleen samalla tavalla kuin on kuvattu fenyylimetoksijohdannaiselle esimerkissä 2(a) paitsi, että bentsyylibromidi korvattiin allylibromidilla. Lopullinen suojauksenpoistovaihe (ts. karboksisuojaryhmän poistaminen, tai -ryhmien tapauksessa, jossa tavoitepeptidin E on $NHCH(R^{12})-Z$, jossa R^{12} on tässä määritetty ja Z on $C(O)OH$, voidaan toteuttaa menettelytavalla, jonka on kuvannut R. Déziel, Tetrahedron Lett., 28, 4371 (1987), edullisesti pyrrolidiinillä tetrakis(trifenyylifosfii-

ni)palladiumin(0) läsnä ollessa. Eräs esimerkki täten valmistetusta, kaavan 1 mukaisesta N-terminaalaisesti tyydyttymättömästä peptidistä on $\text{Me}(\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2)_2\text{CNHC}(\text{O})-\text{Tbg}-\text{CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\text{NHCH}_2\text{CMe}_3$, katso esimerkin 13 taulukossa IV lueteltua 7. yhdistettä.

Huomaa myös, että kun kohteena olevan N-terminaalisen tyydyttymättömän peptidin E on $\text{NHCH}(\text{R}^{10})-\text{Z}$, jossa R^{10} on tässä määriteltä ja Z on CH_2OH , välituote, jota käytetään hydroksin sisältävän C-terminaalisen yksikön sisällyttämiseen haluttuun peptidiin, vaatii suojausta syntyvää C-terminaalista hydroksyyliä varten. Hydroksisuojarahmian pitäisi tässä tapauksessa myös olla sellainen, joka voidaan poistaa selektiivisesti tyydyttymättömyyden läsnä ollessa. Eräs mukava suojarahma tässä tapauksessa on allyylioksikarbonyyliryhmä, katso E. J. Corey ja J. W. Suggs, J. Org. Chem., 38 3223 (1973).

Siten sopivia välituotteita käyttämällä voidaan käyttää esimerkkien 1 - 7 sarjaliittamis- ja suojauspoistomenettelytapoja valmistettaessa kaavan 1 mukaisia yhdisteitä, kuten sellaisia, jotka esitetään esimerkkinä seuraavan esimerkin taulukossa. Joissain tapauksissa lopputuotteen saostuksella ei saada puhdasta materiaalia. Niissä tapauksissa tuote voidaan puhdistaa semipreparatiivisella HPLC C-18-käänteisfaasikolonnilla käyttämällä gradienttia asetonitriilistä ja vedestä, jotka molemmat sisältävät 0,06 % TFA:ta. Tätä varten raakatuote liuotettiin 0,1 M NH_4OH :n vesiliuokseen, ja liuoksen pH-arvo säädettiin takaisin neutraaliin pH-arvoon noin 7 käyttämällä 0,1 M AcOH :n vesiliuosta, ennen puhdistusta. Kun sovellettavissa, diastereoisomeeriseokset erotettiin tällä tavalla.

Joitain esimerkkejä muista kaavan 1 mukaisista yhdisteistä, jotka täten voidaan valmistaa, ovat $(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC}(\text{O})-(\text{N-Me})\text{Val-Tbg}-\text{CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\text{NHCH}_2\text{CMe}_3$ ja $(\text{PhCH}_2)_2\text{CHC}(\text{O})-(\text{N-Me})\text{Val-Tbg}-\text{CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\text{NH}-(\text{R})-\text{CH}(\text{Me})\text{CMe}_3$.

Esimerkki 10Herpes simplex -virus (HSV-1) ribonukleotidireduktaasin estoa) Entsyymien valmistus

HSV-1 -ribonukleotidireduktaasi (osaksi puhdistettu) saatiin lepotilassa olevista BHK-21/C13-soluista, jotka oli infektoitu kanta F HSV-1 -viruksella tasolla 10 pfu:ta (plaque forming units)/solu tavalla, joka kuvataan julkaisussa E.A. Cohen et al., J. Gen. Virol., 66, 733 (1985).

b) Esimerkinomaisten peptidien määrittäminen ja tulokset

Noudattamalla menettelytapaa, jonka on kuvannut P. Gaudreau et al., J. Biol. Chem., 262, 12413 (1987), saatiin seuraavassa taulukossa I luetellut määrittäytulokset. Kunkin esimerkinä esitetyn, kaavan 1 mukaisen yhdisteen määrittäytulos ilmaistaan yhdisteen konsentraationa, joka tuottaa 50 % entsyymiaktiivisuuden maksimaalisesta estosta (IC_{50}). Kussakin määrittäyksessä käytetty entsyymivalmisteen yksikköjen lukumäärä oli vakio, perustuen entsyymivalmisteen spesifiseen aktiivisuuteen. Tulokset ovat suhteessa aktiivisuuteen, joka saatiin kontrolliko-keissa ilman testiyhdistettä ja edustaa keskiarvoa neljästä määrittäyksestä, jotka vaihtelivat keskenään alle 10 %.

Taulukko I

Kaavan 1 mukainen yhdiste	FAB/MS (m/z) (M+Na) ⁺	IC ₅₀ μM
Esimerkin 6 otsikkoyhdiste	813*	0,27
PhCH ₂ CH ₂ C(O)-(N-Me)Val-Tbg-CH ₂ -(R)- CH(CH ₂ C(O)CMe ₃)C(O)-Asp(cyPn)- γMeLeu-OH	849	0,19
PhCH ₂ CH ₂ C(O)-(N-Me)Val-Tbg-CH ₂ -(R)- CH(CH ₂ C(O)CMe ₃)C(O)-Asp(cyPn)- γMeLeu-NH ₂	848	0,26
PhCH ₂ CH ₂ C(O)-(N-Me)Val-Tbg-CH ₂ -(R)- CH(CH ₂ C(O)CMe ₃)C(O)-Asp(cyPn)- NHCH ₂ CMe ₃	791	0,33
PhCH ₂ CH ₂ C(O)-(N-Me)Val-Tbg-CH ₂ -(R)- CH{CH ₂ C(O)-(syklopentyyli)}C(O)-Asp- (cyPn)-NHCH ₂ CMe ₃	803	0,32
PhCH ₂ CH ₂ C(O)-(N-Me)Val-Tbg-CH ₂ -(R)- CH(CH ₂ C(O)CMe ₃)C(O)-Asp{(R)-Me}- NHCH ₂ CMe ₃	751,5	0,33
Et ₂ CHNHC(O)-Tbg-CH ₂ -(R)-CH(CH ₂ C(O)- CMe ₃)C(O)-Asp(cyPn)-NHCH ₂ CMe ₃	659	0,23
Et ₂ CHNHC(O)-Tbg-CH ₂ -(S)-CH{CH ₂ C(O)- (pyrrolidino)}C(O)-Asp(cyPn)- γMeLeusinoli	716	0,17

Taulukko I (jatkuu)

Kaavan 1 mukainen yhdiste	FAB/MS (m/z) (M+Na) ⁺	IC ₅₀ μM
Et ₂ CHNHC(O)-Tbg-CH ₂ -(R)-CH(CH ₂ C(O)-CMe ₃)C(O)-Asp(cyPn)-γMeLeu-OH	717	0,12
Et ₂ CHNHC(O)-Tbg-CH ₂ -(R)-CH(CH ₂ C(O)-CMe ₃)C(O)-Asp(cyPn)-γMeLeu-NH ₂	716	0,22
Esimerkin 7 otsikkoyhdiste	703	0,15
Et ₂ CHNHC(O)-Tbg-CH ₂ -(R)-CH{CH ₂ C(O)-(syklopentyyli)}C(O)-Asp(cyPn)-NHCH ₂ CMe ₃	671	0,22
Et ₂ CHNHC(O)-Tbg-CH ₂ -(R)-CH(CH ₂ C(O)-CMe ₃)C(O)-Asp{(R)-Me}-NHCH ₂ CMe ₃	597*	0,20
Pr ₂ CHNHC(O)-Tbg-CH ₂ -(R)-CH(CH ₂ C(O)-CMe ₃)C(O)-Asp(cyPn)-γMeLeu-OH	745	0,15
Pr ₂ CHNHC(O)-Tbg-CH ₂ -(R)-CH(CH ₂ C(O)-CMe ₃)C(O)-Asp(cyPn)-γMeLeusinoli	731	0,20
Pr ₂ CHNHC(O)-Tbg-CH ₂ -(R)-CH(CH ₂ C(O)-CMe ₃)C(O)-Asp(cyPn)-NHCH ₂ CMe ₃	665*	0,08

* (M + H)⁺Esimerkki 11

Herpes simplex -viruksen (HSV-2) replikaation esto soluviljelmässä

Määritys:

BHK-21/C13-soluja (ATCC CCL 10) inkuboidaan kahden päivän ajan 150-cm² T-astioissa ($1,5 \times 10^6$ solua/astia) alpha-MEM -väliaineella (Gibco Canada Inc., Burlington, Ontario, Kanada), jota on täydennetty 8 %:lla (tilavuus/tilavuus) naudan sikiön seerumia (FBS, Gibco Canada Inc.). Solut trypsinisoidaan ja siirretään sitten tuoreelle väliaineelle 24-kaivoiseen levyyn, jolloin saadaan $2,5 \times 10^5$ solua 750 µl:ssa välainetta/kaivo. Soluja inkuboidaan 37°C:ssa 6 tunnin ajan niiden levyyn tarttumisen sallimiseksi. Sen jälkeen solut pestään kerran 500 µl:lla alpha-MEM:ää, jota on täydennetty 0,5 %:lla (tilavuus/tilavuus) FBS:ää ja inkuboidaan sitten 750 µl:n kanssa samaa väliainetta (vähäseeruminen) 3 päivän ajan. Tämän seeruminäлкиinnyttämisaikajakson jälkeen vähäseeruminen väliaine poistetaan, ja soluja inkuboidaan 500 µl:ssa BBMT:tä 2 - 3 tunnin ajan. (BBMT-väliaine kuvataan julkaisussa P. Brazeau et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 7909 (1982).) Sen jälkeen solut infektoidaan HSV-2:llä (infektion multiplisiteetti = 0,02 PFU/solu) 100 µl:ssa BBMT-väliainetta. (Huomaa: käytetty HSV-2 oli kanta HG-52, katso Y. Langelier ja G. Buttin, J. Gen. Virol., 57, 21 (1981); virusta varastoititiin -80°C:ssa.) Yhden tunnin mittaisen virusadsorption jälkeen 37°C:ssa väliaine poistetaan, ja solut pestään BBMT:llä (3 X 250 µl). Kussakin kaivossa olevia soluja inkuboidaan testiaineen sopivien konsentraatioiden läsnä ollessa tai ilman (kontrolli) testiainetta, liuotettuna 200 µl:aan BBMT-väliainetta. Kun on inkuboitu 29 tuntia 37°C:ssa, infektoidut solut kerätään pakastamalla levyn ensin -80°C:seen, minkä jälkeen sulatetaan. Solut kussakin kaivossa kaavitaan kaivon pinnalta sulavien jäänpalasten avulla. Täydellisen sulamisen jälkeen solususpensiot kerätään, ja kukin kaivo huuhdotaan 150 µl:lla BBMT-väliainetta. Virusnäytettä (suspensio plus pesu) sonikoidaan varovasti 4 min ajan 4°C:ssa. Solujäänteet poistetaan sentrifugoimalla (1000 x g 10 min ajan 4°C:ssa). Supernatantti kerätään ja varastoidaan -80°C:ssa virustiitterimääritykseen asti.

Virustitraus suoritettiin modifioimalla kolorimetristä määrittysmenetelmää, jonka on kuvannut M. Langlois et al., Journal of Biological Standardization, 14, 201 (1986).

Erityisemmin, samalla tavalla kuin edellä kuvattiin, BHK-21/-C13-soluja trypsinisoidaan ja siirretään tuoreeseen väliaineeseen 96-kaivoiselle mikrotiitterilevyllä antamaan 20 000 solua 100 µl:ssa väliainetta/kaivo. Valmistetussa levyssä olevia soluja inkuboidaan 37°C:ssa kahden tunnin ajan. Tämän aikana virusnäyte sulatetaan ja sonikoidaan varovasti 15 s ajan, ja valmistetaan näytteen log-laimennokset (1/5-peräkkäiset: 50 µl näytettä plus 200 µl BBMT-väliainetta, tehden peräkkäiset laimennokset monikanavapipetillä.

BHK-21/C13 -solujen yllä olevan 2 tunnin inkuboinnin edettyä loppuun väliaine korvataan alpha-MEM-väliaineella, jota on täydennetty 3 %:lla (tilavuus/tilavuus) FBS:ää. Solut ovat nyt valmiita viruksen eri näytelaimennoksilla infektoitaviksi. Eri laimennosten erät (50 µl) siirretään levyn sopiville kaivoille. Tulokseksi saatuja infektoituja soluja inkuboidaan kahden päivän ajan 37°C:ssa. Sitten 50 µl 0,15-%:ista (tilavuus/tilavuus) neutraalipunaväriä Hank'in tasapainotetussa suolaliuoksessa (pH 7,3, Gibco Canada Inc.) lisätään kuhunkin kaivoon. Valmistettua levyä inkuboidaan 45 min ajan 37°C:ssa. Sitten kunkin kaivon väliaine imetään pois, ja solut pestään kerran 200 µl:lla Hank'in tasapainotettua suolaliuosta. Pesun jälkeen väri vapautetaan soluista lisäämällä 100 µl 0,1 M-Sorensen'in sitraattipuskurin (pH 4,2) ja etanolin 1:1-seosta. (Sorensen'in sitraattipuskuri valmistetaan seuraavalla tavalla: Valmistetaan ensin 0,1 M dinatriumsitraattiliuos liuottamalla sitruunahappomonohydraattia (21 g) 1 N NaOH:n vesiliuosta (200 ml) ja lisäämällä riittävästi suodatettua H₂O:ta 1 l:aan säätämiseksi. Toiseksi 0,1 M dinatriumsitraattiliuosta (61,2 ml) sekoitetaan 0,1 N HCl:n vesiliuoksen (38,8 ml) kanssa, ja tulokseksi saadun liuoksen pH säädetään happamaan pH-arvoon 4,2 mikäli välttämättöntä.) Kaivoissa oleva seos alistetaan varovasti pyörteen vaikutukselle kunnollisen sekoittumisen varmistamiseksi. Levyllä

olevat kaivot skannataan spektrofotometrilevynlukijalla 540 μm :llä elävien solujen lukumäärän määrittämiseksi. Tällä tavalla virusuksen kasvun esto-% voidaan määrittää testiaineen eri konsentraatioille, ja voidaan laskea testiainekonsentraatio, joka aikaansaa viruksen replikaation 50-%:isen eston, ts. EC_{50} -arvo.

Tulokset:

Seuraavassa taulukossa II esitetään esimerkkejä tuloksista, jotka saatiin kun kaavan 1 mukaisia peptidejä arvioitiin tämän esimerkin solukasvatusmäärityksellä.

Taulukko II

Kaavan 1 mukainen yhdiste	EC_{50} μM
Esimerkin 6 otsikkoyhdiste	15
$\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-(\text{N-Me})\text{Val-Tbg-CH}-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\gamma\text{MeLeu-OH}$	65
$\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-(\text{N-Me})\text{Val-Tbg-CH}-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\gamma\text{MeLeu-NH}_2$	60
$\text{Et}_2\text{CHNHC}(\text{O})-\text{Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\text{NHCH}_2\text{CMe}_3$	56
$\text{Et}_2\text{CHNHC}(\text{O})-\text{Tbg-CH}_2-(\text{S})-\text{CH}\{\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{pyrrolidino}\}\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\gamma\text{MeLeusinoli}$	200
$\text{Et}_2\text{CHNHC}(\text{O})-\text{Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}\{\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{(syklopentyyli)}\}\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\text{NHCH}_2\text{CMe}_3$	50

Taulukko II (jatkuu)

Kaavan 1 mukainen yhdiste	EC ₅₀ μM
Pr ₂ CHNHC(O)-Tbg-CH ₂ -(R)-CH(CH ₂ C(O)-CMe ₃)C(O)-Asp(cyPn)-γMeLeusinoli	30
Pr ₂ CHNHC(O)-Tbg-CH ₂ -(R)-CH(CH ₂ C(O)-CMe ₃)C(O)-Asp(cyPn)-NHCH ₂ CMe ₃	24
(1-propyyლისyklopentyyli)aminokarbonyyli-Tbg-CH ₂ -(R)-CH(CH ₂ C(O)CMe ₃)C(O)-Asp(cyPn)-NHCH ₂ CMe ₃	40
Pr ₂ CHNHC(O)-Tbg-CH ₂ -(R)-CH{CH ₂ C(O)-(syklopentyyli)}C(O)-Asp(cyPn)-NHCH ₂ CMe ₃	30

Esimerkki 12

Asikloviiri, esimerkin 6 kaavan 1 mukaisen otsikkopeptidin ja näiden kahden aineen yhdistelmän vertailu HSV-2:n replikaation estossa soluviljelmässä

Seuraavassa taulukossa III kuvataan tuloksia, jotka saatiin kun asikloviiriä ja esimerkin 6 otsikkopeptidiä ja näiden kahden yhdistelmiä arvioitiin esimerkin 11 määritysmenettelytavan mukaan.

Taulukko III

Yhdiste	Arvioitujen näy- tekonsentraatioi- den alue	EC ₅₀ μM
asikloviiri*	0,032 - 20 μM	3,5
peptidi**	1,23 - 100 μM	19
asikloviiri + 2 μM peptidiä	0,32 - 20 M	1,4
asikloviiri + 4 μM peptidiä	0,32 - 20 μM	0,9
asikloviiri + 6 μM peptidiä	0,32 - 20 μM	0,9
asikloviiri + 8 μM peptidiä	0,32 - 20 μM	0,8
asikloviiri + 10 μM peptidiä	0,32 - 20 μM	0,42

* asikloviiri saatiin yhtiöstä Bourroughs Wellcome Inc.,
Kirkland, Quebec, Kanada

** Esimerkin 6 kaavan 1 mukainen otsikkopeptidi.

Tulokset osoittavat asikloviirin ja kaavan 1 mukaisen peptidin välisen synergistisen vaikutuksen siten, että lisäämällä peptidiä asikloviiriin saadaan yhdistelmiä, joilla on merkittävästi pienemmät EC₅₀-arvot kuin pelkän asikloviirin EC₅₀.

Asikloviirin ja kaavan 1 mukaisen peptidin yhdistelmän synergia voidaan osoittaa soveltamalla yllä oleviin tuloksiin

"isobolus"-menetelmää, katso J. Sühnel, Antiviral Research, 13, 23 (1990) ja siinä mainittuja viitteitä. Positiivinen tulos, joka saatiin tätä menetelmää sovellettaessa, kuvataan graafisesti oheisessa kuviossa 1.

Esimerkki 13

Vielä muita esimerkkejä tämä patenttihakemuksen kaavan 1 mukaisista peptideistä sisältyy seuraaviin taulukkoihin IV ja V yhdessä tunnusomaisten massaspektritietojen ja esimerkin 10 määrittelyn määrittystulosten, ts. IC₅₀-arvojen; ja esimerkin 11 solukasvatusmäärittelyn määrittystulosten, ts. EC₅₀-arvojen kanssa.

Taulukko IV

Kaavan 1 mukaiset yhdisteet, joilla on kaava A-B-Tbg-CH ₂ -(R)- CH-(CH ₂ C(O)CMe ₃)C(O)-Asp(cyPn)-E jossa A-B ja E tarkoittaa seuraavaa:		FAB/MS (m/z) (M+H) ⁺	IC ₅₀ μM	EC ₅₀ μM
A-B	E			
Pr ₂ CHNHC(O)	NH-(R)-CH(Me)CMe ₃	679	0,28	14
Pr ₂ CHNHC(O)	NHCH ₂ CMe ₂ Et	679	0,24	16
Pr ₂ CHNHC(O)	NHCH ₂ -(R,S)- CH(Me)Et	665	0,29	50
Pr ₂ CHNHC(O)	NHCH ₂ CHEt ₂	679	0,41	42
MePr ₂ CHNHC(O)	NHCH ₂ CMe ₂ Et	693	0,36	29
Pr ₂ CHNHC(O)	NHNHCMe ₃	666	0,22	84
Me(CH ₂ =CHCH ₂) ₂ - CNHC(O)	NHCH ₂ CMe ₃	691	0,27	30
MePr ₂ CNHC(O)	NHCH ₂ CMe ₃	678	0,28	26
Pr ₂ CHNHC(O)	NHCH ₂ -(syklo- heksyyli)	691	0,36	47
EtPr ₂ CNHC(O)	NHCH ₂ CMe ₃	693		16
(CH ₂ =CHCH ₂) ₂ - CHNHC(O)	NHCH ₂ CMe ₃	661	0,37	100
Bu ₂ CHNHC(O)	NHCH ₂ CMe ₃	693	0,53	65

Taulukko IV (jatkuu)

Kaavan 1 mukaiset yhdisteet, joilla on kaava A-B-Tbg-CH ₂ -(R)- CH-(CH ₂ C(O)CMe ₃)C(O)-Asp(cyPn)-E jossa A-B ja E tarkoittaa seuraavaa:		FAB/MS (m/z) (M+H) ⁺	IC ₅₀ μM	EC ₅₀ μM
A-B	E			
Pr ₂ CHNHC(O)	NH-(S)- CH(CMe ₃)CH ₂ OH	695	0,23	48
Me ₂ PrCNHC(O)	NHCH ₂ CMe ₃	651	0,39	58
Pr ₂ CHNHC(O)	NHCH ₂ CET ₂ Me	693	0,34	18
Pr ₂ CHNHC(O)	NHCMe ₂ CMe ₃	693	0,51	38
(CH ₂ =CHCH ₂) ₂ - CHNHC(O)	NH-(R)-CH(Me)CMe ₃	675	0,32	48
Pr ₂ CHNHC(O)	NH-(R)- CH(Me)C(Me) ₂ Et	693	0,50	21
Pr ₂ CHNHC(O)	cis-NH-(2-metyyli- sykloheksyyli)	691	0,67	75
Pr ₂ CHNHC(O)	trans-NH-(2-metyyli- sykloheksyyli)	691	0,69	60
(R,S)-EtPrCH- NHC(O)	NHCH ₂ CMe ₃	651	0,23	35
(R,S)-EtBuCH- NHC(O)	NHCH ₂ CMe ₃	665	0,26	35
Pr ₂ CHNHC(O)	NH-(R)-CH(Et)CMe ₃	693	0,34	10
Pr ₂ CHNHC(O)	NH-(2,2-dimetyyli- sykloheksyyli)	706	0,40	24
EtPr ₂ CNHC(O)	NH-(R)-CH(Me)CMe ₃	708	0,41	10
Pr ₂ CHNHC(O)	NHCH ₂ CMe ₂ Pr	694	0,42	35
Pr ₂ CHNHC(O)	NH-(R)- CH(Me)CH ₂ CMe ₃	694	0,37	14
Pr ₂ CHNHC(O)	NHCH ₂ CH ₂ CMe ₃	701*	0,58	72
Pr ₂ CHNHC(O)	NH-(R)-CH(Pr)CMe ₃	707	0,43	15

Taulukko IV (jatkuu)

Kaavan 1 mukaiset yhdisteet, joilla on kaava A-B-Tbg-CH ₂ -(R)- CH-(CH ₂ C(O)CMe ₃)C(O)-Asp(cyPn)-E jossa A-B ja E tarkoittaa seuraavaa:		FAB/MS (m/z) (M+H) ⁺	IC ₅₀ μM	EC ₅₀ μM
A-B	E			
Pr ₂ CHNHC(O)	NH-(2,2-dimetyyli- syklopentyyli)	691	0,38	31
Pr ₂ CHNHC(O)	NH-N(Me)CMe ₃	680	0,27	110
Pr ₂ CHNHC(O)	NHCH ₂ CET ₃	707	0,52	19
EtPr ₂ CNHC(O)	NH-(R)-CH(Et)CMe ₃	722	0,36	6
Pr ₂ CHNHC(O)	NH-(R)-CH(Me)CHEt ₂	693	0,33	16
Pr ₂ CHNHC(O)	NHN(Et)CMe ₃	694	0,22	80

* (M + Na)

Taulukko V

Kaavan mukaiset yhdisteet 1		FAB/MS (m/z) (M+H) ⁺	IC ₅₀ •M •M
EC ₅₀			
Pr ₂ CHNHC(O)-Tbg-CH ₂ -(R)-CH(CH ₂ - C(O)CHMe ₂)C(O)-Asp(cyPn)-NHCH ₂ - CMe ₃	673*	0,36	39
Pr ₂ CHNHC(O)-Tbg-CH ₂ -(R)-CH- (CH ₂ C(O)CH ₂ CMe ₃)C(O)-Asp(cyPn)- Leu-OH	679		80
Pr ₂ CHNHC(O)-Tbg-CH ₂ -(R)-CH{CH ₂ - C(O)-(sykloheksyyli)}C(O)-Asp(cyPn)- NHCH ₂ CMe ₃	691	0,37	61

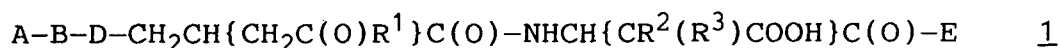
Taulukko V (jatkuu)

Kaavan mukaiset yhdisteet 1 EC ₅₀	FAB/MS (m/z) (M+H) ⁺	•M	IC ₅₀ •M
Pr ₂ CHNHC(O)-Tbg-CH ₂ -(R)-CH{CH ₂ - C(O)-(syklobutyyli)}C(O)-Asp(cyPn)- NHCH ₂ CMe ₃	663	0,31	46
Pr ₂ CHNHC(O)-Tbg-CH ₂ -(R)-CH(CH ₂ - C(O)CMe ₃)C(O)-Asp{(R)-allyyli)- NHCH ₂ CMe ₃	651	0,30	62
Pr ₂ CHNHC(O)-Tbg-CH ₂ -(R)-CH(CH ₂ - C(O)CMe ₃)C(O)-Asp{(R)-Pr}- NHCH ₂ CMe ₃	653	0,25	46
Pr ₂ CHNHC(O)-Tbg-CH ₂ -(R)-CH(CH ₂ - C(O)CMe ₂ Et)C(O)-Asp(cyPn)-NHCH ₂ - CMe ₃	679	0,21	33
Pr ₂ CHNHC(O)-Tbg-CH ₂ -(R)-CH{CH ₂ - C(O)-(1-metyylisyklopentyyli)}C(O)- Asp(cyPn)-NHCH ₂ CMe ₃	691	0,24	35
Pr ₂ CHNHC(O)-NH-(S)-CH(CMe ₂ Et)-C(O)- CH ₂ -(R)-CH(CH ₂ C(O)CMe ₃)C(O)-Asp- (cyPn)-NH-(R)-CH(Me)CMe ₃	693	0,25	13
Pr ₂ CHNHC(O)-Val-CH ₂ -(R)-CH(CH ₂ - C(O)CMe ₃)C(O)-Asp(cyPn)-NH-(R)- CH(Me)CMe ₃	665	0,22	37

*(M + Na)

Patenttivaatimukset

1. Kaavan 1 mukainen peptidi



t u n n e t t u siitä, että

A on fenyyli(alempi)alkanoyyli; fenyyli(alempi)alkanoyyli, joka on monosubstituoitu aromaattiseen osaan alemmalla alkyylillä, aminolla, halogeenillä, hydroksilla tai alemmalla alkoksilla; alempi alkanoyyli, joka on substituoitu fenyyllillä tai monosubstituoidulla fenyyllillä, jolloin monosubstituentti on alempi alkyyli, halogeeni, hydroksi tai alempi alkoksi; tai {fenyyli(alempi)alkyyli}aminokarbonyyli; ja B on $N(CH_3)-CHR^4C(O)$, jossa R^4 on alempi alkyyli; tai

A ja B yhdessä otettuna muodostavat tyydyttyneen tai tyydyttymättömän alkyyliaminokarbonyylin, jolla on kaava $R^5-NH-C(O)$, jossa R^5 on (2-10C)-alkyyli, alempi sykloalkyyli, 1-(alempi alkyyli)-(alempi sykloalkyyli), 1-(2-propenyli)-3-butenyyli, 1-metyyli-1-(2-propenyli)-3-butenyyli tai 1-etyyli-1-(2-propenyli)-3-butenyyli;

D on $NH-CHR^6C(O)$, jossa R^6 on alempi alkyyli tai alempi alkyyli, joka on monosubstituoitu karboksilla, hydroksilla, merkaptolla tai bentsyylioksilla;

R^1 on alempi alkyyli, alempi sykloalkyyli, 1-(alempi alkyyli)-(alempi sykloalkyyli), tai NR^7R^8 , jossa R^7 on vety tai alempi alkyyli ja R^8 on alempi alkyyli, tai R^7 ja R^8 yhdessä typpiätoimin kanssa, johon ne ovat kiinnittyneet, muodostavat pyrrolidinon, piperidinon, morfolinon tai 4-metyylipiperatsinon;

R^2 on vety tai alempi alkyyli ja R^3 on alempi alkyyli, tai R^2 on vety ja R^3 on alempi alkenyyli tai fenyyli-(1-4C)alkyyli, tai R^2 ja R^3 yhdessä hiiliatomin kanssa, johon ne ovat kiinnittyneet, muodostavat alemman sykloalkyylin; ja

E on NHR^9 , jossa R^9 on (4-9C)alkyyli; alempi sykloalkyyli; alempi sykloalkyyli, joka on monosubstituoitu tai disubstituoitu alemmalla alkyylillä tai (alempi alkyyli)-(alempi sykloalkyyllillä); tai E on $NHNR^{10}R^{11}$, jossa R^{10} on vety tai alempi

alkyyli ja R^{11} on (4-9C)alkyyli; tai E on $NHCH(R^{12})-Z$, jossa R^{12} on (4-9C)alkyyli, alempi sykloalkyyli tai (alempi sykloalkyyli)-(alempi alkyyli) ja Z on CH_2OH , $C(O)OH$, $C(O)NH_2$ tai $C(O)OR^{13}$, jossa R^{13} on alempi alkyyli; tai sen terapeuttisesti hyväksyttävä suola; jossa

käsite "alempi alkanoyyli" joko yksinään tai yhdistelmänä toisen radikaalin kanssa, tarkoittaa 1-oksoalkyyliiradikaalia, jonka 1-oksoalkyyliosaa on suoraketjuinen tai haaroittunut 1-oksoalkyyli, jossa on 2 - 6 hiiliatomia; käsite "alempi alkyyli" joko yksinään tai yhdistelmänä toisen radikaalin kanssa tarkoittaa suoraketjuista alkyyliiradikaalia, joka sisältää 1 - 6 hiiliatomia, ja haaroittunutta alkyyliiradikaalia, jota sisältävät 3 - 6 hiiliatomia; käsite "alempi alkoksi" tarkoittaa suoraketjuisia alkoksiradikaaleja, jotka sisältävät 1 - 4 hiiliatomia, ja haaroittuneet alkoksiradikaalit, joissa on 3 - 4 hiiliatomia; käsite "alempi sykloalkyyli" joko yksinään tai yhdistelmänä toisen radikaalin kanssa, tarkoittaa tyydyttyneitä syklisiä hiilivetyradikaaleja, jotka sisältävät 3 - 6 hiiliatomia; käsite "1-(alempi alkyyli)-(alempi sykloalkyyli)" tarkoittaa alempaa sykloalkyyliiradikaalia, jossa on 1-asemassa substituenttina alempi alkyyli; käsite "alempi alkenyyli" tarkoittaa suoraketjuista alkenyyliiradikaalia, joka sisältää 2 - 6 hiiliatomia, ja haarautunutta alkenyyliiradikaalia, joka sisältävät 2 - 6 hiiliatomia.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että A on fenyyli(alempi)alkanoyyli; (4-aminofenyyli)-(alempi)-alkanoyyli; (4-halogeenifenyyli)-(alempi)alkanoyyli, (4-hydroksifenyyli)-(alempi)alkanoyyli; (4-(alempi alkoksi)-fenyyli)-(alempi)alkanoyyli; alempi alkanoyyli, joka on disubstituoitu fenyyllillä, 4-halogeenifenyyllillä tai 4-(alempi alkoksi)fenyyllillä; tai fenyyli(alempi)alkyyliaminokarbonyyli; ja B on (N-Me)Val, (N-Me)Ile tai (N-Me)Tbg; tai A ja B muodostavat yhdessä tyydyttyneen tai tyydyttymättömän alkyyliaminokarbonyylin, jolla on kaava $R^5-NH-C(O)$, jossa R^5 tarkoittaa samaa kuin patenttivaatimuksessa 1; D on (S)-2-amino-3-hydroksi-3-metyyli-

voihapon tai (R)-2-amino-3-merkpto-3-metyyliyoihapon amino-happotähde, tai aminohappotähde, joka on Val, Ile, Tbg tai β -EtNva, R^1 on alempi alkyylili, alempi sykloalkyyli, 1-(alempi alkyylili)-(alempi sykloalkyyli), NMe_2 , NEt_2 , pyrrolidino tai morfolino; R^2 ja R^3 tarkoittaa samaa kuin patenttivaatimuksessa 1; ja E on NHR^9 , jossa R^9 on (4-9C)alkyyli; alempi sykloalkyyli; alempi sykloalkyyli, joka on monosubstituoitu tai disubstituoitu alemmalla alkyylillä; tai (alempi alkyylili)-(alempi sykloalkyyli); tai E on $NHNR^{10}R^{11}$, jossa R^{10} on vety, metyyli tai etyyli ja R^{11} on (4-9C)alkyyli; tai E on $NHCH(R^{12})-Z$, jossa R^{12} on (4-9C)alkyyli tai (alempi sykloalkyyli)-metyyli ja Z tarkoittaa samaa kuin patenttivaatimuksessa 1; tai sen terapeuttisesti hyväksyttävä suola.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että A on fenyyliasetyyli, fenyylipropionyyli, (4-amino-fenyyli)propionyyli, (4-fluorofenyyli)propionyyli, (4-hydroksifenyyli)propionyyli, (4-metoksifenyyli)propionyyli, 2-(fenyyli-metyyli)-3-fenyylipropionyyli, 2-((4-fluorifenyyli)metyyli)-3-(4-fluorifenyyli)propionyyli, 2-((4-metoksifenyyli)metyyli)-3-(4-metoksifenyyli)propionyyli tai bentsyyliaminokarbonyyli; B on (N-Me)-Val tai (N-Me)-Ile; D on Val, Ile tai Tbg; R^1 on 1-metyylietyyli, 1,1-dimetyylietyyli, 1-metyylipropyyli, 1,1-dimetyylipropyyli, 2,2-dimetyylipropyyli, syklobutyyli, syklopentyyli, sykloheksyyli, 1-metyylisyklopentyyli, NMe_2 , NEt_2 , pyrrolidino tai morfolino; R^2 on vety ja R^3 on metyyli, etyyli, 1-metyylietyyli, 1,1-dimetyylietyyli, propyyli, 2-propenyyli tai bentsyyli, ja hiiliatomilla, jossa R^2 ja R^3 ovat, on (R)-konfiguraatio, tai R^2 ja R^3 on kumpikin toisesta riippumatta metyyli tai etyyli, tai R^2 ja R^3 yhdessä hiiliatomin kanssa, johon ne ovat kiinnittyneet, muodostavat syklobutyylin, syklopentyylin tai sykloheksyylin; ja E on NHR^9 , jossa R^9 on 2-metyylipropyyli, 2,2-dimetyylipropyyli, 1(R),2,2-trimetyylipropyyli, 1,1,2,2-tetrametyylipropyyli, 1(R)-etyyli-2,2-dimetyylipropyyli, 2-(R,S)-metyylibutyyli, 2,2-dimetyylibutyyli, 3,3-dimetyylibutyyli, 1(R),2,2-trimetyylibutyyli, 1(R),3,3-trimetyylibutyyli, 2-ettylibutyyli, 2,2-dietyylibutyyli, 2-ettyli-1(R)-metyylibu-

tyyli, 2-etyyli-2-metyyllibutyli, 1(R)-etyyli-3,3-dimetyylli-butyli, 2,2-dimetyyllipentyyli, cis- tai trans-2-metyyllisykloheksyyli, 2,2-dimetyyllisykloheksyyli tai sykloheksyylimetyyli; tai E on $\text{NHNR}^{10}\text{R}^{11}$, jossa R^{10} on vety, metyyli tai etyyli ja on 1,1-dimetyyllietyyli; tai E on $\text{NHCH(R}^{12})\text{-Z}$, jossa hiiliatomilla, jossa R^{12} on, on (S)-konfiguraatio, R^{12} on 1,1-dimetyyllietyyli, 1-metyyllipropyli, 2-metyyllipropyli, 2,2-dimetyyllipropyli tai sykloheksyylimetyyli ja Z on CH_2OH , C(O)OH , C(O)NH_2 tai C(O)OR^{13} , jossa R^{13} on metyyli, etyyli tai propyyli; tai sen terapeuttisesti hyväksyttävä suola.

4. Patenttivaatimuksen 2 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että A ja B yhdessä muodostavat tyydyttyneen tai tyydyttymättömän alkylaminokarbonyylin, joka on butyyliaminokarbonyyli, 1-metyyllietyyliaminokarbonyyli, 1-metyyllipropyliaminokarbonyyli, 1-etyyllipropyliaminokarbonyyli, 1,1-dimetyyllibutyliaminokarbonyyli, 1-etyyllibutyliaminokarbonyyli, 1-propyylibutyliaminokarbonyyli, 1-etyyllipentyyliaminokarbonyyli, 1-butyylipentyyliaminokarbonyyli, 2-etyyllibutyliaminokarbonyyli, 2-etyyllipentyyliaminokarbonyyli, 1-metyyli-1-propyylibutyliaminokarbonyyli, 1-etyyli-1-propyylibutyliaminokarbonyyli, 1,1-dipropyylibutyliaminokarbonyyli, (1-propyyllisyklopentyyli)aminokarbonyyli, (1-propyyllisykloheksyyli)-aminokarbonyyli, 1-(2-propenyli)-3-butenyyliaminokarbonyyli, 1-metyyli-1-(2-propenyli)-3-butenyyliaminokarbonyyli ja 1-etyyli-1-(2-propenyli)-3-butenyyliaminokarbonyyli; D on Val, Ile tai Tbg; R^1 on 1-metyyllietyyli, 1,1-dimetyyllietyyli, 1-metyyllipropyli, 1,1-dimetyyllipropyli, 2,2-dimetyyllipropyli, syklobutyli, syklopentyyli, sykloheksyyli, 1-metyyllisyklopentyyli, NMe_2 , NEt_2 , pyrrolidino tai morfolino; R^2 on vety ja R^3 on metyyli, etyyli, 1-metyyllietyyli, 1,1-dimetyyllietyyli, propyyli, 2-propenyli tai bentsyyli, ja hiiliatomilla, jossa R^2 ja R^3 ovat, on (R)-konfiguraatio, tai R^2 ja R^3 on kumpikin toisesta riippumatta metyyli tai etyyli, tai R^2 ja R^3 yhdessä hiiliatomin kanssa, johon ne ovat kiinnittyneet, muodostavat syklobutylin, syklopentylin tai sykloheksyylin; ja E on NHR^9 , jossa R^9 on 2-metyyllipropyli, 2,2-dimetyyllipropyli, 1(R),2,2-trimetyyllipro-

pyyli, 1,1,2,2-tetrametyyllipropyli, 1(R)-etyyli-2,2-dimetyyllipropyli, 2-(R,S)-metyyllibutyli, 2,2-dimetyyllibutyli, 3,3-dimetyyllibutyli, 1(R),2,2-trimetyyllibutyli, 1(R),3,3-trimetyyllibutyli, 2-etyyllibutyli, 2,2-dietyyllibutyli, 2-etyyli-1-metyyllibutyli, 2-etyyli-2-metyyllibutyli, 1(R)-etyyli-3,3-dimetyyllibutyli, 2,2-dimetyyllipentyli, cis- tai trans-2-metyyllisykloheksyyli, 2,2-dimetyyllisykloheksyyli tai sykloheksyyli-metyyli; tai E on $\text{NHR}^{10}\text{R}^{11}$, jossa R^{10} on vety, metyyli tai etyyli ja R^{11} on 1,1-dimetyyllietyyli; tai E on $\text{NHCH(R}^{12})\text{-Z}$, jossa hiiliatomilla, jossa R^{12} on, on (S)-konfiguraatio, R^{12} on 1,1-dimetyyllietyyli, 1-metyyllipropyli, 2-metyyllipropyli, 2,2-dimetyyllipropyli tai sykloheksyyli-metyyli ja Z on CH_2OH , C(O)OH , C(O)NH_2 tai C(O)OR^{13} , jossa R^{13} on metyyli, etyyli tai propyyli; tai sen terapeuttisesti hyväksyttävä suola.

5. Patenttivaatimuksen 3 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että A on fenyylipropionyyli, 2-(fenyyli-metyyli)-3-fenyylipropionyyli tai bentsyyliaminokarbonyyli; B on (N-Me)Val; D on Tbg; R^1 on 1-metyyllietyyli, 1,1-dimetyyllietyyli, 1-metyyllipropyli, 1,1-dimetyyllipropyli, 2,2-dimetyyllipropyli, syklobutyli, syklopentyli, sykloheksyyli tai 1-metyyllisyklopentyli; R^2 on vety ja R^3 on metyyli, etyyli, 1-metyyllietyyli, propyyli tai bentsyyli, ja hiiliatomilla, jossa R^2 ja R^3 ovat, on (R)-konfiguraatio, tai R^2 ja R^3 ovat kumpikin toisesta riippumatta metyyli tai etyyli, tai R^2 ja R^3 yhdessä hiiliatomin kanssa, johon ne ovat kiinnittyneet, muodostavat syklobutyylin, syklopentyylin tai sykloheksyylin; ja E on NHR^9 , jossa R^9 on 2,2-dimetyyllipropyli, 1(R),2,2-trimetyyllipropyli, 1(R)-etyyli-2,2-dimetyyllipropyli, 2,2-dimetyyllibutyli tai 1(R)-etyyli-3,3-dimetyyllibutyli tai E on $\text{NHCH(R}^{12})\text{-Z}$, jossa hiiliatomilla, jossa R^{12} on, on (S)-konfiguraatio, R^{12} on 2,2-dimetyyllipropyli ja Z on CH_2OH , C(O)OH , C(O)NH_2 tai C(O)OR^{13} , jossa R^{13} on metyyli, etyyli tai propyyli; tai sen terapeuttisesti hyväksyttävä suola.

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että A ja B yhdessä muodostavat tyydyttyneen tai

tyydyttymättömän alkyyliaminokarbonyylin, joka on 1-etyyli-propyyliaminokarbonyyli, 1-etyyllibutyliaminokarbonyyli, 1-propyylibutyliaminokarbonyyli, 2-etyyllipentyliaminokarbonyyli, 1-metyyli-1-propyylibutyliaminokarbonyyli, 1-etyyli-1-propyyliaminokarbonyyli, 1,1-dipropyylibutyliaminokarbonyyli, (1-propyyllisyklopentyli)-aminokarbonyyli, 1-(2-propenyli)-3-butenyyliaminokarbonyyli ja 1-etyyli-1-(2-propenyli)-3-butenyyliaminokarbonyyli; D on Tbg; R¹ on 1-metyylietyyli, 1,1-dimetyylietyyli, 1-metyyllipropyyli, 1,1-dimetyyllipropyyli, 2,2-dimetyyllipropyyli, syklobutyli, syklopentyli, sykloheksyyli tai 1-metyyllisyklopentyli; R² on vety ja R³ on metyyli, etyyli, 1-metyylietyyli, propyyli tai bentsyyli, ja hiiliatomilla, jossa R² ja R³ ovat, on (R)-konfiguraatio, tai R² ja R³ ovat kumpikin toisesta riippumatta metyyli tai etyyli, tai R² ja R³ yhdessä hiiliatomin kanssa, johon ne ovat kiinnittyneet, muodostavat syklobutyylin, syklopentyylin tai sykloheksyylin; ja E on NHR⁹, jossa R⁹ on 2,2-dimetyyllipropyyli, 1(R),2,2-trimetyyllipropyyli, 1(R)-etyyli-2,2-dimetyyllipropyyli, 2,2-dimetyyllibutyli tai 1(R)-etyyli-3,3-dimetyyllibutyli tai E on NHCH(R¹²)-Z, jossa hiiliatomilla, jossa R¹² on, on (S)-konfiguraatio, R¹² on 2,2-dimetyyllipropyyli ja Z on CH₂OH, C(O)OH, C(O)NH₂ tai C(O)OR¹³, jossa R¹³ on metyyli, etyyli tai propyyli; tai sen terapeuttisesti hyväksyttävä suola.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidi, tunnettu siitä, että se on joukosta

PhCH₂CH₂C(O)-(N-Me)Val-Tbg-CH₂-(R)-CH(CH₂C(O)CMe₃)C(O)-Asp(cyPn)-γMeLeusinoli,

PhCH₂CH₂C(O)-(N-Me)Val-Tbg-CH₂-(R)-CH(CH₂C(O)CMe₃)C(O)-Asp(cyPn)-γMeLeu-OH,

PhCH₂CH₂C(O)-(N-Me)Val-Tbg-CH₂-(R)-CH(CH₂C(O)CMe₃)C(O)-Asp(cyPn)-γMeLeu-NH₂,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

$(1\text{-propyyლისyklopentyyli})\text{aminokarbonyyli-Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\text{NHCH}_2\text{CMe}_3,$

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

$\text{Pr}_2\text{CHNHC(O)-Tbg-CH}_2\text{-(R)-CH(CH}_2\text{C(O)CMe}_3\text{)C(O)Asp(cyPn)-cis-NH-(2-}$
 $\text{metyyლისykloheksyyli),}$

$\text{Pr}_2\text{CHNHC(O)-Tbg-CH}_2\text{-(R)-CH(CH}_2\text{C(O)CMe}_3\text{)C(O)Asp(cyPn)-trans-NH-}$
 $(2\text{-metyyლისykloheksyyli),}$

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

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

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

$\text{Pr}_2\text{CHNHC(O)-Tbg-CH}_2\text{-(R)-CH(CH}_2\text{C(O)CMe}_3\text{)C(O)Asp(cyPn)-NH-(2,2-}$
 $\text{dimetyylისykloheksyyli),}$

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

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

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

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

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

$\text{Pr}_2\text{CHNHC(O)-Tbg-CH}_2\text{-(R)-CH(CH}_2\text{C(O)CMe}_3\text{)C(O)Asp(cyPn)-NH-(2,2-dimetyylisyklopentyyli),}$

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

$\text{Pr}_2\text{CHNHC(O)-Tbg-CH}_2\text{-(R)-CH\{CH}_2\text{C(O)-(1-metyylisyklopentyyli)C(O)-Asp(cyPn)-NHCH}_2\text{CMe}_3$,

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

$\text{Pr}_2\text{CHNHC(O)-Val-CH}_2\text{-(R)-CH(CH}_2\text{C(O)CMe}_3\text{)C(O)Asp(cyPn)-NH-(R)-CH(Me)CMe}_3$.

8. Farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää herpesviruksen vastaisesti tehokkaan määrän patenttivaatimuksen 1 mukaista peptidiä tai sen terapeuttisesti hyväksyttävää suolaa ja farmaseuttisesti tai eläinlääketieteellisesti hyväksyttävää väliainetta.

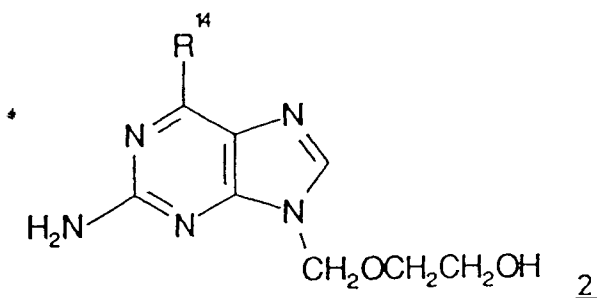
9. Kosmeettinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 1 mukaista peptidiä tai sen terapeuttisesti hyväksyttävää suolaa ja fysiologisesti hyväksyttävää väliainetta, joka soveltuu paikalliseen antoon.

10. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 7 mukainen peptidi tai sen terapeuttisesti hyväksyttävä suola herpesvirusinfektion hoitamiseksi nisäkkäällä.

11. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 7 mukainen peptidi, jolla on kaava 1, tai sen terapeuttisesti hyväksyttävä suola herpesviruksen replikaation estämiseksi.

12. Farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää farmaseuttisesti tai eläinlääketieteellisesti hyväksyttävää väliainetta ja tehokkaan määrän yhdistelmää, jossa on antiviraalista nukleosidianalogia tai sen terapeuttisesti hyväksyttävää suolaa ja patenttivaatimuksen 1 mukaista ribonukleotidireduktaasia estävää peptidiä tai sen terapeuttisesti hyväksyttävää suolaa.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että nukleosidianalogi on yhdiste, jolla on kaava 2



jossa R¹⁴ on vety, hydroksi tai amino, tai sen terapeuttisesti hyväksyttävä suola.

14. Patenttivaatimuksen 12 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että antiviraalinen nukleosidianalogi on valittu joukosta vidarabiini, idoksuridiini, trifluridiini, gansikloviiri, edoksudiini, brovaviiri, fiasitabiini, pensikloviiri, famsikloviiri ja rosikloviiri.

15. Patenttivaatimuksen 12 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että koostumus on tooppisen formulaation muodossa.

16. Koostumus, jossa on antiviraalista nukleosidianalogia tai sen terapeuttisesti hyväksyttävää suolaa ja patenttivaatimuksen 1 mukaista ribonukleotidireduktaasia estävää peptidiä tai sen

terapeuttisesti hyväksyttävää suolaa hoidettaessa herpes-virusinfektiota nisäkkäällä.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se on joukosta asyloviiri, 6-deoksiasyloviiri, 2,6-diamino-9-((2-hydroksietoksi)metyyli)puriini, vidarabiini, idoksuridiini, trifluridiini, gansikloviiri, edoksudiini, brovaviiri, fiasitabiini, pensikloviiri, famsikloviiri ja rosikloviiri.

18. Patenttivaatimuksen 8 mukainen farmaseuttinen koostumus hoidettaessa herpes simplex-virusten, tyyppien 1 ja 2 infektioita nisäkkäällä, t u n n e t t u siitä, että kaavan 1 mukainen peptidi on joukosta

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

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

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

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

$(1\text{-propyyllisyklopentyyli})\text{aminokarbonyyli-Tbg-CH}_2-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CMe}_3)\text{C}(\text{O})-\text{Asp}(\text{cyPn})-\text{NHCH}_2\text{CMe}_3,$

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

19. Menetelmä valmistaa patenttivaatimuksen 1 mukaista peptidiä tai sen terapeuttisesti hyväksyttävää suolaa, t u n n e t t u siitä, että

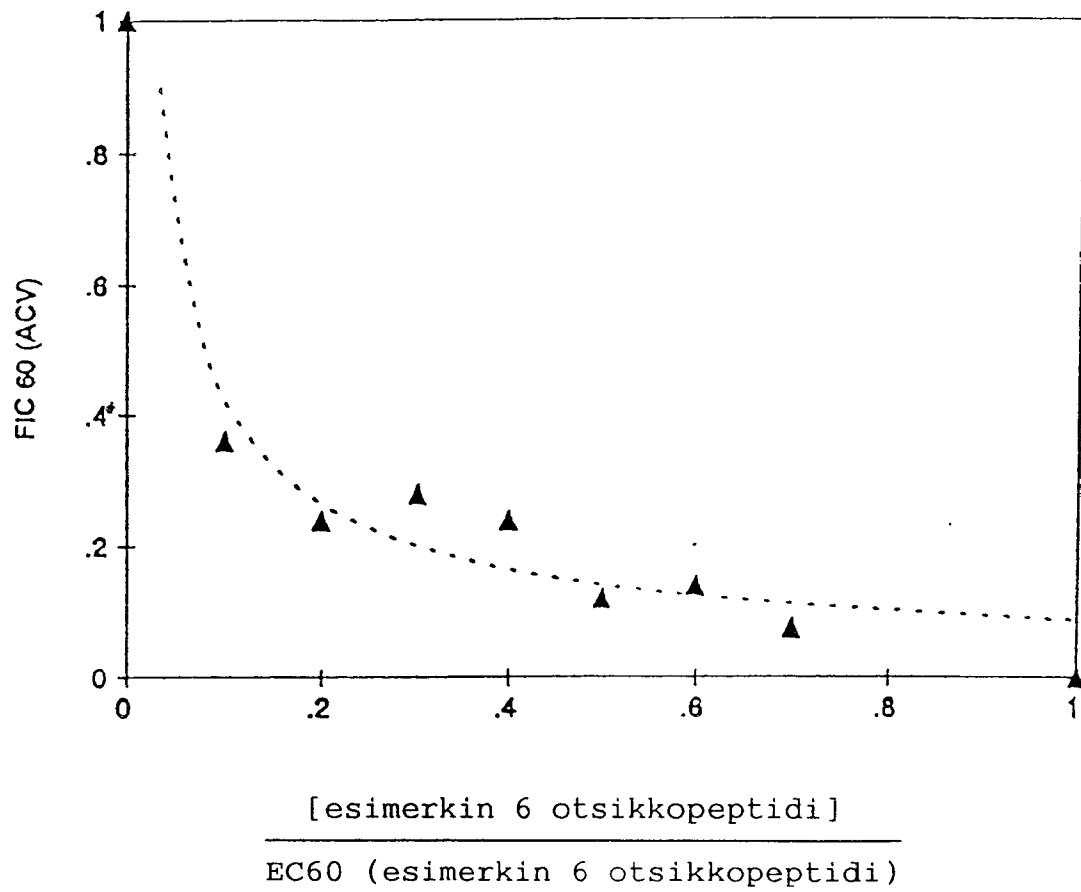
a) liitetään vaiheittain peptidin, aminohapon tai johdettujen aminohappotähteiden ja peptidin ei-peptidifragmenttien sekvenssin järjestyksessä, jossa

i) jäännösten ja fragmenttien reaktiiviset sivuketjoryhmät suojataan sopivilla suojaryhmillä, jotka estävät kemiallisen reaktion tapahtumisen siinä paikassa, kunnes suoja ryhmä lopulta poistetaan vaiheittain tapahtuvan liittämisen jälkeen;

ii) liittämisreaktantin α -aminoryhmä suojataan α -amino-suojaryhmällä samalla kun vapaa karboksiryhmä liittyy toisen reaktantin vapaan α -aminoryhmän kanssa; α -aminosuojaryhmä on sellainen, että se voidaan selektiivisesti poistaa seuraavan reaktion tapahtumisen sallimiseksi tuossa α -aminoryhmässä; ja

iii) aminohappojäännöksen tai peptidifragmentin C-terminaalinen karboksyyli, josta on määrä tulla suojatun peptidin C-terminaalinen funktio, mikäli sellainen on läsnä, suojataan sopivalla suojaryhmällä, joka estää kemiallisen reaktion tapahtumisen tuossa paikassa kunnes suojaryhmä poistetaan sen jälkeen kun haluttu aminohapposekvenssi peptidille on koottu; ja

b) liittämisen jälkeen poistetaan kaikki suojaryhmät ja haluttaessa suoritetaan standardimuunnokset, jolloin saadaan patenttivaatimuksen 1 mukaista peptidiä; ja haluttaessa muunnetaan peptidi sen terapeuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi.



KUVIO 1