

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 7/64

C12P 21/00 A61K 38/13



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96196264. X

[45] 授权公告日 2004 年 3 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 1141317C

[22] 申请日 1996. 7. 17 [21] 申请号 96196264. X

[30] 优先权

[32] 1995. 7. 17 [33] EP [31] 95111162. 4

[86] 国际申请 PCT/EP96/03129 1996. 7. 17

[87] 国际公布 WO97/04005 德 1997. 2. 6

[85] 进入国家阶段日期 1998. 2. 13

[71] 专利权人 碳化学公司

地址 瑞士比尼根

[72] 发明人 J·M·路施格

审查员 沈志红

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 杜京英

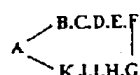
权利要求书 3 页 说明书 8 页

[54] 发明名称 有抗人体免疫缺损病毒作用的环孢菌素衍生物

[57] 摘要

本发明涉及通式 I 所示的新环肽物质, 其中 A - K 表示下列的氨基酸片断: A 是由通式 II 所示取代的高苏氨酸, $R_1 - CH_2CH(CH_3) - CH(OH) - CH(NHCH_3) - COOH$ II 其中 R_1 是正丙基或丙烯基, 双键物质优选为反式构型, B 是 α - 氨基丁酸, 缬氨酸, 正缬氨酸或苏氨酸, C 是由通式 III 所示的 (D) - 氨基酸, $CH_3NH - CH(R) - COOH$ III 其中 R 是 $C_2 - C_6$ 烷基, 链烯基, 炔基, 这些基团可以是直链或支链的, 并可被羟基, 氨基, $C_1 - C_4$ 烷基氨基, $C_1 - C_4$ 二烷基氨基, 烷氧基或酰氧基进一步取代, $COOR_2$, $CONHR_2$, 其中 R_2 可是直链或支链的 $C_1 - C_4$ 烷基, $X - R_3$, 其中 X 是 O 或 S, R_3 是直链或支链的 $C_1 - C_4$ 烷基, 链烯基, 炔基, 并且当 X 为 S 时, R_3 也可是芳香基或杂芳基, 卤素, 优选氟, 氰基, 或 CHR_4R_5 , 其中 R_4 是氢, 甲基, 乙基或苯

基, 并且 R_5 是氢, 羟基或卤素, 优选氟, 还包括氨基, $C_1 - C_4$ 烷基氨基, $C_1 - C_4$ 二烷基氨基, 酰氧基, 优选乙酰氧基, 以及叔 - 丁氧基羰基 - 氨基乙氧基 - 乙氧基 - 乙酰氧基, 或烷氧基羰基, 优选丁氧基羰基, D 是 N - 甲基 - γ - 羟基亮氨酸或 N - 甲基 - γ - 乙酰氧基亮氨酸, E 是缬氨酸, F, I 和 J 都是 N - 甲基亮氨酸, G 是丙氨酸, H 是 (D) - 丙氨酸或 (D) - 丝氨酸, K 是 N - 甲基缬氨酸。本发明也涉及这些肽的制备方法及其预防人免疫缺陷病毒感染用途。



I

1. 一种如通式 I 所示的环肽物质,



其中 A-K 表示下列的氨基酸片断:

A 是通式 II 所示取代的高苏氨酸,



其中 R_1 是正丙基或丙烯基, 双键为反式构型,

B 是 α -氨基丁酸, 缬氨酸, 正缬氨酸或苏氨酸,

C 是由通式 III 所示的 (D)-氨基酸,



其中

R 是 C_2-C_6 烷基, 链烯基, 炔基, 这些基团可以是直链或支链的, 并可被羟基, 氨基, C_1-C_4 烷基氨基, C_1-C_4 二烷基氨基, 烷氧基或酰氧基再进一步取代,

COOR_2 , CONHR_2 , 其中 R_2 可是直链或支链的 C_1-C_4 烷基,

$\text{X}-\text{R}_3$, 其中 X 是 O 或 S, 并且 R_3 是直链或支链的 C_1-C_4 烷基, 链烯基, 炔基, 并且当 X 为 S 时, R_3 也可是芳香基或杂芳基,

卤素,

氰基, 或

CHR_4R_5 , 其中 R_4 是氢, 甲基, 乙基或苯基, 并且 R_5 是氢, 羟基或卤素, 还有氨基, C_1-C_4 烷基氨基, C_1-C_4 二烷基氨基, 酰氧基, 以及, 叔-丁氧基羰基-氨基乙氧基-乙氧基-乙酰氧基, 或烷氧基羰基,

D 是 N-甲基- γ -羟基亮氨酸或 N-甲基- γ -乙酰氧基亮氨酸,

E 是缬氨酸,

F, I 和 J 都是 N-甲基亮氨酸,

G 是丙氨酸,

H 是 (D)-丙氨酸或 (D)-丝氨酸,

K 是 N-甲基缬氨酸。

2. 根据权利要求 1 所述的通式 I 中的环肽物质, 其中 A 的 R_1 基团是丙烯基, B 是 α -氨基丁酸, D 是 N-甲基- γ -羟基亮氨酸, E 是缬氨酸, F, I 和 J 分别是 N-甲基亮氨酸, G 是丙氨酸, H 是 (D)-丙氨酸, K 是 N-甲基缬氨酸。

3. 根据权利要求 2 所述的通式 I 的环肽物质, 其中通式 III 中所示的 R 基团为

甲基, 乙基, 丙基, 烯丙基, 炔丙基, 羟甲基, 羟乙基, 羟苄基, 氨基甲基, 甲氨基甲基, 二甲氨基甲基, 乙氨基甲基, 二乙氨基甲基, 丙氨基甲基, 异丙氨基甲基, 二丙氨基甲基, 二异丙氨基甲基, 叔丁基氨基甲基, 氟代甲基, 甲氧基甲基, 乙氧基甲基, 甲氧基羰基, 乙氧基羰基, 丙氧基羰基, 异丁氧基羰基, 甲氧基羰基, 乙氧基羰基, 丙氧基羰基, 异丙氧基羰基, 苯基氨基羰基, 甲氧基羰基, 乙氧基羰基, 丙氧基羰基, 叔丁氧基羰基, 甲氧基, 乙氧基, 丙氧基, 异丙氧基, 正丁氧基, 异丁氧基, 叔丁氧基, 羟乙氧基, 甲硫基, 乙硫基, 羟基乙硫基, 丙硫基, 异丙硫基, 正丁基硫基, 异丁基硫基, 叔丁基硫基, 苯基硫基, 2-吡啶基硫基, 苯并噻唑-2-基硫基。

4. 3-N-甲基-(D)-丝氨酸-4-(γ -羟基)-N-甲基-亮氨酸环孢菌素。

5. 一种通式 I 所示化合物的制备方法, 通式中的 C 如权利要求 1 中所定义, D 是 N-甲基- γ -羟基亮氨酸, 该制备方法包括: 将通式 I 所示的环肽利用微生物进行羟基化, 该通式 I 中的 D 代表 N-甲基亮氨酸。

6. 根据权利要求 5 所述的制备方法, 其中的微生物是 *Sebekia Benihana*。

7. 一种通式 I 所示化合物的制备方法, 该通式 I 中的 D 代表 N-甲基- γ -羟基亮氨酸, 该方法包括: 利用合适的碱, 将通式 I 所示环肽转化为聚阴离子, 其中通式 I 中的 C 是肌氨酸, D 为 N-甲基- γ -羟基-亮氨酸, 再将该聚阴离子与适当的亲电性试剂反应, 转化成为权利要求 1 中所述的产物。

8. 一种药物组合物, 其中包括一种或多种如权利要求 1 中所述的环肽物质

和药用可接受性稀释剂或赋形剂。

9. 权利要求 1 所述化合物用于制备成治疗或防止由人体免疫缺损病毒引起的感染的药物的应用。

10. 通式 I 所示环肽的聚阴离子, 其中的式 C 为肌氨酸, 同时 D 为 N- 甲基- γ - 羟基亮氨酸。

11. 通式 I 环肽的聚阴离子, 具体为 4- (γ - 羟基) - N- 甲基亮氨酸- 环孢菌素。

有抗人体免疫缺损病毒作用的环孢菌素衍生物

本发明涉及一种新的由环孢菌素类物质衍生得到的环肽物质，该环肽不仅对人体免疫缺损性病毒（HIV）具有很强的抑制作用，而且没有任何的免疫抑制活性。此类环肽物质尤其是在欧洲专利 EP 484 281 中特别请求给予保护。其中，此专利的说明书中明确请求保护的物质之一是（ γ -羟基-N-甲基亮氨酸）环孢菌素。虽然此物质由环孢菌素 A 经微生物羟基化作用即可容易地制备得到，但在 EP 484 281 中指出，与具有最强抗 HIV 活性并被称为甲基异亮氨酸-4-环孢菌素或甲基缬氨酸-4-环孢菌素相比，该物质的抗 HIV 活性要低 5-6 倍。此 3 种物质都没有免疫抑制活性。出乎意料的是，该环孢菌素氨基酸中肌氨酸的 3 位亚甲基上引入适当的取代基，其抗 HIV 活性将被显著地提高，但免疫抑制活性并没有任何增加。环孢菌素 A 可用于防止器官移植后产生器官移植排异作用，但所需环孢菌素 A 的治疗剂量很高，并且环孢菌素衍生物在抗 HIV 治疗中所需的剂量也同样的较高，因此本发明的目的是提供新的环孢菌素衍生物，该衍生物具有高效抗 HIV 活性，同时这些环孢菌素衍生物可由环孢菌素 A 只经过几个步骤即制备得到，而环孢菌素 A 作为产品现已被成吨的生产出来。

本发明还涉及通式 I 所示的新环肽物质，



其中 A - K 表示下列的氨基酸片断：

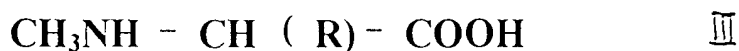
A 是由通式 II 所示取代的高苏氨酸，



其中 R_1 是正丙基或丙烯基，双键物质优选为反式构型，

B 是 α -氨基丁酸，缬氨酸，正缬氨酸或苏氨酸，

C 是由通式 III 所示的（D）-氨基酸，



其中

R 是 $C_2 - C_6$ 烷基, 链烯基, 炔基, 这些基团可以是直链或支链的, 并可被羟基, 氨基, $C_1 - C_4$ 烷基氨基, $C_1 - C_4$ 二烷基氨基, 烷氧基或酰氧基进一步取代,

$COOR_2$, $CONHR_2$, 其中 R_2 可是直链或支链的 $C_1 - C_4$ 烷基,

$X - R_3$, 其中 X 是 O 或 S, R_3 是直链或支链的 $C_1 - C_4$ 烷基, 链烯基, 炔基, 并且当 X 为 S 时, R_3 也可是芳香基或杂芳基,

卤素, 优选氟,

氰基, 或

CHR_4R_5 , 其中 R_4 是氢, 甲基, 乙基或苯基, 并且 R_5 是氢, 羟基或卤素, 优选氟, 还包括氨基, $C_1 - C_4$ 烷基氨基, $C_1 - C_4$ 二烷基氨基, 酰氧基, 优选乙酰氧基, 以及叔-丁氧基羰基-氨基乙氧基-乙氧基-乙酰氧基, 或烷氧基羰基, 优选丁氧基羰基,

D 是 N-甲基- γ -羟基亮氨酸或 N-甲基- γ -乙酰氧基亮氨酸,

E 是缬氨酸,

F, I 和 J 都是 N-甲基亮氨酸,

G 是丙氨酸,

H 是 (D)-丙氨酸或 (D)-丝氨酸,

K 是 N-甲基缬氨酸。

本发明的一个重要组成要素是通式 III 所示氨基酸 C 的 R 基团所代表的不同基团。通式 III 中的 R 基团实例为直链或支链的 $C_1 - C_6$ 烷基, 链烯基或炔基, 其中这些基团还可进一步被羟基, 烷氧基, 酰氧基, $C_1 - C_4$ 烷基氨基, 或 $C_1 - C_4$ 二烷基氨基取代。具体例如甲基, 乙基, 丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 叔丁基, 戊基, 异戊基, 新戊基, 叔戊基, 己基, 环丙甲基, 烯丙基, 丁烯基, 戊烯基, 异戊烯基, 炔丙基和丁炔基。R 基团中的烷氧基和酰氧基取代基可具体选自甲氧基, 乙氧基, 丙氧基, β -甲氧基乙氧基, 还有乙酰氧基或新戊酰氧基。R 基团中的 $C_1 - C_4$ 烷基氨基和 $C_1 - C_4$ 二烷基氨基取代基可具体选自甲基氨基, 二甲基氨基, 乙基氨基, 二乙基氨基, 丙基氨基, 异丙基氨基, 二丙基氨基, 二异丙基氨基和叔丁基氨基。R 的 R_2 基团可以代表甲基, 乙基, 丙基, 异丙基, 正丁基,

异丁基或叔丁基。另外，R 还可以是卤素和氰基。R₃和 X - R₃基团是直链或支链的 C₁ - C₄烷基，链烯基，或炔基，并且当 X 是 S 时，也可能是芳香基和杂芳基。具体的芳香基例如苯基，1 - 萘基和 2 - 萘基，杂芳基的例子有 2 - 吡啶基，3 - 吡啶基，4 - 吡啶基，2 - 嘧啶基，4 - 嘧啶基，吡嗪基和苯并噻唑 - 2 - 基。

优选的化合物是，A 的 R₁基团为丙烯基，B 是 α - 氨基丁酸，D 是 N - 甲基 - γ - 羟基亮氨酸，E 是缬氨酸，F，I 和 J 各自为 N - 甲基亮氨酸，G 是丙氨酸，H 是 (D) - 丙氨酸和 K 是 N - 甲基缬氨酸。

在此结构式中，通式 III 中的 R 基团是甲基，乙基，丙基，烯丙基，炔丙基，羟甲基，羟乙基，羟苄基，氨基甲基，甲氨基甲基，二甲氨基甲基，乙氨基甲基，二乙氨基甲基，丙氨基甲基，异丙氨基甲基，二丙氨基甲基，二异丙氨基甲基，叔丁基氨基甲基，氟代甲基，甲氧基甲基，乙氧基甲基，甲氧基羰基，乙氧基羰基，丙氧基羰基，异丁氧基羰基，甲氨基羰基，乙氨基羰基，丙氨基羰基，异丙氨基羰基，苯基氨基羰基，甲氧基羰甲基，乙氧基羰甲基，丙氧基羰甲基，叔丁氧基羰甲基，甲氧基，乙氧基，丙氧基，异丙氧基，正丁氧基，异丁氧基，叔丁氧基，羟乙氧基，甲硫基，乙硫基，羟基乙硫基，丙硫基，异丙硫基，正丁基硫基，异丁基硫基，叔丁基硫基，苯硫基，2 - 吡啶基硫基，苯并噻唑 - 2 - 基硫基，氰基或氟。

新化合物的制备首先是将通式 I 所示环肽与适当的碱反应，制备成聚阴离子物质，其中通式 I 中的 D 是甲基亮氨酸，然后将此聚阴离子与适宜的亲电性试剂反应，适当时，引入新的取代基团以进一步转化，使氨基酸 C 产生预期的取代反应。产物经微生物转化作用后被羟基化。另一种可选择的制备新化合物的方法包括，如上所述，首先是由通式 I 所示环肽与适当的碱反应，制备成聚阴离子物质，其中通式 I 中的 D 是 N - 甲基 - γ - 羟基 - 亮氨酸，然后将此聚阴离子物质与适宜的亲电性试剂反应，适当时，引入新的基团以达到进一步转化，得到预期的取代氨基酸 C。聚阴离子物质是通过适当的起始反应物溶液与合适的碱进行反应后得到的，该反应溶液所用的溶剂为无水溶剂，例如四氢呋喃，反应在低温下进行，优选的反应温度为低于零下 40 度，所用碱是过量的，优选的碱是溶于无水四氢呋喃中的

二异丙氯化锂；然后，所得聚阴离子物质与适当的亲电性试剂结合。此方法基本上已经被 Seebach 等人所公开（D.Seebach 等人，*Helv.Chim.Acta*，第 76 卷，1564 - 1590 页，1993）。另外，适宜的碱还包括碱金属氮化物，例如二乙基氯化锂，或六甲基二硅杂叠氮化物；还有碱金属醇盐，例如甲醇钾，叔丁醇钾，叔戊醇钾，和甲醇钠。适用亲电性试剂具体有烷基卤，例如，碘甲烷，碘乙烷，烯丙基溴和苄基溴；烷氧甲基卤，例如，甲氧基甲基氯，甲氧基乙氧基甲基氯，和苄氧基甲基氯；或羰基化合物，例如醛或某些酮，具体的例子有甲醛，乙醛，苯甲醛，丙酮，或环酮，例如环丙酮和它的高级同系物；以及碳酸的反应衍生物，例如异氰酸盐，和有机羧酸活性衍生物，例如酯，具体的例子有甲酸甲酯，草酸二乙酯，苯甲酸乙酯和烟酸乙酯。其它适用的亲电性试剂是卤素，以及正性卤素的其它种类，例如 N - 氯代琥珀酰亚胺，N - 溴代琥珀酰亚胺，N - 氟代 - N - 新戊基 - p - 甲苯磺酰胺，全氯氧代氟化物；N - 卤化氰，例如氰化氯；还有二硫化物和它们的铊盐，例如二甲基硫，二甲基硫甲基碘化铊，二苯基二硫化物，二吡啶基二硫化物，和 2，2' - 苯并噻唑基二硫化物。与这些亲电性试剂进行反应，可形成一个新的手性中心。根据不同的反应条件，可得到两种非对映异构体的混合物，而该混合物中的两种非对映体中的一种是优势产物。这些新的非对映体彼此不同，这是由通式 I 所示氨基酸 C 的差异造成的，该非对映体的构型分别是（D）构型和（L）构型。本发明中优选的非对映体是通式 I 所示的（D）构型氨基酸 C 的非对映异构体。导致优选生成（D）构型非对映体或（L）构型非对映体的反应因素，及所用碱对反应的影响，以及亲电性试剂的选择范围，都由 Seebach 等人在环孢菌素 A 为起始反应物的制备试验中做了细致的研究，并在文献中有详细的报导（D.Seebach 等人，*Helv.Chim.Acta*，第 76 卷，1564 - 1590 页，1993），其它的作者对这些试验报导也做了鉴定性地评价（S.David, *Chemtracts Organic Chemistry*, 第 6 卷，303 - 306 页，1993）。本发明也对反应条件进行了描述，该反应条件的主要作用是非对映体的形成，那些非对映体在 C 位氨基酸上可形成（D）构型的新手性中心。本发明还证明了可采用 4 - (γ - 羟基) - N - 甲基 - 亮氨酸环孢菌素代替环孢菌素 A 作为反应起始物的可行性。将 4 - (γ - 羟基) - N

- 甲基 - 亮氨酸环孢菌素作为反应起始物并应用于这种转化是新的应用, 也是本发明发明内容的一部分。

通常, 在这类情况中得到的优势产物还是 (D) 构型氨基酸。

可利用多种放线菌属的微生物来完成对 D 氨基酸 γ 位的微生物羟基化作用, 例如采用 Eur.J.Immunol.1987,17,1359.中描述的 *Sebekia benihana* 。这种转化的重要性主要是在于, 它只经过一步就几乎消除了环孢菌素全部的免疫抑制活性。

在具有低毒性的同时, 通式 I 所示的化合物具有很高的生物活性, 尤其是它们表现出对人体免疫缺损病毒 (HIV) 的抑制作用, 因此可作为抗 HIV 感染的药物。经适当的体内试验并选择 0.05-50mg/l 的浓度即可观察到此抑制作用。通式 I 所示的化合物, 适当时, 和它们的盐可单独作为药物, 或无机或有机的药用惰性辅料结合以制备成适用的药物。

实施例 1

3 - N - 甲基 - (D) - 丝氨酸 - 4 - (γ - 羟基) - N - 甲基亮氨酸环孢菌素的制备

Eur.J.Immunol.,1987,17 卷, 1359 页中描述了微生物转化作用, 利用 *Sebdkia benihana* 将环孢菌素 A 中 N - 亮氨酸 γ 位进行羟基化, 该生物转化可将 3 - N - 甲基 - (D) - 丝氨酸环孢菌素制备得到 3 - N - 甲基 - (D) - 丝氨酸 - 4 - γ - 羟基 - N - 甲基亮氨酸环孢菌素。所用的菌株被描述为 NRLL 11111, 它属于游动放线菌科。

起始培养:

NRLL 11111 的琼脂培养物在无菌培养介质和 27 °C 条件下培养 10 天, 该灭菌介质的 PH 值调至 7, 并且它是由 20g 葡萄糖, 10g 酵母提取物 (Gistex), 10g 胨, 40g 淀粉, 2g 碳酸钙, 40g 琼脂, 和 1 升水组成。

预培养:

预培养介质由 35g 葡萄糖, 50g 淀粉, 12.5g 胨, 50g 麦精, 22.5g 酵母提取物, 和 5g 碳酸钙, 和 5 升水组成。另外, 该介质含有 5ml 的由示踪组分组成的溶液 [1ml 浓硫酸, 5g 硫酸亚铁 (II) 七水合物, 50mgKI, 100mg 硼酸, 4g 硫酸锌七水合物, 2g 氯化镁 (II) 四水合物, 200g 硫

酸铜五水合物和 2g 氯化钴六水合物，这些组分溶于 1l 蒸馏水中]。起始培养物的芽孢和菌丝体悬浮在 10ml 的 0.9% 盐溶液中，该悬浮液加入到 100ml 的灭菌预培养介质中。此培养物在 27 °C 下振摇四天，振摇是在转速为 200 转/分钟的轨道摇动器上进行。四天后，将预培养物用与培养介质稀释（1:10）并再振摇三天。

主培养:

将用于主培养的发酵介质（1 升蒸馏水，1ml 如上所述的示踪组分溶液，200mg 钼酸铵，255mg 磷酸氢二钾，120mg 磷酸二氢钾，100mg 硫酸镁七水合物，50mg 氯化钙六水合物，12.5g 大豆粉，2.5g 酵母提取液，10g 淀粉，10g 糊精和 10g 西瑞糖）调至 PH 等于 7.3，并在 120 °C 下灭菌 20 分钟。将上述得到的预培养物 10ml 加入到发酵介质中，混合物在 27 °C 下振摇 24 小时，振摇由轨道摇动器完成，然后将 100mg 3 - N - 甲基 - (D) - 丝氨酸 - 环孢菌素加入其中，并继续振摇 3 天。

3 - N - 甲基 - (D) - 丝氨酸 - 4 - (γ - 羟基) - N - 甲基亮氨酸环孢菌素的分离

经过滤将菌丝体从主培养物中分离出来，滤液用二氯甲烷提取 5 次。合并后的提取液用旋转蒸发器浓缩，残留物用 250g 硅胶（Merck 硅胶，颗粒大小为 0.4-0.63 目）进行色谱分离。环孢菌素部分再用 70g 硅胶进行色谱分离，得到 15mg 3 - N - 甲基 - (D) - 丝氨酸 - 4 - (γ - 羟基) - N - 甲基亮氨酸环孢菌素的无定形粉末。该物质的旋光度是 $[\alpha]_D = -166^\circ$ （ $c = 0.5$ ，二氯甲烷）。该产物可用甲醇结晶，所得结晶产物的熔点是 150 - 152 °C，在其溶于氘化的 DMSO 的 ^1H NMR 谱中，N - 甲基 - γ - 羟基 - 亮氨酸上的两个甲基在 1.05ppm 处呈单峰。

实施例 2:

3 - N - 甲基 - (D) 丝氨酸环孢菌素的制备

此物质的制备方法已由 D.Seebach 等人在 *Helv.Chimica Acta* 的第 76 卷，第 1564 - 1590 页，1993 的文献中公开。

该物质可按下列方式得到:

2a) 3- α -甲氧基羰基环孢菌素

在 0℃和惰性气体(氩气)保护下,将 30ml 的 1.6mol 正丁基锂的己烷溶液滴加到 8.7ml 二异丙胺的 800ml THF 中的溶液。0℃下保持 20 分钟,随后将该溶液冷却至 -78℃,把预先冷却到 -78℃的 10.0g 环孢菌素 A 在 150ml 无水四氢呋喃中的溶液分次加入到上述该溶液中。所得混合物在 -78℃下搅拌 1 小时,然后通入干燥的 CO₂ 气流。6.4ml 的氯甲酸甲酯滴加到混合物中,并且在 -78℃继续搅拌 2 小时。然后,加入 1.1ml 的二异丙胺,反应温度可升至 20℃,混合物在此温度下搅拌 14 小时;再把混合物加热回流 45 分钟。随后,混合物冷却到 20℃,加入 100ml 的 10% 磷酸,水相用 600ml 的乙酸乙酯萃取。水相再继续用乙酸乙酯抽提数次。合并有机提取液,用硫酸镁干燥,并真空至干。所得油状物用 500g 硅胶(0.02-0.05 目)进行色谱分离,流动相是乙酸乙酯与环己烷的 4:1 的混合物。含有产物的馏分合并在一起,并将溶剂真空蒸除。得到 1.9g 的 3- α -甲氧基羰基环孢菌素的无色粉末,该物质的熔点是 138℃。

2b) 3-N-甲基-D-丝氨酸环孢菌素

在 0℃下,将 2.4ml 的 2.0mol 硼氢化锂在四氢呋喃中的溶液滴加到 1.0g 3- α -甲氧基羰基环孢菌素在 30ml 无水四氢呋喃中的溶液。该混合物在 0℃下搅拌 22 小时。随后加入 2ml 蒸馏水,再滴加 10% 的盐酸,然后再加入 10ml 的蒸馏水。此混合物与 25ml 乙酸乙酯共同振摇,随后静置分层,其中的水相层继续用乙酸乙酯萃取 3 次,每次所用乙酸乙酯的量是 50ml。合并有机提取液并用硫酸镁干燥,然后在真空下浓缩。残留物用 300g 硅胶进行色谱分离,流动相是乙酸乙酯。将含有产物的馏分合并在一起,并在真空下浓缩,得到 401mg 的 3-N-甲基-(D)-丝氨酸-环孢菌素的无色不定形粉末,该产物的熔点是 128-130℃。

实施例 3:

从 4-(γ -羟基)-N-甲基亮氨酸环孢菌素制备

3-N-甲基-(D)-丝氨酸-4-(γ -羟基)-N-甲基亮氨酸环孢菌素

在 0℃ 和惰性气体（氩气）保护下，将 5ml 的 1.6mol 正丁基锂的己烷溶液滴加到 1.12ml 二异丙胺于 50ml THF 中的溶液。0℃ 下保持 20 分钟，随后将该溶液冷却至 -78℃，把预先冷却到 -78℃ 的 1.2g 4-(γ -羟基)-N-甲基-亮氨酸环孢菌素在 50ml 无水四氢呋喃中的溶液分次加入到上述该溶液中。所得混合物在 -78℃ 下搅拌 1 小时，再利用氩气的微气流将单体甲醛通入到反应混合物中。混合物在 -78℃ 继续搅拌 2 小时。然后，反应温度可升至 20℃，加入 10ml 的 10% 磷酸，水相用 100ml 的乙酸乙酯萃取。水相再继续用乙酸乙酯抽提数次。合并有机提取液，用硫酸镁干燥，并真空至干。所得油状物用 100g 硅胶（0.02-0.05 目）进行色谱分离，流动相是乙酸乙酯。将含有产物的馏分合并在一起，并将溶剂真空蒸除。该方法得到 5mg 的 3-N-甲基-(D)-丝氨酸-4-(γ -羟基)-N-甲基亮氨酸环孢菌素。根据其物理化学指标，用本方法制备的该物质与实施例 1 中描述的物质是相同的。

抗病毒活性试验：

在本试验中采用由 Myoshi 等人公开的（Nature 294,770-771,1981）的 MT4 的 T 细胞系。在 37℃ 下，细胞对 HIV-1（菌株 IIIB）进行 2 小时的吸附。然后将种菌移去，感染细胞转移到组织培养皿中，这些培养皿中含有不同浓度待测化合物。在菌系中，该病毒的种菌被选定识别，随后导致细胞上清液中病毒 p24 抗原的浓度呈指数倍增长，这些变化是自感染后第 4 天开始的。在感染后第 3 或 4 天，利用 ELISA 法（酶联免疫吸附测定法）来分析细胞上清液中的 p24 抗原。经感染过的并用待测物质处理过的细胞上清液中 p24 的浓度，与感染过但未经处理的对照细胞上清液中的 p24 浓度进行比较，可测定得到 IC₅₀ 值。在本试验中，3-N-甲基-(D)-丝氨酸-4-(γ -羟基)-N-甲基亮氨酸环孢菌素的 IC₅₀ 是 0.1mg/l，与此相比，环孢菌素 A 的 IC₅₀ 值是 0.5mg/l。