

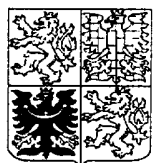
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

285 997

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **3089-95**

(22) Přihlášeno: **02. 04. 94**

(30) Právo přednosti:
18. 06. 93 DE 93/4320201

(40) Zveřejněno: **13. 03. 96**
(Věstník č. 3/96)

(47) Uděleno: **18. 10. 99**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **15. 12. 99**
(Věstník č. 12/99)

(86) PCT číslo: **PCT/EP94/01037**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 95/00168**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 38/04

A 61 K 38/00

(73) Majitel patentu:

ASTA MEDICA AKTIENGESELLSCHAFT,
Dresden, DE;

(72) Původce vynálezu:

Engel Jürgen Prof. Dr., Alzenau, DE;
Kutscher Bernhard Dr., Maintal, DE;
Bernd Michael Dr., Frankfurt am Main, DE;
Niemeyer Ulf Dr., Offenbach, DE;

(74) Zástupce:

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

(54) Název vynálezu:

**Peptid se sekvencí aminokyselin
a jeho použití pro výrobu
farmaceutického prostředku**

Ac-D-Nal/2/-D-Phe/4-Cl/-xxx-A-B-yyy-zzz-Arg-C-D-
-Ala-NH₂

(57) Anotace:

Popisuje se peptid se sekvencí aminokyselin obecného vzorce I, ve kterém xxx = D-Pal/3/, D-Phe/4-Cl/, D-Trp, yyy = D-cit, D-Lys/R/, D-Arg, D-Hci, kde R byl vybrán ze skupiny, sestávající z /C₁-C₄/-acylu a /C₁-C₁₀/-alkylu, zzz = L-Leu, Nle, Nva, t-Leu a A = Ser, Ser/cukr/, přičemž zbytek cukru byl vybrán ze skupiny, sestávající z glukózy, galaktózy, allózy, altrózy, manózy, gulózy, idózy, talózy, B = Tyr, Lys/Nic/, Mop a C = Pro, Ala a jeho farmaceuticky přijatelné soli. Popisuje se rovněž farmaceutický prostředek pro potírání AIDS a ARC, který obsahuje nejméně jeden popisovaný peptid nebo jeho sůl a konečně se popisuje i použití uvedených peptidů pro potírání AIDS a/nebo ARC.

CZ 285 997 B6

Peptid se sekvencí aminokyselin a jeho použití pro výrobu farmaceutického prostředkuOblast techniky

5

Předmětem vynálezu je peptid se sekvencí kyselin, zejména nonapeptid a dekaeptid, a jeho použití pro výrobu léčiv pro potírání AIDS.

10 Dosavadní stav techniky

Od roku 1981 byly u homosexuálních mužů v New Yorku a v San Francisku pozorovány ve velké míře až dosud vzácné neléčitelné infekce. U všech pacientů se našly těžké defekty imunitní obrany. Brzy potom byl Luc Montagnierem v Pasteurově ústavu objeven nový vir, humánní vir imunitního oslabení (human immunodeficiency virus HIV).

Pro léčení AIDS se dnes připouští pouze didesoxynukleosidový analog 3'-azido-3'-desoxythymidinu (AZT) nebo zidovudinu (INN). Tento je schopen mírnit symptomy nemoci a prodloužit průměrnou dobu přežití pacientů nemocných AIDS. Při léčení AZT dochází k vytvoření rezistentních kmenů virů s gravírujícím vedlejším účinkem a kostní dřeň. Další léky jsou klinicky zkoušeny. Tak popisuje DE-OS 39 35 580 použití 1-oktadecyl-2-methyl-glycero-3-fosfocholinu pro výrobu léčiv pro boj proti infekcím HIV. EP-A-493 popisuje použití 2'-3'-deoxyguanosinu nebo monofosfátů nebo trifosfátů 2'-3'-dodeoxyguanosinu pro stejný účel.

25 Všechny tyto látky jsou ještě v klinickém vývoji a dosud nejsou zralé pro trh.

Léčiva, používaná v oblasti protivirové chemoterapie, nejsou dnes dostatečně selektivní. Existuje tedy velká potřeba dobře snesitelných, vysoce účinných léčiv, která by nejen zpomalila průběh nemoci, nýbrž která by také zabránila zmnožení virů a kromě toho by byla schopná stabilizovat i oslabený imunitní systém pacienta.

S překvapením bylo nyní zjištěno, že při screeningovém AIDS pokusu na CEM-IW-buňkách mají LHRH-analogové dekaeptidy podle vzorců II až VIII anti-HIV účinek a kromě toho účinek, stimulující růst buněčných kultur.

35

Podstata vynálezu

40 Předmětem vynálezu je peptid se sekvencí aminokyselin a jeho použití pro výrobu léčiva na bázi peptidických LHRH-antagonistů. Sloučeniny samy jsou i při maximálních použitých dávkách jen málo toxické.

Sekvence aminokyseliny LHRH je:

45
$$\text{LHRH} = \text{p-Glu}^1\text{-His}^2\text{-Trp}^3\text{-Ser}^4\text{-Tyr}^5\text{-Gly}^6\text{-Leu}^7\text{-Arg}^8\text{-Pro}^9\text{-Gly}^{10}\text{-NH}_2$$

Následující vzorec popisuje peptid se sekvencí aminokyseliny podle vynálezu:

50
$$\text{Ac-D-Nal/2/-D-Phe/4-Cl/-xxx-A-B-yyy-zzz-Arg-C-D-Ala-NH}_2$$

přičemž platí

xxx = D-Pal/3/, D-Phe/4-Cl/, D-Trp,
yyy = D-Cit, D-Lys/R/, D-Arg, D-Hci,

přičemž R byl vybrán ze skupiny, sestávající z /C₁-C₄/-acylu a /C₁-C₁₀/-alkylu,

zzz = L-leu, Vic, Nva, t-Leu,

A = Ser, Ser/cukr/,

5

přičemž zbytek cukru byl vybrán ze skupiny, sestávající z glukózy, galaktózy, silózy, altrózy, manózy, gulózy, idózy a talózy,

B = Tyr, Lys/Nic/, Mop,

10 C = Pro, Ala.

Použité zkratky pro aminokyseliny, peptidy a jejich deriváty jsou doporučeny IUPAC-IUB-Commision für biochemische Nomenklatur.

15 /European J. Biochem. 1984, 138, 9-37/.

Zkratky pro méně používané aminokyseliny:

Dpa znamená 2,3-diaminopropionovou kyselinu,

20 Nal znamená 3-/2-naftyl/-alanin,

Thl znamená β-2'-thienylalanin,

Tpl znamená 2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido-/3,4-b/-indol-3-karboxylovou kyselinu,

Nic znamená nicotinoyl,

Mop znamená 4-/morfolinomethyl/-fenylalanin.

25

Dále platí, že Ac je acetyl a t-Leu je terciární leucin.

Zejména výhodné peptidy obecného vzorce I představují peptidy s následujícími sekvencemi aminokyselin:

30

vzorce II = Ac-D-Nal/2/¹-D-Phe/4-Cl/²-D-Pal/3/³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-Nle⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰

/II/,

nebo farmaceuticky přijatelná sůl takového peptidu,

35

vzorce III = Ac-D-Nal/2/¹-D-Phe/4-Cl/²-D-Pal/3/³-Tyr⁵-D-Cit⁶-Nva⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰

/III/,

40 nebo farmaceuticky snesitelná sůl takového peptidu,

vzorce IV = Ac-D-Nal/2/¹-D-Phe/4-Cl/²-D-Trp³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-A-Ala¹⁰,

/IV/,

45

nebo farmaceuticky přijatelná sůl peptidu,

vzorce V = Ac-D-Nal/2/¹-D-Phe/4-Cl/²-D-Pal/3/³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰

50

/V/,

nebo farmaceuticky přijatelná sůl takového peptidu,

vzorce VI = Ac-D-Nal/2/¹-D-Phe/4-Cl/²-D-Pal/3/³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Hci⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰

/VI/,

5 nebo farmaceuticky přijatelná sůl takovéhoho peptidu,

vzorce VII = Ac-D-Nal/2/¹-D-Phe/4-Cl/²-D-Pal/3/³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-t-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰

/VII/.

10

nebo farmaceuticky přijatelná sůl takovéhoho peptidu,

vzorce VIII = Ac-D-Nal/2/¹-D-Phe/4-Cl/²-D-Pal/3/³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Ala⁹-D-Ala¹⁰

15

nebo farmaceuticky přijatelná sůl takovéhoho peptidu.

Oligopeptidy podle vynálezu se syntetizují konvenčními způsoby, známými z literatury. Souhrnný popis způsobů, které při tom přicházejí v úvahu, je například v M. Bodanszky, Principles of Peptide synthesis, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1984.

20

Principy syntézy pevných fází polypeptidů jsou vysvětleny například v učebnici J.H. Stevart und J.D. Young, Solid phase Peptide Synthesis Pierce Chem. Co., Rockford, IL, 1984 /2. vydání/ a v Übersichtsartikel von L. Barany et al., Int. J. Peptide Protein Res., 30, 705-739 /1987/.

25

Syntézy peptidů podle vzorců II až VIII se dařily podle blokového diagramu na methylbenz-hydrylaminové pryskyřici /podávaná forma hydrochlorid/ firmy Advanced Chem. tech. /Louisville/Kentucky/, USA, která byla před navázáním C-terminálního Boc-alaninu převedena 10% triethylaminem v dichlormethanu /obj/obj/ ve volnou bázi.

30

/Boc = terc. butyloxykarbonylový zbytek/.

Všechny následující aminokyseliny, chráněné Na-Boc, byly v průběhu 90 minut kopulovány ve trojnásobném molárním přebytku v přítomnosti diizopropylkarbodiimidu /DIC/ a 1-hydroxy-benzotriazolu /HOBt/ v CH₂Cl₂/DMF, ve směsích dichlormethan/dimethylformamidu složení 80/20 /obj/obj/ působením 50% trifluoroctové kyseliny /TFA/ v dichlormethanu. Zbytky volných aminofunkcí byly blokovány acetylací v pětinasobném přebytku acetylimidazolu v dichlormethanu. Sled reakčních kroků výstavby peptidu na pryskyřici vyplývá z blokového diagramu. Pro odštěpení peptidů, vázaných na pryskyřici, byl nyní konečný produkt syntézy pevné fáze sušen ve vakuu a zpracován v 500násobném přebytku HF/anisolu 10 : 1 /obj/obj/ během 15 až 60 minut při 0 °C.

35

40

Předmětem vynálezu jsou i farmaceuticky akceptovatelné soli peptidů, jako například hydrochlorid, trifluoracetát, acetát, síran, fosforečnan, mesylát nebo tosylát.

45

Po oddestilování fluorovodíku a anisolu ve vakuu vypadnou všechny surové amidy peptidů rozmícháním s bezvodým ethyletherem jako bílé tuhé látky, oddělení polymerního nosiče, který se vyloučí současně s nimi, se provádělo vymytím 50% /obj/obj/ vodnou kyselinou octovou, ve vakuu se daly získat nyní peptidy jako vysokoviskózní oleje, které se po přidání absolutního etheru za studena přeměnily v bílé tuhé látky. Surové peptidy se izolovaly, promyly na fritě absolutním etherem a usušily ve vakuu.

50

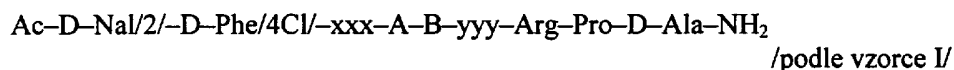
Preparativní vyčištění se provádělo pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie /HPLC/ za uvedených podmínek:

Parametry preparativní HPLC:

- přístroje: čerpadlo Shimadzu LC-BA
detektor Shimadzu SPD-6A
integrátor Shimadzu C-R4A
kontrolní přístroj Shimadzu SCL-6A
- činidla: acetonitril Lichrosol Merck Art. 30
kyselina trifluoroctová Fluka Nr. 91700
nejčistší voda /Seralpur-zařízení/
- mobilní fáze A: 970 ml vody nejčistší /VE-voda/
+ 30 ml acetonitrilu
+ 1 ml kyseliny trifluoroctové
- mobilní fáze B: 300 ml vody /nejčistší VE-voda/
+ 700 ml acetonitrilu
+ 1 ml kyseliny trifluoroctové
- velikost toku 40 ml/min
tlak: $14 \cdot 10^5$ Pa
průměrná doba chodu preparativního průběhu: asi 30 až 40 minut.
- Správná identita všech syntetizovaných peptidů byla po vyčištění HPLC prokazována analýzou aminokyselin, hmotnostní spektroskopií a ^1H -NMR-spektroskopií.
- Opakující se pracovní postupy syntézy pevných fází jsou shrnuty v následujícím schématu; stupně 1 až 17 popisují sled operačních kroků pro připojení vždy jedné aminokyseliny.

stupně	činidla a operace	čas /min/
1	boc-aminokyselina, DIC, HOBt 1 : 1 : 1	90
2	barevný test na úplné zreagování, falešně pozitivní, opakování 1 a 2	
3	MeOH, promytí	1
4	DIPEA, 10 % v CH_2Cl_2 ; neutralizace	2
5	MeOH; promytí	1
6	CH_2Cl_2 ; promytí, 3krát	2
7	/ $\text{CH}_3\text{CO}/_2\text{O}$, imidazol, 1 : 1, acetylce	30
8	MeOH; promytí, 2krát	1
9	CH_2Cl_2 ; promytí, 3krát	2
10	TFA, 50 % v CH_2Cl_2 , odštěpení Boc	1
11	TFA, 50 % v CH_2Cl_2 , odštěpení Boc	30
12	izopropanol; promytí a odbarvení	2
13	DIPEA, 10 % v CH_2Cl_2 ; neutralizace	3
14	NaOH; promytí	1
15	DIPEA, 10 % v CH_2Cl_2 ; neutralizace	3
16	MeOH, promytí	1
17	CH_2Cl_2 ; promytí, 2krát	2

Syntézní produkt podle výše uvedeného blokového diagramu:



Úplnost syntézy byla zkoušena chloranilovým testem podle Th. Christensena: Acta Chem. Scand. B 33, 763 /1979/ a Kaiserovým ninhydrinovým testem podle Stevarta.

5 Vynález se týká také farmaceutického prostředku pro potírání AIDS a/nebo ARC, který obsahuje nejméně jeden peptid nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl.

10 ARC představuje zkratku AIDS-related complex; jde o snížení imunity, která spočívá na podezření, že se jedná o AIDS; toto podezření se zakládá na obrazu onemocnění, o jehož časové a medicíně souvislosti není zatím dost důkazů. O ARC se mluví, jestliže existují nejméně dva z následujících klinických symptomů jako je chronické zduření lymfatických uzlin /trvajících déle než dva měsíce/ na dvou nebo několika částech těla, chronické průjmy /delší než 7 dní/, úbytek hmotnosti /více než 10 % tělesné hmotnosti/, trvajících nebo ve vlnách se projevujících zvýšení a snížení tělesné teploty, noční pocení nebo všeobecné symptomy, jako je únava, snížení výkonnosti atd. V současnosti se požaduje důkaz minimálně dvou laboratorních nálezů, 15 typických pro AIDS.

20 A konečně je předmětem vynálezu použití peptidu se sekvencí aminokyselin pro výrobu farmaceutického prostředku pro potírání AIDS a/nebo ARC. Popisují se peptidy a jejich syntéza, které se používají rovněž pro terapii virových onemocnění.

Peptidy samy o sobě jsou i při použití maximálních dávek jen málo toxické. Ve srovnání s testovanou referenční sloučeninou azidothymidinem se hodnoty EC₅₀ pohybují při NCI pokusech u zkoumaných peptidů mezi $5,9 \times 10^7$ mol/litr až $2,0 \times 10^{-5}$ mol/litr.

25 Současně uvedená referenční sloučenina AZT /azidothymidin/ měla například hodnotu EC₅₀ $3,10 \times 10^{-9}$ mol/litr.

30 Všechny sloučeniny byly dávkovány v rozmezí od 10^{-4} až 10^{-5} mol/litr. Obvykle uváděná hodnota IC₅₀ /koncentrace inhibitoru, při které v neinfikované kultuře odumře 50 % buněk/ je proto větší než nejvyšší dávkování.

35 Ošetřená infikovaná kultura má hodnotu EC₅₀ $4,5 \times 10^{-5}$ mol/litr. Vzhledem k tomu, že hodnoty pro ošetřenou neinfikovanou kulturu nepoklesnou na hodnotu IC₅₀, může se pro hodnotu IC₅₀ uvádět pouze hodnota pro nejvyšší dávkování, to znamená IC₅₀ větší než $3,3 \times 10^{-5}$ mol/litr. Terapeutický index /TI₅₀ = IC₅₀/EC₅₀/ je potom vyšší než 7,30.

Popis screeningové metody na anti-HIV-aktivitu

40 Způsob je vhodný pro nalezení účinných látek, které jsou účinné ve všech fázích cyklu rozmnožování viru. Princip testu spočívá na usmrcení T4-lymfocytů virem HIV.

45 Malá množství viru HIV se přidávají k buněčným kulturám. Jsou nezbytné nejméně dva dokonale virální reprodukční cykly, aby se usmrtily T4-lymfocyty a aby se mohly vyhodnotit výsledky. Účinné látky, které reagují s viriony /částicemi podobnými virům/, buňkami nebo produkty virálních genů, aby tak byly v interakci s virálními aktivitami a blokovaly tak pomnožování virů, chrání buňky před smrtí a před lyzí.

50 Aby bylo možné prohlédnout velký počet buněk infikovaných virem, je testovací systém zautomatizován. Sloučeniny, které degenerují, denaturují nebo které se rychle metabolizují, se ale nemohou na základě uspořádání testu bezpečně objevit.

Jako pozitivní kontrola pro test slouží AZT /azidothymidin/ a DDC.

Způsob testování

1. T4-lymfocyty /buněčné linie CEM/ se doplňují v poměru vir : buňka asi 1 : 0,05 v mikrotitračních deskách virem.
2. Látka, která se má testovat, se, když to není jinak uvedeno, rozpustí v dimethylsulfoxidu /DMSO/, potom se dá jak na infikované, tak i na neinfikované buněčné kultury.
3. Kultury se inkubují 6 až 7 dní při 37 °C v atmosféře 5% CO₂.
4. K buněčným kulturám se přidá tetrazoliová sůl XTT a buněčné kultury se dále inkubují, aby se přežívajícími buňkami nechala proběhnout formazánová barevná reakce kopulací s fenazinmethosulfonátem (PMS/).
5. Jednotlivé buněčné kultury se spektroskopicky analyzují a přežívající buňky se zjišťují mikroskopicky, aby se potvrdil ochranný účinek.
6. Ošetřené buňky, infikované virem, se srovnávají s ošetřenými neinfikovanými buňkami. Další srovnání /neošetřených infikovaných buněk a neošetřených neinfikovaných buněk, prohloubenin, obsahujících účinnou látku, prostých buněk/ se provádí na stejné desce.
7. Stanoví se účinnost testované sloučeniny.

Další podrobnosti experimentu lze seznat z Weislow, J. Pat. Canc. Inst. 81 /8/, strana 577 /1989/. Z tohoto vyplývá, že peptidy podle vynálezu se hodí pro výrobu farmaceutických prostředků pro potírání AIDS a pro potírání nemocí, které jsou spojeny s infekcí virem, vyvolávajícím oslabení imunity /AIDS related complex, ARC/.

Dávkování

Dávka farmaceutického prostředku podle vynálezu se pohybuje mezi 0,01 mg až 10 mg při denním podávání.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Peptid podle vzorce II

Hmotnostní spektrum: $/M + H^+ = 1431$

¹H-NMR-spektrum /DMSO-d₆, 250 MHz/ δ v ppm: 8,65 - 7,1; mnoho multipletů, aromatické a NH-signály; 7,0 a 6,6; 2,1 4H, aromatické H Tyr; 5,95 m, NHCONH₂Cit; 4,8 - 4,1, více multipletů; C₄H; 3,75 a 3,5; multiplety; alifatické H; 3,2 - 2,65, více multipletů, CβH alifatické a aromatické aminokyseliny; 2,1 - 1,3, více multipletů, zbytkové alifatické H; 1,780, d 3H, CH₃CO⁻; 1,20d, 3H, C HAla; 0,80, m, Nle.

Příklad 2

Peptid podle vzorce III

5 ^1H -NMR-spektrum / $\text{MSO}-d_6$, 250 MHz/ δ v ppm:

8,65 - 7,1, mnoho multipletů, aromatické a NH-signály; 7,0 a 6,6 2d, 4H, aromatické H Tyr; 5,9 m, $\text{NHCONH}_2\text{Cit}$; alifatické H; 3,2 2,65; více multipletů, C β N alifatické a aromatické aminokyseliny; 2,1 - 1,25; více multipletů, zbytkové, alifatické H; 1,70, 5, 3H, CH_3CO^- ; 1,20, d, 10 3H, C β H, Ala; 0,85, m 3H, Nva.

Hmotnostní spektrum: $/M + H^+ / = 1417$

15 Příklad 3

Peptid podle vzorce IV;

Hmotnostní spektrum: $/M + H^+ / = 1469$

20 ^1H -NMR-spektrum / $\text{DMSO}-d_6$, 250 MHz/ δ v ppm:

8,2 - 6,5, mnoho multipletů, aromatické a NH-signály; 8,2 - 6,5, mnoho multipletů, aromatické a NH-signály; 5,8 a 5,4, 2 m 3H, NH-CO-NH_2 Citrollia, 4,5, 4,3, 4,2 a 4,0, multiplety C_6H_5 , 25 3,8 - 2,6, více multipletů, alifatické a aromatické C β H; 2,0 - 1,9, více multipletů, zbytkové alifatické protony; 1,6, 5,3 H, CH_3CO^- ; 1,1 d, 2H, C β H Ala; 0,7, d, 6H C δ H leu.

Příklad 4

30

Peptid podle vzorce V, INN; Cetrorelix

Hmotnostní spektrum ($\text{DMSO}-d_6$, 250 MHz/ δ v ppm:

35 8,7 - 7,2, mnoho multipletů, aromatické a NH-signály; 7,05 a 6,65, 2d, 4H; aromatické H Tyr; 5,85, m NHCONH_2 , Cit; 4,8 - 4,1, více multipletů, C α H; 3,8 a 3,55, 2m, alifatické H; 3,3 - 2,7 C β H alifatické a aromatické aminokyseliny; 2,1 - 1,3, více multipletů, zbytkové alifatické signály; 1,7, 5,3 H, CH_3CO^- ; 1,2 d, 3H, C β H Ala; 0,85 2d, 6H, C δ H leu.

40

Příklad 5

Peptid podle vzorce VI

45 Hmotnostní spektrum: $/M + H^+ / = 1444$

^1H -NMR-spektrum / $\text{DMSO}-d_6$, 250 MHz/ δ v ppm:

50 8,6 - 7,1, mnoho multipletů, aromatické a NH-signály; 7,0 a 6,6, 2d, 4H, aromatické H Tyr; 4,8 - 4,0, více multipletů, C α H; 3,7 a 3,5, 2m, 4H; 3,2 - 2,7, více multipletů, C β H aromatické a alifatické aminokyseliny; 2,0 - 1,0, více multipletů, zbytkové alifatické signály; 1,7, 5, 3H, CH_3CO^- ; 1,2, d 3H, C β H Ala; 0,8, dd, 6H, C δ H, leu

Příklad 6

Peptid podle vzorce VII

5 Hmotnostní spektrum: $/M + H^+ / = 1431$ ^1H -NMR-spektrum /DMSO- d_6 , 250 MHz/ δ v ppm:

8,6 - 7,1, mnoho multipletů, aromatické a NH-signály; 7,0 a 6,6, 2d, 4H, aromatické H Tyr;
 10 5,9 m NHCONH₂, Cit; 4,8 - 4,0, více multipletů, C α H, 3,85 a 3,5, 2 multiplety, alifatické H;
 3,1 - 2,7, více multipletů, C β H alifatické a aromatické aminokyseliny; 2,1 - 1,3, více multipletů,
 zbytkové alifatické H; 1,7, 5,3 H, CH₃CO⁻; 1,20, d, 3H, C β H Ala; 5,9 H, t-butyl, Tle.

15 Příklad 7

Peptid podle vzorce VIII

Hmotnostní spektrum: $/M + H^+ / = 1405$

20

 ^1H -NMR-spektrum /DMSO- d_6 , 250 MHz/ δ v ppm:

9,1 - 7,3, více multipletů, aromatické a NH-signály; 7,21, dd, 4H, aromatické H p-cl-Phe; 7,0 a
 6,6, 2d, 4H, aromatické H Tyr; 5,9 a 5,4, 2m, 3H, NHCONH₂ Cit; 4,7 - 4,1, více multipletů,
 25 C α H; 3,55 - 2,8, více multipletů; C H alifatické a aromatické aminokyseliny; 1,70, 5, 3H,
 CH₃CO⁻; 1,55 a 1,45, 2m alifatické signály Arg a leu; 0,80, dd, 6H, C δ H leu.

Výsledky účinnosti peptidů podle příkladů 1 až 7

30 Peptidy podle příkladů 1 až 7 byly zkoumány screeningovým způsobem a byla zjišťována jejich
 anti-HIV-aktivita /NCI/. Všechny peptidy byly buď účinné nebo omezeně účinné. EC50
 hodnoty, odpovídající nalezeným aktivitám, jsou v rozmezí 4 - 15 μM . Dále uvedená tabulka
 shrnuje výsledky.

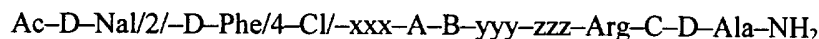
Příklad č.	Vzorec	číslo vzorku	účinnost *
1	II	D-21072	aktivní
2	III	D-21073	aktivní
3	IV	D-20454	omezeně aktivní
4	V	D-20761	aktivní
5	VI	D-20455	omezeně aktivní
6	VII	D-21071	omezeně aktivní
7	VIII	D-21740	aktivní

35

* EC50-hodnoty, odpovídající účinností „aktivní“ až „omezeně aktivní“, jsou v rozmezí
 4 - 15 μM .

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Peptid se sekvencí aminokyselin obecného vzorce I



/I/,

přičemž platí

10

xxx = D-Pal/3/, D-Phe/4-Cl/, D-Trp,
 yyy = D-Cit, D-Lys/R/, D-Arg, A-Hci,

přičemž R byl vybrán ze skupiny, sestávající z /C₁-C₄/-acylu a /C₁-C₁₀/-alkylu,

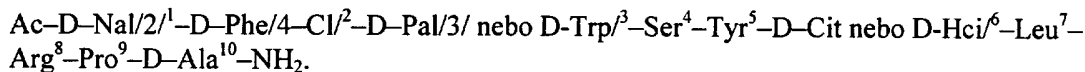
15

zzz = L-Leu, Vic, Nva, t-Leu,
 A = Ser, Ser/cukr/,

přičemž zbytek cukru byl vybrán ze skupiny, sestávající z glukózy, galaktózy, allózy, altrózy,
 20 citrózy, manózy, gulózy, idózy a talózy

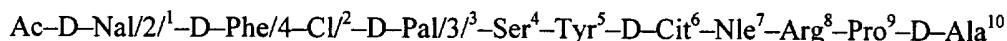
B = Tyr, Lys/Nic/, Mop,
 C = Pro, Ala,

- 25 nebo jejich farmaceuticky snesitelná sůl, jako například hydrochlorid, trifluoracetát, acetát, síran, fosforečnan, mesylát, tosylát, vyjma následujících peptidů



30

2. Peptid podle nároku 1 se sekvencí aminokyselin



- 35 nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

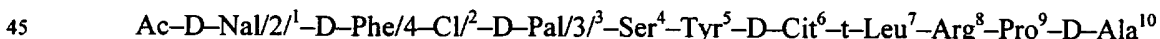
3. Peptid podle nároku 1 se sekvencí aminokyselin



40

nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

4. Peptid podle nároku 1 se sekvencí aminokyselin



45

nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

5. Peptid podle nároku 1 se sekvencí aminokyselin

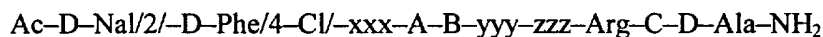
50



nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

6. Farmaceutický prostředek pro potírání AIDS a/nebo ARC, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje nejméně jeden peptid, uvedený v nárocích 1 až 5 nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl.

- 5 7. Použití nejméně jednoho peptidu podle nároku 1 se sekvencí aminokyselin podle obecného vzorce I



/I/,

10

příčemž platí

xxx = D-Pal/3/, D-Phe/4-Cl/, D-Trp

yyy = D-Cit, D-Lys/R/, D-Arg, A-Hci

15

příčemž R byl vybrán ze skupiny, sestávající z

/C₁-C₄/-acylu a /C₁-C₁₀/-alkylu,

20

zzz = L-Leu, Vic, Nva, t-Leu,

A = Ser, Ser/cukr/,

příčemž zbytek cukru byl vybrán ze skupiny, sestávající z glukózy, galaktózy, allózy, manózy, gulózy, talózy a idózy,

25

B = Tyr, Lys/Nic/, Mop,

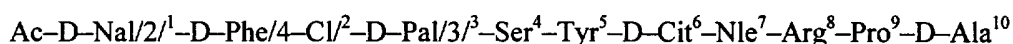
C = Pro, Ala,

nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, jako například hydrochloridu, trifluoracetátu, acetátu, síranu, fosforečnanu, mesylátu nebo tosylátu, pro výrobu farmaceutického prostředku pro potírání AIDS a/nebo ARC.

30

8. Použití peptidu podle nároku 1 se sekvencí aminokyselin

35



nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu farmaceutického prostředku pro potírání AIDS a/nebo ARC.

40

9. Použití peptidu podle nároku 1 se sekvencí aminokyselin



nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu farmaceutického prostředku pro potírání AIDS a/nebo ARC.

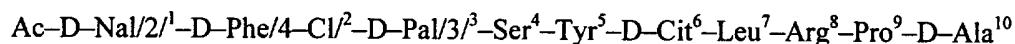
45

10. Použití peptidu podle nároku 1 se sekvencí aminokyselin

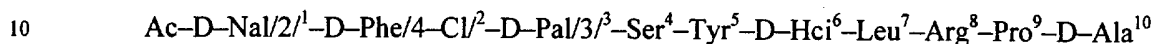


50

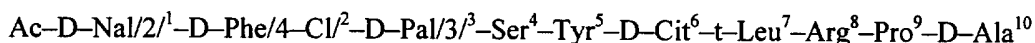
nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu farmaceutického prostředku pro potírání AIDS a/nebo ARC.

11. Použití peptidu podle nároku 1 se sekvencí aminokyselin

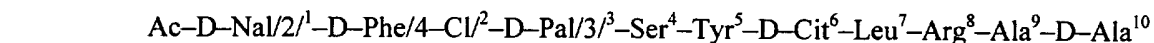
- 5 nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu farmaceutického prostředku pro potírání AIDS a/nebo ARC.

12. Použití peptidu podle nároku 1 se sekvencí aminokyselin

nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu farmaceutického prostředku pro potírání AIDS a/nebo ARC.

13. Použití peptidu podle nároku 1 se sekvencí aminokyselin

- 20 nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu farmaceutického prostředku pro potírání AIDS a/nebo ARC.

14. Použití peptidu podle nároku 1 se sekvencí aminokyselin

nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu farmaceutického prostředku pro potírání AIDS a/nebo ARC.

30

Konec dokumentu
