

3328/96

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**



A2

76979

Pális
~~Retrovírus~~ proteáz inhibitor kombinációk *készítmények*

K I V O N A T

A találmány tárgya emlősök retrovírus fertőzéseinek, például HIV fertőzésének kezelésére szolgáló eljárás, amelyben olyan retrovírus proteáz inhibitorok kombinációit alkalmazzák, amelyek a retrovírusok in vitro vagy in vivo replikációjának megakadályozásában hatásosak. A találmány tárgyát különösképpen több proteáz inhibitor vegyület kombinációjának terápiás alkalmazása képezi. A találmány tárgyát képezi továbbá olyan kombinációs terápia, amelyben proteáz inhibitorok és a proteáz inhibitoroktól eltérő más vírusellenes szerek kombinációját alkalmazzák.

Albresi Anna Maria

3328/96

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY***Retrovirális proteáz inhibitor készítmények*
Retrovírus-proteáz-inhibitor kombinációk

A találmány tárgyát emlősök retrovírus fertőzéseinek kezelésére alkalmas kombinációs kompozíciók képezik, így humán immunhiány vírus (HIV) fertőzés kezelése retrovírus proteáz inhibitorok olyan kombinációjával, amelyek hatékonyan megelőzik az emlős retrovírusok, például HIV in vitro és in vivo replikációját. A találmány közelebbről olyan kombinációs kompozíciókra vonatkozik, amelyek egy proteáz inhibitor vegyületet egy másik proteáz inhibitor vegyülettel együtt tartalmazznak.

A retrovírusok replikációs ciklusa során gag és gag-pol gén transzkripció termékek transzlációja révén jönnek létre proteinek. A proteinek ezután vírus által kódolt proteázok (vagy proteinázok) hatására alakulnak vírus enzimekké és a vírus mag szerkezeti proteinjeivé. Legszokásosabban a gag prekursor proteinek alakulnak mag proteinekké, és a pol prekursor proteinek vírus enzimekké, azaz reverz transzkriptázzá és retrovírus proteázzá. Kimutatták, hogy ahhoz, hogy fertőző vironok jöjjenek létre, a prekursor proteineknek a retrovírus proteáz által való pontos átalakítása szükséges. Kimutatták például, hogy a HIV pol génje proteáz régiójában bekövetkező kereteltolódásos mutáció megakadályozza a gag prekursor protein átalakulását. A HIV proteáz aktív helyének egy aszparaginsav egysége hely-fajlagos mutagenézise révén azt is kimutatták, hogy a gag prekursor protein átalakulása gátlódik. Ennek megfelelően kísérleteket tettek a vírusreplikáció gátlására retrovírus proteázok hatásának gátlásával.

A retrovírus proteáz gátlás jellemzően egy átmeneti állapotú mimetikus hatást foglal magában, amelynek során a retrovírus proteáz egy olyan mimetikus vegyületnek tevődik ki, amely a gag és gag-pol proteinokkal kompetitív módon (jellemzően reverzibilis módon) kötődik az enzimhez, és ezzel gátolja a szerkezeti proteinek kialakulását és magának a retrovírus proteáznak a



szabaddá válását. Ily módon a retrovírus replikációs proteázok hatásosan gátolhatók.

Javasolták a mimetikus vegyületek néhány csoportját, különösen proteázok gátlására szolgálókat, például HIV proteáz gátlására alkalmasakat. Az ilyen mimetikus vegyületek körébe tartoznak hidroxietil-amin izoszterek, redukált amid izoszterek és nem-peptid izoszterek. Lásd például az EP 0 346 847 és EP 0 342 541 számú szabadalmi leírásokban; a Roberts és munkatársai: "Rational Design of Peptide-Based Proteinase Inhibitors", *Science* **248**, 358 (1990); Erickson és munkatársai: "Design Activity, and 2.8 Å Crystal Structure of a C₂ Symmetric Inhibitor Complexed to HIV-1 Protease", *Science*, **249**, 527 (1990); és S. Thaisrivongs: "Structure-Based Design of Non-Peptide HIV Protease Inhibitors", 35th Annual Buffalo Medicinal Chemistry Meetings, State University of New York at Buffalo, Buffalo, NY, US, 1994. május 22-25. szakirodalmi helyeken.

Egy a retrovírus proteáz inhibitorokkal, így a HIV proteáz inhibitorokkal kapcsolatos probléma, hogy az inhibitorra rezisztens vírustörzsek fejlődtek ki. Például a Merck & Co., L-735 524 jelölésű HIV proteáz inhibitora hatásos ember HIV fertőzéseivel szemben, de a betegekben később az L-735 524 inhibitorra rezisztens HIV törzsek fejlődnek ki [Waldholz: *The Wall Street Journal*, 1994. február 25., B3 oldal, és Condra és munkatársai: *Nature* **374**, 569-571 (1995). További példák találhatók a Vacca és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **91**, 4096-100 (1994); Ho és munkatársai: *J. Virol.* **68**, 2016-2020 (1994); és Sardana és munkatársai: *Biochem.* **33**, 2004-2010 (1994) szakirodalmi helyeken].

A következőkben röviden ismertetjük a találmányt.

A találmány emlősök retrovírus fertőzéseinek, így ember immunhiány vírus (HIV) fertőzésének kezelésére alkalmas kombinációs készítményekre vonatkozik, amelyek a retrovírusok in vitro vagy in vivo replikációját megakadályozó



hatásos retrovírus proteáz inhibitorokat tartalmaznak. Így a találmány főként olyan kombinációs kompozíciókra vonatkozik, amelyek proteáz inhibitor vegyületek kombinációjából állnak. Továbbá, ez a kombináció tartalmazhat további vírusellenes szereket is.

A következőkben részleteiben ismertetjük a találmányt.

A retrovírus proteáz egy kritikus enzim a retrovírus replikációs folyamatban. A retrovírusok, így a HIV szaporodása gátolható azáltal, ha a vírust egy retrovírus proteáz inhibitorral tesszük ki. Ha azonban a retrovírust tartósan tesszük ki a proteáz inhibitor hatásának, variáns retrovírusok szelektálódhatnak úgy, hogy létrejön egy új, a többitel szemben túlsúlyban lévő, a proteáz inhibitorral szemben rezisztens retrovírus törzs. Ez a túlsúlyban lévő retrovírus törzs olyan proteáz termelésére képes, amelyet már nem gátol vagy többnyire nem kielégítően gátol a proteáz inhibitor, és ez a törzs a proteáz inhibitor jelenlétében is szabadon szaporodhat, kivéve, ha az inhibitor koncentrációját lényegesen megnöveljük. A találmány megoldást nyújt a retrovírus proteáz inhibitorok iránt rezisztens retrovírus törzsek kialakulása megakadályozására.

A találmány szerinti kombinációs kompozíciók, amelyek emlősök, például ember, majom, macska és hasonlók kezelésére alkalmasak, legalább két retrovírus proteáz inhibitor hatásos mennyiségéből tevődnek össze. A kompozíciók adagolhatók oly módon, hogy legalább két retrovírus proteáz inhibitor egyidejűleg adagolunk, azaz két vagy több retrovírus proteáz inhibitor úgy adagolunk, hogy legalább két inhibitor hatásos mennyisége minden időben jelen legyen az emlősben. Más megoldás szerint az adagolást végezhetjük legalább két retrovírus proteáz inhibitor egymást követő vagy váltakozó adagolásával, azaz, a kombináció két vagy több retrovírus proteáz inhibitorát úgy adagoljuk, hogy egyidejűleg csak egy inhibitor hatásos mennyisége legyen jelen az emlősben. A retrovírus proteáz inhibitorok megfelelő megválasztásával ezzel a



módszerrel hatásosan ellenőrizhetjük a retrovírusok szaporodását még az inhibitorok valamelyikére rezisztens törzs jelenléte esetén is.

A retrovírus proteáz inhibitorokat azoknak a rezisztens retrovírus törzs(ek)nek a profilja alapján választjuk meg, amelyek a retrovírusok szaporodó tenyészetének in vitro vagy in vivo az inhibitornak való kitételkor létrejönnek. A retrovírus proteáz inhibitorokat úgy választjuk meg, hogy ne jelentkezzen kereszt-rezisztencia egy retrovírus rezisztens törzsre sem. A retrovírus törzset akkor tekintjük két proteáz inhibitorra kereszt-rezisztenciával bírónak, ha a retrovírus törzs mindkét inhibitorra rezisztens. Míg némi kereszt-rezisztencia elviselhető, előnyös, ha az egy csoportban alkalmazott kiválasztott retrovírus proteáz inhibitorok között nem létezik kereszt-rezisztencia. Így egy olyan retrovírus variáns (vagy mutáns) törzs, amely egy első retrovírus proteáz inhibitornak való kifejlődésre képes, még gátolt lesz a második retrovírus proteáz inhibitor által, vagy ha a kitétel folytán mind az első, mind a második retrovírus proteáz inhibitorral szemben rezisztencia fejlődik ki, a gátlás még egy harmadik retrovírus proteáz inhibitorral megvalósítható, vagy egy negyedik retrovírus proteáz inhibitorral, és így tovább.

A különböző proteáz inhibitorok kereszt-rezisztencia profilját összehasonlítjuk, és a kombinációs kompozíciókhoz olyan vegyületeket választunk ki, amelyek előnyösen nem, vagy csak gyenge kereszt-rezisztenciával bírnak. A gyógyszer rezisztencia fenotípusokat a nem-rezisztens, alacsony rezisztencia szintű (az EC_{50} vagy EC_{90} értékeket mintegy 10-szeresnél kisebb mértékben eltoló), közepes rezisztencia szintű (az EC_{50} vagy EC_{90} szinteket mintegy 10 és mintegy 100-szoros közötti mértékben eltoló) vagy magas rezisztencia szintű (az EC_{50} vagy EC_{90} értékeket több mint mintegy 100-szoros mértékben eltoló) csoportokra oszthatjuk. Feltételezzük, hogy a gyógyszer rezisztencia korrelációban van a beteg vírusterhelésére gyakorolt csökkent hatással, ha az elérhető in vivo inhibitor koncentrációk csökkent proteáz gátló hatást fejtenek ki a rezisz-



tens vírusra. Így előnyösebbek azok a proteáz inhibitor kombinációk, amelyek minimális kereszt-rezisztencia profillal bírnak (azaz előnyösen nem több mint közepes rezisztencia szintűek; még előnyösebben nem több mint alacsony rezisztencia szintűek, legelőnyösebben nem rezisztensek), és maximális belső eredetű (intrinzik) hatással bírnak a vad típusú és/vagy rezisztens vírusokra, amelyek egy más inhibitorral szemben szelektálódtak. Egy első vegyülettel való kombinációban való alkalmazásra előnyös például egy olyan vegyület, amely előnyösen hatásos az olyan vírustörzsekkel szemben, amelyek az első vegyület iránt közepes vagy még előnyösebben magas szintű rezisztenciát mutatnak. Minden inhibitor és kombináció farmakológiája és toxikológiája részét képezi az inhibitor kombináció megválasztásának.

Még előnyösebb a retrovírus proteáz inhibitorok megválasztása, ha legalább egy, az első retrovírus proteáz inhibitor ellen rezisztens vírustörzs és legalább egy, a második retrovírus proteáz inhibitor ellen rezisztens törzs különböző aminosav helyettesítettséggel bír a proteáz peptid szekvenciának azon a helyén, amely a proteáz azonos szubsztrátkötő régióját érinti, és a megfigyelt inhibitor rezisztenciához hozzájárul. Így korlátozott azoknak a lehetséges aminosav helyettesítéseknek a száma, amelyek a proteáz azonos helyén előfordulhatnak. Különösen igaz ez akkor, ha ez a hely az enzim aktivitása, hatékonysága és/vagy stabilitása szempontjából kritikus.

Ezt az eseményt észleltük a később bemutatásra kerülő 1. és 2. példa szerinti HIV proteáz inhibitorok vonatkozásában. Az 1. példa szerinti vegyület iránti retrovírus rezisztencia a HIV proteáz 88-helyzetű aminosavjának helyi mutációjából adódott (a 88-helyzetű aszparagin aszparaginsavra cserélődött). A 2. példa szerinti vegyület iránti retrovírus rezisztencia a HIV proteáz 88-helyzetű aminosavjának helyi mutációjából származott (a 88-helyzetű aszparagin szerinre cserélődött). Ismert néhány olyan, a 88-helyzetű aminosavat érintő helyettesítés, amely az enzimaktivitás elvesztésével jár [Loeb és munkatársai:



Nature 340, 387-400 (1989)]. Így, ha mind az 1., mind a 2. példa szerinti HIV proteáz inhibitor adagoljuk, lényegesen csökken annak valószínűsége, hogy mindkét inhibitor iránti keresztrezisztenciával bíró vírustörzsek jöjjenek létre sikerrel. Nem észleltünk a 6-hetes kezelés alatt a kombináció alkalmazása mellett mindkét inhibitorra irányuló rezisztenciát, míg egyetlen inhibitor esetén azonos körülmények mellett megjelent a rezisztens fenotípus. Az enzimaktivitást érintő helyen bekövetkező mutáció mellett ugyanabban a variánsban más helyen is bekövetkezhet mutáció, amely nem érinti lényegesen az enzimaktivitást és/vagy rezisztenciát.

Más módon, még előnyösebben, retrovírus proteáz inhibitorokat úgy választunk, hogy ha legalább egy az első retrovírus proteáz inhibitor iránt rezisztens egy vírustörzs van, az megnövekedett érzékenységgel bírjon az említett második proteáz inhibitor iránt, vagy ha legalább egy vírustörzs rezisztens a második retrovírus proteáz inhibitor iránt, ez megnövekedett érzékenységgel bírjon az első proteáz inhibitor iránt.

A találmány megvalósítására alkalmas retrovírus proteáz inhibitorok képviselői - a korlátozás szándéka nélkül - azok a proteáz inhibitorok, amelyeket a 08/152 934 számú (1993. november 15-én bejelentett), 08/253 531 számú (1994. június 3-án bejelentett), 08/109 787 számú (1993. augusztus 20-án bejelentett), 08/110 911 számú (1993. augusztus 24-én bejelentett), 08/110 913 számú (1993. augusztus 24-én bejelentett), 08/110 912 számú (1993. augusztus 24-én bejelentett), 08/204 827 számú (1994. március 2-án bejelentett), 07/886 556 számú (1992. május 20-án bejelentett), 07/886 663 számú (1992. május 20-án bejelentett), 07/886 531 számú (1992. május 20-án bejelentett), 08/148 817 számú (1993. november 8-án bejelentett), 08/886 700 számú (1992. május 21-én bejelentett), és 07/998 187 számú (1992. december 29-én bejelentett) amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésekben, valamint a PCT/US93/10552 számú (1993. október 29-én bejelentett), PCT/US93/10460



(1993. október 29-én bejelentett) és PCT/US93/10461 (1993. október 29-én bejelentett) szabadalmi leírásokban ismertetnek, amelyek mindegyikét teljes egészében beépítjük leírásunkba referenciaként.

További, a találmány szerinti alkalmazásra alkalmas retrovírus proteáz inhibitorokat ismertetnek - a korlátozás szándéka nélkül - az 5 157 041 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban, a 346 847 számú európai szabadalmi leírásban, a 07/883 825 számú (1992. május 15-én benyújtott) amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben, a WO 93/09096 közlési számú PCT szabadalmi leírásban, valamint a Tet. Lett, 35, 673-676 (1994); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 4096-4100 (1994); Y. N. Wong és munkatársai., Biopharm. & Drug Dispos. 15, 535-544 (1994); M.L. West és D. P. Fairlie, Trends Pharmacol. Sci. 16, 67-75 (1995); és S. Thaisrivongs, "HIV Protease Inhibitors", Ann. Reports Med. Chem. 29. kötet, 14. fejezet, 133-144. oldal (1994), Academic Press, szerk.: J. Bristol szakirodalmi helyeken, amelyek mindegyikét teljes egészében referenciaként építjük leírásunkba.

Úgy véljük, hogy szakember a leírásban foglalt kitanítás birtokában további vizsgálatok nélkül a találmányt teljes terjedelmében hasznosítani tudja. A következőkben előnyös sajátos megvalósítási módokat ismertetünk példákban anélkül, hogy minden lehetséges vegyület-kombináció kimerítő leírását adnánk, csak néhány olyan hatóanyag-kombinációt ismertetünk, amelyet hatásosnak tartunk. Ezek és más proteáz inhibitorok rezisztens vírus izolátumok alkalmazásával való vizsgálata segíthet a megfelelő hatóanyag-kombinációk azonosítására anélkül, hogy a felsoroltakra korlátoznánk a lehetőségeket. Ezért az alábbi előnyös megvalósítási módok csak a szemléltetést szolgálják a korlátozás szándéka nélkül.

1. Példa, (1) képletű vegyület

Az $[1S-[1R(R^*),2S^*]]-N^1-[3-[[[(1,1-dimetil-etil)-amino]-karbonil]]-2-metil-propil]-amino]-2-hidroxi-1-(fenil-metil)-propil]-2-[(2-kinolinil-karbonil)-amino]-bután-$



diamid előállítható a 08/152 934 számú (1993. november 15-én bejelentett) és a 08/156 498 számú (1993. november 23-án bejelentett) szabadalmi bejelentésekben leírt módon, amelyek bejelentői jelen bejelentésével azonosak, mindkét leírást teljes terjedelmében referenciaként leírásunkba beépítjük.

2. Példa, (2) képletű vegyület

A (2R,3S)-3-(N-metil-amino-acetil-L-terc-butil-glicinil)-amino-1-(N-izoamil-N-(terc-butil-karbamoil))-amino-4-fenil-2-butanol előállítható a 08/109 787 számú (1993. augusztus 20-án bejelentett), a jelen bejelentéssel egyidejűleg benyújtott 2766/1 ügyvivői számú, és a 08/156 498 számú (1993. november 23-án benyújtott) szabadalmi bejelentésekben leírt módon, mindhárom bejelentés bejelentője jelen bejelentésével azonos, és mindhármát teljes terjedelmében referenciaként építjük be leírásunkba.

3. Példa, (3) képletű vegyület

A (2R-hidroxi-3-[[[(4-metoxi-fenil)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-karbaminsav-5-pirimidil-metil-észter előállítható a 08/110 911 számú (1993. augusztus 24-én benyújtott) és a 08/156 498 számú (1993. november 23-án benyújtott) amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésekben ismertetett módon, a fenti bejelentések mindegyikének bejelentője jelen bejelentésével azonos, mindkét bejelentést teljes terjedelmében referenciaként építjük leírásunkba.

4. Példa, (4) képletű vegyület

Az $[1S-[1R^*(R^*),2S^*]]-N-[2-hidroxi-3-[N^1-(2-metil-propil)-N^1-(4-metoxi-fenil-szulfonil)-amino]-1-(fenil-metil)-propil]-2-metil-3-(metil-szulfonil)-propánamid$ előállítható a 08/110 913 számú (1993. augusztus 24-én benyújtott) és a 08/156 498 számú (1993. november 23-án benyújtott) amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésekben ismertetett módon, amelyek mindegyi-



kének bejelentője jelen bejelentésével azonos, mindkettőt teljes terjedelmében referenciaként építjük leírásunkba.

5. Példa, (5) képletű vegyület

Az N-(2(R)-hidroxi-1(S)-indanil)-2(R)-fenil-metil-4(S)-hidroxi-5-(1-(4-(3-piridil-metil)-2(S)-N'-(terc-butil-karboxamido)-piperazinil))-pentánamid (L-735 524) előállítható a 07/883 825 számú (1992. május 15-én benyújtott amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban és a WO 93/09096 közzétételi számú PCT szabadalmi leírásban, valamint a Tet. Lett. 35, 673-676 (1994) és Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 4096-4100 (1994) szakirodalmi helyeken leírt eljárásokkal, a fenti hivatkozások mindegyikét teljes terjedelmében referenciaként építjük leírásunkba.

6. Példa, (6) képletű vegyület

Az N-terc-butil-dekahidro-2-[2(R)-hidroxi-4-fenil-3(S)-[[N-(2-kinolil-karbonil)-L-aszparaginil]-amino]-butil]-(4aR,8aS)-izokinolin-3(S)-karboxamid (Ro 31-8959) előállítható az 5 157 041 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetett módon, amely leírást teljes terjedelmében referenciaként építünk leírásunkba.

7. Példa, (7) képletű vegyület

Az [1S-[1R*(R*),2S*]]-N¹-[3-[[[(1,1-dimetil-etil)-amino]-karbonil]-(3-metil-butil)-amino]-2-hidroxi-1-(fenil-metil)-propil]-2-[(2-kinolinil-karbonil)-amino]-butándiamid előállítható a 08/152 934 számú (1993. november 15-én benyújtott) és a 08/156 498 számú (1993. november 23-án benyújtott) amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésekben ismertetett módon, mindkét bejelentés bejelentője azonos a jelen bejelentésével, és mindkét hivatkozott szabadalmi leírást teljes terjedelmében referenciaként építjük leírásunkba.



8. Példa, (8) képletű vegyület

Az N-[3-[N²-[N¹-(1,1-dimetil-etil)-amino-szulfonil]-N²-(2-metil-propil)-amino]-2R-hidroxi-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-[(2-kinolinil-karbonil)-amino]-butándiamid előállítható a PCT/US93/10552 számú (1993. október 29-én benyújtott) szabadalmi bejelentésben és a 08/156 498 számú (1993. november 23-án benyújtott) amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben ismertetett eljárásokkal, melyek mindegyikének bejelentője a jelen bejelentés bejelentőjével azonos, mindkét bejelentést teljes terjedelmében referenciaként építjük leírásunkba.

9. Példa, (9) képletű vegyület

A (2S,3R,4S,5S)-2,5-bisz-[N-[N-[[N-metil-N-(2-piridinil-metil)-amino]-karbonil]-valinil]-amino]-3,4-dihidroxi-1,6-difenil-hexán (A-77003) előállítható a J. Med. Chem. 36. 320-330 (1993) szakirodalmi helyen leírt módon, amelyet teljes terjedelmében referenciaként építünk leírásunkba.

10. Példa, (10) képletű vegyület

A (2S,3S,5S)-5-[N-[N-[N-metil-N-[(2-izopropil-4-tiazolil)-metil]-amino]-karbonil]-valinil]-amino]-2-[N-[(5-tiazolil)-metoxi-karbonil]-amino]-3-hidroxi-1,6-difenil-hexán (A-84538, ABT-538) előállítható a WO 94/14436 közzétételi számú PCT szabadalmi bejelentésben (1993. december 16-án benyújtott) leírt módon, amelyet teljes terjedelmében referenciaként építünk leírásunkba.

11. Példa, (11) képletű vegyület

A [2R-hidroxi-3-[[[(4-amino-fenil)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-karbaminsav-3S-tetrahidrofuranil-észter (VX-478) előállítható a WO 94/05639 közzétételi számú (1993. szeptember 7-én benyújtott) PCT szabadalmi bejelentésben ismertetett módon, amelyet teljes egészében referenciaként építünk leírásunkba.



12. Példa, (12) képletű vegyület

Az N-terc-butil-dekahidro-2-[2(R)-hidroxi-4-(fenil-tio)-3(S)-[[N-[(2-metil-3-hidroxi-fenil)-karbonil]-amino]-butil]-(4aR,8aS)-izokinolin-3(S)-karboxamid (AG-1343, AG-1350) előállítható a Bioorg. & Med. Chem. Let. 5, 715-720, 5, 721-726 és 5, 727-732 (1995) szakirodalmi helyeken ismertetett módon, amelyek mindegyikét teljes egészében referenciaként építjük leírásunkba. Különösen a 3-hidroxi-2-metil-benzoészav HOBt aktív észtere [Bioorg. & Med. Chem. Let. 5, 727-732 (1995)] kapcsolható az N-terc-butil-dekahidro-2-[2(R)-hidroxi-4-(fenil-tio)-3(S)-amino-butil]-(4aR,8aS)-izokinolin-3(S)-karboxamidhoz [Bioorg. & Med. Chem. Let. 5, 715-720 (1995)].

13. Példa, (13) képletű vegyület

A [4R-(4 α ,5 α ,6 β ,7 β)]-1,3-bisz[(3-amino-fenil)-metil]-hexahidro-5,6-dihidroxi-4,7-bisz(fenil-metil)-2H-1,3-diazepin-2-on (DMP-450, XM-412) előállítható a WO 93/07128 közzétételi számú PCT szabadalmi bejelentésben ismertetett módon, amelyet teljes egészében referenciaként leírásunkba építünk. Különösen egy 3-nitro-fenil-metil-halogenid, így a 3-nitro-fenil-metil-klorid vagy -bromid reagál a hidroxilcsoporton védett [4R-(4 α ,5 α ,6 β ,7 β)]-hexahidro-5,6-dihidroxi-4,7-bisz(fenil-metil)-2H-1,3-diazepin-2-on-származékkal, ezt követően a hidroxilcsoportok védőcsoportját eltávolítjuk (lásd a WO 93/07128 közzétételi számú PCT szabadalmi leírásban), és a nitrocsoportot aminocsoporttá redukáljuk. Az ilyen redukálás szakember számára ismert eljárásokkal végezhető.

14. Példa, (14) képletű vegyület

N-[2R-hidroxi-3-[[[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-[[pirrolidin-1-il)-acetil]-amino]-3,3-dimetil-butánamid előállítása

A Rész: 1,3-benzodioxol-5-szulfonil-klorid előállítása

4,25 g vízmentes N,N-dimetil-formamid 0 °C hőmérsékletű oldatához nitrogéngáz atmoszférában 7,84 g szulfuril-kloridot adunk, ekkor szilárd anyag



képződik. Az elegyet 15 percig keverjük, majd 6,45 g 1,3-benzodioxolt adunk hozzá, és 2 órán át 100 °C hőmérsékleten tartjuk. Ezután az elegyet lehűtjük, jeges vízbe öntjük, metilén-kloriddal extraháljuk, magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, majd besűrítjük. 7,32 g nyerterméket nyerünk fekete olaj formájában. Ezt a nyerterméket szilikagélen kromatografáljuk, 20 % metilén-kloridot tartalmazó hexánt alkalmazunk eluensként, így 1,9 g (1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil-kloridot nyerünk.

Más módon, egy 22 literes gömblombikot mechanikus keverővel, kondenzálólhűtővel, melegítőköpennyel és nyomáskiegyenlítő csepegtetőtölcsérrel szerelünk fel, és 2778 g, 18,1 mól kén-trioxid-DMF-komplexet adunk bele. Ezután 4 liter diklór-etánt adunk hozzá, és megindítjuk a keverést. A csepegtetőtölcséren át 5 perc alatt 1905 g, 15,6 mól 1,3-benzodioxolt adunk az elegyhez, majd hőmérsékletét 75 °C-ra növeljük, és 22 órán át ezen az értéken tartjuk (NMR vizsgálat szerint a reakció 9 óra alatt lejártszódik). A reakcióelegyet 26 °C hőmérsékletre hűtjük, és 2990 g, 18,1 mól oxalil-kloridot adunk hozzá olyan sebességgel, hogy az elegy hőmérsékletét 40 °C alatt tartsuk (ez mintegy 1,5 órát vesz igénybe). Az elegyet ezután 67 °C hőmérsékleten tartjuk 5 órán át, majd jégfürdőben 16 °C-ra hűtjük. Az elegyhez 5 liter vizet adunk olyan sebességgel, hogy hőmérséklete 20 °C alatt maradjon. A víz teljes beadagolása után az elegyet 10 percig keverjük. A rétegeket elválasztjuk, a szerves fázist 2 x 5 liter vízzel mossuk. A szerves fázisokat 500 g magnézium-szulfáton szárítjuk, majd a szárítóanyag eltávolítására szűrjük, ezután az oldószert vákuumban 50 °C hőmérsékleten eltávolítjuk. A visszamaradó meleg folyadékot hagyjuk lehűlni, közben szilárd anyag képződése indul meg. 1 óra elteltével a szilárd anyagot 400 ml hexánnal mossuk, szűrjük, és szárítjuk. Így 2823 g kívánt szulfonil-kloridot nyerünk. A hexános mosófolyadékot besűrítjük, a kapott szilárd anyagot 400 ml hexánnal mossuk, így további 464 g szulfonil-kloridot nyerünk. Az

össz-hozam az 1,3-benzodioxolra vonatkoztatott 95,5 %, az össz kapott anyagmennyiség 3287 g.

B Rész: 2S-[Bisz(fenil-metil)-amino]-3-fenil-propanol előállítása

1. Eljárás: 2S-[bisz(fenil-metil)-amino]-3-fenil-propanol előállítása a DIBAL-ból. N,N-bisz(fenil-metil)-L-fenilalanin-fenil-metil-észter redukálása

1. Lépés: 50,0 g, 0,302 mól L-fenilalanin, 24,2 g, 0,605 mól nátrium-hidroxid és 83,6 g, 0,605 mól kálium-karbonát 500 ml vízben készült oldatát 97 °C hőmérsékletre melegítjük. Az elegyhez lassan (25 perces adagolási idő alatt) 108,5 ml, 0,605 mól benzil-bromidot adunk. Az elegyet 97 °C hőmérsékleten 30 percig nitrogéngáz atmoszférában keverjük. Az oldatot szobahőmérsékletre hűtjük, 2 x 250 ml toluollal extraháljuk, majd az egyesített szerves fázisokat vízzel és sóoldattal mossuk, magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, majd olajjá sűrítjük be. Az N,N-bisz(fenil-metil)-L-fenilalanin-fenil-metil-észter szilikagél oszlopon kromatografálással tisztítható eluensként 15 % etil-acetátot tartalmazó hexán alkalmazásával. Szokásosan a termék elegendően tiszta ahhoz, hogy a következő lépésben további tisztítás nélkül használjuk fel. EIMS: m/z 434 (M-1).

2. Lépés: Az előző reakcióban kapott 0,302 mól benzilált fenil-alanin-fenil-metil-észtert 750 ml toluolban oldjuk, és -55 °C hőmérsékletre hűtjük. Az oldathoz 443,9 ml, 0,666 mól, 1,5 mól/literes toluolos DIBAL oldatot adunk olyan sebességgel, hogy a hőmérsékletet -55 °C és -50 °C között tartssuk (az adagolás ideje mintegy 1 óra). Az elegyet 20 percig nitrogéngáz atmoszférában keverjük, majd -55 °C hőmérsékleten lassan hozzáadunk 37 ml metanolt. A hideg oldatot ezután 1,8 liter hideg (5 °C hőmérsékletű) 1,5 n hidrogén-kloridba öntjük, a kicsapódott mintegy 138 g szilárd anyagot kiszűrjük, és toluollal mossuk. A szilárd anyagot 400 ml toluol és 100 ml víz elegyében szuszpendáljuk. Az elegyet 5 °C hőmérsékletre hűtjük, 186 ml, 2,5 n nátrium-hidroxidot adunk hozzá, és szobahőmérsékleten a szilárd anyag oldódásáig keverjük. A toluolos fázist a vi-



zes fázistól elkülönítjük, vízzel és sóoldattal mossuk, magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, és 75 ml térfogatra (89 g) sűrítjük be. A visszamaradó anyaghoz 25 ml etil-acetátot és 25 ml hexánt adunk, ekkor a kívánt alkohol kristályosodása megkezdődik. 30 perc elteltével további 50 ml hexánt adunk a további kristályosodás elősegítésére az elegyhez. A szilárd anyagot szűrjük, 50 ml hexánnal mossuk, így 34,9 g első hozamot nyerünk a termékből. A termék 5,6 g-os második hozamát az anyalúg ismételt szűrésével izoláljuk. A két hozamot egyesítjük, és 20 ml etil-acetátból és 30 ml hexánból átkristályosítjuk. Így az L-fenilalaninra számított 40 %-os hozammal 40 g 2S-[bisz(fenil-metil)-amino]-3-fenil-propanolt nyerünk.

Elemzési eredmények a $C_{23}H_{25}ON$ képlet alapján:

számított: C % = 83,34; H % = 7,60; N % = 4,23;

talált: C % = 83,43; H % = 7,59; N % = 4,22.

2. Eljárás: β S-2-[Bisz(fenil-metil)-amino]-benzol-propanol előállítása L-fenil-alaninol N,N-dibenzilezésével

176,6 g, 1,168 mól L-fenilalaninol 484,6 g, 3,506 mól kálium-karbonát 710 ml vízben készült kevert oldatához adunk. Az elegyet nitrogéngáz atmoszférában 65 °C hőmérsékletre melegítjük, majd 400 g, 2,339 mól benzil-bromid 305 ml 3A etanolban készült oldatát adjuk hozzá olyan sebességgel, hogy az elegy hőmérséklete 60-68 °C között maradjon. A bifázisos oldatot 65 °C hőmérsékleten 55 percig keverjük, majd erőteljes keverés mellett hagyjuk 10 °C hőmérsékletre hűlni. Az olajos termék kis granulomok formájában megszilárdul. A terméket 2,0 liter csapvízzel hígítjuk, és 5 percig keverjük, hogy a szerves melléktermékek oldódjanak. A terméket vákuumban végzett szűréssel különítjük el, és vízzel pH = 7-ig mossuk. A kapott nyersteget 1,1 liter 1:10 arányú etil-acetát/heptán elegyből kristályosítjuk. A terméket -8 °C hőmérsékleten végzett szűréssel különítjük el, 1,6 liter hideg (-10 °C hőmérsékletű) 1:10 arányú etil-acetát/heptán eleggyel mossuk, és levegőn szárítjuk. 88 %-os hozammal 339 g

2S-[Bisz(fenil-metil)-amino]-3-fenil-propanolt nyerünk, amelynek olvadáspontja 71,5-73,0 °C.

C Rész: 2S-[Bisz(fenil-metil)-amino]-3-fenil-propánaldehyd előállítása

1. Eljárás: 200 g, 0,604 mól 2S-[bisz(fenil-metil)-amino]-3-fenil-propanolt 300 ml, 2,15 mól trietil-aminban oldunk. Az elegyet 12 °C hőmérsékletre hűtjük, és 380 g, 2,39 mól kén-trioxid/piridin komplex 1,6 liter DMSO-ban készült oldatát adjuk hozzá olyan sebességgel, hogy az elegy hőmérséklete 8 - 17 °C maradjon. Az oldatot szobahőmérsékleten, nitrogéngáz atmoszférában 1,5 órán át keverjük, majd jeges vízzel hűtjük, és 45 perc alatt 1,6 liter hideg (10-15 °C hőmérsékletű) vizet adunk hozzá. A kapott oldatot 2,0 liter etil-acetáttal extraháljuk, 2,0 liter 5 %-os citromsavval és 2,2 liter sóoldattal mossuk, 280 g magnézium-szulfáton szárítjuk, majd szűrjük. Az elegyről az oldószert vákuumban eltávolítjuk, a visszamaradó anyagot vákuumban szárítjuk, így 99,9 %-os hozammal 198,8 g 2S-[bisz-(fenil-metil)-amino]-3-fenil-propánaldehydet nyerünk halványsárga olaj formájában. A kapott nyerstermék elegendően tiszta ahhoz, hogy a következő lépésben tisztítás nélkül használjuk fel.

2. Eljárás: 8,4 ml, 0,096 mól oxalil-klorid 240 ml diklór-metánban készült oldatát -74 °C hőmérsékletre hűtjük. Az oldathoz lassan, olyan sebességgel, hogy az elegy hőmérséklete -74 °C maradjon, hozzáadjuk 12,0 ml, 0,155 mól DMSO 50 ml diklór-metánban készült oldatát (az adagolási idő mintegy 1,25 óra). Az elegyet 5 percig keverjük, majd 0,074 mól 2S-[bisz(fenil-metil)-amino]-3-fenil-propanol 100 ml diklór-metánban készült oldatát adjuk hozzá (az adagolási idő mintegy 20 perc, a hőmérséklet -75 °C és -68 °C közötti). Az elegyet -78 °C hőmérsékleten 35 percen át nitrogéngáz atmoszférában keverjük, majd 41,2 ml, 0,295 mól trietil-amint adunk hozzá 10 perc alatt (a hőmérsékletet -78 °C és -68 °C között tartva), ekkor ammóniumsó csapódik ki. A hideg elegyet 30 percig keverjük, majd 225 ml vizet adunk hozzá. A diklór-metános fázist a vizes fázistól elkülönítjük, vízzel, majd sóoldattal mossuk, magnézium-szulfáton szárítjuk, és

besűrítjük. A visszamaradó anyagot etil-acetáttal és hexánnal hígítjuk, majd szűrjük az ammóniumsó eltávolítására. A szűrletet besűrítjük, így 2S-[bisz(fenil-metil)-amino]-3-fenil-propánaldehydet nyerünk. Az aldehidet a következő reakciólépésbe tisztítás nélkül visszük.

3. Eljárás: 1,0 g, 3,0 mmól 2S-[bisz(fenil-metil)-amino]-3-fenil-propanol, 0,531 g, 4,53 mmól N-metil-morfolin, 2,27 g 4 Å molekulaszita és 9,1 ml acetonitril elegyéhez 53 mg, 0,15 mmól tetrapropil-ammónium-perrutenátot (TPAP) adunk. Az elegyet 40 percig szobahőmérsékleten keverjük, majd vákuumban besűrítjük. A visszamaradó anyagot 15 ml etil-acetátban szuszpendáljuk, szilikagél párnán szűrjük, majd a szűrletet vákuumban besűrítjük. Az így kapott termék mintegy 50 % 2S-[bisz(fenil-metil)-amino]-3-fenil-propánaldehydet tartalmaz halványsárga olajként.

4. Eljárás: 1,0 g, 3,02 mmól 2S-[bisz(fenil-metil)-amino]-3-fenil-propanol 9,0 ml toluolban készült oldatához hozzáadunk 4,69 mg, 0,03 mmól 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinil-oxi szabad gyököt (TEMPO), 0,32 g, 3,11 mmól nátrium-bromidot, 9,0 ml etil-acetátot és 1,5 ml vizet. Az elegyet 0 °C hőmérsékletre hűtjük, és hozzáadunk 0,735 g, 8,75 mmól nátrium-hidrogén-karbonátot tartalmazó 2,87 ml 5 %-os háztartási fehérítőt és 8,53 ml vizet, az adagolást lassan, 25 perc alatt végezzük el. Az elegyet 0 °C hőmérsékleten 60 percig keverjük, majd két további adag, egyenként 1,44 ml fehérítőszert adagolunk, és ezzel az elegyet 10 percig keverjük. A vizes fázist 2 x 20 ml etil-acetáttal extraháljuk, az egyesített szerves fázisokat 4,0 ml 25 mg kálium-jodidot és 4,0 ml vizet tartalmazó, 4,0 ml oldattal, 20 ml 10 %-os vizes nátrium-tioszulfát-oldattal, majd sóoldattal mossuk. A szerves oldatot magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, majd vákuumban besűrítjük. 1,34 g nyers olajat nyerünk, amely kis mennyiségben tartalmazza a kívánt aldehidet, a 2S-[bisz(fenil-metil)-amino]-3-fenil-propánaldehydet.

D Rész: N,N-dibenzil-3(S)-amino-1,2-(S)-epoxi-4-fenil-bután előállítása

1. Eljárás: 191,7 g, 0,58 mól 2S-[bisz(fenil-metil)-amino]-3-fenil-propánal-dehidet és 56,4 ml, 0,77 mól klór-jód-metánt 1,8 liter tetrahidrofuránban tartalmazó oldatot rozsdamentes acél reaktorban nitrogéngáz atmoszférában -30 és -35 °C közé hűtünk. Az oldathoz 365 ml, 0,58 mól 1,6 mól/literes hexános n-butil-lítium-oldatot adunk olyan sebességgel, amely mellett az elegy hőmérséklete -25 °C alatt marad. Az adagolás befejezése után az elegyet -30 és -35 °C közötti hőmérsékleten 10 percig keverjük. A további reagens adagolást a következő módon végezzük: (1) további 17 ml klór-jód-metánt, majd 110 ml n-butil-lítiumot adunk -25 °C alatti hőmérsékleten. Az adagolás befejezése után az elegyet -30 és -35 °C közötti hőmérsékleten 10 percig keverjük. Ezt a műveletsort még egyszer megismételjük. (2) további 8,5 ml, 0,11 mól klór-jód-metánt, majd 55 ml, 0,088 mól n-butil-lítiumot adagolunk -25 °C alatti hőmérsékleten. Az adagolás befejezése után az elegyet -30 és -35 °C közötti hőmérsékleten 10 percig keverjük. Ezt a műveletsort ötször megismételjük. (3) További 8,5 ml, 0,11 mól klór-jód-metánt, majd 37 ml, 0,059 mól n-butil-lítiumot adagolunk -25 °C alatti hőmérsékleten. Az adagolás befejezése után az elegyet -30 és -35 °C közötti hőmérsékleten 10 percig keverjük. Ezt a műveletsort még egyszer megismételjük. A külső hűtést megszüntetjük, és az elegyet 4-16 óra alatt szobahőmérsékletre melegítjük, erre az időre a vékonyrétegkromatográfiás vizsgálat (szilikagélen, 20 % etil-acetátot tartalmazó hexán kifejlesztőszerezrel) azt mutatja, hogy a reakció lejátszódott. Az elegyet 10 °C hőmérsékletre hűtjük, és 1452 g, 16 %-os ammónium-klorid-oldatot adunk hozzá, a reakcióelegy hőmérsékletének 23 °C alatt való tartása mellett. Az elegyet ezután 10 percig keverjük, majd a szerves és vizes fázist elkülönítjük. A vizes fázist 2 x 500 ml etil-acetáttal extraháljuk, az etil-acetátos fázisokat a tetrahidrofurános fázissal egyesítjük. Az egyesített oldatot 220 g magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, és vákuumban bepároljuk. A kapott barna olajos maradékot 70 °C hőmérsékleten 0,8 bar vá-

kuumban szárítjuk 1 órán át. Így 222,8 g nyersterméket kapunk. A nyersterméket általában további tisztítás nélkül közvetlenül használjuk fel a következő reakciólépésben.

2. Eljárás: 0,074 mól nyers aldehid és 7,0 ml, 0,096 mól klór-jód-metán 285 ml tetrahidrofuránban készült oldatát $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékletre hűtjük nitrogéngáz atmoszférában. Az oldathoz 25 ml, 0,040 mól, 1,6 mól/literes hexános n-butillítiumot adunk olyan sebességgel, hogy az elegy hőmérséklete $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ legyen. Az első adagolás után 1,6 ml, 0,022 mól további klór-jód-metánt, majd 23 ml, 0,037 mól n-butillítiumot adagolunk, az elegy hőmérsékletét $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ értéken tartva. Az elegyet 15 percig keverjük. A reagensek mindegyikét, azaz 0,70 ml, 0,010 mól klór-jód-metánt és 5 ml, 0,008 mól n-butillítiumot még 4 alkalommal adagoljuk be 45 perc alatt $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten. Ezután a hűtőfürdőt eltávolítjuk, és az oldatot 1,5 óra alatt $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra melegítjük. Az elegyet 300 ml telített vizes ammónium-klorid-oldatba öntjük, a tetrahidrofurános fázist elkülönítjük, a vizes fázist 1 x 300 ml etil-acetáttal extraháljuk. Az egyesített szerves fázisokat sóoldattal mossuk, magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, majd besűrítjük. 27,4 g barna olajat nyerünk. A terméket a következő lépésben tisztítás nélkül használhatjuk.

3. Eljárás: 178,84 g, 0,54 mól 2S-[Bisz(fenil-metil)-amino]-3-fenil-propánaldehid és 46 ml, 0,71 mól bróm-klór-metán 1,8 liter tetrahidrofuránban készült oldatát -30 és $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékletre hűtjük rozsdamentes acél reaktorban, nitrogéngáz atmoszférában. Az oldathoz ezután 340 ml, 0,54 mól, 1,6 mól/literes hexános n-butillítium-oldatot adunk olyan sebességgel, hogy a hőmérsékletet $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ alatt tartsuk. Az adagolás befejezése után az elegyet -30 és $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten 10 percig keverjük. A reagensek további adagolását a következő módon végezzük: (1) További 14 ml bróm-klór-metánt, majd 102 ml n-butillítiumot adagolunk $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ alatti hőmérsékleten. Az adagolás befejezése után az elegyet -30 és $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten 10 percig keverjük.

Ezt a műveletsort még egyszer megismételjük. (2) További 7 ml, 0,11 mól bróm-klór-metánt, majd 51 ml, 0,082 mól n-butil-lítiumot adagolunk -25 °C alatti hőmérsékleten. Az adagolás befejezése után az elegyet -30 és -35 °C közötti hőmérsékleten 10 percig keverjük. Ezt a műveletsort ötször megismételjük. (3) További 7 ml, 0,11 mól bróm-klór-metánt, majd 51 ml, 0,082 mól n-butil-lítiumot adagolunk -25 °C alatti hőmérsékleten. Az adagolás befejezése után az elegyet -30 és -35 °C közötti hőmérsékleten 10 percig keverjük. Ezt a műveletsort megismételjük. Ezután a külső hűtést megszüntetjük, az elegyet 4-16 óra közötti idő alatt szobahőmérsékletre melegítjük, erre az időre a vékonyrétegkromatográfiás vizsgálat (szilikagél, 20 % etil-acetátot tartalmazó hexán kifejlesztőszer) azt jelzi, hogy a reakció lejátszódott. A reakcióelegyet 10 °C hőmérsékletre hűtjük, és 1452 g 16 %-os ammónium-klorid-oldatot adunk hozzá az elegy hőmérsékletét 23 °C alatti értéken tartva. Ezután az elegyet 10 percig keverjük, majd a szerves fázisokat elválasztjuk. A vizes fázist 2 x 500 ml etil-acetáttal extraháljuk, az etil-acetátos fázist a tetrahidrofurános fázissal egyesítjük, és az egyesített oldatot 220 g magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, és rotációs bepárlón 65 °C hőmérsékleten bepároljuk. A visszamaradó barna olajat 70 °C hőmérsékleten 0,8 bar vákuumban 1 órán át szárítjuk. 222,8 g nyersterméket nyerünk.

E Rész: N-[3(S)-[N,N-bisz(fenil-metil)-amino]-2(R)-hidroxi-4-fenil-butil]-N-izobutil-amin · oxálsavsó előállítása

1. Lépés: 388,5 g, 1,13 mól nyers N,N-dibenzil-3(S)-amino-1,2(S)-epoxi-4-fenil-bután 2,7 liter izopropanolban (vagy etil-acetátban) készült oldatához 2 perc alatt 1,7 kg, 23,1 mól izobutil-amint adunk. Az elegy hőmérsékletét 25 °C-ra, majd 30 °C-ra növeljük. Az oldatot ezután 82 °C hőmérsékletre melegítjük, és ezen a hőmérsékleten 1,5 órán át keverjük. A meleg oldatot vákuumban besűrítjük, a visszamaradó barna olajat 0,1 kPa vákuumban 16 órán át szárítjuk, így 450 g nyers olaj terméket kapunk.

2. Lépés: 8,08 g, 89,72 mmól oxálsav 76 ml metanolban készült oldatához 15 perc alatt hozzáadjuk a fenti nyers 3(S)-[N,N-bisz(fenil-metil)-amino]-1-(2-metil-propil)-amino-4-fenil-butan-2(R)-ol 90 ml etil-acetátban készült oldatát. Az elegyet szobahőmérsékleten mintegy 2 órán át keverjük, majd a kivált szilárd anyagot szűrjük, 2 x 20 ml etil-acetáttal mossuk, és vákuumban mintegy 1 órán át szárítjuk. Így 21,86 g 97 %-os diasztereomer tisztaságú sötét nyert nyerünk. Olvadáspont: 174,99 °C;

Mikroanalízis:

Számított:	C % = 71,05;	H % = 7,50;	N % = 5,53;
Talált:	C % = 71,71;	H % = 7,75;	N % = 5,39.

Más módon, 5 g nyers 3(S)-[N,N-bisz(fenil-metil)-amino]-1-(2-metil-propil)-amino-4-fenil-butan-2(R)-olt 10 ml metil-terc-butil-éterben (MTBE) oldunk, és 4 ml metanolban oldott 1 g oxálsavat adunk hozzá. Az elegyet mintegy 2 órán át keverjük, majd a kapott szilárd anyagot szűrjük, hideg MTBE-vel mossuk, és szárítjuk. Így 2,1 g fehér, szilárd anyagot nyerünk, amelynek diasztereomer tisztasága mintegy 98,9 % (HPLC csúcs alatti terület alapján).

F Rész: 1-[N-[(1,3-Benzodioxol-5-il)-szulfonil]-N-(2-metil-propil)-amino]-3(S)-[N,N-bisz(fenil-metil)-amino]-4-fenil-2(R)-butanol

2000 ml 1,4-dioxánban lévő 354,7 g, 0,7 mól N-[3(S)-[N,N-bisz(fenil-metil)-amino]-2(R)-hidroxi-4-fenil-butil]-N-izobutil-amin-oxálsav-sóhoz 241,9 g, 1,75 mól kálium-karbonát 250 ml vízben készült oldatát adjuk. Az elegyet szobahőmérsékleten 2 órán át keverjük, majd 250 ml 1,4-dioxánban 162,2 g, 0,735 mól 1,3-benzodioxol-5-szulfonil-kloridot adunk hozzá 15 perc alatt. Az elegyet szobahőmérsékleten 18 órán át keverjük, majd 1000 ml etil-acetátot és 500 ml vizet adunk hozzá, és a keverést további 1 órán át folytatjuk. A vizes fázist elkülönítjük, 200 ml etil-acetáttal tovább extraháljuk, az egyesített etil-acetátos fázisokat 500 ml 25 %-os sóoldattal mossuk, vízmentes magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, és a magnézium-szulfátot 200 ml etil-acetáttal mossuk, majd az oldó-

szert vákuumban lepároljuk. 105 %-os hozammal 440,2 g kívánt szulfonamidot nyerünk viszkózus sárga, habos olaj formájában. HPLC/MS (elektronpermet) (m/z 601 $[M+H]^+$).

Más módon, 2800 g, 5,53 mmól N-[3(S)-[N,N-bisz(fenil-metil)-amino]-2(R)-hidroxi-4-fenil-butil]-N-izobutil-amin-oxálsav-sót és 4 liter tetrahidrofuránt 22 literes, mechanikus keverővel felszerelt gömblombikba adunk. 1921 g, 13,9 mól kálium-karbonátot 2,8 liter vízben oldunk, és a tetrahidrofurános elegyhez adjuk. Az elegyet ezután 1 órán át keverjük, 1281 g, 5,8 mól 1,3-benzodioxol-5-szulfonil-kloridot 1,4 liter tetrahidrofuránban oldunk, és 25 perc alatt hozzáadjuk a reakcióelegyhez. További 200 ml tetrahidrofuránt alkalmazunk az adagoló-tölcsér öblítésére. Az elegyet ezután 14 órán át keverjük, majd 4 liter vizet adunk hozzá, újabb 30 percig keverjük, majd a fázisokat hagyjuk szétválni. A fázisokat elválasztjuk, a vizes fázist 2 x 500 ml tetrahidrofuránnal mossuk. Az egyesített tetrahidrofurános rétegeket 500 g magnézium-szulfáton szárítjuk 1 órán át. Az oldatot a szárítószer eltávolítására szűrjük, majd ebben az állapotában használjuk a következő reakciókban.

G Rész: 1-[N-[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-N-(2-metil-propil)-amino]-3(S)-amino-4-fenil-2(R)-butanol-metánszulfonsav-só előállítása

62 g, 0,010 mól nyers 1-[N-[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-N-(2-metil-propil)-amino]-3(S)-[bisz(fenil-metil)-amino]-4-fenil-2(R)-butanolt 40 ml metanolban oldunk. Az oldathoz 0,969 g, 0,010 mól metánszulfonsavat és 5 ml vizet adunk. Az elegyet 500 ml-es Parr hidrogénező palackba helyezzük, amely 225 mg 50 % víztartalmú, 20 % fémtartalmú szénhordozós $Pd(OH)_2$ -t tartalmaz. A palackot a hidrogénező berendezésbe helyezzük, nitrogénnel ötször átöblítjük, majd ötször hidrogénnel öblítjük. A reagáltatást 35 °C hőmérsékleten végezzük 434,4 kPa hidrogéngáz nyomás mellett 18 órán át. Ezután további 125 mg katalizátort adagolunk, a palackot hidrogéngázzal öblítjük, majd a hidrogénezést to-

vábbi 20 órán át folytatjuk. Az elegyet Celiten szűrjük, a szűrőpogácsát 2 x 10 ml metanollal mossuk. A metanolnak mintegy 1/3-át vákuumban eltávolítjuk. A visszamaradó metanolt toluollal való azeotróp desztillálással 10,1 kPa vákuumban eltávolítjuk. A toluolt 15, 10, 10 és 10 ml-es részletekben adagoljuk. A terméket az elegyből kristályosítjuk, szűrjük, majd 2 x 10 ml toluollal mossuk. A szilárd anyagot szobahőmérsékleten 0,1 kPa vákuumban 6 órán át szárítjuk, így 84 %-os hozammal 4,5 g aminsót nyerünk: m/z 421 $[M+H]^+$.

Más módon, a nyers 1-[N-[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-N-(2-metil-propil)-amino]-3(S)-[bisz(fenil-metil)-amino]-4-fenil-2(R)-butanol tetrahidrofuranos oldatához 500 ml vizet, majd 531 g, 5,5 mól metánszulfonsavat adunk. Az oldatot a tökéletes elegyedés biztosítására keverjük, majd 18,9 literes autoklávba visszük. Az autoklávba 500 ml tetrahidrofuránnal 200 g Perlman katalizátort (50 % víztartalmú 20 % fémtartalmú szénhordozós $Pd(OH)_2$) adunk. A reaktort nitrogénnel négyszer átöblítjük, majd négyszer öblítjük hidrogénnel. Ezután a reaktort hidrogéngázzal 515 kPa nyomásig feltöltjük, és 450 fordulat/perc keverést indítunk meg. 16 óra elteltével HPLC analízis szerint még kevés monobenzil köztitermék jelen van. További 50 g katalizátort adagolunk, és a reagáltatást éjszakán át folytatjuk. Ezután az oldatot 500 g Celiten szűrjük a katalizátor eltávolítására, majd öt részletben vákuumban bepároljuk. Minden részlethez 500 ml toluolt adunk, és vákuumban azeotróposan eltávolítjuk a maradék vizet. A visszamaradó szilárd anyagot három részre osztjuk, és minden részt 2 liter metil-terc-butil-éterrel mosunk és szűrünk. A visszamaradó oldószert szobahőmérsékleten, 0,1 kPa alatti vákuumban eltávolítjuk. Így 2714 g kívánt sót nyerünk.

H Rész: N-[2R-hidroxi-3-[[[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-[(fenil-metoxi-karbonil)-amino]-3,3-dimetil-butánamid előállítása

118,8 g, 0,776 mól N-hidroxi-benzotriazol és 137,1 g, 0,52 mól N-karbobenziloxi-karbonil-L-terc-leucin 750 ml vízmentes dimetil-formamidban készült oldatához 0 °C hőmérsékleten, nitrogéngáz atmoszférában 109,1 g, 0,57 mól EDC-t adunk. Az elegyet 0 °C hőmérsékleten 2 órán át keverjük, majd 273 g, 0,53 mól 2R-hidroxi-3-[[[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil-amin-metánszulfonát 250 ml vízmentes dimetil-formamidban készült, előzetesen 228 ml, 210 g, 2,08 mól 4-metil-morfolinnal semlegesített oldatát adjuk az elegyhez. A kapott elegyet 0 °C hőmérsékleten 30 percig, majd szobahőmérsékleten 18 órán át keverjük, ezután az oldószert vákuumban, 45 °C hőmérsékleten eltávolítjuk róla, 1,5 liter etil-acetátot adunk hozzá, 5 %-os citromsavval, telített nátrium-hidrogén-karbonáttal, majd sóoldattal mossuk, vízmentes magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, és besűrítjük. 400 g nyersterméket kapunk. Ezt a nyersterméket három részletben Prep 2000 Chromatogram szilikagélen, 20 és 50 % között változó koncentrációjú etil-acetátot tartalmazó hexán eluenssel kromatografáljuk, 320 g tisztított anyagot nyerünk. m/e = 674 (M+Li), HPLC szerint 98 %-os tisztaság.

I Rész: N-[2R-hidroxi-3-[[[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-amino-3,3-dimetil-butánamid előállítása

312 g N-[2R-hidroxi-3-[[[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-[(fenil-metoxi-karbonil)-amino]-3,3-dimetil-butánamid 1 liter tetrahidrofuranban készült oldatát 100 g 4 % fémtartalmú szénhordozós palládiumkatalizátor jelenlétében 515 kPa hidrogéngáz nyomáson 6 órán át szobahőmérsékleten hidrogénezzük. A katalizátort kiszűrjük, a szűrletről az oldószert vákuumban eltávolítjuk. 240 g kívánt vegyületet nyerünk.

J Rész: N-[2R-hidroxi-3-[[[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-[(klór-acetil)-amino]-3,3-dimetil-butánamid előállítása

234,3 g, 0,439 mól N-[2R-hidroxi-3-[[[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-amino-3,3-dimetil-butánamid 1 liter metilén-kloridban készült oldatához 80 ml, 59,5 g, 0,46 mól diizopropil-etil-amint adunk, majd lassan szobahőmérsékleten hozzáadunk 78,8 g, 0,46 mól klór-ecetsavanhidridet, miközben a hőmérsékletet 35 °C alatt tartjuk. Az elegyet további 1 órán át keverjük, ekkor HPLC elemzés szerint még kevés kiindulási anyag jelen van. Az elegyhez 1,5 g klór-ecetsavanhidridet adunk, majd 10 perc múlva az oldószert vákuumban eltávolítjuk, és a visszamaradó anyaghoz 1 liter etil-acetátot adunk, 5 %-os citromsavoldattal, telített nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal és sóoldattal mossuk, vízmentes magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, és besűrítjük. 314 g nyersterméket kapunk. Ezt három részletben Prep 2000 Chromatogram-on szilikagélen kromatografáljuk, eluensként 20 és 50 % között növekvő etil-acetát koncentrációjú hexánt alkalmazunk. 165 g kívánt vegyületet nyerünk. m/e = 616 (M+Li), HPLC szerint 98 %-os tisztaság.

K Rész: N-[2R-hidroxi-3-[[[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-[[[pirrolidin-1-il)-acetil]-amino]-3,3-dimetil-butánamid előállítása

164,2 g, 0,27 mól N-[2R-hidroxi-3-[[[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-[(klór-acetil)-amino]-3,3-dimetil-butánamidhoz 500 ml tetrahidrofuránt adunk, az oldószert vákuumban lepároljuk az etil-acetát eltávolítására, majd 350 ml tetrahidrofuránt adunk a visszamaradó anyaghoz. Ehhez az oldathoz 10 °C hőmérsékleten 130 ml, 1,56 mól pirrolidint adunk. 1 óra elteltével az oldószereket vákuumban eltávolítjuk, a visszamaradó anyaghoz 1 liter etil-acetátot adunk, telített nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal és sóoldattal mossuk, vízmentes magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, majd

besűrítjük. 185 g nyerste-terméket nyerünk, ezt HPLC eljárással vizsgálva 98,9 %-os tisztaságúnak találjuk. A terméket három részre osztjuk, és Prep 2000 Chromatogram-on kromatografáljuk, eluensként először 50 % etil-acetátot tartalmazó hexánt, majd 5 % metanolt tartalmazó etil-acetátot alkalmazunk. 160 g tisztított anyagot nyerünk, amely HPLC szerint 99 %-os tisztaságú. Ezt az anyagot 460 ml dietil-éterből és 70 ml hexánból átkristályosítva 121 g kívánt terméket nyerünk, amelynek tisztasága HPLC szerint 99 % fölötti, $m/e = 651$ (M+Li), olvadáspontja 112-114 °C.

15. Példa, (15) képletű vegyület

N-[2R-Hidroxi-3-[(2-metil-propil)-[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-metil-3-(metil-szulfonil)-propánamid előállítása

A Rész: 2(S)-metil-3-(metil-szulfonil)-propionsav előállítása

1. Lépés: 200 g, 1,23 mól D-(-)-3-acetil-b-merkaptó-izovajsav 1,0 liter metanolban készült oldatához 161,0 g, 2,47 mól kálium-hidroxid 500 ml metanolban készült oldatát adjuk, miközben az elegy hőmérsékletét jégfürdőben való hűtéssel 10 °C alatt tartjuk. Az elegyet további 20 percig keverjük, majd 117 ml, 156 g, 1,23 mól dimetil-szulfátot adunk hozzá, miközben hőmérsékletét 20 °C alatt tartjuk. A jégfürdőt eltávolítjuk, és az elegyet további 60 percig keverjük. A sókat kiszűrjük, az oldószert vákuumban eltávolítjuk, és a visszamaradó anyaghoz etil-acetátot adunk. A vizes fázist elkülönítjük, tömény hidrogén-kloriddal megsavanyítjuk, etil-acetáttal extraháljuk, vízmentes magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, majd besűrítjük. 99 %-os hozammal 164 g kívánt 2S-metil-3-(metil-tio)-propionsavat nyerünk: $m/e = 133$ (M-H).

2. Lépés: 10,0 g, 74,6 mmól 2S-metil-3-(metil-tio)-propionsav 150 ml acetonban és 30 ml vízben készült oldatához, az oldatot jégfürdőben 18 °C hőmérsékletre hűtve 161,8 g, 263 mmól oxont adunk. Miután az anyagnak körülbelül a felét beadagoltuk, és a hőmérséklet 24 °C-ra emelkedett, az adagolást leállítjuk,

a hőmérsékletet 18 °C-ra csökkentjük, majd az adagolást folytatjuk. Az elegyet 15-20 °C hőmérsékleten 15 percig keverjük, majd a fürdőt eltávolítjuk, és a reagáltatást szobahőmérsékleten folytatjuk 1 órán át. A szilárd anyagokat szűrjük, acetonnal mossuk, a szűrletet mintegy 40 ml-re sűrítjük be, és a visszamaradó anyagot 200 ml etil-acetátban oldjuk. Az etil-acetátos fázist vízmentes magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, majd besűrítjük. 11,4 g olajat nyerünk. Ezt az olajat minimális mennyiségű etil-acetátban oldjuk, és hexánt adunk hozzá, hogy csapadékot képezzünk. Ezt a csapadékot gyűjtjük, 6,95 g kívánt terméket nyerünk: $m/e = 167$ (M+H).

B Rész: N-[2R-hidroxi-3-[(2-metil-propil)-[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-metil-3-(metil-szulfonil)-propánamid előállítása

5,0 g, 30 mmól 2S-metil-3-(metil-szulfonil)-propionsav és 6,90 g, 45 mmól N-hidroxi-benzotriazol 30 ml vízmentes dimetil-formamidban készült oldatához 0 °C hőmérsékleten, nitrogéngáz atmoszférában 6,34 g, 33 mmól EDC-t adunk. Mintegy 10 perc múltán minden EDC feloldódik. Az elegyet 60 percig 0 °C hőmérsékleten tartjuk, majd hozzáadjuk 15,5 g, 30 mmól 2R-hidroxi-3-[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil-amin-metánszulfonát 30 ml vízmentes dimetil-formamidban készült, előzetesen 3,4 ml, 31,6 mmól 4-metil-morfolinnal semlegesített oldatát. Az elegyet 3 órán át 0 °C hőmérsékleten, majd 17 órán, éjszakán át keverjük. Ezután a dimetil-formamidot vákuumban eltávolítjuk, a visszamaradó anyaghoz etil-acetátot adunk, 5 %-os citromsavoldattal, telített nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, vízzel, majd sóoldattal mossuk, vízmentes magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, és besűrítjük. 16 g nyersterméket nyerünk, amely HPLC vizsgálat szerint 88 %-os tisztaságú. A terméket szilikagélen kromatografáljuk 20 és 80 % között növekvő koncentrációjú etil-acetátot tartalmazó hexán eluens alkalmazásával, és

a kapott tiszta terméket etil-acetát és hexán elegyből átkristályosítjuk. Így 8,84 g tiszta terméket nyerünk, amelynek olvadáspontja 131,8-133,8 °C.

Más módon, 35,0 g, 211 mmól 2S-metil-3-(metil-szulfonil)-propionsav és 48,3 g, 315 mmól N-hidroxi-benzotriazol 210 ml vízmentes dimetil-formamidban készült oldatához 0 °C hőmérsékleten, nitrogéngáz atmoszférában hozzáadunk 44,4 g, 231 mmól EDC-t. Mintegy 30 perc elteltével az EDC teljes egészében oldódik. További 60 percig 0 °C hőmérsékleten tartjuk az elegyet, majd 108,8 g, 211 mmól 2R-hidroxi-3-[[[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil-amin-metánszulfonát 350 ml vízmentes dimetil-formamidban készült, előzetesen 24 ml, 22,3 g 4-metil-morfolinnal semlegesített oldatát adjuk hozzá. Az elegyet 2 órán át 0 °C hőmérsékleten, majd éjszaka, 18 órán át keverjük. Ezután a dimetil-formamidot vákuumban eltávolítjuk, a visszamaradó anyaghoz 1 liter etil-acetátot adunk, 5 %-os citromsavoldattal, telített nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, vízzel, majd sóoldattal mossuk, vízmentes magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, majd besűrítjük. 120,4 g nyers-terméket kapunk, amely HPLC szerint 90 % tisztaságú. A terméket 750-1000 ml abszolút etanolból kétszer kristályosítva 82,6 g kívánt terméket nyerünk.

16. Példa, (16) képletű vegyület

2S-[[[(N-metil-amino)-acetyl]-amino]-N-[2R-hidroxi-3-[[[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-3,3-dimetil-butánamid előállítás

6,55 g, 10,7 mmól N-[2R-hidroxi-3-[[[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-[(klór-acetyl)-amino]-3,3-dimetil-butánamidhoz 25 ml tetrahidrofuránt adunk, és az oldószert az etil-acetát teljes eltávolítására vákuumban lepároljuk, majd a visszamaradó anyaghoz 25 ml tetrahidrofuránt adunk. Ehhez az oldathoz 10 °C hőmérsékleten 19 ml, 214 mmól 40 %-os vizes metil-amint adunk, majd 2 óra múlva vákuumban eltávolítjuk az oldószert, és a visszamaradó anyaghoz 1 liter etil-acetátot adunk, telített

nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, majd sóoldattal mossuk, vízmentes magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, majd besűrítjük. 6,0 g terméket nyerünk, amely 98 %-os tisztaságú.

17. Példa

A találmány szerinti retrovírus proteáz inhibitor vegyületek hatásos HIV proteáz inhibitorok. Az alábbi enzimes vizsgálat alkalmazható a kombinációs terápiában használandó retrovírus proteáz inhibitorok kiválasztására. Az ilyen vegyületek IC_{50} értéke (az a koncentráció, amelyben az inhibitor vegyület az enzimaktivitást 50 %-kal csökkenti) ezzel az eljárással kiszámítható.

Az enzimes eljárás az alábbi. A szubsztrát 2-amino-benzoil-Ile-Nle-Phe(p- NO_2)-Gln-ArgNH₂. A pozitív kontroll MVT-101 [Miller, M. és munkatársai: Science 246, 1149 (1989)]. A vizsgálati puffer 20 mmól/liter-es, pH = 6,4-es nátrium-foszfát-puffer, amely 20 % glicerint, 1 mmól/liter EDTA-t, 1 mmól/liter DTT-t és 0,1 % CHAPS-t tartalmaz. A szubsztrátot DMSO-ban oldjuk, majd 10-szeres hígítást készítünk belőle a vizsgálati pufferrel. A végső szubsztrátkoncentráció a vizsgálatnál mintegy 80 μ mól/liter. A HIV proteázt a vizsgálati pufferben mintegy 12,3 nmól végső enzim koncentrációra hígítjuk, a molekulatömeget 10780-nak számítva.

A dimetil-szulfoxid végső koncentrációja mintegy 14 %, a gliceriné mintegy 18 %. A vizsgálandó vegyületet DMSO-ban oldjuk, és DMSO-val a vizsgálati koncentráció mintegy 10-szeresére hígítjuk, majd 10 μ l szubsztrátban. A fluoreszcencia növekedését négy időpontban (0, 8, 16 és 24 perc) környezeti hőmérsékleten vizsgáljuk. Minden vizsgálatot párhuzamos lyukakban végzünk.

18. Példa

A találmány szerint kiválasztott HIV proteáz inhibitor vegyületek hatékonysága az előzőekben leírt enzim vizsgálatlaltal és az alábbi CD4+ sejtvonal vizsgálatlaltal határozható meg. A proteáz inhibitorok vírusellenes aktivitását az 50 %-os hatékony koncentráció (EC_{50}) és/vagy 90 %-os hatékony koncentráció (EC_{90})

értékekben fejezzük ki. Ezek az inhibitor koncentrációk szükségesek ahhoz, hogy a vírus replikációt 50, illetve 90 %-kal gátoljuk.

Az akután fertőzött sejtek HIV gátlásának vizsgálatára szolgáló eljárás lényegében a Pauwels és munkatársai [J. Virol. Methods 20, 309-321 (1988)] által ismertett eljárás. A vizsgálatot 96-lyukú szövettenyésztő lemezekon végezzük. A CD4+ sejtvonalat, például a CEM, MT-2, MT-4 és hasonló sejtvonalakat, 10 % magzati borjúsérummal kiegészített RPMI-1640 tápközegben (Gibco) tenyésztjük, majd 2 µg/ml polybrennel kezeljük. A szövettenyésztő lemez minden egyes lyukjába 80 µl térfogatú, 1×10^4 sejtet tartalmazó tápközeget mérünk. Minden lyukba 100 µl vizsgálandó vegyületet adunk, amely a szövettenyésztő tápközegben van oldva (vagy a tápközeget adjuk kontrollként vizsgálandó vegyület nélkül), így állítjuk be a végső kívánt koncentrációt, majd a sejteket 1 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk. Egy fagyasztott HIV-1 tenyészetet a tápközegben 5×10^4 TCID₅₀/ml koncentrációra hígítunk (TCID₅₀ = az a dózis, amelyben a vírus a szövettenyésztet sejtjeinek 50 %-át megfertőzi), és a vizsgálandó vegyületet tartalmazó lyukakba, illetve a csak tápközeget tartalmazó lyukakba (fertőzött kontroll sejtek) 20 µl vírushintát (amely 1000 TCID₅₀ vírust tartalmaz) adunk. Néhány lyukba tenyésztő tápközeget adunk vírus nélkül (fertőzetlen kontroll). Hasonló módon, meghatározzuk a vizsgálandó vegyületek saját toxicitását oly módon, hogy néhány, a vizsgálandó vegyületet tartalmazó lyukba vírus nélküli tápközeget adunk. Az alábbi táblázatban összegezzük, hogy a vizsgálatban a szövettenyésztő lemezek mit tartalmaznak:

	Sejtek	Hatóanyag	Vírus
1.	+	-	-
2.	+	+	-
3.	+	-	+
4.	+	+	+

A 2. és 4. vizsgálatban a vizsgálandó vegyületek végső koncentrációja 1, 10, 100, illetve 500 µg/ml. Pozitív hatóanyag kontrollként azidotimidint (AZT)

vagy didezoxiinozint (ddl) alkalmazunk. A vizsgálandó vegyületeket DMSO-ban oldjuk, és a szövettenyésztő tápközeggel úgy hígítjuk, hogy a végső DMSO koncentráció egyetlen esetben se haladja meg az 1,5 % értéket. DMSO-t minden kontroll lyukba a megfelelő koncentrációban adagolunk.

A vírus beadagolását illetően a sejteket 37 °C hőmérsékleten, nedvesített, 5 % szén-dioxidot tartalmazó atmoszférában 7 napig inkubáljuk. A vizsgálandó vegyületeket kívánt esetben a 0., 2. és 5. napon adagolhatjuk. A fertőzést követő 7. napon minden lyuk sejtjeit újrászuszpendáljuk, és minden sejtszuszpensióból 100 µl-t vizsgálatra eltávolítunk. Minden µl sejtszuszpensióhoz 20 µl 5 mg/ml-es 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium-bromidot adunk, és a sejteket 37 °C hőmérsékleten 5 % szén-dioxidot tartalmazó környezetben inkubáljuk. Az inkubálás időtartama alatt az MTT-t az élő sejtek metabolikusan redukálják, aminek eredményeként a sejtben egy színes formazan termék képződik. Minden mintához 100 µl 10 %-os nátrium-dodecil-szulfátot adunk, amely 0,01 n hidrogén-kloridban van oldva, ezzel a sejteket lizáljuk, a mintákat éjszakán át inkubáljuk. 590 nm-nél minden minta abszorpcióját meghatározzuk Molecular Devices mikrolemez leolvasó alkalmazásával. Meghatározzuk a vizsgált vegyület citotoxicitását és vírusellenes hatékonyságát, minek során összehasonlítjuk a fertőzött vagy fertőzetlen sejteket tartalmazó vegyülettel inkubált és a fertőzetlen, kezeletlen kontroll lyukak mintáinak abszorpció értékeit.

HIV tenyésztési eljárások

Donor limfociták stimulálása

A koagulált vérfolyadékot (a vér vörösvértestek kiülepítése után visszamaradt koagulált folyadék) az amerikai Vöröskeresztől vagy a Washington University School of Medicine vérbankjától kaptuk. Ezek a készítmények HIV és CMV antitestekre, HBV felületi antigénre (HBsAg) és ALT (alanin transzferáz) aktivitásra mint a nem-A és nem-B hepatitisz markerére előre szkrínáltak. 30 ml

leukocitában dúsított vért eltávolítunk a műanyag tartályból, és két 50 ml-es csavaros tetejű centrifugacsőbe 15-15 ml-t töltünk. Minden mintát azonos térfogatú steril, foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS) hígítunk, és pipetázással keverünk. A hígított vér minták alá Pasteur pipettával 15 ml Ficoll-Paque-t vagy LSM-t helyezünk, és hagyjuk az oldatot a cső aljára folyni. Ezután minden csövet 1300 fordulat/perc sebességgel ($400 \times g$) 45 percig 20°C hőmérsékleten centrifugálunk. A centrifugálást követően a köztes felületen lévő limfocita sávot eltávolítjuk, és 50 ml-es csőbe visszük. Steril PBS-t adunk az elkülönített limfociták hígítására, majd 1300 fordulat/perc mellett 8 percig centrifugáljuk. A sejttöledéket PBS-ben aló újrassuszpendálással és újracentrifugálással kétszer mossuk. A végül kapott sejttöledéket 20 ml PBS-ben újra szuszpendáljuk pipetázással, és az összes élő sejt számát Trypan Blue kizárással meghatározzuk.

Klinikai izolátumok akut fertőzőttségének vizsgálata

Mintegy 3×10^7 sejtet aktiválunk 48 órán át mintegy 3-5 $\mu\text{g/ml}$ PHA-val 10 % magzati borjúsérumot és 10 E/ml IL-2-t tartalmazó RPMI tápközegben. Az aktivált limfocita szuszpenzióhoz mintegy 0,001 - 0,01 fertőzési sokaságban ismert koncentrációjú vírus törzsoldatokat adunk. A sejt-vírus szuszpenziót 37°C hőmérsékleten 2 órán át inkubáljuk, hogy a vírus abszorpció megtörténjen. A visszamaradó vírus inokulumot centrifugálással eltávolítjuk, és a sejteket 10 % magzati borjúsérumot és 10 E/ml IL-2-t tartalmazó RPMI tápközegben újrassuszpendáljuk. Ezeket a fertőzött sejteket visszük a vizsgálati rendszerbe 10 mg/ml-es DMSO-ban készült törzsoldatból komplett szövettenyésztő tápközeggel hígítva oly mértékben, hogy a 96-lyukú mikrotiter lemez egy lyukjába bevitt 200 μl mennyiség mintegy 5×10^5 sejtet tartalmazzon. Kontrollként fertőzetlen, kezeletlen sejteket és csak 0,1 % DMSO-val kezelt sejteket vagy AZT vagy DDI egyikével kezelt sejteket alkalmazunk. A tenyészeteket szincitium-képződés (sejtfal nélküli roncsolt sejtek) tekintetében a fertőzést követő 7. és 11. napon

vizsgáljuk, illetve a felülúszókat reverz transzkriptáz aktivitás és p24 antigén jelenléte vonatkozásában vizsgáljuk.

Krónikus fertőzési vizsgálatok

12-lyukú mikrotiter lemez 6 lyukjába mintegy 5×10^4 sejt/lyuk mennyiségben HXB2-vel (laboratóriumi HIV-1 törzs) krónikusan fertőzött CEM sejteket adunk. A lyukak felét a vizsgálati vegyületek különböző koncentrációival kezeljük, és ugyanilyen számú fertőzetlen CEM sejtet tartunk fenn hozzáadott vegyület nélkül. Három egymást követő napon friss tápközeget adagolunk, amely vizsgálati vegyületet tartalmaz, vagy anélküli. A tenyészeteket ezután 48 órán át a tápközeg cserélése nélkül inkubáljuk. A sejteket centrifugálással gyűjtjük, PBS-val kétszer mossuk, és 0,125 mól/liter 6,8-as triszt, 4 % SDS-t, 20 % glicerint, 10 % β -merkaptó-etanolt és 0,02 % brómfenol-kéket tartalmazó 2x Laemmli pufferben újraszuszpendáljuk. A tenyészet felülúszóit 0,22 μ m-es szűrőn visszük át a sejtörmelék eltávolítására, majd 50 000 fordulat/perc mellett 90 percig centrifugáljuk a vírusrészecskék besűrítésére. A vírus üledéket 50 ml 2x Laemmli pufferben újraszuszpendáljuk. A sejt- vagy vírusszuspenziót 5 percig forraljuk, majd 10-20 %-os SDS-poliakrilamid gradiens gélen elektroforetikusan elválasztjuk. A gél tartalmát electroblott eljárással nitrocellulózra vesszük át. HIV-fajlagos proteineket p24 és p17 elleni monoklonális antitestek alkalmazásával mutatjuk ki, majd biotinhoz kötött kecske - anti-egér IgG-vel és HRP-hez kötött avidinnel. A monoklonális antitestek által felismert specifikus proteinek láthatóvá tételére 4-klór-1-naftol enzimes konverzióját alkalmazzuk. Megvizsgáljuk továbbá a krónikusan fertőzött CEM sejtek által termelt vírusok fertőzőképességét a vizsgálati vegyületek jelenlétében vagy hiányában. A szűrt felülúszókból sorozathígítást készítünk, és ezt használjuk fertőzetlen CEM sejtek (mintegy 1×10^4 /lyuk) fertőzésére. A tenyészeteket szincitiumok képződése tekintetében a fertőzést követő 7. és 11. napon megvizsgáljuk, illetve a felülúszókat reverz transzkriptáz aktivitás vagy p24 antigén vonatkozásában vizsgáljuk.

Mikro reverz transzkriptáz (RT) vizsgálat

A mikro RT vizsgálat néhány szokásos RT vizsgálat adaptációja. A módszer úgy fejlesztettük ki, hogy lehetővé tegye HIV RT aktivitás kis térfogatból való kvantitatív mérését, és megkönnyítse nagy számú minta feldolgozását.

Anyagok	Törzsoldatok	
		milliliterenként
Trisz (pH 7,8)	1,0 mól/l	50 µl
KCl	3,0 mól/l	25 µl
DTT (tárolás: -20 °C-on)	0,1 mól/l	20 µl
MgCl ₂	0,15 mól/l	33 µl
poli(rA)p(dt012-18) Pharmacia 27-7878	25 E/2,5 ml	25 µl (0,5 E)
NP-40	2 %	25 µl
³ H-TTP (NET 221A, 80 Ci/mmól)	2,5 Ci/ml	10 µl
H ₂ O		777 µl

Eljárás:

1. Lyukanként 50 µl koktélt adunk 96-lyukú U-fenekű mikrotiter lemez lyukjaiba.
2. Lyukanként 10-20 µl sejtmentes felülúszó oldatot adagolunk.
3. Mechanikus keverővel alaposan elegyítjük.
4. 37 °C hőmérsékleten 2 órán át inkubálást végzünk.
5. TOMTEK segítségével DE81 szűrőpapírra vagy ennek ekvivalensére szívatjuk.
6. 2X SSC-vel négy alkalommal öblítést végzünk.
7. 95 %-os etanollal egyszer öblítünk.
8. A szűrőt szárítjuk.
9. Béta-lemez-számlálóval (Pharmacia) való számlálást készítünk elő.

A tenyésztés menetét az 1. ábrán mutatjuk be. Több ciklusban, a vegyület növekvő koncentrációjával ismételjük meg a tenyésztést, míg az EC_{50} értékben eltolódást észlelünk.

A következőkben a HIV proteáz inhibitorra rezisztens mutánsok szelektálására alkalmas tenyésztési eljárást mutatjuk be. Fertőzött sejteket szaporítunk folytonosan proteáz inhibitor jelenlétében. Egyes tenyészeteket váltakozó heteken magas, illetve alacsony inhibitor koncentrációknak teszünk ki. Másokat állandó koncentráció mellett passzálunk (átoltás). A hatóanyag koncentrációkat időszakosan növeljük mindaddig, míg az EC_{50} következetes eltolódását nem észleljük. A dózis-hatás görbe eltolódása általában 0,5 - 1 $\mu\text{g/ml}$ vagy ezt meghaladó (5-10-szer EC_{90}) értéknél észlelhető, és függ a kezelt vírus izolátumtól. Mind laboratóriumban adaptált, mind primer klinikai HIV izolátumokat alkalmaztunk. Ugyanazokat a vírus izolátumokat hatóanyag nélkül azonos módon passzáltuk, hogy a kezelt és kezeletlen izolátumok között közvetlen nukleozid szekvencia összehasonlítást tehesünk. Általában a proteáz inhibitorokra rezisztens HIV-1 variánsokat sorozat-passzálassal szelektáltuk meghatározott proteáz inhibitorok néhány gátló koncentrációjának jelenlétében [Markowitz és munkatársai: *Journal of Virology* 69, 701-706 (1995)]. Az alábbiakban felsorolt HIV-1 variánsok azokat a mutánsokat jelölik, amelyek a szelektált vírus izolátumokban jelen vannak, de nincsenek jelen a kontroll, kezeletlen vírus izolátumokban.

RF a HIV-1_{RF} HIV-1 törzset jelöli, míg RFR jelentése azon rezisztens törzsek elegye, amelyeket RF-nek az 1. példa szerinti vegyület elleni szelektálásánál nyertünk. RFR a G48V (14/40 klón); G48V, V82A (18/40 klón) G48V, L90S (2/40 klón); G48V, I54T, V82A (1/40 klón); G48M (1/40 klón); G48V, Q61H (1/40 klón); V13I, G48V (1/40 klón); G48V, F53L, V82A (1/40 klón) és G48V, V82A, C95Y (1/40 klón) proteáz genotípussal bíró vírustörzsek elegye. RFR2

jelentése azon rezisztens törzsek elegye, amelyeket RFR klónozásával kaptunk limitáló hígítás melletti szaporodás három körében.

RFR2 a G48V, V82A (13/15 klón); G17E, G48V, V82A (1/15 klón); G48V, V82A, N37D, N88D (1/15 klón) proteáz genotípusú vírustörzsek elegyét foglalja magában. RFRR azon rezisztens törzsek elegyét jelenti, amelyeket RF-nek az 1. és 2. példák szerinti vegyületekkel szembeni szelektálásával nyertünk, majd limitáló hígításnál végzett szaporítással három körben klónoztunk. RFRR a G48V, I54T, L63P, V82A (7/9 klón); G48V, I54T, L63P, V82A, N88S (1/9 klón); és G48V, I54T, L63P, G73M, V82A (1/9 klón) proteáz genotípusú vírustörzsek elegyét foglalja magában. SF162 jelentése a HIV-1 SF-162 törzs és SF162R SF162-nek az 1. példa szerinti vegyülettel való szelektálásával kapott rezisztens törzsek elegyét jelenti. SF162R az M46I, F53L, L63P, A71V, N88D (2/3 klón); és M46I, F53L, L63P, A71V, N88D, Q92R (1/3 klón) proteáz genotípusú vírustörzsek elegyét foglalja magában. A 89-959 jelölés a HIV-1 89-959 törzset jelenti, és a 89-959R jelölés a 89-959 törzsnek a 2. példa szerinti vegyülettel való szelektálása révén kapott rezisztens törzsek elegyét jelenti. A 89-959R az N88S (4/5 klón); és D25N, T26A, D30N, D37N, R41K, G73D, R87K, N88S (1/4 klón) proteáz genotípusú vírustörzsek elegyét foglalja magában. NL4 jelentése a HIV-1 HIV-1_{NL4-3} törzs. NL4(G48V) jelentése egy olyan törzs, amelyben szintetikusán létrehozott helyspecifikus mutáció van a proteáz 48 helyzetű aminosav helyén, ahol glicin helyett valin áll. Az NL4(I84V) egy olyan törzs, amelyben a proteáz 84 helyzetű aminosav helyén szintetikusán létrehozott helyspecifikus mutáció révén izoleucin helyett valin áll. NL4(R8Q,M46I) jelentése egy szintetikusán létrehozott helyspecifikus mutációval nyert törzs, amelynek proteázában a 8-helyzetű aminosav arginin helyett glutamin, és a 46-helyzetű aminosav metionin helyett izoleucin. Az NL4(P22-538) rezisztens törzsek elegye, amelyet a HIV-1_{NL4-3} 10. példa szerinti vegyülettel való szelektálásával kaptunk 22 passzálást követően, és amely az M46I, L63P, A71V, V82F, I84V (4/10); M46I,

L63P, V82F, I84V (3/10); és M46I, A71V, V82F, I84V (3/10) proteáz genotípusokat foglalja magában.

NL4 (P37-538) jelentése HIV-1_{NL4-3} 10. példa szerinti vegyülettel való szelektálásából 37 passzálás után kapott rezisztens törzsek elegye, amelyek M46I, L63P, A71V, I84A proteáz genotípusokat foglalják magukban. NL4(538/524) olyan rezisztens törzseket jelöl, amelyeket NL4(P22-538) 5. példa szerinti vegyülettel való szelektálásával 24 passzálás után nyertünk, és az M46I, L63P, A71V, I84A proteáz genotípusokat foglalja magában. NL4(538/P7-AG) jelentése olyan rezisztens törzsek elegye, amelyeket az NL4(P22-538) 12. példa szerinti vegyülettel való szelektálásával kaptunk 7 passzálást követően, és az M46I, L63P, A71V, I84A és V32I, V82I proteáz genotípusokat foglalja magában. NL4(538/P24-AG) olyan rezisztens törzseket jelöl, amelyeket NL4(P22-538)-nak a 12. példa szerinti vegyülettel való szelektálásával 24 passzálást követően kaptunk, és az M46I, L63P, A71V, I84A proteáz genotípusokat foglalja magában. NLA (P19-003) olyan rezisztens törzseket jelöl, amelyeket HIV-1_{NL4-3}-nak a 9. példa szerinti vegyülettel való szelektálásával nyertünk 19 passzálást követően, és az R8K és M46I proteáz genotípusokat foglalja magában. NL4(P34-003) olyan rezisztens törzseket jelöl, amelyeket HIV-1_{NL4-3}-nek a 9. példa szerinti vegyülettel való szelektálása révén nyertünk 34 passzálást követően, és az R8K, M46I, L63P A71V, L90M proteáz genotípusokat foglalja magában. A vírus izolátum rezisztenciára vonatkozó eredményeket az 1.-11. táblázatokban foglaljuk össze.

20. Példa

Az 1-3. táblázatokban összegzett vírus izolátum rezisztencia eredményeket az alábbi vizsgálati eljárással vagy annak kis módosításaival nyertük. Mintegy 3×10^7 sejtet aktiváltunk 48 órán át 10 % magzati borjúsérumot és 10 E/ml IL-2-t tartalmazó RPMI tápközegben lévő mintegy 3 - 5 $\mu\text{g/ml}$ PHA-val. Ismert koncentrációjú vírus törzsoldatokat adunk az aktivált limfocita szuszpenzióhoz

mintegy 0,001 - 0,1 fertőzési sokaságban. A sejt - vírus szuszpenziót 37 °C hőmérsékleten 2 órán át inkubáljuk a vírus abszorpció létrejötte érdekében. A maradék vírus oltóanyagot centrifugálással eltávolítjuk, és a sejteket 10 % magzati borjúsérumot és 10 E/ml IL-2-t tartalmazó RPMI tápközegben újraszuszpendáljuk. Ezeket a fertőzött sejteket a vizsgálati vegyület 10 mg/ml-es DMSO-ban készült törzsoldatából teljes szövettenyésztő közegben készült hígításokhoz adjuk 96-lyukú mikrotiter lemezek lyukjaiba úgy, hogy lyukanként 200 µl-ben mintegy 5×10^5 sejt legyen jelen. Fertőzött, kezeletlen sejteket, és csak 0,1 % DMSO-val kezelt sejteket vagy AZT-vel vagy DDI-vel kezelt sejteket alkalmazunk kontrollként. A tenyészeteket a fertőzést követő 7. és 11. napokon szincitium képződés szempontjából megvizsgáljuk, vagy a felülúszókat vizsgáljuk reverz transzkriptáz aktivitás vagy p24 antigén vonatkozásában.

1. Táblázat

A példa száma	Vírus izolátum (EC ₅₀ ng/ml)	
	SF162	SF162R
1.	31	443
2.	2	6
5.	4	4
6.	2	11

2. Táblázat

A példa száma	Vírus izolátum (EC ₅₀ ng/ml)	
	SF162	SF162R
1.	2	111
7.	1	108
8.	1	98

3. Táblázat

A példa száma	Vírus izolátum (EC ₅₀ ng/ml)		
	89-959	89-959R	89-959R
1.	96 [#]	5 [#]	37 ^{##}
2.	100 [#]	395 [#]	872 ^{##}
5.	36 [#]	5 [#]	38 ^{##}
6.	4		6 ^{##}
7.	13 [§]	12 [§]	
8.	12 [§]	11 [§]	

[#], ^{##}, [§] Azonos vizsgálatban kapott értékek

21. Példa

A 4-6. táblázatban összegzett vírus izolátum rezisztencia eredményeket az alábbi vizsgálati mód szerint vagy annak kis módosításaival nyertük. A vizsgálatokat 96-lyukú szövettenyésztő lemezekben végeztük. CEM-T4 sejteket szuszpendáltunk 90 % RPMI tápközeg (Gibco BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) és 10 % hőkezelt magzati borjúsérum (Gibco BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) elegyében 5×10^5 élő sejt/ml végkoncentrációra. Egy HIV tenyészet (HIV-1_{RF} törzs) fagyasztott alikvot mintáját gyorsan felolvasztjuk (37 °C hőmérsékletű vízfürdőben), és a CEM-T4 sejtekhez adjuk mintegy 0,001 - 0,01 fertőző egység/sejt végkoncentrációban. A vírus - sejt szuszpenziót kavarással gyorsan elegyítjük, és 100 µl-t azonnal hozzáadunk minden egyes vizsgálati vegyület 100 µl mennyiségű (amelyet 90 % RPMI és 10 % FBS elegyében készült kétszeres koncentrátumként készítünk), 96-lyukú szövettenyésztő lemez lyukjaiban lévő hígításához. Minden lemez tartalmaz kontroll lyukakat, amelyek sejteket és vírust tartalmaznak, de vizsgálati vegyületet nem. Minden vizsgálatban pozitív kontrollként 3'-azido-3'-deoxitimidint (AZT) használunk.

A szövettényésztő lemezeket 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk nedvesített, 5 % szén-dioxidot tartalmazó légkörben 7 napon át. Ezután meghatározzuk a vírus replikáció szintjét a felülúszóban lévő reverz transzkriptáz aktivitás mérésével, amit szokásos módszerekkel végzünk (mint azt például az előzőekben ismertettük, például a Techniques in HIV Research, szerk.: Aldovini & Walker, 1990, Stockton Press, NY szakirodalmi helyen ismertetett módon).

4. Táblázat

A példa száma	Vírus izolátum (EC ₅₀ ng/ml)	
	RF	RFR
1.	30	223 [#]
2.	40	8 [#]
3.	5	2 [#]
4.	10	0,4 [#]
5.	44 ^{##}	7 [#]
6.	12 ^{##}	15 [#]

^{#, ##} Azonos vizsgálatban kapott értékek

5. Táblázat

A példa száma	Vírus izolátum (EC ₅₀ ng/ml)	
	RF	RFR
1.	24	394
7.	2	78
8.	2	1

6. Táblázat

A példa száma	Vírus izolátum (EC ₅₀ ng/ml)		
	RF	RFR2	RFRR
1.	19	880	5609
2.	35	367	1111
5.	6	57	982
6.	6	31	962
14.	1	6	39
15.	5	9	21
16.	3	1	9

22. Példa

A 7-11. táblázatokban összegzett vírus izolátum rezisztencia eredményeket Markowitz és munkatársai eljárásával vagy annak kisebb módosításaival nyertük. Az eljárást a Journal of Virology, 69, 701-706 (1995) szakirodalmi helyen ismertetik, amelyet leírásunkba teljes egészében referenciaként építünk be.

7. Táblázat

A példa száma	Vírus izolátum (EC ₅₀ nmól/l)		
	NL4	NL4 (G48V)	NL4 (I84V)
5.	80	160	640
6.	30	150	90
10.	80	160	800
12.	25	125	125
13.	250	1000	6250
14.	8	8	72
15.	60	60	60
16.	8	8	8



8. Táblázat

A példa száma	Vírus izolátum (EC ₅₀ nmól/l)	
	NL4	NL4 (R80,M46I)
5.	80	240
6.	30	30
10.	80	240
12.	25	125
13.	250	750
16.	8	8

9. Táblázat

A példa száma	Vírus izolátum (EC ₅₀ nmól/l)		
	NL4	NL4 (P22-538)	NL4 (P37-538)
5.	80	800	6400
6.	30	150	2400
10.	80	1600	6400
12.	25	500	>3125
13.	250	5000	>31250
14.	60	60	1000
15.	8	400	1000
16.	8	8	40

10. Táblázat

A példa száma	Vírus izolátum (EC ₅₀ nmól/l)			
	NL4	NL4(538/524)	NL4(538/P7-AG)	NL4(538/P24-AG)
5.	80	6400	6400	6400
6.	30	2400	2400	2400
10.	80	6400	6400	6400
12.	25	>3125	>3125	>3125

10. Táblázat

(folytatás)

A példa száma	Vírus izolátum (EC_{50} nmól/l)			
	NL4	NL4(538/524)	NL4(538/P7-Ag)	NL4(538/P24-AG)
13.	250	>31250	>31250	>31250
16.	8	40	40	40

11. Táblázat

A példa száma	Vírus izolátum (EC_{50} nmól/l)		
	NL4	NLA (P19-003)	NL4 (P34-003)
5.	80	240	400
6.	30	30	30
10.	80	400	400
12.	25	150	375
13.	250	1250	1250
16.	8	8	8

23. Példa

A hatóanyag rezisztens HIV-1 variánsok in vitro szelektálására az 1. és 2. példák szerinti proteáz inhibitorokat alkalmaztuk, amelyek egyedi hidroxietil-karbamid-izosztert tartalmaznak. Klinikai és laboratóriumi HIV-1 törzseket passzáltunk T-sejt sejtvonalban vagy perifériás vér mononukleáris sejtekben (PBMC) növekvő hatóanyagkoncentrációk jelenlétében. A rezisztens variánsok következetesen legalább 10-szer magasabb EC_{50} értékeket mutattak, mint az azonos időtartamon át, de inhibitor jelenléte nélkül passzált kontroll vírus. A vírus DNS-t PCR eljárással sokszoroztuk, és a proteáz kódoló gén nukleotidszekvenciáját szokásos eljárásokkal meghatároztuk. A 2. és 1. példa szerinti proteáz inhibitorokra rezisztens vírusok esetén a szelektált variánsok közül

számosban következetesen a 88-helyzetű aminosavban észleltünk változást. A 88-helyzetű Asn maradék a szerkezetileg megőrzött spirális doménen belül esik, amely mind a monomer, mind a dimer aszparaginsav proteinázokban jelen van. A megfelelő Gly-Arg-Asp/Asn (86-88. egység) karboxil-terminális szekven-
cia egyedi a retrovírus aszparaginsav proteinázoknál. Míg az ezen eredmé-
nyekre adott válaszok mindegyike csak spekulatív, a rekombináns HIV-1
proteázhoz kötött prototípus hidroxietil-karbamid inhibitorok nagy felbontású
Rtg-sugár szerkezetéből származó templáton alapuló modell kísérletek azt a
feltételezést valószínűsítik, hogy az Asn88 mutáció megváltoztathatja a proteáz
konformációját.

A találmány szerinti retrovírus proteáz inhibitor vegyületek előnyösen ha-
tékony vírusellenes vegyületek, és főként retrovírusok, különösen lentivírusok
hatásos inhibitorai, mint az előzőekből látható.

Fentieknek megfelelően a találmány szerinti vegyületek hatásos inhibitorai
a HIV-nek. Feltehető, hogy a tárgyi vegyületek más HIV törzseket is gátolnak,
például a HIV-2-t, és más vírusokat, például a VISNA vírust, a majom immunhi-
ány vírust [Simian Immunodeficiency virus (SIV)], a HTLV-1-t és a HTLV-2-t.
Ennek megfelelően a találmány szerinti vegyületek hatásosak retrovírus fertő-
zések kezelésére és/vagy megelőzésére.

A találmány körébe tartoznak a retrovírus proteáz inhibitor vegyületek
szolvátjai és hidrátjai is, ha ilyenek vannak, ezeket a találmány szerinti módon
állítjuk elő vagy izoláljuk.

A retrovírus proteáz inhibitor vegyületek alkalmazhatók szervesetlen vagy
szerves savakkal alkotott sóik formájában. Ezen sók körébe tartoznak - a korlá-
tozás szándéka nélkül -: az acetát-, adipát-, alginát-, citrát-, aszpartát-,
benzoát-, benzolszulfonát-, biszulfát-, butirát-, kámforát-, kámforszulfonát-,
diglukonát-, ciklopentapropionát-, dodecilszulfát-, etánszulfonát-, glukohepta-
noát-, glicerofoszfát-, hemiszulfát-, heptanoát-, hexanoát-, fumarát-, hidrogén-

-klorid-, hidrogén-bromid-, hidrogén-jodid-, 2-hidroxi-etánszulfonát-, laktát-, maleát-, metánszulfonát-, nikotinát-, 2-naftalinszulfonát-, oxalát-, palmoát-, pektinát-, perszulfát-, 3-fenil-propionát-, pikrát-, pivalát-, propionát-, szukcinát-, tartarát-, tiocianát-, tozilát-, mezilát- és undekanoátsók.

A gyógyászati célra alkalmas sók képzésére alkalmas savak körébe olyan szervetlen savak tartoznak, mint például a hidrogén-klorid, kénsav és foszfor-sav, valamint olyan szerves savak, mint például az oxálsav, maleinsav, borostyánkősav és citromsav, előnyösen a hidrogén-klorid. A sók további példái az alkálifémekkel vagy alkáliföldfémekkel alkotott sók, például a nátrium-, kálium-, kalcium- vagy magnéziumsók vagy a szerves bázisokkal alkotott sók.

A gazdaszervezetnek beadott napi össz-dózis egyszerre vagy napi több adózisban beadva például 0,01 - 50 mg/testtömeg kg, nap, szokásosabban 0,1 - 30 mg/testtömeg kg, nap. A dózisegység készítmények tartalmazhatják a napi dózis kisebb alegységeit.

Az a hatóanyag mennyiség, amelyet a hordozóanyagokkal kombinálva egyetlen dózis formát állítunk elő, a kezelendő gazdaszervezettől és az adagolás módjától függően változó.

A kóros állapotoknak a retrovírus proteáz inhibitor vegyületekkel és/vagy kompozíciókkal való kezelésének dózis rendjét számos tényezőtől függően választjuk meg, ezek körébe tartoznak a beteg faja, kora, testtömege, neme, táplálkozása és egészségi állapota, a betegség súlyossága, az adagolás módja, farmakológiai megfontolások, például az adott esetben alkalmazott vegyület aktivitása, hatékonysága, farmakokinetikai és toxikológiai profilja, továbbá az, hogy a hatóanyagot szállító rendszert alkalmazzuk-e, vagy hogy a hatóanyagot valamely hatóanyag-kombináció részeként alkalmazzuk-e. Ennek megfelelően az adott esetben alkalmazott adagolási rend széles körön belül változhat, és ennek megfelelően eltérhet az előzőekben megadott előnyös adagolási rendtől.

A találmány szerinti vegyületek adagolhatók orálisan, parenterálisan, inhalációs permetként, rektálisan vagy helyileg dózisegység készítményekként, amelyek kívánt esetben szokásosan alkalmazott nem-toxikus, gyógyászati célra elfogadható hordozóanyagokat, segédanyagokat és vivőanyagokat tartalmaznak. A helyi adagolású készítmények lehetnek transzdermális adagolásra kialakítottak is, például transzdermális tapaszok vagy iontoforézis eszközök. A parenterális kifejezésen itt a szubkután injekciókat, intravénás, intramuszkuláris, intrasternális injekciókat és infúziós technikákat értjük.

Az injektálható készítmények, például steril injektálható vizes vagy olajos szuszpenziók a szakterületen szokásos módon formálhatók megfelelő diszpergáló- vagy nedvesítőszeres és szuszpendálószeres alkalmazásával. A steril injektálható készítmények lehetnek steril injektálható oldatok vagy szuszpenziók, nem-toxikus, parenterális adagolás céljára elfogadható hígítóanyagokban vagy oldószerekben, például 1,3-butándiolban készült oldatok. Az elfogadható hordozóanyagok és oldószerek körébe tartoznak például a víz, a Ringer-oldat és az izotóniás nátrium-klorid-oldat. Szokásosan alkalmazottak továbbá oldószerként vagy szuszpendáló közegként a steril állandó olajok. Erre a célra minden steril állandó olaj alkalmas, beleértve a szintetikus mono- vagy diglicerideket is. Továbbá, a zsírsavak, például az olajsav ugyancsak alkalmazhatók injekciók készítésére.

A hatóanyag rektális adagolására kúpok készíthetők a hatóanyagnak megfelelő nem-irritáló segédanyaggal, például kakaóvajjal és polietilén-glikollal való elegyítésével, amelyek szokásos hőmérsékleten szilárdak, de a végbél hőmérsékletén folyékonyak, és ezért a végbélben megolvadnak, és a hatóanyagot szabadon engedik.

Az orális adagolásra szolgáló szilárd dózisformák körébe tartoznak kapszulák, tabletták, pirulák, porok és granulumok. Az ilyen szilárd dózisformákban a hatóanyag legalább egy inert hígítóanyaggal, például szacharózzal, laktózzal

vagy keményítővel elegyített lehet. Az ilyen dózisformák tartalmazhatnak - a szokásos gyakorlatnak megfelelően - az inert hígítóanyagokon kívül további anyagokat is, például sikosítószereket, például magnézium-sztearátot. Kapszulák, tabletták és pirulák esetén a dózisformák tartalmazhatnak pufferolószereket is. A tablettákat és pirulákat készíthetjük továbbá bélben oldódó bevonatokkal ellátott formában is.

Az orális adagolásra szolgáló folyékony dózisformák körébe tartozhatnak gyógyászati szempontból elfogadható emulziók, oldatok, szuszpenziók, szirupok és elixírek, amelyek a szakterületen szokásosan alkalmazott inert hígítóanyagokat, például vizet tartalmaznak. Az ilyen készítmények tartalmazhatnak segédanyagokat is, például nedvesítőszereket, emulgeáló- és szuszpendálószereket, édesítőszereket, ízesítő- és illatosítóanyagokat.

A találmány szerinti retrovírus proteáz inhibitor vegyületek adagolhatók egyetlen hatóanyagként, de alkalmazhatók más, a retrovírusok, például HIV-1 ellen hatásos vírusellenes szerekkel kombinálva is. Az ilyen vegyületek körébe tartoznak például - a korlátozás szándéka nélkül - más HIV-1 proteáz inhibitorok, különféle nukleozid analógok, nem-nukleozid reverz transzkriptáz inhibitorok, tat antagonisták és glikozidáz inhibitorok.

A HIV-1 proteáz inhibitorok körébe tartoznak például - a korlátozás szándéka nélkül - az Ro 31-859 [Roberts, N.A. és munkatársai: Science, 248, 258-261 (1990) és Drugs of the Future, 16(3), 210-212 (1991)], KNI-272, (Kagayama, S. és munkatársai: Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1993, 810-817), a gyűrűs karbamid sorozat (Lam P. és munkatársai: "De Novo Design and Discovery of Potent, Nonpeptidal HIV-1 Protease Inhibitors", a 205. American Chemical Society National Meeting, Medicinal Chemistry Division, Denver, CO, 1993. március 28-április 2. 96. számú anyaga), az L-735, 524 (Dorsey, B.D. és munkatársai: "L-735,524: The Rational Design of a Potent and Orally Bioavailable HIV Protease Inhibitor", a 206. American Chemical Society

National Meeting, Medicinal Chemistry Division, Chicago, IL, 1993. augusztus 22-27., 6. számú anyaga) és ezek analógjai.

A kompetitív nukleozid analógok körébe tartoznak - a korlátozás szándéka nélkül - az azidotimidin (AZT), didezoxinozin (DDI), DDC, 3TC, D4T és a PMEA. A nem-nukleozid, nem-kompetitív reverz transzkriptáz inhibitorok példái körébe tartoznak - a korlátozás szándéka nélkül - a piridon osztály, [Wei, J.S. és munkatársai: J. Med. Chem. 36, 249-255 (1993); Hoffman, J.M. és munkatársai, J. Med. Chem. 35, 3784-3791 (1992); Saari és munkatársai: J. Med. Chem. 35, 3792-3802 (1992); Drugs of the Future 17, (4), 283-285 (1992)] és analógjai; a bisz(heteroaril)-piperazinok osztálya [Romero, D.L. és munkatársai, J. Med. Chem. 36, 1505-1508 (1993); Romero, D.L. és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 34, 746-751 és 3187-3198 (1991)] és analógjaik, és a triciklusos piridobenzo- és depirido-diazepinonok [Hargrave, K.D., J. Med. Chem. 34, 2231-2241 (1991); Merluzzi, M. J. Science 250, 1411-1413 (1990)] és analógjaik, és az 5-klór-3-(fenil-szulfonil)-indol-2-karboxamid és analógjai [Williams, T.M. és munkatársai, J. Med. Chem. 36, 1291-1294 (1993)]. A tat antagonisták körébe tartoznak - a korlátozás szándéka nélkül - az Ro 5-3335 és Ro 24-7429 [Hsu, M.C. és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 909, 6395-6399 (1993); Tam, S. és munkatársai: "TAT INHIBITORS: A New class of anti-HIV agents", a 204. American Chemical Society National Meeting, Organic Chemistry Division, Washington, DC, 1992. augusztus 23-28. 372. számú anyaga] és analógjai. A glikozidáz inhibitorok példáiként említjük - a korlátozás szándéka nélkül - a kasztanospermint, a kasztanospermin-6-butil-észtert, az N-butil-1-dezoxi-nojirimicint, az N-butil-1-dezoxi-nojirimicin-perbutil-észtert, analógjaikat és prodrugjaikat.

A terápiás szerek formálhatók különálló kompozíciókként, amelyeket lényegében egyidőben adunk be, vagy más módon, a terápiás szerek beadhatók egyetlen kompozícióként, úgy, hogy minden hatóanyag terápiásan hatékony

mennyiségben jusson a gazdaszervezetbe. Más megoldás szerint, a terápiás szerek adagolhatók különböző időpontokban úgy, hogy egyidőben csak egy vagy két hatóanyag terápiás mennyisége legyen a szervezetben.

A találmány szerinti vegyületek és kombinációk hatásos vírusellenes vegyületek és kombinációk, különösen hatásosak retrovírus inhibitorokként amint azt az előzőekben bemutatottuk. Így a találmány szerinti vegyületek hatásos HIV proteáz inhibitorok. Úgy véljük, hogy a találmány szerinti vegyületek más retrovírusokkal szemben is hatásosak lesznek, például más lentivírusokkal, és különösen egyéb HIV törzsekkel, például HIV-2-vel, humán T-sejt leukémia vírussal, sarcoma vírussal, majom immunhiány vírussal, macska leukémia vírussal, macska immunhiány vírussal és hasonlókkal szemben. Így a találmány szerinti vegyületek hatásosak retrovírus fertőzések kezelésére és/vagy megelőzésére.

A találmány szerinti vegyületek és kombinációk ugyancsak hatékonyak retrovírusok oldatokban való szaporodásának megelőzésére. Mind humán, mind állati sejtenyészetek, például T-limfocita tenyészetek használatosak számos jólismert célra, például kutatási és diagnosztikai célra, beleértve ebbe a kalibrálásokat és kontrollokat. A találmány szerinti vegyületek hatásos mennyiségét a sejtenyészet szaporítása és tárolása előtt vagy alatt adhatjuk a sejtenyészet tápközegébe, hogy megakadályozzuk a sejtenyészetben nem szándékosan, vagy nem tudottan jelenlévő retrovírus nemkívánt és nem várt replikációját. A vírus lehet eredetileg jelen a sejtenyészetben, például a HIV jelen lehet a humán T-limfocitákban sokkal azt megelőzően, minthogy a vérből kimutatható lenne, illetve jelen lehet egy vírus a vírusnak való kitettség folytán. A találmány szerinti vegyületek és kombinációk ilyen alkalmazása megelőzi, hogy a kutatók vagy klinikusok esetlegesen letális, nem tudott vagy váratlan kitettség részesei legyenek.

Az előzőek csak a találmány bemutatását szolgálták, anélkül, hogy a találmányt a bemutatott vegyületekre kívánnánk korlátozni. A szakemberek számára nyilvánvaló variációk és változtatások ugyancsak a találmány oltalmi körébe tartoznak.

Az előző leírásból szakember könnyen megismerheti a találmány lényeges jellemzőit, és anélkül, hogy a találmány szellemétől és terjedelmétől eltérne, a találmányon számos változtatást és módosítást hajthat végre annak érdekében, hogy a különböző felhasználásokhoz és körülményekhez adaptálja azt.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás retrovírus fertőzések kezelésére emlősben, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az emlősnek

(a) egy első retrovírus proteáz inhibitor hatásos mennyiségét, és

(b) egy második retrovírus inhibitor hatásos mennyiségét adagoljuk, ahol a második retrovírus proteáz inhibitor legalább egy olyan retrovírus törzzsel szemben hatékony, amely az első retrovírus proteáz törzs iránt rezisztens.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az első és második inhibitorokat úgy adagoljuk, hogy az emlősben mindkét inhibitor hatásos mennyisége legyen jelen.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az első és második inhibitorot váltakozva adagoljuk, úgy, hogy egyidőben egy inhibitor hatásos mennyisége legyen jelen az emlősben.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az alkalmazott retrovírus proteáz inhibitor

N-(2(R)-hidroxi-1(S)-indanil)-2-(R)-fenil-metil-4(S)-nhidroxi-5-(1-(4-(3-piridil-metil)-2(S)-N'-(terc-butyl-karboxamido)-piperazinil))-pentánamid;

N-terc-butyl-dekahidro-2-[2(R)-hidroxi-4-fenil-3(S)-[[N-(2-kinolil-karbonil)-L-aszparaginil]-amino]-butil]-(4aR,8aS)-izokinolin-3(S)-karboxamid;

(2S,3R,4S,5S)-2,5-bisz-[N-[N-[[N-metil-N-(2-piridinil-metil)-amino]-karbonil]-valinil]-amino]-3,4-dihidroxi-1,6-difenil-hexán;

(2S,3S,5S)-5-[N-[N-[[N-metil-N-[(2-izopropil-4-tiazolil)-metil]-amino]-karbonil]-valinil]-amino]-2-[N-[(5-tiazolil)-metoxi-karbonil]-amino]-3-hidroxi-1,6-difenil-hexán;

[2R-hidroxi-3-[[[(4-amino-fenil)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil-karbaminsav-3S-tetrahidrofuranil-észter;

N-terc-butyl-dekahidro-2-[2(R)-hidroxi-4-(fenil-tio)-3(S)-[[N-((2-metil-3-hidroxi-fenil)-karbonil)-amino]-butil]-(4aR,8aS)-izokinolin-3(S)-karboxamid;
[4R-(4 α ,5 α ,6 β ,7 β)]-1,3-bisz[(3-amino-fenil)-metil]-hexahidro-5,6-dihidroxi-4,7-bisz(fenil-metil)-2H-1,3-diazepin-2-on;

N-[2R-hidroxi-3-[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-[[pirrolidin-1-il)-acetil]-amino]-3,3-dimetil-butánamid;

N-[2R-hidroxi-3-[(2-metil-propil)-[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-metil-3-(metil-szulfonil)-propánamid;
[1S-[1R⁺(R⁺),2S⁻]]-N-[2-hidroxi-3-[N¹-(2-metil-propil)-N¹-(4-metoxi-fenil-szulfonil)-amino]-1-(fenil-metil)-propil]-2-metil-3-(metil-szulfonil)-propánamid;

2S-[[[(N-metil-amino)-acetil]-amino]-N-[2R-hidroxi-3-[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-3,3-dimetil-butánamid; vagy

(2R,3S)-3-(N-metil-amino-acetil-L-terc-butyl-glicinil)-amino-1-(N-izoamil-N-(terc-butyl-karbamoil))-amino-4-fenil-2-butanol.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az alkalmazott második retrovírus inhibitor

N-(2(R)-hidroxi-1(S)-indanil)-2-(R)-fenil-metil-4(S)-hidroxi-5-(1-(4-(3-piridil-metil)-2(S)-N'-(terc-butyl-karboxamido)-piperazinil))-pentánamid;

N-terc-butyl-dekahidro-2-[2(R)-hidroxi-4-fenil-3(S)-[[N-(2-kinolil-karbonil)-L-aszparaginil]-amino]-butil]-(4aR,8aS)-izokinolin-3(S)-karboxamid;

(2S,3R,4S,5S)-2,5-bisz-[N-[N-[[N-metil-N-(2-piridinil-metil)-amino]-karbonil]-valinil]-amino]-3,4-dihidroxi-1,6-difenil-hexán;

(2S,3S,5S)-5-[N-[N-[N-metil-N-[(2-izopropil-4-tiazolil)-metil]-amino]-karbonil]-valinil]-amino]-2-[N-[(5-tiazolil)-metoxi-karbonil]-amino]-3-hidroxi-1,6-difenil-hexán;

[2R-hidroxi-3-[[[(4-amino-fenil)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil-karbaminsav-3S-tetrahidrofuranil-észter;

N-terc-butyl-dekahidro-2-[2(R)-hidroxi-4-(fenil-tio)-3(S)-[[N-((2-metil-3-hidroxi-fenil)-karbonil)-amino]-butil]-(4aR,8aS)-izokinolin-3(S)-karboxamid;
[4R-(4 α ,5 α ,6 β ,7 β)]-1,3-bisz[(3-amino-fenil)-metil]-hexahidro-5,6-dihidroxi-4,7-bisz(fenil-metil)-2H-1,3-diazepin-2-on;

N-[2R-hidroxi-3-[[[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-[[[pirrolidin-1-il)-acetil]-amino]-3,3-dimetil-butánamid;

N-[2R-hidroxi-3-[(2-metil-propil)-[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-metil-3-(metil-szulfonil)-propánamid;
[1S-[1R⁺(R⁺),2S⁺]]-N-[2-hidroxi-3-[N¹-(2-metil-propil)-N¹-(4-metoxi-fenil-szulfonil)-amino]-1-(fenil-metil)-propil]-2-metil-3-(metil-szulfonil)-propánamid;

2S-[[[(N-metil-amino)-acetil]-amino]-N-[2R-hidroxi-3-[[[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-3,3-dimetil-butánamid; vagy

(2R,3S)-3-(N-metil-amino-acetil-L-terc-butyl-glicinil)-amino-1-(N-izoamil-N-(terc-butyl-karbamoil))-amino-4-fenil-2-butanol.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az alkalmazott első retrovírus proteáz inhibitor

N-(2(R)-hidroxi-1(S)-indanil)-2-(R)-fenil-metil-4(S)-hidroxi-5-(1-(4-(3-piridil-metil)-2(S)-N'-(terc-butyl-karboxamido)-piperazinil))-pentánamid;

N-terc-butyl-dekahidro-2-[2(R)-hidroxi-4-fenil-3(S)-[[N-(2-kinolil-karbonil)-L-aszparaginil]-amino]-butil]-(4aR,8aS)-izokinolin-3(S)-karboxamid;

(2S,3R,4S,5S)-2,5-bisz-[N-[N-[[N-metil-N-(2-piridinil-metil)-amino]-karbonil]-valinil]-amino]-3,4-dihidroxi-1,6-difenil-hexán;

(2S,3S,5S)-5-[N-[N-[N-metil-N-[(2-izopropil-4-tiazolil)-metil]-amino]-
-karbonil]-valinil]-amino]-2-[N-[(5-tiazolil)-metoxi-karbonil]-amino]-3-hidroxi-
-1,6-difenil-hexán;

[2R-hidroxi-3-[[[(4-amino-fenil)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-
-metil)-propil-karbaminsav-3S-tetrahidrofuranil-észter;

N-terc-butyl-dekahidro-2-[2(R)-hidroxi-4-(fenil-tio)-3(S)-[[N-((2-metil-3-
-hidroxi-fenil)-karbonil)-amino]-butil]-(4aR,8aS)-izokinolin-3(S)-karboxamid;

[4R-(4 α ,5 α ,6 β ,7 β)]-1,3-bisz[(3-amino-fenil)-metil]-hexahidro-5,6-dihidroxi-
-4,7-bisz(fenil-metil)-2H-1,3-diazepin-2-on;

N-[2R-hidroxi-3-[[[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-
-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-[[pirrolidin-1-il]-acetil]-amino]-3,3-dimetil-
-butánamid;

N-[2R-hidroxi-3-[(2-metil-propil)-[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-amino]-
-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-metil-3-(metil-szulfonil)-propánamid;

[1S-[1R⁺(R⁻),2S⁻]]-N-[2-hidroxi-3-[N¹-(2-metil-propil)-N¹-(4-metoxi-fenil-
-szulfonil)-amino]-1-(fenil-metil)-propil]-2-metil-3-(metil-szulfonil)-
-propánamid vagy

(2R,3S)-3-(N-metil-amino-acetil-L-terc-butyl-glicinil)-amino-1-(N-izoamil-N-
-(terc-butyl-karbamoil))-amino-4-fenil-2-butanol, és

a második retrovírus proteáz inhibitor

2S-[[[(N-metil-amino)-acetil]-amino]-N-[2R-hidroxi-3-[[[(1,3-benzodioxol-5-il)-
-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-3,3-dimetil-
-butánamid.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az első
retrovírus proteáz inhibitor

N-(2(R)-hidroxi-1(S)-indanil)-2-(R)-fenil-metil-4(S)-hidroxi-5-(1-(4-(3-piridil-
-metil)-2(S)-N'-(terc-butyl-karboxamido)-piperazinil))-pentánamid, és

a második retrovírus proteáz inhibitor

(2R,3S)-3-(N-metil-amino-acetil-L-terc-butyl-glicinil)-amino-1-(N-izoamil-N-(terc-butyl-karbamoil))-amino-4-fenil-2-butanol;

N-[2R-hidroxi-3-[(2-metil-propil)-[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-metil-3-(metil-szulfonil)-propánamid;

[1S-[1R⁺(R⁺),2S⁺]]-N-[2-hidroxi-3-[N¹-(2-metil-propil)-N¹-(4-metoxi-fenil)-szulfonil]-amino]-1-(fenil-metil)-propil]-2-metil-3-(metil-szulfonil)-

-propánamid; vagy

2S-[[[(N-metil-amino)-acetil]-amino]-N-[2R-hidroxi-3-[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-3,3-dimetil-butánamid.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az első retrovírus proteáz inhibitor

(2S,3S,5S)-5-[N-[N-[N-metil-N-[(2-izopropil-4-tiazolil)-metil]-amino]-karbonil]-valinil]-amino]-2-[N-[(5-tiazolil)-metoxi-karbonil]-amino]-3-hidroxi-1,6-difenil-hexán; és

a második retrovírus proteáz inhibitor

(2R,3S)-3-(N-metil-amino-acetil-L-terc-butyl-glicinil)-amino-1-(N-izoamil-N-(terc-butyl-karbamoil))-amino-4-fenil-2-butanol;

N-[2R-hidroxi-3-[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-[[[pirrolidin-1-il)-acetil]-amino]-3,3-dimetil-

-butánamid; vagy

2S-[[[(N-metil-amino)-acetil]-amino]-N-[2R-hidroxi-3-[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-3,3-dimetil-butánamid.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a betegnek egy harmadik retrovírus proteáz inhibitor is adunk, amely harmadik retrovírus proteáz inhibitor legalább egy olyan vírustörzs iránt hatékony, amely mind az első, mind a második retrovírus proteáz inhibitor iránt rezisztens.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , h o g y a h a r -
madik retrovírus proteáz inhibitor

N-(2(R)-hidroxi-1(S)-indanil)-2-(R)-fenil-metil-4(S)-hidroxi-5-(1-(4-(3-piridil-
-metil)-2(S)-N'-(terc-butil-karboxamido)-piperazinil))-pentánamid;

N-terc-butil-dekahidro-2-[2(R)-hidroxi-4-fenil-3(S)-[[N-(2-kinolil-karbonil)-L-
-aszparaginil]-amino]-butil]-(4aR,8aS)-izokinolin-3(S)-karboxamid;

(2S,3R,4S,5S)-2,5-bisz-[N-[N-[[N-metil-N-(2-piridinil-metil)-amino]-
-karbonil]-valinil]-amino]-3,4-dihidroxi-1,6-difenil-hexán;

(2S,3S,5S)-5-[N-[N-[N-metil-N-[(2-izopropil-4-tiazolil)-metil]-amino]-
-karbonil]-valinil]-amino]-2-[N-[(5-tiazolil)-metoxi-karbonil]-amino]-3-hidroxi-
-1,6-difenil-hexán;

[2R-hidroxi-3-[[4-amino-fenil]-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-
-metil)-propil-karbaminsav-3S-tetrahidrofuranil-észter;

N-terc-butil-dekahidro-2-[2(R)-hidroxi-4-(fenil-tio)-3(S)-[[N-((2-metil-3-
-hidroxi-fenil)-karbonil]-amino]-butil]-(4aR,8aS)-izokinolin-3(S)-karboxamid;

[4R-(4 α ,5 α ,6 β ,7 β))-1,3-bisz[(3-amino-fenil)-metil]-hexahidro-5,6-dihidroxi-
-4,7-bisz(fenil-metil)-2H-1,3-diazepin-2-on;

N-[2R-hidroxi-3-[[1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-
-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-[[pirrolidin-1-il)-acetyl]-amino]-3,3-dimetil-
-butánamid;

N-[2R-hidroxi-3-[(2-metil-propil)-[(1,3-benzodioxol-5-il)-szulfonil]-amino]-
-1S-(fenil-metil)-propil]-2S-metil-3-(metil-szulfonil)-propánamid;

[1S-[1R⁺(R⁺),2S⁺]]-N-[2-hidroxi-3-[N¹-(2-metil-propil)-N¹-(4-metoxi-fenil-
-szulfonil)-amino]-1-(fenil-metil)-propil]-2-metil-3-(metil-szulfonil)-
-propánamid;

2S-[[N-metil-amino)-acetyl]-amino]-N-[2R-hidroxi-3-[[1,3-benzodioxol-5-il)-
-szulfonil]-(2-metil-propil)-amino]-1S-(fenil-metil)-propil]-3,3-dimetil-
-butánamid; vagy

(2R,3S)-3-(N-metil-amino-acetil-L-terc-butil-glicinil)-amino-1-(N-izoamil-N-(terc-butil-karbamoil))-amino-4-fenil-2-butanol.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az első retrovírus proteáz inhibitor iránt rezisztens vírus törzsek közül legalább egy, és a második retrovírus proteáz inhibitor iránt rezisztens vírus törzsek közül legalább egy olyan retrovírus proteázt termel, amely a proteáz peptid szekvenciában legalább egy olyan aminosav-helyettesítéssel bír, amely helyettesítés a proteáz azonos szubsztrát-kötőhely régióját érinti, és hozzájárul az észlelt inhibitor-rezisztenciához.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy legalább egy, a proteáz inhibitortól eltérő vírusellenes szer is adagolunk.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy vírusellenes szerként egy nukleozid analógot, egy nem-nukleozid reverz transzkriptáz inhibitor, egy tat-antagonistát vagy glikozidáz-inhibitor alkalmazunk.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az alkalmazott nukleozid analóg AZT, DDI, DDC, 3TC, D4T vagy PMEA, és a glikozidáz-inhibitor kasztanospermin vagy N-butil-1-dezoxi-nojirmicin.

15. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a kezelt emlős ember, majom vagy macska.

16. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a retrovírus HIV vagy HTLV.

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a retrovírus HIV-1 vagy HIV-2.

18. Eljárás betegek retrovírus fertőzéseinek kezelésére, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy

(a) két olyan retrovírus proteáz inhibitort választunk ki, amelyek közül a második kiválasztott retrovírus proteáz inhibitor legalább egy olyan retrovírus

törzs iránt hatékony, amellyel szemben a kiválasztott első retrovírus proteáz törzs rezisztens, és

(b) a betegnek mind az első, mind a második kiválasztott inhibitor hatásos mennyiségét adagoljuk.

19. A 18. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az első és második inhibitort úgy adagoljuk, hogy a betegben egyidejűleg legyen jelen mindkét inhibitor hatásos mennyisége.

20. A 18. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az első és második inhibitort egymással váltakozva adagoljuk úgy, hogy egyidejűleg csak az egyik inhibitor hatásos mennyisége legyen jelen a betegben.

A meghatalmazott:

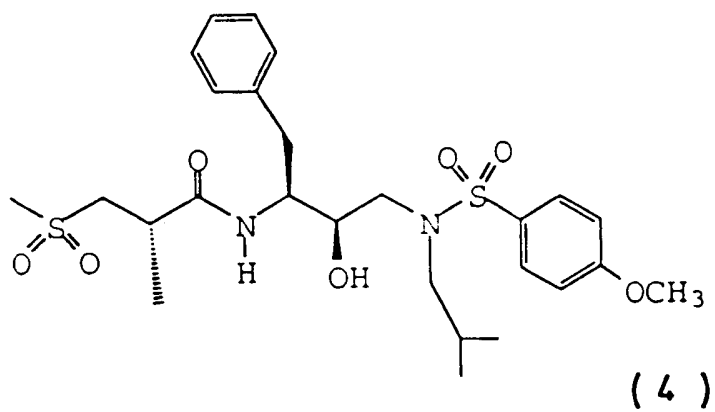
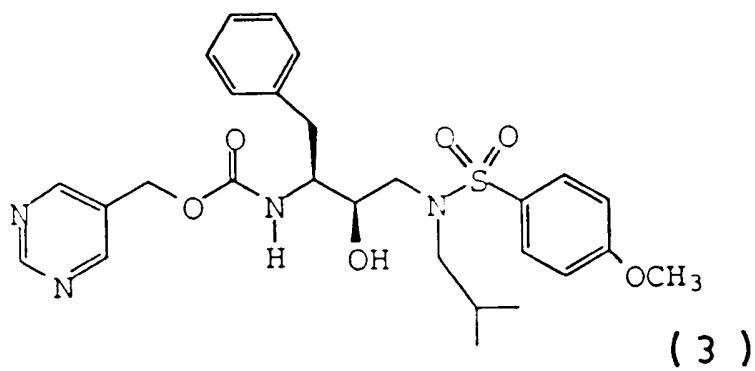
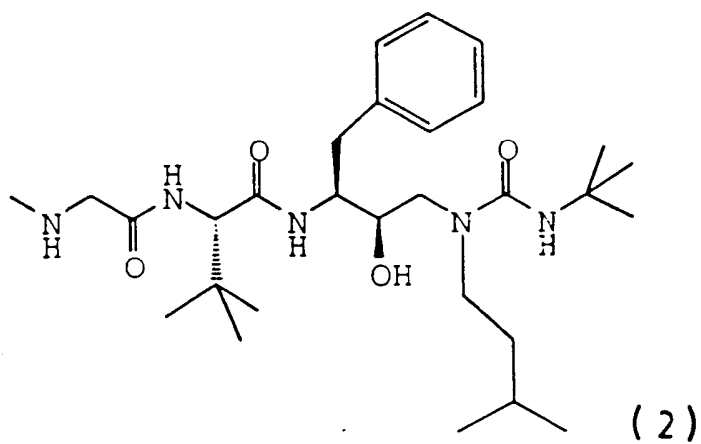
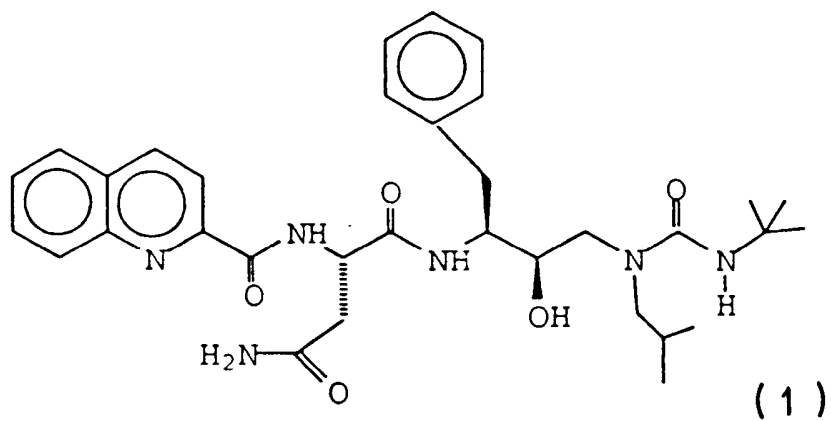
Danubia Szabadalmi és

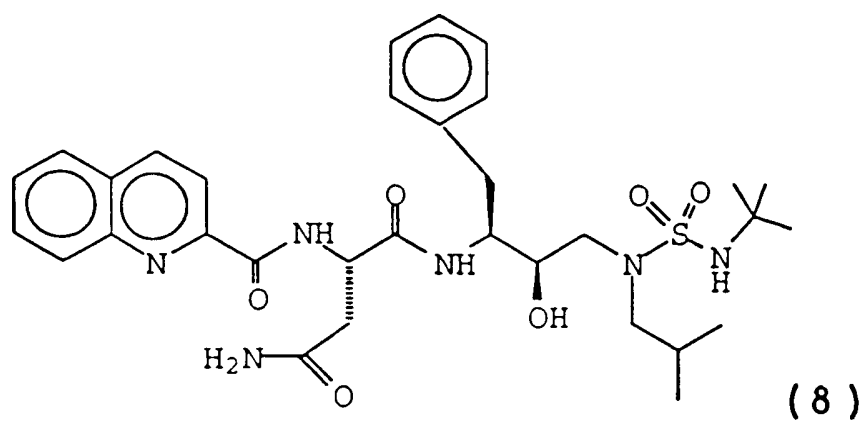
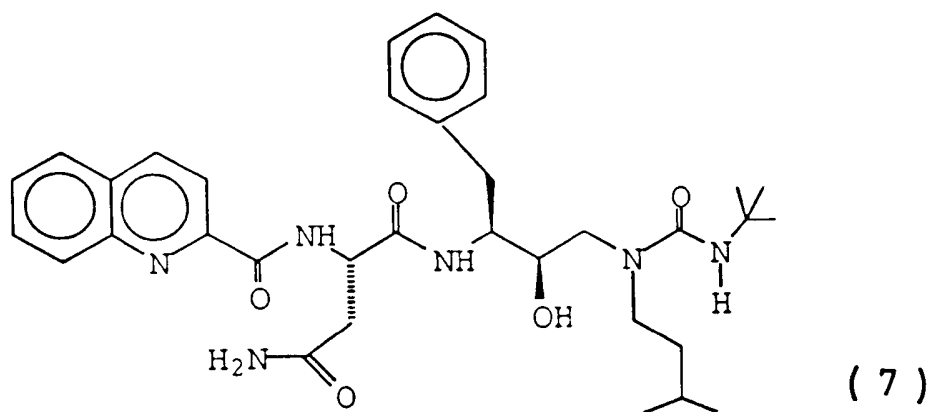
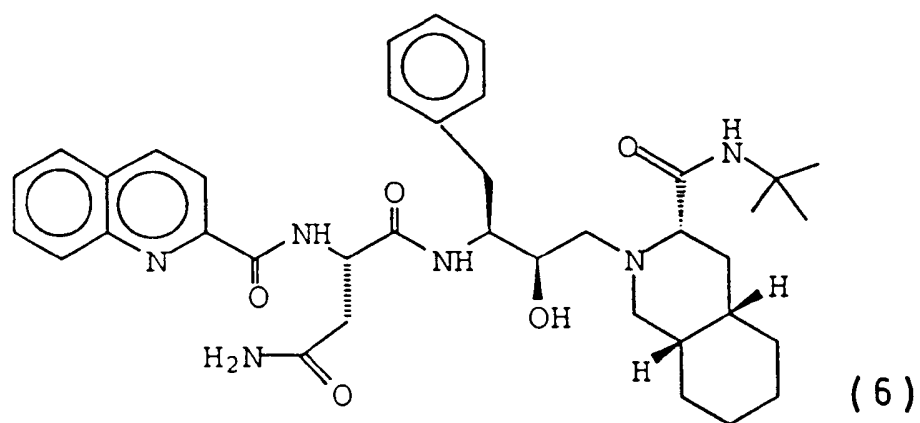
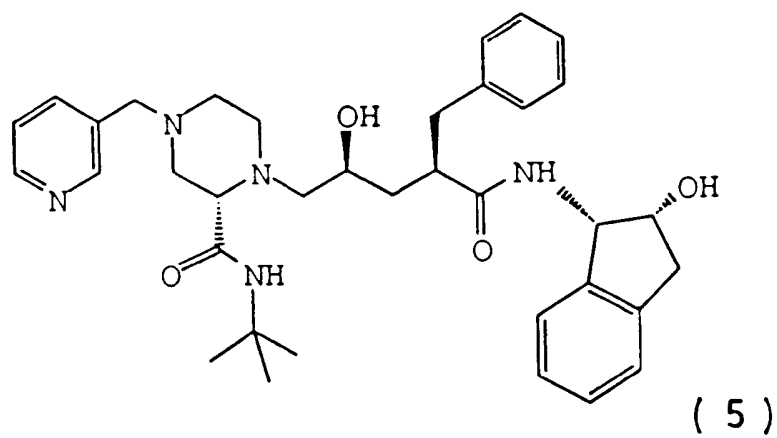
Védjegy Iroda Kft.

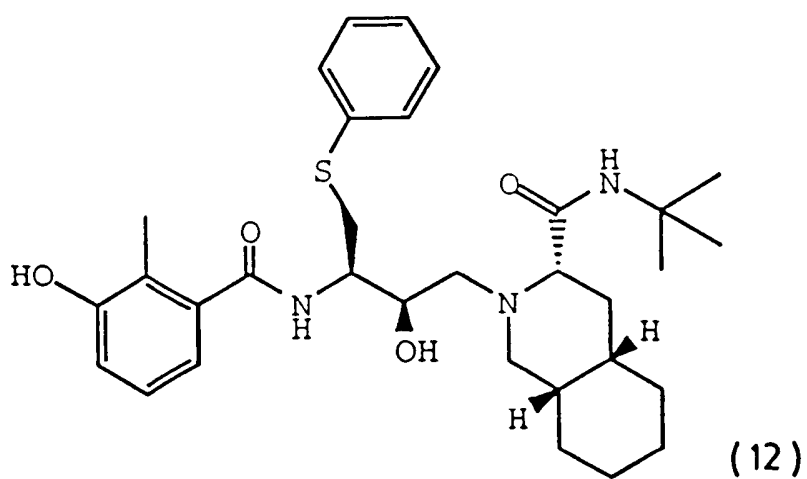
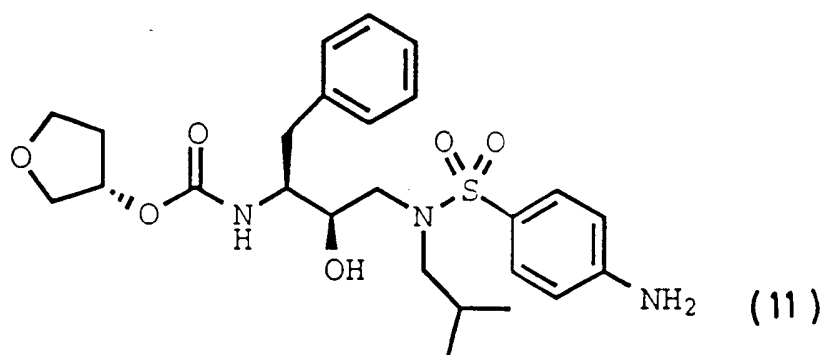
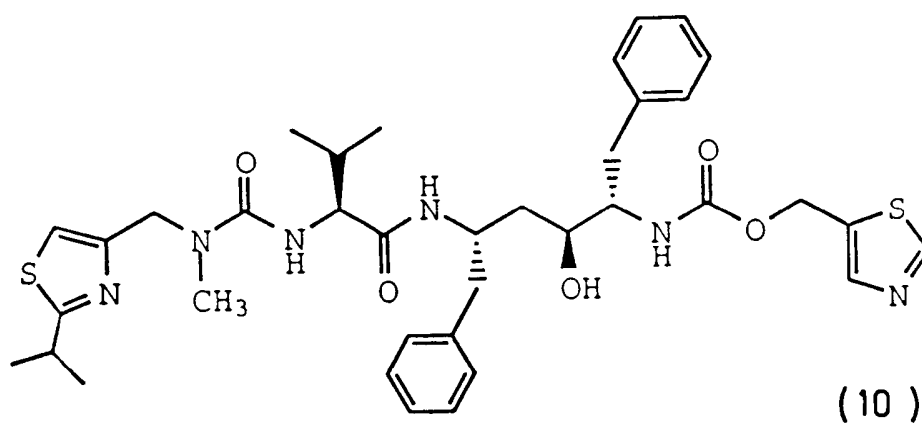
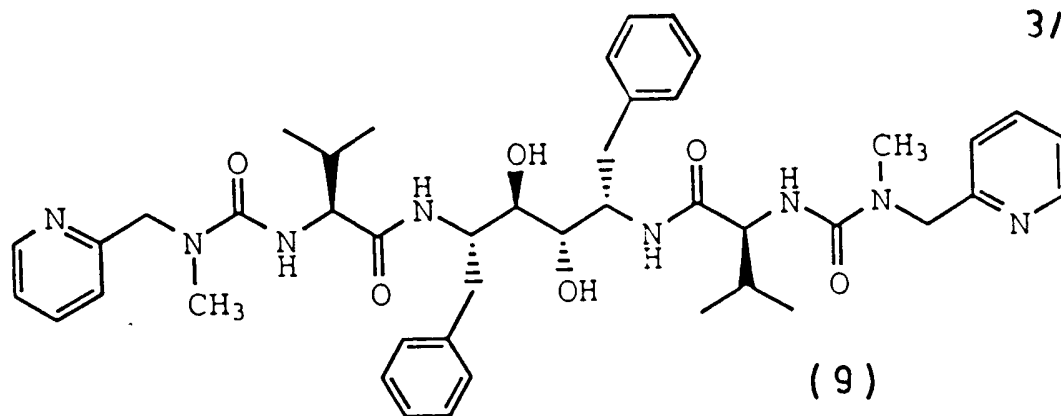
Válas

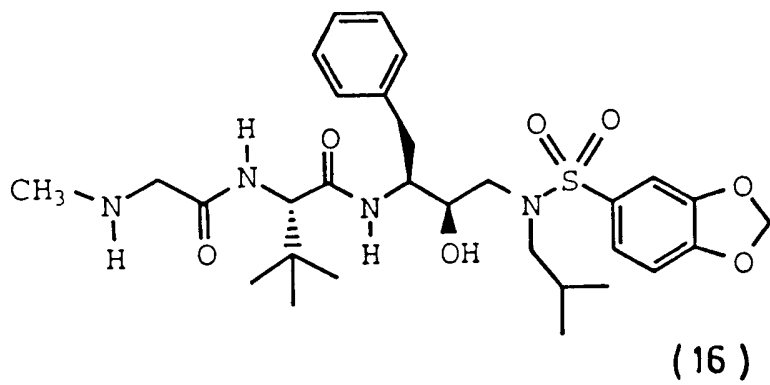
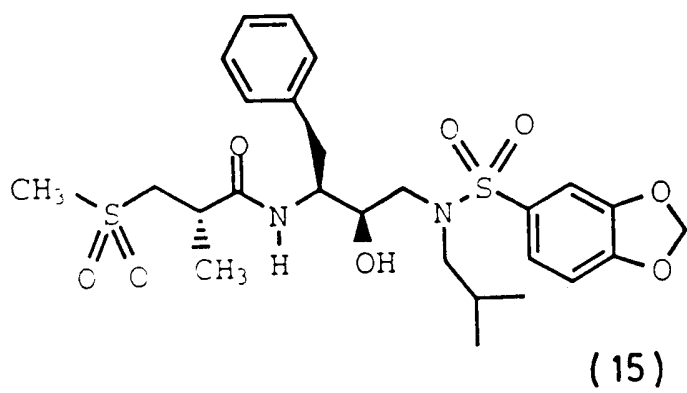
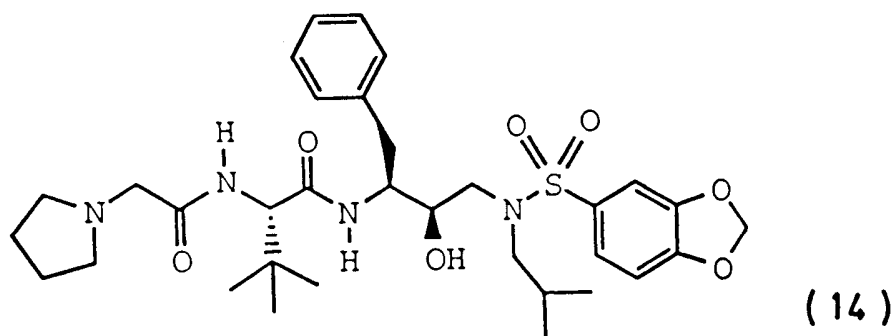
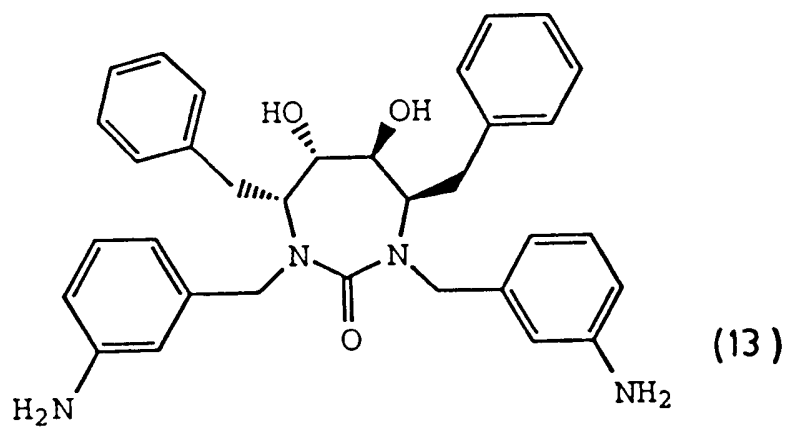
Válas Györgyné dr.

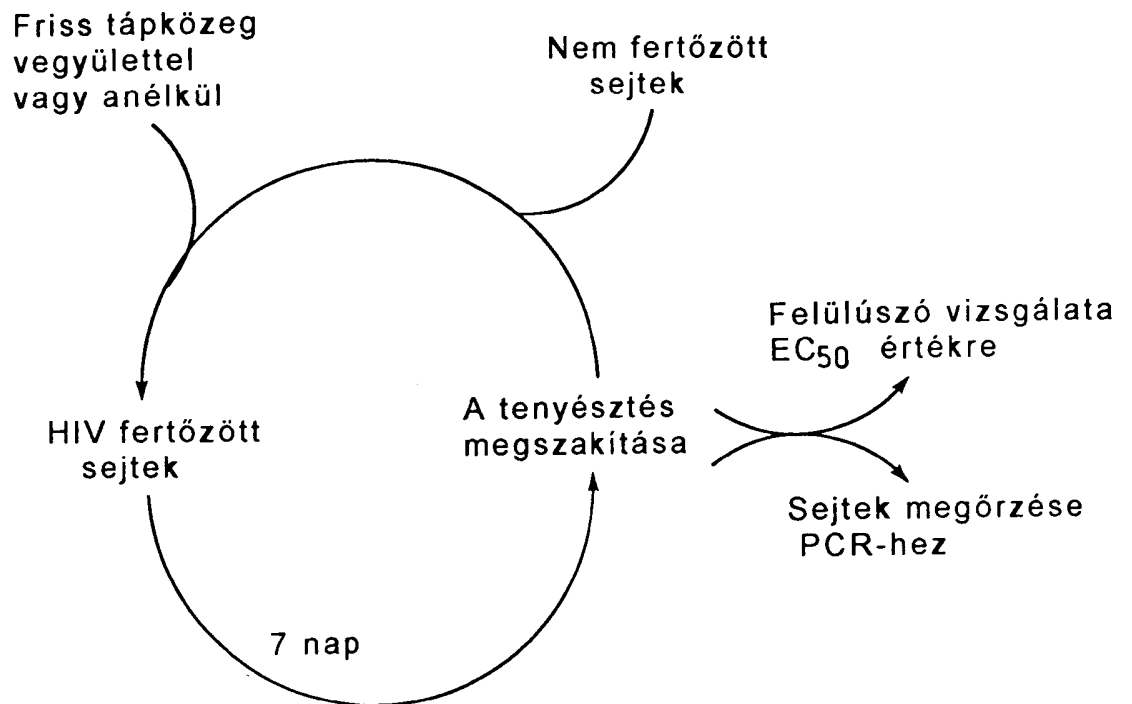
szabadalmi ügyvivő











1. ábra