(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
A61K 31/195

(45) 공고일자 1999년06월15일
(11) 등록번호 10-0203556
(24) 등록일자 1999년03월24일

(21) 출원번호 10-1991-0019402
(22) 출원일자 1991년11월01일
(65) 공개번호 특1992-0009390
(43) 공개일자 1992년06월25일

(30) 우선권주장 9023859.3 1990년11월02일 영국(GB)
9023972.4 1990년11월05일 영국(GB)
9023970.8 1990년11월05일 영국(GB)
9023971.6 1990년11월05일 영국(GB)
9116836.9 1991년08월05일 영국(GB)

(73) 특허권자 노바르티스 아게 한스 루돌프 하우스
스위스 체하-4058 바젤 슈바르쯔발트알레 215

(72) 발명자 고수영
영국 런던엔더블유3 4엘와이 벨시즈 파크가든42 플랫5
한스코벨
스위스연방 4059 바슬 바이센슈타인스트라세 1
브리지트로젠비르스
오스트리아 2340 묄딩 씨. 츠빌링가세 17
디터제바크
스위스연방 8044 쮜리히 오렐리스트라세 3
레네페.트라버
스위스연방 4052 바슬 히르츠보덴파크 20
롤랜드벵거
스위스연방 4125리엔 그렌자체르벡 45
피트로볼링거
스위스연방 4103 보트밍겐 구스탁커스트라세 56

(74) 대리인 나영환, 도두형

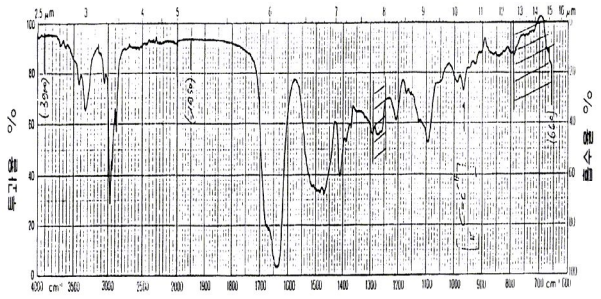
심사관 : 김희수

(54) 신규의 사이클로스포린

요약

본 발명은 AIDS 및 AIDS 관련 장애의 치료 및 예방에 유용한 비면역 억제성, 시클로필린에 결합성인 시클로스포린에 관한 것이다. 이러한 시클로스포린에는 위치 4 및/또는 5가 변형된 신규 Ciclosporin 유도체가 있다.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

신규의 사이클로스포린

[도면의 간단한 설명]

제1도는 CH_2Cl_2 중의 IR 스펙트럼 분석 결과를 나타낸 것이고,

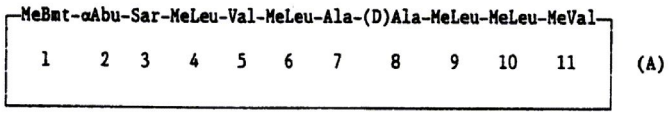
제2도는 $CDCl_3$ 중의 양자 NMR 스펙트럼 분석 결과를 나타낸 것이며,

제3도는 $CDCl_3$ 중의 300MHz ^1H NMR 스펙트럼 분석 결과를 나타낸 것이다.

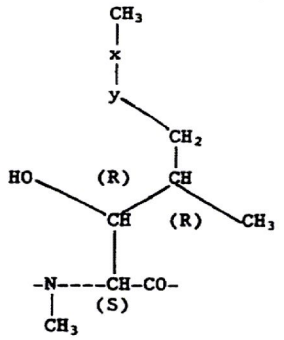
[발명의 상세한 설명]

본 발명은 신규 사이클로스포린, 이것의 약제로서의 용도와 이를 함유한 약학 조성물, 및 이것의 제조방법에 관한 것이다.

사이클로스포린(Cyclosporin)은 일종의 구조적으로 특이한 고리형의 폴리-N-메틸화 운데카펩티드로서, 대개는 약리학적 활성, 특히 면역 억제성, 소염성 및/또는 구충 활성을 갖는다. 분리하고자 하는 사이클로스포린중 첫번째 것은 천연 곰팡이의 대사물은 Ciclosporin 또는 Cyclosporine인데, 이것은 사이클로스포린 A로도 공지되어 있으며 SANDIMMUN® 또는 SADIMMUNE®이라는 이라는 등록상표로 시판되고 있다. Ciclosporin은 하기 일반식(A)의 사이클로스포린이다:



상기 식 중, MeBmt는 하기 일반식 (B)의 N-메틸-(4R)-4-부트-2E-엔-1-일-4-메틸-(L) 트레오닐 잔기를 의미한다 :



(B)

(상기식중, -x-y는 -CH=CH-(트랜스형)이다.)

Ciclosporin을 처음 발견한 이래로, 각종 천연 사이클로스포린이 분리 및 확인되었으며, 전체 합성 수단 또는 반합성 수단, 또는 변형된 배양 기법을 통해 다른 많은 비-천연 사이클로스포린을 제조했다. 상기 사이클로스포린의 종류는 현재 상당히 많으며, 그 예로는 천연 사이클로스포린 A 내지 Z {참고; 트라버 외 다수의 문헌[1, Helv. Chim. Acta, 60, 1247-1255 (1977)]; 트라버외 다수의 문헌[2, Helv. Chim. Acta, 65, 1655-1667 (1982)]; 코벨외 다수의 문헌(Europ. J. Applied Microbiology and Biotechnology, 14, 273-240 1982)]; 및 폰 바트 버그외 다수의 문헌[Progress in Allergy, 38, 28-45, 1986)]} 및, 각종 비-천연 사이클로스포린 유도체 및 디히드로-사이클로스포린 [이때, MeBmt 잔기 (상기 일반식 B)의 -x-y 부분은 포화되어 -x-y-=-CH_2-CH_2-를 형성함]을 비롯한 인공 또는 합성 사이클로스포린; 유도된 사이클로스포린(예를 들어, MeBmt 잔기의 3'-O-원자가 아실화되거나 또는 부가의 치환체가 제3위치의 사코실 잔기의 α-탄소원자에 삽입된 형태); MeBmt 잔기가 이성질체형인 사이클로스포린(예를 들어, MeBmt 잔기의 6' 및 7' 위치에 걸친 구조가 트랜스 보다는 시스형인 형태); 및 알. 웬저에 의해 개발된 사이클로스포린을 제조하는 전체 합성법을 이용하여 변형 아미노산을 펩티드 서열내의 특정 위치에 삽입시킨 사이클로스포린이 있다{참고; 트라버외 다수의 문헌 1, 트라버외 다수의 문헌 2 및 코벨외 다수의 상기 참고 문헌; 미국 특허 제4,108,985호, 제4,220,641호, 제4,288,431호, 제4,554,351호, 제4,396,542호 및 제4,798,823호; 유럽 특허 공개 제34,567A, 56,782A, 300,784A, 300,785A 및 414,632A; 국제 특허 공개 제WO 86/02080호 및 영국 특허 공개 제2,206,119호 및 제2,207,678호; 웬저 1., [Transpl. Proc., 15 suppl. 1: 2230 (1983)]; 웬저 2., [Angew. Chem. Int. Ed. 24 77 (1985)] 및 웬저 3., [Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, 50, 123 (1986)]}.

따라서 사이클로스포린류는 현재 매우 많으며, 그 예로는 $[Thr]^2$-, $[Val]^2$-, $[Nva]^2$- 및 $[Nva]^2$-$[Nva]^5$-Ciclosporin(이들은, 각각 사이클로스포린 C, D, G 및 M으로도 공지되어 있음), $[3\text{-}O\text{-아세틸-MeBmt}]^1$-Ciclosporin(이것은 사이클로스포린 A 아세테이트로도 공지되어 있음), $[디히드로\text{-MeBmt}]^1$-$[Val]^2$-Ciclosporin(디히드로-사이클로스포린 D로도 공지되어 있음), $[(D)\ Ser]^8$-Ciclosporin, $[Melle]^{11}$-Ciclosporin, $[(D)MeVal]^{11}$-Ciclosporin(사이클로스포린 H로도 공지되어 있음), $[MeAla]^6$-Ciclosporin, $[(D)Pro]^3$-Ciclosporin 등이 있다.

사이클로스포린의 통상적인 명명법에 따라. Ciclosporin (즉, 사이클로스포린 A)의 구조를 참고하여 본 명세서 및 특허 청구범위 전반에 걸쳐 이들을 정의하였다. 이러한 정의는, 먼저 Ciclosporin에 존재하는

것과 다른 분자의 잔기를 표시한 다음 Ciclosporin에 존재하는 것과 동일한 나머지 잔기를 특징화 하기 위해 용어 Ciclosporin를 붙임으로써 이루어진다. 동시에 접두사 디히드로는, MeBmt 잔기가 소수화된(디히드로-MeBmt) 사이클로스포린, 즉 일반식 B의 -x-y가 $-CH_2$ $-CH_2$인 사이클로스포린을 칭하는데 사용한 것이다. 따라서 $[Thr]^2$-Ciclosporin은 2-위치의 αAbu가 Thr로 치환된 것을 제외하고는 일반식 A의 서열과 동일한 서열을 가진 사이클로스포린이며, $[디히드로-MeBmt]^1$-$[Val]^2$-Ciclosporin은 위치 1의 MeBmt 잔기가 수소화되고 위치 2의 αAbu가 발린으로 치환된 것을 제외하고는 일반식 A의 서열을 갖는 사이클로스포린이다.

또한 약어, 예를 들어 Ala, MeVal, αAbu 등으로 표시되는 아미노산 잔기는 종래 방식에 따르면, 예를 들어 (D)Ala의 경우와 같이 특별한 언급이 없는 한 (L)-입체 형태를 갖는 것으로 인식해야 한다. MeLeu의 경우와 같이 Me로 시작되는 잔기 약어는 α-N-메틸화 잔기를 의미한다. 사이클로스포린 분자의 개별 잔기들은, 당해 기술분야에서와 같이 위치 1의 잔기 MeBmt 또는 디히드로-MeBmt부터 시작해서 시계방향으로 번호가 붙여진다. 본 명세서 및 특허 청구범위 전반에 걸쳐 동일한 숫자 서열이 사용된다.

정확한 메카니즘은 아직 밝혀지지 않았으나, 현재 Ciclosporin은 IL-2의 전사 개시를 차단하여 T 세포 활성화 과정을 방해하는 방식으로 작용하는 것으로 공지되어 있다. Ciclosporin은 다수의 세포종에서 발생하는 17kD 시토졸 단백질(시클로필린)과 함께 복합체를 형성하며, 단백질 중첩에 관여하는 효소인 펩티딜-프롤린 시스-트랜스 이성질화 효소와 동일한 것으로 밝혀졌다. 그러나, 현재까지 시클로필린에 대한 결합이 사이클로스포린의 면역 억제 활성과 직접적인 관련이 있는지의 여부, 또는 시클로필린이 결합 자체가 면역억제 활성에 대한 충분조건 인지의 여부는 확실하지 않다.

시클로필린에 강하게 결합하는 사이클로스포린이 있긴 하나, 이들은 면역억제성을 전혀 지니지 않는 것으로 현재 밝혀져 있다. 따라서, 면역억제 활성을 위해서는, 시클로필린에 대한 결합이 필요조건이긴 하나 충분조건은 아니라는 결과가 나온다.

본 발명은 HIV-1 복제에 대항하여 작용하는 사이클로스포린을 제공한다.

인체 면역 결핍 바이러스(HIV)는 다른 각종 세포종(type), 특히 단구계 세포종에서도 복제되지만 T-헬퍼(T4) 림프구를 우선적으로 감염시킨다. 이로써, 점차적인 T4-세포 파괴를 특징으로 하는 저속 진행성 면역계 질환, 일명 에이즈(AIDS)가 유발된다. 에이즈의 다른 면역학적 이상 증상은 세포 독성/억제성(T8) 림프구의 증가, 항원 표시/인식 방법의 결함 및 B-세포의 폴리클론 활성화 증상이다. T4-세포 파괴의 메카니즘은 아직도 확실하지 않다. 비교적 소수의 T4-세포가 감염된 것으로 미루어 볼 때, 바이러스에 의한 직접적 세포 변성효과가 T4-세포 파괴의 유일한 이유가 될 수는 없다. T4-세포의 파괴는, HIV-생산성 T4-세포 또는 HIV-단백질로 코팅된 T4-세포로 인해 야기되는 자가면역 과정에 의해 증폭될 수 있는 것으로 가정되어 왔다. 이런 지속적인 항원성 자극은, T4-세포내 HIV-복제를 증진시키면서 T-세포독성 클론을 증대시키는 T4-세포의 영구적 활성화 상태를 초래할 수 있다. 비 감염된 T4-세포는, 그것의 CD4 분자에 외인성 바이러스 gp 120이 결합됨에 따라 항원성이 부여될 수 있으므로 T-세포독성 반응의 대상이 될 수 있다.

미국 특허 제4,814,323호는, Ciclosporin이 AIDS에 대해 활성을 지니므로 통상적으로 면역억제제로서 공지된 사이클로스포린은 이런 처방에 유용할 수 있음을 개시하고 있다. 그러나, 이 특허에는 비-면역 억제성 사이클로스포린이 이러한 특성을 지닐 것이라고는 시사된 바 없다.

놀랍게도, 시클로필린에 결합하나 면역억제성은 지니지 않는 사이클로스포린이 HIV-1 복제에 대해 억제 효과를 지닌다는 점이 밝혀졌다.

문헌[Quesniaux, Eur. J. Immunol. 1987 17 1359-1365]에 기재된 경쟁적 ELISA 테스트에서, 사이클로스포린이 인체 재조합 시클로필린에 Ciclosporin의 적어도 1/5 정도로 결합할 경우, 상기 사이클로스포린은 시클로필린에 결합성이 있는 것으로 간주한다. 이 테스트에서는, 코팅된 BSA-Ciclosporin과 함께 시클로필린을 배양하는 동안 테스트할 사이클로스포린을 첨가하고, 경쟁인자 없는 대조 반응이 50% 억제되는데 필요한 농도(IC_{50})를 계산한다. 결과는 결합비 (BR)로서 나타내는데, 이 결합비는 상기 테스트 화합물의 IC_{50}과 Ciclosporin 자체의 동시 테스트시의 IC_{50}과의 비에 대한 상용로그 값이다. 따라서 BR이 1.0이라는 것은, 테스트 화합물이 Ciclosporin보다 1/10 정도로 약하게 시클로필린에 결합한다는 것이며, 음(-)의 값은 Ciclosporin보다 시클로필린에 강한 결합을 가진다는 것을 의미한다.

HIV에 대해 활성을 지닌 사이클로스포린은, BR이 0.7 이하이며($\log_{10}5 \fallingdotseq 0.7$이기 때문에), 0 또는 그 이하가 바람직하다.

사이클로스포린의 혼합 림프구 반응 (MLR)에서의 활성이 Ciclosporin 활성의 5%이하, 바람직하게는 2% 이하인 경우, 이 사이클로스포린은 비-면역억제성인 것으로간주한다. 상기 혼합 림프구 반응은 티. 메오의 문헌[Immunlogical Methods, 엘. 레프코비츠 및 비. 페리스(편집) 대학출판부, 뉴욕, pp 227-239, 1979]에 기재되어 있다. Balb/c 쥐 (암컷, 생후 8 내지 10주)에서 취한 비장세포(0.5×10^6)를 CBA 쥐(암컷, 생후 8 내지 10주)에서 취한 0.5×10^6개의 방사선 조사된 (2000라디안) 또는 미토마이신 C-처리된 비장 세포와 함께 5일 동안 동시 배양시켰다. 방사선 조사된 동종이계의 세포는 Balb/c 비장 세포내에서 증식 반응을 유도하는데, 이는 DNA내로 표지된 전구물질을 삽입시켜 측정할 수 있다. 자극 세포는 방사선 조사되기 때문에(또는 미토마이신 C로 처리), 증식중인 Balb/c 세포와 반응하지 않지만, 세포 자체의 항원성을 보유한다. MLR에서 측정한 테스트 화합물의 IC_{50}을, 병행되는 실험에서 측정한 Ciclosporin의 IC_{50}과 비교한다.

HIV-1 복제의 억제제로서의 사이클로스포린의 활성은 하기 테스트 시스템에서 입증할 수 있다.

1. MT4-세포내에서 HIV-1에 의해 유도된 세포 변성 효과의 억제작용

포웰즈외 다수의 문헌[J. Virol. Meth. 20/309 (1988)]에 의해 기술된 측정 방법을 약간 변경시켜 사용하였다. 종전에는 HIV-감염에 상당히 허용적인 것으로 밝혀진, HTLV-I-형질전환된 T4-세포주인 MT4를 표적 세포로 사용한다. HIV-1, HTLV-IIIB 균주에 의해 유도된 세포 변성효과에 대한 억제 작용은, HIV-감염된 세포 및 모의-감염된 세포의 생활성을 측정함으로써 판정한다. 생활성은 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨브로마이드 (MTT)의 동일계상에서의 환원을 통해 분광학적으로 측정한다. 화합물로 처리한 미감염 세포에서와 같이 화합물 부재하의 바이러스-감염 및 미감염된 배양체를 대조군으로서 포함시킨다. 모의-감염된 배양물에서 4일동안 배양시키는 동안 1㎖당 세포의 수가 10배만큼 증가하도록 세포 농도를 선택한다. 바이러스 접종량은, 배양 4일 후 표적 세포의 90%가 세포사(死)할 수 있도록 조정한다. 바이러스는 1시간 동안 37℃의 10배 농축된 세포 현탁액상에 흡착시킨다. 이어서, 감염된 세포를 1:10으로 희석시켜, 테스트 화합물이 수용된 미량역가 평판에 첨가한다.

2. 세포독성

부가의 세포주, 구체적으로 단구성 세포주 (U937)에서 항-HIV 효능을 평가하기 위해, 먼저 이들 세포주에 대한 테스트 화합물의 세포독성을 측정한다. Jurkat 및 U937 세포의 현탁액을 1×10^5 세포수/㎖로 조정한 후, 다양한 농도의 테스트 화합물의 존재하에서 배양시킨다. 48시간후, MTT로 염색하여 ㎖당 세포수를 비교한다. MT4 세포의 세포독성도 동일한 방식으로 측정할 수 있다.

3. Jurkat 및 U937세포내 HIV-1 복제의 억제작용

T4-세포주 Jurkat 및 단구성 세포주 U937은, 바이러스 용액에 10배 농축된 상기 세포를 현탁시킴으로써 감염시킨다. 이어서, 바이러스를 37℃에서 2시간동안 흡착시킨 후, 상기 세포를 회전시키고, 접종원을 제거한 후, 테스트 화합물을 포함한 새로운 배양 배지중에서 세포를 원래 농도로 재현탁시킨다. 따라서, 흡착이 이루어진 후에 물질을 첨가한다. 감염후 2, 5, 8, 12, 15 및 19일째, 감염된 배양액의 분획을 제거한다. 세포를 회전시킨 후 상등액을 수거한다. 바이러스성 p24항원의 농도는, 시판되는 ELISA 키트를 사용하여 상등액중에서 판정한 후 바이러스 제조시의 매개변수로서 이용한다. 각 분획을 제거한 후 세포수를 계수하고, 테스트 화합물을 특정 농도로 함유한 새로운 배지를 첨가함으로써 세포수를 2×10^5 세포수/㎖로 조정한다.

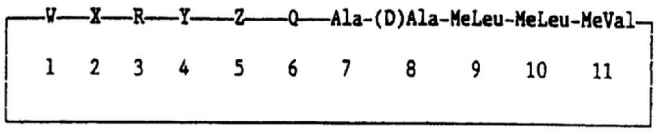
본 발명의 화합물, 즉 HIV-1에 활성을 지닌 비-면역 억제성의 시클로필린-결합 사이클로스포린(활성 화합물)중에서 일부는 신규이며 그 나머지는 공지된 것이다; 그러나 공지된 활성 화합물의 항-HIV 활성은 종전에는 밝혀지지 않았으며, 대다수의 경우, 공지된 활성 화합물이 임의의 약학적 활성을 지닌 것으로 개시된 바도 없다.

많은 활성 화합물이 특이적으로 4 및/또는 5 위치에서 Ciclosporin과 다른 구조를 가진다는 점이 밝혀졌다.

활성 화합물의 한군은 위치 4의 MeLeu기가 다른 N-메틸화 아미노산, 예를 들어 γ-히드록시-MeLeu, Melle, MeVal, MeThr 또는 MeAla으로 치환된 사이클로스포린이다. Melle 및 MeThr 이외에도, 이것의 알로(allo) 형태인 Mealle 및 MeaThr도 또한 사용할 수 있다. 알로 형태에서, β-위치의 입체 이성질체는 천연 아미노산과는 반대의 입체 형태를 가지므로 n-형태 및 알로-형태는 한쌍의 부분 입체 이성질체를 이룬다.

활성 화합물의 또다른 군은, 위치-5의 발린(Val)이 N-알킬-아미노산, 바람직하게는 N-메틸-아미노산으로 치환된 것이다. N-알킬화 아미노산은 발린 또는 류신이 바람직하다. $[Val]^5$의 아미노기중의 수소는 비분지형 C_{1-6} 알킬기, 바람직하게는 메틸, 에틸 또는 n-프로필, 구체적으로 메틸로 치환되는 것이 바람직하다. 후자의 바람직한 활성 화합물 군은 모두 신규한 것이다.

부가적으로 또는 대안적으로, 특정의 활성 화합물은 1, 2, 3 및/또는 6위치가 Ciclosporin과 다를 수도 있다. 활성 화합물의 바람직한 군은 하기 일반식 (Ⅰ)의 화합물로 구성된다:



(I)

상기 식 중, W는 MeBmt, 디히드로-MeBmt 또는 8'-히드록시-MeBmt이고; X는 αAbu, 발린, 트레오닌, Nva 또는 O-메틸 트레오닌 (MeOThr)이고; R는 Sar 또는 (D)-MeAla이고; Y는 MeLeu, γ-히드록시-Meleu, Melle, MeVal, MeThr, MeAla, Mealle 또는 MeaThr이고; Z는 발린, 류신, MeVal 또는 MeLeu이며; Q는 MeLeu, γ-히드록시-MeLeu 또는 MeAla 인데; 단, y가 MeLeu일 경우에는 Z는 MeVal 또는 MeLeu이거나, 또는 W가 8'-히드록시-MeBmt이다.

W, X, Y, Z, Q 및 R기는 각각 다음과 같이 정의되는 것이 바람직하다.

W는 W'가 바람직한데, W'는 MeBmt 또는 디히드로-MeBmt이고; X는 X'가 바람직한데, X'는 αAbu 또는 Nva이고, X가 더욱 바람직한데, X는 αAbu이고; R은 R'가 바람직한데, R'은 Sar이고; Y는 Y'가 바람직한데, Y'는 γ-히드록시-MeLeu, MeVal, MeThr 또는 Melle이고; Z는 Z'가 바람직한데, Z'는 발린 또는 MeVal이며; Q는 Q'가 바람직한데, Q'는 MeLeu이다.

활성 화합물의 특히 바람직한 한 군은, W가 W', X가 X', Y가 Y', Z가 Z', Q가 Q'이며, R이 R'인 일반식 (Ⅰ)의 화합물이다.

일반식 (Ⅰ)의 특히 바람직한 화합물은 다음과 같다:

a)[디히드로-MeBmt]^{1}-[γ-히드록시-MeLeu]^{4}-Ciclosporin

b)[MeVal]^{4}-Ciclosporin

c)[MeIle]^{4}-Ciclosporin

d)[MeThr]^{4}-Ciclosporin

e)[γ-히드록시-MeLeu]^{4}-Ciclosporin

f)[Nva]^{2}-[γ-히드록시-MeLeu]^{4}-Ciclosporin

g)[γ-히드록시-MeLeu]^{4}-[γ-히드록시-MeLeu]^{6}-Ciclosporin

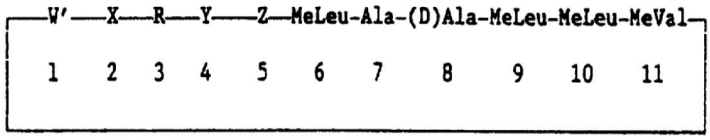
h)[MeVal]^{5}-Ciclosporin

i)[MeOThr]^{2}-[(D)MeAla]^{3}-[MeVal]^{5}-Ciclosporin

j)[8'-히드록시-MeBmt]^{1}-Ciclosporin

또한 일반식 (Ⅰ)의 범위 밖의 특정 화합물, 예를 들어 k)[MeAla]^{6}-Ciclosporin, 및)[γ-히드록시-MeLeu]^{9}-Ciclosporin도 역시 활성 화합물이다.

본 발명은 또한, 하기 일반식 (Ⅱ)의 화합물인 신규 활성 화합물을 제공한다.



(II)

상기식중, W', X, R, Y 및 Z는 상기 정의한 바와 같으며, 단 1) Y가 MeLeu 또는 MeAla일 경우 Z는 MeVal 또는 MeLeu이며; 2) W'가 MeBmt이고, R이 Sar이며, Y가 γ-히드록시-MeLeu일 경우, Z는 발린 이외의 것이다.

신규 활성 화합물의 바람직한 군은, X가 X이고, Y가 Y'이며 Z가 Z'인 일반식 (Ⅱ)의 화합물로 구성되는데, 이때 W'가 MeBmt인 경우에는 Y'는 γ-히드록시-MeLeu 이외의 것이다.

특히 바람직한 신규 활성 화합물은 상기 화합물 a), b), c), d), f) 및 h)이다. 이들 화합물중, 예를 들어 화합물 b) 및 c)는 시클로필린에 대한 Ciclosporin의 결합을 차단시킴으로써 Ciclosporin의 면역억제 작용을 차단하므로, Ciclosporin 길항제로서 작용하는 것으로 밝혀졌다.

활성 화합물은 여러가지 방법으로 제조할 수 있는데, 이 방법은 다음과 같이 분류할 수 있다:

1) 발효법

2) 생물학적 변환법

3) 유도법

4) 부분 합성법

5) 전체 합성법

1) 특정의 활성 화합물은, 하기 실시예 1에 기술된 c) 화합물의 제조를 통해 예시된 바와 같이 톨리포클라듐 인플라툼(Tolypocladium inflatum)갬과 같은 Ciclosporin-생성 유기체의 원래의 또는 변형된 균주의 발효 부산물로서 생성된다.

2) 공지 화합물 j) 및 l)을 비롯한 다른 활성 화합물은 Ciclosporin의 대사물로서, Ciclosporin을 투여받은 사람 또는 동물의 소변에서 크로마토그래피법을 통해 분리해낼 수 있다. 또한, 미생물을 이용한 상기 및 기타 대사적 형질 전환이 가능한데, 예를 들면 실시예 2 및 3에 기재된 바와 같이 사이클로스포린 A의 생물학적 전환에 의한 화합물 e) 및 g)의 제조, 또는 사이클로스포린 G의 생물학적 전환에 의한 화합물 f)의 제조(실시예 4)가 가능하다. 이들 실시예에서는, 세베키아 베니하나(Sebekia benihana)라는 신규의 변형 균주를 배양하는 단계, 하나 이상의 MeLeu 잔기를 가진 사이클로스포린을 첨가하는 단계, 및 발효액으로부터 생성물을 분리시키는 단계를 포함하는, 하나 또는 그 이상의 γ-히드록시-MeLeu 잔기를 가진 사이클로스포린의 신규 제조방법을 입증하고 있다.

3) 유도법이란, 팹티드 결합의 열림 및 재형성없이 하나 이상의 아미노산이 변형되는 하나 이상의 화학

반응을 통해 천연 또는 합성 사이클로스포린을 활성 화합물로 전환시키는 것을 의미한다. 예를 들어, 5위치의 Val이 N-알킬화된 활성 화합물류는, 실시예 5의 화합물 h) 및 실시예 6의 화합물 i)에 예시된 바와 같이, 5위치에 발린을 가진 이에 상응하는 사이클로스포린을 부틸리튬과 반응시킨 후, 알킬화제와 반응시킴으로써 제조할 수 있다. 또 다른 예로서, 화합물 a)는 화합물 e)의 수소화(실시예 7)를 통해 제조할 수 있고, 역시 Ciclosporin의 주 대사물인 화합물 j)는 실시예 8에 기술된 바와 같이 공지 화합물인 Ciclosporin 아세테이트로부터 제조할 수 있다.

4) 부분 합성법이란 용어는 천연 사이클로스포린의 고리를 개환시켜, 하나 이상의 아미노산을 제거하고, 다른 아미노산을 첨가한 후, 고리를 다시 닫는 일련의 화학반응을 의미한다.

5) 사이클로스포린의 전체 합성법은, 웬저의 상기 참고 문헌에 기술된 바와 같이 직쇄형 운데카펩티드를 형성시킨 후 이를 고리화함으로써 수행할 수 있다(미국 특허 제4,396,542호 및 제4,798,823호 역시 참조). 임의의 다른 방법을 이용할 수 있는 경우에는, 그 방법이 전체 합성법보다 용이할 수도 있으나, 사이클로스포린은 주로 전체 합성법을 통해 제조할 수 있다. 화합물 d)의 제조(실시예 9) 및 공지된 대사화합물 l)의 제조시에도 전체 합성법을 사용할 수 있다.

화합물 k)는, 퀘스니어외 다수의 문헌[Mol. Immunol. 24 1159 1987]에 그 특성이 기술되어 있으며 전체 합성법으로 제조할 수 있는 공지 물질이다. 예를 들어, 이 화합물의 전체 합성법은 미국 특허 제4,914,188호에 기재되어 있다.

[실시예1]

[Melle]^{4}-Ciclosporin (화합물 c)

[생산 균주]

기탁번호 DSM 6627로 1991년 7월 24일에 부다페스트 조약 규정하의 독일 미생물 수집소에 기탁된 진균류 균주 톨리포클라듐 인플라튬(Tolypocladium inflatum)Cy E 4556을 발효시킴으로써 화합물 c)를 제조하였다. 이 균주는 톨리포클라듐 인플라튬(Tolypocladium inflatum) 갬스종의 균주 NRRL 8044의 돌연변이체로서, 분류학적으로는 모 균주와 동일한데, 이는 예를 들어 영국 특허 제 1,491,509호에 상세히 기재되어 있다.

배양체 1. 한천 출발 배양체 : 균주 DSM 6627의 한천 사면 배양체를 하기 한천 배지에서 27℃하에 14일 동안 증식시켰다.

효모 추출물(Gistex) 4g

맥아 추출물(Wander) 20g

한천 20g

광물질 제거수 총 1000㎖가 되게 첨가

상기 배지는 pH가 5.4 내지 5.6이며 120℃에서 20분동안 살균시켰다.

2. 선배양체 : 4개의 출발 배양 균사체에서 취한 포자를 40㎖의 0.9% 염용액에 현탁시켰다. 각각 100㎖ 선배양 배지를 포함한 일련의 500㎖ 얼렌마이어 플라스크에 상기 현탁액을 각각 20㎖씩 주입하였다. 선배양 배지의 조성은 다음과 같다:

카제인(앰버 EHC) 25g

말토오즈 75g

KH_2PO_4 1g

KCl 2.5g

광물질 제거수 총 1000㎖가 되게 첨가

염산을 이용해 배지의 pH를 5.2 내지 5.5로 조정한 후, 20분동안 120℃에서 살균시켰다. 선배양체는 50mm의 편심을 가진 200rpm의 회전 진탕기상에서 27℃하에 24시간동안 발효시켰다.

3. 중간 배양체 : 20ℓ의 선배양체 배지를 수용한 25ℓ의 철제 발효기에 배양체 200㎖를 주입하였다. 중간 배양체는 0.5바 압력, 150 rpm의 교반속도 및 배지 1ℓ당 0.5ℓ/분의 기류 속도하에 27℃에서 5일동안 발효시켰다.

4. 주배양체 : 100ℓ의 선배양체 배지에 10ℓ의 중간배양체를 주입한 후 120ℓ의 철제 발효기에서 발효시켰다. 이 배지에 4g/ℓ의 D-트레오닌을 첨가하고, 여과를 통해 살균시켰다. 발효 과정은 14일 동안 27℃에서 수행하는데, 이때 처음 5일 동안은 0.5바의 압력하에서 배지 1리터당 0.4ℓ/분의 기류 속도 및 70rpm의 교반 속도를 사용하고, 그 이후의 발효기간 동안에는 0.5ℓ/분의 기류속도 및 100 rpm까지 증가된 교반속도하에서 수행하였다.

분리 : 균사체를 배양 배지에서 분리해낸 후, 터랙스(Turrax) 장치에서 10ℓ의 메탄올/물 용액 (부피비 9:1)과 함께 압착 및 3회 교반함으로서 추출시켰다. 압착된 균사체는 흡입-여과법을 통해 용매로부터 분리시키고, 합쳐진 여과액은, 증기가 거의 물로만 이루어질 때까지 40℃의 진공상태에서 증발을 통해 농축시켰다. 산출된 혼합물은, 각 추출시마다 2ℓ의 1,2-디클로로에탄을 사용하여 4회에 걸쳐 추출하였고, 합쳐진 1,2-디클로로에탄 용액은 40℃의 진공상태에서 증발을 통해 농축시켰다.

잔류물은, 용출제로서 에틸 아세테이트/물(분획 2.5ℓ)을 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피법(실

리카겔 10kg, 입자크기 0.02mm 내지 0.045mm; 그레이스)로 처리하였다. [Melle]^4-Ciclosporin을 함유한 분획 20 내지 23을 수거하여 용출제(분획 300㎖)로서 클로로포름/메탄올(부피피 98:2)을 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피법(실리카겔 600g, 입자크기 0.04mm 내지 0.063mm, 메르크)으로 더욱 분리시켰다. 이어서 용출제(분획 200㎖)로서 염화 메틸렌/메탄올(부피비 98:2)을 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(실리카겔 400g, 입자크기 0.04mm 내지 0.063mm, 메르크)로 더욱 정제시켜, 정제된 [Melle]^4-Ciclosporin을 무정형 백색 분말로 수득했다 : m.p. 155℃ 내지 158℃; [α]20/D= -235° (c=0.68) 및 -193° (c=0.74).

CH_2Cl_2 중의 IR 스펙트럼 결과는 제1도에 제시된 바와 같고, $CDCl_3$중의 양자 NMR 스펙트럼 결과는 제2도에 제시된 바와 같다.

[실시예 2]

[γ-히드록시-MeLeu]^4-Ciclosporin (화합물 e)

화합물 e)는, 미생물 세베키아 베니하나(Sebekia benihana)에 의한 Ciclosporin의 생물학적 변환을 통해 수득했다. 사용한 최초의 균주는 NRLL11111로 명명된 균주로서, 세베키아 베니하나 종(Sebekia benihana)(디어츠 및 리 : [Sebekia, 악티노플라세아과의 새로운 속, Abstrs. 82권, Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol., 163, 아틀란타, 1982]에 속한다. 이 균주는 노보비오신을 히드록실화 시킬수 있다. 화합물 e) 및 관련 화합물의 제조시 사용된 계대배양 균주는 기탁 번호 DSM 6182로 독일 미생물 수집소(D-3300 브라운슈바이크)에 1990년 9월 20일자로 기탁된 것이다.

1. 한천 출발 배양체 : DSM 6182 균주의 한천 사면 배양체를 하기 한천 배지에서 27℃로 10일동안 증식시켰다.

글루코즈 10g

전분(용해성) 20g

효모 추출물(Gistex) 5g

펩톤(N-Z-아민 Typ A, 셰필드) 5g

$CaCO_3$ 1g

한천(박토) 18g

광물질 제거수 총 1ℓ가 되게 첨가

pH : NaOH/H_2SO_4를 이용해 pH 7로 중화시킴.

살균 : 120℃에서 20분동안 처리

2. 선배양체 : 하나의 출발 배양체의 포자 및 균사체를 10㎖의 0.9% 염 용액 중에 현탁시켰다. 각각 50㎖의 선배양체가 수용된 일련의 200㎖들이 얼렌마이어 플라스크에 상기 현탁액을 각각 5㎖씩 주입하였다. 선배양 배지의 조성물은 다음과 같다.

글루코즈 7g

전분(용해성) 10g

효모 추출물(Gistex) 4.5g

맥아 추출물(액상, Wander) 10g

펩톤(N-Z-아민 Typ A, 셰필드) 2.5g

$CaCO_3$ 1g

미량원소 용액 235호 1㎖

광물질 제거수 총 1ℓ가 되게 첨가

pH는 NaOH/H_2SO_4를 사용하여 pH 7로 중화시켰다.

살균처리 : 120℃에서 20분동안 처리

미량원소 용액 235호 :

H_3BO_3 0.1g

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5g

KI 0.05g

$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 2g

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.2g

$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 2g

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 4g

H_2SO_4(97%) 1㎖

광물질 제거수 총 1ℓ가 되게 첨가

선 배양체는 50㎜의 편심을 가진 200rpm의 회전 진탕기에서 4일동안 27℃하에 발효시켰다.

3. 중간배양체 : 선 배양 배지 50㎖씩이 수용된 일련의 200㎖들이 얼렌마이어 플라스크에 각각 선 배양체 5㎖씩을 주입하였다. 중간 배양체는 50㎜의 편심을 가진 200rpm의 회전 진탕기에서 27℃하에 3일동안 발효시켰다.

4. 주배양체 : 주 배지 50㎖씩이 수용된(총 12ℓ) 일련의 500㎖ 얼렌마이어 플라스크에 각각 중간 배양체 5㎖씩을 주입하였다. 이들 배양체는 50㎜의 편심을 가진 200rpm의 회전 진탕기에서 27℃하에 3일 동안 발효시켰다. 24시간 후, 메탄올중에 용해된 사이클로스포린 A(7.5mg)을 각각의 주 배양체(=150mg/L)에 첨가했다.

주배양 배지의 조성은 다음과 같다.

세렐로오즈 10g

덱스트린 10g

전분(용해성) 10g

효모 추출물 (Gistex) 2.5g

대두분(Nurupan, Edelsoya) 12.5g

K_2HPO_4 0.25g

KH_2PO_4 0.12g

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.10g

$CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.05g

미량원소 용액 AC-1 1㎖

광물질 제거수 총 1ℓ가 되게 첨가

pH : 7.2 내지 7.5로 조정(KOH/H_2SO_4)

살균처리 : 120℃에서 20분간 처리

미량원소 용액 AC-1 : 이 동안 용액에 $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 0.2g을 첨가하면 235호 용액과 동일한 조성물이 된다.

5. 분리 : 균사체를 배양 배지로부터 분리한 후, 생성된 배양 여과액(13L)은 각 추출시마다 1.5L씩 사용하여 1,2-디클로로에탄으로 3회 추출하였다. 합친 1,2-디클로로에탄 용액은 40℃의 진공 상태에서 증발시켰다. 미정제 잔류물은, 용출제로서 메탄올을 이용하는 Sephadex LH-20겔 여과법으로 처리했다. 사이클로스포린 화합물(525mg)을 함유한 분획을 수거한 후, 클로로포름/메탄올을 용출제로 사용하여 실리카겔 상에서 크로마토그래피(50g, 입자 크기 0.04mm 내지 0.063mm, '메르크')로 정제하였다. 동일한 시스템을 이용하여 크로마토그래피를 반복 수행한 결과, 정제된 $[\gamma$-히드록시-MeLeu$]^4$-Ciclosporin을 무정형의 백색 분말 형태로 수득했다. m.p. 150℃ 내지 153℃, $[\alpha]_D^{20}$=225℃ ($CHCl_3$ 중에서 c=0.53), -171℃ (CH_3OH 중에서 c=0.44).

[실시예 3]

$[\gamma$-히드록시-MeLeu$]^4$-$[\gamma$-히드록시-MeLeu$]^6$-Ciclosporin (화합물 g)

$[\gamma$-히드록시-MuLeu$]^4$-Ciclosporin의 정제 반응을 통해 수득된 극성이 보다 큰 부분은, 아세톤/헥산(2:1)을 용출제로 사용하여 반복적으로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(입자크기 0.04mm - 0.063mm) 처리한 후, 메틸 t, 부틸 에테르/메탄올/물(90:9:1)를 용출제로 사용하여 다시 실리카겔 상에서 크로마토그래피 처리하여 더욱 분리시켰다. 처음 분획은 $[\gamma$-히드록시-Leu$]^4$-Ciclosporin을 함유하고 있는데, 이것을 목탄에 의해 탈색시킴으로써 더욱 정제시켜 무정형 백색분말의 정제된 표제 화합물을 수득했다. m.p. 162℃ 내지 164℃, $[\alpha]_D^{20}$=-211℃ ($CHCl_3$ 중에서 c=0.50), -157℃(CH_3OH 중에서 c=0.52).

상기 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에 의한 나중 분획은 $[\gamma$-히드록시-MeLeu$]^4$-$[\gamma$-히드록시-MeLeu$]^6$-Ciclosporin을 포함하고 있는데, 이것을 목탄에 의해 탈색시킴으로써 더욱 정제시켜 무정형 백색분말의 정제된 표제 화합물을 수득했다, m.p. 157℃ 내지 160°, $[\alpha]_D^{20}$=-217℃ ($CHCl_3$ 중에서 c=0.54), -176℃ (CH_3OH 중에서 c=0.42).

[실시예 4]

[Nva]^{2}-[γ-히드록시-MeLeu]^{4}-Ciclosporin (화합물 f)

이 화합물은, 출발물질로서 사이클로스포린 G([Nva]^{2}-Ciclosporin)를 사용하는 점을 제외하고는 화합물 e ([γ-히드록시-MeLeu]^{4}-Ciclosporin)의 제조방법과 유사한 방법으로 제조했다. 에틸 아세테이트 포화 수용액 및 아세톤/헥산(2:1)을 각각 용출제로 사용하여 실라카겔 컬럼 크로마토그래피법을 반복 수행함으로써 정제시킨 후, 표제 화합물을 무정형의 백색 분말형태로 수득했다. m.p. 138℃ 내지 141℃, $[\alpha]_D^{20}$=-213℃ ($CHCl_3$ 중에서 c=0.69), -168℃ (CH_3OH 중에서 c=0.70).

[실시예 5]

[MeVal]^{5}-Ciclosporin (화합물 h)

테트라히드로푸란(20㎖)에 용해된 사이클로스포린 A (0.60g=0.5 mmol)를 헥산중의 부틸리튬(1.0 mmol) 용액(1.6 M) 0.63㎖과 함께 항온 처리했다. 생성된 용액은 -78℃에서 디메틸 설페이트(0.1㎖; 1.5 mmol)와 반응시켰다. 반응 혼합물을 실온으로 서서히 가온시킨 후 밤새도록 교반했다.

섬광 크로마토그래피(SiO_2, 5% 메탄올/에테르) 및 HPLC(역상)를 순차적으로 이용하여 분리함으로써 표제 생성물을 수득하였다. 상기 화합물은 제3도에 제시된 $CDCl_3$ 중의 300MHz ^{1}H NMR 스펙트럼 분석 결과를 특징으로 한다.

[실시예 6]

[MeOThr]^{2}-[(D)MeAla]^{3}-[MeVal]^{5}-Ciclosporin (화합물 i)

480㎖의 무수 THF와 6.96g(49.2 mMol)의 디이소프로필 아민의 혼합물을 -80℃로 냉각시키고, 헥산(=44.5 mMol) 중의 부틸리튬 용액(1.33 M) 33.5㎖를 주사기로 서서히 첨가했다. 이 혼합물을 -80℃에서 30분동안 교반한 후, 120㎖의 무수 THF내 8g(6.6 mMol)의 사이클로스포린 C ([Thr]^{2}-Ciclosporin) 용액을 2분 내지 3분 동안 주사기로 첨가했다. 투명한 용액을 -80℃에서 몇시간 더 교반한 후, 2.06㎖의 요오드화 메틸을 서서히 첨가했다.

혼합물을 2시간동안 실온으로 가온한 후, 40㎖의 물을 첨가하고, 용매는 30℃/15 mmHg의 회전 증발기에서 증발시켰다. 잔류물은 물과 에테르로 분리한 후, 에테르층은 반 포화 상태의 염수로 4회 세척하여 $MgSO_4$로 건조시킨 후, 증발시켜 8.1g의 잔류물을 수득하였다.

잔류물은 에틸 아세테이트 포화 수용액을 이용해 1200g의 키젤겔(Kieselgel) 상에서 크로마토그래피로 정제함으로써 미정제 생성물을 생성시키고, 이 생성물은 5% MeOH/CH_2Cl_2를 사용해 200g의 키젤겔상에서 크로마토그래피로 더욱 정제시켜 정제된 표제 생성물을 수득하였다. $[\alpha]_D^{20}$=-195℃ ($CHCl_3$ 중에서 c=1.0)

[실시예 7]

[디히드로-MeBmt]^{1}-[γ-히드록시-MeLeu]^{4}-Ciclosporin (화합물 a)

미리 수소첨가된 10% 팔라듐/목탄 200mg을 4㎖의 에탄올에 현탁시킨 현탁액에, 10㎖의 에탄올중의 1.2g의 [γ-히드록시-MeLeu]^{4}-Ciclosporin (화합물 e)을 첨가하고, 더 이상 수소가 흡수되지 않을때까지 실온에서 수소첨가 반응을 진행시켰다. 여과를 통해 촉매를 제거한 후 용액을 증발시켜, 무정형 백색분말의 표제 화합물을 수득하였다. m.p. 154℃ 내지 156℃, $[\alpha]_D^{20}$=-225℃ ($CHCl_3$ 중에서 c=0.87), -169℃ (CH_3OH 중에서 c=0.70).

[실시예 8]

[8'-히드록시-MeBmt]^{1}-Ciclosporin (화합물 j)

1. [O-아세틸-ω-브로모-MeBmt]^{1}-Ciclosporin : 250㎖의 사염화탄소내 25.0g(20 mmol)의 [O-아세틸-MeBt]^{1}-Ciclosporin (트라버외 다수의 문헌[Helv. Chim. Acta 1982, 65, 1653]참고), 4.4g(25 mmol)의 N-브로모 숙신아미드 및 400mg의 아조비스이소부티로니트릴의 혼합물을 2.5시간동안 환류 가열했다. 용매를 증발시킨 후 에테르로 대체시키고, 고형물로 여과하여 수세한 후 황산 마그네슘으로 건조시키고 건조상태가 될 때까지 증발시켰다. 잔류물은 에틸 에테르/에틸 아세테이트 (4:1)를 사용하여 실리카겔상에서 크로마토그래피 처리하여 10.7g(40%)의 무정형 생성물을 생성시키고, 이것은 에테르/헥산으로부터 경질화 시켜 8.4g의 정제된 물질을 생성시켰다; m.p. 207℃ 내지 209℃. 크로마토그래피에 따른 나중 분획은 약간 질이 낮은 생성물 11.2g을 추가로 함유했다.

2. [O-아세틸-ω-아세톡시-MeBmt]^{1}-Ciclosporin : 30㎖의 메틸 에틸 케톤 내 단계 1의 생성물(15~20%로 산정된 출발물질로 오염된) 4.31g(3.3 mmol)과 테트라에틸암모늄 아세테이트 테트라히드레이트 2.1g(8 mmol)의 혼합물(촉매량의 요오드화 나트륨 함유)을 3시간 동안 105℃의 오일배스에서 가열한 후 주말동안 실온에서 방치하였다. 용매는 메틸 t-부틸 에테르로 희석시킨 후 물 및 염수로 세척했다. 유기층을 $MgSO_4$로 건조시켜 증발시킨 결과 미정제 생성물 4.0g이 남았는데, 이것을 RP-18 역상 컬럼 (240g)으로 정

제시킴으로써 3.07g의 표제 생성물을 산출시켰다; m.p. 191℃ 내지 192℃.

3. [ω-히드록시-MeBmt]^{1}-Ciclosporin : 75㎖ 메탄올 중의 단계 2의 생성물 1.72g(1.3 mmol)의 용액 및 메탄올 50㎖중의 1.2g의 나트륨의 용액을 혼합하여 2.5시간 동안 실온에서 유지하였다. 이어서, 이 용액을 아세트산으로 산성화시킨 후, 감압하에 용매를 증발시키고, 그 잔류물은 메틸 t-부틸 에테르에 용해시켜, 물, 염수, 및 중탄산 나트륨 용액으로 차례로 세척하여 $MgSO_4$로 건조시킨 후 증발시켰다. 미정제 생성물(1.6g)은 메탄올/물 (75:15)을 이용하여 RP-18 컬럼(240g)으로부터 용출시켜 정제된 생성물 1.5g을 생성시켰다. 샘플은 에테르/헥산으로부터 결정화하여 결정형 생성물 (m.p. 181℃ 내지 183℃)을 산출시켰다.

[실시예 9]

[MeThr]^{4}-Ciclosporin (화합물 d)

미국 특허 제4,396,542호 및 제4,798,823호에 기재된 Ciclosporin의 전체 합성법은 위치 4에 MeLeu 대신 MeThr을 사용하여 수행하였다. 생성물은 $[\alpha]_D^{20}$=-249.6℃($CHCl_3$ 중에서 c=1.0)이었다.

[실시예 10]

[MeVal]^{4}-Ciclosporin (화합물 b)

미국 특허 제4,396,542호 및 제4,798,823호에 기재된 Ciclosporin의 전체 합성법은 위치 4에 MeLeu 대신 MeVal을 사용함으로써 수행했다. 생성물의 $[\alpha]_D^{20}$=-226℃ ($CHCl_3$ 중에서 c=0.358)이었다.

[실시예 11]

Ciclosporin-관련 활성 화합물의 면역 억제력 및 시클로필린-결합력

(1) ELISA 분석시 측정한 활성 화합물의 시클로필린 결합비(BR) 및 (2) MLR 분석시 측정한 Ciclosporin-관련 활성 화합물의 면역억제 활성의 예를 표 1에 제시했는데, 상기 면역억제 활성은 Ciclosporin에 대한 활성의 백분율 (면역억제비 또는 IR)로서 표현했다. 이들 값 및 이 테스트의 수행방법의 중요성에 대한 추가의 설명은 상기에 제시한 바와 같다.

[표 1]

화합물	BR (log_{10})	IR (%)
a) [디히드로-MeBmt]^{1}-[γ-히드록시-MeLeu]^{4}-Ciclosporin	0.1	1 미만
b) [MeVal]^{4}-Ciclosporin	0.1	1 미만
c) [MeIle]^{4}-Ciclosporin	-0.2	1 미만
e) [γ-히드록시-MeLeu]^{4}-Ciclosporin	-0.3	1 미만
f) [Nva]^{2}-[γ-히드록시-MeLeu]^{4}-Ciclosporin	0.4	1 미만
h) [MeVal]^{5}-Ciclosporin	0.4	5.3
j) [8'-히드록시-MeBmt]^{1}-Ciclosporin	0.35	1.8
k) [MeAla]^{6}-Ciclosporin	-0.4	3.2
l) [γ-히드록시-MeLeu]^{9}-Ciclosporin	0.15	2.9

[실시예 12]

활성 화합물의 항-HIV 활성 및 세포 독성

MT4-세포중 HIV-1 복제의 억제제로서 Ciclosporin 및 활성 화합물의 활성 및 MT4-세포중 활성 화합물 및 Ciclosporin의 세포독성의 예를 표 2에 기재했다. 이들 수치 및 적절한 방법의 중요성은 상기에서 설명하였다.

[표 2]

화합물	세포독성 (μg/㎖)	항-HIV (IC_{50})
a) [디히드로-MeBmt]^1-[γ-히드록시-MeLeu]^4-Ciclosporin	16.3	0.12
b) [MeVal]^4-Ciclosporin	5.4	0.064
c) [MeIle]^4-Ciclosporin	4.5	0.056
e) [γ-히드록시-MeLeu]^4-Ciclosporin	15.5	0.34
f) [Nva]^2-[γ-히드록시-MeLeu]^4-Ciclosporin	14.0	0.85
h) [MeVal]^2-Ciclosporin	4.4	0.45
i) [MeOThr]^2-[(D)MeAla]^3-[MeVal]^3-Ciclosporin	>10	0.45
j) [8′-히드록시-MeBmt]^1-Ciclosporin	10.6	0.56
k) [MeAla]^6-Ciclosporin	5.2	1.34
l) [γ-히드록시-MeLeu]^9-Ciclosporin	>10	0.31
Ciclosporin	8.45	0.53

상기 활성 화합물들은, AIDS 감염자의 치료 및 무증상의 HIV-양성 환자에서의 AIDS의 예방 둘다에 대해 처방된다. AIDS 증상이 나타나는 환자에게 활성 화합물을 투여하면 AIDS와 관련된 T4-세포 감소 작용을 전환시키고, 카포시육종과 같은 AIDS-관련 질환의 회복을 유도하며, 신종의 기회적 감염 가능성을 감소시킨다.

따라서 본 발명은, 본 발명의 활성 화합물을 HIV-1 바이러스에 감염된 환자에게 유효량 투여함으로써, 후천성 면역 결핍증 및 HIV-1 바이러스에 의해 유도된 다른 질환을 치료 및 예방하는 방법을 제공한다.

활성 화합물은 임의의 통상적인 경로, 특히 장내 투여, 예를 들면 음료, 정제 또는 캡슐 형태로의 경구 투여; 또는 주사액 또는 현탁액 형태로의 비경구 투여를 통해 투여할 수 있다. 정맥내 경로로 투여하는 경우에는 1일 용량이 1mg/kg 내지 20mg/kg 일 수 있으며, 3mg/kg 내지 10mg/kg이 바람직하고, 경구 투여시에는 1mg/kg 내지 50mg/kg이고, 바람직하게는 7mg/kg 내지 20mg/kg이다.

활성 화합물의 독성은 Ciclosporin과 유사할 것으로 추측된다. 활성 화합물은 면역 억제성이 없기 때문에, 면역 억제성과 관련된 Ciclosporin의 특정 부작용을 피할 수 있다. 그러나 Ciclosporin와 관련된 다른 부작용, 구체적으로 오랜 기간 사용에 따른 신장 독성도 또한 활성 화합물과 관련이 있을 수 있다.

활성 화합물에 바람직한 생약 제제로는 영국 특허 출원 제2 222 770 A호에 기술된 미세 에멀젼계가 있는데, 이것은 국소 투여형태 및 경구형이 있다; 또한 영국 특허 출원 제2 209 671 A호에 기재된, 지방산 당 모노에스테르 (예, 사카로오즈 모노라우레이트)를 함유한 고형 용액으로 제조된 경구형 및 주사 가능한 형태가 있다. 경구 투여용으로 적합한 단위 투여 형태는, 예를 들어 투여량당 25mg 내지 200mg의 활성 화합물을 함유한다.

제형예 A :

실시예 1의 생성물	50.0mg
글리코푸롤 75	180.0mg
미글리올 812	90.0mg
크레모포르 RH40	180.0mg
알파-토코페롤	0.5mg

제형예 B :

실시예 1의 생성물	100.0mg
테트라글리콜	20.0mg
캅텍스 800	20.0mg
니콜 HCO-40	860.0mg
부틸히드록시톨루엔 (BHT)	1.0mg

제형예 C :

실시예 1의 생성물	25.0mg
글리코푸롤 75	100.0mg
미글리올 812	35.0mg
크레모포르 RH 40	90.0mg
부틸히드록시아니졸 (BHA)	0.2mg

제형제 D :

실시예 1의 생성물	10.0mg

테트라글리콜	10.0mg
미리톨	5.0mg
크레모포르 RH 40	75.0mg
알파-토코페롤	0.1mg

상기 제형의 개별 성분 및 그 제조방법은 영국 특허 출원 제2 222 770호에 모두 기재되어 있으며, 그 내용은 본문에 참고 인용한다.

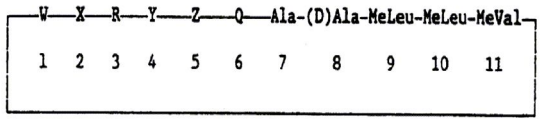
(57) 청구의 범위

청구항 1

비-면역 억제성이면서 시클로필린-결합성인 사이클로스포린을 포함하는, AIDS 및 AIDS 관련 질환의 치료 및 예방용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 사이클로스포린이 하기 일반식 (Ⅰ)의 화합물인 것을 특징으로 하는, AIDS 및 AIDS 관련 질환의 치료 및 예방용 약학 조성물 :

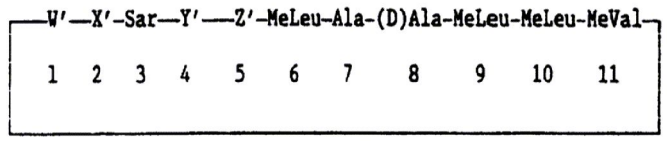


(I)

상기 식 중, W는 MeBmt, 디히드로-MeBmt 또는 8'-히드록시-MeBmt이며; X는 αAbu, Val, Thr, Nva 또는 MeOThr이고; R은 Sar 또는 (D)-MeAla이며; Y는 MeLeu, γ-히드록시-MeLeu, MeIle, MeVal, MeThr, MeAla, MeaIle 또는 MeaThr이고; Z는 Val, Leu, MeVal 또는 MeLeu이며; Q는 MeLeu, γ-히드록시-MeLeu 또는 MeAla 인데; 단, Y가 MeLeu일 경우에는, Z가 MeVal 또는 MeLeu이거나, 또는 W가 8'-히드록시-MeBmt이다.

청구항 3

제2항에 있어서, 일반식 (Ⅰ')의 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하는, AIDS 및 AIDS 관련 질환의 치료 및 예방용 약학 조성물:



(I')

상기 식 중, W는 MeBmt 또는 디히드로-MeBmt이며; X'는 αAbu 또는 Nva이고; Y'는 γ-히드록시-MeLeu, MeVal, MeThr 또는 MeIle이며; Z'는 Val 또는 MeVal이다.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 화합물이 다음의 화합물로 구성된 군중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, AIDS 및 AIDS 관련 질환의 치료 및 예방용 약학 조성물:

[디히드로-MeBmt]^{1}-[γ-히드록시-MeLeu]^{4}-Ciclosporin,

[MeVal]^{4}-Ciclosporin,

[MeIle]^{4}-Ciclosporin,

[MeThr]^{4}-Ciclosporin,

[γ-히드록시-MeLeu]^{4}-Ciclosporin,

[Nva]^{2}-[γ-히드록시-MeLeu]^{4}-Ciclosporin,

[γ-히드록시-MeLeu]^{4}-[γ-히드록시-MeLeu]^{6}-Ciclosporin,

[MeVal]^{5}-Ciclosporin,

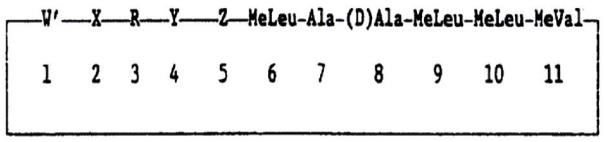
[MeOThr]^{2}-[(D)MeAla]^{3}-[MeVal]^{5}-Ciclosporin,

[8'-히드록시-MeBmt]^{1}-Ciclosporin, 및

[γ-히드록시-MeLeu]^{9}-Ciclosporin.

청구항 5

하기 일반식(II)의 화합물 :

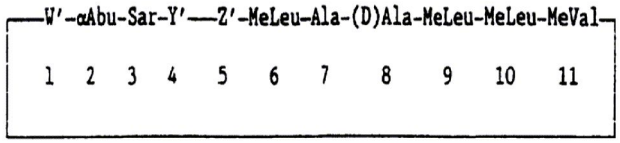


(II)

상기식 중, W'는 MeBmt 또는 디히드로-MeBmt이며; X는 αAbu Val, Thr, Nva 또는 MeOThr이고; R은 Sar 또는 (D)-MeAla이며; Y는 MeLeu, γ-히드록시-MeLeu, Melle, MeVal, MeThr, MeAla, Mealle 또는 MeaThr이고; Z는 Val, Leu, MeVal 또는 MeLeu인데; 단, 1) Y가 MeLeu 또는 MeAla일 경우, Z는 MeVal 또는 MeLeu이고; 2) W'가 MeBmt이고, R이 Sar이며 Y가 γ-히드록시-MeLeu 일 경우에 Z는 발린 이외의 것이다.

청구항 6

제5항에 있어서, 하기 일반식 (II')의 화합물 :



(II')

상기식 중, W'는 MeBmt 또는 디히드로-MeBmt이고; Y'는 γ-히드록시-MeLeu, MeVal, MeThr, 또는 Melle이며; Z'는 Val 또는 MeVal인데; 단, W'가 MeBmt 일 경우에 Y'는 γ-히드록시-MeLeu 이외의 것이다.

청구항 7

하기 화합물로 구성된 군중에서 선택된 화합물 :

[디히드로-MeBmt]^{1}-[γ-히드록시-MeLeu]^{4}-Ciclosporin,

[MeVal]^{4}-Ciclosporin,

[Melle]^{4}-Ciclosporin,

[MeThr]^{4}-Ciclosporin,

[Nva]^{2}-[γ-히드록시-MeLeu]^{4}-Ciclosporin,

[γ-히드록시-MeLeu]^{4}-[γ-히드록시-MeLeu]^{6}-Ciclosporin,

[MeVal]^{5}-Ciclosporin, 및

[MeOThr]^{2}-[(D)MeAla]^{3}-[MeVal]^{5}-Ciclosporin.

청구항 8

영양 배지에서 진균 균주 DSM 6627을 배양하는 단계 및 발효액으로부터 생성물을 분리하는 단계를 포함하는 [Melle]^{4}-Ciclosporin의 제조방법.

청구항 9

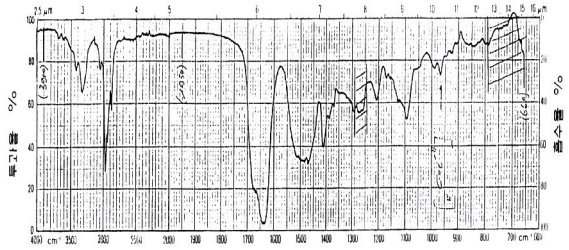
진균 균주 DSM 6627의 순수 배양체.

청구항 10

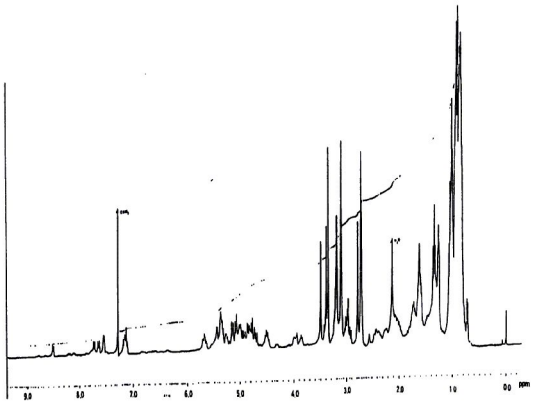
영양 배지내에서 진균 균주 NRLL 11111을 배양하는 단계, 하나 이상의 MeLeu 잔기를 가진 사이클로스포린을 첨가하는 단계, 및 발효액으로부터 생성물을 분리하는 단계를 포함하는, 하나 이상의 γ-히드록시-MeLeu 잔기를 가진 사이클로스포린의 제조방법.

도면

도면1



도면2



도면3

