

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

249542
(11) (B2)

(51) Int. Cl.⁴
C 07 K 7/64

(22) Přihlášeno 23 03 85
(21) (PV 2132-85)
(32) (31) (33) Právo přednosti od 23 03 84
(8407618) a od 10 05 84 (8411922)
Velká Británie
(40) Zveřejněno 17 07 86
(45) Vydáno 15 09 88

(72)
Autor vynálezu WENGER ROLAND dr., RIEHEN, TRABER RENÉ P. dr.,
KOBEL HANS dr., BASEL, HOFMANN HANS, ETTINGEN (Švýcarsko)

(73)
Majitel patentu SANDOZ AG., BASEL (Švýcarsko)

(54) Způsob výroby cyklosporinů

1

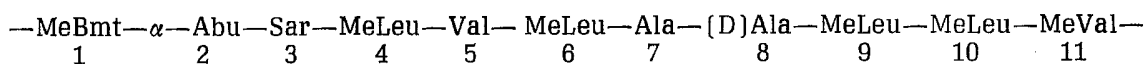
2

Řešení se týká způsobu výroby cyklosporinu, jehož zbytek aminokyseliny v poloze 8 je zbytek (D)-acyloxy- α -aminokyseliny, látku tak použít jako léčivo.

Vynález se týká výroby nových cyklosporinů.

Jako cyklosporiny jsou označovány strukturně zvláštní, cyklické, poly-N-methylované undekapeptidy, které vykazují farma-

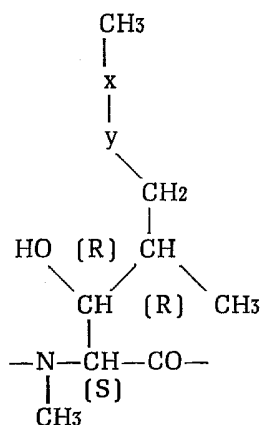
kologické účinky, zejména imunosupresivní, protizánětlivé a antiparazitární účinky. Prvním izolovaným cyklosporinem a také kmenovou sloučeninou této řady, je přirozený metabolit hub — cyklosporin A vzorce A



(A)

kde

—MeBmt— znamená N-methyl—(4R)-4-but-2E-en-1-yl-4-methyl(L)threonylový zbytek obecného vzorce B



(B)

kde —x—y znamená —CH=CH— (trans).

Od původního objevu cyklosporinu A bylo izolováno a identifikováno mnoho přírodních cyklosporinů a bylo vyrobeno mnoho dalších, v přírodě se nevyskytujících cyklosporinů, totální syntézou nebo polosyntetickým způsobem, nebo také modifikovaným kultivačním způsobem. Proto stoupl význam cyklosporinů, které nyní například zahrnují přírodní cyklosporiny A až Z (viz Kobel a spol., European Journal of applied Microbiology and Biotechnology 14, 237 až 240 /1982/ referát přednesený von Trabem a spol., 24 th. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, /8.—10. 10. 1984/), dále různé cyklosporiny, které nejsou přírodního původu, obsahující dihydro-cyklosporiny (kde skupina —x—y— znamená ve zbytku —MeBmt— ve výše uvedeném vzorci B — nasycenou skupinu, například jak je popsáno v US patentových spisech vzorce A, číslo 4 108 985, 4 210 581 a 4 220 581), cyklosporiny, kde zbytek —MeBmt— je v izomerizované nebo N-demethylované formě (viz Evropský patent č. 0 034 567 a „Cyclosporin A“, Proc. Internat. Conference on Cyclosporin A, Cambridge (U. K.) September 1981, Ed. D. J. G. White, Elsevier Press (1982) — oba získané totální syntézou cyklosporinů obje-

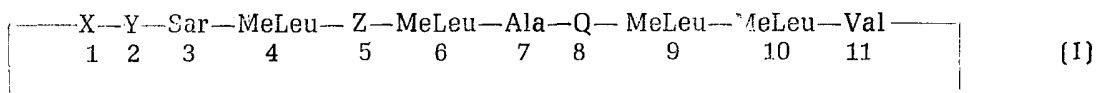
venou R. Wengerem, kde se začleňují různé aminokyseliny na určitá místa peptidového řetězce (viz Evropský patent č. 0 056 782). Jako příklady takovýchto cyklosporinů popsaných ve shora uvedené literatuře mohou být uvedeny: [Thr]²-, [Val]²-, [Nva]²- a [Nva]²- [Nva]⁵-cyklosporin (také nazývaný jako cyklosporin C, D, G, popřípadě M), [dihydro-MeBmt]¹-[Val]²-cyklosporin (označovaný také jako dihydro-cyklosporin D) a [(D)Ser]⁸- a [dihydro-MeBmt]¹-[(D)Ser]⁸- a [dihydro-MeBmt]¹-[(D)Ser]⁸-cyklosporin.

V souladu s běžnou nomenklaturou cyklosporinů jsou tyto v popise i v předmětu vynálezu označovány ve vztahu k cyklosporinu A. To znamená, že se nejdříve uvede ta část molekuly, která je odlišná od cyklosporinu A a pak uvedením slova „cyklosporin“ ostatní část, která odpovídá cyklosporinu A. Výraz -dihydro-MeBmt- byl použit k označení zbytku v uvedeném vzorci B, kde —x—y znamená —CH₂—CH₂—. Tak byl jako [dihydro-MeBmt]¹-[Val]²-cyklosporin označen onen cyklosporin, který obsahuje seskupení podle vzorce A, ale kde —MeBmt— (vzorec B, —x—y— znamená —CH=CH—/trans/) je nahrazen v poloze 1-dihydro-MeBmt- (vzorec B, —x—y— = —CH₂—CH₂—) a skupina —αAbu- v poloze 2 zbytkem —Val—. Podobným způsobem je jako [(D)Ser]⁸-cyklosporin označen cyklosporin se sekvencí podle vzorce A, kde ale -(D)-Ala- v poloze 8 nahrazen-(D)Ser-.

Dále v souladu s běžnou praxí mají aminokyseliny uváděné zkratkami, například —Ala—, —MeVal— atd., (L)-konfiguraci, pokud není uvedeno jinak. Zbytky s předložkou „Me“ jako například —MeLeu—, znamenají N-methylované zbytky. Různé zbytky cyklosporinových molekul se číslovají obdobně jako v literatuře, tj. ve směru hodinových ručiček a vychází se od —MeBmt— nebo —dihydro-MeBmt— zbytku v poloze 1. V popise i v předmětu vynálezu je používáno stále stejné číslování sekvencí.

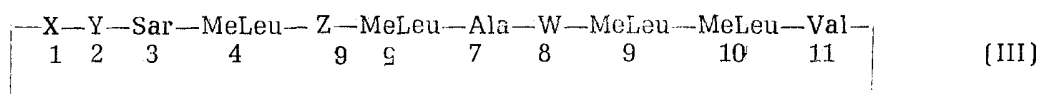
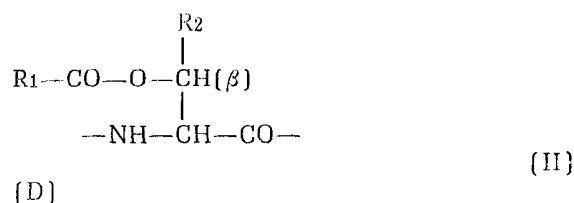
Podle vynálezu bylo nyní nalezeno, že nové cyklosporiny upotřebitelné ve farmaci mohou být takové, kde zbytek v poloze 8 je tvořen acyloxy-α-aminokyselinou s (D)-konfigurací.

Předložený vynález se proto týká způsobu výroby cyklosporinů obecného vzorce I

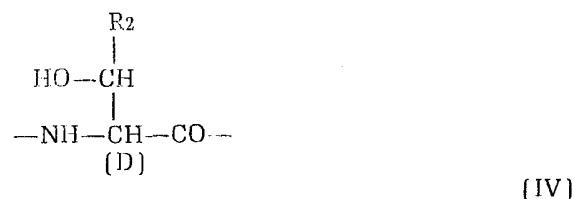


kde

X znamená —MeBmt— nebo —Dihydro—MeBmt—,
Y znamená — α Abu—, —Ala—, —Thr—, —Val— nebo —Nva—,
Z znamená —Val— nebo —Nva— a
Q znamená zbytek obecného vzorce II



kde X, Y a Z mají výše uvedený význam a W znamená zbytek obecného vzorce IV



kde R₂ má výše uvedený význam, acyluje, čímž se skupina R₁—CO—, kde R₁ má výše uvedený význam, zavede do polohy β , a popřípadě se získaný cyklosporin obecného vzorce I, kde X znamená —MeBmt—, redukuje na odpovídající cyklosporin, kde X znamená —Dihydro—MeBmt.

Ve vzorci I je Q výhodně O-acyl-(D)-serylový nebo O-acyl-(D)-threonylový zbytek a acylskupina má vzorec R₁—CO—, kde R₁ má výše uvedený význam. Y znamená výhodně — α Abu—, —Thr—, —Val— nebo —Nva—.

Skupinu cyklosporinů vyrobených způsobem podle vynálezu tvoří ty sloučeniny vzorce I, kde Y znamená — α Abu— nebo —Nva—, Z—Val— a R₂ vodík.

Další skupinu cyklosporinů vyrobených podle vynálezu tvoří ty sloučeniny obecného vzorce I, kde Y znamená — α Abu— nebo —Nva—, Z—Nva—, R₁ vodík nebo alkyl s 1 až 4 uhlíkovými atomy a R₂ vodík.

Acylace může být provedena postupy známými pro acylaci hydroksupin, například reakcí s výhodně dvěma ekvivalenty nebo ještě Y = —Thr—, jedním ekvivalentem vhodného acylhalogenidu, nebo při formyla-

kde

R₁ znamená vodík, alkyl s 1 až 4 atomy uhlíku nebo fenyl a

R₂ znamená vodík nebo methyl, vyznačujícího se tím, že se cyklosporin obecného vzorce III

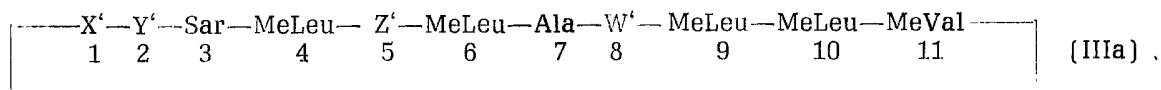
ci, reakcí například se směsným anhydridem kyseliny octové, kyseliny mravenčí, při teplotě například od asi —10 do 50 °C. Reakce se provádí za bezvodých podmínek, výhodně v inertním rozpouštědle jako je methylenchlorid a za přítomnosti kondenzačního činidla jako je 4-dimethylaminopyridin. Za těchto podmínek probíhá acylace hydroxyskupiny zbytkem aminokyseliny snadněji v poloze 8 než hydroxyskupiny v poloze 1.

Popřípadě prováděná redukce může být provedena známými postupy pro redukci přírodních cyklosporinů, například katalytickou hydrogenací, např. postupy uvedenými v britském patentovém spise č. 1 567 201.

Hydrogenace se výhodně provádí v neutrální oblasti, při teplotách mezi asi 20 a 30 °C a za atmosférického tlaku nebo mírně zvýšeného tlaku. Jako hydrogenační katalyzátory se používají například oxid platičitý nebo paládiové katalyzátory, například paládium na uhlí. Hydrogenace se může provádět například v reakčním rozpouštědle inertním za podmínek reakce jako je ethylacetát nebo v nižším alifatickém alkoholu jako je methanol nebo isopropanol.

Výchozí sloučeniny obecného vzorce III jsou známy například z uvedeného evropského patentu č. 0 056 782, kde je rovněž popsán způsob jejich výroby, nebo mohou být vyrobeny způsobem analogickým postupem popsanému v evropském patentu číslo 0 034 567 (na který odkazuje zveřejněný spis 0 056 782) pro obecnou úplnou syntézu cyklosporinu, nebo ještě dalšími postupy popsanými zejména v příkladech.

Tak mohou být například připraveny cyklosporiny obecného vzorce IIIa



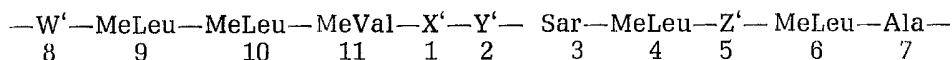
kde

Y' znamená — α Abu—, —Thr—, —Val—
nebo —Nva—,

Z' znamená —l— nebo jestliže Y' zna-
mená — α Abu— nebo —Nva— znamená
—Nva—,

W' znamená —(D)Ser— nebo jestliže Y'
znamená — α Abu a Z' —Val— znamená
—(D)Thr— a

X' znamená —MeBmt—, nebo jestliže Y'



kde Y', Z', W' a X' mají výše uvedený vý-
znam, cyklizuje, přičemž undekapeptid může
být v nechráněné nebo O-chráněné formě,
a chránicí skupina se, je-li to nutné, odště-
pí, nebo

c) se pro výrobu cyklosporinu obecného
vzorce IIIa, kde

Y' znamená —Thr—, —Val— nebo
—Nva—,

Z' znamená —Val— nebo, jestliže Y' zna-
mená —Nva—, znamená —Nva—,

W' znamená —(D)Ser— a

X' znamená —MeBmt—,

kultivuje kmen hub produkujících:

(Thr)²-cyklosporin,

(Val)²-cyklosporin,

(Nva)²-cyklosporin nebo

(Nva)²-(Nva)⁵-cyklosporin

za přítomnosti živného média obsahujícího
(D)-serin a cyklosporin obecného vzorce
IIIa se ze získané kultivační břečky izoluje,
nebo

d) se pro výrobu cyklosporinů obecného
vzorce IIa, kde X' znamená -dihydro-Membt-
redukuje odpovídající cyklosporin obecného
vzorce IIIa, kde X' znamená —MeBmt—.

Undekapeptidy použité ve způsobu b) mo-
hou být připraveny podle postupů uvede-

znamená —Thr—, —Val— nebo —Nva—,
Z'—Val— a W'—(D)Ser—, znamená -dihyd-
ro-MeBmt,

vyrobeny tak, že se

a) v O-chráněné formě výše definovaného
cyklosporinu obecného vzorce III odštěpí
chránicí skupina, nebo

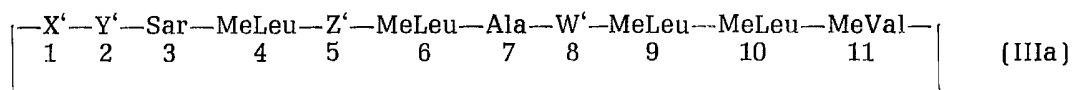
b) se undekapeptid s přímým řetězcem
obsahující sekvenci

ných ve výše citovaném evropském patentu
č. 0 056 782, například podle schématu v
příkladu 1a tohoto patentu, kde se peptido-
vá sekvence sestávající ze zbytků 8 až 11
cyklosporinové molekuly kombinuje se sek-
venčí sestávající ze zbytků 1 až 7, s nezbyt-
nou substitucí zbytku v poloze 2 a/nebo
logickým způsobem, nebo obecnou syntézou
cyklosporinů popsanou v evropském patentu
č. 0 034 567 (na který odkazuje patent číslo
0 056 782), nebo dále popsáním způsobem
(zejména v příkladech).

Cyklosporiny vhodné jako výchozí látky
pro způsob b) mohou být vyrobeny způso-
bem a).

Ačkoliv výchozí sloučeniny obecného
vzorce III, které jsou v následujících pří-
kladech specificky popsány, spadají do šir-
šího rozsahu evropského patentového spisu
č. 0 056 782, jsou nové, tj. dosud nebyly spe-
cificky popsány. Podle vynálezu bylo nyní
nalezeno, že tyto cyklosporiny mají zvláště
zajímavé nebo výhodné spektrum účinnosti,
zejména immunosupresivní účinnost a zvlá-
ště zabraňují nežádoucím efektům (obrana)
spojeným s transplantací, např. transpla-
tacemi orgánů, např. v porovnání se zná-
mými cyklosporiny vzorce III, tj. s těmi cyk-
losporiny vzorce III, které jsou specificky
popsány v evropském patentu č. 0 056 782.

Proto se předložený vynález týká z další-
ho hlediska cyklosporinu vzorce IIIa



kde

Y' znamená — α Abu—, —Thr—, —Val—
nebo —Nva—,

Z' znamená —Val— nebo, v případě, že
Y' znamená — α Abu— nebo —Nva—, zna-
mená —Nva—,

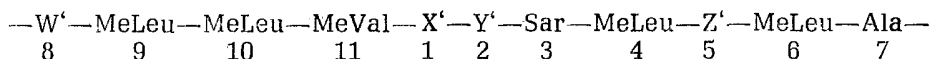
W' znamená —(D)Ser— nebo v případě,
když Y' znamená — α Abu— a Z' —Val—,
znamená —(D)Thr— a

X' znamená —MeBmt— nebo v případě,
když Y' znamená —Thr—, —Val— nebo
—Nva—, Z' znamená —Val— a W' —(D)-
Ser—, znamená X' -dihydro-MeBmt—.

Specifickými cyklosporiny vzorce IIIa jsou:

- a) [(D)Thr]⁸-cyklosporin
- b) [Thr]²—[(D)Ser]⁸-cyklosporin
- c) [dihydro-MeBmt]¹—[Thr]²—[(D)Ser]⁸-cyklosporin
- d) [Val]²—[(D)Ser]⁸-cyklosporin
- e) [dihydro-MeBmt]¹—[Val]²—[(D)Ser]⁸-cyklosporin
- f) [Nva]²—[(D)Ser]⁸-cyklosporin
- g) [dihydro-MeBmt]¹—[Nva]²—[(D)Ser]⁸-cyklosporin
- h) [Nva]⁵—[(D)Ser]⁸-cyklosporin a
- i) [Nva]²—[Nva]⁵—[(D)Ser]⁸-cyklosporin.

Z výše uvedených cyklosporinů jsou slou-



kde Y', Z', W' a X' mají výše uvedený význam, cyklizuje, přičemž undekapeptid může být v nechráněné nebo v O-chráněné formě, a je-li to nutné odštěpí se chránicí skupina, nebo

e) že se pro výrobu cyklosporinu vzorce IIIa, kde

Y' znamená —Thr—, —Val— nebo —Nva—,
Z' znamená —Val— nebo v případě, že Y' znamená —Nva, znamená Z' —Nva—,
W' znamená —(D)Ser— a
X' znamená —MeBmt—,

kultivuje kmen hub produkujících:

[Thr]²-cyklosporin,
[Val]²-cyklosporin,
[Nva]²-cyklosporin nebo
[Nva]²—[Nva]⁵-cyklosporin

v přítomnosti živného média obsahujícího (D)-serin a cyklosporin vzorce IIIa se ze získané kultivační břečky izoluje, nebo

f) že se pro výrobu cyklosporinu obecného vzorce IIIa, kde X' znamená -dihydro—MeBmt—, redukuje cyklosporin vzorce IIIa, kde —X' znamená —MeBmt—.

Undekapeptidy použité ve způsobu d) mohou být připraveny podle postupů uvedených ve výše zmíněném evropském patentu číslo 0 056 782, například podle schématu v příkladu 1a tohoto patentu, kde se peptidová sekvence sestávající ze zbytků 8 až 11 cyklosporinové molekuly kombinuje se sekvencí sestávající ze zbytků 1 až 7, s nezbytnou substitucí zbytku v poloze 2 a/nebo 5 a/nebo 8. —(D)Ser— nebo —(D)Thr— zbytek v poloze 8 je výhodně v O-chráněné formě, např. ve formě O-t-butylderivátu. Cyklizace se provádí za použití speciálních metod uvedených ve zmíněném evropském patentu, s následujícím odštěpením O-chránicí sku-

čeniny a), b), e), f) a i), zejména a), f) a i) se zřetelem na jejich účinnost, jejich spektrum účinnosti, například jejich imunosupresivní účinnost, zvláště zajímavé, např. v porovnání se specifickými cyklosporiny popsány v evropském patentu číslo 0 056 782.

Dále se způsob podle vynálezu pro přípravu výše definovaných cyklosporinů vzorce IIIa vyznačuje tím,

c) že se odštěpí chránicí skupina v O-chráněné formě výše definovaného cyklosporinu obecného vzorce III, nebo

d) že se undekapeptid s přímým řetězcem obsahující sekvenci

piny v případě postupu a), prováděným metodami známými v chemii peptidů.

Výhodným kmenem pro použití ve způsobu c) je kmen NRRL 8044 houby *Tolypocladium inflatum* (Gams). Jeho kultura byla deponována v United States Department of Agriculture (Northern Research and Development Division), Peoria, Ill., USA, kde je přístupná veřejnosti.

Další kultura byla deponována pod číslem FRI FERM-P č. 2796 ve Fermentation Research Institute, Inage, Chiba City, Japonsko. Morfologické znaky tohoto kmenu, který byl dříve přiřazen rodu hub *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers.), jakož i metody pro výrobu a uchování předkultury a udržovací kultury, jsou popsány v literatuře, například v britském patentu č. 1 491 509.

Podle způsobu c) se kultivuje vybraný kmen, např. rodu *Tolypocladium inflatum* (Gams), výhodně po dobu asi 2 týdnů v živném médiu popsáném v následujících příkladech a za přítomnosti přidaného (D)-nebo (D,L)-serinu při teplotě 27 °C. Aminokyselinový prekursor se přidává do kultivačního média výhodně v množství od asi 1 do asi 15 g, výhodně asi 4 až 10 g/litr.

Výhodně kultivační médium obsahuje jako přídavek prekursor aminokyseliny zbytku v poloze 2 požadovaného cyklosporinu, například v množství od asi 6,0 do asi 10,0, výhodně asi 8,0 g/litr kultivačního média. Po uplynutí kultivační doby se získaný cyklosporin vzorce IIIa izoluje z kultivační břečky o sobě známými metodami, jako je například rozdělení břečky na mycélium a kultivační filtrát, extrakce mycelia za zhomogenizování a odstředění buněčného materiálu.

Získaný surový cyklosporin se může přechistit například chromatograficky a/nebo překrystalováním. Tak se odstraní další cyklosporiny, zvláště přírodní cyklosporiny.

Způsob d) může být například proveden, že se použije výše uvedená metoda pro re-

dukci sloučenin vzorce I, kde X znamená —MeBmt—.

Následující příklady objasňují provedení způsobu podle vynálezu.

Příklad 1

Syntéza [(O-acetyl)—(D)Ser]⁸-cyklosporinu

[vzorec I: X = —MeBmt—, Y = — α Abu—, Z = —Val—, Q = -O-acetyl-(D)Ser—]:

20 mg 4-dimethylaminopyridinu se přidá ke 47 mg [(D)Ser]⁸-cyklosporinu (vyrobený v souladu s postupem popsáním v příkladu 1 nebo 3, výše zmíněného evropského patentu č. 0 056 782) rozpuštěným ve 3 ml methylenchloridu. K reakční směsi se přidá 6,1 mg čerstvě destilovaného acetylchloridu v 1 ml methylenchloridu a získaná reakční směs se míchá 1 hodinu při teplotě místnosti.

Tato reakční směs se zředí 50 ml methylenchloridu a třepe se s 30 ml vody. Organická fáze se oddělí, suší se síranem sodným, odfiltruje se a odpaří. Zbytek se filtruje přes 60 g silikagelu (0,062 až 0,20 mm) za použití směsi methylenchloridu s 5 % methanolu jako elučního činidla, shromažďují se 25ml frakce. Titulní sloučenina se získá z frakcí 4 až 8 pomocí chromatografie na tenké vrstvě za použití methylenchloridu s 5 % methanolu jako elučního činidla.

$[\alpha]_D^{20} = -202^\circ$ (c = 0,92 v CHCl₃).

Příklad 2

Analogickým postupem jako v příkladu 1 se z odpovídajících neacylovaných cyklosporinů získají následující sloučeniny:

2.1. [(O-benzoyl)—(D)Ser]⁸-cyklosporin
[vzorec I: X = —MeBmt—, Y = — α Abu—, Z = —Val—, Q = -O-benzoyl—(D)Ser—]:

$[\alpha]_D^{20} = -220^\circ$ (c = 1,0 v CHCl₃);

2.2. [O-acetyl—(D)Thr]⁸-cyklosporin
[vzorec I: X = —MeBmt—, Y = — α Abu—, Z = —Val—, Q = -O-acetyl—(D)Ser—]:

$[\alpha]_D^{20} = -219^\circ$ (c = 1,0 v CHCl₃);

2.3. [Nva]²—[O-acetyl—(D)Ser]⁸-cyklosporin
[vzorec I: X = —MeBmt—, Y = —Nva—, Z = —Val—, Q = -O-acetyl—(D)Ser—]:

$[\alpha]_D^{20} = -240^\circ$ (c = 1,0 v CHCl₃),
—233° (c = 0,8 v CHCl₃), —177° (c = 0,76 v CH₃OH):
t. t. 143 až 147 °C;

2.4. [Val]²—[O-acetyl—(D)Ser]⁸-cyklosporin

[vzorec I: X = —MeBmt—, Y = —Val—, Z = —Val—, Q = -O-acetyl—(D)Ser—]:

$[\alpha]_D^{20} = -219^\circ$ (c = 0,9 v CHCl₃);

2.5. [Nva]⁵—[O-acetyl—(D)Ser]⁸-cyklosporin

[vzorec I: X = —MeBmt—, Y = — α Abu—, Z = —Nva—, Q = -O-acetyl—(D)Ser—]:

$[\alpha]_D^{20} = -215^\circ$ (c = 1,0 v CHCl₃);

2.6. [Nva]²—[Nva]⁵—[O-acetyl—(D)Ser]⁸-cyklosporin

[vzorec I: X = —MeBmt—, Y = —Nva—, Z = —Nva—, Q = -O-acetyl—(D)Ser—]:

$[\alpha]_D^{20} = -196,9^\circ$ (c = 1,0 v CHCl₃) a

2.7. [Thr]²—[O-acetyl—(D)Ser]⁸-cyklosporin

[vzorec I: X = —MeBmt—, Y = —Thr—, Z = —Val—, Q = -O-acetyl—(D)Ser—]:

$[\alpha]_D^{20} = -251^\circ$ (c = 0,86 v CHCl₃),
—174° (c = 0,81 v CH₃OH):
t. t. = 143 až 146 °C.

Příklad 3

Syntéza [dihydro-MeBmt]¹—[O-acetyl—(D)Ser]⁸-cyklosporinu

[vzorec I: X = -dihydro—MeBmt—, Y = — α Abu—, Z = —Val—, Q = -O-acetyl—(D)Ser—]:

54 mg [(O-acetyl)—(D)Ser]⁸-cyklosporinu v 10 ml ethanolu se hydrogenuje za použití 10 mg paládía na živočišném uhlí (10 procent) při teplotě místnosti a normálním tlaku. Po 20 hodinách se získaný reakční roztok zfiltruje přes tenkou vrstvu loje a ethanol se odpaří ve vakuu. Po dalším sušení za vysokého vakua se získá titulní sloučenina.

$[\alpha]_D^{20} = -205,8^\circ$ (c = 1,02 v CHCl₃).

Příklad 4

Následující sloučeniny se připraví buď postupem podle příkladu 1, za použití neacylovaných cyklosporinů, nebo podle příkladu 3, hydrogenací odpovídajících cyklosporinů popsanych v příkladu 2:

4.1. [dihydro-MeBmt]¹—[Nva]²—[O-acetyl—(D)Ser]⁸-cyklosporin

[vzorec I: X = -dihydro—MeBmt—, Y = —Nva—, Z = —Val—, Q = -O-

-acetyl—(D)Ser—]:
t. t. 139 až 141 °C;

$[\alpha]_D^{20} = -225^\circ$ ($c = 0,88$ v CHCl_3),
 -163° ($c = 0,76$ v CH_3OH);

- 4.2. [dihydro-MeBmt]¹—[Val]²—(O-acetyl—(D)Ser)⁸-cyklosporin
[vzorec I: X = -dihydro—MeBmt—, Y = —Val—, Z = —Val—, Q = -O-acetyl—(D)Ser—]:

$[\alpha]_D^{20} = -210^\circ$ ($c = 0,85$ v CHCl_3); a

- 4.3. [dihydro-MeBmt]¹—[Thr]²—(O-acetyl—(D)Ser)⁸-cyklosporin
[vzorec I: X = -dihydro—MeBmt—, Y = —Thr—, Z = —Val—, Q = -O-acetyl—(D)Ser—]:

$[\alpha]_D^{20} = -241^\circ$ ($c = 1,0$ v CHCl_3),
 -162° ($c = 1,0$ v CHCl_3);
t. t. 148 až 150 °C.

Výroba výchozího materiálu:

Příklad 5

Výchozí sloučeniny nutné pro výrobu sloučenin v příkladech 2.2 až 2.7. se připraví obdobným způsobem jako známá sloučenina [(D)Ser]⁸-cyklosporin. Výroba této sloučeniny je popsána v příkladu 1 evropského patentu č. 0 056 782, se substitucí odpovídajícího zbytku v polohách 2 a/nebo 5 a/nebo 8, jak je popsáno v reakčním schématu u příkladu 1a uvedeného patentu.

- 5.1. [(D)Thr]⁸-cyklosporin
[vzorec IIIa: X' = —MeBmt—, Y' = —αAbu—, Z' = —Val—, W' = —(D)Thr—]:
 $[\alpha]_D^{20} = -248,7^\circ$ ($c = 1,0$ v CHCl_3);

- 5.2. [Nva]²-[(D)Ser]⁸-cyklosporin
[vzorec IIIa: X' = —MeBmt—, Y' = —Nva—, Z' = —Val—, W' = —(D)Ser—]:
t. t. 150 až 153 °C;
 $[\alpha]_D^{20} = -262^\circ$ ($c = 0,71$ v CHCl_3),
 -191° ($c = 0,73$ v CH_3OH);

- 5.3. [Val]²-[(D)Ser]⁸-cyklosporin
[vzorec IIIa: X' = —MeBmt—, Y' = —Val—, Z' = —Val—, W' = —(D)Ser—]:
 $[\alpha]_D^{20} = -257^\circ$ ($c = 1,0$ v CHCl_3),
 -225° ($c = 0,45$ v CHCl_3), -198° ($c = 0,42$ v CH_3OH):
t. t. 136 až 140 °C;

- 5.4. [Nva]⁵-[(D)Ser]⁸-cyklosporin
[vzorec IIIa: X' = —MeBmt—, Y' = —αAbu—, Z' = —Nva—, W' = —(D)Ser—]:
 $[\alpha]_D^{20} = -212^\circ$ ($c = 1,0$ v CHCl_3);

- 5.5. [Nva]²-[Nva]⁵-[(D)Ser]⁸-cyklosporin
[vzorec IIIa: X' = —MeBmt—, Y' = —Nva—, Z' = —Nva—, W' = —(D)Ser—]:
 $[\alpha]_D^{20} = -217^\circ$ ($c = 1,0$ v CHCl_3) a

- 5.6. [Thr]²-[(D)Ser]⁸-cyklosporin
[vzorec IIIa: X' = —MeBmt—, Y' = —Thr—, Z' = —Val—, W' = —(D)Ser—]:
 $[\alpha]_D^{20} = -258^\circ$ ($c = 0,39$ v CHCl_3),
 -178° ($c = 0,40$ v CH_3OH),
t. t. 147 až 152 °C.

Příklad 6

Sloučenina z příkladu 5. 2 může být také vyrobena jiným způsobem — mikrobiologicky — jak je uvedeno dále:

a) 10 litrů živného média obsahujícího 50 g maltózy, 5 g (DL)-norvalinu, 8 g (D)-serinu, 0,75 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,5 g heptahydrátu síranu hořečnatého, 0,1 g hexahydrátu chloridu vápenatého a 8 g kasienového peptonu na litr média, se očkuje 1 litrem suspenze konidií a mycelia kmene houby NRRL 8044, odebrané ze subkultury staré tři dny. Naočkované produkční médium se rozdělí po 100 ml do 100 ml Erlenmayerových baněk, které se inkubují 14 dní při 27 °C na kruhové třepačce při 180 otáčkách za minutu. Mycelium se oddělí od kultivačního média, rozmělní se a za míchání se extrahuje 3 × 3 litru 90% methanolu. Rozmělněné mycelium se z roztoku oddělí filtrací s odsáváním a spojené filtry se odpaří ve vakuu při teplotě 40 °C, až se pára v podstatě skládá z vody. Získaná směs se 4 × extrahuje vždy 0,5 litru 1,2-dichlorethanu. Spojené 1,2-dichlorethanové roztoky se odpaří za vakua při teplotě 40 °C.

Získaný zbytek se podrobí gelové filtraci na Sephadexu LH-20 (1,4 kg; Pharmacia) methanolem, shromažďují se 280 ml frakce. Frakce 9 až 11 obsahující cyklosporinovou směs se spojí a pak se dělí pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (1 kg silikagelu, velikost zrn 0,063 až 0,2 mm, Merck), za použití vodou nasyceného ethylacetátu jako elučního činidla (frakce 500 ml). V souladu s polaritou se eluuje nejprve [Nva]²-cyklosporin (frakce 7 až 9), následuje směs obsahující [Nva]²-[(D)Ser]⁸-cyklosporin a cyklosporin. Oddělení [Nva]²-[(D)Ser]⁸-cyklosporinu a cyklosporinu se provádí sloupcovou chromatografií na silikagelu (280 g Merck, 0,63 až 0,2 mm) za použití směsi chloroform/methanol (98 : 2) jako elučního činidla (frakce 100 ml). Frakce 20 až 30 obsahující surový [Nva]²-[(D)Ser]⁸-cyklosporin se dále čistí tlakovou chromatografií na silikagelu s reverzní fází („Merck“ LiChropep RP 18, 260 g velikost zrn 0,04 až 0,063 mm) za použití směsi me-

thanolu a vody (85:15) jako elučního činidla a jímají se 25 ml frakce. Spojené frakce 45 až 55 poskytnou čistý $[Nva]^2-[(D)-Ser]^8$ -cyklosporin ve formě amorfního bílého prášku.

Subkultura potřebná pro výše uvedený způsob může být získána následujícím způsobem:

b) Suspenze spor a mycelia použitá pro očkování vyrobená z kultury prvotně izolovaného kmene NRRL 8 044 se kultivuje 21 dní při 27 °C na následujícím agarovém médiu: 20 g sladového extraktu, 20 g agaru, 4 g extraktu z kvasnic v litru demineralizované vody. Spory této kultury se vyjmou do fyziologického roztoku chloridu sodného, přičemž je konečná koncentrace 5×10^6 spor. ml^{-1} . 10 ml této suspenze se použije pro očkování 1 litru živného roztoku stejného složení jako má kultivační médium v příkladu 6a, s výjimkou (D)-serinu a (DL)-norvalinu. Inkubace se prováděla 3 dny při 27 °C na třepačce kruhové (200 otáček za minutu). Tato kultura byla použita pro naočkování produkční kultury. $[Nva]^2-[(D)-Ser]^8$ -cyklosporin může být ve fermentoru připraven následujícím způsobem:

c) Asi 10^9 spor kultury kmene NRRL 8 044 na šikmém agaru se přidá do fermentoru z nerezové oceli obsahujícího 20 litrů kultivačního média následujícího složení:

fruktóza	75 g
Amber EHC	25 g
dihydrogenfosforečnan	
draselný	5 g
chlorid draselný	2,5 g
dest. voda do	1 litru
(pH = 5,5)	

Předem se provede sterilizace po dobu 20 minut při 120 °C. Výhodné inkubační podmínky jsou teplota 27 °C, průchod vzduchu 16 litrů za minutu při přetlaku 0,1 MPa a počtu otáček 200 min^{-1} .

Takto získaná subkultura se inkubuje 6 dní a 15 litrů se vnese do fermentoru z nerezové oceli obsahujícího 300 litrů produkčního média následujícího složení:

maltóza	75 g
Amber EHC	25 g
dihydrogenfosforečnan	
draselný	5 g
chlorid draselný	2,5 g
(DL)-norvalin	5 g
(D)-serin	8 g
dest. voda do	1 litru
(pH = 5,5)	

Předem byla provedena sterilizace po dobu 20 minut při teplotě 120 °C. Kultura se udržuje při teplotě 27 °C, provzdušňuje vzduchem o průtoku 120 l za minutu, při přetlaku 0,1 MPa, míchá se při počtu otáček 70 min^{-1} . Tvorba pěny je regulována přidáváním silikonové emulze.

Po 14 dnech inkubace se kultura, která má celkový objem 275 litrů ochladí na 10 °C a mycelium se oddělí za použití Westfalia-separátoru. Filtrát se extrahuje dvakrát za míchání ethylacetátem. Extrakty se promyjí malým množstvím vody, přečistí se a vysuší ve vakuu. K myceliu se přidá methanol, provede se homogenizace a zfiltruje se.

Extrakce se dvakrát opakuje za použití 90% methanolu. Methanolicke extrakty se spojí a za přidání vody se koncentrují ve vakuu. Zbýlý vodný koncentrát se extrahuje dvakrát ethylacetátem, extrakty se promyjí malým množstvím vody, spojí a koncentrují ve vakuu. Extrahovaná vodná fáze se ještě extrahuje dvakrát směsí ethylacetátu — isopropanolu (8:2). Získané extrakty se spojí a znovu se odpaří ve vakuu.

Extrakty mycelia a filtrátu se zfiltrují, použije se padesátinásobek Sephadexu LH-20 s methanolem jako elučním činidlem. Přední frakce se čistí chromatograficky, přičemž se použije stonásobné množství silikagelu 60 (velikost zrn 0,04 až 0,063 mm) za použití vodou nasyceného ethylacetátu jako elučního činidla. Nejprve se eluuje $[Nva]^2$ -cyklosporin, pak cyklosporin a $[Nva]^2-[(D)Ser]^8$ -cyklosporin. Další frakce se podrobí dalšímu chromatografickému čištění, přičemž se použije 140-násobné množství silikagelu 60 (zrnění 0,063—0,20 milimetru) a směs chloroformmethanol (98:2) jako eluční činidlo. Získá se čistý $[Nva]^2-[(D)Ser]^8$ -cyklosporin.

Příklad 7

Sloučenina z příkladu 5.3. se může také připravit mikrobiologickým postupem stejně jako v příkladu 6a) s následujícími změnami:

a) V živném médiu se (DL)-norvalin nahradí 10 g (L)-valinu. Po oddělení mycelia z kultivačního média se provede následující extrakce:

Surové mycelium se z roztoku odsaje a spojené filtráty se za přidání vody odpaří ve vakuu při teplotě 40 °C, až se pára skládá v podstatě z vody. Získaná směs se třikrát extrahuje vždy 5 litry ethylacetátu. Spojené ethylacetátové extrakty se koncentrují ve vakuu při teplotě 40 °C.

Získaný zbytek se podrobí gelové filtraci na Sephadexu LH-20 (1,4 kg; Pharmacia) s methanolem. Frakce, které obsahují směs cyklosporinů se spojí a pak se dělí sloupcovou chromatografií na silikagelu (3 kg silikagelu; velikost zrn 0,020 až 0,45 mm, „Grace“), s použitím ethylacetátu nasyceného vodou jako elučního činidla. V souladu se svojí polaritou se nejprve eluuje $[Val]^2$ -cyklosporin, následuje směs obsahující $[Val]^2-[(D)Ser]^8$ -cyklosporin jako hlavní složku.

Další čištění $[Val]^2-[(D)Ser]^8$ -cyklosporinu se provádí chromatografií na silikage-

lu (80 g, „Grace“, 0,020 až 0,0045 mm) za použití směsi aceton/hexan (1:1) jako elučního činidla. Frakce, které obsahují surový [Val²]-[(D)Ser⁸]-cyklosporin, které se dále čistí tlakovou chromatografií na sloupci silikagelu („Merck“ LiChroprep RP 18, 160 g, zrnění 0,04 až 0,063 mm) s reverzní fází za použití směsi methanol/voda (80:20) jako elučního činidla, přičemž se získá čistý [Val²]-[(D)Ser⁸]-cyklosporin jako amorfni bílý prášek.

b) Potřebná subkultura se získá postupem jako v příkladu 6b).

[Val²]-[(D)Ser⁸]-cyklosporin se může také vyrobit ve fermentoru, přičemž se postupuje podle příkladu 6c) s následujícími změnami:

c) Ve složení produkčního média se (DL)-norvalin nahradí 10 g (L)-valinu. Po přidání methanolu k myceliu, homogenizaci a filtraci (2 × 90% methanolem) se pokračuje následujícím způsobem:

Methanolicke extrakty se spojí a po přidání vody se koncentrují ve vakuu. Zbývající vodný koncentrát se extrahuje 3× ethylacetátem, extrakty se promyjí malým množstvím vody, spojí a odpaří ve vakuu.

Extrakty mycelia a filtrátů se zfiltrují, přičemž se použije 50násobné množství Sephadexu LH-20 a methanol jako eluční činidlo. První frakce se chromatograficky čistí, použije se čtyřicetinasobné množství Silikagelu 60 (zrnění 0,04 až 0,063 mm) a ethylacetát nasycený vodou jako eluční činidlo. Nejprve se eluuje [Val²]-cyklosporin, pak cyklosporin a [Val²]-[(D)Ser⁸]-cyklosporin.

Další frakce se podrobí dalšímu chromatografickému čištění, přičemž se použije stónásobné množství Silikagelu 60 a směsi aceton/hexan (1:1) a tlakové chromatografie na silikagelu („Merck“ LiChroprep RP 18, zrnění 0,04 až 0,063 mm) s reverzní fází za použití směsi methanol/voda (80:20) jako elučního činidla, přičemž se získá čistý [Val²]-[(D)Ser⁸]-cyklosporin.

Příklad 8

Sloučenina z příkladu 5.6. může být také vyrobena mikrobiologicky, přičemž se postupuje podle příkladu 6a) s následujícími odchylkami:

a) V živném médiu se nahradí (DL)-norvalin 5 g (L)-threoninu. Po inkubaci se provede extrakce následujícím způsobem:

Mycelium se oddělí od kultivačního média a rozmělní v Turraxu a míchá se s 3 × 9 litry 90% methanolu pro extrakci. Rozmělněné mycelium se od roztoku oddělí odsátím a spojené filtráty se za přídavku vody odpaří ve vakuu při 40 °C, až je pára v podstatě tvořena vodou. Získaná směs se 3× extrahuje vždy 5 litry ethylacetátu. Spojené

ethylacetátové extrakty se koncentrují za vakua při teplotě 40 °C.

Získaný zbytek se podrobí gelové filtraci na Sephadexu LH-20 (2 kg; Pharmacia) s methanolem. Frakce obsahující směs cyklosporinů se spojí a pak rozdělí sloupcovou chromatografií na silikagelu (2 kg Silikagelu, zrnění 0,02 až 0,045 mm, „Grace“) za použití ethylacetátu nasyceného vodou jako elučního činidla. V souladu s polaritou se nejprve eluuje cyklosporin, pak [(D)Ser⁸]-cyklosporin, pak [Thr²]-cyklosporin a nakonec [Thr²]-[(D)Ser⁸]-cyklosporin v surovém stavu.

Další čištění [Thr²]-[(D)Ser⁸]-cyklosporinu se provádí chromatografií na silikagelu (50 g, „Grace“, 0,02 až 0,45 mm), za použití směsi aceton/hexan (2:1) jako elučního činidla, čímž se získá čistý [Thr²]-[(D)Ser⁸]-cyklosporin ve formě amorfniho bílého prášku.

b) Potřebná subkultura se získá způsobem uvedeným v příkladu 6b).

[Thr²]-[(D)Ser⁸]-cyklosporin může být také vyroben ve fermentoru postupem podle příkladu 6c) s následujícími odchylkami:

c) Ve složení produkčního média se (DL)-norvalin nahradí 5 g (L)-threoninu. Po inkubaci a odstranění mycelia za použití separátoru Westfalia se postupuje následujícím způsobem:

K myceliu se přidá methanol, zhomogenizuje se a zfiltruje. Tato extrakce se dvakrát opakuje za použití 90% methanolu. Methanolicke extrakty se spojí a za přidání vody se koncentrují ve vakuu. Zbýlý vodný koncentrát se extrahuje 2× ethylacetátem, extrakty se promyjí malým množstvím vody, spojí a koncentrují ve vakuu.

Extrakty mycelia se zfiltrují. K této filtraci se použije padesátinasobné množství Sephadexu LH-20 a jako eluční činidlo methanol. Přední frakce se čistí chromatograficky, přičemž se použije třicetinasobné množství Silikagelu 60 (zrnění 0,04 až 0,063 milimetru) a ethylacetátu nasyceného vodou jako elučního činidla. Nejprve se eluuje cyklosporin, pak [(D)Ser⁸]-cyklosporin následovaný [Thr²]-cyklosporinem a nakonec [Thr²]-[(D)Ser⁸]-cyklosporin. Tyto pozdější frakce se podrobí dalšímu chromatografickému čištění, přičemž se použije 250násobné množství Silikagelu 60 (zrnění 0,02 až 0,045 mm) a směs aceton/hexan (2:1) jako eluční činidlo. Získá se čistý [Thr²]-[(D)Ser⁸]-cyklosporin.

Příklad 9

Následující sloučeniny použité jako výchozí látky v příkladech 4.1. až 4.3., mohou být připraveny z cyklosporinů uvedených v příkladech 5 až 7, přičemž se postupuje analogicky jako v příkladu 3.

- 9.1. [Dihydro-MeBmt]¹—[Nva]²—[(D)Ser]⁸-cyklosporin
[vzorec IIIa: X' = -dihydro—MeBmt—, Y' = —Nva—, Z' = —Val—, W' = —(D)Ser—] připraven z produktu z příkladu 5.2. nebo 6:

$[\alpha]_D^{20} = -251^\circ$ (c = 1,23 v CHCl₃);
—179° (c = 1,16 v CH₃OH);
t. t. 155 až 157 °C.

- 9.2. [Dihydro-MeBmt]¹—[Val]²—[(D)Ser]⁸-cyklosporin
[vzorec IIIa: X' = -dihydro—MeBmt—, Y' = —Val—, Z' = —Val—, W' = —(D)Ser—] připraven z produktu z příkladu 5.3. nebo 7:

$[\alpha]_D^{20} = -224^\circ$ (c = 1,0 v CHCl₃).

- 9.3. [Dihydro-MeBmt]¹—[Thr]²—[(D)Ser]⁸-cyklosporin
[vzorec IIIa: X' = -dihydro—MeBmt—, Y' = —Thr—, Z' = —Val—, W' = —(D)Ser—] připraven z produktu z příkladu 5.6. nebo 8:

$[\alpha]_D^{20} = -262^\circ$ (c = 0,73 v CHCl₃);
—173° (c = 0,79 v CH₃OH);
t. t. = 156 až 158 °C.

Cyklosporiny, ve kterých zbytek aminokyseliny v poloze 8 je [D]-acyloxy- α -aminokyseliny zbytek, které zde byly definovány a popsány, dále označované jako cyklosporiny podle vynálezu, vykazují farmakologickou aktivitu. Zvláště vykazují při pokusech na zvířatech imunosupresivní, protizánětlivou a antiparazitární účinnost, jak je zřejmé například z testu stimulace lymfocytů podle Janossyho a spol. [Clin. Exp. Immunol., 9, 483 (1971) a 10, 525 (1972)] v koncentracích od 0,001 do 10,0 μ g/ml, z adjuvansarthritis-testu podle Pearsona a spol. [Arthr. Rheum. 2, 440 (1959)] v dávkách od 10 do 30 mg na kilogram/den p. o. a z anti-malaria-testu podle L. Raneho [Chemotherapie and Drug Resistance in Malaria, vyd. W. Peters, Academic Press, New York, 1970] v dávkách od 25 do 100 mg/kg/den s. c.

Na základě své imunosupresivní účinnosti mohou být cyklosporiny podle vynálezu použity k profylaxi a ošetření stavů a onemocnění, které vyžadují snížení imunitní odpovědi. Cyklosporiny podle vynálezu tak mohou najít použití při potlačení proliferace lymfocytů a imunocytů, např. při ošetření autoimunitních onemocnění, k potlačování rejekce při transplantacích, např. kůže, plic, srdce, srdce a plic, kostní dřeně, ledvin, sleziny a rohovky.

Specifickými autoimunitními chorobami, při kterých mohou nalézt použití cyklosporiny podle vynálezu, jsou ta onemocnění, pro která je navrženo ošetření cyklosporinem A nebo již bylo použito, například aplastická anémie, „pure red cell anaemia“,

idiopatická trombocytopenie, systemický Lupus erythematosus, Polychondritis, Sklerodermie, Wegener granulomatosis, chronická aktivní Hepatitis, Myasthenia gravis, Psoriasis, Steven-Johnsonův syndrom, idiopatická Sprue, Morbus Crohn, Gravesova ophthalmopatie, Sarcoidose, sklerosa multiplex, primární biliární cirrhosa, primární juvenilní diabetes, Uveitis posterior, intersticiální plicní fibrosa a Psoriasis Arthritis.

Na základě své protizánětlivé účinnosti mohou cyklosporiny podle vynálezu nalézt použití při ošetření zánětlivých stavů, zejména zánětlivých stavů s aetiologií, která zahrnuje autoimunitní složky, např. k ošetření arthritidy a reumatických onemocnění jako je Arthritis chronica progrediens.

Na základě své antiparazitární účinnosti mohou cyklosporiny podle vynálezu nalézt použití jako antiparazitární léčiva, např. k ošetření parazitárních infekcí různých typů, zejména protozoálních, jakož i trematodeálních a nematodeálních infekcí. Specifické typy parazitárních infekcí, při kterých mohou cyklosporiny podle vynálezu nalézt použití, jsou takové infekce, pro které bylo již v literatuře navrženo ošetření cyklosporiny, např. Schistosomiasis, Filariasis, Leishmania, Coccidioidomycosis a zejména Malaria.

Pro výše uvedené indikace se pohybuje denní dávka mezi asi 75 až 5 000, výhodně kolem 2 000, zvláště výhodně kolem asi 1 500 mg. Při použití jednotné dávky, např. při orálním podání, je jedna dávka asi 25 až asi 2 500, výhodně asi 1 000, zvláště výhodně asi 800 mg cyklosporinu podle vynálezu, smíšeného s farmaceuticky přijatelným ředidlem nebo nosičem.

Cyklosporiny podle vynálezu mohou být také podávány běžným způsobem, zejména v souladu s běžnými metodami podávání cyklosporinu A, zvláště intravenózní infuzí, např. v případě transplantace orgánů před a ihned po transplantaci, jakož i při výskytu gastrointestinálních poruch, které jinak zhoršují absorpci, nebo orálně, např. ve formě orálního roztoku.

Jak již bylo dříve uvedeno, jsou cyklosporiny vzorce IIIa nové. Mimo použití jako meziproducty vykazují farmakologickou účinnost a/nebo profylaktickou, zejména ve vztahu k imunosupresivní aktivitě a zejména ve vztahu k jejich použití při potlačení rejekce transplantátů. Tato skutečnost je činí zvláště zajímavými ve vztahu k ostatním cyklosporinům, které jsou specificky popsány v evropském patentu č. 0 056 782.

Vzhledem ke své imunosupresivní účinnosti jsou cyklosporiny vzorce IIIa užitečné k profylaxi a ošetření onemocnění a stavů, které požadují redukci imunitní odpovědi, např. k potlačení proliferace lymfocytů a imunocytů, např. při ošetření onemocnění autoimunity, např. k ošetření specifických onemocnění autoimunity jak je uvedeno v

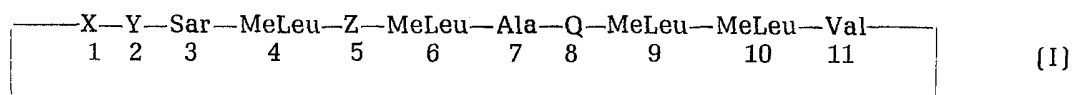
souvislosti s použitím cyklosporinů podle vynálezu nebo při prevenci rejekce transplantátů, např. dříve uvedených specifických druhů v souvislosti s použitím cyklosporinů podle vynálezu.

Se zřetelem na svoji protizánětlivou účinnost jsou cyklosporiny vzorce IIIa také užitečné k ošetření zánětlivých stavů, zvláště zánětlivých stavů s aetiologií obsahující nebo zahrnující autoimunní složky, např. k ošetření arthritidy a reumatických onemocnění jako Polyarthritidis chronica progrediens.

Se zřetelem na svoji antiparazitární účinnost jsou cyklosporiny vzorce IIIa užitečné jako antoparazitární prostředky, např. pro ošetření parazitárních infekcí různých typů, jak je zejména popsáno v souvislosti s použitím cyklosporinů podle vynálezu.

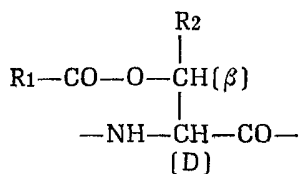
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby cyklosporinů obecného vzorce I

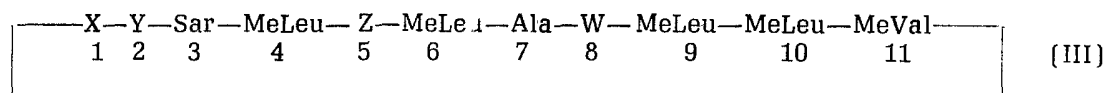


kde

X znamená —MeBmt— nebo —dihydro—MeBmt—,
Y znamená —αAbu—, —Thr—, —Val—
nebo —Nva—,
Z znamená —Val— nebo —Nva— a
Q znamená zbytek obecného vzorce II

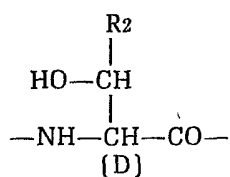


(II)



kde

X znamená —MeBmt— nebo —dihydro—
—MeBmt—,
Y znamená —αAbu—, —Ala—, —Thr—,
—Val— nebo —Nva—,
Z znamená —Val— nebo —Nva— a
W znamená zbytek obecného vzorce IV



(IV)

kde

R₂ znamená vodík nebo methyl,

Pro výše uvedené indikace se denní dávka pohybuje v oblasti od asi 75 do asi 5 000 mg a při použití jednotlivé dávky, např. pro orální podání, je tato dávka od asi 25 do asi 2 500 mg cyklosporinu vzorce IIIa smíšeného s farmaceuticky přijatelným ředidlem nebo nosičem.

Cyklosporiny vzorce IIIa mohou být podávány běžnými způsoby, zejména v souladu s běžnými metodami pro podávání cyklosporinu, zvláště intravenózní infúzí, např. v případě transplantace orgánů, před a ihned po transplantaci, jakož i při výskytu gastrointestinálních poruch, které jinak zhoršují absorpci nebo orálně, např. ve formě orálního roztoku.

kde

R₁ znamená vodík, alkyl s 1 až 4 atomy uhlíku nebo fenyl a

R₂ znamená vodík nebo methyl, vyznačující se tím, že se cyklosporin obecného vzorce III

acyluje, čímž se skupina R₁—CO, kde R₁ znamená vodík, alkyl s 1 až 4 atomy uhlíku nebo fenyl, zavede do β-polohy, a je-li to žádoucí, získaný cyklosporin obecného vzorce I, kde X znamená —MeBmt—, se redukuje na odpovídající cyklosporin, kde X znamená —dihydro—MeBmt—.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se cyklosporin obecného vzorce III, kde Y znamená —αAbu— nebo —Nva—, Z znamená —Val— a W znamená zbytek vzorce IV, kde R₂ znamená vodík, acyluje.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se cyklosporin obecného vzorce III, kde Y znamená —αAbu—, Z znamená —Nva— a W znamená zbytek vzorce IV, kde R₂ znamená vodík, acyluje, čímž se skupina R₁—CO, kde R₁ znamená vodík nebo alkyl s 1 až 4 atomy uhlíku, zavede do polohy β.