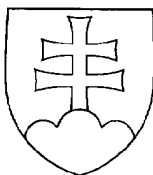


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

- (21) Číslo prihlášky: 3297-91
(22) Dátum podania: 30.10.91
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 9116836, 9023859, 9023972, 9023970, 9023971
(32) Dátum priority: 05.08.91, 02.11.90, 05.11.90, 05.11.90, 05.11.90
(33) Krajina priority: GB, GB, GB, GB, GB
(40) Dátum zverejnenia: 13.05.92
(45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: 04.03.98
(86) Číslo PCT:

(11) Číslo dokumentu:

278 808

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶ :

C 07K 7/64
A 61K 38/00
C 12P 21/04//
(C 12P 21/04,
C 12R 1 : 645)

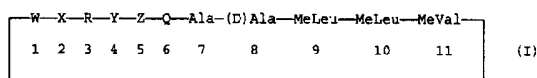
(73) Majiteľ patentu: NOVARTIS AG, Basel, CH;

(72) Pôvodca vynálezu: Ko Soo Young, London, GB;
Kobel Hans, Dr., Basel, CH;
Rosenwirth Brigitte, prof. Dr., Mödling, AT;
Seebach Dieter, prof. Dr., Zürich, DE;
Traber René P., Dr., Basel, CH;
Wenger Roland, Dr., Riehen, CH;
Bollinger Pietro, Dr., Bottmingen, CH;

(54) Názov vynálezu: **Cyklosporíny, ich použitie pri príprave liečiva na liečenie a prevenciu AIDS, spôsob ich prípravy a plesňové kmene použiteľné pri tomto spôsobe**

(57) Anotácia:

Cyklosporíny všeobecného vzorca (I), v ktorom W je MeBmt, dihydro-MeBmt alebo 8'-hydroxy-MeBmt, X je α Abu, Val, Thr, Nva alebo MeOThr, R je Sar alebo (D)-MeAla, Y je MeLeu, τ -hydroxy-MeLeu, Melle, MeVal, MeThr, MeAla, Mealle alebo MeaThr, Z je Val, Leu, MeVal alebo MeLeu, a Q je MeLeu, τ -hydroxy-MeLeu alebo MeAla, s podmienkou, že ak Y je MeLeu, potom buď Z je MeVal alebo MeLeu, alebo W je 8'-hydroxy-MeBmt, sú určené na použitie ako liečivo. Využiteľné sú pri príprave liečiv na liečenie a prevenciu AIDS a ťažkostí spojených s AIDS. Opisuje sa spôsob prípravy týchto cyklosporínov kultiváciou plesňových kmeňov, ktoré sú tiež predmetom ochrany.

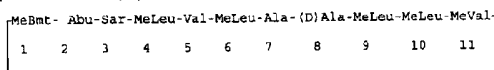


Oblasť techniky

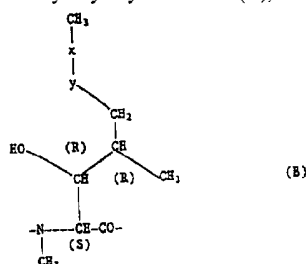
Predložený vynález sa týka nových cyklosporínov, ich použitia ako farmaceutických prostriedkov a farmaceutických prostriedkov obsahujúcich tieto cyklosporíny, spôsobu ich prípravy a plesňových kmeňov používaných pri tomto spôsobe.

Doterajší stav techniky

Cyklosporíny zahŕňajú triedu štruktúrne rozlíšiteľných cyklických poly-N-metylovaných undekapeptidov, ktoré obvykle vykazujú farmakologickú, najmä imunosupresívnu, protizápalovú a/alebo protiparazitickú účinnosť. Prvý z cyklosporínov, ktorý sa izoloval, je v prírode sa vyskytujúci plesňový metabolit Ciclosporin alebo Cyclosporine, známy tiež ako cyklosporín A a ktorý je komerčne dostupný pod ochrannou známkou SANDIMUN^R alebo SANDIMMUNE^R. Cyclosporin je cyklosporín vzorca (A),



kde MeBmt znamená N-metyl-(4R)-4-but-2E-en-1-yl-4-metyl-(L)-treonylový zvyšok vzorca (B),



kde -x-y- je -CH=CH- (trans).

Od tých čias, kedy bol objavený pôvodný Ciclosporin, bola izolovaná a identifikovaná celá škála v prírode sa vyskytujúcich cyklosporínov a mnoho ďalších neprirodných cyklosporínov bolo pripravených totálnou syntézou alebo semi-syntetickými spôsobmi alebo aplikáciou modifikovaných techník kultivácie. Trieda cyklosporínov je už teraz rozsiahla a zahŕňa napríklad v prírode sa vyskytujúce cyklosporíny A až Z (viď Traber a kol.; Helv. Chim. Acta, 60, 1247 až 1255 (1977); Traber a kol.; 2, Helv. Chim. Acta, 65, 1655 až 1667 (1982); Kobel a kol., Europ. J. Applied Microbiology and Biotechnology, 14, 273 až 240 (1982); a von Wartburg a kol., Progress in Allergy, 38, 28 až 45, (1986)), ako i rôzne neprirodné deriváty cyklosporínov a umelé alebo syntetické cyklosporíny, vrátane dihydro-cyklosporínov, (kde časť -x-y- zvyšku MeBmt (vzorec B) je nasýtená, takže -x-y- = -CH2-CH2-); deriváty cyklosporínov (napríklad kde 3'-O-atóm zvyšku MeBmt je acylovaný alebo kde je zavedený ďalší substituent na α-uhlíkový atóm sarkosylového zvyšku v polohe 3); cyklosporíny, kde MeBmt zvyšok je prítomný v izoménej forme (napríklad keď konfigurácia v polohách 6' a 7' MeBmt zvyšku je skôr cis než trans); a cyklosporíny, v ktorých sú v špecifických polohách peptidickej sekvencie zabudované rôzne aminokyseliny, napríklad použitím totálnej syntézy pre prípravu cyklosporínov, ktorú vyvinul R.

Wenger - pozri napríklad Traber a kol. 1, Traber a

kol. 2 a Kobel a kol., ako je citované; US patenty č. 4 108 985, 4 220 641, 4 288 431, 4 554 351, 4 396 542 a 4 798 823, európske patentové prihlášky č.34 567A, 56 782A, 300 784A, 300 785A a 414 632A, medzinárodná patentová prihláška č. WO 86/02080 a anglické patentové prihlášky č. 2 206 119 a 2 207 678, Wenger 1, Transpl. Proc., 15 Suppl. 1:2230 (1983), Wenger 2, Angew. Chem. Int. Ed. 24, 77, (1985) a Wenger 3, Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, 50, 123 (1986).

Trieda cyklosporínov je v súčasnosti skutočne veľmi veľká a zahŕňa napríklad [Thr]²-, [Val]²-, [Nva]²- a [Nva]²-[Nva]⁵-Ciclosporin (známe tiež ako cyklosporíny C, D, C a M), [3-O-acetyl-MeBmt]¹-Ciclosporin (známy tiež ako cyklosporín A acetát), [Dihydro-MeBmt]¹-[Val]²-Ciclosporin (známy tiež ako dihydro-cyklosporín D), [(D)Ser]⁸-Ciclosporin, [Melle]¹¹-Ciclosporin, [(D)MeVal]¹¹-Ciclosporin (známy tiež ako cyklosporín H), [MeAla]⁶-Ciclosporin, [(D)Pro]³-Ciclosporin a pod.

V súlade s konvenčnou nomenklatúrou pre cyklosporíny sú tu v opise a v nárokoch zlúčeniny definované vzhľadom na štruktúru Ciclosporinu (t. j. Cyclosporinu A). Najskôr sa označia tie zvyšky v molekule, ktoré sa líšia od zvyškov prítomných v Ciclosporine a potom sa uvedie výraz "Ciclosporin", ktorý charakterizuje zostávajúce zvyšky, ktoré sú totožné so zvyškami prítomnými v Ciclosporíne. Súčasne sa používa predpona "dihydro" na označenie cyklosporínov, kde zvyšok MeBmt je hydrogenovaný (dihydro-MeBmt), t. j. kde -x-y- vo vzorci (B) je -CH2CH2-. Tak [Thr]²-Ciclosporin je cyklosporín so sekvenciou znázornenou vo vzorci A, ale αAbu v polohe 2 je nahradený Thr a [Dihydro-MeBmt]¹-[Val]²-Ciclosporin je cyklosporín so sekvenciou znázornenou vo vzorci (A), ale zvyšok MeBmt v polohe 1 je hydrogenovaný a αAbu v polohe 2 je nahradený Val.

Ďalej v zvyškoch aminokyselín označených podľa bežnej praxe skratkami, napríklad Ala, MeVal, αAbu atď. sa rozumie, že majú (L)-konfiguráciu, pokiaľ nie je uvedené inak, napríklad ako v prípade "(D)Ala". Skratky zvyškov, pred ktorými je použitý výraz "Me", ako napríklad "MeLeu", znamenajú α-N-metylované zvyšky. Jednotlivé zvyšky cyklosporínovej molekuly sú číslované, ako je obvyklé v smere otáčania hodinových ručičiek, pričom sa vychádza od zvyškov MeBmt alebo dihydro-MeBmt v polohe 1. V opise a v nárokoch sa používajú rovnaké numerické sekvencie.

Teraz je už preukázané, že Ciclosporin rušivo pôsobí na proces aktivácie T buniek blokovaním iniciácie transkripcie IL-2, i keď presný mechanizmus nie je ešte objasnený. Ukazuje sa, že Ciclosporin tvorí komplex s 17 kD cytosolickým proteínom (cyklofilín), ktorý sa vyskytuje v mnohých typoch buniek a ktorý je identický s peptidyl-prolyl-cis-trans-izomerázou, enzýmom uvoľňovaným pri konformácii proteínu. Až doteraz však nie je jasné, či viazanie na cyklofilín je priamo spojené s imunosupresívnou účinnosťou cyklosporínov alebo či viazaný cyklofilín je sám dostatočným kritériom pre imunosupresívnu účinnosť.

Podstata vynálezu

V súčasnosti sa zistilo, že existujú cyklosporíny, ktoré sú pevne viazané na cyklofilín, ale napriek tomu

nepôsobia imunosupresívne. Z toho vyplýva, že viazanie na cyklofilín je nutným, ale nedostatočným kritériom pre imunosupresívnu účinnosť.

Podľa predloženého vynálezu sa získajú cyklosporíny, ktoré sú účinné proti replikácii HIV-1.

Ľudský vírus imunitnej nedostatočnosti (HIV) preferenčne infikuje T-pomocné (T4) lymfocyty, i keď replikuje tiež v rôznych iných typoch buniek, najmä tých, ktoré majú jednobunecný pôvod. Spôsobuje pomaly prebiehajúce ochorenie imunitného systému vyznačené postupnou deštrukciou T4-buniek, nazývané AIDS. Ostatnými imunologickými abnormalitami AIDS sú zvýšenie cytotoxických/supresívnych (T8) lymfocytov, defekt v procese prezentácie/rozoznania antigénu a polyklonálnej aktívácie B- buniek. Mechanizmus deštrukcie T4-buniek nie je ešte stále jasný. Zdá sa, že relatívne málo T4-buniek je infikovaných a tak priamy cytopatogénny účinok spôsobený vírusom nemusí byť iba jediným dôvodom pre vyčerpanie T4-buniek. Existuje hypotéza, že deštrukcia T4-buniek môže byť zosilnená autoimunitným procesom aktivovaným HIV-produkujúcimi bunkami alebo T4-bunkami potiahnutými HIV-proteínom. Táto kontinuálna antigénna stimulácia môže viesť do stavu permanentnej aktívácie T4-buniek, ktoré by zvyšovali HIV-replikácie v týchto bunkách a rozširovali by T-cytotoxické klon. Neinfikované T4-bunky sa môžu stať antigénnymi viazaním exogénneho vírusu gp120 na CD4 molekuly a stať sa tak cieľom T-cytotoxického odozvy.

US patent č. 4 814 323 uvádza, že Ciclosporin vykazuje aktivitu na AIDS a že všeobecne "cyklosporíny známe ako imunosupresory" môžu byť pri tejto indikácii použiteľné. Nie je však žiadny predpoklad, že by neimunosupresívne cyklosporíny vykazovali tieto vlastnosti.

S prekvapením sa teraz zistilo, že cyklosporíny, ktoré sa viažu na cyklofilín, ale nie sú imunosupresívne, vykazujú inhibičný účinok na HIV-1 replikácie.

Cyklosporín sa považuje za viažuci sa na cyklofilín, ak sa viaže na ľudský rekombinovaný cyklofilín aspoň z jednej pätiny rovnako ako Ciclosporin pri kompetitívnom ELISA teste popísanom v práci Quesniaux, Eur. J. Immunol. 1987, 17, 1359 až 1365. V tomto teste testovaný cyklosporín sa pridá počas inkubácie cyklofilínu s potiahnutým BSA-Ciclosporinom a vypočítava sa koncentrácia potrebná na získanie 50 % inhibície kontrolnej reakcie bez kompetitora (IC_{50}). Výsledky sa vyjadrujú ako väzbový pomer (BR), čo je dekadický logaritmus pomeru IC_{50} testovanej zlúčeniny a IC_{50} pri simultánnom teste samotného Ciclosporinu. Tak BR 1,0 indukuje, že testovaná zlúčenina viaže cyklofilín o faktor 10 menej než Ciclosporin a negatívna hodnota ukazuje väzbu silnejšiu než Ciclosporin.

Cyklosporíny aktívne na HIV majú Br nižší než 0,7 (pretože $\log_{10} 5 = 0,7$ približne), výhodne rovnaký alebo nižší než 0.

Cyklosporín sa považuje za neimunosupresívny, ak vykazuje účinok pri zmiešanej lymfocytovej reakcii (MLR) nie väčší ako 5 %, výhodne nie viac ako 2 % účinku Ciclosporinu. Zmiešaná lymfocytová reakcia je opísaná v práci T. Meo, v "Immunological Methods", L. Lefkovits a B. Peris, vyd. Academic Press, N.Y., str. 227 až 239 (1979). Bunky zo sleziny ($0,5 \times 10^6$) Balb/c myši (samice, 8 až 10 týždňov) sa 5 dní spolu inkubujú s $0,5 \times 10^6$ bunkami sleziny CBA myši (samice, 8 až 10 týždňov), ktoré boli vopred ožiarené (2000 rad) alebo ošetrované mitomycínom C. Ožiarené alogénne bunky indukujú množenie Balb/c sleziných buniek, ktoré sa môže merať

označením prekursora inkorporovaného do DNA. Pretože stimulačné bunky sú ožiarené (alebo ošetrované mitomycínom C), nereagujú na Balb/c bunky množením, ale zachovávajú si antigénne vlastnosti.

IC_{50} nájdené pre testovanú zlúčeninu v MLR sa porovnáva s hodnotou nájdenou pre Ciclosporin v paralelnom teste.

Aktivitu cyklosporínov ako inhibítorov HIV-1 replikácie možno preukázať nasledujúcim systémom testov:

1. Inhibícia HIV-1 indukovaného cytopatogénneho efektu v MT4- bunkách.

Použije sa postup opísaný v práci Pauwels a kol., J. Virol. Meth. 20/309 (1988) s malými obmenami. Ako cieľové bunky sa použijú HTLV-I-transformované T4-bunky, MT4, v ktorých bolo vopred preukázané, že sú vysoko permissívne pre HIV-infekcie. Inhibícia HIV-1, kmeňom HTLV-IIIB-indukovaný cytopatogénny účinok sa stanoví meraním životaschopnosti tak HIV-infikovaných, ako aj simulovane infikovaných buniek. Životaschopnosť sa stanoví spektrofotometricky redukciou in situ 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenylyltetrazoliumbromidu (MTT). Vírusom infikované a neinfikované kultúry bez zlúčeniny sa zahrnujú ako kontroly, rovnako ako neinfikované bunky ošetrované zlúčeninou. Koncentrácia buniek sa vyberá tak, že počet buniek na ml sa zvýši o faktor 10 počas 4-dennej inkubácie v simulovane infikovanej kultúre. Očko vírusu sa upraví tak, že spôsobí úhyn buniek v 90 % cieľových buniek po 4-dennej inkubácii. Vírus sa adsorbuje na 10-násobne koncentrovanú suspenziu buniek pri teplote 37 °C v priebehu 1 hodiny. Potom sa infikované bunky zriedia 1 : 10 a pridajú sa do mikrotitračných dosiek obsahujúcich testovanú zlúčeninu.

2. Cytotoxicita

Na stanovenie anti-HIV potenciálu v ďalších bunečných líniiach a najmä v monocyklickej línii (U937) sa najprv určí bunečná toxicita testovanej zlúčeniny na tieto bunečné línie. Jurkat a U937 bunečné suspenzie sa upravujú na 1×10^5 buniek/ml a inkubujú sa v prítomnosti rôznych koncentrácií testovanej zlúčeniny. Po 40 hodinách sa množstvo buniek na ml porovnáva zafarbením s MTT. Cytotoxicita v MTT bunkách sa môže merať rovnakým spôsobom.

3. Inhibícia HIV-1 replikácie v Jurkat a U937 bunkách

T4-bunky línie Jurkat a monocytické bunky línie U937 sa infikujú suspendovaním buniek 10-násobnej koncentrácie do roztoku vírusu. Adsorpcia sa uskutočňuje 2 hodiny pri teplote 37 °C. Bunky sa potom vyzrážajú, očko sa odstráni a bunky sa znovu suspendujú na pôvodnú koncentráciu v čerstvom kultivačnom médiu obsahujúcom testovanú zlúčeninu. Substancia sa tak pridáva po adsorpcii. V dňoch 2, 5, 8, 12, 15 a 19 po infekcii sa odoberú alikvoty infikovanej kultúry. Bunky sa vyhodí a supernatanty sa zberajú. Koncentrácia vírusového antigénu p24 sa v supernatante stanoví použitím komerčného ELISA prostriedku na slúži ako parameter produkcie vírusu. Po každom odobraní alikvoty sa spočítajú bunky a upravujú sa na 2×10^5 buniek/ml pridaním čerstvého média obsahujúceho testovanú zlúčeninu v príslušnej koncentrácii.

Zo zlúčenín podľa predloženého vynálezu, čiže neimunosupresívnych, cyklofilín viažucich cyklosporínov aktívnych na HIV-1 (aktívne zlúčeniny) sú niektoré no-

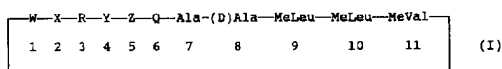
vé a ostatné sú známe; ale anti-HIV aktivita známych aktívnych zlúčenín nebola dosiaľ opísaná a v mnohých prípadoch v známych aktívnych zlúčeninách nebol stanovený žiadny farmaceutický účinok.

Zistilo sa, že mnohé aktívne zlúčeniny majú štruktúry odlišné od Ciclosporinov, špeciálne v polohách 4 a/alebo 5.

Jednou skupinou aktívnych zlúčenín sú cyklosporiny, v ktorých skupina MeLeu v polohe 4 je nahradená rôznymi N-metylovanými aminokyselinami, napríklad τ -hydroxy-MeLeu, Melle, MeVal, MeThr alebo MeAla. Ďalej možno použiť okrem Melle a MeThr tiež alo-formy Mealle a MeaThr. V aloforme má stereochemia v β -polohe opačnú konfiguráciu než prírodná aminokyselina, takže normálna forma a alo-forma tvoria pár diastereoizomérov.

Ďalšou skupinou aktívnych zlúčenín sú zlúčeniny, v ktorých Val v polohe 5 je nahradený N-alkylovanou, výhodne N-metylovanou aminokyselinou. Výhodnými aminokyselinami sú N-alkylované Val alebo Leu. Výhodne je vodík v iminoskupine /Val/⁵ nahradený nerozvetvenou alkylovou skupinou s 1 až 6 atómami uhlíka, výhodne metylovou, etylovou alebo n-propylovou skupinou, najmä metylovou skupinou. Tieto menované aktívne zlúčeniny sú všetky nové.

Navyše alebo alternatívne sa určité aktívne zlúčeniny môžu líšiť od Ciclosporinu v polohách 1, 2, 3 a/alebo 6. Výhodnú skupinu aktívnych zlúčenín tvoria zlúčeniny všeobecného vzorca (I).



kde W je MeBmt, dihydro-MeBmt alebo 8'-hydroxy-MeBmt,

X je α Abu, Val, Thr, Nva alebo O-metyltreonín (MeOThr),

R je Sar alebo (O)-MeAla,

Y je MeLeu, τ -hydroxy-MeLeu, Melle, MeVal, MeThr, MeAla, Mealle alebo MeaThr,

Z je Val, Leu, MeVal alebo MeLeu a

Q je MeLeu, τ -hydroxy-MeLeu alebo MeAla, s podmienkou, že ak Y je MeLeu, potom buď Z je MeVal alebo MeLeu alebo W je 8'-hydroxy-MeBmt.

Skupiny W, X, Y, Z, Q a R môžu mať nezávisle od seba nasledujúce výhodné významy:

W je výhodne W', kde W' je MeBmt alebo dihydro-MeBmt,

X je výhodne X', kde X' je α Abu alebo Nva, výhodnejšie X'', kde X'' je α Abu,

R je výhodne R', kde R' je Sar,

Y je výhodne Y', kde Y' je τ -hydroxy-MeLeu, MeVal, MeThr alebo Melle,

Z je výhodne Z', kde Z' je Val alebo MeVal a

Q je výhodne Q', kde Q' je MeLeu.

Mimoriadne výhodnou skupinou aktívnych zlúčenín sú zlúčeniny všeobecného vzorca (I), kde W je W', X je X', Y je Y', Z je Z', Q je Q' a R je R'.

Najmä výhodné zlúčeniny všeobecného vzorca (I) sú:

- [dihydro-MeBmt]¹-[τ -hydroxy-MeLeu]⁴-Ciclosporin
- [MeVal]⁴-Ciclosporin
- [Melle]⁴-Ciclosporin
- [MeThr]⁴-Ciclosporin
- [τ -hydroxy-MeLeu]⁴-Ciclosporin
- [Nva]²[τ -hydroxy-MeLeu]⁴-Ciclosporin
- [τ -hydroxy-MeLeu]⁴-[τ -hydroxy-MeLeu]⁶-Ciclosporin

h) [MeVal]⁵-Ciclosporin

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

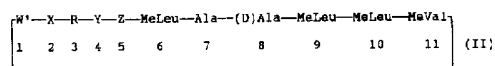
j) [8'-hydroxy-MeBmt]¹-Ciclosporin

Ďalej sú aktívnymi zlúčeninami určité zlúčeniny, ktoré nepatria do rozsahu všeobecného vzorca (I), napríklad

k) [MeAla]⁶-Ciclosporin a

l) [τ -hydroxy-MeLeu]⁹-Ciclosporin.

Podstatou vynálezu sú tiež nové aktívne zlúčeniny všeobecného vzorca (II).



kde W', X, R, Y a Z majú uvedený význam s podmienkou, že

1. keď Y je MeLeu alebo MeAla, potom Z je MeVal alebo MeLeu a

2. keď W' je MeBmt, R je Sar a Y je τ -hydroxy-MeLeu, potom Z je iné než Val.

Výhodnú skupinu nových aktívnych zlúčenín tvoria zlúčeniny všeobecného vzorca (II), kde X je X', Y je Y' a Z je Z', s podmienkou, že ak W' je MeBmt, potom Y' je iné než τ -hydroxy-MeLeu.

Najmä výhodné nové aktívne zlúčeniny sú zlúčeniny a), b), d), f) a h), už uvedené. Niektoré z týchto zlúčenín, napríklad zlúčeniny b) a c), blokujú imunosupresívne pôsobenie Ciclosporinu blokovaním jeho viazania na cyklofilín a tak pôsobia ako antagonisti Ciclosporinu.

Aktívne zlúčeniny možno pripraviť mnohými rôznymi spôsobmi, ktoré možno roztriediť nasledovne:

1. Fermentácia
2. Biotransformácia
3. Derivatizácia
4. Čiastočná syntéza
5. Celková syntéza

1. Určité aktívne zlúčeniny sa pripravujú ako produkty pri fermentácii pôvodných alebo modifikovaných kmeňov organizmov produkujúcich Ciclosporin, ako je *Tolypocladium inflatum* Gams, ako je doložené pri príprave zlúčeniny c) v príklade 1.

2. Ostatné aktívne zlúčeniny, vrátane známych zlúčenín j) a l), sú metabolity Ciclosporinu a možno ich izolovať chromatografickými metódami z moču ľudí a zvierat, ktorí obdržali Ciclosporin. Ďalej možno pri týchto a ostatných transformáciách použiť mikroorganizmy, napríklad pri príprave zlúčenín e) a g) biotransformáciou cyklosporínu A, ako je opísané v príkladoch 2 a 3 alebo pri príprave zlúčeniny f) biotransformáciou cyklosporínu C, ako je opísané v príklade 4. Tieto príklady dokladujú nový spôsob prípravy cyklosporínov s jedným alebo viacerými zvyškami τ -hydroxy-MeLeu zvyškov, ktorý sa vyznačuje tým, že sa kultivuje nový modifikovaný kmeň *Sebekia benihana*, pridá sa cyklosporin, ktorý má jeden alebo viac MeLeu zvyškov a izoluje sa produkt z fermentačného média.

3. Derivatizáciou sa rozumie to, že prírodné alebo syntetické cyklosporíny možno previesť na aktívne zlúčeniny jednou alebo viacerými chemickými reakciami, pri ktorých sa jedna alebo viac aminokyselín modifikuje bez toho, aby došlo k otvoreniu peptidických väzieb a premenia sa. Napríklad triedu aktívnych zlúčenín, kde Val v polohe 5 je N-alkylovaný, možno pripraviť reakciou zodpovedajúceho cyklosporínu obsahujúceho Val v polohe 5 s butyllitiom a potom reakciou s alkylačným činidlom, ako je doložené pre zlúčeninu h) v príklade 5

a pre zlúčeninu i) v príklade 6.

Ďalej možno zlúčeninu a) pripraviť hydrogenáciou zlúčeniny c) (príklad 7) a zlúčeninu j), ktorá je tiež hlavným metabolitom Ciclosporinu, možno pripraviť zo známej zlúčeniny, Ciclosporin-acetátu, ako je opísané v príklade 8.

4. Výrazom čiastočná syntéza sa rozumie séria chemických reakcií, pri ktorých sa kruh prírodného cyklosporínu otvorí, odstráni sa jedna alebo viac aminokyselín, pridajú sa iné aminokyseliny a kruh sa opäť uzavrie.

5. Celkovú syntézu cyklosporínov možno uskutočniť vytvorením lineárneho undekapeptidu a cyklizáciou, ako opísal Wenger (pozri vyššie) a pozri tiež US patenty č. 4 396 542 a 4 789 823. V zásade možno akýkoľvek cyklosporín pripraviť celkovou syntézou, ak je však dostupná jedna z ostatných uvedených metód, je to pre celkovú syntézu omnoho výhodnejšie. Celkovú syntézu možno použiť pre prípravu zlúčeniny d) (príklad 9) a pre známy metabolit zlúčeninu 1.

Zlúčenina k) je známa látka, ktorej vlastnosti boli popísané v práci Quesniaux a kol. (Mol. Immunol. 24, 1159, 1987) a ktorú možno tiež pripraviť celkovou syntézou. Napríklad celková syntéza tejto zlúčeniny je opísaná v US patente č. 4 914 188.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

[Melle]⁴-Ciclosporin (zlúčenina c)

Produkčný kmeň

Zlúčenina c) sa pripraví fermentáciou plesne kmeňa *Tolypocladium inflatum* Cy E 4556, uloženého v "Deutsche Sammlung für Mikroorganismen" za podmienok Budapeštianskej dohody 24. júna 1991 pod číslom DSM 6627. Tento kmeň je mutantom kmeňa NRRL 8044 druhu *Tolypocladium inflatum* Cams a je taxonomicky identický s východiskovým kmeňom, ktorý je dôsledne opísaný napríklad v anglickom patente 1 491 509.

Kultúra 1. Východisková kultúra na agare

Šikmé agarové kultúry kmeňa DSM 6627 sa nechajú rásť 14 dní pri teplote 27 °C na živnom médiu nasledujúceho zloženia:

extrakt z kvasníc (Cistex)	4 g
sladový extrakt (Wander)	20 g
agar	20 g
demineralizovaná voda do	1000 ml

Toto médium má pH 5,4 až 5,6 a sterilizuje sa 20 minút pri teplote 120 °C.

2. Prekultúra

Spóry mycélia 4 východiskových kultúr sa suspendujú v 40 ml 0,9 % roztoku soli. Vždy 20 ml tejto suspenzie sa inokuluje rad 500 ml Erlenmeyerových baniek vždy s obsahom 100 ml média pre prekultúru. Zloženie média pre prekultúru je nasledujúce:

kazein (Amber EHC)	25 g
maltóza	75 g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCl	2,5 g
demineralizovaná voda do	1000 ml

Toto médium sa upraví na pH 5,2 až 5,5 pomocou HCl a potom sa 20 minút sterilizuje pri teplote 120 °C. Prekultúry sa fermentujú 24 hodín pri teplote 27 °C na rotačnej trepačke pri 200 otáčkach za minútu s excentri-

citou 50 mm.

3. Medzikultúra

25-litrový oceľový fermentor s 20 litrami média pre prekultúru sa inokuluje 200 ml prekultúry. Medzikultúra sa fermentuje 5 dní pri teplote 27 °C pri miešaní 150 otáčok za minútu a prevzdušňovaní prietokom vzduchu 0,5 l/min. na liter a pri tlaku 0,05 MPa.

4. Hlavná kultúra

100 litrov média pre prekultúru sa inokuluje 10 litrami medzikultúry a fermentuje sa v 120-litrovom oceľovom fermentore. K tomuto médiu sa pridá 4 g/l O-Treonínu, sterilizovaného filtráciou. Fermentácia sa uskutočňuje 14 dní pri teplote 27 °C pri miešaní rýchlosťou 70 otáčok za minútu a prevzdušňovaní prietokom vzduchu 0,4 l/min. na liter média a pri tlaku 0,05 MPa prvých 5 dní, a počas zvyšného času fermentácie sa rýchlosť miešania zvýši na 100 otáčok za minútu a prevzdušňuje sa prietokom 0,5 l/min.

Izolácia

Mycélium sa oddelí od média kultúry a extrahuje sa rozmelením a miešaním trikrát 10 litrami zmesi metanolu a vody (9:1 objemovo). Rozmelené mycélium sa oddelí od rozpúšťadla vákuovou filtráciou a spojené filtráty sa zahustia odparením pri zníženom tlaku a teplote 40 °C, kým pary nepozostávajú prevažne zo samotnej vody. Získaná zmes sa extrahuje štyrikrát pri použití vždy 2 litrov 1,2-dichlóretánu a spojené 1,2-dichlóretánové roztoky sa zahustia odparením pri zníženom tlaku a teplote 40 °C.

Zvyšok sa chromatografuje na kolóne silikagélú (10 kg silikagélú, veľkosť granulátu 0,02 až 0,045 mm, "Grace") s použitím zmesi etylacetátu a vody ako elučného činidla (frakcia 2,5 l). Frakcie 20 až 23, obsahujúca [Melle]⁴-Ciclosporin, sa spoja a potom sa ďalej chromatograficky rozdelia použitím kolóny silikagélú (600 g silikagélú, veľkosť granulátu 0,04 až 0,63 mm, "Merck") a použitím zmesi chloroformu a metanolu (98 : 2 objemovo) ako elučného činidla (frakcia 300 ml). Ďalšie čistenie sa uskutočňuje chromatograficky na kolóne silikagélú (400 g silikagélú, veľkosť granulátu 0,04 až 0,063 mm, "Merck") pri použití zmesi metylénchloridu a metanolu (90 : 2 objemovo) ako elučného činidla (frakcia 200 ml) a získa sa čistý [Melle]⁴-Ciclosporin vo forme bieleho amorfného prášku, teplota topenia 155 - 150 °C, $[\alpha]_D^{20} = -235^\circ$ c = 0,68 v CHCl₃) a - 193° (c = 0,74 v CH₃OH).

IČ spektrum v CH₂Cl₂ je znázornené na obr. 1, kde T znamená % transmisie a A znamená % absorpcie a protónové NMR spektrum v COCl₂ je znázornené na obr. 2.

Príklad 2

[τ -Hydroxy-MeLeu]⁴-Ciclosporin (zlúčenina e)

Zlúčenina e) sa získa biotransformáciou Ciclosporinu pomocou mikroorganizmov *Sebekia benihana*. Originálny kmeň je označený ako NRRL 11111 a patrí k druhu *Sebekia benihana* (Dietz a kol.: *Sebekia*, nový rod čeľade Actinoplanaceae. Abstrakta 82. Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol., 163, Atlanta 1982). Tento kmeň je schopný hydroxylovať novobiocín. Subkultúrny kmeň, ktorý sa používa na prípravu zlúčeniny e) a príbuzných zlúčenín, je uložený "German Collection of Microorganisms" (D-3300 Braunschweig) pod číslom DSM 6182.

1. Východisková kultúra na agare

Šikmé agarové kultúry kmeňa DSM 6182 sa nechajú 10 dní rásť pri teplote 27 °C na agarovom živnom médiu nasledujúceho zloženia:

glukóza	10 g
škrob (rozpuštný)	20 g
extrakt z kvasníc (Cistex)	5 g
pepton (N-Z-Amine typ A, Sheffield)	5 g
CaCO ₃	1 g
agar (Bacto)	10 g
demineralizovaná voda do	1 l

pH: neutralizácia na pH 7 pomocou NaOH/H₂SO₄
sterilizácia: 20 minút pri teplote 120 °C

2. Prekultúra

Spóry a mycélium jednej východiskovej kultúry sa suspendujú v 10 ml 0,9 % roztoku soli. Vždy 5 ml tejto súспенzie sa inokuluje rad 200 ml Erlenmeyerových baniek vždy s 50 ml média pre prekultúru. Zloženie média pre prekultúru je nasledujúce:

glukóza	7 g
škrob (rozpuštný)	10 g
extrakt z kvasníc (Cistex)	4,5 g
sladový extrakt (kvapalný, Wander)	10 g
pepton (N-Z-Amine typ A, Sheffield)	2,5 g
CaCO ₃	1 g
roztok stopových prvkov č. 235	1 ml
demineralizovaná voda do	1 litera

pH: neutralizácia na pH 7 pomocou NaOH/H₂SO₄
sterilizácia: 20 minút pri teplote 120 °C

Roztok stopových prvkov č. 235:

H ₃ BO ₃	0,1 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 g
KI	0,05 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,2 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	2 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4 g
demineralizovaná voda do	999 ml
H ₂ SO ₄ (97 %)	1 ml

Prekultúry sa fermentujú 4 dni pri teplote 27 °C na rotačnej trepačke pri 200 otáčkach za minútu s excentricitou 50 mm.

3. Medzikultúra

Rad 200 ml Erlenmeyerových baniek každá s 50 ml média pre prekultúru sa inokuluje vždy 5 ml prekultúry. Medzikultúra sa fermentuje 3 dni pri teplote 27 °C na rotačnej trepačke pri 200 otáčkach za minútu s excentricitou 50 mm.

4. Hlavná kultúra

Rad 500 ml Erlenmeyerových baniek vždy s 50 ml hlavného média (celkovo 12 litrov) sa inokuluje vždy 5 ml medzikultúry. Tieto kultúry sa fermentujú 3 dni pri teplote 27 °C na rotačnej trepačke pri 200 otáčkach za minútu s excentricitou 50 mm. Po 24 hodinách sa pridá ku každej hlavnej kultúre (=150 mg/l) cyklosporín A (7,5 mg) solubilizovaný v metanole.

Zloženie média hlavnej kultúry je nasledujúce:

cerelóza	10 g
dextrín	10 g
škrob (rozpuštný)	10 g
extrakt z kvasníc (Cistex)	2,5 g

sójová múka (Nurupan, Edelsója)	12,5 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,12 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,10 g
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0,05 g
roztok stopových prvkov AC-1	1 ml
demineralizovaná voda do	1 litera

pH: upravené na 7,2 až 7,5 (KOH/H₂SO₄)
sterilizácia: 20 minút pri teplote 120 °C

Roztok stopových prvkov AC-1:

Tento roztok má rovnaké zloženie ako roztok č. 235, ibaže sa do neho pridá 0,2 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄.

15

5. Izolácia

Mycélium sa oddelí od média kultúry a vzniknutý filtrát kultúry (13 l) sa extrahuje trikrát 1,2-dichlóretánom s použitím 1,5 l pre každú extrakciu. Spojené 1,2-dichlóretánové roztoky sa odparia pri zníženom tlaku pri teplote 40 °C. Surový zvyšok sa podrobí gélovej filtrácii na Sephadex LH-20 s použitím metanolu ako elučného činidla. Tie frakcie, ktoré obsahujú cyklosporínové zlúčeniny (525 mg), sa spoja a chromatografujú sa na silikagéle (50 g, veľkosť granulátu 0,04 až 0,063 mm, "Merck") s použitím zmesi chloroformu a metanolu ako elučného činidla. Opakovanou chromatografiou s použitím rovnakého systému sa získa čistý [τ-hydroxy-MeLeu]⁴-Ciclosporin vo forme bieleho amorfného prášku s teplotou topenia 150 až 153 °C, [α]_D²⁰ = -225° (c = 0,53 v CHCl₃), -171° (c = 0,44 v CH₃OH).

Príklad 3

[τ-hydroxy-MeLeu]⁴-[τ-hydroxy-MeLeu]⁶-Ciclosporin (zlúčenina g)

Viac polárne vedľajšie frakcie vznikajúce pri čistení [τ-hydroxy-MeLeu]⁴-Ciclosporinu sa ďalej oddelia opakovanou chromatografiou na kolóne silikagélu (veľkosť granulátu 0,04 až 0,063 mm) s použitím zmesi octanu a hexánu 2 : 1 ako elučného činidla a ďalšou chromatografiou na silikagéle s použitím zmesi metyl-terc-butyléru, metanolu a vody 90 : 9 : 1 ako elučného činidla. Prvá frakcia obsahuje [τ-hydroxy-Leu]⁴-Ciclosporin, ktorý sa ďalej čistí odfarbením aktívnym uhlím, čím sa získa čistá zlúčenina vo forme bieleho amorfného prášku, s teplotou topenia 162 až 164 °C, [α]_D²⁰ = -211° (c = 0,50 v CHCl₃), -157° (c = 0,52 v CH₃OH).

Neskoršie frakcie z chromatografie na kolóne silikagélu obsahujú [τ-hydroxy-MeLeu]⁴-[τ-hydroxy-MeLeu]⁶-Ciclosporin a ten sa ďalej čistí odfarbením aktívnym uhlím, pričom sa získa čistá zlúčenina uvedená v názve vo forme bieleho amorfného prášku s teplotou topenia 157 až 160 °C, [α]_D²⁰ = -217° (c = 0,54 v CHCl₃), -176° (c = 0,42 v CH₃OH).

Príklad 4

[Nva]²-[τ-hydroxy-MeLeu]⁴-Ciclosporin (zlúčenina f)

Zlúčenina uvedená v názve sa pripraví analogicky ako pri príprave zlúčeniny c) ([τ-hydroxy-MeLeu]⁴-Ciclosporin), ale s použitím cyklosporínu C ([Nva]²-Ciclosporin) ako východiskovej zlúčeniny. Po čistení opakovanou chromatografiou na kolóne silikagélu s použitím etylacetátu nasýteného vodou a zmesou acetónu a

hexánu 2 : 1 ako elučných činidiel sa získa zlúčenina uvedená v názve vo forme bieleho amorfného prášku s teplotou topenia 138 až 141 °C [α]_D²⁰ = -213° (c = 0,69 v CHCl₃), -168° (c = 0,70 v CH₃OH).

Príklad 5

[MeVal]⁵-Ciclosporin (zlúčenina h)

Cyklosporin A (0,60 g, 0,5 mmol) sa rozpustí v tetrahydrofuráne (20 ml) a inkubuje sa s 0,63 ml 1,6 M roztoku butyllítia (1,0 mmol) v hexáne. Vzniknutý roztok sa nechá reagovať s dimetylsulfátom (0,1 ml, 1,5 mmol) pri teplote -78 °C. Reakčná zmes sa nechá pomaly zahriať na izbovú teplotu a mieša sa cez noc.

Izoláciou rýchlou chromatografiou (SiO₂, 5 % zmes metanolu a éteru) a potom vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou (reverzná fáza) sa získa produkt uvedený v názve. Zlúčenina je charakterizovaná ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) spektrom, ktoré je znázornené na obr. 3.

Príklad 6

[MeThr]²-[(D)MeAla]³-[MeVal]⁵-Ciclosporin (zlúčenina i)

Zmes 480 ml tetrahydrofuránu (absolútneho) a 6,96 g (49,2 mmol) diizopropylamínu sa ochladí na -80 °C a pomaly sa nálevkou pridáva 33,5 ml 1,33 M roztoku butyllítia v hexáne (44,5 mmol). Zmes sa mieša 30 minút pri teplote -80 °C a potom sa počas 2 až 3 minút pridá nálevkou roztok 8 g (6,6 mmol) cyklosporínu C ([Thr]²-Ciclosporin) v 120 ml absolútneho tetrahydrofuránu. Čierny roztok sa mieša ďalšiu hodinu pri teplote -80 °C a potom sa pomaly pridá 2,06 ml metyljodidu.

Zmes sa nechá zahriať na izbovú teplotu počas 2 hodín, potom sa pridá 40 ml vody a rozpúšťadla, odparia sa na rotačnom odparovaku pri teplote 30 °C a pri tlaku 2,0 kPa. Zvyšok sa rozdelí medzi vodu a éter a éterová vrstva sa premyje štyrikrát polonasyteným roztokom chloridu sodného, vysuší sa síranom horečnatým a odparí. Získa sa zvyšok s hmotnosťou 8,1 g.

Tento zvyšok sa chromatografuje na 1200 g silikagélú a eluuje sa vodou nasýteným etylacetátom, pričom sa získa surový produkt, ktorý sa čistí ďalšou chromatografiou na 200 g silikagélú a eluuje sa 5 % MeOH/CH₂Cl₂, pričom sa získa čistá zlúčenina uvedená v názve, [α]_D²⁰ = -195° (c = 1,0 v CHCl₃).

Príklad 7

[Dihydro-MeBmt]¹-[τ -hydroxy-MeLeu]⁴-Ciclosporin (zlúčenina e)

K suspenzii 200 mg vopred hydrogenovaného 10 % paládia na uhlí v 4 ml etanolu sa pridá 1,2 g [τ -hydroxy-MeLeu]⁴-Ciclosporinu (zlúčenina e) v 10 ml etanolu a hydrogenácia sa uskutočňuje pri izbovej teplote tak dlho, kým sa nespotrebuje žiadny vodík. Po odstránení katalyzátora filtráciou sa roztok odparí, pričom sa získa zlúčenina uvedená v názve vo forme bieleho amorfného prášku s teplotou topenia 154 až 156 °C, [α]_D²⁰ = -225° (c = 0,87 v CHCl₃), -169° (c = 0,70 v CH₃OH).

Príklad 8

[8'-Hydroxy-MeBmt]¹-Ciclosporin (zlúčenina j)

1. [O-acetyl- ω -bróm-Bmt]¹-Ciclosporin:

Zmes 25,0 g (20 mmol) [O-acetyl-MeBmt]¹-Ciclosporinu (Tabor a kol. Helv. Chim. Acta, 1982, 65 1653), 4,4 g (25 mmol) N-brómsukcínimidu a 400 mg azobisisobutyronitrilu v 250 ml chloridu uhličitého sa zo-

hrieva do varu 2,5 hodiny. Rozpúšťadlo sa odparí a nahradí sa éterom, pevné podiely sa odfiltrujú sa premyjú vodou, vysuší sa síranom horečnatým a odparia sa do sucha. Zvyšok sa chromatografuje na silikagélú za elúcie zmesi etyléteru a etylacetátu (4 : 1) a získa sa 10,7 g (40 %) amorfného produktu, ktorý sa prekryštalizuje zo zmesi éteru a hexánu a získa sa 8,4 g čistej látky s teplotou topenia 207 až 209 °C. Neskoršie frakcie chromatogramu obsahujú ďalších 11,2 g produktu o niečo menšej kvality.

2. [O-acetyl- ω -acetoxy-MeBmt]¹-Ciclosporin:

Zmes 4,31 g (3,3 mmol) produktu zo stupňa 1 (znečisteného podľa výpočtu 15 až 20 % východiskovou látkou) a 2,1 g (8 mmol) tetraetylamóniumacetátu-tetrahydrátu v 30 ml metyletylketónu obsahujúceho katalytické množstvo jodidu sodného, sa zahrieva 3 hodiny na olejovom kúpeli na teplotu 105 °C a potom sa udržiava pri izbovej teplote cez víkend. Zmes sa zriedi metylterc.butyléterom a premyje sa vodou a roztokom chloridu sodného. Organická vrstva sa vysuší síranom horečnatým a odparením sa získa 4,0 g surového produktu, ktorý sa čistí na kolóně s reverznou fázou RP-18 (240 g) a získa sa 3,07 g zlúčeniny uvedenej v názve s teplotou topenia 191 až 192 °C.

3. [ω -hydroxy-MeBmt]¹-Ciclosporin:

Roztok 1,72 g (1,3 mmol) produktu zo stupňa 2 v 75 ml metanolu a roztok 1,2 g sodíka v 50 ml metanolu sa spolu zmieša a zmes sa udržiava 2,5 hodiny pri izbovej teplote. Potom sa roztok okyslí kyselinou octovou. Rozpúšťadlo sa odparí pri zníženom tlaku a zvyšok sa rozpustí v metylterc.butylétere, premyje sa postupne vodou, roztokom chloridu sodného a roztokom hydrogenuhlíčanu sodného, vysuší sa síranom horečnatým a odparí. Surový produkt (1,6 g) sa eluuje z kolóny RP-18 (240 g) zmesou metanolu a vody (75 : 15) a získa sa 1,5 g čistého produktu. Vzorka sa prekryštalizuje zo zmesi éteru a hexánu a získa sa kryštalický produkt s teplotou topenia 181 až 183 °C.

Príklad 9

[MeThr]⁴-Ciclosporin (zlúčenina d)

Celková syntéza Ciclosporinu, ako je opísaná v US patentoch č. 4 396 542 a 4 7698 823, sa uskutočňuje s použitím zlúčeniny obsahujúcej v polohe 4 MeThr namiesto MeLeu. Produkt má [α]_D²⁰ = -249,6° (c = 1,0 v CHCl₃).

Príklad 10

[MeVal]⁴-Ciclosporin (zlúčenina b)

Celková syntéza Ciclosporinu, ako je opísaná v US patentoch č. 4 396 542 a 4 798 823, sa uskutočňuje s použitím zlúčeniny obsahujúcej v polohe 4 MeVal namiesto MeLeu. Produkt má [α]_D²⁰ = -226° (c = 0,350 v CHCl₃).

Príklad 11

Imunosupresívna účinnosť viazania aktívnych zlúčenín na cyklofilín, vzťahnuté na Ciclosporin

Tabuľka I uvádza v stĺpci (1) príklady väzbových pomerov (BR) aktívnych zlúčenín na cyklofilín, vzťahnuté na Ciclosporin, ako bolo merané ELISA testom, a v stĺpci (2) imunosupresívna účinnosť aktívnych zlúčenín, vzťahnuté na Ciclosporin, ako bolo merané MLR testom a ako je vyjadrené ako percento účinnosti, vzťahnuté na

Ciclosporin, (imunosupresívny pomer označený ako IR).
Ďalšie vysvetlenie týchto významov a metodiky uskutočnenia týchto testov bolo už vysvetlené.

Tabuľka I

Zlúčenina	BR(log ₁₀)	IR (%)
a) [dihydro-MeBst] ¹ -[r-hydroxy-MeLeu] ² -Ciclosporin	0,1	<1
b) [MeVal] ³ -Ciclosporin	0,1	<1
c) [MeIle] ⁴ -Ciclosporin	-0,2	<1
e) [r-hydroxy-MeLeu] ⁵ -Ciclosporin	-0,3	<1
f) [Nva] ⁶ -[r-hydroxy-MeLeu] ⁷ -Ciclosporin	0,4	<1
h) [MeVal] ⁸ -Ciclosporin	0,4	5,3
j) [8'-hydroxy-MeBst] ⁹ -Ciclosporin	0,35	1,8
k) [MeAla] ¹⁰ -Ciclosporin	-0,4	3,2
l) [r-hydroxy-MeLeu] ¹¹ -Ciclosporin	0,15	2,9

Príklad 12

Anti-HIV účinnosť a cytotoxicita aktívnych zlúčenín

Príklady účinnosti aktívnych zlúčenín a Ciclosporinu ako inhibítora HIV-1 replikácie v MT4-bunkách a cytotoxicita aktívnych zlúčenín a Ciclosporinu v MT4-bunkách sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke I. Významy týchto hodnôt a príslušné metodiky boli už diskutované.

Tabuľka II

Zlúčenina	Cytotoxicita (μg/ml)	anti-HIV (IC ₅₀)
a) [dihydro-MeBst] ¹ -[r-hydroxy-MeLeu] ² -Ciclosporin	16,3	0,12
b) [MeVal] ³ -Ciclosporin	5,4	0,064
c) [MeIle] ⁴ -Ciclosporin	4,5	0,056
e) [r-hydroxy-MeLeu] ⁵ -Ciclosporin	15,5	0,34
f) [Nva] ⁶ -[r-hydroxy-MeLeu] ⁷ -Ciclosporin	14,1	0,85
h) [MeVal] ⁸ -Ciclosporin	4,4	0,45
i) [MeThr] ⁹ -[(D)MeAla] ¹⁰ -[MeVal] ¹¹ -Ciclosporin	>10	0,45
j) [8'-hydroxy-MeBst] ¹² -Ciclosporin	10,6	0,56
k) [MeAla] ¹³ -Ciclosporin	5,2	1,34
l) [r-hydroxy-MeLeu] ¹⁴ -Ciclosporin	>10	0,31
Ciclosporin	8,45	0,53

Aktívne zlúčeniny sú indikované tak pre prevenciu AIDS u asymptomatických HIV-pozitívnych pacientov, ako aj ošetrovaní pacientov podozrelých z AIDS. U pacientov, u ktorých sa prejavilo AIDS, by malo podávanie aktívnej zlúčeniny zvrátiť úbytok T4-buniek spojený s AIDS, vyvolať pokles ťažkostí súvisiacich s AIDS, ako je Kaposiho sarkóm, a znížiť pravdepodobnosť možnosti nových infekcií.

Predložený vynález sa tiež týka spôsobu ošetrovania a prevencie syndrómu získanej imunitnej nedostatočnosti a ostatných ťažkostí vyvolaných vírusom HIV-1 u pacientov infikovaných týmto vírusom, pričom tento spôsob spočíva v podávaní účinného množstva aktívnej zlúčeniny týmto pacientom.

Aktívne zlúčeniny možno podávať obvyklými spôsobmi, najmä enterálne, napríklad orálne, napríklad vo forme roztoku na pitie, tablet alebo kapslí, alebo parenterálne, napríklad vo forme injikovateľných roztokov alebo suspenzií. Pri intravenóznom podávaní sa určená denná dávka môže pohybovať od 1 do 20 mg/kg, výhodne od 3 do 10 mg/kg, a pri orálnom podávaní od 1 do 50 mg/kg,

výhodne od 7 do 20 mg/kg.

Predpokladá sa, že toxicita aktívnych zlúčenín je podobná ako toxicita Ciclosporinu. Pretože aktívne zlúčeniny nie sú imunosupresívne, nevyvolávajú určité vedľajšie účinky, ktoré spôsobí Ciclosporin vzhľadom na imunosupresivitu. Aktívne zlúčeniny však môžu spôsobiť ostatné vedľajšie účinky ako Ciclosporin, najmä neurotoxicitu pri dlhodobom používaní.

Výhodné liečivé prípravky s aktívnymi zlúčeninami sú mikroemulzie, ako sú opísané v anglickej patentovej prihláške 2 222 770A, ktoré zahŕňujú tak topické, ako i orálne formy a ďalej orálne a injikovateľné formy získané z tuhých roztokov obsahujúcich monoester mastnej kyseliny so sacharidom, napríklad monolaurát sacharózy, ako je opísané v anglickej patentovej prihláške 2 209 671A. Vhodná jednotková dávka pre orálne aplikácie je napríklad od 25 do 200 mg aktívnej zlúčeniny na dávku.

Príklad prípravku A:

20	produkt podľa príkladu 1	50,0 mg
	Glycofurol 75	180,0 mg
	Miglyol 812	90,0 mg
	Cremophor RH40	180,0 mg
	α-tokoferol	0,5 mg

25

Príklad prípravku B:

20	produkt podľa príkladu 1	100,0 mg
	tetraglykol	20,0 mg
	Captex 800	20,0 mg
30	Nikkol HCO-40	860,0 mg
	butylhydroxytoluén (BHT)	1,0 mg

35

Príklad prípravku C:

35	produkt podľa príkladu 1	25,0 mg
	Glycofurol 75	100,0 mg
	Miglyol 812	35,0 mg
	Cremophor RH 40	90,0 mg
	butylhydroxyanizol (BHA)	0,2 mg

40

Príklad prípravku D:

40	produkt podľa príkladu 1	10,0 mg
	tetraglykol	10,0 mg
	myritol	5,0 mg
45	Cremophor RH 40	75,0 mg
	α-tokoferol	0,1 mg

50

Jednotlivé zložky týchto prípravkov, ako i spôsoby ich prípravy sú opísané v anglickej patentovej prihláške č. 2 222 770, ktorá je tu uvedená ako odkaz.

50

Priemyselná využiteľnosť

Zlúčeniny opísané v predloženom vynáleze možno použiť na liečenie a prevenciu syndrómu získanej imunitnej nedostatočnosti a ostatných ťažkostí vyvolaných vírusom HIV-1 u pacientov infikovaných týmto vírusom.

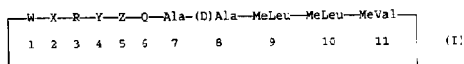
55

PATENTOVÉ NÁROKY

60

1. Cyclosporín všeobecného vzorca (I),

65



kde W je MeBmt, dihydro-MeBmt alebo 8'-hydroxy-MeBmt,

X je α Abu, Val, Thr, Nva alebo MeOThr,

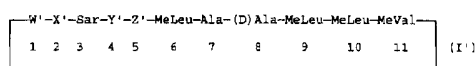
R je Sar alebo (D)-MeAla,

Y je MeLeu, τ -hydroxy-MeLeu, Melle, MeVal, MeThr, MeAla, Mealle alebo MeaThr,

Z je Val, Leu, MeVal alebo MeLeu, a

Q je MeLeu, τ -hydroxy-MeLeu alebo MeAla, s podmienkou, že ak Y je MeLeu, potom buď Z je MeVal alebo MeLeu alebo W je 8'-hydroxy-MeBmt, na použitie ako liečivo.

2. Cyklosporín podľa nároku 1 všeobecného vzorca (I),



kde W' je MeBmt alebo dihydro-MeBmt,

X' je α Abu alebo Nva,

Y' je τ -hydroxy-MeLeu, MeVal, MeThr alebo Melle,

Z' je Val alebo MeVal,

na použitie ako liečivo.

3. Cyklosporín podľa nároku 1, vybraný zo skupiny zahrnujúcej:

[dihydro-MeBmt]¹-[τ -hydroxy-MeLeu]⁴-Ciclosporin

[MeVal]⁴-Ciclosporin

[Melle]⁴-Ciclosporin

[MeThr]⁴-Ciclosporin

[τ -hydroxy-MeLeu]⁴-Ciclosporin

[Nva]²-[τ -hydroxy-MeLeu]⁴-Ciclosporin

[τ -hydroxy-MeLeu]⁴-[τ -hydroxy-MeLeu]⁶-Ciclosporin

[MeVal]⁵-Ciclosporin

[MeOThr]²-[(D)MeAla]³-[MeVal]⁵-Ciclosporin

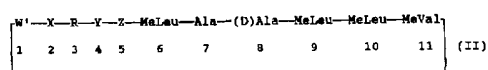
[8'-hydroxy-MeBmt]¹-Ciclosporin a

[τ -hydroxy-MeLeu]⁹-Ciclosporin,

na použitie ako liečivo.

4. Použitie cyklosporínu podľa nárokov 1, 2 alebo 3 pri príprave liečiva na liečenie a prevenciu AIDS a ťažkostí spojených s AIDS.

5. Cyklosporín všeobecného vzorca (II) podľa nároku 1,



kde W' je MeBmt alebo dihydro-MeBmt,

X je α Abu, Val, Thr, Nva alebo MeOThr,

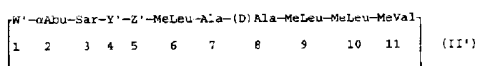
R je Sar alebo (D)-MeAla,

Y je MeLeu, τ -hydroxy-MeLeu, Melle, MeVal, MeThr, MeAla, Mealle alebo MeaThr a

Z je Val, Leu, MeVal alebo MeLeu,

s podmienkou, že 1) ak Y je MeLeu alebo MeAla, potom Z je MeVal alebo MeLeu, a 2) keď W' je MeBmt, R je Sar a Y je τ -hydroxy-MeLeu, potom Z je iné ako Val.

6. Cyklosporín podľa nároku 5 všeobecného vzorca (II),



kde W' je MeBmt alebo dihydro-MeBmt,

Y' je τ -hydroxy-MeLeu, MeVal, MeThr alebo Melle, a

Z' je Val alebo MeVal,

s podmienkou, že ak W' je MeBmt, Y' je iné ako τ -hydroxy-MeLeu.

7. Cyklosporín podľa nároku 6 vybraný zo skupiny zahrnujúcej:

[dihydro-MeBmt]¹-[τ -hydroxy-MeLeu]⁴-Ciclosporin

[MeVal]⁴-Ciclosporin

[Melle]⁴-Ciclosporin

[MeThr]⁴-Ciclosporin

[Nva]²-[τ -hydroxy-MeLeu]⁴-Ciclosporin

[τ -hydroxy-MeLeu]⁴-[τ -hydroxy-MeLeu]⁶-Ciclosporin

[MeVal]⁵-Ciclosporin a

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

8. Cyklosporín podľa nároku 7, ktorým je [Melle]⁴-Ciclosporin.

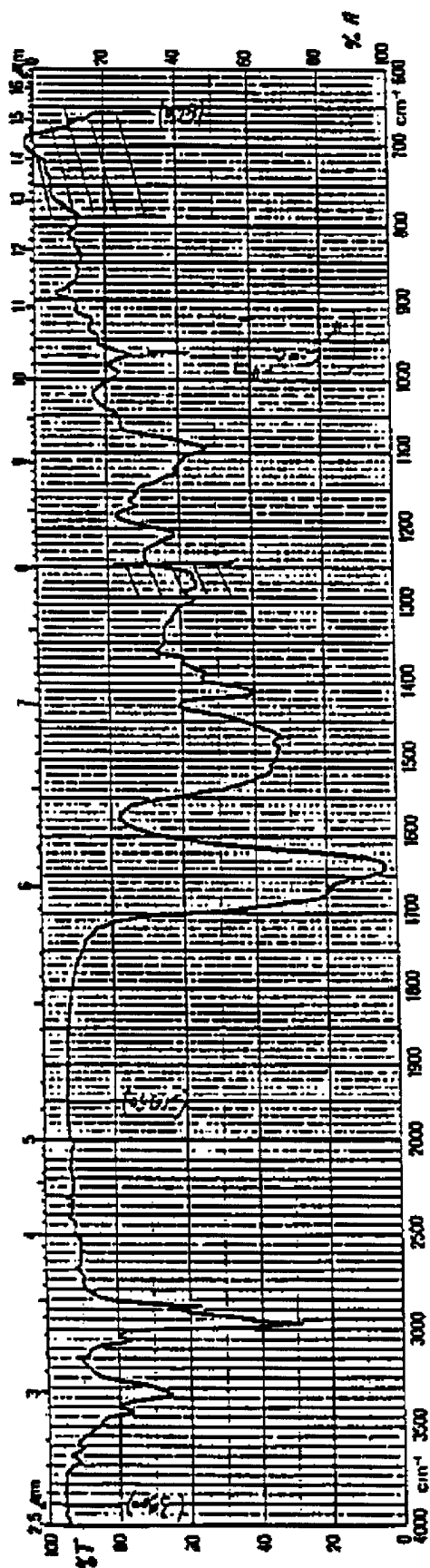
9. Spôsob prípravy [Melle]⁴-Ciclosporinu podľa nárokov 1, 2, 3 a 5 až 8, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa kultivuje plesňový kmeň DSM 6627 v živnom médiu a produkt sa izoluje z fermentačnej živnej pôdy.

10. Čistá kultúra plesňového kmeňa DSM 6627.

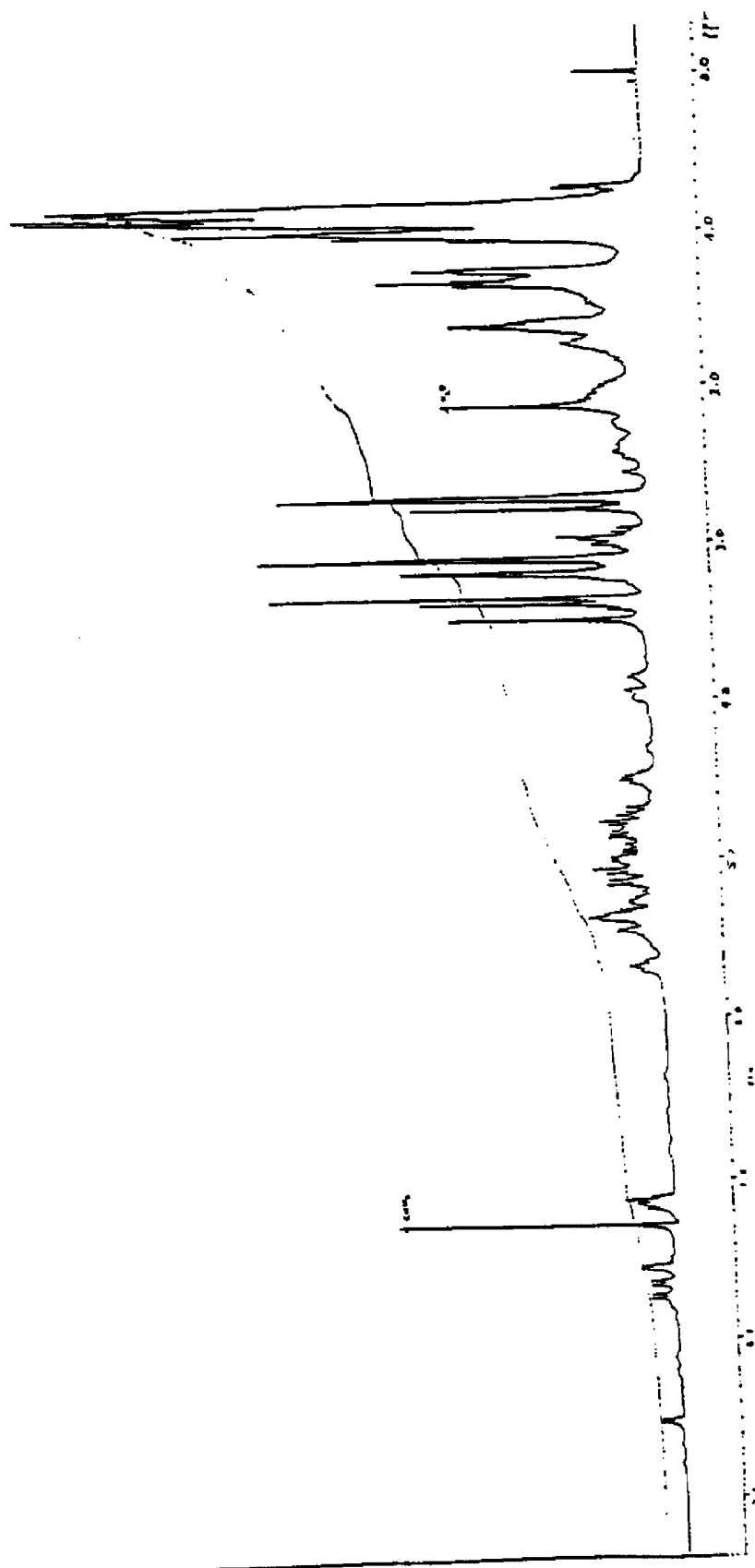
11. Spôsob prípravy cyklosporínov obsahujúcich jeden alebo viac τ -hydroxy-MeLeu zvyškov podľa nárokov 1, 2, 3 a 5 až 8, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa kultivuje plesňový kmeň DSM 6182 v živnom médiu, pridá sa cyklosporín obsahujúci jeden alebo viac MeLeu zvyškov a z fermentačnej živnej pôdy sa izoluje produkt.

12. Čistá kultúra plesňového kmeňa DSM 6182.

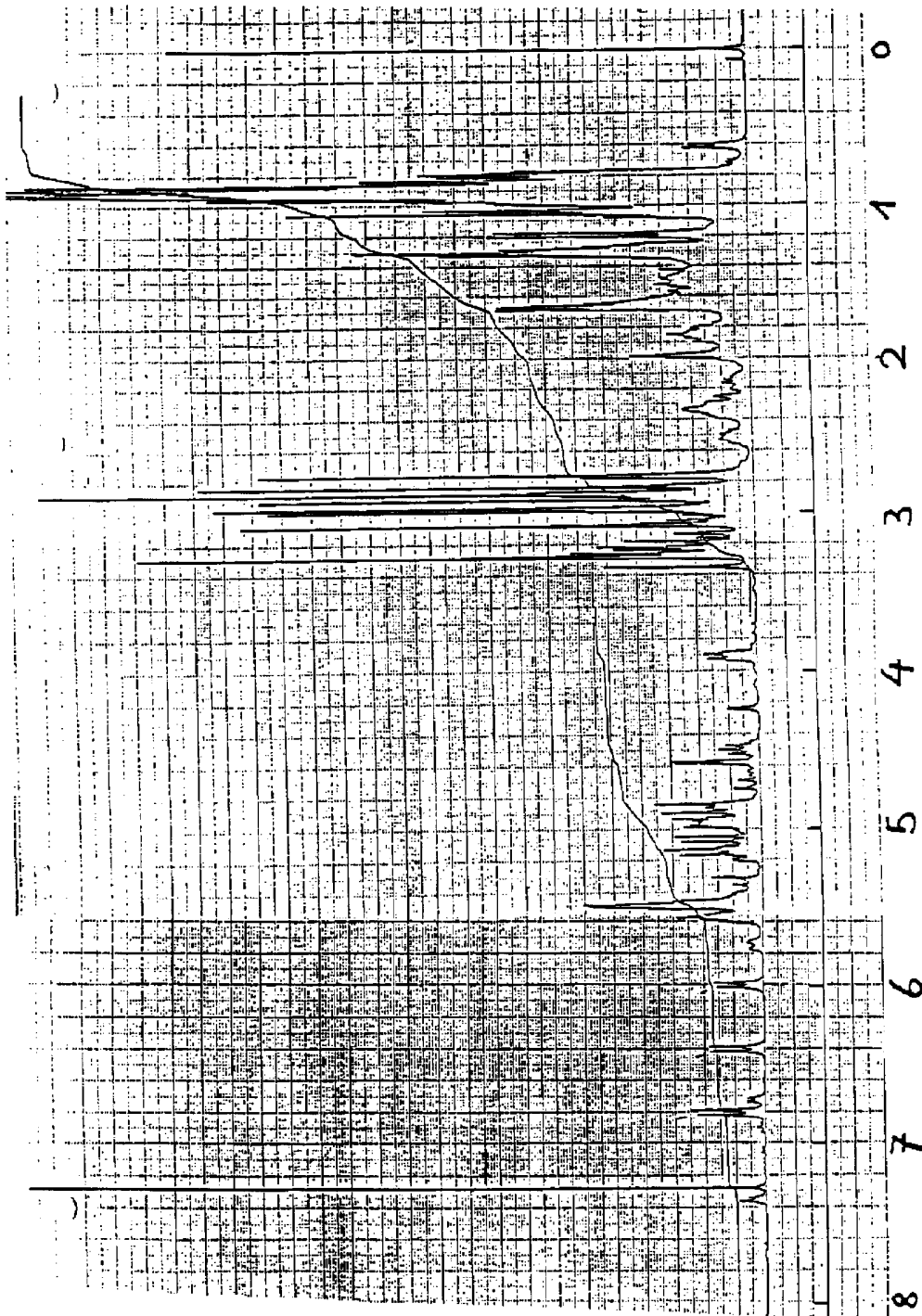
3 výkresy



Обр. 1



Obr. 2



Obr. 3

Koniec dokumentu