



⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **8700191**

Nederland

⑲ NL

---

- ⑤④ **Immunosuppressieve middelen, farmaceutische preparaten die ze bevatten en het toepassen van deze middelen.**
- ⑤① Int.Cl.: A61K 31/47, C07D 221/06, C07D 457/00, C07K 7/64.
- ⑦① Aanvrager: Sandoz A.G. te Basel, Zwitserland.
- ⑦④ Gem.: Ir. L.W. Kooy c.s.  
Octrooibureau Vriesendorp & Gaade  
Dr. Kuiperstraat 6  
2514 BB 's-Gravenhage.

- 
- ②① Aanvraag Nr. 8700191.
- ②② Ingediend 27 januari 1987.
- ③② Voorrang vanaf 31 januari 1986.
- ③③ Land van voorrang: Groot-Brittannië (GB).
- ③① Nummer van de voorrangsaanvraag: 8602372 .
- ⑥② --

- 
- ④③ Ter inzage gelegd 17 augustus 1987.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

---

- Immunosuppressieve middelen, farmaceutische preparaten die ze bevatten en het toepassen van deze middelen -

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op immunosuppressieve middelen die chinolinederivaten zijn, preparaten die ze bevatten en op werkwijzen voor het toepassen van deze middelen.

5 Men heeft nu gevonden dat chinolinederivaten met een laag molecuulgewicht een immunosuppressieve werking uitoefenen en alleen of bijvoorbeeld tezamen met een immunosuppressief middel, bijvoorbeeld een cyclosporine, waardoor de dosis van het immunosuppressieve middel kan worden verlaagd, kunnen  
10 worden toegediend.

Hierna worden deze chinolinederivaten aangeduid als verbindingen volgens de uitvinding. Een aspect van de onderhavige uitvinding heeft betrekking op het toepassen van een verbinding volgens de uitvinding bij het  
15 bereiden van een immunosuppressief farmaceutisch preparaat. Deze verbindingen kunnen bijvoorbeeld in de vorm van een vrije base of in een farmaceutisch aanvaardbare zuuradditiezuurvorm, bijvoorbeeld het hydrochloride, maleaat of mesylaat, worden toegepast.

20 De verbindingen volgens de uitvinding kunnen een kern van bijvoorbeeld tot 4 gecondenseerde ringen, waaronder het chinolinegedeelte, bevatten. De kernen kunnen substituenten, bijvoorbeeld zijketens, hebben. De kernen hebben een laag molecuulgewicht in die zin, dat elke zijketen  
25 geen gecondenseerde ringen bevat.

Voorbeelden van chinolinederivaten met laag molecuulgewicht zijn benzochinolinen, in het bijzonder met formule 1, waarin de ringen A en B transgecondenseerd zijn en waarin

30  $R_1$  en  $R_2$ , elk onafhankelijk van elkaar, een waterstofatoom, een hydroxyl- of methoxygroep voorstellen, onder de voorwaarde dat  $R_1$  en  $R_2$  niet beide een waterstofatoom zijn,

$R_3$  een waterstofatoom of een alkylgroep;

met 1-4 koolstofatomen weergeeft,

$R_4$   $-\text{COOH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{OR}_5$ ,  $-\text{CH}_2\text{CN}$ ,  $-\text{CON}(\text{R}_6)\text{R}_7$ ,  
 $-\text{CH}_2\text{SR}_8$ ,  $-\text{NHSO}_2\text{N}(\text{R}_9)\text{R}_{10}$  of  $-\text{NHCON}(\text{R}_9)\text{R}_{10}$  is,

5  $R_5$  een waterstofatoom of een alkylgroep  
met 1-3 koolstofatomen voorstelt,

$R_7$  een waterstofatoom, een alkylgroep  
met 1-3 koolstofatomen, een fenylgroep of een pyridylgroep  
weergeeft, welke fenyl- of pyridylgroep desgewenst gesubstitu-  
eerd is door halogeen, methyl of methoxy, of waarin

10  $R_6$  en  $R_7$  tezamen een  $-(\text{CH}_2)_4-$ ,  $-(\text{CH}_2)_5-$   
of  $-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-$ groep vormen,

$R_8$  een alkylgroep met 1-4 koolstofatomen  
of een pyridylgroep is, welke pyridylgroep desgewenst  
gesubstitueerd is door halogeen, methyl of methoxy, en

15  $R_9$  en  $R_{10}$ , onafhankelijk van elkaar,  
een waterstofatoom of een alkylgroep met 1-3 koolstofatomen  
voorstellen, of tezamen  $-(\text{CH}_2)_4-$  of  $-(\text{CH}_2)_5-$  vormen, evenals  
de fysiologisch-hydrolyseerbare en -aanvaardbare esters ervan.

Deze verbindingen zijn bekend uit bij-  
20 voorbeeld het Europese octrooischrift 77754 (A2). De  
aanbevolen verbinding hiervan is N,N-diethyl-N'-[(3 $\alpha$ ,4 $\alpha$ ,10 $\alpha$  $\beta$ )-  
1,2,3,4,4 $\alpha$ ,5,10,10 $\alpha$ -octahydro-6-hydroxy-1-propyl-3-benzo[g]  
chinoliny]sulfamide, eveneens bekend als CV (hierna verbinding  
A), bij voorkeur toegepast als het hydrochloride.

25 Aanbevolen verbindingen zijn ergot-  
derivaten met laag molecuulgewicht, d.w.z. verbindingen die geen  
peptidegedeelte op de 8-plaats bezitten, d.w.z. geen ergo-  
peptiden zijn. Ze kunnen bijvoorbeeld een aminogroep, bijvoor-  
beeld een acylamino-, ureidio- of sulfaminogroep of thio-  
30 methylgroep, op de 8-plaats bezitten, welke door bijvoorbeeld  
één of desgewenst twee alkylgroepen met 1-4 koolstofatomen  
kunnen zijn gesubstitueerd. Geschikt bezitten ze een enkele  
binding op de 9,10-plaats van de ergolinekern.

Aanbevolen verbindingen zijn 8 $\alpha$ -sulfamoyl-  
35 aminoergolinen. Deze kunnen gebaseerd zijn op formule 1a,  
waarin

$R_1^a$  onder andere een alkylgroep met 1-4

koolstofatomen,

$R_2^a$  onder andere een waterstofatoom  
of een alkylgroep met 1-4 koolstofatomen en

$R_3^x$  onder andere een  $-NHSO_2N[(C_{1-4})alkyl]_2$   
groep voorstellen.

Onder de aanbevolen voorbeelden vallen:

a) 1,6-dimethyl-8 $\alpha$ -(N,N-dimethylsulfamoylamino)-ergoline-1  
(eveneens bekend als Mesulergine, hierna verbinding B genoemd)

b) 6-n-propyl-8 $\alpha$ -(N,N-diethylsulfamoylamino)-ergoline-1  
(N,N-diethyl-N'-(6-propylergolin-8 $\alpha$ -yl)sulfamide) bij  
voorkeur toegepast als het hydrochloride, eveneens bekend als  
CQP, (hierna verbinding C genoemd)

c) N,N-diethyl-N'-[(8 $\alpha$ )-1-ethyl-6-methyl-ergolin-8-yl]-  
sulfamide bij voorkeur toegepast als het hydrochloride (hierna  
verbinding D genoemd)

Het meest aanbevolen voorbeeld is (b), d.w.z. verbinding C.

Onder andere aanbevolen verbindingen

vallen:

i) 3-(9,10-didehydro-6-methyl-ergolin-8 $\alpha$ -yl)-1,1-diethyl-  
ureum (eveneens bekend als Lisuride, bij voorkeur toege-  
past als het waterstofmaleaat),

ii) 6-n-propyl-8 $\alpha$ -methylmercaptomethyl-ergoline-1 (eveneens  
bekend als Pergolide, bij voorkeur toegepast als het mesylaat),

iii) transhydro-lisuride, eveneens bekend als terguride met de  
chemische naam 3-(6-methyl-ergolin-8 $\alpha$ -yl)-1,1-diethyl-  
ureum, beschreven in bv. DOS 3135305 en 3124714,

iv) 6-n-propyldihydro-lisuride eveneens bekend als proterguride  
met de chemische naam 3-(6-n-propyl-ergolin-8 $\alpha$ -yl)-1,1-  
diethyl-ureum,

v) 6- en 2-gesubstitueerde, bijvoorbeeld 6-n.-propyl- en/of  
2-methyl- of broomderivaten van terguride, lisuride en  
proterguride, bijvoorbeeld beschreven in het Europese  
octrooischrift 21206 (A.1) en 160842 (A.1), in het bijzon-

der de voorbeelden en farmaceutische gegevens daarvan.  
Onder voorbeelden vallen 2-broomerguride, eveneens  
bekend als 2-broomlisuride, bij voorkeur toegepast in  
de vorm van het hydrochloride.

- 5 vi) Metergoline, eveneens bekend als de benzylester van (+)-N-(carboxy)-1-methyl-9,10-dihydrolysergamine.
- vii) Dosergoside, eveneens bekend als N-(1S,2R,3E)-2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-3-heptadecanyl)-6-methylergoline-8-beta-carboxamide.
- 10 viii) FCE-21336 eveneens bekend als 1-ethyl-3-(3'-dimethylamino-propyl)-3-(6-alkyl-ergoline-8'-beta-carbonyl)-ureum, bij voorkeur toegepast als het difosfaat.
- 15 ix) GYKI-32887, eveneens bekend als 6-methyl-8-(N-mesyl-N-2-azidoethyl)ergoleen, bij voorkeur toegepast als het bimaaleaat, bijvoorbeeld beschreven in USP 4.299.836.

Onder groepen van verbindingen vallen  
verbindingen met formule 1', waarin

20  $R_1'$  een waterstofatoom of een alkylgroep  
met 1-4 koolstofatomen voorstelt,

$R_2'$  een waterstof-, chloor- of broomatoom  
of de methylgroep weergeeft,

25  $R_3'$  een alkylgroep met 1-5 koolstofatomen  
of een alkenylgroep met 3-5 koolstofatomen, waarin de dubbele  
binding zich niet aan het koolstofatoom bevindt dat aan het  
stikstofatoom grenst, is en

30  $R_4'$  een alkylgroep met 3-7 koolstofatomen,  
een cycloalkylgroep met 3-7 koolstofatomen, een adamantylgroep,  
fenylgroep, fenylgroep gesubstitueerd door één of een aantal  
leden gekozen uit de groep bestaande uit alkyl met 1-3  
koolstofatomen, alkoxy met 1-3 koolstofatomen, alkylthio met  
1-3 koolstofatomen, trifluormethyl, hydroxyl, nitro, amino en  
35 mono- en di-( $C_{1-3}$ alkyl)-amino, of een fenylgroep die bevat een  
gecondenseerde niet-aromatische, heterocyclische 5- of 6-ring  
met 1 of 2 zuurstof- en/of zwavelatomen als heteroatomen, voorstelt,  
beschreven in GB 2-152.507 A, zie in het bijzonder de voorbeelden

en farmaceutische gegevens daarvan, bijvoorbeeld

(5R,8S,10R)-2,6-dimethyl-8 $\alpha$ -pivaloylamino-ergoline (hierna verbinding E genoemd), bij voorkeur als het hydrochloride toegepast, en het 2-chloorderivaat, (5R,8S,10R)-2-chloor-6-methyl-8 $\alpha$ -pivaloylamino-ergoline.

Onder andere voorbeelden vallen een verbinding met formule 1'', waarin

R<sub>1</sub>'' een waterstofatoom of een alkylgroep met 1-4 koolstofatomen voorstelt,

R<sub>2</sub>'' een waterstof-, chloor- of broomatoom of de methylgroep weergeeft,

R<sub>3</sub>'' een alkylgroep met 1-5 koolstofatomen of een alkenylgroep met 3-5 koolstofatomen, waarin de dubbele binding zich niet aan het koolstofatoom bevindt dat aan het stikstofatoom grenst, is en

R<sub>4</sub> een alkylgroep met 1-7 koolstofatomen, een cycloalkylgroep met 3-7 koolstofatomen, een adamantyl- of fenylgroep of een fenylgroep die door één of een aantal leden gekozen uit de groep bestaande uit alkyl met 1-3 koolstofatomen, alkoxy met 1-3 koolstofatomen, alkylthio met 1-3 koolstofatomen, trifluormethyl, hydroxyl, nitro, amino en mono- en di-(C<sub>1-3</sub>-alkyl)-amino is gesubstitueerd, of een fenylgroep gecondenseerd met een niet-aromatische, heterocyclische 5- of 6-ring met 1 of 2 zuurstof- en/of zwavelatomen als heteroatoom, voorstelt, onder de voorwaarde dat indien R<sub>2</sub>'' een waterstofatoom is, R<sub>3</sub>'' noch R<sub>4</sub>'' de methylgroep zijn, bijvoorbeeld verbindingen waarin R<sub>1</sub>'' = H, R<sub>2</sub>'' = Br of in het bijzonder CH<sub>3</sub>'', R<sub>3</sub>'' = CH<sub>3</sub> en R<sub>4</sub>'' = tert-butyl, Duitse octrooiaanvraag P 3447383.1, op 24 december 1984 ingediend als Britse octrooiaanvraag 8531420, nu ter inzage gelegd als Britse octrooiaanvraag 2169291.

Van vele van de hiervoor genoemde verbindingen is vermeld dat ze prolactine-secretieremmers zijn, waarvan enkele een zeer krachtige en langdurende werking bezitten. De werking van de verbindingen als prolactine-secretieremmers kan volgens standaardproeven worden bepaald, bijvoorbeeld door verlaging van de basale serumprolactinespiegels bij mannetjesratten.

De resultaten met representatieve ver-  
bindingen zijn bijvoorbeeld:

|   | Verbinding | ID <sub>50</sub> mg/kg na 4 uren |
|---|------------|----------------------------------|
| 5 | A          | 0,03                             |
|   | B          | 0,003                            |
|   | C          | 0,001                            |

Een groep verbindingen omvat verbindingen  
die D<sub>2</sub>-agonisten zijn, zonder enige antagonistische werking.  
10 Onder een andere groep verbindingen vallen die verbindingen  
welke serotonineagonisten zijn, bijvoorbeeld zoals geïndiceerd  
bij standaard in vitro bindingsproeven en door aktivering van  
het voor 5-HT gevoelige adenylaatscyclase van de leverbot  
15 volgens de methode van R. Markstein, Neurochemical effects of  
some ergot derivatives: A basis for their antiparkinson actions.  
J. Neural transm 51:39 , (1981).

Onder voorbeelden van dergelijke verbindingen  
vallen verbinding C en pergolide . Verbinding C, pergolide en  
5-HT hebben een werking van respectievelijk 90, 80 en 100 en  
20 pD<sub>2</sub> [log EC<sub>50</sub>] van resp. 6,9, 6,9 en 7,7, bij deze proef op  
adenylaatscyclase gestimuleerd door serotonine bepaald.

Zoals hierna zal worden toegelicht kan  
verrassenderwijze de werking van een verbinding volgens de  
uitvinding als een prolactine-secretieremmer dienen als een  
25 leidraad wat betreft de kracht van het immunosuppressieve effect  
ervan, doch , tenminste voor de voorrangsdatum van deze aanvraag,  
was er geen bewijs van een direkt verband tussen hun vermogen  
prolactinespiegels te verlagen en hun immunosuppressieve  
werking.

30 Inderdaad kan de werking van deze verbindingen  
als prolactine-secretieremmers en de langdurende werking van  
deze eigenschap in sterke mate de waarneming van hun interessante  
eigenschappen op andere gebieden hebben gemaskeerd, in het  
bijzonder op basis van in vitro onderzoek. Op grond van een uitgebreid  
35 onderzoek van deze verbindingen volgens de uitvinding is gebleken

dat ze bijzonder interessante immunosuppressieve eigenschappen, vaak bij lagere doses dan te verwachten was, bezitten.

De verbindingen volgens de uitvinding vertonen een immuno-responswerking, zoals uit standaard ex-vivo en in-vivo proeven blijkt.

Proef 1: anti-lichaam producerende celontwikkeling bij muizen (PFC-proef)

De verbindingen volgens de uitvinding verlagen de antilichaamtiter bij SRBC (rode bloedcellen van schapen) bij plaque-vormende cel - (PFC)proeven. Deze methoden maken het bepalen van het aantal miltlymfocyten die lytische antilichamen voor de SRBC vormen en het onderscheid tussen IgM en IgG producerende cellen mogelijk.

De intraveneuze injectie van SRBC ( $5 \times 10^7$ ) in 0,2 ml i.v. dient als de primaire immunisatie antigeenbron bij de onderzoeken op muizen. De muizen bij deze onderzoeken waren vrouwtjes (C57 zwart) met een lichaamsgewicht van ongeveer 20 g. Alle dieren waren van tevoren, één dag voor de SRBC behandeling, met de respectievelijke verbindingen behandeld en daarna, gedurende in totaal 6 dagen, dagelijks om 11.00 uur behandeld. De milten werden verwijderd teneinde de PFC-aantallen op het SRBC antigeen te behalen.

De miltcellen werden gesuspenderd in de Hapes-gebufferde uitgebalanceerde zoutoplossing (HBSS), één maal gewassen en weer gesuspenderd in een volume dat was ingesteld volgens het te verwachten aantal plaque-vormende cellen. De direkte bepaling van IgM-PFC werd uitgevoerd door plaquevorming van 0,1 ml van de verdunde miltcellen met 0,025 ml SRBC (30%), 0,3 ml Agar (0,5% in HBSS) en 0,025 ml complement (het serum van een guinees biggetje) en aangebracht op Petri-schalen. Een indirecte methode voor de bepaling van IgG-PFC werd uitgevoerd met een monoklonaal anti-lichaam voor de IgM (1:4 verdunning) plus een anti-gama polyspecifiek antiserum (1:800) teneinde complement-fixatie mogelijk te maken. De miltlymfocyten uit de milt van elke muis werden onderzocht teneinde de IgM-en IgG-PFC in duplo te bepalen.

Alle platen werden 4 uren bij 37°C geincubeerd en daarna in bevochtigde kamers gedurende een nacht bij 4°C bewaard. De plaques werden met de hand onder toepassing van een plaque-teller geteld.

5 Representatieve resultaten zijn:

Plaque-vormend effect.

| <u>Proef A</u> |                        |                                          |                   |                                          |                        |
|----------------|------------------------|------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------|------------------------|
| 10             | behandeling            | IgM<br>(PFCx10 <sup>3</sup><br>per milt) | %<br>van controle | IgG<br>(PFCx10 <sup>3</sup><br>per milt) | %<br>van con-<br>trole |
|                | controle               | 195,6<br>± 33,3                          | ---               | 46,2<br>±11,6                            | ---                    |
| 15             | cyclosporine*          |                                          |                   |                                          |                        |
|                | 36 mg/kg/<br>dag s.c.  | 98,6*<br>± 18,2                          | 49,6              | 24,4*<br>±10,6                           | -47,2                  |
| 20             | verbinding A           | 87,0*<br>± 26,5                          | -55,4             | 13,6*<br>±10,3                           | -71,6                  |
|                | 1,0 mg/kg/<br>dag s.c. |                                          |                   |                                          |                        |

25 \* eveneens bekend als ciclosporine en cyclosporine A.

| <u>Proef B</u> |                                   |                                          |
|----------------|-----------------------------------|------------------------------------------|
| 30             | behandeling                       | IgM<br>(PFCx10 <sup>3</sup><br>per milt) |
|                | controle                          | 329,6                                    |
| 35             | cyclosporine<br>60 mg/kg/dag p.o. | 180,9                                    |
|                |                                   | -45%                                     |

8700191

|   |                     |       |      |
|---|---------------------|-------|------|
|   | verbinding C        | 327,0 | -1%  |
|   | 1 mg/kg/dag p.o.    |       |      |
| 5 | verbinding C        | 244,4 | -26% |
|   | 0,1 mg/kg/dag p.o.  |       |      |
|   | verbinding C        | 167,2 | -49% |
|   | 0,01 mg/kg/dag p.o. |       |      |

10

Bij deze proef had verbinding A op basis van een dosis van 1 mg/kg/dag gedurende 6 dagen s.c. toegediend een effect dat van dezelfde orde was als Cyclosporine in 36 mg/kg/dag onder dezelfde omstandigheden. Verbinding C, in een dosis van 0,01 mg/kg/dag p.o. gedurende 6 dagen toegediend, had een werking die van dezelfde orde was als van Cyclosporine in een dosis van 60 mg/kg/dag onder overeenkomstige omstandigheden. Het immunosuppressieve effect van verbinding C daalde bij hogere doseringen. De dosering van andere verbindingen volgens de uitvinding kan volgens routineonderzoek worden bepaald, waarbij men moet denken aan de relevante activiteiten van de remming van de prolactine-secretie en aan het feit dat een immunosuppressieve werking niet bij lage en hoge doses mag worden bepaald. Voorbeelden van doseringen liggen in het traject van 0,01 tot 10 mg/kg, bijvoorbeeld tot 1 mg/kg p.o. en s.c.

25

Proef 2: gemengde lymfocytreactieproef bij muizen.

30

Het vermogen van de verbindingen volgens de uitvinding de lymfocytenrespons op allogene stimulatie te verminderen werd gemeten volgens de gemengde lymfocyten-reactieproef (MLR), waarbij bestraalde allogene cellen van stimulatormuizen een vermeerderende respons bij responder histo-onverenigbare cellen induceren.

35

Eerste variant:

Reagerende muizen (Balb/c vrouwtjes, 8-10 weken oud) werden 5 dagen sub-cutaan behandeld met de verbindingen

8700191

volgens de uitvinding. Gelijke aantallen stimulatorlymfocyten van knaagdieren (van stimulator, CBA, muizen; lymfocyten die in vitro met 200 R waren bestraald) en effectorlymfocyten van de behandelde dieren of controledieren werden 5 dagen ge-  
5 incubeerde. Het <sup>3</sup>H thymidine dat in lymfocyt DNA was opgenomen werd als parameter voor de celvermeerdering in respons op een allogene stimulant gebruikt. (zie S.S.Rich en med., J. Exp.Medicine, (1974), 140 , 1588-1693.

De verkregen representatieve resultaten  
10 zijn:

dpm x 10<sup>3</sup>/10  
cellen ± SD

|    |                              |                |
|----|------------------------------|----------------|
|    | Controle                     | 131192 ± 12344 |
| 15 | Verbinding E in 5 mg/kg s.c. | 103218 ± 21497 |

Verbinding E remt dus de respons met ongeveer 21%. De doseringen van andere verbindingen werden  
door experimenteren gevonden, waarbij rekening gehouden wordt  
20 met de relatieve werkingen betreffende het remmen van de prolactine-secretie en dat een immunosuppressieve werking niet bij lage of hoge doseringen mag worden bepaald. Voorbeelden van trajekten zijn bv. 1-10 mg/kg s.c.

25 Tweede variant:

Bovendien remmen de verbindingen de immuno-respons van effectorlymfocyten op histo-onverenigbare (allogene) lymfocyten volgens een variant van de hiervoor beschreven, tweeweg MLR (gemengde lymfocytenreactie)proef.

30 Muizen van twee histo-onverenigbare stammen (Balb/c en CBA) (6-8 weken oud) werden één maal daags s.c. behandeld met een verbinding volgens de uitvinding gedurende tenminste 7 dagen. Drie uren na de laatste toediening van het geneesmiddel werden de milten verwijderd. De MLR-proef werd  
35 uitgevoerd met 0,5 x 10<sup>6</sup> miltcellen van Balb/c muizen en 0,5 x 10<sup>6</sup> miltcellen van CBA muizen , waarbij de laatste met 2000 rad

waren bestraald. De miltcellen van de Balb-c muizen werden gedurende 4 dagen met de allogene CBA-miltcellen geïncubeerd. Men voegde radioactief thymidine toe en na 16 uren werd de opname van  $^3\text{H}$ -thymidine in het DNA van de miltcellen van de muis gemeten.

De resultaten verkregen met verbinding C

zijn :

Dosis

Verandering<sup>3</sup> t.o.v. de controle

|                          |      |
|--------------------------|------|
| 5 mg/kg                  | -20% |
| 0,5 mg/kg                | -50% |
| 0,05 mg/kg               | -71% |
| (Cyclosporine 100 mg/kg) | -53% |

De doseringen van de andere verbindingen werden door experimenteren bepaald , waarbij weer rekening gehouden wordt met de relatieve werkingen betreffende het remmen van de prolactine-secretie en dat een immunosuppressieve werking niet bij lage en hoge doseringen mag worden bepaald. Voorbeelden van trajekten zijn bijvoorbeeld 0,01 tot 10 mg/kg , bijvoorbeeld 0,01 - 1 mg/kg.

### Proef 3: Freund's adjuvans arthritis bij ratten.

Een proefmodel is een knaagdiermodel van de ontwikkeling van autoimmune adjuvans arthritis. Er werd een remming van de ontwikkeling van adjuvans arthritis waargenomen.

Volgens een variant werd Myobacterium Butyricum van Difco Laboratories , Detroit , Michigan bereid in een emulsie met paraffin subliquidum PHHVI (Siegried Zofingen, Zwitserland) in een concentratie van 6 mg/ml . Gedurende de ether-anesthesie werd een volume van 0,1 ml van deze emulsie intracutaan geïnjecteerd met een 21 g 1-1/2 inch naald in de basis van de staart van mannelijke Sprague-Dawley ratten. (ca 150-175 g). In 95 tot 100% van de achterpoten trad bij de positieve controledieren arthritis op. De dikte

8700191

van de achterpoten (midden-tibiaal gebied) werd gemeten met een lineaire meter (Mitutoyo) gekoppeld aan een elektronisch digitale aflezer (Mitutoyo).

5 In 100% van een controlegroep werd adjuvans arthritis ontwikkeld. De verbindingen volgens de uitvinding werden gedurende 7 dagen of 14 dagen met behulp van een sub-cutaan werkende osmotische pomp aan groepen van 5 dieren toegediend. Het voortschrijden van de arthritis en de remmende werking van een representatieve verbinding, 10 verbinding B, in een dosis van 0,1 mg/kg/dag, zijn :

| <u>Dikte van de achterpoot (mm)</u> |     |                |                |                 |
|-------------------------------------|-----|----------------|----------------|-----------------|
|                                     | Dag | Controle groep | Verbinding B   | Verbinding B    |
|                                     |     |                | 7 dgn. doseren | 14 dgn. doseren |
| 15                                  | 0   | 6,1            | 6,1            | 6,0             |
|                                     | 3   | 6,2            | 6,2            | 6,2             |
|                                     | 6   | 6,3            | 6,2            | 6,2             |
|                                     | 9   | 7,0            | 6,5            | 6,7             |
|                                     | 12  | 7,7            | 6,9            | 7,7             |
| 20                                  | 15  | 7,8            | 7,6            | 7,8             |
|                                     | 18  | 8,9            | 7,9            | 7,9             |
|                                     | 21  | 9,5            | 8,2            | 8,2             |

25 De dosis van andere verbindingen kan volgens routineonderzoek worden bepaald, waarbij rekening gehouden wordt met de relatieve werkingen van de prolactine-secretieremmende werking. Voorbeelden van doses zijn die van 0,1 tot 1 mg/kg/dag s.c.

30

Proef 4: lokaal transplantaat t.o.v. de gastheer (GvH) bij ratten.

Miltcellen (ca  $1 \times 10^7$ ) werden genomen van 6 weken oude Wistar/Furth/ (W/F)ratten en werden geïnjecteerd

35

8700191

in de linker achterpoot van (F 344 x WF)F1 vrouwtjesratten met een gewicht van ongeveer 100 g. Vóór de injectie waren de ratten dagelijks gedurende 7 dagen behandeld met de verbinding en vervolgens nog dagelijks gedurende 3 dagen daarna.

5 Het gewichtsverschil tussen de linker en rechter lymfeklieren werd als parameter voor het beoordelen van de reactie genomen.

De resultaten verkregen met representatieve verbindingen zijn:

|    | Gewicht van de lymfeklier | Gewicht van de lymfeklier | Percentage verschil |
|----|---------------------------|---------------------------|---------------------|
| 10 | Controle                  | verbinding A              |                     |
|    |                           | 0,01 mg/kg/dag            |                     |
|    | ca 63 mg                  | ca 50 mg                  | - 21%               |
| 15 |                           | verbinding C              |                     |
|    |                           | 0,001 mg/kg/dag           |                     |
|    | ca 33 mg                  | 24 mg                     | -28%                |
| 20 |                           | verbinding C              |                     |
|    |                           | 0,01 mg/kg/dag            |                     |
|    | ca 33 mg                  | 19 mg                     | -42%                |
| 25 |                           | verbinding C              |                     |
|    |                           | 0,1 mg/kg/dag             |                     |
|    | ca 33 mg                  | 18 mg                     | -45%                |
| 30 |                           | verbinding E              |                     |
|    |                           | 5 mg/kg/dag               |                     |
|    | ca 55 mg                  | ca 39 mg                  | -41%                |

Zoals kan worden vastgesteld is verbinding C op een dosis afhankelijke wijze actief.

35 De dosis van andere verbindingen kan volgens routineonderzoek worden vastgesteld, waarbij rekening gehouden wordt met de relatieve werkingen van de prolactine-secretieremmende werking en dat een immunosuppressieve werking niet bij

4700101

lage en hoge doseringen mag worden bepaald. Voorbeelden van doses liggen tussen ongeveer 0,001 en 5 mg/kg/dag.

Proef 5: biosynthesesnelheid bij ratten.

5

De verbindingen volgens de uitvinding remmen de biosynthesesnelheid van een geschikte marker voor hormonen, mitogenen en verbindingen, namelijk ornithinedecarboxylase (ODC) in de thymus, milt, beenmerg en de hypofyse voorkwab bijvoorbeeld bij de immuun gestimuleerde rat.

10

15

De bij dit onderzoek toegepaste marker ter bepaling van de biosynthesesnelheid van de lymfatische en endocriene weefsels was ornithinedecarboxylase (ODC). ODC, het snelheidsbeperkende enzym bij de polyamine biosynthese, dient als een vroegtijdige marker van de  $G_1$  celcyclus progressie van zich vermeerderende weefsels en de toegenomen biosynthese in secernerende weefsels, in respons op voedingsstoffen of stimulerende materialen. Er is een piekwerking van ODC na de stimulering in vitro binnen 4 uren, waardoor dit enzym een bruikbare intracellulaire marker voor het begrip van de verwantschap tussen agonisten en de doelwitweefselrespons is. De ODC-werking van lymfatische weefsels schijnt verband te houden met een functionele respons op het immuun-systeem.

20

25

Volgens een typische onderzoeksmethode werden KFM mannetjesratten (150-175 g) 1 dag voor de toediening van het volledige Freund's adjuvans, op een analoge wijze als hiervoor beschreven, behandeld met de verbinding volgens de uitvinding. Het toedienen van de verbinding werd daarna één maal daags herhaald. Twee dagen later werden van de dieren de koppen afgesneden, de weefsels verwijderd en bevroren in vloeibare stikstof. De ODC activiteiten (pmol/30 min./mg proteïne) werden gemeten. De ODC werking werd bepaald door de vrijmaking van  $14\text{ CO}_2$  uit L-(1- $^{14}\text{C}$ )-ornithine te bepalen, zoals beschreven door Snyder en med. Proc. Natl.Acad.Sci. 60:1420, 1968.

30

35

De resultaten verkregen met verbinding

C zijn:

|    |                      | Controle | Freund's<br>behandeling | Verbinding C |           |           |
|----|----------------------|----------|-------------------------|--------------|-----------|-----------|
|    |                      |          |                         | 0,01 mg/kg   | 0,1 mg/kg | 0,5 mg/kg |
| 5  |                      |          |                         |              |           |           |
|    | Thymus               | 291,8    | 253,8                   | 98,80        | 171,40    | 177,0     |
|    | SEM                  | 32,95    | 24,33                   | 24,15        | 19,48     | 53,70     |
|    | Milt                 | 24,83    | 34,88                   | 12,14        | 34,62     | 37,96     |
|    | SEM                  | 3,77     | 6,54                    | 1,83         | 5,35      | 11,89     |
| 10 |                      |          |                         |              |           |           |
|    | Lymfen-<br>klieren   | 40,70    | 64,40                   | 43,10        | 107,30    | 103,90    |
|    | Beenmerg             | 37,20    | 27,10                   | 17,40        | 45,80     | 43,40     |
|    | Bijniermerg          | 15,50    | 7,40                    | 17,10        | 180,0     | 95,0      |
|    | Hypofyse<br>voorkwab | 170,40   | 151,30                  | 32,60        | 33,70     | 41,20     |
| 15 |                      |          |                         |              |           |           |

Zoals blijkt remt verbinding C , in doses waarbij deze verbinding krachtige immunoremmende eigenschappen bezit, bijvoorbeeld 0,01 mg/kg , de biosynthesesnelheden. In hogere doses stimuleert verbinding C de ODC-werking in het bijniermerg en de immunosuppressieve werking was minder.

De toxiciteitwaarden van enkele verbindingen volgens de uitvinding zijn gepubliceerd. Deze waarden kunnen volgens routineonderzoek worden bepaald.

Toxiciteitwaarden voor representatieve verbindingen.

NTEL= geen toxisch effect. Acute onderzoeken werden gedurende 7 of 14 dagen na respectievelijke i.v. of p.o. toediening bepaald, tenzij anders is aangegeven.

Verbinding A: acute LD<sub>50</sub> (muis) 17 mg/kg i.v. 357 mg/kg p.o.  
NTEL (4 weken) ratten tussen 0,2 en 0,57 mg/kg/dag p.o.

NTEL ( 4 weken) honden tussen 0,02 en 0,06 mg/kg/dag p.o.

Verbinding B: overeenkomstig verbinding E

8700191

- Verbinding C: acute LD<sub>50</sub> (muis) 45 mg/kg i.v. 69 mg/kg p.o.  
NTEL ( 4 weken) ratten 0,19 mg/kg/dag p.o.  
NTEL ( 4 weken) honden 0,2 mg/kg/dag p.o.
- 5 Verbinding D: acute LD<sub>50</sub> (muis) 44 mg/kg i.v. 992 mg/kg p.o.  
NTEL (26 weken) ratten tussen 5 en 17 mg/kg/  
dag p.o.  
NTEL (26 weken) honden tussen 0,3 mg/kg/dag  
p.o.
- 10 Verbinding E: goed verdragen gedurende 4 weken bij toedie-  
ning aan Beagle-honden tot 3 mg/kg daags p.o.

Gezien hun immunosuppressieve werking,  
zowel tegen een primair en secundair immunorespons als tegen zowel  
15 IgM en IgG- PFC, zijn de verbindingen volgens de uitvinding  
bruikbaar ter voorkoming en behandeling van ziekten en aandoeningen  
die een vermindering van de immunorespons nodig maken, in  
het bijzonder die welke verlopen via de T en/of B-cellen. Ze  
kunnen dus worden toegepast ter onderdrukking van de vermeerdering  
20 van lymfocyten en immunocyten, bijvoorbeeld ter voorkoming van  
de afstoting van transplantaten, bijvoorbeeld huid-, beenmerg-  
en niertransplantaten, behandeling en voorkoming van transplantaat  
tegen gastheerziekten en in het bijzonder bij de behandeling  
van autoimmuunziekten.

25 De verbindingen zijn niet alleen bruikbaar  
bij vasculaire autoimmuunziekten, doch eveneens bij een  
verscheidenheid van autoimmuunziekten die verband houden met  
weefsels en andere organen en plaatjes.

30 Specifieke autoimmuunziekten waarvoor de  
verbindingen volgens de uitvinding kunnen worden toegepast,  
omvatten die welke spontaan van aard zijn (bijvoorbeeld niet door  
een geneesmiddel geïnduceerd) . Dergelijke autoimmuunziekten  
kunnen worden gekarakteriseerd door specifieke antilichamen.  
Hieronder vallen al die waarvoor behandeling met Cyclosporine  
35 is voorgesteld of toegepast, bijvoorbeeld aplastische anaemie,  
"pure red cell" anaemie, idiopathische thrombocytopenia (bijv.

ideopathische thrombocytopenische purpura), systemische lupus erythematosus, polychondritis, sclerodermie, Wegener granulomatose, dermatomyositis, chronisch actieve hepatitis, myasthenia gravis, psoriasis, syndroom van Stevens-Johnson, spruw, bijv. idiopathische spruw, ziekte van Crohn, ziekte van Graves, Graves ophthalmopatie, sarcoidose, multiple sclerose, primaire biliaire cirrhose, Diabetes mellitus type I, uveitis, bijv. uveitis posterior en uveitis anterior, nephrotische syndromen, glomerulaire nephritis, interstitiele long fibrose en arthritis psoriatica.

Onder bijzonder interessante indicaties vallen psoriasis en arthritis, multiple sclerose, Diabetes type I, de ziekte van Grave, uveitis en myasthenia gravis.

Ze zijn verder bruikbaar voor de behandeling van ontstekingen, bijvoorbeeld arthritis en reumatische aandoeningen met een autoimmuunfactor en verder voor de behandeling van protozoische infecties, bijv. malaria en schistosomose.

Voor de hiervoor genoemde toepassingen zal de dosis natuurlijk variëren, afhankelijk van de wijze van toediening, de toegepaste verbinding, de speciale, te behandelen, aandoening en de gewenste therapie. In het algemeen worden echter bevredigende resultaten verkregen indien een voldoende dosis wordt toegediend om een langdurige en continue remming van de prolactine-secretie tot stand te brengen, bijvoorbeeld tot minder dan 2 nanogram prolactine per ml bloedplasma of in dosis tot ongeveer 2 malen hoger teneinde eventuele plotselinge prolactinegolven te onderdrukken. Verder zijn doses tot één tiende lager dan de prolactineremmende doses geïndiceerd als doeltreffend bij de immunosuppressieve indicatie.

Voor de grotere primaten, in het bijzonder mensen, ligt een geïndiceerde, dagelijkse dosis tussen ongeveer 0,001 en 10 mg (bijv. 0,1 tot 10 mg) p.o. voor de verbindingen volgens de uitvinding. Deze kan bijvoorbeeld geschikt in gescheiden doses tot 4 malen daags of bij voorkeur in een vorm met vertraagde afgifte worden toegediend. Eenheidsdoseringvormen bevatten bijvoorbeeld ongeveer 0,0002 tot ongeveer 10 mg van de verbindingen.

De nauwkeurige, toe te dienen, dosering

kan verder afhangen van de relatieve werking ten opzichte van Cyclosporine A bij de hiervoor beschreven proeven. Op deze basis is bijvoorbeeld vastgesteld dat verbinding A moet worden toegediend in een dosis van ongeveer 0,1 tot 1 mg/dag ,  
5        bijvoorbeeld 0,5 mg, p.o.

De aanbevolen verbinding is verbinding C. Deze oefent bij mensen een langdurig, prolactine-secretie<sup>remmend</sup> effect bij 0,01 mg tot 0,03 mg p.o. per dag uit. Geïndiceerde doses voor een immunosuppressief effect liggen tussen  
10        0,005 en 0,03 mg p.o.

De verbindingen volgens de uitvinding kunnen zowel in de vorm van een vrije base als in de vorm van een farmaceutisch aanvaardbaar zuuradditiezout worden toegediend. Dergelijke preparaten zijn in het algemeen bekend en kunnen  
15        op een gebruikelijke wijze worden bereid of vervaardigd. De verbindingen kunnen volgens elke gebruikelijke weg worden toegediend, in het bijzonder enteraal, bij voorkeur oraal, bijvoorbeeld in de vorm van capsules of tabletten , of , indien geschikt, parenteraal in de vorm van injecteerbare oplossingen of suspensies.

20        Een voorbeeld van een capsulepreparaat dat de verbinding A bevat is:

|                                                 |          |    |
|-------------------------------------------------|----------|----|
| Verbinding A (0,1 mg base)<br>als hydrochloride | 0,1092   | mg |
| maïszetmeel                                     | 175,3908 | mg |
| 25        lactose (200 mesh)                    | 120,0    | mg |
| siliciumdioxide                                 | 1,5      | mg |
| magnesiumstearaat                               | 3,0      | mg |
|                                                 | <hr/>    |    |
| Totaal                                          | 300      | mg |

30        Een voorbeeld van een capsulepreparaat dat de aanbevolen verbinding volgens de uitvinding C bevat is:

|                                      |           |    |
|--------------------------------------|-----------|----|
| Verbinding C in de hydrochloridevorm | 0,02725*  | mg |
| mannitol                             | 107,47275 | mg |
| 35        maiszetmeel                | 80,0      | mg |
| siliciumdioxide (Aerosil 200)        | 0,5       | mg |
|                                      | <hr/>     |    |
|                                      | 188       | mg |

(\* overeenkomende met 0,025 mg vrije base)

Capsules die geringere hoeveelheden ver-  
binding C bevatten, bijvoorbeeld 0,005 mg., kunnen op een  
5 analoge wijze worden vervaardigd.

De onderhavige uitvinding verschaft eveneens  
een nieuwe therapeutische methode, welke omvat het gezamenlijk  
toedienen van i) een immunosuppressief middel, bijvoorbeeld  
een cyclosporine, in het bijzonder Cyclosporine en ii) een  
10 verbinding volgens de uitvinding.

Onder immunosuppressieve middelen vallen  
azathioprine, cyclofosfamide, steroïden, bijv. methylprednisolon  
en Ciamexon.

De cyclosporinen omvatten een klasse  
15 van structureel aparte, cyclische, poly-gemethyleerde  
undecapeptiden met waardevolle farmacologische, in het bijzonder  
immunosuppressieve, anti-inflammatoire en anti-protosoische werking.  
Het eerste geïsoleerde cyclosporine en de "moeder" verbinding  
van deze klasse, is het in de natuur voorkomende schimmel-  
20 metabool Cyclosporine, eveneens bekend als cyclosporine A,  
waarvan de bereiding en eigenschappen zijn beschreven in het  
Amerikaanse octrooischrift 4.117.118. Sinds de oorspronkelijke  
vondst van Cyclosporine is een grote verscheidenheid van in de  
natuur voorkomende cyclosporinen geïsoleerd en geïdentificeerd en  
25 vele, verder niet in de natuur voorkomende, cyclosporinen zijn  
volgens synthetische of half-synthetische methoden of onder  
toepassing van gemodificeerde cultuurmethoden, bereid. De door  
de cyclosporinen omvatte klasse is dus nu aanzienlijk en omvat  
bijvoorbeeld de in de natuur voorkomende cyclosporinen (Thr<sup>2</sup>).  
30 (Val<sup>2</sup>) - en (Nva<sup>2</sup>)-Cyclosporine (eveneens bekend als resp. de  
cyclosporinen C, D en G, evenals verschillende half-synthetische  
derivaten daarvan, zoals hun dihydroderivaten (zoals bijvoorbeeld  
beschreven in de Amerikaanse octrooischriften 4.108.985; 4.210.581  
en 4.220.641), waaronder bijvoorbeeld (Dihydro-MeBmt<sup>1</sup>)-(Val<sup>2</sup>)-  
35 Cyclosporine (eveneens bekend als dihydrocyclosporine D) en andere  
al of niet in de natuur voorkomende cyclosporinen, zoals die  
beschreven in het Europese octrooischrift 0.058.134.81, bijvoorbeeld

[<sup>8</sup>(D)-Ser] - in overeenstemming met de nu gebruikelijke nomenclatuur voor de cyclosporinen, zijn deze hierin gedefinieerd onder referentie aan de structuur van Cyclosporine (d.w.z. cyclosporine A). Dit geschiedt door eerst die resten in het molecuul aan te geven die van die welke in Cyclosporine aanwezig zijn verschillen en daarna de naam "Cyclosporine" te gebruiken teneinde de overige resten die identiek zijn met die welke aanwezig zijn in Cyclosporine te karakteriseren. Cyclosporine heeft formule 2, waarin A de -MeBmt-[N-methyl-(4R)-4-but-2E-en-1-yl-4-methyl-(L)threonyl]rest met formule 3 voorstelt, waarin -x-y- is -CH=CH- (trans) en B is - $\alpha$ -Abu-. Dientengevolge is (Thr<sup>2</sup>)-Cyclosporine (cyclosporin C) de verbinding met formule 2, waarin A de hiervoor aangegeven betekenis heeft en B = -Thr- en (Dihydro-MeBmt<sup>1</sup>)-(Val<sup>2</sup>)-Cyclosporine (dihydrocyclosporine D) is de verbinding met formule 2, waarin A -dihydro-MeBmt- met formule 3 voorstelt, waarin -x-y = -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- en B = -Val-.

Als de "ouder" verbinding van de klasse, heeft Cyclosporine tot nu toe de meeste aandacht getrokken. Het belangrijkste gebied van klinische onderzoeken voor Cyclosporine is als immunosuppressief middel geweest, in het bijzonder in verband met de toepassing ervan bij ontvangers van orgaantransplantaties, bijvoorbeeld van hart, longen, gecombineerde hart- en longen, lever, nieren, pancreas, beenmerg, huid en hoornvliestransplantaties en in het bijzonder allogene orgaantransplantaties. Op dat gebied heeft Cyclosporine een opmerkelijk succes en reputatie geboekt en het is nu in de handel verkrijgbaar en wordt op grote schaal in de kliniek toegepast.

Tegelijkertijd is de toepasbaarheid van Cyclosporine voor verschillende autoimmuunziekten en ontstekingen, in het bijzonder ontstekingen met een etiologie waarbij een auto-immuuncomponent, zoals bij arthrititis en reumatische aandoeningen, is betrokken, intensief geweest en verslagen en resultaten in vitro, bij diermodellen en klinische onderzoeken, zijn wijdverbreid in de literatuur.

Een ander gebied van onderzoek is de potentiële toepasbaarheid als anti-parasitair middel, in het bijzon-

der als anti-protozoaal middel, met de mogelijke, voorgestelde toepassingen, zoals behandeling van malaria en van schistosomiase.

Andere cyclosporinen vertonen dezelfde, algehele farmacologische bruikbaarheid als Cyclosporine en  
5 verschillende voorstellen voor de toepassing, in het bijzonder bij één van de hiervoor genoemde indicaties, zijn overwegend in de literatuur te vinden.

In weerwil van de zeer grote bijdrage die Cyclosporine aan de stand der techniek heeft geleverd, in het  
10 bijzonder op het gebied van de transplantaatchirurgie en in weerwil van de grote acceptatie en het succes van deze verbinding in de kliniek, is een duidelijk negatief aspect ervan zijn vermelde orgaantoxiciteit, bijvoorbeeld hepatotoxiciteit en nefrotoxiciteit. In de kliniek bleek nefrotoxiciteit in het  
15 algemeen meer dan de gebruikelijke zorg te baren en hoewel het duidelijk is dat in die betrekkelijk geringe aantal gevallen waarbij zich een probleem voordoet nefrotoxiciteit in elk geval dosisafhankelijk, reversibel en niet-progressief bij een langdurige behandeling is (klinisch is het alleen waarschijnlijk dat zich  
20 een probleem, indien dit al het geval is, zal voordoen in de beginfase van de Cyclosporine therapie, bijvoorbeeld onmiddellijk na de transplantatie wanneer differentiatie tussen afstoting en nefrotoxiciteit moeilijk is), zullen methoden voor het verlagen van dit speciale neveneffect en andere verwante bijwerkingen  
25 van orgaantoxiciteit die mogelijkwijze zouden kunnen plaatsvinden natuurlijk zeer gunstig zijn. Afgezien dus van het algemener maken van de Cyclosporine-therapie zal het de behoeften om bij te sturen verminderen, bijvoorbeeld onmiddellijk na de transplantatie, evenals de soms optredende noodzaak van een gemengde immunosuppres-  
30 sieve therapie (bijvoorbeeld overgang op andere geneesmiddelen) toe te passen, bijvoorbeeld bij patienten die duidelijke nefrotoxische reacties vertonen.

Eveneens is het zo dat terwijl individuele andere cyclosporinen dan Cyclosporine aanzienlijk minder toxische,  
35 bijvoorbeeld nefrotoxische, neveneffecten dan Cyclosporine kunnen vertonen of zelfs in het algemeen dergelijke nevenreacties kunnen missen, voor zover orgaantoxiciteit een overweging voor hun

klinische toepassing is of kan zijn, een methode voor het oplossen van dit probleem eveneens van aanzienlijk belang kan zijn.

Overeenkomstige overwegingen als hiervoor  
5 besproken voor cyclosporinen gelden eveneens voor andere immuno-suppressieve middelen. Toedienig ervan leidt tot neveneffecten, bijvoorbeeld toxiciteitsmoeilijkheden, lymphoma, gewichtsvermindering enz.

Volgens de onderhavige uitvinding heeft  
10 men nu verrassenderwijze gevonden dat de immuno-suppressieve werking van immunosuppressieve middelen, bijvoorbeeld cyclosporinen, in het bijzonder Cyclosporine, onverwachts en geschikt verhoogd kan worden door het gezamenlijk toedienen met de verbindingen volgens de uitvinding. Meer in het bijzonder heeft men gevonden  
15 dat het gezamenlijk toedienen van immuno-suppressieve middelen en verbindingen volgens de uitvinding verrassenderwijze een grotere immunosuppressieve werking geeft dan de som van de werking van de afzonderlijke bestanddelen (super additief synergisme).

Het gezamenlijk toedienen van verbindingen  
20 volgens de uitvinding met immunosuppressieve middelen verschaft dus een methode welke het mogelijk maakt aanzienlijk minder van het immunosuppressieve middel toe te passen dan anders voor de immunosuppressieve toepassing nodig zou zijn, bijvoorbeeld voor het onderdrukken van afstoting van een orgaantransplantaat, bij  
25 het behandelen van een auto-immuunziekte evenals bij de behandeling van ontstekingsaandoeningen met een etologie waarbij een auto-immuun component te pas komt. Door het mogelijk te maken minder van het immunosuppressieve middel toe te passen, verschaft de onderhavige uitvinding het zeer belangrijke voordeel dat een methode  
30 wordt gegeven voor het vermijden of verminderen van bijwerkingen, bijvoorbeeld schade toebrengen aan een orgaan ten gevolge van het toedienen van een immunosuppressief middel tijdens de immuno-suppressieve therapie.

Volgens het voorgaande verschaft de onderhavige  
35 uitvinding een methode voor :

1. het tot stand brengen van immunosuppressie,  
bijvoorbeeld:

1.1 ter vermindering van afstoting van een  
transplantaat, bijvoorbeeld bij ontvangers van orgaantransplantaties,  
bijvoorbeeld van elk van de specifieke , hiervoor vermelde,  
typen, of

5 1.2 ter behandeling van auto-immuunziekten,  
bijvoorbeeld ter behandeling van elk van de hiervoor vermelde,  
specifieke auto-immuunziekten, of

2. ter behandeling van ontstekingen, in het  
bijzonder ontstekingsaandoeningen met een etiologie waarbij een  
10 auto-immuuncomponent betrokken is , bijvoorbeeld arthritis en  
rheumatische aandoeningen, of

3. ter behandeling van protozoische infecties,  
bijvoorbeeld ter behandeling van malaria,

aan een patient die een dergelijke behandeling  
15 behoeft, welke methode het toedienen van een doeltreffende hoeveel-  
heid van

a) immunosuppressieve middelen, bijvoorbeeld  
cyclosporine, zoals bijvoorbeeld cyclosporine G of Cyclosporine,  
en

20 b) een verbinding volgens de uitvinding,  
aan een patient die een dergelijke behandeling behoeft , omvat.

Rekening houdende met de synergistische  
wisselwerking van de bestanddelen a) en b) betreffende de immuno-  
suppressie, zullen de hoeveelheden a) en b) die volgens de  
25 speciale methode gedefinieerd onder 1 hiervoor of , indien het  
een conditie met een etiologie waarbij een auto-immuun bestanddeel is  
betrokken, volgens de speciale , hiervoor onder 2 gedefinieerde,  
speciale methode, nodig zijn, tezamen een immuno-suppressief  
doeltreffende hoeveelheid bevatten. Bovendien zal in het geval dat  
30 rekening moet worden gehouden met de resterende orgaantoxiciteit of  
andere neveneffecten van het immunosuppressieve middel [ bijvoorbeeld  
in weerwil van de lagere doses van benodigd a) ten gevolge van het  
toedienen van b) ], de benodigde hoeveelheid b) geschikt zijn  
om een dergelijke resterende toxiciteit te verlagen.

35 In verband met de speciale, onder 2 en 3  
hiervoor gedefinieerde methoden, zal de benodigde hoeveelheid van

a) respectievelijk 2, een doeltreffende hoeveelheid tegen ontstekingen en 3, een anti-protozoisch doeltreffende hoeveelheid bevatten en zal de benodigde hoeveelheid b) een hoeveelheid zijn die voldoende is om een eventuele orgaantoxiciteit, die anders optreedt en toe te schrijven is aan a), te verminderen.

Het zal duidelijk zijn dat de onderhavige uitvinding eveneens op te vatten is als een methode voor het verminderen van de orgaantoxiciteit, bijvoorbeeld hepatotoxiciteit, of, in het bijzonder, nefrotoxiciteit, van een verbinding a) d.w.z. ter vermindering van schade aan het orgaan, zoals bijvoorbeeld de lever, of in het bijzonder, aan de nieren, teweeg gebracht door een bestanddeel a) ] bij een patient die therapeutisch met a) wordt behandeld, welke omvat het toedienen van bestanddeel b).

De synergistische wisselwerking van immuno-suppressieve middelen, bijvoorbeeld Cyclosporine en verbindingen volgens de uitvinding, bijvoorbeeld A, in verband met de immuno-suppressieve werking, kan worden aangetoond met klinische proeven en aan de hand van dierproefmodellen, bijvoorbeeld met de gelokaliseerde transplantaat-versus-gastheerreactie bij ratten, uitgevoerd volgens de methoden beschreven door Ford en med., Transplantation 10, 258-266 (1970). Volgens deze onderzoekmethode leidt de gelijktijdige behandeling met een immunosuppressief middel, bijvoorbeeld een cyclosporine, zoals Cyclosporine en verbindingen volgens de uitvinding ( met behandeling met een verbinding volgens de uitvinding die begint voor het enten met stimulatorcellen ) tot een remming van de transplantaat-versus-gastheerreactie die groter is dan de som van de waargenomen activiteiten indien de verbindingen afzonderlijk worden toegediend.

Bovendien geeft de combinatie van a) en b) een verlaging van de antilichaamtiter voor de rode bloedcellen van schapen bij de hiervoor beschreven proef I. Zo leidt bijvoorbeeld het toedienen van 36 mg/kg/dag s.c. Cyclosporine met 0,1 mg/kg/dag van verbinding A tot een verlaging van 62,8% IgM-titer en 79,1% van de IgG-titer. De combinatie van Cyclosporine (60 mg/kg/dag p.o.) en verbinding C (0,1 mg/kg/dag p.o.) leidt tot een verlaging van 63% van de IgM-titer.

Geschikte doseringen van andere verbindingen

volgens de uitvinding kunnen op basis van de relatieve activiteiten van de prolactine-secretieremmende werking worden gevonden. Voorbeelden van doses zijn van 0,1 tot 10 mg/kg/dag s.c.

5 Een andere proef voor het aantonen van de immunosuppressieve werking van de combinatie is :

Proef 6: het transplanteren van neonataal hartweefsel  
in de oren van muizen

10 Volgens deze in vivo proef werd de afstotings-  
tijd van getransplanteerd neonataal hartweefsel door de verbindingen  
volgens de uitvinding verlengd.

Volgens een methode werd een kleine incisie  
aan de basis van het oor van een C 57 BL muis (H-2<sup>b</sup>) aangebracht.  
Stompe of fijne pincetten werden gebruikt om de dorsale huidlaag  
15 los te maken van de kraakbeenlaag, teneinde een zak te vormen.  
Daarna werd de helft van een hart genomen van een 1 tot 2 dagen  
oude Balb/c muis (H-2<sup>d</sup>) in de zak gestoken. Op 6 dagen na het  
transplanteren en elke week daarna werd de overleving van de hart-  
transplantatie gevolgd met microelektroden die aan elke zijde van  
20 het transplantaat waren geplaatst. Er werd gebruik gemaakt van  
een dynograaf recorder teneinde de elektrische activiteit afkomstig  
van het transplantaat te registreren. Als eindpunt van de over-  
leving van het transplantaat werd de tijd genomen waarbij de  
elektrische activiteit verloren was gegaan. Niet-behandelde muizen  
25 stootten het transplantaat na 8,5 dagen af.

Volgens dit model werd aangenomen dat een  
effektieve immunosuppressie had plaatsgevonden indien de afstotings-  
tijd was opgelopen tot tenminste 17 dagen. De tijd tot de afstoting  
van het hartallotransplantaat werd door de verbindingen volgens  
30 de uitvinding verlengd indien de verbindingen in een dosis van  
0,05 tot 0,5 mg/kg s.c. gezamenlijk met cyclosporine (18 mg/kg/dag  
s.c.) werden toegediend. Bij toediening van de verbinding A in  
een dosis van 0,05 mg/kg/dag, s.c. was 50 % van de hart-  
allotransplantaten in een groep van 10 dieren nog actief op de  
35 17<sup>e</sup> dag.

Volgens de werkwijze van de onderhavige  
uitvinding kunnen het immunosuppressieve middel en een verbinding

volgens de uitvinding gescheiden , op verscheidene tijden tijdens de therapie, of vrijwel gelijktijdig, worden ingediend . Zo kan men met de behandeling van een verbinding volgens de uitvinding beginnen voordat men het met immunosuppressieve middel behandelt, of na het begin van de behandeling met het immunosuppressieve middel, bijvoorbeeld nadat een remissie van de ziekte tot stand is gebracht. De onderhavige uitvinding wordt geacht al dergelijke behandelingsmethoden te omvatten en de uitdrukking "gezamenlijk toedienen" dient dienovereenkomstig te worden opgevat. In de praktijk kan de methode volgens de uitvinding waarbij begonnen wordt met het toedienen van de verbinding volgens de uitvinding voor de behandeling met een immunosuppressief middel, in sommige gevallen en afhankelijk van bijvoorbeeld het doel van de therapie met het immunosuppressieve middel en de conditie van de te behandelen patient, vooral gunstig zijn. Zo kan het aanvangen van de behandeling met de verbinding volgens de uitvinding tot 7 dagen of meer voor het behandelen met het immunosuppressieve middel een extra en gunstig vooraf beschermend effect tegen neveneffecten van het immunosuppressieve middel, zoals bijvoorbeeld orgaan-toxiciteit , bijvoorbeeld nefrotoxiciteit, opleveren.

Het is ook mogelijk dat de immunosuppressieve middelen in een normale dosis met de verbinding volgens de uitvinding wordt toegediend en dat de cyclosporine-dosis na enkele weken, bijvoorbeeld 1 maand na het starten van de therapie met de verbinding volgens de uitvinding, wordt verlaagd.

De doses van het immunosuppressieve middel die bij het uitvoeren van de werkwijze volgens de uitvinding worden toegediend zullen natuurlijk variëren, afhankelijk van in het bijzonder het speciale , toegepaste cyclosporine, de wijze van toediening , de te behandelen aandoening ( bijvoorbeeld of de behandeling ... voor de immunosuppressie of voor een ander doel is : en indien voor immunosuppressie wordt toegepast, in verband met bijvoorbeeld een orgaantransplantatie , beenmergtransplantatie of de behandeling van een autoimmuunziekte ) , evenals het gewenste effect. Bovendien zullen de doses in het algemeen aan de individuele patienten moeten worden aangepast, teneinde een geschikte , langdurige , geneesmiddelserumconcentratie in te stellen , bijvoorbeeld door toediening van een dagelijkse

begin- of start- of "loading dosis", met een daarna volgende instelling van de dosis (in het algemeen verlaging ) in overeenstemming met de serumspiegels, zoals bepaald door regelmatige RIA bewaking.

5

In het algemeen worden echter , indien een immunosuppressieve behandeling is gewenst ( d.w.z. indien er een potentiering van de werking door de gezamenlijk toegediende verbinding volgens de uitvinding optreedt) bevredigende resultaten verkregen bij toediening in een doseringstrajekt van ongeveer 1 tot ongeveer 25 mg/kg/dag (bijvoorbeeld in het geval van Cyclosporine van ongeveer 5 tot ongeveer 15 mg/kg /dag ), oraal éénmaal of in gescheiden doses twee of drie malen daags aan de patient toegediend . Is een i.v. toediening gewenst , bijvoorbeeld door infuseren ( zoals bij de beginfase van de

10

15

behandeling) , dan zijn lagere doses, bijvoorbeeld van de orde van ongeveer 0,5 tot ongeveer 5,0 mg/kg/dag ( bijvoorbeeld in het geval van Cyclosporine van ongeveer 1 tot ongeveer 3 mg/kg/dag als begindosis , of ongeveer 2 mg/kg/dag voor een onderhoudsdosis ) algemeen geïndiceerd.

20

Wordt met de behandeling geen immunosuppressieve doeleinden nagestreefd, dan worden bevredigende resultaten verkregen bij toediening in een dosistrajekt van ongeveer 5 tot ongeveer 50 mg/kg/dag (bijvoorbeeld in het geval van Cyclosporine van ongeveer 10 tot ongeveer 20 mg/kg/dag tijdens de beginfase van de behandeling, onder vermindering tot een onderhoudsdosis van ongeveer 5 tot ongeveer 10 mg/kg/dag ), oraal éénmaal of in gescheiden doses twee of drie malen daags aan een patient toegediend. Is een i.v. toediening gewenst, bijvoorbeeld via een infuus (bijvoorbeeld in de beginfase van de behandeling ) , dan zijn

25

30

lagere doses, bijvoorbeeld van de orde van ongeveer 1 tot ongeveer 10 mg/kg/dag (bijvoorbeeld in het geval van Cyclosporine van ongeveer 3 tot ongeveer 5 mg/kg/dag voor een begindosis of tot ongeveer 2,5 mg/kg/dag voor een onderhoudsdosis) algemeen geïndiceerd.

35

De bij uitvoering van de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding toe te dienen doses van de verbinding volgens de uitvinding zullen eveneens variëren, bijvoorbeeld afhanke-

lijk van de relatieve prolactine-secretieremmende werking van de betreffende verbinding, de wijze van toediening, de toegepaste cyclosporine-therapie (bijvoorbeeld of een immunosuppressieve of andere cyclosporinedosering is gewenst) en het speciale , toegepaste cyclosporine . Het toedienen kan enteraal (bijvoorbeeld 5 oraal ) of parenteraal ( bijvoorbeeld i.m.) geschieden of de verbinding kan in een vorm met vertraagde afgifte worden toegediend. Doses van de verbindingen volgens de uitvinding, bijvoorbeeld verbinding C, zijn hiervoor vermeld. Voor verbinding A is een 10 geschikte, dagelijkse dosis voor orale toediening van de orde van ongeveer 0,1 tot ongeveer 1 mg/kg/dag , één maal of in gescheiden doses twee of drie malen daags toegediend.

Zowel orale als parenterale doseringsvormen voor cyclosporinen , bijvoorbeeld Cyclosporine , en verbindingen 15 volgens de uitvinding, die geschikt bij de werkwijze volgens de uitvinding kunnen worden toegepast, zijn bekend uit de stand der techniek , bijvoorbeeld het Britse octrooischrift 2.015.339 B en zijn in de handel verkrijgbaar.

Aanbevolen indicaties omvatten transplantatie, 20 Diabetes mellitus, type I, uveitis posterior, reumatische arthritis en niersyndromen.

Desgewenst kunnen combinatie-doseringsvormen van de verbinding volgens de uitvinding en cyclosporine worden opgesteld . Deze kunnen op de drinkbare , opgeloste preparaatvorm 25 van cyclosporine zijn gebaseerd, d.w.z.

200 mg Cyclosporine

1 ml Labrafil M 1944 CS (zoals beschreven in G.B.2.015.339)/ethanol-  
mengsel (40:15 v/v)

0,4 ml olijfolie of maïsolie,

30 dat een verbinding volgens de uitvinding in vrije basevorm, bijvoorbeeld 0,1 mg verbinding A of 0,005 mg verbinding C , kan bevatten. Het mengsel kan als een drinkbare oplossing of in zachte gelatine capsules worden toegepast.

35

- C O N C L U S I E S -

1. Een immunosuppressief farmaceutisch  
preparaat dat een chinoline met een laag molecuulgewicht bevat.

2. Farmaceutisch preparaat dat geschikt is  
voor immunosuppressieve therapie en voor gezamenlijke toediening  
5 met een ander immunosuppressief middel, met het kenmerk, dat  
dit een chinoline met laag molecuulgewicht bevat.

3. Farmaceutisch preparaat dat geschikt  
is om tezamen met een ander immunosuppressief middel te worden  
toegediend teneinde de neveneffecten veroorzaakt door het  
10 andere immunosuppressieve middel te verminderen, met het kenmerk, dat  
dit preparaat een chinoline met laag molecuulgewicht bevat.

4. Farmaceutisch preparaat volgens één  
der voorgaande conclusies ter behandeling van:  
aplastische anaemie, pure red cell anaemie, idiopathische  
15 thrombocytopaenia, systemische lupus erythematosus, polychontritis,  
sclerodermie, Wegener granulomatose, dermatomyositis, chronisch  
aktieve hepatitis, myasthenia gravis, psoriasis, syndroom van  
Steven-Johnson, idiopathische spruw, ziekte van Crohn, Graves  
ophthalmopathie, sarcoidose, multiple sclerose, primaire biliaire  
20 cirrhose, Diabetes mellitus type I, uveitis posterior, nephrotische  
syndromen, interstitiële longfibrose en arthritis psoriatica.

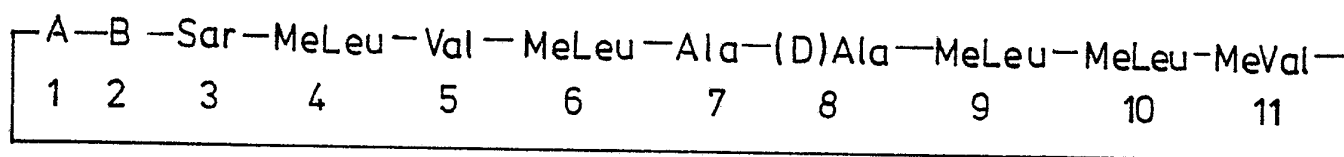
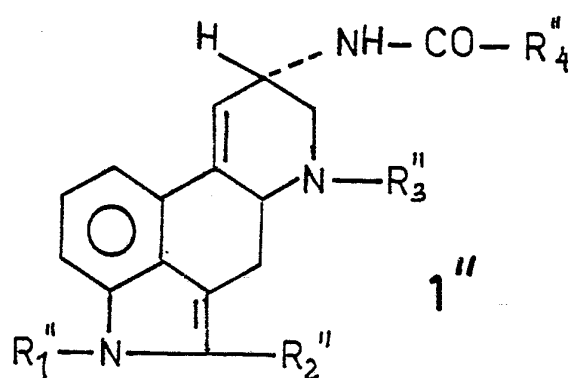
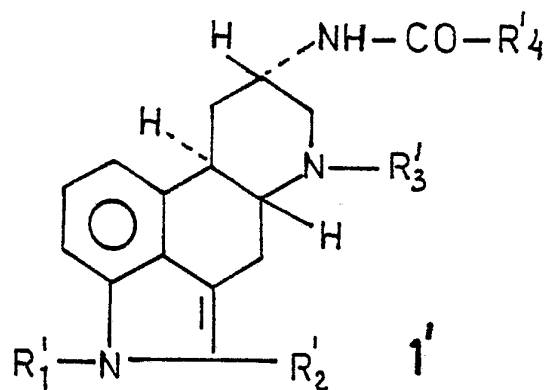
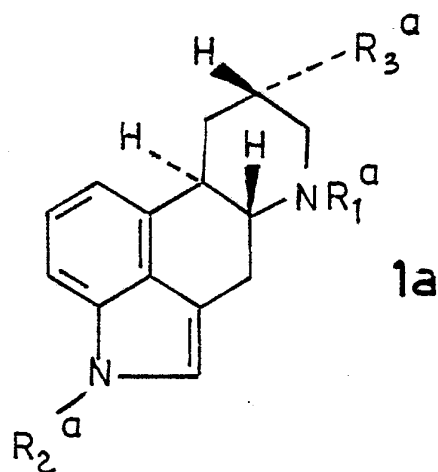
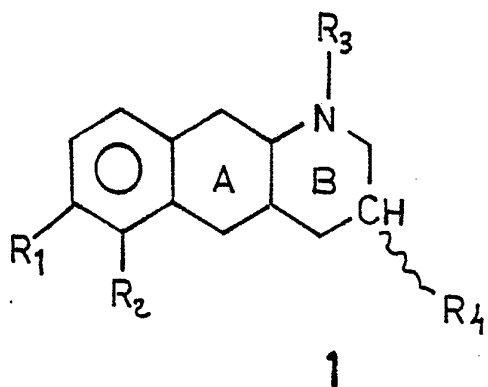
5. Farmaceutische preparaat volgens één  
der voorgaande conclusies ter behandeling van arthritis,  
multiple sclerose, myasthenia gravis en psoriasis.

25 6. Preparaat volgens één der voorgaande  
conclusies, met het kenmerk, dat het chinoline met laag molecuul-  
gewicht een ergolinederivaat met laag molecuulgewicht is.

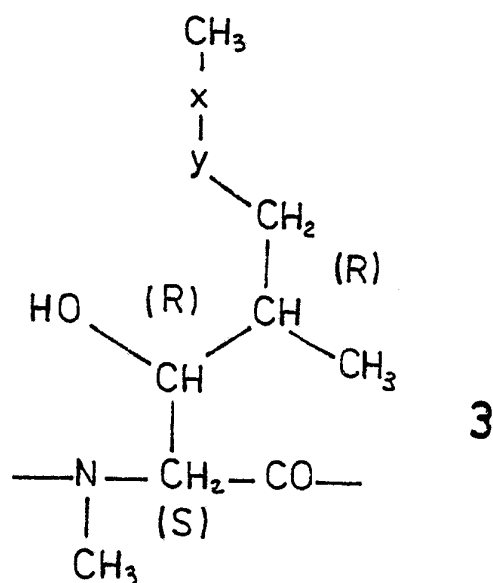
7. Preparaat volgens één der voorgaande  
conclusies, met het kenmerk, dat men als chinoline  
30 6-n-propyl-8-(n,n-diethylsulfamoylamino)ergoline-I toepast.

8. Preparaat volgens één der voorgaande  
conclusies, met het kenmerk, dat men als chinoline N,N-diethyl-N'-  
[(3 $\times$ ,4a $\alpha$ ,10a $\beta$ )-1,2,3,4,4a,5,10,10a-octahydro-6-hydroxy-1-  
propyl-3-benzo[g]chinoliny]sulfamide toepast.





**2**



8700191