



(12) PATENT

(19) NO

(11) 332459

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 7/52 (2006.01)

C07K 7/64 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/13 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

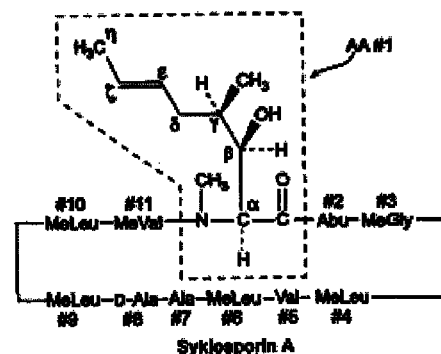
A61K 9/107 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

## Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20042031	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.10.17 PCT/CA2002/01559
(22)	Inng.dag	2004.05.14	(85)	Videreføringssdag	2004.05.14
(24)	Løpedag	2002.10.17	(30)	Prioritet	2001.10.19, US, 346201 2002.04.05, US, 370596
(41)	Alm.tilgj	2004.05.19			
(45)	Meddelt	2012.09.24			
(73)	Innehaver	Isotechnika Pharma Inc., 5120-75th Street, CA-ABT6E6W2 EDMONTON, Canada			
(72)	Oppfinner	Selvaraj Naicker, 3304-117th Street, CA-ABT6J3J4 EDMONTON, Canada Randall W Yatscoff, 1596 Hector Roas, CA-ABT6R225 EDMONTON, Canada Robert T Foster, 34 Westbrook Drive, CA-ABT6J2C9 EDMONTON, Canada Mark Abel, 11530-9A Avenue, CA-ABT6J7B2 EDMONTON, Canada Seetharaman Jayaraman, 11812-13 Avenue, CA-ABT6J7E9 EDMONTON, Canada			
(74)	Fullmektig	Curo AS, Industriveien 53, 7080 HEIMDAL, Norge			
(54)	Benevnelse	<b>Fremgangsmåte for framstilling av en blanding av (E)- og (Z)-isomere av ISATX247.</b>			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 9918120 A1 EP 0296122 A2 US 5239057 A			
(57)	Sammendrag				

Oppfinnelsen angår isomeriske blandinger av syklosporin-analoger som strukturelt er lik syklosporin A. Blandingen innehar forbedret effektivitet og redusert toksisitet overfor de individuelle isomere, og overfor de naturlig forekommende og andre nåværende kjente syklosporinene og syklosporin-derivatene. Utførelser av den foreliggende oppfinnelsen er rettet mot cis og trans-isomere av syklosporin A - analoger, omtalt som ISATX247, og derivater av det. Blandinger av ISATX247 isomere oppviser en kombinasjon av forbedret kraft og redusert toksisitet overfor de naturlig forekommende og ellers kjente syklosporinene. ISATX247 isomere og alkylerte, arylerte og deuterierte derivater syntetiseres via stereoselektive baner hvor de særlige forholdene for en reaksjon bestemmer graden av stereoselektivitet. Stereoselektive baner kan utnytte en Wittig reaksjon, eller en organometallisk reagent omfattende uorganiske elementer så som bor, silisium, titan og litium. Forholdet mellom isomere i en blanding kan variere fra omtrent 10 til 90 vektprosent, basert på den totale vekten av blandingen.



Foreliggende oppfinnelse angår en isomerisk blanding av syklosporin-analoger som er relatert til syklosporin A. Det er forventet at blandingene har forbedret effektivitet og/eller redusert toksisitet overfor de individuelle isomerene og overfor naturlig forekommende og andre nåværende kjente syklosporiner og syklosporin-derivater. I tillegg angår foreliggende oppfinnelse synteseruter for produksjon av isomere av syklosporin A analoger, idet slike ruter varierer i graden av stereoselektivitet avhengig av de spesifikke reaksjons-forholdene.

#### Referanser:

Bennett, W.M., "The nephrotoxicity of new and old immunosuppressive drugs," Renal Failure, Vol. 20, side 687-90 (1998).

J.-F. Biellmann, J.-B. Ducep i "Allylic and benzylic carbanions substituted by heteroatoms" Organic Reactions Vol. 27 (Wiley, New York, 1982) s. 9

H.J. Carlsen et al i "A Greatly Improved Procedure for Ruthenium Tetroxide Catalyzed Oxidations of Organic Compounds" J. Org. Chem., Vol. 46, No 19. side 3736-3738 (1981).

T. Chang, L.Z. Benet, M.F. Hebert, "The effect of water-soluble vitamin E on cyclosporine pharmacokinetics in healthy volunteers", Clin. Pharmacol. Ther., Vol. 59, side 297-303 (1996).

E.J. Corey, M.C. Desai in Tetrahedron Letters, Vol. 26, nr 47, s 5747 - 8 (1985).

M.K. Eberle, F. Nuninger, "Synthesis of the main metabolite (OL-17) of cyclosporin A" J. Org. Chem., Vol. 57, side 2689-2691 (1992).

E. Ehlinger, P. Magnus i "Silicone in synthesis. 10. The (trimethylsilyl)allyl anion: A  $\beta$ -acyl anion equivalent for the conversion of aldehydes and ketones into  $\gamma$ -lactones", J. Am. Chem. Soc., Vol. 102, nr. 15, side 5004-5011 (1980).

D.S. Frumann, C.B. Klee, B.E. Bierer, S.J. Burakoff, "Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK506 and cyclosporin A", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 89, s. 3686-90 (1992).

Granelli-Piperno, L. Andrus, R.M. Steinman, "Lymphokine and nonlymphokine mRNA levels in stimulated human cells: kinetics, mitogen requirements, and effects of cyclosporine A", J. Exp. Med., Vol. 163, s. 922 (1986).

J.R. Hanson, "The Protection of Alcohols", Protecting Groups in Organics Synthesis, kap 2, s 24-25 (Sheffield Academic Press, Sheffield, England, 1999).

M.F. Hebert, J.P. Roberts, T. Prueksartianont, L.Z. Benet, "Bioavailability of cyclosporin with concomitant rifampin administration is markedly less than predicted by hepatic enzyme induction" Clin. Pharmacol. Ther., Vol 52, s 453 -7 (1992).

R.W. Hoffmann, Angewandte Chemie International Edition, Vol 555, (1982).

R.W. Hoffmann, H.-J. Zei, "Stereoselective synthesis of alcohols. 8. Diastereoselective synthesis of  $\beta$ -methylhomoallyl alcohols via crotylboronates" *J. Org. Chem.*, Vol 46, s. 1309 - 1314 (1981).

P.F. Hurdlik og D. Peterson i "Stereospecific Olefin-Forming Elimination Reactions of  $\beta$ -Hydroxysilanes" *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 97, nr. 6, s. 1464 - 1468 (1975).

Y. Ikeda, J. Ukai, N. Ikeda, H. Yamamoto, "Stereoselective synthesis of (Z)- and (E)-1,3-alkadienes from aldehydes using organotitanium and lithium reagents", *Tetrahedron*, Vol. 43, nr. 4, s. 723 - 730 (1987).

Kobel et al., *Europ. J. Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 14, s. 237 - 240 (1982).

J. McMurry, *Organic Chemistry*, 5. utg. (Brooks/Cole, Pacific Grove, 2000), s 780 - 783.

M.T. Reetz in *Organotitanium Reagents in Organic Synthesis* (Springer-Verlag, Berlin 1986) s. VII, 148-149, og 164-165.

Rich et al, *J. Med. Chem.*, Vol. 29, s 978 (1986).

W.R. Roush, "Allylorganometallics", *Comprehensive Organic Synthesis*, Pergamon Press, Vol. 2, s 1-53. S.L. Schreiber, G.R. Crabtree, "The mechanism of action of cyclosporine A and FK506", *Immunol. Today*. Vol. 13, s. 136-42 (1992).

Sketris, R. Yatscoff, P. Keown, D.M. Canafax, M.R. First, D.W. Holt, T.J. Schroeder, M. Wright, "Optimizing the use of cyclosporine in renal transplantation", *Clin. Biochem.*, Vol. 28, s. 195-211 (1995).

M.B. Smith og J. March, *March's Advanced Organic Chemistry* (Wiley, New York, 2001), s. 144-147.

Streitwieser, C.H. Heathcock, *Introduction to Organic Chemistry*, 2. utg. (Macmillan, New York, 1981), s. 845-846.

J.A. Thliveris, R.W. Yatscoff, M.P. Lukowski, K.R. Copeland, J.R. Jeffery, G.F. Murphy, "Chronic cyclosporin nephrotoxicity: A rabbit model", *Nephron*. Vol 57, s. 470 - 6 (1991).

J.A. Thliveris, R.W. Yatscoff, M.J. Mihatsch, "Chronic cyclosporine-induced nephrotoxicity: A rabbit model" *Transplantation*, Vol. 57, s. 774-6 (1994).

S.E. Thomas in *Organic Synthesis: The Roles of Boron and Silicon* (Oxford University Press, New York, 1991), s. 84-87.

Traber et al., *Helv. Chim. Acta.*, Vol. 60, s 1247 - 1255 (1977).

Traber et al., *Helv. Chim. Acta.*, Vol. 65, s 1655 - 1667 (1982).

D.S. Tsai, D.S. Matteson, "A stereocontrolled synthesis of (Z) and (E) terminal dienes from pinacol (E)-1-trimethylsilyl-1-propene-3-boronate", *Tetrahedron Letters*, Vol. 22, nr. 29, s. 2751 - 2752 (1981).

H.A. Valentine, J.S. Schroeder, "Recent advances in cardiac transplantation" [redaksjonell; kommentar], *N. Engl. J. Med.*, Vol. 333, nr. 10, s. 660-1 (1995).

von Wartburg et al., *Progress in Allergy*, Vol. 38, s 28-45 (1986).

Wenger, *Transpl. Proc.*, Vol. 15, Suppl. 1, s 2230 (1983).

Wenger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, Vol. 24, s. 77 (1985).

Wenger, *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Vol. 50, s 123 (1986).

Y. Yamamoto, N. Asao, *Chemical Reviews*, s. 2307 (1993).

Dan Yang, et al., "A C<sub>2</sub> Symmetric Chiral Ketone for Catalytic Asymmetric Epoxidation of Unfunctionalized Olefins" *J. Am. Chem. Soc.*, Vol 118, s 491-492 (1996).

Dan Yang, et al., "Novel Cyclic Ketones for Catalytic Oxidation Reactions", *J. Org. Chem.*, Vol. 63, s 9888-9894 (1998).

US patent 4,108,985.

US patent 4,160,452.

US patent 4,210,581.

US patent 4,220,641.

US patent 4,256,108.

US patent 4,265,874.

US patent 4,288,431.

US patent 4,384,996.

US patent 4,396,542.

US patent 4,554,351.

US patent 4,771,122.

US patent 5,239,057.

US patent 5,284,826.

US patent 5,525,590.

Europeisk patent publikasjon nr. 0 034 567.

Europeisk patent publikasjon nr. 0 056 782.

Europeisk patent publikasjon nr. 0 296 122.

Internasjonal patent publikasjon nr. WO 86/02080.

Internasjonal patent publikasjon nr. WO 99/18120.

Omtalen av hver av de ovenfor nevnte patentene, patentsøknadene og publikasjonene er tatt med her i sin helhet ved referanse.

### **Bakgrunn**

Syklosporin-derivater utgjør en klasse av sykliske polypeptider omfattende elleve aminosyrer, som blir produsert som sekundære metabolitter av sopp-arten *Tolypocladium infaltum* Gams. Det er observert at de reversibelt inhiberer immunokompetente lymfocytter, særlig T-lymfocytter, i G0 eller G1 fasen av celle-syklusen. Det er også observert at syklosporin-derivater reversibelt inhiberer produksjonen og frigivelsen av lymfokiner (Granelli-Piperno et al., 1986). Selv om et

antall syklosporin-derivater er kjent, er syklosporin A den mest brukte. De undertrykkende effektene av syklosporin A er forbundet til inhiberingen av T-celle medierte aktiveringer. Denne undertrykkningen blir gjennomført ved at syklosporin bindes til det allestedsnærværende intracellulære proteinet, syklofilin. Dette komplekset inhiberer igjen den kalsium- og kalmodulin-avhengige serine-threonine fosfatase-aktiviteten av enzymet calcineurin. Inhibering av calcineurin hindrer aktivering av transkripsjons-faktorer så som NFATp/c og NF- $\kappa$ B, som er nødvendige for induksjon av cytokin-genene (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL4, og GM-CSF) under T-celle aktivering. Syklosporin inhiberer også lymfokin-produksjon i T-hjelper cellene in vitro, og sperrer utviklingen av modne CD8 og CD4 celler i thymus (Granelli-Piperno et al., 1986). Andre in vitro egenskaper av syklosporin inkluderer inhibering av IL-2 produserende T-lymfocytter og cytotoksiske T-lymfocytter, inhibering av IL-2 frigjort av aktiverte T-celler, inhibering av hvilende T-lymfocytter som respons til alloantigen og eksogent lymfokin, inhibering av IL-1 produksjon, og inhibering av mitogen-aktivering av IL-2 produserende T-lymfocytter (Granelli-Piperno et al., 1986).

Syklosporin er en kraftig immunosuppressiv forbindelse som har vist seg å undertrykke humoral immunitet og celle-medierte immun-reaksjoner så som transplantat-avvisning, forsenket hypersensitivitet, eksperimentell allergisk encefalomyelitt, Friends adjuvans artritt og transplantat kontra vert sykdom. Det blir benyttet for forebygging av organ-avvisning etter organ-transplantasjon, for behandling av reumatisk artritt, for behandling av psoriasis, og for behandling av autoimmune sykdommer, inkludert type I diabetes, Crohns sykdom, lupus og lignende.

Siden den opprinnelige oppdagelsen av syklosporin, har en rekke naturlig forekommende syklosporiner blitt isolert og identifisert, og mange ytterligere ikke-naturlig forekommende syklosporiner er framstilt ved total- eller semi-syntetiske hjelpemidler eller ved bruk av modifiserte dyrknings-teknikker. Klassen omfattende syklosporiner er derfor nå betydelig og inkluderer for eksempel de naturlige forekommende syklosporinene A til Z (jfr. Traber et al (1977); Traber et al (1982), Kobel et al (1982); og von Wartburg et al (1986)), samt en rekke ikke-naturlig forekommende syklosporin-derivater og kunstige eller syntetiske syklosporiner inkludert dihydro og iso-syklosporiner; derivatiserte syklosporiner (dvs. hvorved 3'-O atomet av -MeBmt-resten actyleres eller en ytterligere substituent introduseres ved  $\alpha$ -karbonatomet på sarcosyl-resten ved 3-posisjonen); syklosporiner hvorved -MeBmt- resten er tilstede i en isomer-form (dvs hvorved konfigurasjonen over posisjon 6' og 7' av -MeBmt-resten er cis heller en trans); og syklosporiner hvorved variant-aminosyrer er innlemmet ved spesifikke posisjoner inne i peptid-sekvensen, for eksempel ved å benytte den totalt syntetiske framgangsmåten for produksjon av syklosporiner, utviklet av R. Wenger, se for eksempel Traber et al. (1977), Traber et al (1982); og Kobel et al (1982); US patent 4,108,985, 4,210,581, 4,220,641, 4,288,431, 4,554,351 og 4,396,542, Europeisk Patent Publikasjon 0 034 567 og 0 056 782, internasjonal Patent Publikasjon WO 86/02080; Wenger (1983), Wenger (1985) og Wenger (1986). Syklosporin A analoger inneholdende

modifiserte aminosyrer i 1-posisjonen er rapportert av Rich et al. (1986). Immunosuppressive, anti-inflammatoriske og anti-parasittiske syklosporin A analoger er beskrevet i US patent 4,384,996; 4,771,122; 5,284,826; og 5,525,590, alle overdratt til Sandoz. Ytterligere syklosporin-analoger er omtalt i WO 99/18120, overdratt til Isotechnika. Begrepene Ciclosporin, ciclosporin, syklosporin og Syklosporin benyttes vekslende, og viser til syklosporin.

Det er et antall skadelige effekter forbundet med syklosporin A behandling, inkludert nefrotoksisitet, hepatotoksisitet, cataractogenese, hirsutisme, parathesis og gingival hyperplasi for nå nevne noen (Sketris et al., 1995). Av disse er nefrotoksisitet en av de mer alvorlige, dose-relaterte skadelige effektene som resulterer fra syklosporin A administrasjon. Produkter som frigir syklosporin A medikament-produkter umiddelbart (f.eks. Neoral® og Sandimmune®) kan forårsake nefrotoksisiteter og andre giftige bieffekter på grunn av den hurtige frigivelsen og absorpsjonen av høye blod-konsentrasjoner av medikamentet. Det er påstått at toppkonsentrasjonen av medikamentet er forbundet med bieffektene (Bennett, 1998). Den eksakte mekanismen hvorved syklosporin A analoger forårsaker nyre-skade er ikke kjent, imidlertid er det foreslått at en økning i nivået av vasokonstrikte substanser i nyren fører til vasokonstriksjonen av afferente glomerulære arterioler. Dette kan resultere i nyre-iskemia, en nedgang i glomerulær filtrasjons-hastighet, og over lang tid, interstitiell fibrose. Når dosen reduserer eller andre immunosuppressive forbindelser blir erstattet, forbedres nyre-funksjonen (Valantine og Schroeder, 1995).

Det er derfor et behov for immunosuppressive forbindelser som er effektive og som har redusert toksisitet.

Syklosporin-analoger som inneholder modifiserte aminosyrer i 1-posisjon, er omtalt i WO 99/18120, som er overdratt til søkeren av foreliggende søknad, og tatt med her i sin helhet. US provisorisk patentsøknad 60/346,201, også overdratt til søker av foreliggende søknad, omtaler en særlig foretrukket syklosporin A analog omtalt som "ISA-TX247". Denne analogen er strukturelt identisk med syklosporin A, bortsett for modifikasjon ved 1-aminosyre resten. Søkere oppdaget at enkelte blandinger av cis og trans isomere av ISATX247 oppviste en kombinasjon av forbedret kraft, og/eller redusert toksisitet i forhold til naturlig forekommende og nåværende kjente syklosporiner. Enkelte alkylerte, arylerte og deutererte derivater av ISATX247 ble også omtalt.

Vanligvis strekker de omtalte blandinger i US provisorisk patentsøknad 60/346,201 fra omtrent 10 til 90 vektprosent av trans-isomeren og omtrent 90 til 10 vekt% av cis-isomeren; i en annen utførelse inneholder blandingen omtrent 15 til 85 vekt% av trans-isomeren og omtrent 85 til 15 vekt% av cis-isomeren; i en annen utførelse inneholder blandingen omtrent 25 til 75 vekt% av trans-isomeren og omtrent 75 til 25 vekt% av cis-isomeren; i en annen utførelse inneholder blandingen omtrent 35 til 65 vekt% av trans-isomeren og omtrent 65 til 35 vekt% av cis-isomeren; i en annen utførelse inneholder blandingen omtrent 45 til 55 vekt% av trans-isomeren og omtrent 55 til 45 vekt% av cis-isomeren. I en annen utførelse er den isomeriske blandingen en ISATX247

blanding som omfatter omtrent 45 til 50 vekt% av trans-isomeren og omtrent 50 til 55 vekt% av cis-isomeren. Disse vektprosent-tallene er basert på den totale vekten av blandingen. Med andre ord, en blanding kan inneholde 65 vekt% av (E)-isomeren og 34 vekt% av (Z)-isomeren, eller motsatt. I en alternativ nomenklatur, kan cis-isomeren også beskrives som en (Z)-isomer, og trans-isomeren kan også kalles en (E)-isomer.

Det er følgelig et behov innen området for framgangsmåter for å framstille syklosporin-analoger, inkludert isomere av ISATX247. Det er nødvendig med syntetiske ruter som produserer forrikete blandinger av de individuelle isomerene, samt blandinger av isomerene med et ønsket forhold mellom de to isomerene. Framgangsmåter for framstilling av derivater av ISATX247 er også nødvendig.

### **Oppfinnelsen**

Syklosporin og dens analoger er med i en klasse sykliske polypeptider som har sterk immuno-suppressiv aktivitet. Til tross for fordelene disse medikamentene har med hensyn til de immuno-suppressive, anti-inflammatoriske og anti-parasittiske aktivitetene, er det et antall skadelige effekter forbundet til syklosporin A terapi, inkludert nefrotoksisitet og hepatotoksisitet. Det er følgelig et behov for nye immunosuppressive forbindelser som opprettholder farmakologisk aktivitet som det naturlig forekommende syklosporin A, men uten en eller flere av de forbundete giftige bieffektene.

Utførelser av den foreliggende oppfinnelsen framskaffer enkelte blandinger av cis og trans-isomere av syklosporin A analoger, som er farmasøytisk nyttige. En foretrukket analog er omtalt som ISATX247. Blandinger av ISATX247 isomere oppviser en kombinasjon av forbedret kraft og redusert toksisitet i forhold til naturlig forekommende og nåværende kjente syklosporiner.

Den foreliggende oppfinnelsen er delvis basert på oppdagelsen av at enkelte isomeriske blandinger av analoger av syklosporin gir overlegne immunosuppressive effekter uten de skadelige effektene som er forbundet med syklosporin A. Særlig ble det uventet oppdaget at isomeriske blandinger (dvs. blandinger av både cis- og trans-isomere) fra omtrent 10:90 til omtrent 90:10 (trans- til cis-) av syklosporin analoger modifisert ved 1-aminosyre-resten, gir overlegen effektivitet og sikkerhet. Eksempler på slike analoger er omtalt i WO 99/18120, og inkluderer deuteraterte og ikke deuteraterte forbindelser. Særlig har blandinger i området fra omtrent 45:55 til omtrent 50:50 (trans- til cis-) og i området fra omtrent 50 til 55% trans- og omtrent 45 til omtrent 50 % cis vist seg å være spesielt effektive. Dessuten er det vist at disse isomer-blandingene oppviser en kombinasjon av overlegen kraft og redusert toksisitet i forhold til naturlig forekommende og andre nåværende kjente syklosporiner og syklosporin analoger.

En særlig foretrukket analog (heretter omtalt som "ISATX247") er strukturelt lik syklosprin A med unntak av en modifisert funksjonell gruppe i periferen av molekylet, ved 1-aminosyre-resten. Strukturen av denne spesielle isomeriske analog-blanding sammenlignet med strukturen av syklosporin A er vist i figur 1A, 1B, 2A, 2B.

De isomeriske blandingene kan blant annet benyttes for immunosuppresjon, og for behandling av ulike immun-lidelser, sykdommer og tilstander, inkludert forebygging, kontroll, lindring og behandling.

I samsvar med utførelser av foreliggende oppfinnelse, blir ISATX247 isomere (og derivater av det) syntetisert via stereoselektive ruter som kan variere i graden av selektivitet. Stereoselektive ruter gir blandinger som er forriktet på en av (E)- og (Z)-isomerene, og disse blandingene kan kombineres slik at den resulterende blandingen har et ønsket forhold mellom de to isomerene. Alternativt, kan reaksjons-forholdene av en stereoselektiv rute målsettes for å gi det ønskete forholdet direkte i en framstilt blanding. Prosentandelen av en isomer eller en annen i en blanding, kan bekreftes ved bruk av nukleær magnetisk resonans spektroskopi (NMR) eller andre teknikker som er velkjente innen faget.

Hver av rutene fortsetter vanligvis med påføring av en beskyttende gruppe på en sensitiv alkohol-funksjonell gruppe. I en utførelse er alkoholen beskyttet som et acetat, i andre utførelser er de beskyttende gruppene benzoat-estere eller silyl-eter. Selv om acetat- beskyttende grupper er vanlig innen faget, er det viktig å fremheve at i mange av de eksemplifiserte utførelsene beskrevet her, kan enkelte uønskete bireaksjoner omfattende en acetat-beskyttende gruppe, unngås ved bruk av beskyttende grupper så som benzoat-estere eller silyl-eter.

Den beskyttete forbindelsen kan deretter fungere som en forløper for en rekke stereoselektive synteseruter, inkludert noen som utnytter fosfor-holdige reagenter som deltakere i en Wittig reaksjon, og uorganiske elementer som medlemmer av organometalliske reagenter. Den siste typen kan fortsette videre gjennom seks-ringete overgangs-tilstander hvor sterisk hindring dikterer den endelige konformasjonen. Mange organometalliske reagenter er tilgjengelige, inkludert de som har innslag av uorganiske elementer så som bor, silisium, titan, litium og svovel. Individuelle isomere kan framstilles fra enkle eller multiple forløpere.

Forholdet mellom (E)- og (Z)-isomere kan i enhver blanding, uansett om den er framstilt stereoselektivt eller ikke-stereoselektivt, ha en lang rekke verdier. For eksempel kan blandingen omfatte fra omtrent 10 til 90 vektprosent av (E)-isomerer og omtrent 90 til 10 vekt% av (Z)-isomerer. I andre utførelser kan blandingen inneholde fra omtrent 15 til 85 vekt% av (E)-isomerer og omtrent 85 til 15 vekt% av (Z)-isomerer; i en annen utførelse inneholder blandingen omtrent 25 til 75 vekt% av (E)-isomerer og omtrent 75 til 25 vekt% av (Z)-isomerer; i en annen utførelse inneholder blandingen omtrent 35 til 65 vekt% av (E)-isomerer og omtrent 65 til 35 vekt% av (Z)-isomerer; i en annen utførelse inneholder blandingen omtrent 45 til 55 vekt% av (E)-isomerer og

omtrent 55 til 45 vekt% av (Z)-isomerer. I en annen utførelse er den isomeriske blandingen en ISATX247 blanding som omfatter omtrent 45 til 50 vekt% av (E)-isomerer og omtrent 50 til 55 vekt% av (Z)-isomerer. Disse vektprosent-tallene er basert på den totale vekten av blandingen, og det vil forstås av summen av vekt-% andelene av (E)-isomerer og (Z)-isomerer er 100 vekt%. Med andre ord, en blanding kan inneholde 65 vekt% av (E)-isomerer og 35 vekt% av (Z)-isomerer, eller motsatt.

Følgelig framskaffer foreliggende oppfinnelse i et aspekt, framgangsmåter for å framstille en blanding av isomeriske syklosporin A analoger, modifisert ved 1 aminosyre-resten, hvorved synteseruten omfatter trinnene: oppvarming av et acetyl- $\eta$ -halosyklosporin A med trialkylfosfin, triarylfosfin (f.eks. trifenylfosfin), arylalkylfosfin og triarylsarin for å produsere et mellomliggende fosfonium-halid av acetyl-syklosporin A; framstilling av en blanding av (E)- og (Z)-isomere av acetyl-1,3-diene ved å røre mellomproduktet fosfoniumhalid av acetyl-syklosporin A med formaldehyd, eventuelt i nærvær av et litium-halid, og framstilling av en blanding av (E)- og (Z)-isomere av ISATX247 ved å behandle blandingen av (E)- og (Z)-isomere av acetyl-1,3-diene, med en base. I et annet aspekt, er oppfinnelsen rettet mot framgangsmåter for framstilling av en blanding av isomere av syklosporin A analoger, modifisert ved 1-aminosyre-resten, hvorved synteseruten omfatter trinnene for å: konvertere et mellomprodukt, for eksempel beskyttet trimetylsilyl (TMS) syklosporin A aldehyd eller acetyl-syklosporin A aldehyd til en blanding av (E)- og (Z)-isomere av acetyl-1,3-diene ved å reagere mellomproduktet med et fosforholdig ylide via en Wittig reaksjon, eventuelt i nærhet av et litium-halid; og framstilling av en blanding av (E)- og (Z)-isomere av ISATX247 ved å behandle blandingen av (E)- og (Z)-isomere av acetyl-1,3-diene, med en base i tilfelle den acetyl-beskyttende gruppen, eller for eksempel en syre i tilfelle for TMS beskyttende gruppe.

I et ytterligere aspekt, er oppfinnelsen rettet mot framgangsmåter for å produsere en E-isomer forrikt blanding av syklosporin A analoger modifisert ved 1-aminosyre-resten, hvorved den stereoselektive syntesen av det E-isomer-forrikete materialet omfatter trinnene for å: reagere et acetyl-syklosporin A aldehyd med en reagent valgt fra gruppen omfattende trialkylsilylallyl-boronat-ester og E- $\gamma$ -(trialkylsilylallyl)dialkylboran for å danne en  $\beta$ -trialkylsilyl-alkohol, behandle  $\beta$ -trialkylsilyl alkoholen med syre for å danne acetyl-(E)-1,3-diene, og behandle acetyl-(E)-1,3-diene med base for å danne (E)-isomerer av ISATX247.

I nok et ytterligere aspekt, er oppfinnelsen rettet mot framgangsmåter for å produsere en blanding forrikt på Z-isomere av syklosporin A analoger modifisert ved 1 aminosyre-resten, hvorved den stereoselektive syntesen av det Z-isomer forrikete materialet omfatter trinnene for å: reagere et acetyl-syklosporin A aldehyd med en reagent valgt fra gruppen omfattende trialkylsilylallyl-boronat-ester og (E- $\gamma$ -trialkylsilylallyl)-dialkylboran for å danne en  $\beta$ -trialkylsilyl-alkohol,

behandle  $\beta$ -trialkylsilyl alkoholen med en base for å danne acetyl-(Z)-1,3-diene, og behandle acetyl-(Z)-1,3-diene med base for å danne (Z)-isomeren av ISATX247.

I nok et ytterligere aspekt, er oppfinnelsen rettet mot framgangsmåter for å produsere en blanding forriket på E-isomere av syklosporin A analoger modifisert ved 1 aminosyre-resten, hvorved den stereoselektive syntesen av det E-isomer forriket materialet omfatter trinnene for å: reagere et acetyl-syklosporin A aldehyd med et litert allyldifenylfosfin-oksidd for å danne acetyl-(E)-1,3-diene; og behandle acetyl-(E)-1,3-dienet med en base for å danne (E)-isomeren av ISATX247.

I nok et ytterligere aspekt, framskaffer oppfinnelsen en framgangsmåte for produksjon av en Z-isomer forriket blanding av syklosporin A analoger modifisert ved 1-aminosyre-resten, idet den stereoselektive syntesen av det Z-isomer forrikete materialet omfatter trinnene for å: reagere et acetyl-syklosporin A aldehyd med [3-(difenylfosfino)allyl]titan for å danne et titan-holdig mellomprodukt, la det titanholdige mellomproduktet fortsette til et erythro- $\alpha$ -addukt; konvertere erythro- $\alpha$ -adduktet til et  $\beta$ -oksidofosfonium-salt ved å behandle med iodmetan; konvertere  $\beta$ -oksidofosfoniumsalt til et acetyl-(Z)-1,3-diene, og behandle acetyl-(Z)-1,3-dienet med base for å danne (Z)-isomeren av ISATX247.

I enda et ytterligere aspekt, framskaffer oppfinnelsen blandinger av (E)- og (Z)-isomere framstilt med en prosess omfattende trinnene for å: beskytte  $\beta$ -alkoholen av syklosporin A for å danne acetyl-syklosporin A; bromere  $\eta$ -karbonet på sidekjeden av 1-aminosyre-resten på acetyl-syklosporin A for å gi et første mellomprodukt acetyl- $\eta$ -bromsyklosporin A; varme opp det første mellomprodukt acetyl- $\eta$ -bromsyklosporin A med en reagent valgt fra gruppen omfattende trifenylfosfin og trialkylfosfin for å produsere et andre mellomprodukt valgt fra gruppen omfattende trifenyl- og trialkylfosfonium-bromid av acetyl-syklosporin A; framstille en blanding av (E)- og (Z)-isomere av acetyl-1,3-diene ved å røre ylidet generert fra trifenyl- eller trialkylsilyl-saltet (andre mellomprodukt trifenylfosfonium bromid) av acetyl-syklosporin A med formaldehyd; og framstilling av blandingen av (E)- og (Z)-isomere av ISATX247 ved å behandle blandingen av (E)- og (Z)-isomere av acetyl-1,3-diene med en base.

Oppfinnelsen er også rettet mot blandinger av materialer, inkludert trifenyl- og trialkylfosfonium-bromider av acetyl-syklosporin A, produktet framstilt av en prosess omfattende trinnene for å: beskytte  $\beta$ -alkoholen av syklosporin A, brominere  $\eta$ -karbonet på sidekjeden av 1-aminosyre-resten av syklosporin A for å produsere et første mellomprodukt acetyl- $\eta$ -bromsyklosporin A; og varme opp det første mellomprodukt acetyl- $\eta$ -bromsyklosporin A med en reagent valgt fra gruppen omfattende trifenylfosfin og trialkylfosfin for å produsere et bromid av acetyl-syklosporin A valgt fra gruppen omfattende trifenyl- og trialkylfosfonium-bromider av acetyl-syklosporin A. Det er også framskaffet blandinger omfattende en trifenyl eller trialkylfosfonium-bromid derivat av acetyl-syklosporin A og blandingene omfattende et  $\beta$ -trimetylsilyl-alkohol-derivat av syklosporin A.

I et ytterligere aspekt framskaffer oppfinnelsen framgangsmåter for selektiv framstilling av syklosporin A aldehyd omfattende trinnene for å: beskytte  $\beta$ -alkoholen av syklosporin A ved å danne acetyl-syklosporin A eller trimetylsilyl (TMS) syklosporin A; og oksidere acetyl-syklosporin A eller TMS syklosporin A med ozon som den oksiderende forbindelsen brukt med en reduserende forbindelse.

I et annet ytterligere aspekt er oppfinnelsen rettet mot framgangsmåte for framstilling av en blanding av isomeriske syklosporin A analoger modifisert ved 1-aminosyre-resten, hvorved synteseruten omfatter trinnene for å: konvertere et mellomprodukt acetyl-syklosporin A aldehyd til en blanding av (E)- og (Z)-isomere av acetyl-1,3-diene ved å reagere mellomproduktet med et fosforholdig ylide framstilt fra et tributylallylfosfonium-halogenid via en Wittig reaksjon, eventuelt i nærvær av et litium halid; og framstilling av en blanding av (E)- og (Z)-isomere av ISATX247 ved å behandle blandingen av (E)- og (Z)-isomere av acetyl-1,3-diene med en base.

I et ytterligere aspekt, framskaffer oppfinnelsen framgangsmåter for stereoselektiv syntese av E-isomeren av ISATX247 omfattende trinnene for å: reagere et trimetylsilyl (TMS) syklosporin A aldehyd med trialkylsilylallyl boran for å danne en  $\beta$ -trialkylsilyl alkohol; behandle  $\beta$ -trialkylsilyl alkoholen for å danne E-isomeren av ISATX247 direkte.

Et annet aspekt av oppfinnelsen er rettet mot framgangsmåter for den stereoselektive syntesen av Z-isomeren av ISATX247 omfattende trinnene for å: reagere et trimetylsilyl (TMS) syklosporin A aldehyd med trialkylsilylallyl boran for å danne et  $\beta$ -trialkylsilyl-alkohol; behandle  $\beta$ -trialkylsilyl alkoholen med en base for å danne TMS-(Z)-1,3-diene; og avbeskytte TMS-(Z)-1,3-dienet for å danne Z-isomeren av ISATX247.

Oppfinnelsen er også rettet mot framgangsmåter for framstilling av blandinger av isomeriske syklosporin A analoger modifisert ved 1-aminosyre-resten, framgangsmåten omfatter en synteserute som framstiller en (E)-isomer og en (Z)-isomer av ISATX247 slik at (E)-isomeren og (Z)-isomeren er tilstede i blandingen i et forhandsbestemt forhold, hvorved synteseruten omfatter trinnene for å: beskytte  $\beta$ -alkoholen av syklosporin A, oksidere det beskyttet syklosporin A for å produsere et andre mellomprodukt beskyttet syklosporin A aldehyd, konvertere den andre mellomprodukt beskyttete syklosporin A aldehydet til en blanding av E- og Z-isomere av beskyttet 1,3-diene ved å reagere den andre mellomproduktet med et fosforholdig ylide via en Wittig reaksjon, eventuelt i nærvær av et litium-halid, og framstille en blanding av E- og Z-isomere ved å avbeskytte det beskyttete 1,3-dienet.

Andre framgangsmåter for å framstille slike blandinger som også er framskaffet av oppfinnelsen inkluderer framgangsmåter for framstilling av en blanding av isomeriske syklosporin A analoger modifisert ved 1-aminosyre-resten, framgangsmåten omfatter en synteserute som framstiller en (E)-isomer og en (Z)-isomer av ISATX247 slik at (E)-isomeren og (Z)-isomeren er tilstede i blandingen i et forhandsbestemt forhold, hvorved forholdet av isomere i blandingen

varierer fra omtrent 45 til 55 vektprosent av (E)-isomeren og omtrent 55 til 45 vekt% av (Z)-isomeren, basert på total vekt av blandingen.

Oppfinnelsen framskaffer også framgangsmåter for framstilling av en forhandsbestemt blanding av isomeriske syklosporin A analoger modifisert ved 1-aminosyre-resten, framgangsmåten omfatter: framstilling av et første material forrikt på en (E)-isomer av ISATX247; framstilling av et andre material forrikt på en (Z)-isomer av ISATX247; og blanding av det første og andre materialet i et forhold som er beregnet for å gi den ønskete isomeriske blandingen.

I det følgende vil oppfinnelsen beskrives med henvisning til figurer, hvor

figur 1A viser strukturen av syklosporin A, viser 11 aminosyre-resten som omfatter den sykliske peptid-ringen av molekylet, samt strukturen av sidekjeden av 1-aminosyre-resten,

figur 1B viser en annen illustrasjon av strukturen av syklosporin A med særlig vekt på definisjonen av begrepet "CsA" slik det er benyttet i foreliggende beskrivelse,

figur 2A viser strukturen av E-isomeren (eller trans-isomeren) av syklosporin A analogen, kalt ISATX247,

figur 2B viser strukturen av Z-isomeren (eller cis-isomeren) av syklosporin A analogen ISATX247,

figur 3 viser en oversikt over et eksempel på en synteserute som kan benyttes for å framstille syklosporin analoger i samsvar med foreliggende oppfinnelse, idet stereoselektive ruter er gruppert i samsvar med reaktive forhold,

figur 4 viser en synteserute som gir en blanding av (E)- og (Z)-isomere av ISATX247, fra en brom-forløper,

figur 5 viser en annen synteserute som gir en blanding av (E)- og (Z)-isomere av ISATX247 fra en aldehyd forløper,

figur 6 viser et eksempel på et stereoselektivt reaksjons-skjema som kan benyttes for å framstille blandinger forrikt på enten (E)-eller (Z)-isomeren av ISATX247, idet begge isomerene kan framstilles fra den samme forløper-alkoholen,

figur 7 viser et alternativt reaksjons-skjema for den stereoselektive syntesen av en blanding forrikt på (Z)-isomeren av ISATX247,

figur 8 viser et alternativt reaksjons-skjema for den stereoselektive syntesen av en blanding forrikt på (E)-isomeren av ISATX247,

figur 9 A-C viser et eksempel på synteseruter for framstilling av en blanding av (E)- og (Z)-isomerene av ISATX247, forholdene for hver reaksjon er målsatt for å gi et spesielt eksempel-forhold mellom de to isomerene,

figur 10 viser et eksempel på synteseruter for framstilling av en blanding av (E)- og (Z)-isomerene av ISATX247, hvor blandinger forrikt på en av de to isomerene framstilles først, og deretter blandes i et forhands-definerte forhold for å oppnå de ønskete forholdene,

figur 11 viser resultatene av en analyse som viser at inhiberingen av calcineurin fosfatase-aktivitet ved ISATX247 (45-50 % E-isomer og 50-55 % Z-isomer) var opptil 3-ganger kraftigere (bestemt med IC50) enn syklosporin A,

figur 12 framstiller strukturen og en isomerisk blanding av noen deutererte og ikke-deutererte analoge isomeriske blandinger,

figur 13 viser resultatene av en analyse som viser at inhiberingen av calcineurin fosfatase aktivitet av ulike deutererte og ikke-deutererte analoge isomeriske blandinger, var minst like kraftig (bestemt med IC50), sammenlignet med syklosporin A.

### Syntese

Syklosporin og dets analoger er en del av en klasse sykliske polypeptider med kraftig immuno-suppressiv aktivitet. Til tross for fordelene disse medikamentene tilbyr med hensyn til immuno-suppressiv, anti-inflammasjons og anti-parasittisk aktiviteter, er det et antall uheldige effekter forbundet med syklosporin A behandling, som inkluderer nefrotoksisitet og hepatotoksisitet. Det er derfor et behov for nye immunosuppressive forbindelser som er like farmakologisk aktive som den naturlig forekommende forbindelsen syklosporin A, men uten de forbundete giftige bieffektene.

Søkere har tidligere omtalt en syklosporin A analog, omtalt som "ISATX247". Denne analogen er strukturelt lik syklosporin A, med unntak for modifiseringer ved 1-aminosyre-resten. Søkerne oppdaget at enkelte blandinger av cis- og trans-isomere av ISATX247 oppviste en kombinasjon av forbedret kraft, og redusert toksisitet, i forhold til naturlig forekommende og nåværende kjente syklosporiner.

I samsvar med utførelser av foreliggende oppfinnelse, blir ISATX247 isomere (og derivater av det) syntetisert ved stereospesifikke ruter som kan variere i graden av stereoselektivitet. Stereoselektive ruter gir blandinger som er forriktet på en av (E)- og (Z)-isomerene, og disse blandingerne kan kombineres slik at den resulterende blandingen har det ønskete forholdet mellom de to isomerene. Alternativt kan reaksjons-forholdene for en stereospesifikk rute målsettes for å gi det ønskete forholdet direkte i den framstilte blandingen.

Det kjemiske navnet på en av de immunosuppressive syklosporin-analogene i samsvar med foreliggende oppfinnelse, kalt ISATX247, er kjemisk beskrevet av navnet syklo{{E,Z}}-(2S, 3R, 4R)-3-hydroksy-4-metyl-2-(metylamino)-6,8-nonadienoyl-L-2-aminobutyryl-N-metyl-glylsyl-N-metyl-L-Leucyl-L-valyl-N-metyl-L-leucyl-L-alanyl-D-alanyl-N-metyl-L-leucyl-N-metyl-L-leucyl-N-metyl-L-valyl}. Dets empiriske formel er C<sub>63</sub>H<sub>111</sub>N<sub>11</sub>O<sub>12</sub>, og har en molekylvekt på omtrent 1214,85. Begrepet ISATX247 er et varenavn gitt til denne farmakologisk aktive forbindelsen.

Strukturen av ISATX247 er hovedsakelig bekreftet ved nukleær magnetisk resonans (NMR) spektroskopi. Både <sup>1</sup>H og <sup>13</sup>C spektrene ble bestemt ved bruk av en serie av en- og to-

dimensjonale NMR-forsøk, og ved sammenligning med de kjente NMR-karakteristikkene (eng. NMR assignments) for syklosporin A. De absolutte karakteristikkene for (E)- og (Z)-isomerene av ISATX247 ble bekreftet ved Nuclear Overhauser Effect (NOE) eksperiment. Ytterligere støttende bevis ble framskaffet ved masse-spekter analyser, som bekreftet molekylvekten, og ved det infrarøde spekteret, som var svært likt syklosporin A. Det siste var forventet, gitt likheten mellom de to forbindelsene.

Strukturen av syklosporin A er vist i figur 1A. Strukturen inkluderer identifikasjon av de 11 aminosyre-restene som omfatter den sykliske peptid-ringen av molekylet. Disse 11 aminosyre-restene er merket med nummer som øker med klokka, og starter med aminosyren som er vist ved topp-senter av ringen (og identifisert med merket "1-aminosyre"). Den første aminosyren er omsluttet av en stiplet boks for klarhet. Side-kjeden av 1-aminosyre-resten er tegnet ut kjemisk, ettersom det er ved denne generelle plasseringen at de syntetiske reaksjonene som er beskrevet her, foregår. Som vanlig er karbonet i naboposisjon til karbonyl-gruppen av en aminosyre merket som  $\alpha$ -karbonet, hvor etterfølgende bokstaver i det greske alfabetet er benyttet for å merke tilstøtende karboner i retning nedover kjeden, bort fra peptid-ringen. I tilfellet for syklosporin A, som vist i figur 1A, er  $\beta$ -karbonet på sidekjeden bundet til en hydroksyl-gruppe, og det er en trans-orientert dobbel-binding mellom  $\epsilon$  og  $\zeta$ -karbonene på sidekjeden.

En annen skisse av syklosporin A strukturen er tegnet i figur 1B, hvor en annen del av molekylet er omsluttet av en stiplet boks. Denne figuren definerer nomenklaturen som skal benyttes i den foreliggende beskrivelsen, hvor begrepet "CsA" viser til den delen av syklosporin A som er omsluttet av boksen. Den nåværende nomenklaturen er et stenografisk hjelpemiddel for å vise området hvor de syntetiske reaksjonene beskrevet her, vil foregå (dvs. sidekjeden av 1-aminosyre resten, som er tegnet utenfor den stiplede boksen i figur 1B), uten at det er nødvendig å tegne resten av molekylet hver gang en reaksjon er beskrevet. Det vil være opplagt for fagpersoner at bindingen mellom  $\alpha$ - og  $\beta$ -karbonene på sidekjeden har normal lengde, og bare er fremhevet i denne tegningen for å bistå ved definisjonen av begrepet "CsA".

Som angitt ovenfor, er en særlig foretrukket syklosporin A analog omtalt som ISATX247, og dets to stereoisomere E (eller trans) og Z (eller cis) vist i henholdsvis figur 2A og 2B. Cis eller trans naturen av disse stereoisomerene refererer til konfigurasjonen av dobbel-bindingen mellom  $\epsilon$  og  $\zeta$  karbonene på sidekjeden, dvs. dobbelbindingen nærmere peptidringen, i motsetning til dobbel-bindingen ved enden av kjeden.

Det skal sies et ord om stereokjemisk nomenklatur. I den foreliggende beskrivelsen vil begrepene cis og (Z) brukes om hverandre, og begrepene trans og (E) vil brukes om hverandre. Bruk av begrepene "erytro" og "treo" vil holdes på et minimum på grunn av tydelig forvirring i litteraturen, med hensyn til betydning. Se R.W. Hoffmann og H.-J. Zei i "Stereo-selective synthesis of Alcohols. 8. Diastereoselective Synthesis of  $\beta$ -Methylhomoallyl Alcohols via Crotylboronates", J.

Org. Chem., Vol. 46, s. 1309 - 1314 (1981); A. Streitwieser og C.H. Heathcock, Introduction to Organic Chemistry, 2. utg. (Macmillan, New York, 1981), s 845-846; og M.B. Smith og J. March, March's Advanced Organic Chemistry (Wiley, New York, 2001), s. 144-147. I de få tilfellene hvor treo/erythro terminologien er benyttet her, er overenskomsten i Streitwieser og Heathcock benyttet, hvor "erythro"-isomere viser til (R,S) og (S,R) konfigurasjoner, og "treo"-isomere viser til (R,R) og (S,S) konfigurasjoner.

En siste kommentar til nomenklaturen angår den siste karbon-karbon dobbel-bindingen vist i figur 2A og 2B. I et alternerende nummererings-system kan karbonene i sidekjeden av 1-aminosyre-resten nummereres ved å starte med det siste ( $\theta$ ) karbonet, og arbeide seg tilbake til peptid-ringene. I dette systemet kan ISATX247 isomere omtales som 1,3-diener i samsvar med vanlig nomenklatur innen organisk kjemi, hvor hver dobbelbinding identifiseres ved dets lavest nummererte karbon.

Syntese-rutene vist i figur 3-8 vil nå beskrives. I samsvar med utførelser av foreliggende oppfinnelse, kan isomeriske blandinger framstilles direkte, hvor reaksjons-forholdene for en spesifikk syntese-rute er målsatt for å oppnå det ønskete forholdet mellom isomerene i blandingen. Alternativt kan det framstilles blandinger som er forriktet på en av de to geometriske isomerene av en syklosporin A analog, og blandingene kan kombineres i et forhandsdefinert forhold, for å oppnå den ønskete blandingen.

En oversikt over syntese-rutene i samsvar med utførelser av foreliggende oppfinnelse er gitt i figur 3, hvor særlig vekt er lagt på gruppering av reaksjons-ruter i samsvar med kjemi og stereoselektivitet. Med henvisning til figur 3, er syntese-ruter som nyttiggjør Wittig reaksjoner generelt vist på høyre side av diagrammet, som antydnet ved referansenummer 31, mens rutene 32 og 33 som nyttiggjør organometalliske reagenter som er antatt å danne seks-ringete overgangstilstander, er vist i midtre og venstre side av diagrammet. Hvilken som helst av synteserutene kan gi en blanding av isomerene, eller de kan gi blandinger forriktet på en av de to isomerene.

Utførelser av den foreliggende oppfinnelsen gir en rekke framgangsmåter for å ende opp med ønskete blandinger av isomere. Flexibiliteten og allsidigheten av syntese-strategiene som er omtalt her, kan delvis reflekteres av symmetriene og asymmetriene i figur 3. En reaksjon som er vanlig for hver av rutene, er beskyttelse av en funksjonell gruppe i syklosporin A 34; i denne eksemplifiserte utførelsen ved at reaksjonen er konversjon av syklosporin A 34 til acetyl-syklosporin A 35. En asymmetri i figur 3 er bruken av acetyl-syklosporin A-aldehyd-forbindelse 51 som en forløper for alle titan- og litium-organometall reagent-rutene, men bare for noen av de fosforholdige Wittig reaksjons-rutene.

Generelt kan syntese-ruter i figur 3, hvis reaksjons-forhold kan avstemmes for å gi en blanding med det ønskete forholdet mellom isomere, benytte fosforholdige reagenter som deltakere i en Wittig reaksjon. Andre stereoselektive ruter benytter også uorganiske elementer, vanligvis som

deler av organometalliske reagenter som fortsetter gjennom seks-ringete overgangs-tilstander hvor sterisk hindring avgjør hvilken konfigurasjon som oppnås. Et overflod av organometalliske reagenter er nyttige for foreliggende oppfinnelse, inkludert de som omfatter uorganiske element så som bor, silisium, titan, litium og svovel.

Blandinger forriktet på den ene av et par isomere, kan framstilles fra en enkelt forløper, alternativt kan de to blandingene framstilles fra ulike forløpere. I en av de stereoselektive rutene i figur 2 (rute 32), fører en enkelt forløper til begge isomerene av ISATX247, avhengig av hvilke reaksjons-forhold som er valgt. I en annen av de stereoselektive rutene (rute 33) er to ulike forløpere nødvendig for å gi hver av de forrikete blandingene.

Reaksjonene i figur 3 vil nå diskuteres i detalj. En reaksjon som er vanlig for hver av rutene, er beskyttelse av alkoholen i  $\beta$ -posisjon på sidekjeden av 1-aminosyre-resten. Et slikt beskyttelses-system takler et problem som man vanligvis støter på i organisk syntese, idet en første funksjonell gruppe uaktsomt blir endret av en reaksjon ment for en andre (lignende og/eller identisk) funksjonell gruppe plassert på et annet sted på molekylet. For å utføre systemet blir den første funksjonelle gruppen reagert med en beskyttende gruppe, den ønskete reaksjonen blir utført på en andre funksjonell gruppe, og den beskyttende gruppen blir deretter fjernet fra den første funksjonelle gruppen.

Beskyttende grupper er velkjente innen organisk syntese, og er diskutert av J.R. Hanson i kapittel 2, "The protection of Alcohols" i publikasjonen *Protecting Groups in Organic Synthesis* (Sheffield Academic Press, Sheffield, England, 1999), s. 24-25. Hanson belærer hvordan hydroksyl-grupper kan beskyttes ved å konvertere dem enten til estere eller etere. Acetat-estere er kanskje den mest benyttete typen av kjemi for å beskytte hydroksyl-grupper. Det er en lang rekke forhold som kan benyttes for å innføre acetat-gruppen. Disse reagentene og løsningsmidlene inkluderer acetisk anhydrid og -pyridin, acetisk anhydrid, -pyridin og -dimetylaminyridin (DMAP); acetisk anhydrid og natriumacetat, acetisk anhydrid og toluene-p-sulfonsyre, acetyl-klorid, pyridin og DMAP og keten. DMAP er en nyttig acetylerings-katalysator på grunn av dannelsen av et svært reaktivt N-acylpyridinium-salt fra anhydridet.

I en utførelse av foreliggende oppfinnelse, blir  $\beta$ -alkoholet av syklosporin A 34 beskyttet som et acetat ved å reagere 34 med acetyl-klorid, etyl-acetat eller kombinasjoner av disse, hvilket danner forbindelsen acetyl-syklosporin A 35. I en annen utførelse gjennomgår  $\beta$ -alkoholet et nukleofilt tillegg til acetisk anhydrid, hvilket danner acetyl-syklosporin A 35 og eddiksyre. Disse reaksjonene kan utføres i nærvær av dimetylaminyridin (DMAP) hvor et overskydd av acetisk anhydrid fungerer som løsningsmiddel. I disse tilfellene kan prefikset "acetyl" benyttes i nomenklaturen gjennom syntese-ruten, eller inntil acetyl-gruppen er fjernet. For eksempel er det siste mellom-produktet i en rute med en acetyl-gruppe ved  $\beta$ -karbonet, kalt "acetyl-(E)-1,3-diene".

Selv om framstillingen av acetyl-syklosporin A er velkjent i litteraturen, vil det bli forstått av fagpersoner at beskyttende grupper andre enn acetat-estere kan benyttes for å beskytte  $\beta$ -alkoholen på 1-aminosyre-resten av syklosporin A 34. Disse beskyttende gruppene kan inkludere benzoat-estere, substituerte benzoat-estere, etere, og silyl-etere. Under enkelte reaksjons-forhold er den acetat-beskyttende gruppen tilbøyelig til uønskete bireaksjoner så som eliminering og hydrolyse. Ettersom benzoat-estere, etere og silyl-etere ofte er mer resistent overfor slike bireaksjoner, under de samme reaksjons-forholdene, er det ofte fordelaktig å bruke slike beskyttende grupper framfor acetat. Syklosporin eller syklosporin-derivater som er beskyttet av en acetyl-gruppen eller enhver annen beskyttende gruppe er omtalt som "beskyttet syklosporin A". På samme måte vil det ultimate mellomproduktet i den eksemplifiserte ruten ovenfor, bli kalt "beskyttet-(E)-1,3-diene" i stedet for acetyl-(E)-1,3-diene. Egenskapene av den valgte beskyttende gruppen kan ha innvirkning på det ønskete forløpet i de ytterligere trinnene i reaksjons-sekvensene.

Med henvisning til figur 3, har acetyl-syklosporin A 35 i den eksemplifiserte ruten en beskyttet  $\beta$ -alkohol, og denne forbindelsen fungerer som en forløper for syntesen av ISATX247 isomere i flere av syntese-rutene. Wittig reaksjons-ruter vil diskuteres først.

#### **Syntese av blandinger av (E)- og (Z)-isomere av ISATX247 via Wittig reaksjonen**

Wittig reaksjons-rutene eksemplifisert her er identifisert ved referanse-nummer 31 i figur 3. Framgangsmåte 1 går via brom-mellomproduktet acetyl- $\eta$ -bromsyklosporin 41, mens framgangsmåte 2 benytter acetyl-syklosporin A aldehyd 51 som et utgangspunkt. De eksemplifiserte framgangsmåtene beskrevet nedenfor utnytter en Wittig reaksjon for å innføre en alkene funksjonalitet med en blanding av stereokjemiske konfigurasjoner.

Wittig reaksjonene benyttet i de eksemplifiserte utførelsene omtalt her, kan utføres i nærvær av et litium-halid. Nærværet av litium-halider i Wittig reaksjoner er velkjent for å ha effekt på forholdet av geometriske isomere som produseres, og derfor kan tillegget av en slik forbindelse behjelpe produksjonen av en ønsket blanding av (E)- og (Z)-isomerene av ISATX247.

#### **Framgangsmåte 1**

I en utførelse av foreliggende oppfinnelse, er en blanding av (E)- og (Z)-isomerene ISATX247 framstilt som vist i figur 4. Bruken av den bølge-formete framstillingen i figur 4 (se særlig forbindelse 43 og 44) ment å vise at den eksemplifiserte reaksjons-sekvensen gir en blanding av (E)- og (Z)-isomere. I en utførelse varierer den prosentvise andelen av (E)- og (Z)-isomere fra omtrent 10 til 90 prosent av (E)-isomere til omtrent 90 til 10 % av (Z)-isomeren, men disse områdene er bare eksempler, og mange andre områder er mulige. For eksempel kan blandingen inneholde fra omtrent 15 til 85 vekt% av (E)-isomeren og omtrent 85 til 15 vekt% av (Z)-isomeren. I

andre utførelser inneholder blandingen omtrent 25 til 75 vekt% av (E)-isomerer og omtrent 75 til 25 vekt% av (Z)-isomerer; omtrent 35 til 65 vekt% av (E)-isomerer og omtrent 65 til 35 vekt% av (Z)-isomerer, og omtrent 45 til 55 vekt% av (E)-isomerer og omtrent 55 til 45 vekt% av (Z)-isomerer. I nok en annen utførelse, er den isomeriske blandingen en ISATX247 blanding som omfatter omtrent 45 til 50 vekt% av (E)-isomerer og omtrent 50 til 55 vekt% av (Z)-isomerer. Disse vektprosent-tallene er basert på den totale vekten av blandingen, og det vil forstås at summen av vekt% av (E)- og (Z)-isomerene er 100 vektprosent. Med andre ord kan en blanding inneholde 65 vekt% av (E)-isomerer og 35 vekt% av (Z)-isomerer, eller omvendt.

Med henvisning til figur 4 er enden av  $\eta$ -karbonet på sidekjeden av 1-aminosyre-resten av acetyl-syklosporin A bromert i det neste reaksjons-trinnet, ved å refluksere acetyl-syklosporin A 35 med N-bromsuccinimid og azo-bis-isobutyronitril i et løsningsmiddel så som karbontetraklorid, hvilket gir mellomproduktet acetyl- $\eta$ -bromsyklosporin A 41. N-Bromsuccinimid er en reagent som ofte benyttes for å erstatte allyliske hydrogenener med brom, og det er antatt å gjøre det via en fri radikal mekanisme. Framstillingen av mellomproduktet 41 var hovedsakelig beskrevet av M.K. Eberle og F. Nuninger i "Synthesis of the Main Metabolite (OL-17) of Cyclosporin A" J. Org. Chem., Vol 57, s. 2689-2691 (1992).

Det nye mellomproduktet trifenyl-fosfonium-bromid av acetyl-syklosporin A 42 kan framstilles fra acetyl- $\eta$ -bromsyklosporin A 41 ved å varme den siste forbindelsen med trifenyl-fosfin i et løsningsmiddel så som toluene.

Det nye mellomproduktet 42, og andre som er likt det, er antatt å være hoved-mellomprodukt i syntesen av en rekke syklosporin A analoger som inneholder et konjugert diene-system i 1-aminosyre-resten. For eksempel kan forbindelser så som triaryl-fosfiner, trialkyl-fosfiner, arylalkyl-fosfiner og triaryllarsiner i tillegg til trifenyfosfin, reageres med acetyl- $\eta$ -bromsyklosporin A 41 for å framstille andre aktiverte forbindelser, lignende med 42.

Igjen med henvisning til figur 4, kan en blanding av (E)- og (Z)-isomerene av acetyl-1,3-diene 43 framstilles ved å røre trifenyfosfonium-bromidet av acetyl-syklosporin A 42 med et overskudd av formaldehyd i toluen ved romtemperatur. Etter tilsats av formaldehydet, ble en base, så som natriumhydroksid, satt til dråpevis, og den isomeriske blandingen av diener ble ekstrahert med etyl-acetat.

Et antall organisk kjemi bøker beskriver Wittig reaksjonen. En beskrivelse er særlig framskaffet av J. McMurry, Organic Chemistry, 5. utgave (Brooks/Cole, Pacific Groove, 2000), s. 780-783. En Wittig reaksjon kan benyttes for å konvertere et keton eller et aldehyd til en alkene. I en slik prosess kan et fosforholdig ylidyde (eng. phosphorus ylidyde) også kalt et fosforan, reageres med aldehydet eller ketonet for å gi et dipolart mellomprodukt kalt et betaine. Vanligvis er ikke betaine-mellomproduktet isolert, men det dekomponerer heller spontant gjennom en fire-ring for

å gi et alken og et trifenyfosfin-oksider. Netto-resultatet er erstatning av karbonyl-oksigen atomet med R<sub>2</sub>C= gruppen opprinnelig bundet til fosforet.

Det vil forstås av fagpersoner at en rekke reagenter kan substitueres for de eksemplifiserte Wittig reaksjons-reagentene omtalt ovenfor. For eksempel kan et antall alkyl-, aryl-, aldehyd- og keton-forbindelser substitueres for formaldehyd for å framstille et enormt antall syklosporin-derivater. Søkere har utført syntesen ovenfor med formaldehyd, og i stedet for formaldehyd, forbindelser så som acetaldehyd, deuterisert formaldehyd, deuterisert acetaldehyd, 2-klorbenzaldehyd, benzaldehyd og butyraldehyd. Slike Wittig reaksjoner kan utføres med andre forbindelser enn trifenylosonium derivater, så som triaryl-fosfiner, trialkylfosfiner, arylalkylfosfiner og triarylarsiner. I stedet for å bruke natrium-hydroksid kan ulike baser så som natriumkarbonat, butyllitium, heksyllitium, natriumamid, litium-hindrete baser så som litium-diiso-propylamid og alkali-metall-alkoksider benyttes. I tillegg til å variere disse reagentene, kan reaksjonen gjennomføres i forskjellige organiske løsningsmidler eller blandinger av organiske løsningsmidler og vann, i nærvær av ulike salter, særlig litium-halider, og ved varierende temperaturer. Alle faktorene opplistet ovenfor kan logisk velges av en fagperson for å ha den ønskete effekten på stereokjemien av den dannede dobbel-bindingen, dvs. den ønskete effekten på forholdet mellom cis- og trans-isomere. I en utførelse av foreliggende oppfinnelse blir Wittig reaksjonen utført i et løsningsmiddel valgt fra gruppen omfattende tetrahydrofuran og toluen, og hvorved løsningsmidlet blir benyttet i nærvær av en forbindelse valgt fra gruppen omfattende butyllitium, natrium lavere alkoksider, kalium lavere alkoksider og karbonat ved en temperatur mellom omtrent -80°C og 110°C. Kalium lavere oksid kan være et kalium-tert-butoksider. Dessuten kan løsningsmidlet være tetrahydrofuran benyttet i nærvær av kalium-tert-butoksider i en temperatur mellom omtrent -70°C og -100°C.

I et endelig trinn i denne syntesen, ble den beskyttende gruppen på β-karbonet fjernet ved bruk av den følgende prosedyren. Blandingen av acetyl-(E)-1,3-diene og acetyl-(Z)-1,3-diene 43 ble løst i metanol, og deretter ble vann satt til. En base så som kalium-karbonat ble satt til, og reaksjonsblandingen ble rørt ved romtemperatur. Andre baser enn kaliumkarbonat som kan benyttes, inkluderer natrium-hydroksider, natriumkarbonat, natrium-alkoksider, og kalium-alkoksider. Etyl-acetat ble deretter benyttet for å ekstrahere den endelige produkt-blandingen av (E)- og (Z)-isomere av ISATX247 44.

### **Framgangsmåte 2**

I en alternativ reaksjons-rute for å syntetisere en blanding av (E)- og (Z)-isomere av ISATX247, via en Wittig reaksjons-strategi, kan det benyttes en firetrinns synteserute som følgende: 1) beskyttelse av β-alkoholen, som i framgangsmåte 1, 2) oksidering av acetyl-syklosporin A produsert fra det første trinnet for å produsere et aldehyd, 3) en Wittig reaksjon, og 4) de-

acetylering av Wittig reaksjons-porduktet eller tilsvarende hydrolyse av acetat-esteren for å oppnå alkoholen. Denne reaksjons-sekvensen er vist i figur 5.

Syntese ruten begynner på tilsvarende måte som Wittig reaksjons-ruten i figur 4, ved at det første trinnet beskytter  $\beta$ -alkoholen med en acetat-ester gruppe. De to rutene skilles imidlertid derfra, ved at det neste trinnet i framgangsmåte 2 konverterer acetyl-syklosporin A 35 til et aldehyd, acetyl-syklosporin A aldehyd 51. Denne reaksjonen benytter en oksiderende forbindelse som er tilstrekkelig sterk til å spalte en C=C binding for å gi to fragmenter. Alkene-spalting er kjent innen faget. Ozon er kanskje den mest benyttete dobbelbindings-spaltings-reagenten, men andre oksiderende reagenter så som kalium permanganat (KMnO<sub>4</sub>) eller osmium tetroksid kan også forårsake spalting av dobbel-bindinger.

I samsvar med en utførelse av foreliggende oppfinnelse, blir acetyl-syklosporin A konvertert til et aldehyd med ozon som oksiderende middel, etterfulgt av opparbeidelse med en reduserende forbindelse for å danne acetyl-syklosporin A aldehyd. Ozonlyserings-trinnet blir utført ved et temperatur-område på omtrent -80°C til 0°C. Løsningsmidlet benyttet under ozonlyseringen kan være en lavere alkohol, så som metanol. Den reduserende forbindelsen kan være et trialkylfosfin så som tributyl-fosfin, et triarylfosfin, et trialkylamin så som trietylamin, et alkylaryl-sulfid eller et dialkylsulfid så som dimetylsulfid. Når det arbeides med tributylfosfin som den reduserende forbindelsen, vil en fagperson vite at reaksjonen er dose-kontrollert.

I samsvar med en annen utførelse av foreliggende oppfinnelse, er  $\beta$ -alkoholen av syklosporin A beskyttet med en trimetylsilyl (TMS) gruppe og oksidert med ozon som oksiderende forbindelse, etterfulgt av opparbeidelse med en reduserende forbindelse for å danne TMS syklosporin A aldehyd. Det ozonlyserende trinnet utføres ved et temperatur-område fra omtrent -80°C til 0°C. Løsningsmidlet som benyttes under ozonlyserings-trinnet kan være en blanding av lavere alkohol og diklormetan. Den reduserende forbindelsen kan velges fra gruppen omfattende trialkylfosfiner så som tributyl-fosfin, triarylfosfiner, trialkylaminer så som trietylamin, alkylaryl-sulfider, thiosulfater eller dialkylsulfider så som dimetylsulfid. Når det arbeides med tributylfosfin som den reduserende forbindelsen, vil en fagperson vite at reaksjonen er dose-kontrollert.

I tillegg kan syklosporin A aldehydet framstilles ved å beskytte  $\beta$ -alkoholen på syklosporin A ved å danne acetyl-syklosporin A, og deretter konvertere acetyl-syklosporin A til acetyl-syklosporin A epoksid med en monopersulfat, fortrinnsvis okson, i nærvær av et keton, så som acetoksyacetone eller diacetoksyacetone. Dette trinnet utføres i et organisk løsningsmiddel som er inert under disse reaksjons-forholdene så som acetonitril og vann. Etylendiammentetra-eddisyre-dinatrium salt ble satt til for å fange ethvert tungmetall-ion som kan være tilstede. Epoksiderings-reaksjonen utføres fortrinnsvis ved en pH over 7. Denne epoksiderings-reaksjonen etterfølges av oksidativ spalting av epoksidet med period syre eller perodat salt under sure forhold. Eventuelt kan oksideringen og den oksidative spaltingen kombineres i en opparbeidelses-prosedyre. Disse reaksjonene er

diskutert av Dan Yang, et al, i "A C2 Symmetric Chiral Ketone for Catalytic Asymmetric Epoxidation of Unfunctionalized Olefins", J. Am. Chem. Soc., vol 118, s 491-491 (1996) og "Novel Cyclic Ketones for Catalytic Oxidation Reactions" J. Org. Chem., Vol. 63, s 9888-9894 (1998).

Bruken av ruthenium baserte oksiderende forbindelser er omtalt av H.J. Carlsen et al. i "A Greatly Improved Procedure for Ruthenium Tetroxide Catalyzed Oxidation of Organic Compounds", J. Org. Chem., Vol. 46 nr. 19, s 3736 - 3738 (1981). Carlsen et al. belærer at historisk sett ga kostnadene for ruthenium-metallet en drivkraft for utvikling av katalytiske prosedyrer, den mest populære av disse brukte periodat eller hypokloritt som stokiometriske oksidanter. Disse forskerene fant et tap av katalytisk aktivitet under reaksjonen med konvensjonell bruk av ruthenium som de antok skyldes nærværet av karboksylsyrer. Tilsatsen av nitriler til reaksjons-blandingen, særlig acetonitril, ble funnet å betydelig fremme hastigheten og graden av oksidativ spalting av alkener i et CCl<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O/IO<sub>4</sub>- system.

I samsvar med en utførelse av foreliggende oppfinnelse, kan acetyl-syklosporin A aldehyd 51 framstilles fra acetyl syklosporin A 35 ved å løse det i en blanding av acetonitril og vann, og deretter tilsette først natrium-periodat og deretter ruthenium klorid-hydrat. Aldehydet 51 kan ekstraheres med etylacetat. Det skal bemerkes at syntesen av aldehydet 51 med denne oksiderende spaltings-strategien er viktig for mange av de stereoselektive rutene som vil diskuteres nedenfor, og følgelig blir leseren henvist tilbake til dette avsnittet.

I tillegg kan syklosporin A aldehydet framstilles ved å beskytte  $\beta$ -alkoholen på syklosporin A ved å danne acetyl-syklosporin A, og deretter konvertere acetyl-syklosporin A til acetyl-syklosporin A epoksid med en monopersulfat, fortrinnsvis okson, i nærvær av et keton, fortrinnsvis et aktivert keton, fortrinnsvis acetoksyacetone eller diacetoksyacetone. Dette trinnet utføres i et organisk løsningsmiddel som er inert under disse reaksjons-forholdene så som acetonitril og vann. Etylen-diammentetra-eddiskyre-dinatrium salt ble satt til for å fange ethvert tungmetall-ion som kan være tilstede. Epoksiderings-reaksjonen utføres fortrinnsvis ved en pH over 7. Denne epoksiderings-reaksjonen etterfølges av oksidativ spalting av epoksidet med period syre eller periodat salt under sure forhold. Oksideringen og den oksidative spaltingen kan kombineres i en opparbeidelses-prosedyre. Disse reaksjonene er diskutert av Dan Yang, et al, i "A C2 Symmetric Chiral Ketone for Catalytic Asymmetric Epoxidation of Unfunctionalized Olefins", J. Am. Chem. Soc., vol 118, s 491-491 (1996) og "Novel Cyclic Ketones for Catalytic Oxidation Reactions" J. Org. Chem., Vo. 63, s 9888-9894 (1998).

Det tredje trinnet i framgangsmåte 2 inkluderer konvertering av aldehydet 51 til en blanding av (E)- og (Z)-diener via en Wittig reaksjon, på en tilsvarende måte som for framgangsmåte 1. Som i framgangsmåte 1 tilfører et fosforholdig ylde aldehydet for å gi et betaine (som ikke er isolert), med det netto-resultat at karbonyl-oksygenatomet av aldehydet blir erstattet av R<sub>2</sub>C=gruppen opprinnelig bundet til fosforet. Igjen kan slike Wittig reaksjoner utføres med andre fosfor-holdige

forbindelser enn trifenyl-fosfonium derivater, så som triarylfosfiner, trialkylfosfiner, arylalkylfosfiner og triarylsiner, ved ulike temperaturer og ved å benytte en rekke basiske løsninger og løsningsmidler eller tilsats av ulike uorganiske salter kan stereokjemien av de nylig dannede dobbel-bindingene påvirkes.

I en utførelse blir acetyl-syklosporin A aldehyd 51 løst i toluen, hvorved det er tilsatt en base så som natrium-hydroksid i vann. Allyl-trifenyl-fosfonium-brom 52 blir deretter satt til, og reaksjonen blir rørt i noe tid. Utarbeiding av produkt-blandingen av acetyl (E)- og (Z)-1,3-diener 53 omfatter ekstraksjon med heksan og/eller etylacetat, hvor uttrykket "utarbeiding" er ment å bety prosessen for å ekstrahere og/eller isolere reaksjons-produkt fra en blanding av reaktanter, produkter, løsningsmiddel osv.

I et endelig trinn i framgangsmåte 2, tilsvarende det endelige trinnet av framgangsmåte 1, blir acetat-ester gruppen som beskytter alkoholen i  $\beta$ -karbon posisjonen fjernet med kalium-karbonat, hvilket gir en blanding av (E)- og (Z)-isomere av ISATX247 54. Andre baser enn kaliumkarbonat som kan benyttes for å fjerne den beskyttende gruppen inkluderer natriumhydroksid, natriumkarbonat, natriumalkoksid og kaliumalkoksid.

#### **Syntese av blandinger forrikt på en av ISATX247 (E)- og (Z)-isomerene, via organometalliske ruter.**

I samsvar med utførelser av den foreliggende oppfinnelse, kan stereoselektive syntese ruter omfatte bruk av uorganiske reagenter inneholdende elementer så som silisium, bor, titan, svovel, fosfor og/eller litium. Disse rutene kan fortsette via en seks-ringet overgangs-tilstand hvor et av medlemmene i ringen er det uorganiske elementet fra den organometalliske reagenten. I noen utførelser kan steriske hindrings-effekter i forbindelse med overgangs-tilstanden påvirke det stereokjemiske resultatet av reaksjonen.

To eksemplifiserte utførelser vil diskuteres i denne omtalen. I den første stereoselektive utførelsen (framgangsmåte 3, også vist som rute 32 i figur 3), undergår en silisiumholdig forbindelse en eliminerings-reaksjon under sure eller basiske forhold. Dette er et eksempel på en Peterson olefinering. I den andre stereoselektive utførelsen (framgangsmåte 4, også vist som rute 33 i figur 3), blir hver av isomerene framstilt fra forskjellige forløpere. (Z)-isomeren er produsert fra titan- og fosforholdige mellomprodukt, mens (E)-isomeren er produsert via et litium-holdig mellomprodukt.

#### **Framgangsmåte 3**

Denne ruten går via acetyl-syklosporin A aldehydet 51.

Et tilsvarende reaksjons-forløp er omtalt generelt av D.J.S. Tsai og D.S. Matteson i "A Stereocontrolled Synthesis av (Z) and (E) Terminal Dienes from Pinacol (E)-1-Trimethylsilyl-1-

Propene-3-Boronate, "Tetrahedron Letters", vol. 22, nr. 29, s 2751-2752 (1981). Framgangsmåten er vist i figur 6. Generelt omfatter syntesen framstilling av en trimetylsilylallylborat-ester-reagent 62, og deretter behandling av acetyl-syklosporin A aldehyd 51 med 62 for å danne en  $\beta$ -trimetylsilyl-alkohol 64. Denne alkoholen er antatt å dannes via en bor-holdig overgangstilstand 63. Ettersom bor-estere reagerer sakte i allylborat-reaksjoner, vil det forstås av fagpersoner at bruk av en borane-reagent som reagerer fortere, så som E- $\gamma$ -trimetylsilyl-dietylboran eller 9-(E- $\gamma$ -trimetylsilylallyl)-9-BB har fordeler.  $\beta$ -trimetylsilyl-alkohol 64 kan deretter undergå en Peterson olefinering for å danne en alken, i dette tilfelle enten dienen 65 eller dienen 67.

Dannelsen av alkener følger en av to adskilte ruter, avhengig av hvorvidt elimineringsreaksjonen (olefineringen) utføres under sure eller basiske forhold. Under sure forhold foregår en anti-eliminering som danner (E)-isomerene, mens det under basiske forhold foregår en cis-eliminering som danner (Z)-isomerene. Det vil forstås av fagpersoner at ved bruk av denne syntese-ruten kan hver av isomerene framstilles fra den samme forløperen. Produktet av hver elimineringsreaksjon omfatter en blanding forrikt på en av de to isomerene. I en utførelse betyr forrikt at blandingen inneholder mer enn eller likt med 75 vekt% av en isomer. I andre utførelser, kan den forrikete blandingen omfatte 80, 85 og 90 vekt% av en av isomerene. Blandingene forrikt på en av isomerene kan dermed kombineres i et forhandsbestemt forhold, for å gi den ønskete blandingen, som vist i figur 10.

Reaksjonene i figur 6 vil nå omtales i detalj, og begynner med framstilling av den borholdige reagenten 62. En generell undersøkelse av bruken av silisium-reagenter i syntesen av karbon-karbon bindings-dannende reaksjoner er omtalt av E. Ehlinger og P. Magnus i "Silicon in Synthesis. 10. The (Trimetylsilyl)allyl Anion: A  $\beta$ -Acyl Anion Equivalent for the Conversion of Aldehydes and Ketones into  $\gamma$ -Lactones, "J. Am. Chem. Soc., Vol. 102, nr. 15, side 5004 - 5011 (1980). Disse undersøkelsene belærer særlig reaksjonen mellom (trimetylsilyl)allyl anionet og et aldehyd. Anionet kan framstilles ved å deprotonere allyltrimetylsilane med sec-butyllitium i tetrahydrofuran ved  $-76^{\circ}\text{C}$ , inneholdende 1 ekvivalent av tetrametyletylendiamin (TMEDA).

Deprotoneringen av allylmetylsilane (dette trinnet er ikke vist i figur 6) er omtalt av J.-F. Biellmann og J.-B. Ducep i "Allylic and Benzylic Carbanions Substituted by Heteroatoms" Organic Reactions, vol. 27 (Wiley, New York, 1982), s. 9. Et proton alfa til heteroatomet i substituerte allyliske systemer kan fjernes med en mer basisk forbindelse. En lang rekke slike forbindelser er tilgjengelige, hvor kanskje n-butyllitium er mest vanlig. N-Butyllitium er benyttet i en stokiometrisk mengde med forbindelsen som skal metalleres i løsning med tetrahydrofuran (THF). Temperaturen blir vanligvis holdt under  $0^{\circ}\text{C}$  (ofte under  $-76^{\circ}\text{C}$ ), hvor n-butyllitium har lav reaktivitet på grunn av dens polymeriske egenskap. Tilsats av en chelaterende forbindelse så som N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin (TMEDA) forårsaker at polymeren dissosierer. Reaksjonen kan imidlertid utføres ved romtemperatur, selv i fravær av TMEDA.

Allylsilaner blir lett deprotonert fordi anionet som blir dannet, er stabilisert ikke bare gjennom forbindelse med den tilstøtende dobbelt-bindingen, men også av den tilstøtende silyl-gruppen. Anionet kan reagere med elektrofiler enten gjennom dets  $\alpha$ -karbon eller dets  $\gamma$ -karbon. Det regio-kjemiske og stereokjemiske resultatet av disse reaksjonene avhenger av flere faktorer, en av de viktigste av disse er identiteten av mot-ionet. Se diskusjonen om allylsilaner av S.E. Thomas i *Organic Synthesis: The Roles for Boron and Silicon* (Oxford University Press, New York, 1991), s. 84-87.

I denne reaksjons-utførelsen underkastes det deprotonerte allylsilanet en elektrofil innfangelse av trimetylborat for å gi et mellomprodukt som, når det reageres med pinacol, gir trans-(trimetylsilyl)borat-forbindelsen 62. Boratet 62 kan også kalles en "allylboroan" (allylborat-ester). Alternativt, dersom 9-metoksy-9-dialkylboran benyttes i den elektrofile innfangelsen, vil det føre til et borat kompleks som kan demetoksyleres ved bruk av en bor-trifluorid-reagent (så som  $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ ) for å generere det tilsvarende 9-( $\gamma$ -trans-trimetylsilylallyl)-9-dialkylboran.

Tilsatsen av et aldehyd til en allylboran har allerede blitt omtalt av S.E. Thomas i referansen gitt ovenfor, på side 34-35. Tilsatsen av et aldehyd til et allylboran, hvor sistnevnte er usymmetrisk substituert i den fjerne enden av karbon-karbon dobbel-bindingen (med "fjerne" menes lengst bort fra bor-atomet) gir en homoallylisk alkohol som inneholder to tilstøtende kirale sentre. (E)-allylboraner gir økning i threo-diastereoisomeren, mens (Z)-allylboraner gir økning i erythro-diastereoisomeren. En eksemplifisert reaksjon av en (E)-allylboran 62 med syklosporin A aldehyd 51 er vist i figur 6, hvor bor-mellomproduktet 63 er dannet etter røring av reaktantene i en THF-løsning i en periode på flere dager.

Referanse-nummeret 69 i bor-mellomproduktet 63 (figur 6) er ment å antyde at et antall strukturer er mulig i bor-posisjonen. For eksempel dersom borat-reagenten 62 er en trialkylsilylallyl-borat-ester, vil strukturen ved 69 omfatte en 5-ring som inkluderer to oksygen-atomer. Substitusjoner på borat eller boran-reagenter benyttet i 62 vil være tilstede i strukturen i 63.

Alternativt er det studert på framstilling av erythro-silyl alkoholen, for hvilken syre-eliminering ville gi cis-isomeren og base-eliminering ville gi trans-isomeren, på motsatt måte enn eliminerings-reaksjonene omtalt ovenfor. Det vil være opplagt for fagpersoner at de samme produktene vil oppnås ved slutten av syntesen.

Behandling av mellomproduktet 63 med trietanolamin gir  $\beta$ -trimetylsilyl-alkoholen 64. På den andre siden gir allylboraterings-produktet av (trimetylsilylallyl)dialkyl boran, silyl-alkohol 64 ved oksidering ved bruk av  $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}_2$  eller vandig utarbeidelse. Alkoholen 64 avbildet i figur 6 er thero-diastereoisomeren, ettersom overgangs-tilstanden allylboran 63 var i (E)-konformasjon, selv om det vil forstås av fagpersoner at de andre diastereoisomerene også kunne ha blitt framstilt, dersom man startet fra Z-allylboran-reagenten. Diastereoselektivitet i de nye dannede kirale-senterene er ikke bestemt på dette trinnet, på grunn av fjerning av disse kirale senterene i et

senere trinn i syntesen. Strukturen av  $\beta$ -trimetylsilyl-alkoholen 64 vist i figur 6, er bekreftet av søkerene, ved bruk av spekter-teknikker.

I en framgangsmåte for alkene-syntese, kjent som en Peterson olefinering, fører eliminering av trialkylsilyl-gruppen og hydrokso-gruppen fra  $\beta$ -trimetylsilyl alkoholen 64 til et alkene; i dette tilfellet et diene, på grunn av dobbel-bindingen som allerede er tilstede mellom de to ende-karbonene på kjeden. En diskusjon om konversjonen av  $\beta$ -hydroksysilaner til alkener er presentert i S.E. Thomas referert på side 68-69. En ytterligere diskusjon av denne reaksjonen er gitt av P.F. Hurdlik og D. Peterson i "Stereospecific Olefin-Forming Elimination Reactions of  $\beta$ -hydroxysilanes" J. Am. Chem. Soc.. vol 97, nr. 6, s. 1464-1468 (1975).

Med henvisning til figur 6 kan eliminerings-reaksjonen som konverterer alkoholen 64 til et diene følge en av to adskillige mekaniske ruter, avhengig av hvorvidt reaksjonen blir utført under sure eller basiske forhold. En rute fører til dienet 65, mens den andre fører til dienet 67. Under sure forhold forekommer anti-eliminering, mens under basiske forhold forekommer syn-eliminering. Med andre ord er eliminerings-reaksjonene av  $\beta$ -hydroksysilaner stereospesifikk, og de syre- og base-promoterte reaksjonene kan ta motsatte stereokjemiske ruter. Typiske hjelpe-midler for den syre-promoterte reaksjonen kan inkludere eddiksyre, svovelsyre og ulike Lewis syrer; typiske baser inkluderer natrium-hydrid og kaliumhydrid eller kalium tertibutoksid. Det kan være tilfelle at eliminerings-reaksjonene som benytter natriumhydrid i THF er langsomme ved romtemperatur, mens eliminerings-reaksjoner som benytter kaliumhydrid kan gå raskere.

Stereospesifiteten forekommer på dette trinnet av reaksjons-ruten fordi eliminering under syre-forhold krever at trimetylsilyl- og hydrokso-gruppen er i et antiperiplanart forhold. I motsetning krever eliminering under basiske forhold at trimetylsilyl- og hydrokso-gruppen inntar et synperiplanart forhold. Sistnevnte forhold letter dannelsen av en sterk silisium-oksigen binding og et fire-ringet mellomprodukt, som brytes ned på en måte tilsvarende det endelige trinnet i en Wittig reaksjon. Det vil forstås av fagpersoner at en sterk silisium-oksigen binding erstatter en svakere silisium-karbon binding, som setter til side erstatningen av en sterk karbon-oksygen binding med en svakere karbon-karbon  $\pi$  binding.

Produktene av den stereospesifikke elimineringen av et  $\beta$ -hydrokso-alkylsilane er derfor acetyl-(E)-1,3-diene forbindelsen 67 og acetyl-(Z)-1,3-diene forbindelsen 65. Som i de tidligere framgangs-måtene, kan den beskyttende gruppen nå fjernes fra hver av disse dienene ved behandling med  $K_2CO_3$  i metanol og vann. Dette fjerner acetat-gruppen bundet til  $\beta$ -karbonet på 1-aminosyre-resten, og bringer den funksjonelle gruppen på det karbonet tilbake til et alkohol. Andre baser enn kaliumkarbonat som kan benyttes for å fjerne den beskyttende gruppen inkluderer natrium-hydroksid, natriumkarbonat, natriumalkoksid og kalium-alkoksid.

På dette trinnet i framstillingen er syntesen i det vesentlige fullstendig. Blandingene forriktet på en eller den andre av isomerene kan blandes for å oppnå det ønskete forholdet av isomere i

blandingen. Med "forriktet" er det ment et produkt som omfatter i det minste 75 vekt% av den isomeren, med andre ord, produktet kan inneholde opptil 25 vekt% av den "uønskete" isomeren. Blandingen er utformet for å oppnå det ønskete farmakologiske resultat.

#### Framgangsmåte 4

Ruten kan også foregå via acetyl-syklosporin A aldehydet 51.

En alternativ rute for framstilling av stereoselektive isomere er vist i figurene 7-8. Denne synteseruten skiller seg fra de som nettopp er beskrevet, ved at 1) synteseruten for produksjon av (E)-isomeren av ISATX247 går gjennom andre mellomprodukt enn den for (Z)-isomeren, og 2) disse synteserutene benytter titan og litium-holdige reagenter og/eller mellomprodukt.

Titan-reagenter er kjent for å være særlig nyttige i organisk syntese fordi de er regio- og stereoselektive i reaksjoner med aldehyder og ketoner. Den generelle egenskapen av titan i stereoselektiv kjemi er diskutert av M.T. Reetz i *Organotitanium Reagents in Organic Synthesis* (Springer-Verlag, Berlin 1986), s. VII, 148-149 og 164-165. Her er det angitt at egenskapen av titan-liganden kan variere slik at den elektroniske og steriske identiteten av reagenten kan manipuleres, og at det stereokjemiske resultatet av mange C-C bindings-reaksjoner kan forutsies. I samsvar med denne kjemien, danner sammenslutningen av to prokirale senter av akirale molekyler to senter av kiralitet. En generell regel som regulerer det stereoselektive resultatet er at Z-konfigurerte enolater eller crotyl-metall-forbindelser fortrinnsvis danner syn-addukter, mens E-konfigurerte reagenter favoriserer anti-diastereomerene. Trendene kan igjen forklares ved å anta en seks-medlemmet syklisk overgangs-tilstand med stol-geometri.

Et spesifikt eksempel av denne typen stereoselektiv syntese er omtalt av Y. Ikeda et al i "Stereoselective Synthesis av (Z)- og (E)-1,3-Alkadienes from Aldehydes Using Organotitanium and Litium Reagents", *Tetrahedron*, vol. 43, nr. 4, s. 723-730 (1987). Denne referansen omtaler at allyldifenylfosfin kan benyttes for å framstille en [3-(difenylfosfin)allyl]titan-reagent, som igjen kan kondenseres med et aldehyd, etterfulgt av dannelse av fosfonium-salt, for å gi en (Z)-1,3-alkadiene i en sterkt regio- og stereoselektiv framferd. I motsetning kan et litert allyldifenylfosfin oksid kondensere med et aldehyd for å gi en (E)-1,3-alkadiene direkte, igjen med den ønskete stereoselektiviteten.

Med henvisning til figur 7, foregår syntesen av (Z)-isomeren av ISATX247 (som i de forrige rutene) ved å generere acetyl-syklosporin A aldehyde 51 fra syklosporin A 34. [3-(difenylfosfino)allyl]titan-reagenten 72 blir framstilt ved å deprotonere allyldifenylfosfin 71 med en sterk base så som t-BuLi, og deretter reagere produktet med titan-tetraisopropoksid. Det er teoretisk foreslått en overgangs-tilstand 73 som fører til erythro- $\alpha$ -adduktet 74, som deretter kan konverteres til  $\beta$ -oksidofosfonium saltet 75, ved behandling av 74 med iodmetan (MeI). Det er

påstått at eksistensen av overgangs-tilstanden 73 i det minste delvis er ansvarlig for stereo-selektiviteten av denne synteseruten.

I samsvar med de eksemplifiserte framgangsmåtene beskrevet i foreliggende omtale, kan metall-setet for den organometalliske reagenten være enheten som styrer regio-selektiviteten (Ikeda, s. 725). Dette betyr at aldehydet 51 i figur 7 reagerer med difenylfosfino-forbindelsen 72 ved dets  $\alpha$ -posisjon for å gi det tilsvarende  $\alpha$ -adduktet 74, ettersom  $\gamma$ -karbonet av difenylfosfino-gruppen blir samordnet med metallet, som i dette tilfellet er titan. Den observerte Z-selektiviteten av diene-produktet er forklart ved vurdering av seks-ring overgangs-tilstanden 73. Ettersom både den store syklosporin A sidekjeden av aldehydet 35 og difenylfosfino-gruppen er antatt å innta ekvatorielle posisjoner i overgangs-tilstanden, blir erythro  $\alpha$ -adduktet 74 selektivt dannet, hvilket framskaffer(Z)-1,3-dienet 76.

I motsetning til reaksjonsruten vist i figur 7, hvor (Z)-isomeren av ISATX247 blir produsert via en titan-overgangs-tilstand, blir ikke (E)-isomeren så lett syntetisert med denne framgangsmåten. Faktisk blir forsøk på å syntetisere (E)-isomeren med denne framgangsmåten vanligvis rapportert til å resultere i dårlig utbytte. I stedet, som vist i figur 8, kan litio-derivatet 82 reageres med aldehydet 51 for å gi den litium-holdige overgangs-tilstanden 83, som danner 1,3-dienen med E/Z forhold i et område som er større enn omtrent 75:25. Som i figur 7 er høy stereoselektivitet av reaksjons-produktet mulig på grunn av overgangs-tilstanden 83, hvor vinylgruppen av litium-reagenten 82 og syklosporin A sidekjeden av aldehydet 51 er antatt å innta ekvatorielle posisjoner, for på den måten å produsere (E)-1,3-diene 84 på en stereoselektiv måte. Som omtalt tidligere, kan enkelte uønskete bireaksjoner omfattende den acetat-beskyttende gruppen unngås i alle stereoselektive synteser, gjennom bruk av beskyttende grupper så som benzoate-estere eller silyl-eter.

### **Framstilling av blandinger**

Som tidligere omtalt, ble det funnet at enkelte blandinger av cis og trans-isomere av ISATX247 oppviser en kombinasjon av forbedret kraft og/eller redusert toksisitet i forhold til naturlig forekommende og for nåværende kjente syklosporiner.

I samsvar med utførelser av foreliggende oppfinnelse blir ISATX247 isomere (og derivater av disse) syntetisert via stereoselektive ruter som kan variere i grad av selektivitet. Stereoselektive ruter kan produsere et første material eller blanding forriket på (E)-isomeren, og et andre material eller blanding forriket på (Z)-isomeren, og disse materialene kan kombineres slik at den resulterende blandingen har et ønsket forhold mellom de to isomerene. Alternativt er det antatt at det første materialet kan framstilles ved å separere et reaksjons-produkt for å isolere og forrike (E)-isomeren, og det andre materialet kan framstilles ved å separere et reaksjons-produkt for å

isolere og forrike (Z)-isomerene. I nok en annen utførelse, kan reaksjons-forholdene i en stereoselektiv rute målsettes for å produsere det ønskete forholdet direkte i en framstilt blanding.

Disse prinsippene er vist i figur 9A-C og 10. I figur 9A-C er det vist tre hypotetiske syntese-reaksjoner, som produserer et forhold av (E)- og (Z)-isomerene på henholdsvis omtrent 65 til 35 vektprosent, 50 til 50 vektprosent og 35 til 65 vektprosent. Disse forholdene er selvsagt eksempler bare for illustrative formål, og ethvert hypotetisk sett av tall kunne vært valgt. Det vil være opplagt for fagpersoner at reaksjons-forholdene benyttet for å produsere forholdet vist i figur 9A kan være forskjellig fra de i figur 9B og 9C for å oppnå forskjellige forhold mellom isomerene i produksjons-blandingen. Forholdene for hver reaksjon kan være målsatt for å gi et spesielt forhold mellom de to isomere i det tilfellet.

I motsetning til noen synteseruter, hvor det produseres en blanding av isomere, kan isomerene først framstilles individuelt, og deretter blandes i forhandsbestemte andeler for å oppnå det ønskete forholdet. Dette konseptet er vist i figur 10, hvor produktet av en av de stereoselektive rutene er forriktet på en av isomerene, slik at produktet omfatter mer enn 75 vektprosent av (E)-isomerene, og produktet i den andre stereoselektive ruten er forriktet på den andre isomerene slik at dette produktet omfatter mer enn omtrent 75 vektprosent av (Z)-isomerene. Disse tallene er også eksempler, og renheten av den ønskete isomerene som resulterer fra en stereoselektiv rute kan være større enn eller lik med omtrent 75 vektprosent i en utførelse. I andre utførelser, kan den ønskete isomerene omfatte mer enn eller likt med henholdsvis omtrent 80, 85, 90 og 95 vektprosent.

Etter syntetisering av isomerene individuelt, kan de blandes for å oppnå det ønskete forholdet, som vist i figur 10. For illustrative formål, er de samme hypotetiske forholdene valgt i figur 10 som de i figur 9A-C. Med referanse til figur 10, blir (E)- og (Z)-isomerene blandet for å gi tre forskjellige blandinger som omfatter forhold mellom (E)- og (Z)-isomerene henholdsvis på omtrent 65 til 35 vekt%, 50 til 50 vekt% og 35 til 65 vekt%.

I en alternativ utførelse kan en blanding av (E)- og (Z)-isomerene av ISATX247 separeres slik at blandingen blir forriktet på en av isomerene i forhold til den andre. For eksempel kan en Diels-Alder reaksjon benyttes for å konvertere cis-isomerene til en lukket ring-forbindelse ved å reagere den med et alken. Dersom alkenet er bundet til et substrat som kan isoleres (f.eks. filtrerbar) kan cis-isomerene i all hovedsak fjernes fra blandingen, og det resterende blir en blanding forriktet på trans-isomerene. Cis-isomerene kan gjenvinnes fra den lukkede ring-forbindelsen ved bruk av varme, hvilket produserer en blanding forriktet på cis-isomerene. På denne måten kan derfor cis og trans-isomere separeres.

I praksis kan forholdet mellom (E)- og (Z)-isomerene i enhver blanding, uavhengig av graden av stereoselektivitet av framgangsmåten som den ble framstilt med, innta en lang rekke verdier. For eksempel kan blandingen omfatte fra 10 til 90 prosent av (E)-isomerene til omtrent 90 til 10 prosent

av (Z)-isomerer. I andre utførelser kan blandingen inneholde fra omtrent 15 til 85 vektprosent av (E)-isomerer og omtrent 85 til 15 vektprosent av (Z)-isomerer, omtrent 25 til 75 vektprosent av (E)-isomerer og omtrent 75 til 25 vektprosent av (Z)-isomerer, omtrent 35 til 65 vektprosent av (E)-isomerer og omtrent 65 til 35 vektprosent av (Z)-isomerer, eller omtrent 45 til 55 vektprosent av (E)-isomerer og omtrent 55 til 45 vektprosent av (Z)-isomerer. I nok en annen utførelse er blandingen en ISATX247 blanding som omfatter omtrent 45 til 50 vektprosent av (E)-isomerer og omtrent 50 til 55 vekt% av (Z)-isomerer. Disse vektprosent-tallene er basert på vekten av hele blandingen, og det vil forstås at summen av vektprosenten av (E)-isomerer og (Z)-isomerer er 100 vekt%. Med andre ord kan en blanding inneholde 65 vekt% av (E)-isomerer og 35 vekt% av (Z)-isomerer, og omvendt.

Prosentandelen av en eller den andre isomerer i en blanding, kan bekreftes ved bruk av nukleær magnetisk resonans (NMR), eller andre teknikker velkjent innen faget.

#### **Farmasøytiske blandinger.**

Symptomene for hvilke denne blandingen er interessant, inkluderer særlig autoimmune og inflammatoriske forhold og forhold forbundet med eller tilfeldig i forbindelse med transplantatavvisning, for eksempel behandling (inkludert forbedring, reduksjon, eliminasjon, eller kur av etiologi eller symptomer) eller forebygging (inkludert vesentlig eller fullstendig restriksjon, profylaxe eller unngåelse) av det følgende

a) akutt organ eller vevs-transplantat avvisning, for eksempel behandling av mottakere av for eksempel hjerte, lunge, kombinert hjerte-lunge, lever, nyrer, bukspyttkjertel, hud, tarm eller hornhinne transplantater, særlig hindring og/eller behandling av T-celle medierte avvisninger, samt transplantat-versus-verts sykdom, så som i forbindelse med bein-marg-transplantasjon.

b) kronisk avvisning av et transplantert organ, særlig forebygging av transplantats-åre sykdom (eng. graft vessel disease), for eksempel karakterisert ved stenose av arteriene i transplantatet som et resultat av intima tykning på grunn av forøkning av glatte muskelceller og forbundete effekter.

c) xenotransplantat avvisning, inkludert akutt, hyperakutt eller kronisk avvisning av et organ som forekommer når organ-donoren er av en annen art enn mottakeren, særlig avvisning formidlet av B-celler eller antistoff.

d) autoimmune sykdommer og inflammatoriske forhold, særlig inflammatoriske forhold med en etiologi inkludert en immunologisk eller autoimmun forbindelse så som artritt (f.eks. reumatisk artritt, arthritis chronica progrediente og arthritis deformans) og andre reumatiske sykdommer. Spesifikke autoimmune sykdommer hvorved den synergiske kombinasjonen av oppfinnelsen kan benyttes, inkluderer autoimmune hematologiske sykdommer (inkludert hemolytisk anemi, aplastisk anemi, pure red cell anemi og idiopatiske trombocytopenia), systemisk lupus erythematosus, polychondritis, sklerodoma, Wegener granulomatose, dermatomyositis, kronisk

aktiv hepatitt, myasthenia gravis, psoriasis, Steven-Johnson syndrom, idiopathid spure, (autoimmun) inflammatory bowel disease (inkludert for eksempel ulcerative colitis og Crohns sykdom), endocrine oftalamopati, Graves sykdom, sarcoidosis, multippel sklerose, primær biliary cirrhose, barne diabetes (diabetes mellitus type I), uveitis (foregående og bakre), keratoconjunctivitis sicca og vernal keratoconjunctivitis, mellom-lunge fibrose, psoriatisk artritt, glomerulonephritis (med og uten nefrotisk syndrom, for eksempel inkludert idiopatisk nefrotisk syndrom eller minimal endrings-nefropaty) og barne-dermatomyositis. Autoimmune og inflammatoriske forhold i huden er også antatt å kunne forbedres ved behandling og forebygging ved bruk av den synergiske kombinasjonen i samsvar med oppfinnelsen, for eksempel psoriasis, kontakt dermatitis, atopisk dermatitis, alopecia areata, erythema multiforma, dermatitis herpetiformis, skleroderma, vitiligo, hypersensitiv angiitis, urticaria, bullous pemphigoid, lupus erythematosus, pemphigus, epidermolysis bullosa acquisita og andre inflammatoriske eller allergiske tilstander i huden, og også for inflammatoriske forhold i lungene og luftveiene inkludert astma, allergier og pneumokoniose.

Blandingene av de isomeriske analogene i samsvar med foreliggende oppfinnelse kan administreres rene eller med en bærer, til et varmblodig dyr som har behov for blandingen. Den farmasøytiske bæreren kan være fast eller flytende. Blandingene i samsvar med oppfinnelsen kan administreres oralt, lokalt, parenteralt, ved inhalasjons-spray eller rektalt i dose-enhets utforminger som inneholder vanlige ikke-giftige farmasøytisk akseptable bærere, hjelpestoffer og vehikler. Begrepet parenteralt, slik det benyttes her, inkluderer subkutane injeksjoner, intravenøse, intramuskulære, intrasternale injeksjons- eller infusjons-teknikker.

De farmasøytiske blandingene som omfatter blandingene i samsvar med foreliggende oppfinnelse kan fortrinnsvis være i en form som er egnet for oral bruk, for eksempel som tabletter, trokéer, sugetabletter, vannholdige eller oljete suspensjoner, dispersible pulver eller granuler, emulsjoner, harde eller mye kapsler, eller siruper eller eliksirer. Blandingene ment for oral bruk kan framstilles i samsvar med framgangsmåter kjent innen faget for framstilling av farmasøytiske blandingene, og slike blandingene kan inneholde en eller flere forbindelser valgt fra gruppen omfattende søtnings-, smaks-, farge- og konserverende stoffer for å gi farmasøytisk elegante og velsmakende framstillinger. Tabletter som inneholder den aktive ingrediensen i blanding med ikke-giftige farmasøytisk akseptable bindemidler kan også framstilles med kjente framgangsmåter. Bindemidlene som benyttes kan for eksempel være (1) inerte fortynnings-midler så som kalsiumkarbonat, laktose, kalsiumfosfat eller natriumfosfat, (2) granulerende og disintegrerende forbindelser så som mais-stivelse eller alginsyre; (3) bindemidler så som stivelse, gelatin eller akasie, og (4) smørende forbindelser så som magnesium-stearat, stearinsyre eller talg. Tablettene kan være uten belegg eller de kan være belagt i samsvar med kjente tenikker for å forsenke disintegrasjonen og absorpsjonen i mage- og tarmsystemet, og dermed gi vedvarende virkning

over en lengre periode. For eksempel kan et tidsforsenkende materiale som glyceryl-monostearat eller glyceryl-distearat benyttes. De kan også belegges med teknikker beskrevet i US patent 4,256,108, 4,160,452 og 4,265,874 for å danne osmotisk terapeutiske tabletter for kontrollert frigivelse.

I noen tilfeller kan utforminger for oralt bruk være i form av harde gelatin-kapsler, hvor den aktive forbindelsen er blandet med en inert fortyner i fast form, for eksempel kalsiumkarbonat, kalsiumfosfat eller kaolin. De kan også være i form av myke gelatinkapsler hvor den aktive ingrediensen er blandet med vann eller et oljeholdig medium, for eksempel peanuttolje, flytende parafin eller olivenolje.

Vandige suspensjoner inneholder vanligvis de aktive materialene i blanding med tilsetningsstoff egnet for framstilling av vandige suspensjoner. Slike bindemidler kan inkludere: (1) suspenderende forbindelser så som natrium-karboksymetyl-cellulose, metylcellulose, hydroksypropyl-metyl-cellulose, natriumalginat, polyvinylpyrrolidone, gummi-tragacanth og gummi-acacia; eller (2) dispergerende eller fuktende forbindelser som kan være et naturlig forekommende fosfatid så som lecithin, et kondenserings-produkt av et alkyleneoksid med en fettsyre, for eksempel polyoksyetylen-stearat, et kondenseringsprodukt av etyleneoksid med en langkjedet alifatisk alkohol, for eksempel heptadecaetylen-oksysetanol, et kondenserings-produkt av etyleneoksid med en delvis ester utledet fra en fettsyre og en heksitol så som polyoksyetylen-sorbitol-monooleat, eller et kondenserings-produkt av etyleneoksid med en delvis ester utledet fra en fettsyre og et heksitol-anhydrid, for eksempel polyoksyetylen-sorbitan-monooleat.

De vandige suspensjonene kan også inneholde ett eller flere konserveringsmidler, for eksempel etyl eller p-propyl n-hydroksybenzoat, en eller flere fargestoffer, en eller flere smaksstoffer, og en eller flere søtnings-stoffer så som sukrose, aspartam eller sakkarin.

Oljeholdige suspensjoner kan utformes ved å suspendere den aktive forbindelsen i en vegetabilsk olje, for eksempel jordnøttolje, olivenolje, sesamolje eller kokosolje, en fiskeolje som inneholder omega 3 fettsyrer, eller en mineralolje så som flytende parafin. De oljeholdige suspensjonene kan inneholde en tyknings-forbindelse, for eksempel bivoks, hard parafin eller cetylalkohol. Søtningsmidler og smaksstoffer kan settes til for å gi en velsmakende oral framstilling. Disse blandingene kan konserveres ved tilsats av en antioksidant så som askorbinsyre.

Dispergerbare pulver og granuler er egnet for framstilling av en vandig suspensjon. De framskaffer den aktive ingrediensen i en blanding med en dispergerende eller fuktende forbindelse, en suspenderende forbindelse og en eller flere konserveringsmidler. Egnete dispergerende eller fuktende forbindelser og suspenderende forbindelser er eksemplifisert av de som er nevnt ovenfor. Ytterligere tilsetningsstoffer, for eksempel søtnings-, smaks- og farge-forbindelsene beskrevet ovenfor, kan også være tilstede.

De farmasøytiske blandingene som inneholder blandingen i samsvar med foreliggende oppfinnelse kan også være i form av olje-i-vann emulsjoner. Den oljeholdige fasen kan være en vegetabilsk olje så som olivenoljer eller jordnøttoljer, eller en mineralolje så som flytende parafin eller en blanding av disse. Egnete emulgerende forbindelser kan være (1) naturlig forekommende gummi så som gummi acacia og gummi tragacanth, (2) naturlig forekommende fosfatider så som soyabønner og lecithin, (3) estere eller delvis ester 30 utledet fra fettsyrer og heksitol-anhydrider, for eksempel sorbitan monooleat, (4) kondensjons-produkt av nevnte delvis estere med etylenoksid, for eksempel polyoksy-etylen-sorbitan-monooleat. Emulsjonene kan også inneholde søtnings- og smaksstoffer.

Siruper og eliksirer kan utformes med søtnings-stoffer for eksempel glyserol, propylen-glykol, sorbitol, aspartam eller sukrose. Slike utforminger kan også inneholde et lindrende middel, en konserverende og smakssettende og fargende forbindelse.

De farmasøytiske blandingene kan være i form av sterile injiserbare vannholdige eller oljeholdige suspensjoner. Denne suspensjonen kan utformes i samsvar med kjente framgangsmåter ved bruk av de egnete dispergerende eller fuktende forbindelsene og suspenderende forbindelsene som er nevnt ovenfor. Den sterile injiserbare framstillingen kan også være en steril injiserbar løsning eller suspensjon i en ikke-giftig parenteral akseptabel fortyner eller løsningsmiddel, for eksempel som en løsning i 1,3-butandiol. Blant de akseptable vehiklene og løsningsmidlene som kan benyttes er vann, Ringers løsning og isotonisk natriumklorid løsning. I tillegg blir sterile, fikserte oljer ofte benyttet som løsningsmiddel eller suspenderende medium. For dette formålet kan enhver mild fast olje benyttes inkludert syntetiske mono- eller di-glyserider. I tillegg kan fettsyrer så som oljesyre, benyttes i framstillingen av de injiserbare.

Blandingene i samsvar med foreliggende oppfinnelse kan også administreres i form av stikkpiller for rektal administrasjon av medikamentet. Disse blandingene kan framstilles ved å blande medikamentet med et egnet ikke-irriterende tilsetningsstoff som er fast ved vanlige temperaturer, men flytende ved rektal-temperatur og vil derfor smelte i rektum for å frigi medikamentet. Slike materialer er kakaosmør og polyetylen-glykoler.

For lokal bruk benyttes kremer, geleer, løsninger eller suspensjoner osv., inneholdende de omtalte syklosporinene.

I en særlig foretrukket utførelse benyttes en flytende løsning inneholdende et overflatemiddel, etanol, et lipofilt og/eller et ampifil løsningsmiddel som ikke-aktiv ingrediens. Særlig benyttes en oral multippel emulsjons-utforming inneholdende den isomerisk analog blandingen og de følgende ikke-medisinske ingrediensene: d-alfa Tocoferyl polyetylen glykol 1000 succinat (vitamin E TPGS), medium kjedet triglyserid-olje (MCT), Tween 40 og etanol. En myk gelatinkapsel (omfattende gelatin, glyserin, vann og sorbitol) omfattende den isomerisk analog blandingen og de samme ikke-medisinske ingrediensene som den orale løsningen, kan også med fordel benyttes.

Doseringsnivået i størrelsesorden fra omtrent 0,05 mg til omtrent 50 mg per kilo kroppsvekt per dag, er nyttig ved behandling av de ovenfor antydete forholdene. Dosering-nivået og administrasjons-planen kan variere avhengig av den spesifikke isomeriske blandingen som benyttes, forholdet som skal behandles, og slike ytterligere faktorer som alder og subjektets tilstand. Foretrukne doser er fra omtrent 0,5 til omtrent 10 mg/kg/dag og fra omtrent 0,1 til omtrent 10 mg/kg/dag. I en foretrukket utførelse administreres omtrent 0,5 til omtrent 3 mg/kg/dag oralt, b.i.d.

Mengden aktiv ingrediens som kan kombineres med bærer-materialene for å gi en enkelt doseringsform vil variere avhengig av verten som behandles, og den spesifikke administrasjons-metoden. For eksempel kan en utforming ment for oral administrasjon til mennesker inneholde fra 2,5 mg til 2,5 g av den aktive forbindelsen i blanding med en egnet og bekvemmelig mengde bærer-materiale som kan variere fra omtrent 5 til omtrent 95 prosent av den totale blandingen. Enhets-doserings-former vil vanligvis inneholde mellom fra omtrent 5 mg til omtrent 500 mg av den aktive ingrediensen. I en foretrukket utførelse blir individuelle kapsler inneholdende omtrent 50 mg isomerisk blanding benyttet for oral administrasjon. I en annen foretrukket utførelse, blir orale løsninger inneholdende omtrent 50 mg/ml isomerisk blanding benyttet for oral administrasjon.

Det vil imidlertid forstås av fagpersoner at de spesifikke dose-nivåene for enhver pasient vil avhenge av en rekke faktorer, inkludert aktiviteten av den spesifikke forbindelsen som benyttes, alder, kroppsvekt, generell helse, kjønn, diett, administrasjons-tidspunkt, administrasjons-rute, utsondrings-hastighet, medikament-kombinasjon og egenskapen og hardheten av den spesifikke sykdommen eller forholdet som skal kureres.

### **Metodelære**

Bruk av syklosporin-derivater, en klasse sykliske polypeptider dannet av sopp *Tolypocladium infalatum* Gams, øker den immunosuppressive behandlingen på grunn av de fordelaktige effektene på P-celle medierte reaksjoner. Det er observert at syklosporin derivater reversibelt inhiberer immunokompetente lymfocytter, særlig T-lymfocytter, samt inhiberer lymfokin-produksjon og frigivelse. Denne funksjonen er hovedsakelig basert på syklosporin A -indusert inhibering av calcineurin, et fosfatase enzym funnet i cytoplasma hos celler (Schreiber og Crabtree, 1992). En indikator på effektiviteten av syklosporin A eller et syklosporin A derivat, er dets evne til å inhibere fosfatase-aktiviteten av calcineurin. Calcineurin inhiberings-analysen måler aktiviteten av medikamentet ved funksjons-stedet, og er som sådan den mest nøyaktige og direkte in vitro bedømmelsen av kraften av syklosporin A analoger (Frumann et al., 1992).

ISATX247 er en syklosporin A analog som ligner på syklosporin A, bortsett fra en ny modifikasjon av en funksjonell gruppe på aminosyre 1 resten på molekylet. Det er funnet at

ISATX247 oppviser 3 ganger bedre kraft enn syklosporin A i in vitro calcineurin inhiberings-analysen.

Farmakodynamiske studier (in vivo og in vitro) har vist at ISATX247 har mer kraft enn andre eksisterende syklosporin forbindelser. Effekten av isomeriske blandinger på syklosporin analoger som strekker seg fra omtrent 10:90 til omtrent 01:10 (trans- på cis-), særlig ISATX247 med 50-55% Z-isomer og 45-50 % E-isomer, som en immunosuppressiv forbindelse (versus syklosporin A), er vist i en in vitro calcineurin aktivitetsanalyse, en rottehjerte-transplantat modell, en islet celle allo-transplantasjon musemodell, en kollagen-indusert artritt-modell i musa og/eller en antigen-indusert artritt modell i kaninen. Dataene viser at disse isomeriske blandingene er likeverdige med, eller mer kraftige enn syklosporin A, og derfor nyttige ved behandling av immunoreguleringe lidelser.

Det er et antall uheldige effekter forbundet med syklosporin A behandling, inkludert nefrotoksisitet, hepatotoksisitet, kataraktgenese, hirsutisme, parathesis og gingivahyperplasi for å nevne noen (Sketris et al., 1995). Av disse er nefrotoksisitet en av de mer alvorlige dose-relaterte uheldige effektene som er et resultat av syklosporin A administrasjon. Den eksakte mekanismen hvorved syklosporin A forårsaker skade er ikke kjent. Imidlertid er det foreslått at en økning i nivåene av vasokonstriktive substanser i nyrene fører til lokal vasokonstriksjon i de tilførende glomerulære arteriolene. Dette kan resultere i iskemi, en nedgang i glomerulær filtrerings-hastighet, og over lang tid, interstitiell fibrose.

Den ikke-kliniske sikkerheten av ISATX247 er vurdert i et antall dyre-arter. Gjentatt-dose oratoksitetsstudier i rotter, hunder og primater viste at ISATX247 er godt tolerert og ga effekter som samsvarte med immunosuppresjon. Den eneste toksikologiske effekten som ble notert hos alle artene var diaré, løs avføring.

ISATX247 oppviser ikke mutagen aktivitet som vist i in vitro bakteriell revers-mutasjon og kromosom-avviks analyser, og en in vivo rotte mikronukleous analyse. Til dags dato har ingen karsinogenitets-analyser blitt fullført. Reproduktivitets-toksisitets analyser med ISATX247 er fullført i gravide rotter og kaniner. Det var ingen behandlings-relaterte misdannelser eller endringer. Ved doser som resulterte i moderlig toksisitet, ble tilsvarende foster-toksisitet observert.

## **Eksempler**

### **Eksempel 1: Acetylering av syklosporin A**

Eddiksyre-anhydrid (140 ml) ble satt til syklosporin A (50,0 gram, 41,6 mmol) og blandingen ble rørt ved romtemperatur under N<sub>2</sub>-atmosfære inntil alt syklosporin A var løst. Dimetylaminopyridin (7,62 g, 62,4 mmol) ble satt til og reaksjonen ble rørt ved romtemperatur under en N<sub>2</sub>-atmosfære i 3 timer eller inntil reaksjonen var fullstendig. Reaksjonsblandingen ble kjølt til 5°C og deretter

filtrert. Det samlede faste stoffet ble vasket med heksan for å drive av ytterligere eddiksyre-anhydrid. Det resulterende pasta-faste stoffet ble sakte overført til en kraftig rørt 5 % vandlig natriumbikarbonat løsning (1,5 liter). Den resulterende suspensjonen ble rørt inntil en fin slurry var oppnådd, og utviklingen av CO<sub>2</sub> hadde opphørt. De faste stoffene ble samlet ved filtrasjon og vasket med vann inntil filtratet hadde nøytral pH. Det faste produktet ble tørket i en vakuumovn over natta (55°C), for å gi 44,0 g (85%) av produktet, som et fargeløst fast stoff.

### **Eksempel 2:Oksidering av produkt fra eksempel 1**

Acetonitiril (320 ml) og vann (80 ml) ble satt til acetyl-syklosporin A (42,97 g, 34,54 mmol) og løsningen ble rørt inntil alt materialet var løst. Natrium-periodat (14,77 g, 69,08 mmol) ble satt til, etterfulgt av tilsats av ruthenium-kloridhydrat (0,358g, 1,73 mmol) og deretter ble reaksjonen rørt ved romtemperatur i 3 timer, under N<sub>2</sub>-atmosfære. Vann (300 ml) ble satt til og løsningen ble overført til en separasjons-trakt. Blandingen ble ekstrahert to ganger med etylacetat (300 ml og deretter 250 ml). De mørke svarte etylacetat-ekstraktene ble kombinert og vasket med 250 ml vann, etterfulgt av 250 ml saltvann. Den organiske løsningen ble deretter tørket over MgSO<sub>4</sub> og løsningsmidlet fordampet for å gi et grønnsvart fast stoff. Råproduktet ble kromatografert over silikagel ved bruk av 40% aceton/60% heksan som eluent, for å gi produktet (29,1 g, 68 %) som et fargeløst fast stoff.

### **Eksempel 3:Framstilling av acetyl ISATX247**

#### **i) In situ framstilling av ylilde:**

Acetyl syklosporin A aldehyd (31,84 g, 25,84 mmol) ble satt til 340 ml toluen og blandingen ble rørt inntil materialet var fullstendig løst. Til den resulterende løsningen ble det satt til 340 ml av 1 normal vandig natriumhydroksid. Den resulterende blandingen ble rørt kraftig og deretter ble allyl-trifenyl-fosfonium-bromid (58,22 g, 151,90 mmol) satt til. Reaksjonen ble rørt i 24 timer ved romtemperatur, deretter ble ytterligere allyl-trifenyl-fosfonium-bromid (16,64 g, 43,42 mmol) satt til og røringen fortsatte i ytterligere 24 timer. Blandingen ble overført til en separasjons-trakt og toluen-fasen ble utskilt. Den vandige fasen ble ekstrahert med ytterligere 200 ml toluen. De to toluen ekstraktene ble kombinert og vasket sekvensielt med 200 ml deionisert vann og 200 ml mett vandig natriumklorid løsning. Løsningen ble tørket over MgSO<sub>4</sub>, filtrert og toluenet dampet av for å gi en svært viskøs gel. Dette materialet ble behandlet med 42 ml etylacetat og rørt inntil en fin slurry var dannet. Heksan (570 ml) ble sakte satt til under rask røring. Røringen fortsatte i 30 minutter, og deretter ble den resulterende suspensjonen filtrert og de samlede faste stoffene vasket med 160 ml 5:1 heksan/etyl acetat. Det kombinerte filtratet ble konsentrert på en rotary fordampner til et viskøst semi-fast stoff. Dette materialet ble behandlet med 75 ml etylacetat og rørt inntil en fin slurry ble oppnådd. Heksan (225 ml) ble sakte satt til med rask røring. Røring ble

forsatt i 30 minutter og deretter ble den resulterende suspensjonen filtrert og det oppsamlete faste stoffet vasket med 100 ml av 5:1 heksan/etylacetat. Filtratet ble konsentrert på en rotary fordampner for å gi et blekt gult fast stoff. Råproduktet ble kromatografert over silikagel ved bruk av 40 % aceton/60 % heksan som eluent for å gi produktet (14,09 g) som et fargeløst fast stoff.

#### ii) Forhandsdannet ylidle utvikling og reaksjon i nærvær av LiBr:

Til en rørt suspensjon av allyltrifenyl-fosfonium-bromid (7,67 g, 20 mmol) i THF (20 ml) kjølt til 0°C, ble det satt til en løsning av KOBu<sup>t</sup> i tetrahydrofuran (20 ml, 20 mmol, 1 M løsning). Røringen fortsatte ved denne temperaturen i 30 minutt, og en løsning av LiBr i THF (10 ml, 10 mmol, 1M løsning) ble satt til. Reaksjons-blandingen ble deretter rørt i 20 minutter og en løsning av acetyl CsA-aldehyd (4,93 g, 4 mmol) i THF (10 ml) ble satt til gjennom en kanyle. Etter røring i 15 minutt ved romtemperatur ble reaksjons-blandingen bråkjølt med mettet NH<sub>4</sub>Cl løsning (25 ml). Opparbeidelse og kromatografi som ovenfor ga acetyleret ISATX247 som et fargeløst fast stoff (3,5 g).

#### Eksempel 4:Framstilling av ISATX247

Acetyl ISATX247 (14,6 g, 11,62 mmol) ble løst i 340 ml metanol og deretter ble 135 ml deionisert vann satt til. Kalium-karbonat (13,36 g, 96,66 mmol) ble satt til og blandingen ble rørt ved romtemperatur i 24 til 48 timer inntil reaksjonen var fullstendig. Det meste av metanolet ble fordampet og deretter ble 250 ml etylacetat satt til under røring. En 10 % vandig sitronsyre-løsning (120 ml) ble sakte satt til og deretter ble etylacetat fasen utskilt. Den vandige fasen ble ekstrahert med ytterligere 200 ml etylacetat. De kombinerte etylacetat-ekstraktene ble vasket sekvensielt med 150 ml deionisert vann, 100 ml 10% vandig sitronsyre-løsning og 150 ml mettet vandig natriumklorid, og deretter tørket over MgSO<sub>4</sub>. Etylacetatet ble fordampet for å gi et blekgult fast stoff. Råproduktet ble kromatografert over silikagel ved bruk av 40% aceton/60 % heksan som eluent, for å gi ISATX247 (10,51g, 75%) som et fargeløst fast stoff. ISATX247 inneholder 45-50 % E-isomer og 50-55 % Z-isomer.

Produktene i eksemplene 1-4 ble karakterisert ved masse-spektrometri og/eller nukleær magnetisk resonans spektroskopi.

#### Eksempel 5:Framstilling av acetyl-η-bromsyklosporin A

Acetylsyklosporin A (41,48 g, 33,3 mmol) framstilt som i eksempel 1, N-bromsuccinimid (10,39g, 58,4 mmol) og azo-bis-isobutyronitril (1,09g, 6,67 mmol) ble løst i 250 ml karbon-tetra-klorid og den resulterende blandingen ble varmet til reflux i 2,5 timer. Blandingen ble avkjølt og løsningsmidlet fordampet. Resten ble behandlet med 350 ml dietyleter og filtrert for å fjerne det uløselige materialet. Filtratet ble vasket sekvensielt med 150 ml vann og 150 ml saltvann, deretter tørket over magnesiumsulfat og løsningsmidlet ble fordampet. Råmaterialet ble kromatografert på

silikagel med aceton/heksan (2:3) for å gi 28,57 g (65 %) acetyl- $\gamma$ -bromsyklosporin A som et gult fast stoff.

#### **Eksempel 6:Framstilling av trifenyfosfonium-bromid av acetylsyklosporin A**

Acetyl- $\gamma$ -bromsyklosporin A (28,55 g, 21,6 mmol) og trifenyfosfin (7,55 g, 28,8 mmol) ble løst i 210 ml toluen og den resulterende løsningen ble varmet til 100°C i 21 timer. Løsningen ble avkjølt og toluenet fordampet. Det resulterende oljete, semifaste stoffet ble behandlet med 250 ml heksan/eter (1:4), blandet godt og løsningsmidlet ble dekantert av. Denne prosessen ble gjentatt 3 ganger til med 150 ml eter. Resten ble deretter løst i 50 ml etylacetat og utfelt med 220 ml heksan. Det resulterende faste stoffet ble deretter samlet ved filtrasjon, til å gi 22,5 g (66 %) trifenyfosfonium-bromid av acetylsyklosporin A som et solbrun-farget fast stoff.

#### **Eksempel 7:Wittig reaksjon**

Trifenyfosfonium-bromidet av acetyl-syklosporin (100 mg, 0,06 mmol), et overskudd på 37 % formaldehyd (0,25 ml) og toluen (2 ml) ble rørt raskt ved romtemperatur. Vandig natriumhydroksid som 1 N løsning (2 ml) ble satt dråpevis til, og rørt kontinuerlig i 3,5 timer. Reaksjonsblandingen ble deretter fortynnet med etylacetat (20 ml) og vann (10 ml). Etylacetat-fasen ble utskilt, vasket sekvensielt med vann (10 ml) og saltvann (10 ml), tørket over magnesium-sulfat og løsningsmidlet ble fordampet. Råmaterialet ble kromatografert på silikagel med aceton/heksan (2:3) for å gi 70 mg (88 %) av en blanding av (E)- og (Z)-isomere av acetyl ISATX247 som er fargeløst fast stoff.

#### **Eksempel 8:De-acetylering av Wittig reaksjons-produktet**

Blandingen av isomere fra eksempel 7 (70 mg, 0,056 mmol) ble løst i metanol (5 ml) og deretter ble vann (1 ml) satt til. Kaliumkarbonat (75 mg) ble satt til og reaksjonen ble rørt ved romtemperatur i 19 timer. Det meste av metanolet ble fordampet og 15 ml etylacetat ble satt til resten, etterfulgt av 10 ml 10% vandig sitronsyre. Etylacetat fsen ble utskilt og den vandige fasen ekstrahert med ytterligere 10 ml etylacetat. De kombinerte etylacetat ekstraktene ble vasket sekvensielt med 10 ml vann, 10 ml 10% vandig sitronsyre og 10 ml saltvann før tørking over magnesiumsulfat og fordamping av løsningsmidlet. Råmaterialet ble kromatografert på silikagel med aceton/heksan (2:3) for å gi 37 mg (54 %) ISATX247 som et fargeløst fast stoff som inneholder omtrent 85 % E-isomer og omtrent 15 % Z-isomer.

Produktene i eksempel 5-8 ble karakterisert med masse-spektroskopi og/eller nukleær magnetisk resonans spektroskopi.

### Eksempel 9. Framstilling av de geometriske isomerene av ISATX247

Cis- og trans-isomerene av ISATX247 kan syntetiseres uavhengig ved bruk av det følgende reaksjons-skjema. Sekvensen involverer kjent metallering av allyltrimetylsilane, den elektrophile innfangingen av et trimetylborat, etterfulgt av hydrolyse og deretter transesterifisering for å gi mellomproduktet trans-(trimetylsilyl)allylborat ester. Allylborering av syklosporin-aldehyd ga et bor-mellomprodukt, som konverteres til det ønskete  $\beta$ -trimetylsilyl-alkoholet, ved sekvenstrasjon. Diastereoselektiviteten i dannelsen av nye kirale senter er ikke bestemt på dette stadiet, på grunn av fjerning av disse sentrene på et senere stadium. Det skal bemerkes at den relative stereokjemien av de to senterene i  $\beta$ -trimetylsilyl-alkoholet er anti i samsvar med forventninger og skyldes trans dobbel-bindingen i trans-(trimetylsilyl)borat-forløperen.

Base-promotert eliminerings (Hudrlick et al., 1975) av  $\beta$ -trimetylsilyl-alkohol ga en blanding forrikt på acetyl-(Z)-1,3-diene, mens syre-promotert eliminerings ga en blanding forrikt på acetyl-(E)-1,3-diene. Avbeskyttelse fører til de respektive diene-alkoholene, henholdsvis (Z)- og (E)-isomerene av ISATX247.

En alternerende tilnærming til diener benytter allylfosforaner. Metallering av allyldifenylfosfin og deretter transmetallering med  $\text{Ti}(\text{OPri})_4$  gir titan-mellomproduktet. Allyltitanering etterfulgt av stereospesifikk eliminerings ville generere en blanding forrikt på (Z)-dienet.

På den andre siden, når allyldifenylfosfin-oksiden er utsatt for en lignende sekvens (figur 8), dannes hovedsakelig E-isomeren (75%).

#### i) Allylborering av acetyl CsA-CHO:

(E)-1-trimetylsilyl-1-propen-3-borat ble framstilt i samsvar med tidligere rapporterte framgangsmåter (Ikeda et al., 1987). Til en rørt løsning av (E)-1-trimetylsilyl-1-propen-3-borat (0,2 g, 0,832 mmol) i THF (3 ml) under nitrogen, ble det satt til acetylsyklosporin A aldehyd (1,026 g, 0,832 mmol). Reaksjonsblandingen ble overvåket med "high performance liquid chromatography" (C-8 kolonne, revers fase) og rørt i en periode på totalt 7 dager. Da ble trietanolamin (0,196 g, 1,3 mmol) satt til og røringen fortsatte i en ytterligere periode på 4 dager.  $\beta$ -trimetylsilyl-alkohol ble oppnådd ved rensing over en silikagel kolonne. MS(ES) m/z 1368,9 (M + Na+).

Til en suspensjon av KH (3,5 mg, 26,4  $\mu\text{mol}$ , 30 % mineralolje dispersjon vasket med vannfrie heksaner) i vannfritt THF (1 ml) ble det satt til  $\beta$ -trimetylsilyl-alkohol (10 mg, 7,4 mikromol) og rørt ved romtemperatur i 10 minutt. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med dietyleter (10 ml) og deretter vasket med mettet  $\text{NaHCO}_3$  løsning (2 x 5 ml). Tørking ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) og fjerning av løsningsmiddel ga det forrikete (Z)-acetyl-1,3-dienet. MS (ES) m/z 1294,8 (M + K+).

#### ii) Allyltitanering av acetyl CsA-CHO:

Til en rørt og avkjølt ( $-78^\circ\text{C}$ ) løsning av allyldifenylfosfine (0,54 g, 2,4 mmol) i vannfritt THF (8 ml) ble det satt t-BuLi (1,42 ml, 2,4 mmol, 1,7 M løsning i pentan). Den mursteins-røde løsningen ble rørt i 15 minutt ved denne temperaturen og deretter ved  $0^\circ\text{C}$  i 30 minutt. Den ble deretter kjølt

igjen til  $-78^{\circ}\text{C}$  og tilsatt  $\text{Ti}(\text{OPri})_4$  (0,71 ml, 2,4 mmol). Den brunfargete løsningen ble rørt ved denne temperaturen i 15 minutter og deretter ble en løsning av acetyl CsA-CHO (2,5 g, 2 mmol) i THF (10 ml) satt til gjennom en kanyle. Den blekgule løsningen ble rørt i en periode på ytterligere 30 minutt, og deretter varmet til romtemperatur over natta. Til reaksjonsblandingen ble det satt Mel (0,15 ml, 2,4 mmol) ved  $0^{\circ}\text{C}$ . Røringen fortsatte i 1 time ved denne temperaturen og deretter ved romtemperatur i 2 timer. Reaksjonsblandingen ble tømt over i iskald 1 % HCl (100 ml). Det vandige laget ble ekstrahert med EtOAc (3 x 50 ml). Det kombinerte organiske ekstraktet ble vasket med vann (2 x 25 ml) og saltvann (25 ml). Fjerning av løsningsmidlet ga et gult fast stoff som ble kromatografert over en silikagel kolonne. Eluering med 1:3 aceton-heksan blanding ga den (Z)-forrikete isomeren av acetyl ISATX247. Avbeskyttelse som i eksempel 4 ga (Z)-forriket isomer av ISATX247 (Z/E forhold, 75:25).

#### **Eksempel 10: Framstilling av en (E)-forriket blanding av ISATX247 isomere**

En løsning av allyldifenylfosfin-oksid (1 mmol) og heksametyl-fosforamid (2 mmol) i tetrahydrofuran (5 ml) ved  $-78^{\circ}\text{C}$  ble tilsatt til n-butyllitium (1 mmol, i heksaner). Blandingen ble rørt ved  $-78^{\circ}\text{C}$  i 30 minutt. En løsning av acetyl-syklosporin A aldehyd (0,8 mmol) i tetrahydrofuran (7 ml) ble satt til og reaksjonsblandingen ble gradvis varmet opp til romtemperatur og deretter rørt i 18 timer. Blandingen ble tømt over iskald 1 N saltsyre (50 ml) og deretter ekstrahert i etylaetat. Det organiske ekstraktet ble vasket med vann, tørket over magnesiumsulfat og løsningsmidlet ble fordampet. Resten ble kromatografert over silikagel ved bruk av 25% aceton / 75 % heksaner som eluent, for å gi en blanding av (E)- og (Z)-isomerene av acetyl ISATX247. Fjerning av den acetat-beskyttende gruppen som beskrevet i eksempel 4 ga en (E)-forriket blanding av ISATX247 isomere. Proton NMR spektroskopi antyder at blandingen omfattet 75 % av (E)- og 25 % av (Z)-isomeren av ISATX247. Denne reaksjonen ble også utført i samsvar med Schlossers modifisering (R. Liu, M. Schlosser, Synlett, 1996, 1195). En rørt og avkjølt ( $-78^{\circ}\text{C}$ ) løsning av allyldifenylfosfin-oksid (1,21 g, 5 mmol) i THF (20 ml) ble satt til n-BuLi (2 ml, 5 mmol, 2,5 M løsning i heksaner). Den rødfargete løsningen ble rørt i 40 minutt ved  $-78^{\circ}\text{C}$ . En løsning av acetyl CsA-CHO (1,25 g, 1,02 mmol) i THF (12 ml) ble deretter satt til gjennom en kanyle, i løpet av 15 minutt. Reaksjonsblandingen ble rørt ved romtemperatur i 2 timer. Opparbeidelse og kromatografi som ovenfor ga acetyl ISATX247 (Z:E forhold, 40:60 ved  $^1\text{H}$ NMR analyse).

#### **Eksempel 11: Framstilling av benzoyl-beskyttet syklosporin A**

Syklosporin A (6,01 g, 5 mmol) og 4-dimetylamino-pyridin (305 mg, 2,5 mmol) ble løst i pyridin (5 ml). Benzoanhydrid (3,4 g, 15 mmol) ble satt til og blandingen ble rørt i 19 timer ved  $50^{\circ}\text{C}$ . Ytterligere benzoanhydrid (1,7 g, 7,5 mmol) og DMAP (305 mg, 2,5 mmol) ble satt til og røringen fortsatte ved  $50^{\circ}\text{C}$  i ytterligere 24 timer. Benzoanhydrid (0,85g, 3,8 mmol) ble satt til og reaksjonen

ble rørt i ytterligere 23 timer. Reaksjonsblandingen ble deretter sakte tømt i vann under røring. Utfelt syklosporin A benzoat ble filtrert av og ble vasket med vann. Den innsamlete filterkaken ble løst i et minimalt volum metanol, tilsatt 10% sitronsyre-løsning og rørt i 1 time. Det utfelte produktet ble samlet ved filtrasjon og vasket med vann inntil pH i filtratet nådde den av vann. Det faste syklosporin A benzoatet ble tørket ved 50°C under vakuum for å gi et fargeløst fast stoff.

#### **Eksempel 12: Utfelling av trietylsilyl-eter beskyttet syklosporin A**

Syklosporin A (3,606 g, 3 mmol) ble løst i tørr pyridin (8 ml) og deretter ble DMAP (122 mg, 1 mmol) satt til. Reaksjonsblandingen ble kjølt til 0 °C og deretter ble trietylsilyl-trifluor-metansulfonat (3,6 mmol) satt til dråpevis. Blandingen ble varmet opp til romtemperatur, og ble rørt over natta. Reaksjonsblandingen ble deretter sakte tømt i vann under røring. Den utfelte trietylsilyl-eteren ble filtrert bort og vasket med vann. Den oppsamlete kaken ble løst i et minimalt volum metanol, tilsatt en 5 % sitronsyre-løsning og rørt i 30 minutter. Det utfelte produktet ble samlet ved filtrasjon og vasket med vann inntil pH av filtratet nådde den av vann. Den faste trietylsilyl-eteren ble tørket ved 50°C under vakuum for å gi et fargeløst fast stoff. Triisopropylsilyl og tert-butyldimetylsilyl beskyttende grupper ble også introdusert ved å følge en analog prosedyre.

#### **Eksempel 13: Immunosuppressiv aktivitet ved bruk av calcineurin inhiberingsanalyse**

En indikator på effektiviteten av syklosporin A eller et syklosporin A derivat er dets evne til å inhibere fosfatase-aktiviteten av calcineurin. Calcineurin-inhiberings-analysen måler aktiviteten av medikamentet på dets virkested og er som sådan den direkte in vitro bedømmelsen av kraften av syklosporin A analoger (Frumann et al., 1992).

Den immunosuppressive aktiviteten av ISATX247 (45 - 50 % av E-isomeren og 50-55 % av Z-isomeren) versus syklosporin A ble bedømt ved bruk av calcineurin (CN) inhiberings-analysen. Resultatene av denne analysen viser at inhiberingen av calcineurin-fosfatase-aktivitet av ISATX247 (45-50 % av Z-isomeren og 50-55% av E-isomeren) var opptil tre ganger mer kraftig (bestemt med IC50) sammenlignet med syklosporin A (figur 11).

Den immunosuppressive aktiviteten av forskjellige deutererte og ikke deutererte blandinger av isomeriske analoger versus syklosporin A er vurdert ved bruk av calcineurin (CN) inhiberings-analysen. Strukturen og den isomeriske blandingen av disse analogene er vist i figur 12. I figur 12 tilsvarer referansen "I4" strukturen av ISATX247. I4-M2 angir ISATX247 produsert med framgangsmåten beskrevet i eksemplene 5-8 (angitt som framgangsmåte 2 i denne figuren). I4-D4 angir deuterert ISATX247 produsert med framgangsmåten beskrevet i eksemplene 1-4. I4-D2 angir deuterert ISATX247 produsert med framgangsmåten beskrevet i eksemplene 5-8. Andre isomeriske blandinger er som vist i figuren.

Resultatene av denne analysen viser at inhiberingen av calcineurin fosfatase aktivitet ved disse blandingene av isomeriske analoger var i det minste like kraftig (som bestemt ved IC50) som med syklosporin A (figur 13). CsA angir syklosporin A; isosyklo4 angir ISATX247 framstilt med framgangsmåten beskrevet i eksempel 1-4. Isosyklo 5 tilsvarer I5-M1 i figur 12. Isosyklo4-d4 tilsvarer I4-D4 i figur 12. Isosyklo5-d5 tilsvarer I5-D5 i figur 12. Isosyklo4-d2 tilsvarer I4-D2 i figur 12. Isosyklo4-M2 tilsvarer I4-M2 i figur 12. Isosyklo5-m2 tilsvarer I5-M5 i figur 12.

#### **Eksempel 14: Immunosuppressiv aktivitet ved bruk av rotte-hjerte transplantat modell**

Effektiviteten av ISATX247 (45-50 % av E-isomeren og 50-55 % av Z-isomeren) ved forhindring av avvisning av hjerter transplantert mellom ulike rotte-stammer ble vurdert og sammenlignet med den av syklosporin A. Rottehjerte transplantat-modeller er den mest hyppige brukte modellen for å bedømme in vivo kraften av nye immunosuppressive medikamenter, ettersom forlenget levetid av transplantatet er vanskelig å oppnå i denne modellen på grunn av immun-avvisning.

Prosedyren omfattet den heterotropiske transplantasjonen (til den abdominale aorta og mindre vena cava) av hjertet fra Wistar Furth rotter til Lewis rotter. Intraperitoneale injeksjoner av enten syklosporin A eller en blanding isomere analoger ble gitt til mottakeren av transplantatet, med start 3 dager før transplantasjonen og fortsatte 30 dager etter transplantasjonen. Dersom transplantat-dysfunksjon ble notert under den 30 dager lange perioden etter transplantasjonen, ble dyret avlivet. Dersom dyret levde lenger enn 30 dager etter transplantasjonen, ble test og kontroll artikler koblet fra, og dyret fikk fortsette inntil transplantat-dysfunksjon, eller inntil 100 dager etter transplantasjon.

De gjennomsnittlige overlevelses-ratene for hver gruppe av mottaker dyr er summarisert i tabell 1. Disse resultatene viser at ISATX247 (45-50 % E-isomer og 50-55 % av Z-isomer) ved en optimal dose på 1,75 mg/kg/dag økte overlevelses-tiden omtrent tre ganger i forhold til syklosporin A. Et antall dyr som mottok ISATX247 hadde fremdeles funksjonelle transplantater ved 100 dager etter transplantasjonen (70 dager etter avslutningen av medisinerings.) Disse dataene viser den immunosuppressive aktiviteten av denne blandingen av isomeriske analoger for å hindre avvisning av transplantatet.

<b>Tabell 1</b>			
Effekt av ISA <sub>TX</sub> 247 og syklosporin A, gitt ved en intraperitoneal administrasjon ved den gjennomsnittlige overlevelses-tiden av transplanterte rotte hjerter (gjennomsnitt fra to separate studier, n 13)			
Dose (mg/kilogram/dag)	Gjennomsnittlig overlevelses tid (dager etter operasjonen)		
	Gjennomsnitt ± SEM (Scanning electron microscope)		
	Vehikkel kontroll	Syklosporin A	ISA <sub>TX</sub> 247
0	9 ± 1		
0,5		13 <sup>a</sup> ± 4	11 <sup>a</sup> ± 2
1,75		18 <sup>b</sup> ± 7	57 <sup>b</sup> ± 32
3		50 <sup>c</sup> ± 8	55 <sup>c</sup> ± 12

a,c Ikke betydelig forskjellig

b Betydelig forskjellig (p< 0,01)

Effektiviteten av ulike deuteraterte og ikke-deuteraterte blandinger av isomeriske analoger (strukturer er gitt i figur 12) for å hindre avvisning av hjerter transplantert mellom ulike arter av rotter, ble også vurdert og sammenlignet med den av syklosporin A. Dosene var ved 1,75 mg/kg/dag i 30 dager. Resultatene er oppsummert i tabell 2. Disse resultatene viser at de isomeriske blandingene ved 1,75 mg/kg/dag økte overlevelsestiden minst like mye som syklosporin A, og viste den immunosuppressive aktiviteten av disse blandingene av isomeriske analoger, for å hindre transplantat-avvisning.

<b>Tabell 2</b>	
Effekt av ulike blandinger av isomere analoger og syklosporin A, gitt ved intraperitoneal administrasjon ved 1,75 mg/kg/dag, på den gjennomsnittlige overlevelsestiden av transplanterte rotte-hjerter.	
Test forbindelse [00216]	Gjennomsnittlig overlevelsestid (dager etter operasjon)
Vehikkel kontroll	9
Syklosporin A	20
I5-M1	20
I4-M2	20+
I4-D2	30

#### Eksempel 15: Immunosuppressiv aktivitet i islet celle allotransplantasjon

Evnen av ISATX247 (45-50% av E-isomeren og 50-55 % av Z-isomeren) kontra syklosporin A for å forlenge overlevelsestiden av de transplanterte islet cellene i en musemodell, ble vurdert i en studie omfattende transplant av 500 isleter fra en CBA/J mus inn i en nyre-kapsel hos diabetiske Balb/c muse-resipienter.

Etter transplantasjonen ble ISATX247 eller syklosporin A administrert ved intraperitoneal (i.p.) injeksjon ved doser på 0 (vehikkel), 1,75, 10, 20 eller 25 mg/kg/dag i totalt 30 dager. Blodglukose ble overvåket daglig inntil tidspunkt for transplantat-svikt, som definert av et glukosenivå større enn 17 mmol/l på to påfølgende dager.

Resultatene antyder at ISATX247 økte lengden for transplantat-overlevelse med 40 % ved en dose på 20 mg/kg/dag (tabell 3). Det ble også anmerket at ISATX247 var mindre giftig enn syklosporin A etter hvert som dosene økte. Dette var særlig tydelig ved 25 mg/kg/dag dosen.

Dose (mg/kg/dag)	Behandling	N	Median overlevelse (dager)	Gj. snitt overlevelse (dager)
0	Vehikkel	7	17	16,8
1,75	CsA	9	17	17,4
1,75	ISA	9	18	18,7
10	CsA	6	21	25,3
10	ISA	5	18	19,2
0	Vehikkel	12	16	15,9
20	CsA	9	19	20,2
20	ISA	9	>28	>28
0	Vehikkel	5	21	21,1
25	CsA	10	ND*	ND*
25	ISA	8	50	46,4

\* 7 av 10 dyr i denne gruppen døde av CsA toksisitet. Derfor var det bare 3 dyr som fullførte i denne gruppen, og det ble ikke laget noen statistikk.

#### **Eksempel 16: Immunosuppressiv aktivitet i artritt**

I løpet av de tre siste tiårene, har tre dyremodeller av humant reumatisk artritt blitt omfattende vurdert og brukt i stor utstrekning i preklinisk screening og utvikling av nye anti-reumatiske forbindelser. Disse inkluderer de adjuvans-, kollagen- og antigen-induserte artritt-modellene. De følgende studiene ble utformet for å vurdere anti-inflammatorisk effektivitet av ISATX247 (45-50 % av E-isomer og 50-55% av Z-isomer) både i den kollagen-induserte artritt-modellen i mus og den antigen-induserte artritt-modellen i kaniner. Histopatologien og immunopatologien som ble observert i disse to modellene gjenspeiler funnene i den humane sykdommen. I begge modellene ble effektiviteten av ISATX247 for å hindre begynnelsen av artritt (forebyggingsprotokoll) og for å behandle artritt (behandlingsprotokoll) vurdert. Disse studiene støtter den immunosuppressive virkningen av de krevde blandingene av isomeriske analoger.

#### **A. Kollagen-indusert artritt**

DBA/1 Lac J mus, hannkjønn, holdt under virus-antistoff frie forhold, ble immunisert subkutan ved 8 til 10 ukers alder, med 100 mikrogram av kylling type II kollagen, emulgert i Freund's fullstendige adjuvans. ISATX247, syklosporin A eller vehikkel (Chromophor EL/etanol 72:28 volum/volum) ble administrert daglig ved intraperitoneal (i.p.) injeksjon på 1 til 50 gangers

fortynning av lager-medikamentet (0,25, 0,5 eller 1 mg/ml) i saltvann for å gi konsentrasjoner på 0 (vehikkel), 125, 250 eller 500 µg/mus for ISATX247, og 250 eller 500 µg/mus for syklosporin A. Dyr utvalgt for forebyggings-protokollen (12/gruppe) ble gitt doser fra dagen for immunisering med kollagen (dag 0) inntil ofring på dag 40. Dyr som var utvalgt til behandlings-protokollen (12/gruppe) ble gitt doser fra dagen for begynnelsen av sykdommen (~ dag 28) inntil ofring på dag 38.

Vurderte parametre inkluderer dødelighet, creatin i serum, histologi og resultats-vurderinger, så som klinisk scoring (visuelt), hevelse i bakre pote, histologisk bedømming, erosjons-bedømming og immunohistokjemi.

Erosjons-bedømming ble gjort på en blindet måte ved å vurdere pilformete seksjoner av det proksimale interfalangealleddet (PIP) av den midtre tåen for nærvær eller fravær av erosjon (definert som markerte defekter i brusk eller bein fylt med inflammatorisk vev). Denne tilnærmingen tillot sammenligninger av det samme leddet. Tidligere studier har vist erosjoner >90 % hos ubehandlede dyr med artritt, i dette leddet.

Resultatene antyder at de negative erosjons-poengene i gruppen som ble behandlet med ISATX247 høy-dose (500 µg/mus) var betydelig høyere enn de negative erosjons-poengene i gruppen som ble behandlet med vehikler ( $p < 0,05$ ). Både gruppen behandlet med midt-dose ISATX247 (250 µg/mus) og med høy-dose syklosporin A (500 µg/mus) hadde høyere negative erosjons-poeng enn gruppen behandlet med vehikler ( $p < 0,1$ ). Dessuten hadde gruppene behandlet med lav-dose ISATX247 (125 µg/mus) og midt-dose syklosporin A kontroll (250 µg/mus) høyere, men ikke statistisk signifikante, negative erosjons-poeng, sammenlignet med vehikkel-kontroll gruppen.

Den eneste behandlingen for å betydelig forebygge utvikling av ledd-erosjoner var ISATX247 ved 500 µg/mus. Denne signifikante reduksjonen i samsvar med PIP leddene, som viser erosive endringer i mus behandlet med ISATX247 i forhold til mus i vehikkel kontroll gruppen, viser at ISATX247 har sykdoms-modifiserende egenskaper.

### **B. Antigen-indusert artritt**

New Zealand White kaniner, holdt under spesielle patogenfrie forhold, ble immunisert med 10 mg ovalbumin i saline, emulgert med Freund's fullstendige adjuvans som ble gitt intramuskulært og subkutan på flere steder i nakkegroppen. Fjorten dager senere begynte alle dyrene å motta 2 daglige intra-artikulære injeksjoner av 5 mg ovalbumin og 65 ng humant rekombinant transformerende veksthormon 2 i saline.

ISATX247, syklosporin A eller vehikkel (Chremophor EL/etanol 72:28, v/v) ble administrert daglig ved subkutan injeksjon av 1 til 4 ganger fortynninger av lager-medikamentet (i vehikkelen) i saline for å gi konsentrasjoner på 0 (vehikkel), 2,5, 5,0, eller 10 mg/kg/dag for ISATX247, og 5,0, 10

eller 15 mg/kg/dag for syklosporin A. Dyr som var utvalgt for forebyggings-protokollen (8/gruppe) ble dosert med start på dagen for immunisering med ovalbumin (dag 0) inntil ofring på dag 42. Dyrene utvalgt til behandlings-protokollen (8/gruppe) ble dosert med start på dagen for begynnelsen av sykdom (~28 dager) inntil ofring på dag 42.

Vurderte parametre inkluderte dødelighet, kroppsvekt, serum kreatinin, histologi, og resultatvurderingen så som hevelse i kneledd, synovial fluid-tellinger, postmortem grov-analyser og histologi.

En betydelig nedgang i synoviale histopatologiske poeng ble observert hos dyr behandlet med ISATX247 (P 0,05) og syklosporin (P 0,05) etter 28 dager med behandling (forebyggings-protokollen) sammenlignet med vehikkel-kontrolldyr. Dette ble fulgt av betydelige reduksjoner i synovial-fluid tellinger (ISATX247, P 0,05; syklosporin S, P 0,05). Betydelig forbedring i synoviale histopatologiske poeng hos dyr med etablert artritt ble også åpenbar etter 14 dagers behandling med ISATX247 (P 0,05) og syklosporin A (P 0,05) sammenlignet med vehikkel-kontroller (behandlings-protokoll). En betydelig reduksjon i makroskopiske artritt-poeng var tydelig hos dyr behandlet med ISATX247 (P = 0,01), men ikke hos dyr behandlet med syklosporin A. Behandling ble godt tolerert uten betydelig toksisitet ved analyse av serum creatinin eller ved post-mortem histologi.

Dataene viser at ISATX247 er ekvivalent med eller potensielt mer kraftig enn syklosporin A i behandling og forebygging av reumatisk artritt i en antigen-indusert artritt-modell hos kaniner.

#### **Eksempel 17: Farmakokinetiske og toksikokinetiske egenskaper**

De farmakokinetiske og toksikokinetiske parametrene av ISATX247 (45-50 % av E-isomeren og 50-55 % av Z-isomeren) og syklosporin A ble testet i en kanin-modell. Kaninene har også blitt brukt som modell for å studere syklosporin A nefrotoksitet, men i mye mindre utstrekning enn rotten. Studier har vist at syklosporin A administrert til kaniner forårsaker strukturelle og funksjonelle endringer ved en dose som ikke bare er mindre enn det som tidligere er rapportert hos andre dyremodeller, men også innen i det minste det øvre nivå av det terapeutisk området hos mennesker (Thliveris et al., 1991, 1994). Funnene av interstitial fibrose og arteriopat, i tillegg til de cytologiske endringene i tubulus, antyder også at kaninen er en mer egnet modell for å studere nefrotoksitet, ettersom disse strukturelle enhetene er kjennemerker på nefrotoksitet observert hos mennesker. ISATX247 ble administrert intravenøst (i.v.) i de første 7 dagene, og subkutant (s.c.) i ytterligere 23 dager, i samsvar med det følgende skjema.

<b>Tabell 4</b>				
<b>Dose-administrasjons skjema for vurdering av farmakokinetiske og toksikokinetiske egenskaper av ISA<sub>TX</sub>247 i kanin-modell.</b>				
Behandlings-gruppe	Dag 1-7: i.v. dose (mg/kg)	Dag 8-30 s.c. dose (mg/kg)	Antall dyr	
			Hannkjønn	Hunnkjønn
1. Vehikkel kontroll	0	0	4	4
2. Syklosporin A kontroll	10	10	6	6
3. Lav dose	5	5	0	2
4. Medium dose	10	10	4	4
5. Høy dose	15	15	4	4

Patogenfrie kaniner (SPF) ble benyttet for å sikre at enhver nyre-ændring som ble observert skyldes effekten av ISATX247, og ikke patogener. På dag 1 og 7 ble det samlet blodprøver før medikament administrasjon, og ved 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 18 og 24 timer etter dosen, for å generere en farmakokinetisk profil. Andre vurderte parametre inkluderer klinisk observasjon, kroppsvekt, mat-inntak, hematologi, klinisk kjemi, grov patologi, og histopatologisk vurdering av valgte vev/organer.

Det ble analysert blodprøver via "high performance liquid chromatography" sammen med masse spektrometri (LCMS). Tabell 5 nedenfor oppsummerer de gjennomsnittlige parametrene i kaniner som mottok 10 mg/kg syklosporin A eller ISATX247.

<b>Tabell 5</b>				
<b>Farmakokinetiske parametre av intravenøst administrert syklosporin A og ISA<sub>TX</sub>247 i hankjønnsrotter som mottok 10 mg/kg/dag. Resultater uttrykt som gjennomsnitt ± SD</b>				
Målt parameter	Syklosporin A		ISA <sub>TX</sub> 247	
	Dag 1	Dag 7	Dag 1	Dag 7
t <sub>max</sub> (timer)	0,5	0,5	0,5	0,5
C <sub>max</sub> (µg/l)	1954 ± 320	2171 ± 612	1915 ± 149	1959 ± 470
t <sup>1/2</sup> (timer)	7,4 ± 2,8	9,0 ± 4,0	7,4 ± 1,7	9,2 ± 1,1
Areal under kurven (µg·timer/l)	6697 ± 1717	6685 ± 1247	5659 ± 1309	5697 ± 1373

Det var ingen statistisk signifikante forskjeller mellom de farmakokinetiske parametrene av syklosporin A og ISATX247 hos hankjønns kaniner som mottok 10 mg/kg/dag. De farmakokinetiske parametrene av ISATX247 i hunnkjønns kaniner som mottok den samme dosen var ikke betydelig forskjellig fra det som ble observert hos hankjønnskaniner, med unntak av maksimal konsentrasjon på dag 7.

Ingen signifikante endringer ble notert i de hematologiske parametrene av kaniner som mottok en vehikkel kontroll, syklosporin A eller ISATX247. Det ble bemerket en forskjell kreatinin-nivåene i de forskjellige gruppene under forløpet av studien, som vist i tabell 6 under. Disse forskjellene antydte at syklosporin A hadde en betydelig større negativ effekt på nyrene enn en av vehikkel kontroll eller ISATX247. Det skal bemerkes at selv ved en 50% høyere dose, 15 mg/kg/dag,

sammenlignet med 10 mg/kg/dag syklosporin A, resulterte ikke ISATX247 i noen betydelig økning i serum kreatinin nivåene.

<b>Tabell 6</b>		
<b>Prosentvis endring i serum kreatinin nivå over base-linja hos hannkjønns kaniner som mottok vehikkel, syklosporin A eller ISA<sub>TX</sub>247 i 30 dager.</b>		
Behandlings-gruppe	Dag 15	Dag 30
Vehikkel	+ 6 %	- 3 %
Syklosporin A (10 mg/kg)	+ 22 %	+ 33 %
ISA <sub>TX</sub> 247 (10 mg/kg)	+ 1 %	+ 10 %
ISA <sub>TX</sub> 247 (15 mg/kg)	- 19 %	- 11 %

Vurdering av organer i alle kaniner som mottok vehikkel-kontrollen, 10 mg/kg syklosporin A, 5 mg/kg ISATX247 eller 10 mg ISATX247 viste ingen signifikante unormaliteter. Dette var særlig sant for nyrene, hvor det ikke ble notert noe bevis for interstitial fibrose, vanligvis sett hos syklosporin A-behandlede dyr (Thliveris et al., 1991, 1994). Hos hannkjønns rotter som mottok 15 mg/kg ISATX247, ble det notert en nedgang i spermatogenese. Ingen endringer ble notert hos 3 hunnkjønns rotter som fullførte studien ved denne dosen på 15 mg/kg ISATX247.

#### **Eksempel 18: Immunosuppressive effekter av ISATX247**

Udelt blod fra cynomolgous aper (n=4) ble inkubert med ISATX247 eller syklosporin og stimulert med ulike mitogener i et dyrknings-medium. Lymfocytt proliferasjon ble bedømt ved thitium-merket tymidin inkorporering og ved strømnings-cytometriske analyser av ekspresjon av proliferiserende celle-nukleær-antigen (PCNA) på celler i SG2M fase. Strømnings-cytometri ble også benyttet for å bedømme produksjonen av intracellulære cytokiner ved T-celler og ekspresjon av T-lymfocytt aktiverings-antigener. EC50 (konsentrasjon av medikament nødvendig for å oppnå 50 % av maksimal effekt) ble deretter beregnet ved bruk av WinNonlin<sup>TM</sup> software. Resultater viste at lymfocytt-proliferasjon, cytokin-produksjon og ekspresjon av T-celle overflate antigener ble inhibert mer kraftig av ISATX247, enn av syklosporin, som vist av EC50 (uttrykt som ng/ml), og skrevet inn i tabell 7, nedenfor.

<b>Tabell 7</b>		
Parameter	ISA <sub>TX</sub> 247	Syklosporin
<sup>3</sup> H-thymidin opptak	160,65	565,52
PCNA ekspresjon	197,72	453,88
IL-2 produksjon	103,35	504,80
IFN-produksjon	102,67	465,65
TNF-produksjon	90,58	508,29
CD 71 ekspresjon	149,84	486,82
CD 25 ekspresjon	121,00	431,53
CD 11a ekspresjon	204,40	598,90

Tabell 7		
CD95 ekspresjon	129,98	392,97
CD 154 ekspresjon	160,87	975,10

Ved bruk av en ex vivo fullstendig blod-analyse, har vi på denne måten funnet at ISATX247 undertrykker forskjellige immun-funksjoner 2,3 til 6 ganger kraftigere enn syklosporin.

**Eksempel 19: Wittig reaksjon ved bruk av tributyl-allyl-fosfonium-bromid**

Kalium-tert-butoksid (0,31 g, 2,8 mmol) ble løst i 20 ml tetrahydrofuran. Ved omtrent  $-40^{\circ}\text{C}$  ble tributyl-allyl-fosfonium-bromid (0,99 g, 3,1 mmol) løst i 3 ml tetrahydrofuran, sakte satt til. Den resulterende gule blandingen ble rørt i omtrent 10 minutter ved omtrent  $-40^{\circ}\text{C}$  før en løsning av acetyl-syklosporin A aldehyd (1,5 g, 1,2 mmol) i 6 ml tetrahydrofuran sakte ble satt til. Etter røring av den gul-orange reaksjonsblandingen i 1,5 timer var reaksjonen fullstendig. For å bråkjøle reaksjons-blandingen ble den overført på vandig fosforsyre (1,2 g, 1,0 mmol). Den resulterende vandige løsningen ble ekstrahert med 100 ml toluen etterfulgt av 50 ml toluen. De kombinerte organiske lagene ble vasket med vann og konsentrert under redusert trykk til tørrhet. Produktet, acetyleret ISATX247 ble oppnådd som et svakt gult, fast stoff i omtrent 90 % utbytte. Isomer-forholdet var omtrent 87 % E-isomer og omtrent 13 % Z-isomer (bestemt med  $^1\text{H-NMR}$  spektroskopi).

**Eksempel 20: Wittig reaksjon ved bruk av tributyl-allyl-fosfonium-bromid og en litiumbase**

Tributyl-allyl-fosfonium-bromid (1,38 g, 4,3 mmol) ble løst i en blanding av 20 ml toluen og 3 ml tetrahydrofuran. Ved omtrent  $-78^{\circ}\text{C}$  ble butyllitium (1,6 M i heksan, 2,43 ml, 3,9 mmol) sakte satt til. Den resulterende gule blandingen ble rørt i omtrent 10 minutt ved omtrent  $-78^{\circ}\text{C}$  før en løsning av acetyl-syklosporin A aldehyd (1,5 g, 1,2 mmol) i 6 ml toluen ble sakte satt til. Etter røring av den gul-orange reaksjons-blandingen i 3,5 timer, ble reaksjonen bråkjølt ved å overføre reaksjons-blandingen på en blanding av 50 ml toluen og vandig fosforsyre (0,25 g, 2,2 mmol). Den resulterende tofasete blandingen fikk varmes opp til omgivelses-temperatur før de to lagene ble adskilt. Toluen-laget ble vasket med 20 ml vann og konsentrert under redusert trykk til tørrhet. Produktet, acetyleret ISATX247, ble oppnådd som et svakt gult, fast stoff med et utbytte på omtrent 80 %. Isomer-forholdet var omtrent 70 % E-isomer og omtrent 30 % Z-isomer (bestemt med  $^1\text{H-NMR}$  spektroskopi).

**Eksempel 21: Wittig reaksjon ved bruk av tributyl-allyl-fosfonium-bromid og en litiumbase**

Kjøle SAP018 som beskrevet ovenfor, men ved bare  $-40^{\circ}\text{C}$ . De eksperimentelle forholdene i eksempel 20 ble gjentatt, denne gangen ved bruk av en reaksjons-temperatur på omtrent  $-40^{\circ}\text{C}$ . Under disse forholdene var det isomeriske forholdet av det isolerte produktet, acetyleret ISATX247,

omtrent 74 vekt% av E-isomeren, og omtrent 26 vekt% av Z-isomeren, bestemt med  $^1\text{H-NMR}$  spektroskopi.

#### **Eksempel 22: Wittig reaksjon ved bruk av tributyl-allyl-fosfonium-bromid**

En løsning av acetyl-syklosporin A aldehyd (1,5 g, 1,2 mmol) og tributyl-allyl-fosfonium-bromid (0,99g, 3,1 mmol) i 15 ml tetrahydrofuran ble avkjølt til en omtrent  $-80^\circ\text{C}$ . Kalium tert-butoksid (0,19 g, 1,7 mmol) løst i 9 ml tetrahydrofuran ble sakte satt til. Den resulterende gule blandingen ble rørt i en time ved omtrent  $-80^\circ\text{C}$  for å fullføre reaksjonen før en blanding av 6 ml tetrahydrofuran sakte ble satt til. Etter røring av den gul-orange reaksjonsblanding i 1,5 timer, var reaksjonen fullstendig. For å bråkjøle reaksjonsblanding ble vandig fosforsyre (0,15 g, 1,3 mmol) satt til. Den resulterende blandingen ble sakte tilsatt 5 ml vann. Det resulterende bunnfallet ble filtrert, vasket med 4 ml metanol/vann (1/1) og tørket under vakuum. Produktet, acetyleret ISATX247 ble oppnådd som et fargeløst fast stoff i omtrent 90 % utbytte. Isomer-forholdet var omtrent 91 vekt% E-isomer og 9 vekt% Z-isomer (bestemt ved  $^1\text{H-NMR}$  spektroskopi).

#### **Eksempel 23: Ozonolyse av acetyl CsA**

En løsning av acetylsyklosporin A (15g, 12,1 mmol) i 200 ml metanol ble ozonisert ved  $-78^\circ\text{C}$  ved bruk av en Sander ozon-generator ved omtrent 1,1 bar med en strømgjennomgang av 300 l  $\text{O}_2$  / time inntil reaksjonen var fullstendig (omtrent 5 minutt). Løsningen ble gasset med argon og bråkjølt med dimetylsulfid løst i metanol. For å fullføre reaksjonen ble blandingen rørt over natta ved romtemperatur. Etter konsentrasjon til omtrent 50 ml, ble løsningen sakte til satt 500 ml vann. Det resulterende bunnfallet ble filtrert, vasket med 60 ml vann, og tørket under vakuum. Produktet, acetyleret CsA aldehyd, ble oppnådd som et fargeløst fast stoff i omtrent 95 % utbytte, og en renhet på omtrent 98 % (bestemt med HPLC).

#### **Eksempel 24: Framstilling av trimetylsilyl-beskyttet syklosporin A**

Syklosporin A (40 g, 1 ekvivalent) ble løst i diklormetan (100 ml) ved  $30^\circ\text{C}$ . N,N-bis-(trimetylsilyl)urea (1,1 ekvivalent) ble satt til. Etter 5 minutter røring ved  $30^\circ\text{C}$ , ble p-toluensulfonsyre (0,02 ekvivalenter) satt til. Reaksjonsblanding ble varmet med reflux inntil fullføring av reaksjonen, målt med tynnplate-kromatografi (TLC), høyt trykk eller "high performance liquid chromatography" (HPLC) eller masse-spektroskopi (MS) og deretter avkjølt til romtemperatur. Halv-mettet vandig natrium-bikarbonat løsning (100 ml) ble satt til. Den vandige fasen ble utskilt og ekstrahert med diklormetan. De kombinerte organiske fasene ble tørket over vannfritt  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  og filtrert. Løsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk, og ga råproduktet trimetylsilyl-beskyttet syklosporin A.

**Eksempel 25: Framstilling av trimetylsilyl-beskyttet syklosporin A aldehyd**

Trimetylsilyl-beskyttet syklosporin A (5 g, 1 ekvivalent) ble løst i diklormetan (50 ml). Løsningen ble avkjølt til en temperatur på omtrent -78°C, hvoretter ozon ble boblet gjennom løsningen inntil det kom fram en blå farge. Deretter ble argon boblet gjennom løsningen inntil en fargeløs løsning var oppnådd, for å fjerne overskytende ozon. Trimetylamin (5 ekvivalenter) ble satt til og reaksjons-blandingen ble rørt ved romtemperatur i 17 timer. Trimetylsilyl-beskyttet syklosporin A aldehyd ble oppnådd etter vandig opparbeidelse.

**Eksempel 26: Framstilling av en 3:1 blanding av Z- på E- dobbelbindings-isomere av trimetylsilyl-beskyttet syklosporin A diene via Wittig reaksjoner.**

Til en blanding av kalium-tert-butoksid (3 ekvivalenter) og allyltrifenylfosfonium-bromid (2 ekvivalenter) i toluen (10 ml), tidligere rørt i 60 minutt, ble satt til det trimetylsilyl-beskyttet syklosporin A aldehydet (1 g, 1 ekvivalent). Opparbeidelse av reaksjons-blandingen etter 1 times reaksjon ved romtemperatur ga en 3:1 blanding (ved NMR) av Z- og E-dobbelbindings-isomere av det trimetylsilyl-beskyttet syklosporin A dienet.

**Eksempel 27: Framstilling av en 1:1 blanding av Z- og E- dobbelbindings-isomere av trimetylsilyl-beskyttet syklosporin A diene via Wittig reaksjoner.**

Det trimetylsilyl-beskyttete syklosporin A aldehydet (2,5 g) ble løst i 25 ml toluen og behandlet med 1 N vandig natriumhydroksid løsning (10 ekvivalenter). Reaksjonen ble kraftig rørt og allyltrifenylfosfonium bromid (7,5 ekvivalenter, porsjonsvis) ble satt til. Opparbeidelse av reaksjonsblandingen etter flere timers reaksjon ved romtemperatur, ga en ca 1:1 blanding (ved NMR) av Z- og E-dobbelbindings-isomere av trimetylsilyl-beskyttet syklosporin A diene.

**Eksempel 28: Framstilling av en 1:2 blanding av Z- og E- dobbelbindings-isomere av trimetylsilyl beskyttet syklosporin A diene via Wittig reaksjoner.**

Det trimetylsilyl-beskyttete syklosporin A aldehydet (1 g) ble løst i 5 ml toluen sammen med kalium-karbonat (1,5 ekvivalenter) og allyltrifenylfosfonium-bromid (1,5 ekvivalenter). Opparbeidelse av reaksjons-blandingen etter 4 timers reaksjon ved reflux under kraftig røring ga en ca 1:2 blanding (ved NMR) av Z- og E- dobbelbindings-isomere av det trimetylsilyl-beskyttete syklosporin A dienet.

**Eksempel 29: Framstilling av en 1:3 blanding av Z- og E- dobbelbindings-isomere av trimetylsilyl beskyttet syklosporin A diene via Wittig reaksjoner**

Allyltributylfosfonium-bromid (3 ekvivalenter, framstilt fra allylbromid og tributylfosfin) ble løst i THF (3,5 ml). Toluen (7,5 ml) ble tilsatt, etterfulgt av kalium-tert-butoksid (4 ekvivalenter). Etter 1

times røring ved romtemperatur ble løsningen kjølt til ca  $-30^{\circ}\text{C}$ . En løsning av trimetylsilyl-beskyttet syklosporin A aldehyd (1g, 1 ekvivalent) i toluen (5 ml) ble satt til dråpevis. Etter 45 minutter ved omtrent  $-30^{\circ}\text{C}$ , ble reaksjonsblandingen opparbeidet, og ga en omtrent 1:3 blanding (ved NMR) av Z- og E-dobbelbindings-isomere av det trimetylsilyl-beskyttete syklosporin A dienet.

De følgende to eksemplene, eksempel 30 og 31, er rettet mot allylmetallringer.

**Eksempel 30: Framstilling av acetyl-beskyttet syklosporin A  $\beta$ -trimetylsilyl-alkohol**

En løsning av allyltrimetylsilan (10,1 ekvivalenter) i THF (15 ml) ble tilsatt butyl-litium (1,6 M i heksan, 10 ekvivalenter), ved romtemperatur. Etter 30 minutters reaksjon ble løsningen avkjølt til  $-75^{\circ}\text{C}$ , og behandlet med dietyl-B-metoksyboran (10,1 ekvivalenter). Etter en time ble bortrifluorid-dietyleter-kompleks (10,1 ekvivalenter) satt til, for å generere B-( $\gamma$ -trimetylsilyl-allyl)-dietylboran reagenten. Etter en time, ble en løsning av acetyl-beskyttet syklosporin A aldehyd (5 g, 1 ekvivalent) i THF (15 ml) satt til dråpevis. Etter 20 minutter, ble reaksjons-blandingen varmet til  $-10^{\circ}\text{C}$ , og en mettett vandig  $\text{NH}_4\text{Cl}$  løsning ble satt til. Etter røring i en time ved romtemperatur, ble vann (45 ml) satt til, og reaksjonsblandingen ble ekstrahert 3 ganger med 25 ml etylacetat. De organiske fasene ble vasket sekvensielt med vann (25 ml) og en mettett vandig  $\text{NH}_4\text{Cl}$  løsning (25 ml). De kombinerte organiske fasene ble tørket over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrert og konsentrert under redusert trykk. Råproduktet ble kromatografert (Silikagel, diklormetan/metanol eller etylacetat/heptan) for å gi det acetyl-beskyttete syklosporin A  $\beta$ -trimetylsilyl-alkoholet.

**Eksempel 31: Framstilling av trimetylsilyl-beskyttet syklosporin A  $\beta$ -trimetylsilylalkohol.**

En løsning av allyltrimetylsilan (10,1 ekvivalenter) i THF (15 ml) ble tilsatt butyl-litium (1,6 M i heksan, 10 ekvivalenter) ved romtemperatur. Etter at reaksjonen hadde gått i 30 minutter, ble løsningen avkjølt til  $-65^{\circ}\text{C}$ , og behandlet med dietyl-B-metoksyboran (10,1 ekvivalenter). Etter 1 time ble bortrifluorid-dietyleter-kompleks (10,1 ekvivalenter) satt til for å generere B-( $\gamma$ -trimetylsilyl-allyl)-dietylboran reagenten. Etter en time ble en løsning av trimetylsilyl-beskyttet syklosporin A aldehyd (5 g, 1 ekvivalent) i THF (15 ml) satt til dråpevis. Etter 15 minutter ble reaksjons-blandingen varmet opp til  $10^{\circ}\text{C}$  og en mettett vandig  $\text{NH}_4\text{Cl}$  løsning ble satt til. Etter røring i en time ved romtemperatur, ble vann (12,5 ml) og mettett  $\text{NaHCO}_3$  (25 ml) satt til. Reaksjonsblandingen ble ekstrahert to ganger med 25 ml metyl-t-butyl-eter. De organiske fasene ble vasket to ganger sekvensielt med vann (2 x 25 ml) og en mettett  $\text{NaCl}$  løsning (25 ml). De kombinerte organiske fasene ble tørket over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrert og konsentrert under redusert trykk. Råproduktet ble kromatografert (silikagel, heptan/etyl acetat) for å gi trimetylsilyl-beskyttet syklosporin A  $\beta$ -trimetylsilylalkohol.

De følgende tre eksemplene, eksempel 32, 33 og 34 er rettet mot Peterson elimineringsreaksjoner.

**Eksempel 32: Framstilling av E-acetyl-beskyttet syklosporin A diene**

Den acetyl-beskyttete syklosporin A  $\beta$ -trimetylsilylalkoholen (10 g, 1 ekvivalent) ble løst i THF (50 ml). Konsentrert H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,24 ml, 3 ekvivalenter) ble satt til, og reaksjonsblandingen ble rørt i 20 timer ved romtemperatur. Vann (150 ml) ble satt til og reaksjonsblandingen ble ekstrahert med metyl-t-butyl-eter (200 ml). Den vandige fasen ble re-ekstrahert med metyl-t-butyl-eter (150 ml). De kombinerte organiske fasene ble vasket med vann (150 ml). De kombinerte organiske fasene ble tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrert og konsentrert under redusert trykk for å gi det acetyl-beskyttete syklosporin A dienet (acetyl-beskyttet ISATX247). Råproduktet ble krystallisert fra metyl-t-butyl eter/THF og deretter rekrystallisert fra metyl-t-butyl eter/DMC for å gi acetyl-beskyttet syklosporin A diene (acetyl-beskyttet ISATX247) som et 99-97 %: 1-3 % blanding av E og Z dobbelbindings-isomere (ved 400MHzNMR, 2 % feil i målingen).

Hydrolyse av E-acetyl-beskyttet syklosporin A diene ble utført som følger: Acetyl syklosporin A diene (4 g, 1 ekvivalent) ble løst i metanol (80 ml) og vann (32 ml). Kaliumkarbonat (3,65 g, 8,3 ekvivalenter) ble satt til. Etter røring i 15 timer ved romtemperatur, ble reaksjonsblandingen varmet opp til 40°C i 4 timer. Reaksjonsblandingen ble konsentrert under redusert trykk, og resten ble tatt opp i etylacetat (70 ml). Vandig sitronsyre-løsning 15 % (30 ml) ble sakte satt til, etterfulgt av vann (10 ml). Det vandige laget ble utskilt og re-ekstrahert med etylacetat (56 ml). De organiske fasene ble vasket med vann (30 ml), 15 % sitronsyre-løsning (40 ml) og mettet NaCl løsning (30 ml). De organiske lagene ble kombinert, tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og konsentrert under redusert trykk for å gi syklosporin A diene (ISATX247) som en 98:2 E/Z blanding av dobbelbindings-isomere (ved 400 MHz NMR, ca 2-3 % feil). Se R.W. Hoffmann, *Angewandte Chemie International Edition*, Vol 555 (1982); W.R. Roush, "Allylorganometallics", *Comprehensive Organic Synthesis*, Pergamon Press, Vol 2, s. 1-53; og Y. Yamamoto, N. Asao, *Chemical Reviews*, s. 2307 (1993).

**Eksempel 33: Framstilling av Z-trimetylsilyl-beskyttet syklosporin A diene og dets konversjon til Z-syklosporin A diene (ISATX247)**

Den trimetylsilyl-beskyttete syklosporin A  $\beta$ -trimetylsilyl-alkoholen (2 g, 1 ekvivalent) ble løst i THF (20 ml). Løsningen ble avkjølt til 0-2°C og kalium t-butoksid (4 ekvivalenter) ble satt til. Etter 1,5 timers reaksjon, ble etylacetat (20 ml) og vann (40 ml) satt til. Det vandlige laget ble utskilt og re-ekstrahert med etylacetat (20 ml). De organiske fasene ble vasket med en mettet vandig NaCl løsning (20 ml). De kombinerte organiske fasene ble tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrert og konsentrert under redusert trykk for å gi en blanding av Z-trimetylsilyl-beskyttet syklosporin A diene (trimetylsilyl-beskyttet ISATX247) og Z-syklosporin A diene (Z-isomeren av ISATX247).

Desilyleringen ble fullført ved å løse råprodukt-blandingen i metanol (10 vekt% i løsningen) og sette til 1 M vandig saltsyre (1 ekvivalent). Etter 15 minutter ved romtemperatur, ble vann og etylacetat satt til. Det vandige laget ble utskilt og re-ekstrahert med etylacetat. De organiske fasene ble vasket med en mettet vandig NaCl løsning. De kombinerte organiske fasene ble tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrert og konsentrert under redusert trykk, hvilket ga syklosporin A diene (ISATX247) som en 94:6 blanding av Z og E dobbelbindings-isomere (ved NMR).

#### **Eksempel 34: Framstilling av E-syklosporin A diene (ISATX247)**

Den trimetylsilyl-beskyttete syklosporin A  $\beta$ -trimetylsilyl-alkoholen (500 mg, 1 ekvivalent) ble løst i diklormetan. Denne løsningen ble avkjølt til omtrent 0-2°C, og behandlet med bortrifluorid-dietyleter kompleks (5 ekvivalenter). Etter 1 time ble vann (20 ml) og diklormetan (20 ml) satt til. Det organiske laget ble utskilt og vasket med vann (20 ml), tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrert og konsentrert under redusert trykk for å gi syklosporin A diene (ISATX247) direkte som en 91:9 vektblanding av E- og Z- dobbelbindings-isomere (ved NMR).

#### **Eksempel 35: Avbeskyttelse av trimetylsilyl-beskyttet syklosporin A diene**

Trimetylsilyl-beskyttet syklosporin A diene ble løst i metanol (10 vekt% i løsningen). Denne løsningen ble behandlet med 1 M vandig saltsyre-løsning (1 ekvivalent). Etter 15 minutt ved romtemperatur, ble vann og etylacetat satt til. Det vandlige laget ble utskilt og re-ekstrahert med etylacetat. De organiske fasene ble vasket med en mettet NaCl løsning. De kombinerte organiske fasene ble tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrert og konsentrert under redusert trykk, hvilket ga syklosporin A diene (ISATX247).

#### **Eksempel 36: Epoksidering av acetylsyklosporin A**

Acetylsyklosporin A (2,0 g, 1,61 mmol) ble løst i acetonotril (30 ml). 1,3-diacetoksy-aceton (0,14 g, 0,8 mmol) ble satt til, etterfulgt av 0,0004 M vandig etylendiamintetra-eddisyre dinatriumsalt (20 ml) og natriumbikarbonat (0,405 g, 4,82 mmol). Til den rørte blandingen ble oksone (43,8 % KHSO<sub>5</sub>) (2,23 g, 6,43 mmol) satt til porsjonsvis i løpet av 2 timer. pH ble opprettholdt ved 8,2 med konstant tilførsel av 1 N NaOH (total mengde 6,4 ml) ved bruk av pH stat. Temperaturen ble holdt ved 22-25°C ved tilfeldig avkjøling ved bruk av et kaldvanns-bad. Etter 2,5 timer ble reaksjonen bråkjølt med noen få dråper av en natrium-bisulfitt løsning. Vann (100 ml) ble satt til og blandingen ble ekstrahert to ganger med tert-butyl-metyl-eter (100 ml, deretter 75 ml). De organiske ekstraktene ble vasket med fortynnet vandig natriumklorid (100 ml), kombinert, tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, og konsentrert for å gi ubearbeidet acetyl-syklosporin A epoksid (1,92 g, 95%; HPLC: 99,4 % areal) som et hvitt skum i fast form.

**Eksempel 37: Framstilling av acetylsyklosporin A aldehyd**

Ubearbeidet acetyl-syklosporin A epoksid (1,92 g, 1,52 mmol) ble løst i acetonitril (25 ml). Vann (20 ml) ble satt til, etterfulgt av natrium-periodat (489 mg, 2,28 mmol) og 0,5 M svovelsyre (3,05 ml, 1,52 mmol). Reaksjonsblandingen ble rørt ved 40°C i 18 timer, og deretter ble overskytende natrium-periodat bråkjølt ved å sette til vandig natrium-bisulfitt. Fortynnet natriumklorid (100 ml) ble satt til og blandingen ble ekstahert to ganger med tert-butyl-metyl eter (100 ml hver). De organiske ekstraktene ble vasket med fortynnet vandig natriumklorid (100 ml), kombinert, tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og konsentrert for å gi ubearbeidet acetyl-syklosporin A aldehyd (1,74 g, 92 %; HPLC: 95,7 % areal) som et hvitt skum. Råproduktet ble kromatografert over silikagel ved bruk av 40 % aceton/60 % heksan som eluent for å gi produktet (1,41g, 71 % basert på acetylsyklosporin A, HPLC: 100 % areal) som et hvitt fast skum.

**Eksempel 38: Framstilling av acetylsyklosporin A aldehyd ved bruk av en ett-beger prosedyre**

Acetylsyklosporin A (2,0 g, 1,61 mmol) ble løst i acetonitril (30 ml). 1,3-Diacetoksy-aceton (0,084g, 0,48 mmol) ble tilsatt, etterfulgt av 0,0004 M vandig etylendiamintetra-eddiksyre dinatriumsalt (20 ml) og natriumbikarbonat (0,405 g, 4,82 mmol). Til den rørte blandingen ble oksone (43,8 % KHSO<sub>5</sub>) (1,67 g, 4,82 mmol) satt til prosjonsvis i løpet av 2 timer. pH ble opprettholdt ved 8,2 ved konstant tilførsel av 1 N NaOH (total mengde 3,4 ml) ved bruk av en pH stat. Temperaturen ble holdt ved 20-25°C. Etter 3,5 timer ble 0,5 M svovelsyre (5 ml, 2,5 mmol) satt til reaksjonsblandingen, etterfulgt av noen få dråper konsentrert svovelsyre, inntil pH 1,3 ble oppnådd. Deretter ble natrium-periodat (516 mg, 2,41 mmol) satt til, og reaksjonsblandingen ble rørt ved romtemperatur i 2 timer, og 40°C i 22 timer. Vann (100 ml) ble satt til, og blandingen ble ekstrahert to ganger med tert-butyl-metyl-eter (100 ml, deretter 75 ml). De organiske ekstraktene ble vasket med fortynnet vandig natriumklorid (100 ml), kombinert, tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og konsentrert for å gi ubearbeidet acetyl-syklosporin A aldehyd (1,9 g, 96 %; HPLC: 83,4 % areal) som et hvitt skum. Råproduktet ble kromatografert over silikagel ved bruk av 40 % aceton/60 % heksan som eluent for å gi produktet (1,35 g, 68 % basert på acetylsyklosporin A; HPLC: 100% areal) som et fast hvitt skum.

**Eksempel 39 (ISO):Wittig reaksjon av acetyl-syklosporin A aldehyd med 3-dimetylamino-propyltrifenylfosforiliden**

En stereoselektiv syntese av 1,3-diener er beskrevet av E.J. Corey og M.C. Desai i Tetrahedron Letters, vol 26, nr 47, s 5747-8, (1985). Denne referansen omtaler at ylidet oppnådd ved å behandle 3-(dimetylamino)propyltrifenylfosforan med kalium-heksametyldisilazid kan gjennomgå en Wittig reaksjon med et aldehyd for selektivt å danne et Z-alkenyldimetylamin. Oksidering av aminet med m-klorbenzo-syre gir det tilsvarende N-oskidet som deretter kan varmes i det som er

kjent som en Cope eliminering for å danne det ønskete 1,3-dienet hvor konfigurasjonen av olefinet som dannes under Wittig trinnet er eksklusivt Z eller cis.

Tilsvarende kan Z-isomeren av ISATX247 framstilles ved å reagere acetyl-syklosporin A aldehyd med ylidle oppnådd ved å behandle 3-(dimetylamino)-propylfenylfosfonium-bromid med kalium-heksametyldisilazid. Det resulterende mellomproduktet gjennomgår da en oksidasjon, etterfulgt av en Cope eliminering for å gi acetyl-(Z)-ISATX247. Avbeskyttelse ved bruk av en base, resulterer i (Z)-ISATX247. Den oksiderende reagenten kan være metaklorperbenzosyre.

En rørt suspensjon av 3-dimetylamino-propyl-trifosfonium-bromid (2,5 g, 5,83 mmol) i vannfritt toluen (20 ml) ble det tilsatt kalium-heksametyldisilazide (11,6 ml, 5.8 mmol, 0,5 M løsning i toluen) gjennom en sprøyte. Etter røring i 1 time ved romtemperatur, ble den rødfargete løsningen sentrifugert, og supernatanten overført til en reaksjonsflaske gjennom en kanyle. Til det faste stoffet ble det satt vannfritt toluen (10 ml), rørt og sentrifugert. Supernatanten ble overført til reaksjons-flaska og det kombinerte rødfargete ylidle ble tilsatt OAc-CsA-CHO (1,44 g, 1,17 mmol). Røring ble fortsatt i en ytterligere periode på 2 timer ved romtemperatur etter at fargen hadde blitt lys gul. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med EtOAc (50 ml) og deretter vasket med mettet NaHCO<sub>3</sub> løsning (50 ml) og saltvann (50 ml). Tørking og løsningsmiddel-fjerning ga et blekgult fast stoff. Kromatografi over en silikagel-kolonne og eluering med aceton-heksan-blanding (gradient: 10 til 75 % aceton og 90 til 25 % heksaner) fjernet alle fosfor-relaterte urenheter. Ytterligere eluering med aceton ga ønsket produkt som et fargeløst fast stoff (1,28 g, 84 % utbytte). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2,23 (s, 6H), 2,03 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 129,33, 126,96; MS m/z: 1301 (M<sup>+</sup>), 1324 (M+Na<sup>+</sup>).

#### Konversjon til N-oksid

Til en rørt og avkjølt (0°C) løsning av dimetylamino-forbindelsen oppnådd i Wittig reaksjonen (0,44 g, 0,34 mmol) i CHCl<sub>3</sub> (3 ml) ble det satt en løsning av m-CPBA (0,07g, 0,405 mmol) i CHCl<sub>3</sub> (2 ml). Etter røring i 30 minutt, ble dimetylsulfid (0,5 ml) satt til etterfulgt av CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml). Opparbeidelse ved vasking med NaHCO<sub>3</sub> løsning (25 ml) og vann (25 ml), tørking og fjerning av løsningsmiddel ga et fast stoff (0,43 g). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 3,19 (s, 3H), 3,18 (s, 3H), 2,03 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 131,89, 124,13; MS m/z: 1340 (M+Na<sup>+</sup>).

#### Cope-eliminering av N-oksid. Framstilling av (Z)-isomer av Acetyl ISATX247

N-oksidet (350 mg) ble forsiktig rørt og varmet til 100°C in vacuo i 2 timer. Dette ble deretter passert gjennom en kolonne av silikagel. Eluering med aceton-heksaner blanding (gradient, 5 til 25 % aceton og 95 til 75 % heksaner) ga et fargeløst fast stoff (314 mg). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6,49 (dt, J=16,99, 10,5 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 132,20, 131,09, 129,70, 116,85; MS m/z: 1279 (M+Na<sup>+</sup>).

**(Z)-isomer av ISATX247**

Til en løsning av (Z)-acetyl ISATX247 (50 mg) i MeOH (4 ml) ble det satt vann (1,5 ml) og K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (60 mg), og rørt i 48 timer ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble strippet for løsningsmiddel og ekstrahert med EtOAc (20 ml). Det organiske laget ble vasket med vann (10 ml) og saltvann (10 ml). Tørring og fjerning av løsningsmiddel ga et fargeløst fast stoff. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6,58 (dt, J=16,99, 10,5 Hz, 1H); MS m/z: 1236,8 (M+Na<sup>+</sup>). Den resulterende forbindelsen var Z-isomer av ISATX247. Ingen målbar E-isomer ble observert ved NMR.

Selv om foretrukne utførelser av oppfinnelsen er spesifikt omtalt og beskrevet ovenfor, vil det forstås at mange modifiseringer og endringer av foreliggende oppfinnelse er mulig i lys av informasjonen ovenfor og innenfor området for de tilhørende krav og uten å avvike fra grunntanken og det tenkte omfanget av oppfinnelsen.

**Patentkrav**

1. Framgangsmåte for framstilling av en blanding av (E)- og (Z)-isomere av ISA<sub>TX</sub>247, **karakterisert** ved at synteseruten omfatter trinnene:
  - a) oppvarming av acetyl- $\eta$ -halosyklosporin A med en første forbindelse valgt fra gruppen omfattende triaryl-fosfin, trialkyl-fosfin, arylalkylfosfin og triarylarsin for å gi et mellomprodukt,
  - b) framstilling av en blanding av (E)- og (Z)-isomere av acetyl-1,3-diene ved å røre mellomproduktet med en andre forbindelse valgt fra gruppen omfattende acetaldehyd, formaldehyd, deuterert formaldehyd, 2-klorbenzaldehyd og benzaldehyd, og
  - c) framstille en blanding av (E)- og (Z)-isomere av ISA<sub>TX</sub>247 ved å behandle blandingen med (E)- og (Z)-isomere av acetyl-1,3-diene med en base.
  
2. Framgangsmåte i samsvar med krav 1, **karakterisert** ved at acetyl- $\eta$ -halosyklosporin A er acetyl- $\eta$ -bromsyklosporin A.
  
3. Framgangsmåte i samsvar med krav 1, **karakterisert** ved å ytterligere omfatte trinnet for halogenering av  $\eta$ -karbonet på sidekjeden av 1-aminosyre-resten av syklosporin A ved bruk av en bromerings-reaksjon utført ved refluksing av acetyl-syklosporin A med N-bromsuccinimid og azo-bis-isobutyronitril.
  
4. Framgangsmåte i samsvar med krav 1, **karakterisert** ved at den første forbindelsen er trifenyfosfin og mellomproduktet er trifenyfosfonium halid av acetyl-syklosporin A.
  
5. Framgangsmåte i samsvar krav 1 eller 4, **karakterisert** ved at den andre forbindelsen er formaldehyd.
  
6. Framgangsmåte for framstilling av en blanding av (E)- og (Z)-isomere av ISA<sub>TX</sub>247, **karakterisert** ved at synteseruten omfatter trinnene:
  - a) konvertere et mellomprodukt acetyl-syklosporin A aldehyd til en blanding av (E)- og (Z)-isomere av acetyl-1,3-diene ved å reagere mellomproduktet med et fosforholdig ylde framstilt fra et tributylallylfosfonium-halid eller trifenyfosfonium-halid via en Wittig reaksjon, eventuelt i nærvær av et litium-halid, og
  - b) framstille en blanding av (E)- og (Z)-isomere av ISA<sub>TX</sub>247 ved å behandle blandingen av (E)- og (Z)-isomere av acetyl-1,3-diene med en base.
  
7. Framgangsmåte i samsvar med krav 6, **karakterisert** ved at fosfonium-halidet er et fosfonium-bromid.

8. Framgangsmåte i samsvar med krav 6, **karakterisert** ved at Wittig reaksjonen utføres i et løsningsmiddel valgt fra gruppen omfattende tetrahydrofuran og toluen, og ved at løsningsmidlet benyttes i nærvær av en forbindelse valgt fra gruppen omfattende butyllitium, natrium-lavere alkoksid, kalium lavere alkoksid, og karbonat ved en temperatur mellom omtrent  $-80^{\circ}\text{C}$  og  $110^{\circ}\text{C}$ .

9. Framgangsmåte i samsvar med krav 8, **karakterisert** ved at kalium lavere alkoksid er kalium-tert-butoksid.

10. Framgangsmåte i samsvar med krav 9, **karakterisert** ved at løsningsmidlet er tetrahydrofuran benyttet i nærvær av kalium-tert-butoksid ved en temperatur på omtrent  $-70^{\circ}\text{C}$  og  $-100^{\circ}\text{C}$ .

11. Framgangsmåte i samsvar med krav 6, **karakterisert** ved at det fosforholdige ylidet benyttet i Wittig reaksjonen er valgt fra gruppen omfattende trifenyfosfin, triarylfosfin, trialkylfosfin og arylalkylfosfin.

12. Framgangsmåte for framstilling av en blanding av (E)- og (Z)-isomere av  $\text{ISA}_{\text{TX}247}$ , **karakterisert** ved at synteseruten omfatter trinnene:

a) beskytte en  $\beta$ -alkohol av syklosporin A ved å danne et første mellomprodukt acetyl-syklosporin A aldehyd,

b) oksidere acetyl-syklosporin A for å produsere et andre mellomprodukt acetyl-syklosporin A,

c) konvertere et mellomprodukt acetyl-syklosporin A aldehyd til en blanding av (E)- og (Z)-isomere av acetyl-1,3-diene ved å reagere mellomproduktet med et fosforholdig ylide via en Wittig reaksjon, eventuelt i nærvær av et litium-halid, og

d) framstille en blanding av (E)- og (Z)-isomere av  $\text{ISA}_{\text{TX}247}$  ved å behandle blandingen av (E)- og (Z)-isomere av acetyl-1,3-diene med en base.

13. Framgangsmåte i samsvar med krav 12, **karakterisert** ved at det oksidasjons-trinnet utføres med en oksiderende forbindelse valgt fra gruppen omfattende ozon, kalium-permanganat, ruthenium-tetroksid, osmium-tetroksid, polymer-støttet osmium-tetroksid og ruthenium-klorid.

14. Framgangsmåte i samsvar med krav 13, **karakterisert** ved at de oksiderende forbindelsene ruthenium-tetroksid og ruthenium-klorid benyttes med en ko-oxidant valgt fra gruppen omfattende periodat og hypokloritt.

15. Framgangsmåte i samsvar med krav 13, **karakterisert** ved at ruthenium-tetroksid og ruthenium-klorid benyttes med acetonitril.

16. Framgangsmåte for å framstille en E-isomer forriktet blanding av (E)- og (Z)-isomere av ISA<sub>TX</sub>247 **karakterisert** ved at den stereoselektive syntesen av det E-isomer forrikete materialet omfatter trinnene:

- a) reagere en acetyl-syklosporin A aldehyd med en reagent valgt fra gruppen omfattende  $\gamma$ -(trialkylsilylallyl)borat-estere og E- $\gamma$ -(trialkylsilylallyl)dialkylboraner for å danne en  $\beta$ -trialkylsilyl-alkohol,
- b) behandle  $\beta$ -trialkylsilyl alkoholen med syre for å danne acetyl-(E)-1,3-diene, og
- c) behandle acetyl-(E)-1,3-dienet med base for å danne (E)-isomeren av ISA<sub>TX</sub>247.

17. Framgangsmåte i samsvar med krav 16, **karakterisert** ved syren som benyttes for å behandle  $\beta$ -trialkylsilyl-alkoholen er valgt fra gruppen omfattende eddiksyre, svovelsyre og en Lewis syre.

18. Framgangsmåte for å framstille en Z-isomer forriktet blanding av (E)- og (Z)-isomere av ISA<sub>TX</sub>247, **karakterisert** ved at den stereoselektive syntesen av det E-isomer forrikete materialet omfatter trinnene:

- a) reagere et acetyl-syklosporin A aldehyd med en reagent valgt fra gruppen omfattende  $\gamma$ -(trialkylsilylallyl)borat-estere og E- $\gamma$ -(trialkylsilylallyl)dialkylboraner for å danne en  $\beta$ -trialkylsilyl-alkohol,
- b) behandle  $\beta$ -trialkylsilyl alkoholen med base for å danne acetyl-(E)-1,3-diene, og
- c) behandle acetyl-(Z)-1,3-dienet med base for å danne (Z)-isomeren av ISA<sub>TX</sub>247.

19. Framgangsmåte i samsvar med krav 18, **karakterisert** ved at basen som benyttes for å behandle  $\beta$ -trialkylsilyl-alkoholen er valgt fra gruppen omfattende natrium-hydrid og kalium-hydrid.

20. Framgangsmåte i samsvar med krav 14 eller 18, **karakterisert** ved at  $\gamma$ -(trialkylsilylallyl)-borat-esteren er en trimetylsilylallyl-borat-ester.

21. Framgangsmåte i samsvar med krav 16 eller 18, **karakterisert** ved at E- $\gamma$ -(trialkylsilylallyl)-dialkylboranet er E- $\gamma$ -(trimetylsilylallyl)-9-BBN.

22. Framgangsmåte i samsvar med krav 16 eller 18, **karakterisert** ved at reagenten er E- $\gamma$ -(trimetylsilylallyl)dietylboran.

23. Framgangsmåte i samsvar med krav 16, **karakterisert** ved at trinnet for behandling av  $\beta$ -trialkylsilyl-alkoholen med en syre, omfatter en Peterson olefinering.

24. Framgangsmåte i samsvar med krav 18, **karakterisert** ved at trinnet for behandling av  $\beta$ -trialkylsilyl-alkoholen med en base, omfatter en Peterson olefinering.

25. Framgangsmåte for å framstille en E-isomer forriktet blanding av (E)- og (Z)-isomere av ISA<sub>TX</sub>247, **karakterisert** ved at den stereoselektive syntesen av det E-isomer forrikete materialet omfatter trinnene:

a) reagere et acetyl-syklosporin A aldehyd med et litert allyldifenylfosfin-oksid, for å danne acetyl-(E)-1,3-diene, og

b) behandle acetyl-(E)-1,3-dienet med base for å danne (E)-isomeren av ISA<sub>TX</sub>247.

26. Framgangsmåte for å framstille en Z-isomer forriktet blanding av syklosporin A analoger, modifisert ved 1-aminosyre-resten, **karakterisert** ved at den stereoselektive syntesen av det Z-isomer forrikete materialet omfatter trinnene:

a) reagere et acetyl-syklosporin A aldehyd med [3-(difenylfosfino)allyl]-titan for å danne et titan-holdig mellomprodukt,

b) tillate at det titan-holdige mellomproduktet fortsetter til et erytro- $\alpha$ -addukt,

c) konvertere erytro- $\alpha$ -adduktet til et  $\beta$ -oksidofosfonium-salt ved å behandle det med iodmetan,

d) konvertere erytro- $\beta$ -oksidofosfonium-saltet til et acetyl-(Z)-1,3-diene, og

e) behandle acetyl-(Z)-1,3-dienet med en base for å danne Z-isomeren av ISA<sub>TX</sub>247.

27. Framgangsmåte i samsvar med et av kravene 1, 6, 12, 16, 18, 25 og 26 **karakterisert** ved at basen som er benyttet for å behandle acetyl-1,3-diene er valgt fra gruppen omfattende natriumhydroksid, natriumkarbonat, kaliumkarbonat, natrium-alkoksid, og kalium-alkoksid.

28. Framgangsmåte i samsvar med krav 1, **karakterisert** ved at mellomproduktet er trifenyl- eller trialkyl-fosfonium-bromid av acetyl-syklosporin A, og ved at trinnet som rører mellomproduktet med formaldehyd er gjort i nærvær av et litium-halid.

29. Framgangsmåte for den stereoselektive syntesen av E-isomeren av ISA<sub>TX</sub>247, **karakterisert** ved å omfatte trinnene for å

- a) reagere et trimetylsilyl (TMS) syklosporin A aldehyd med E- $\gamma$ -(trialkylsilylallyl)boran for å danne en  $\beta$ -trialkylsilyl-alkohol, og
- b) behandle  $\beta$ -trialkylsilyl-alkoholen for å danne E-isomeren av ISA<sub>TX</sub>247.

30. Framgangsmåte i samsvar med krav 29, **karakterisert** ved at syren som benyttes er valgt fra gruppen omfattende eddiksyre, svovelsyre eller en Lewis syre, og/eller BF<sub>3</sub>.

31. Framgangsmåte for den stereoselektive syntesen av Z-isomeren av ISA<sub>TX</sub>247, **karakterisert** ved å omfatte trinnene:

- a) reagere et trimetylsilyl (TMS) syklosporin A aldehyd med E- $\gamma$ -(trialkylsilylallyl)boran for å danne en  $\beta$ -trialkylsilyl-alkohol,
- b) behandling av  $\beta$ -trialkylsilyl alkoholen med base for å danne TMS-(Z)-1,3-diene; og
- c) avbeskytting av TMS-(Z)-1,3-dienet for å danne Z-isomeren av ISA<sub>TX</sub>247.

32. Framgangsmåte i samsvar med et av kravene 29 eller 31, **karakterisert** ved at E- $\gamma$ -(trialkylsilylallyl)boranet er framstilt ved trinnene:

- a) avbeskytte et allyltrialkylsilane med en base, og
- b) reagere den avbeskyttete allyltrialkylsilanet med et dialkylalkoksyboran og en Lewis syre.

33. Framgangsmåte i samsvar med krav 32, **karakterisert** ved at dialkylalkoksyboranet er dietylmetoksyboran og Lewis syren er BF<sub>3</sub>.

34. Framgangsmåte i samsvar med krav 32, **karakterisert** ved at allyltrialkylsilanet er allyltrimetylsilane.

35. Framgangsmåte i samsvar med krav 32, **karakterisert** ved at basen som benyttes for å deprotonere allyltrialkylsilanet er butyllitium.

36. Framgangsmåte i samsvar med krav 31, **karakterisert** ved at basen som benyttes for å behandle  $\beta$ -trialkylsilyl-alkoholen er valgt fra gruppen omfattende natrium-hydroksid, kalium-hydroksid og alkali lavere alkoksider, fortrinnsvis kalium-tert-butoksid.

37. Framgangsmåte i samsvar med krav 31, **karakterisert** ved at avbeskyttelsen blir gjennomført ved bruk av en syre valgt fra gruppen omfattende saltsyre, eddiksyre, sitronsyre, en Lewis syre og HF-baserte reagenter.

38. Framgangsmåte i samsvar med krav 37, **karakterisert** ved at den HF-baserte reagenten er valgt fra gruppen omfattende tributyl-ammonium-fluorid og kalium-fluorid.

39. Framgangsmåte for framstilling av en blanding av (E)- og (Z)-isomere av ISA<sub>TX</sub>247, framgangsmåte omfatter en synteserute som fremstiller en (E)-isomer og en (Z)-isomer av ISA<sub>TX</sub>247 slik at (E)-isomeren og (Z)-isomeren er tilstede i blandingen i et forhandsbestemt forhold, **karakterisert** ved at synteseruten omfatter trinnene:

- a) beskytte  $\beta$ -alkoholen på 1-aminosyre-resten på syklosporin A,
- b) oksidere det beskyttete syklosporin A for å produsere et beskyttet syklosporin A aldehyd,
- c) konvertere det beskyttete syklosporin A aldehydet til en blanding av E- og Z- isomere av beskyttet 1,3-diene ved å reagere det beskyttete syklosporin A aldehydet med et fosforholdig ylide via en Wittig reaksjon, eventuelt i nærvær av et litium-halid, og
- d) framstille en blanding av E- og Z- isomere ved å avbeskytte det beskyttete 1,3-dienet.

40. Framgangsmåte i samsvar med krav 39, **karakterisert** ved at  $\beta$ -alkoholen av 1-aminosyre-resten av syklosporin A blir beskyttet ved å reagere syklosporin A med en reagent for å gi beskyttet syklosporin A, valgt fra gruppen omfattende acetat-estere, benzoat-estere, substituerte benzoat-estere, etere og silyl-eter.

41. Framgangsmåte for framstilling av en forhandsbestemt isomerisk blanding av (E)- og (Z)-isomere av ISA<sub>TX</sub>247, **karakterisert** ved at framgangsmåten omfatter,

- a) framstilling av et første materiale forrikt på en (E)-isomer av ISA<sub>TX</sub>247,
- b) framstilling av et andre materiale forrikt på en (Z)-isomer av ISA<sub>TX</sub>247, og
- c) blanding av det første og andre materialet i et forhold som er utformet for å gi den ønskete isomeriske blandingen.

42. Framgangsmåte for framstilling av blanding av (E)- og (Z)-isomere av ISA<sub>TX</sub>247 **karakterisert** ved at synteseruten omfatter trinnene:

- a) konvertering av et mellomprodukt TMS syklosporin A aldehyd til en blanding av (E)- og (Z)-isomere av TMS-1,3-diene ved å reagere mellomproduktet med et fosforholdig ylide framstilt fra et tributylallylfosfonium-halid eller trifenylylfosfonium halid via en Wittig reaksjon, eventuelt i nærvær av et litium halid, og

b) framstilling av en blanding av (E)- og (Z)-isomere av  $ISA_{TX}247$  ved å avbeskytte blandingen av (E)- og (Z)-isomere av TMS-1,3-diene, med en syre.

43. Framgangsmåte i samsvar med krav 44, **karakterisert** ved at det fosforholdige halidet er et fosforholdig bromid.

44. Framgangsmåte i samsvar med krav 44, **karakterisert** ved at trinn a) blir utført i et løsningsmiddel som omfatter tetrahydrofuran og/eller toluene brukt i nærvær av natrium- eller kalium- lavere alkoxid, eller et karbonat, ved en temperatur mellom omtrent  $-80^{\circ}$  og  $110^{\circ}C$ .

45. Framgangsmåte i samsvar med krav 44, **karakterisert** ved at natrium- eller kalium- lavere alkoxid er kalium-tert-butoksid.

46. Framgangsmåte i samsvar med krav 44, **karakterisert** ved at syren er valgt fra en gruppe omfattende saltsyre, eddiksyre, sitronsyre, en Lewis syre og HF-baserte reagenter.

47. Framgangsmåte for den stereoselektive syntesen av E-isomeren av  $ISA_{TX}247$ , omfattende trinnene:

a) reagere et acetyl-syklosporin A aldehyd med E- $\gamma$ -(trialkylsilylallyl)boran for å danne en  $\beta$ -trialkylsilyl-alkohol,

b) reagere  $\beta$ -trialkylsilyl-alkoholen med en base for å danne acetyl-(E)-1,3-dienet, og

c) reagere acetyl-(E)-1,3-dienet med en base for å danne E-isomeren av  $ISA_{TX}247$ .

48. Framgangsmåte i samsvar med 28, 30 eller 47, **karakterisert** ved at trinnet for behandling av  $\beta$ -trialkylsilyl-alkohol videre omfatter en Peterson olefinering.

49. Framgangsmåte i samsvar med krav 47, **karakterisert** ved at boran-reagenten er E- $\gamma$ -(trimetylsilylallyl)-dietyl-boran.

50. Framgangsmåte i samsvar med krav 47, **karakterisert** ved at syren som er benyttet er valgt fra gruppen omfattende eddiksyre, svovelsyre eller en Lewis syre, fortrinnsvis svovelsyre.

51. Framgangsmåte i samsvar med krav 47, **karakterisert** ved at basen som er benyttet for å behandle 1,3-dienet er valgt fra gruppen omfattende natriumhydroksid, natriukarbonat, kaliumkarbonat, natriumalkoksid, kaliumalkoksid, og aminbasene er valgt fra gruppen omfattende

NH<sub>3</sub>, hydroksylamin, hydrazin eller lavere dialkylaminer, basen er fortrinnsvis NH<sub>3</sub> eller dimetylamin.

52. Framgangsmåte for konversjon av acetyl-syklosporin 1,3-diene til ISA<sub>TX</sub>247, **karakterisert** ved at acetyl syklosporin 1,3-diene behandles med en base valgt fra gruppen omfattende natriumhydroksid, natriumkarbonat, kaliumkarbonat, natriumalkoksid, kaliumalkoksid, og aminbaser valgt fra gruppen omfattende NH<sub>3</sub>, hydroksylamin, hydrazin og lavere dialkylaminer, basen er fortrinnsvis dimetylamin.

53. Framgangsmåte for stereoselektiv syntese av Z-isomeren av ISA<sub>TX</sub>247 omfattende trinnene:

- behandle et acetyl syklosporin A aldehyd med en 3-(dimetylamino)propyltrifenyl-fosfonium halid i nærvær av en første base for å danne et acetyl-(Z)-oktenyldimetylamin,
- behandle acetyl-(Z)-oktenyldimetylamin med en oksiderende reagent for å danne et acetyl-(Z)-oktenyldimetylamin-oksid,
- varme opp acetyl-(Z)-oktenyldimetylamin-oksid i en Cope eliminering for å danne et acetyl-(Z)-1,3-diene, og
- behandle acetyl-(Z)-1,3-dienet med en andre base for å danne (Z)-isomeren av ISA<sub>TX</sub>247.

54. Framgangsmåte i samsvar med krav 53, **karakterisert** ved at den første basen er heksametyldisilazid.

55. Framgangsmåte i samsvar med krav 53, **karakterisert** ved at den oksiderende reagenten er en metaklorperbenzo-syre.

56. Framgangsmåte i samsvar med krav 53, **karakterisert** ved at den andre basen er valgt fra gruppen omfattende natrium-hydroksid, natrium-karbonat, kalium-karbonat, natrium-alkoksid, kalium-alkoksid og amin-baser valgt fra gruppen omfattende NH<sub>3</sub>, hydroksylamin, hydrazin og lavere dialkylaminer

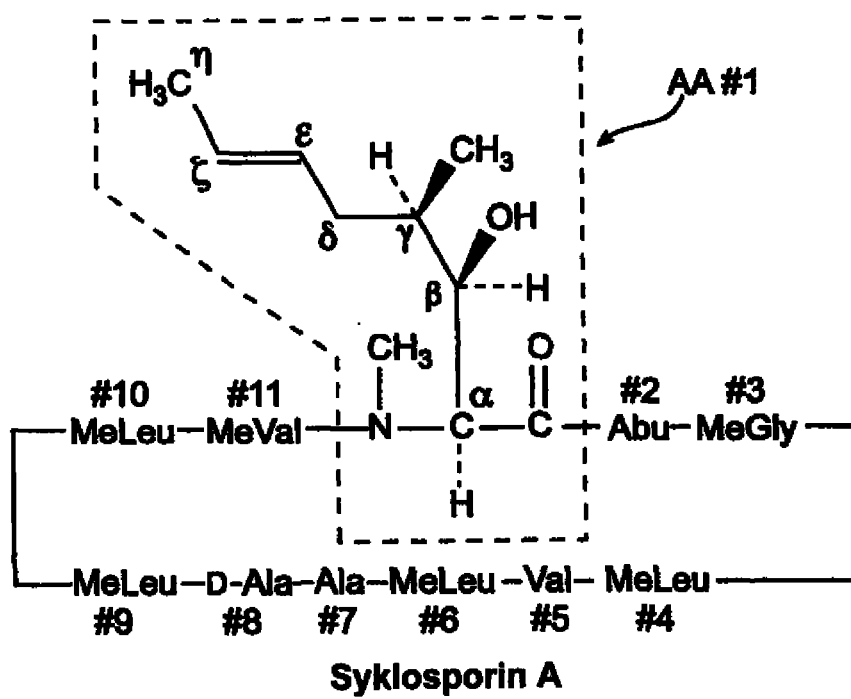


FIG. 1A

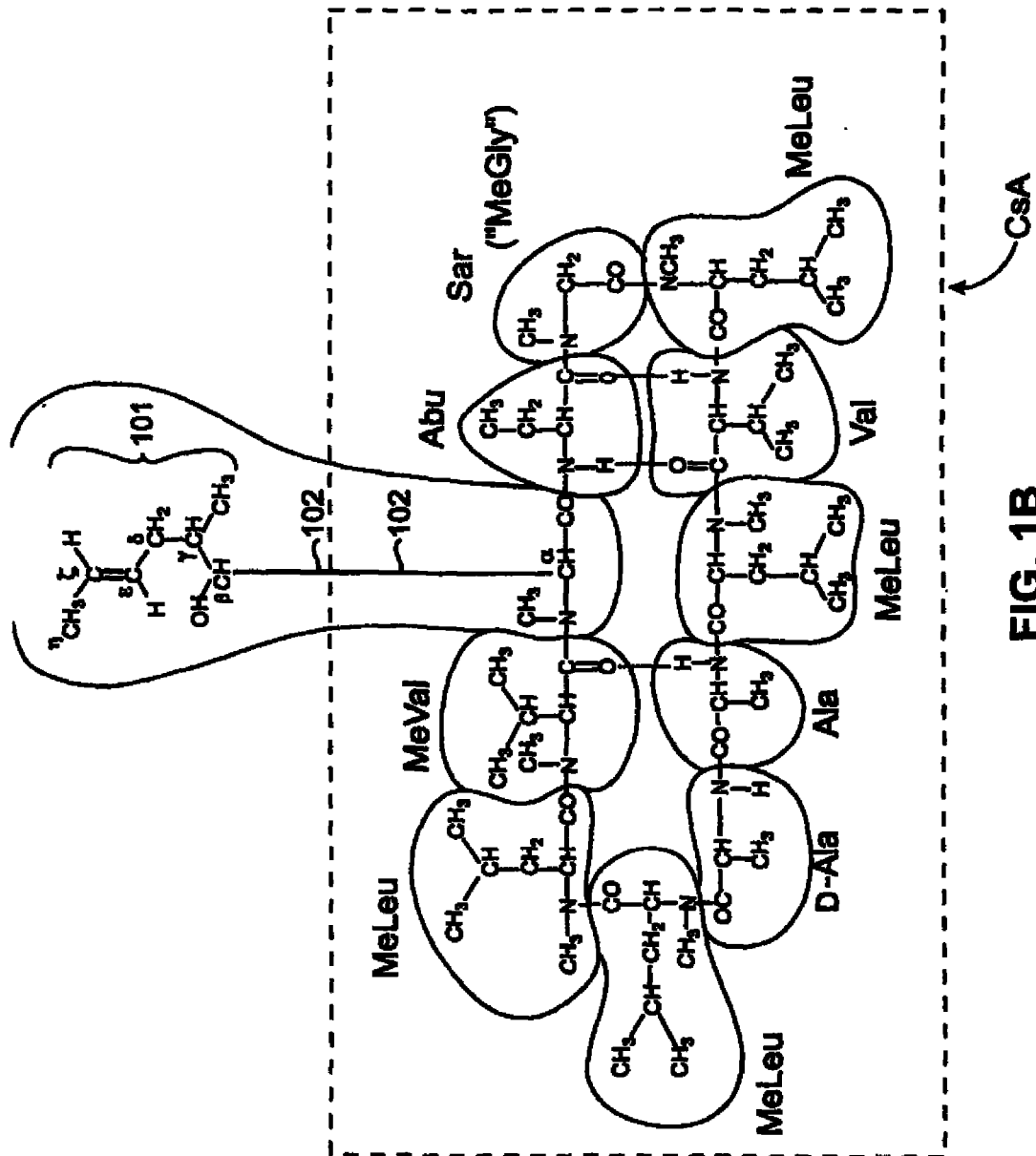


FIG. 1B

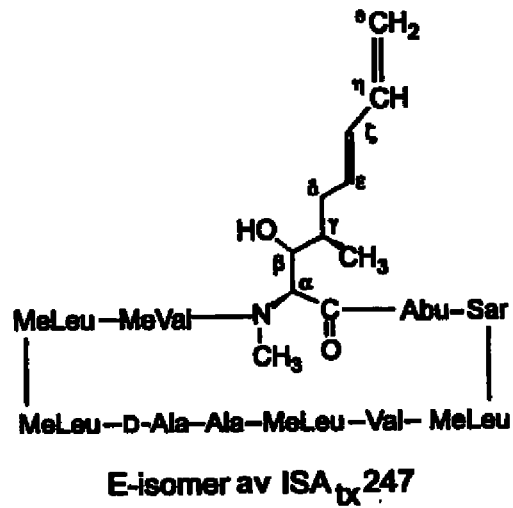


FIG. 2A

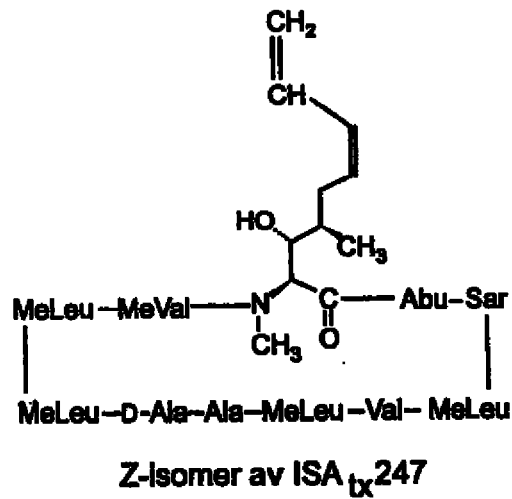


FIG. 2B

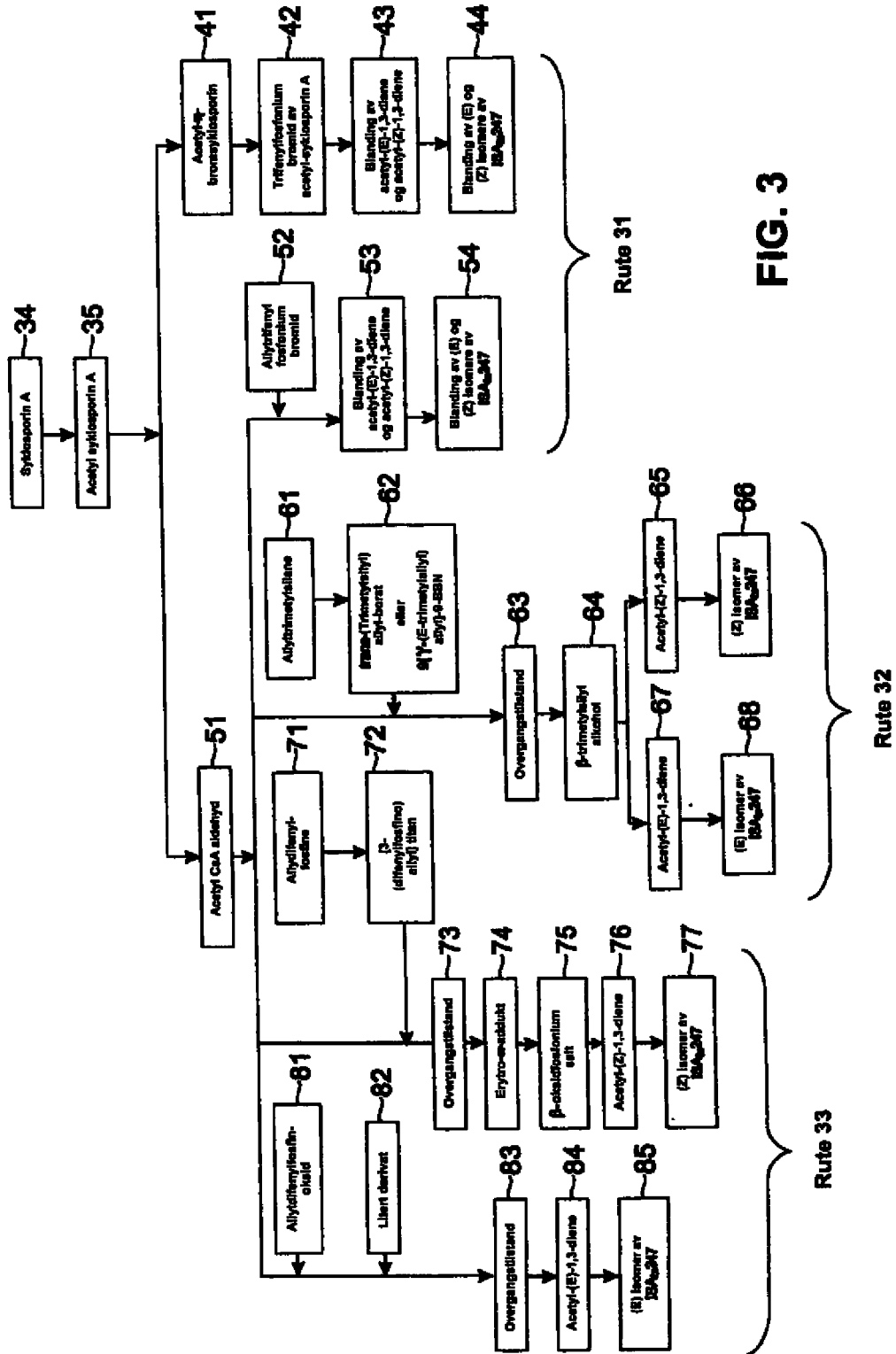


FIG. 3

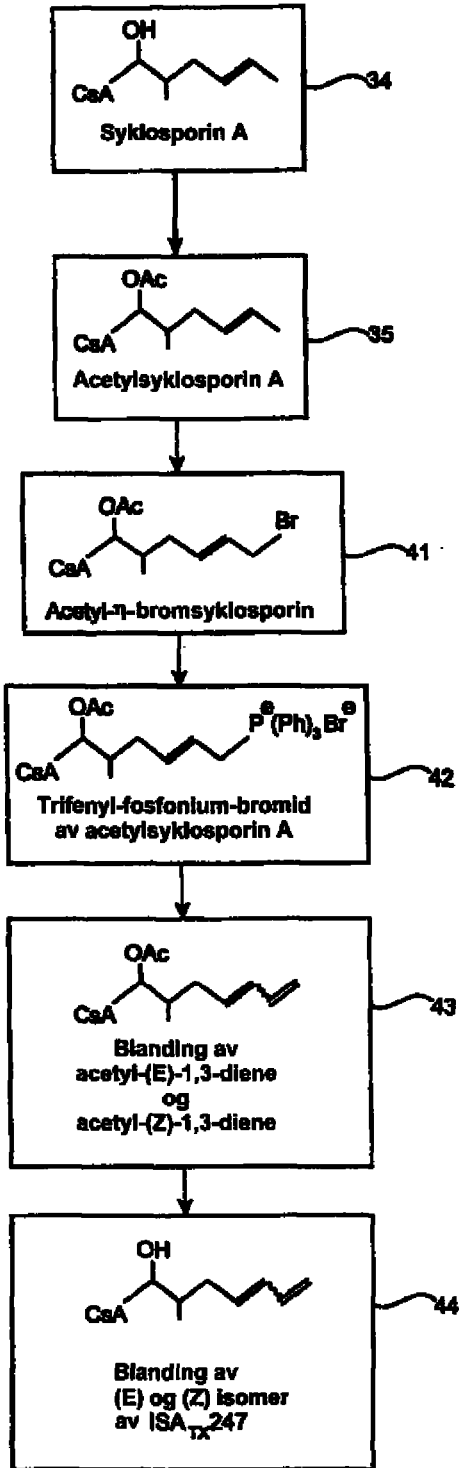


FIG. 4

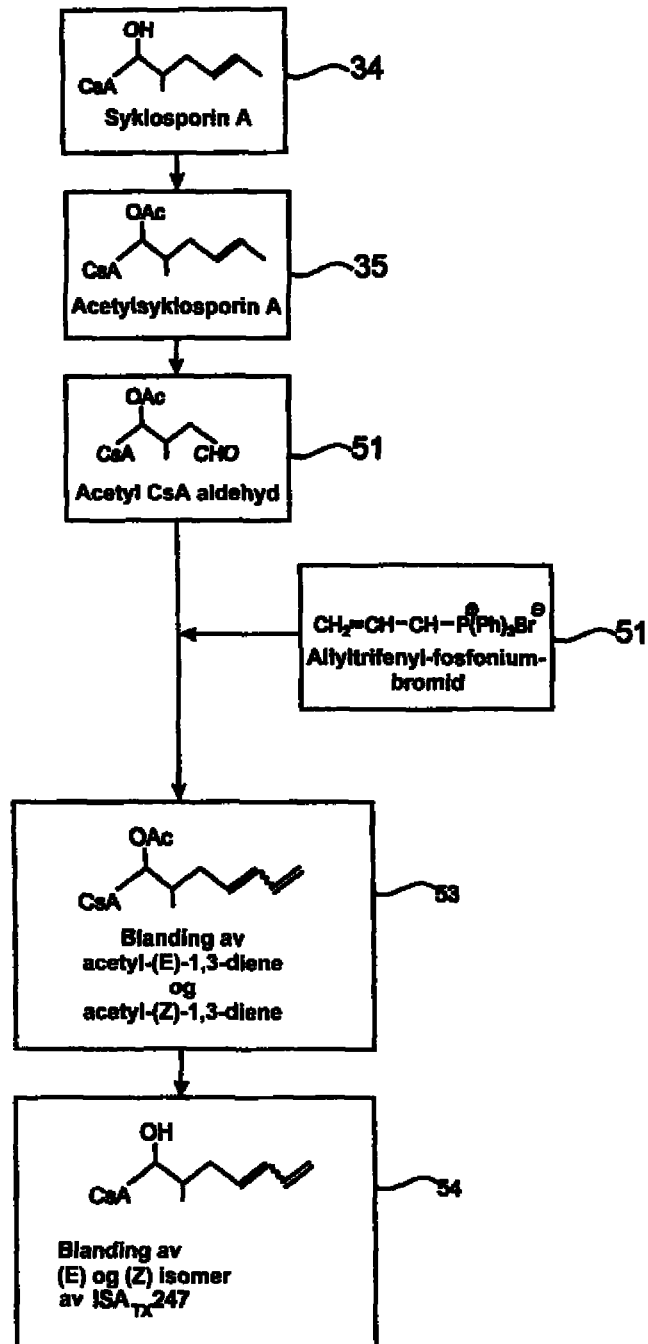
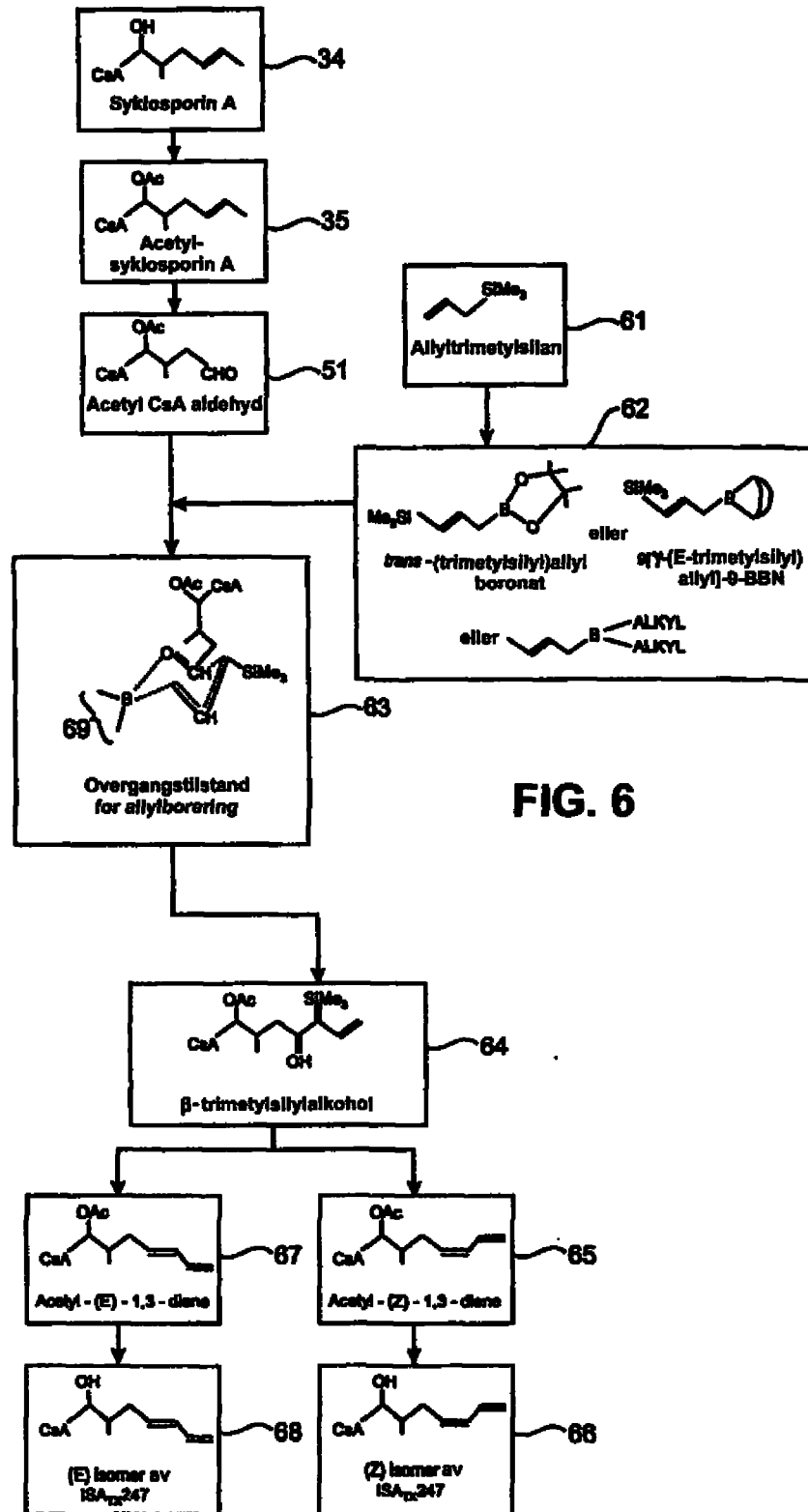
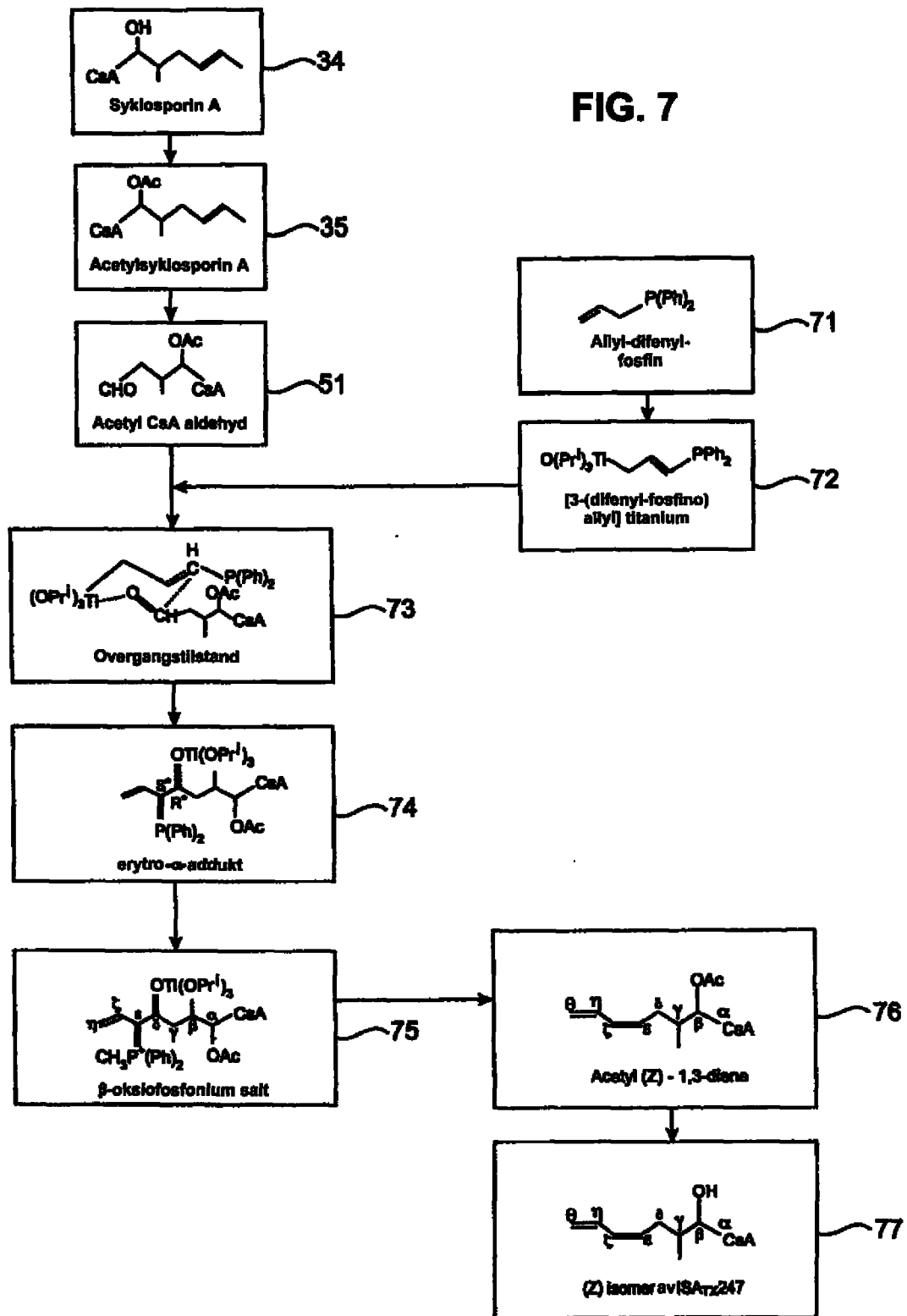


FIG. 5





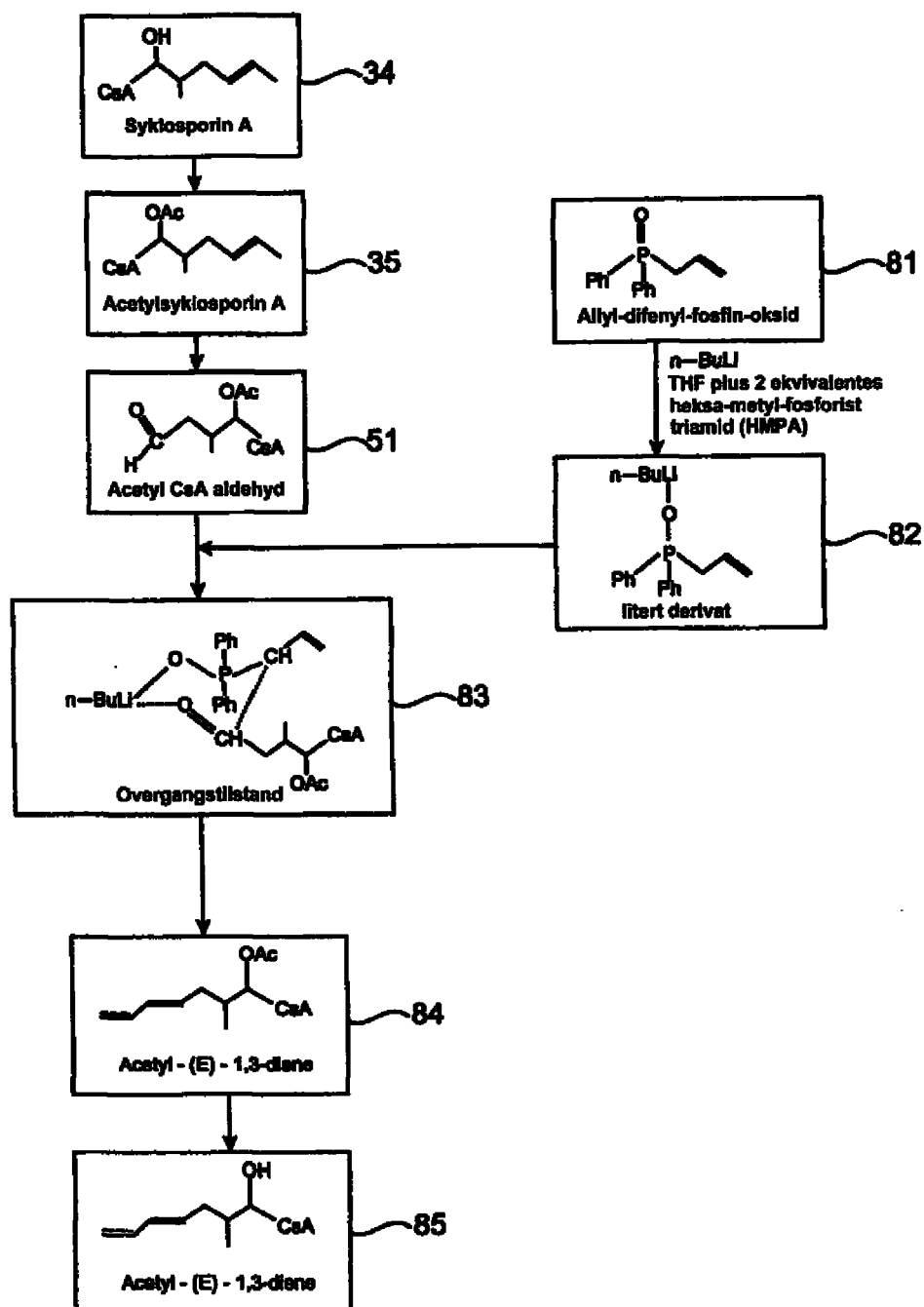


FIG. 8

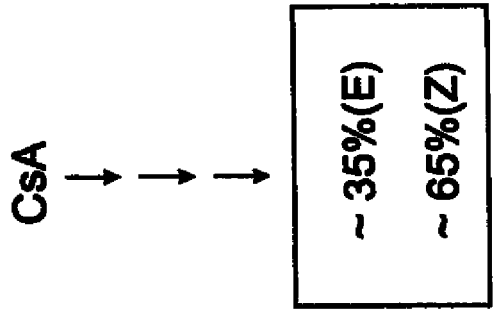


FIG. 9C

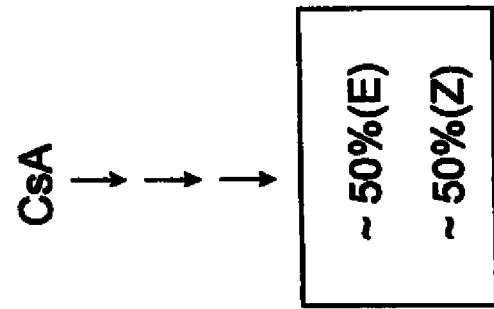


FIG. 9B

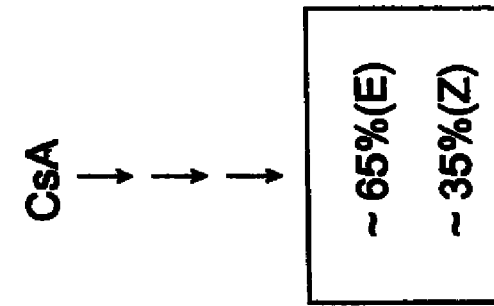


FIG. 9A

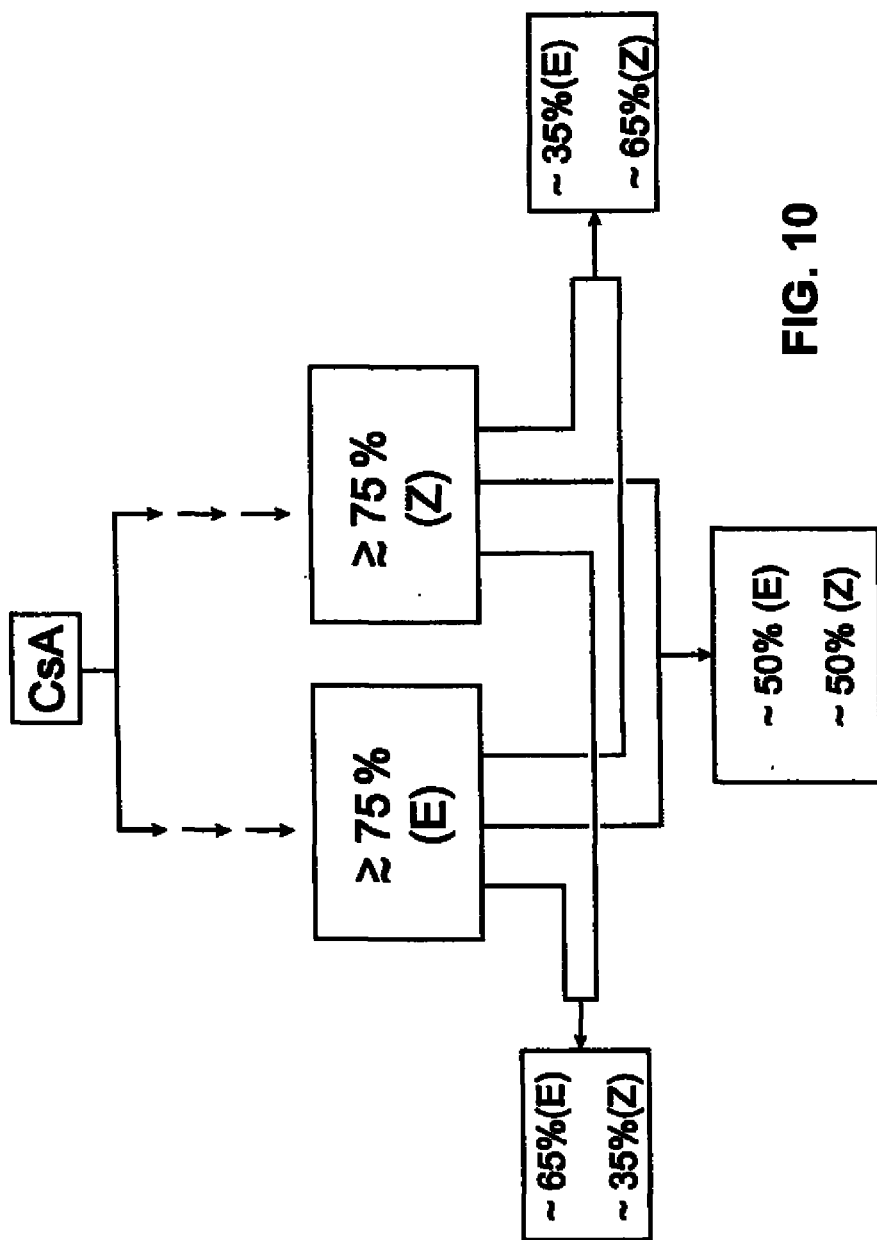


FIG. 10

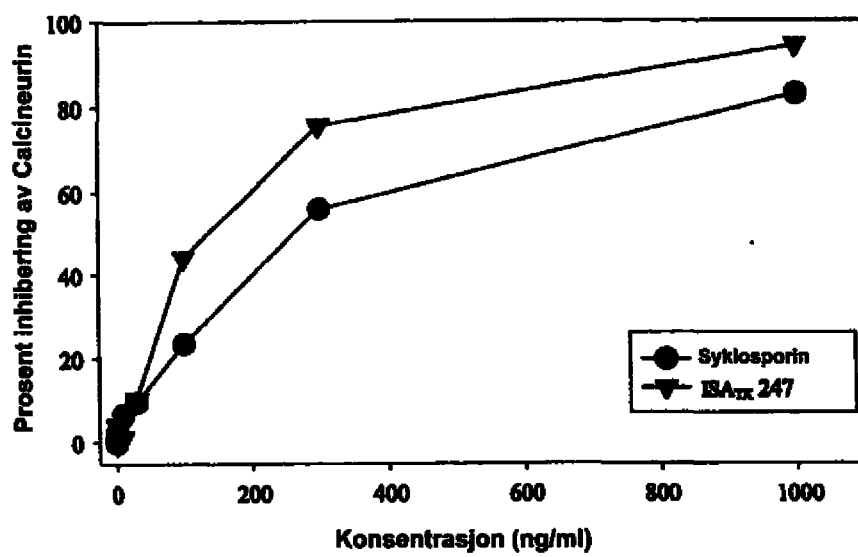
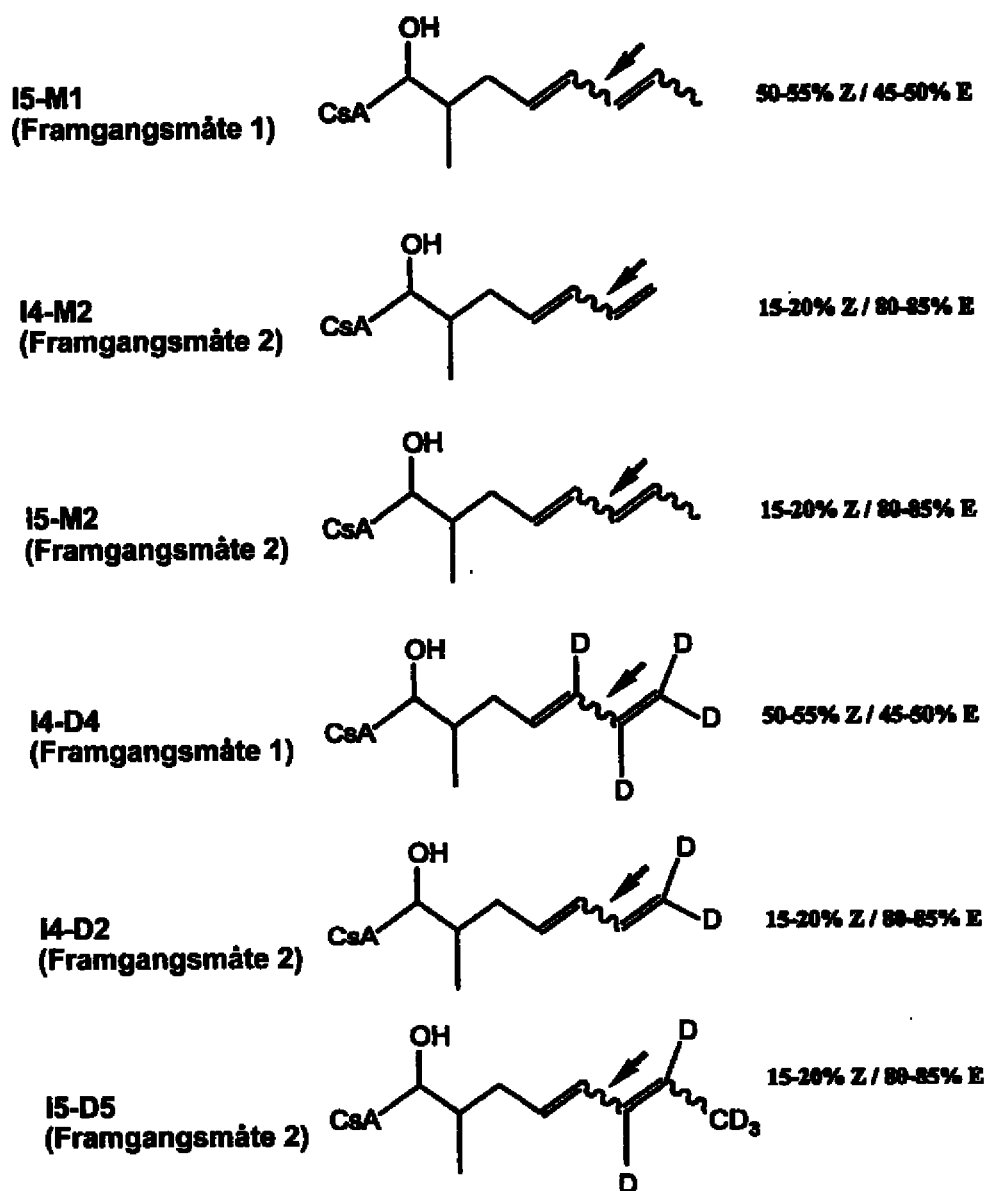
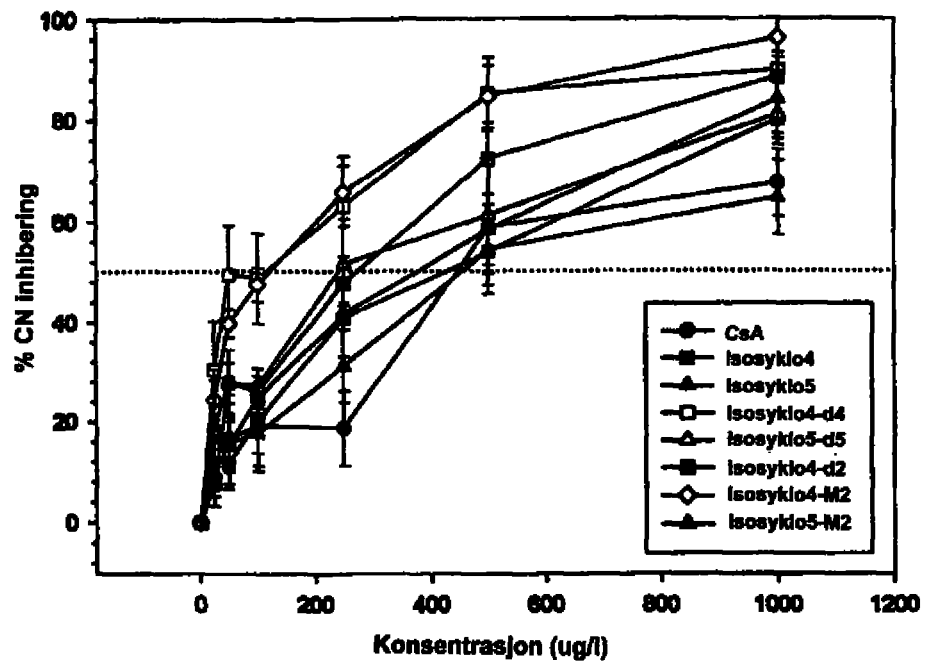


FIG.11

**FIG. 12**

**Prosent Calcineurin Inhibering  
i fullstendig blod,  
ved bruk av modifiserte syklosporiner**

(gjennomsnitt +/- SEM)



**FIG. 13**