



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 266 564**

51 Int. Cl.:
C07K 7/64 (2006.01)
A61K 38/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02767027 .2**
86 Fecha de presentación : **17.10.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1436321**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.07.2004**

54 Título: **Síntesis de análogos de ciclosporinas.**

30 Prioridad: **19.10.2001 US 346201 P**
05.04.2002 US 370596 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

73 Titular/es: **Isotechnika Inc.**
2100 College Plaza, 8215 112th Street
Edmonton, Alberta T6G 2C8, CA

72 Inventor/es: **Naicker, Selvaraj;**
Yatscoff, Randall, W.;
Foster, Robert, T.;
Abel, Mark;
Jayaraman, Seetharaman;
Mair, Hans-Jurgen;
Adam, Jean-Michel y
Lohri, Bruno

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Síntesis de análogos de ciclosporinas.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a mezclas de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247. Se contempla que las mezclas tienen eficacia mejorada y/o toxicidad reducida con respecto a los isómeros individuales y con respecto a los de origen natural y otras ciclosporinas y derivados de ciclosporinas actualmente conocidas.

10 **Bibliografías**

Las siguientes bibliografías se refieren en el presente documento o a las que se hace referencia en el presente documento mediante el número de solicitud o número de patente o entre paréntesis mediante el autor y el año en las partes relevantes de esta memoria descriptiva:

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

20 **J.-P. Biellmann**, J. -B. Ducep en "Allylic and benzylic carbanions substituted by heteroatoms", *Organic Reactions*, Vol. 27 (Wiley, New York, 1982), pág. 9.

H.J. Carlsen et al. en "A Greatly Improved Procedure for Ruthenium Tetroxide Catalyzed Oxidations of Organic Compounds", *J. Org. Chem.*, Vol. 46, número 19, págs. 3736-3738 (1981).

25 **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, págs. 297-303 (1996).

E.J. Corey, M.C. **Desai** en *Tetrahedron Letters*, Vol. 26, número 47, págs. 5747-8, (1985).

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

35 **E. Ehlinger**, P. **Magnus** en "Silicon in synthesis. 10. The (trimethylsilyl) allyl anion: A β -acyl anion equivalent for the conversion of aldehydes and ketones into γ -lactones", *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 102, número 15, págs. 5004-5011 (1980).

D.S. Fruman, 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, págs. 3686-90 (1992).

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

45 **J.R. Hanson**, "The Protection of Alcohols", *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Cap. 2, págs. 24-25 (Sheffield Academic Press, Sheffield, Inglaterra, 1999).

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

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

R.W. Hoffmann, H. -J **Ze**i, "Stereoselective synthesis of alcohols. 8. Diastereoselective synthesis of β -methylhomallyl alcohols via crotylboronates", *J. Org. Chem.*, Vol. 46, págs. 1309-1314 (1981).

55 **P.F. Hurdlik** y D. **Peterson** en "Stereospecific Olefin-Forming Elimination Reactions of B-Hydroxysilanes", *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 97, número 6, págs. 1464-1468 (1975).

60 **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, número 4, págs. 723-730 (1987).

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

J. McMurry, *Organic Chemistry*, 5ª Ed. (Brooks/Cole, Pacific Grove, 2000), págs. 780-783.

65 **M.T. Reetz** en *Organotitanium Reagents in Organic Synthesis* (Springer-Verlag, Berlín, 1986), págs. VII, 148-149, y 164-165.

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

W.R. Roush, "Allylorganometallics", *Comprehensive Organic Synthesis*, Pergamon Press, Vol. 2, págs. 1-53.

S.L. Schreiber, **G. R. Crabtree**, "The mechanism of action of cyclosporin A and FK506", *Immunol. Today*, Vol. 13, págs. 136-42 (1992).

I. 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, págs. 195-211 (1995).

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

A. Streitwieser, **C.H. Heathcock**, *Introduction to Organic Chemistry*, 2ª ed. (Macmillan, Nueva York, 1981), págs. 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, págs. 470-6 (1991).

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

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

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

Traber et al., *Helv. Chim. Acta*, Vol. 65, págs. 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, número 29, págs. 2751-2752 (1981).

H.A. Valantine, **J.S. Schroeder**, "Recent advances in cardiac transplantation" [editorial; comment], *N. Engl. J. Med.*, Vol. 333, número 10, págs. 660-1 (1995).

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

Wenger, *Transpl. Proc.*, Vol. 15, Supl. 1, pág. 2230 (1983).

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

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

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

Dan Yang, et al., "A C₂ Symmetric Chiral Ketone for Catalytic Asymmetric Epoxidation of Unfunctionalized Olefins", *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 118, págs. 491-492 (1996).

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

Patente de los EE.UU. número 4.108.985.

Patente de los EE.UU. número 4.160.452.

Patente de los EE.UU. número 4.210.581.

Patente de los EE.UU. número 4.220.641.

Patente de los EE.UU. número 4.256.108.

Patente de los EE.UU. número 4.265.874.

Patente de los EE.UU. número 4,288.431.

Patente de los EE.UU. número 4.384.996.

Patente de los EE.UU. número 4.396.542.

Patente de los EE.UU. número 4.554.351.

Patente de los EE.UU. número 4.771.122.

5 Patente de los EE.UU. número 5.284.826.

Patente de los EE.UU. número 5.525.590.

Publicación de patente europea número 0 034 567.

10 Publicación de patente europea número 0 056 782.

Publicación de patente internacional número WO 86/02080.

15 Publicación de patente internacional número WO 99/18120.

Antecedentes de la invención

Los derivados de ciclosporina componen una clase de polipéptidos cíclicos, que consisten en once aminoácidos, que se producen como metabolitos secundarios mediante las especies fúngicas *Tolypocladium inflatum* Gams. Se ha observado que inhiben reversiblemente linfocitos inmunocompetentes, particularmente linfocitos T, en la fase G₀ o G₁ del ciclo celular. También se ha observado que los derivados de ciclosporina inhiben reversiblemente la producción y liberación de linfoquinas (Granelli-Piperno *et al.*, 1986). Aunque se conocen una variedad de derivados de ciclosporina, la ciclosporina A es la más ampliamente usada. Los efectos supresores de la ciclosporina A se refieren a la inhibición de los eventos de activación mediados por células T. Esta supresión se consigue mediante la unión de ciclosporina a la proteína intracelular ubicua, ciclofilina. Este complejo, a su vez, inhibe la actividad serina treonina fosfatasa dependiente de calcio y calmodulina de la enzima calcineurina. La inhibición de la calcineurina previene la activación de los factores de transcripción tales como NFAT_{p/c} y NF-κB, que son necesarios para la inducción de los genes de citocina (IL-2, IFN-γ, IL-4, y GM-CSF) durante la activación de las células T. La ciclosporina también inhibe la producción de linfoquinas mediante los linfocitos T cooperadores *in vitro* y detiene el desarrollo de células CD4 y CD8 maduras en el timo (Granelli-Piperno *et al.*, 1986). Otras propiedades *in vitro* de la ciclosporina incluyen la inhibición de IL-2 que produce linfocitos T y linfocitos T citotóxicos, la inhibición de IL-2 liberada por células T activadas, la inhibición de los linfocitos T que quedan en respuesta a linfoquinas aloantígenas y exógenas, la inhibición de la producción de IL-1, y la inhibición de la activación por mitógeno de IL-2 que produce linfocitos T (Granelli-Piperno *et al.*, 1986).

La ciclosporina es un agente inmunosupresor potente que se ha demostrado suprime la inmunidad humoral y las reacciones inmunológicas mediadas por célula tales como rechazo a aloinjerto, hipersensibilidad retardada, encefalo-mielitis alérgica experimental, artritis de adyuvante de Freund e enfermedad de injertos frente a huésped. Se usa para la profilaxis de rechazo de órgano posterior al trasplante de órganos; para el tratamiento de la artrosis reumatoide; para el tratamiento de psoriasis; y para el tratamiento de otras enfermedades autoinmunitarias, que incluyen la diabetes de tipo I, enfermedad de Chron, lupus, y similares.

Desde el descubrimiento original de la ciclosporina, se han aislado e identificado una gran variedad de ciclosporinas de origen natural y se han preparado muchas ciclosporinas adicionales no naturales por medios semi o totalmente sintéticos o mediante la aplicación de técnicas de cultivo modificadas. Por tanto, la clase comprendida por las ciclosporinas es ahora sustancial e incluye, por ejemplo, las ciclosporinas de A a Z de origen natural [véase Traber *et al.* (1977); Traber *et al.* (1982); Kobel *et al.* (1982); y von Wartburg *et al.* (1986)], así como varios derivados de ciclosporina no naturales y ciclosporinas artificiales o sintéticas que incluyen las dihidro e iso-ciclosporinas; ciclosporinas derivatizadas (por ejemplo, en la que se acila el átomo 3'-O del residuo MeBmt o se introduce un sustituyente adicional en el átomo de carbono α del residuo de sarcosilo en la posición 3); ciclosporinas en las que el residuo MeBmt está presente en forma isomérica (por ejemplo, en la que la configuración entre las posiciones 6' y 7' del resto MeBmt es *cis* mejor que *trans*); y ciclosporinas en las que se incorporan aminoácidos variantes en posiciones específicas dentro de la secuencia peptídica empleando, por ejemplo, el método sintético total para la producción de ciclosporinas desarrollado por R. Wenger, véase por ejemplo Traber *et al.* (1977), Traber *et al.* (1982) y Kobel *et al.* (1982); las patentes de los EE.UU. números 4.108.985, 4.210.581, 4. 220.641, 4.288.431, 4.554.351 y 4.396.542; las publicaciones de patente europea números 0 034 567 y 0 056 782; la publicación de patente internacional número WO 86/02080; Wenger (1983); Wenger (1985); y Wenger (1986). Se notifican análogos de ciclosporina A que contienen aminoácidos modificados en la posición 1 por Rich *et al.* (1986). Se describen análogos de ciclosporina A inmunosupresores, antiinflamatorios, y antiparasitarios en las patentes de los EE.UU. números 4.384.996; 4.771.122; 5.284.826; y 5.525.590, todas cedidas a Sandoz. Se describen análogos de ciclosporina adicionales en el documento WO 99/18120, cedido a Isotechnika. Los términos ciclosporina (Ciclosporin), ciclosporina (ciclosporin), ciclosporina (cyclosporina) y ciclosporina (Cyclosporina) son intercambiables y se refieren a la ciclosporina.

Existen numerosos efectos adversos asociados con terapia con ciclosporina A, que incluyen nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, cataratogénesis, hirsutismo, parestesia, e hiperplasia gingival por nombrar algunas (Sketris *et al.*, 1995). De éstas, la nefrotoxicidad es una de las más graves, efectos adversos relacionados con la dosis de administración de ciclosporina A. Productos fármaco de liberación inmediata de ciclosporina A (por ejemplo, Neoral[®]; y Sandimmune[®])

pueden provocar nefrotoxicidad y otros efectos secundarios tóxicos debido a su rápida liberación y la absorción de altas concentraciones en sangre del fármaco. Se postula que las concentraciones pico del fármaco están asociadas con los efectos secundarios (Bennet, 1998). No se conoce el mecanismo exacto mediante el cual la ciclosporina A causa un daño renal; sin embargo, se propone que un aumento en los niveles de las sustancias de vasoconstrictoras en el riñón conduce a la vasoconstricción de las arteriolas glomerulares aferentes. Esto puede dar como resultado isquemia renal, una disminución de la tasa de filtración glomerular y, a largo plazo, fibrosis intersticial. Cuando se reduce la dosis o se sustituye otro agente inmunosupresor, la función renal mejora (Valantine y Schroeder, 1995).

En consecuencia, existe una necesidad de agentes inmunosupresores que son efectivos y tienen toxicidad reducida.

Se describen análogos de ciclosporina que contienen aminoácidos modificados en la posición 1 en el documento WO 99/18120, que se cede al cesionario de la presente solicitud. También se cede al presente cesionario el documento WO 03/0335227, en el que los solicitantes describieron un análogo de ciclosporina A particularmente preferido denominado "ISA_{TX}247". Este análogo es estructuralmente idéntico a la ciclosporina A excepto por una modificación en residuo del aminoácido 1. Los solicitantes descubrieron que ciertas mezclas de isómeros *cis* y *trans* de ISA_{TX}247 presentaban una combinación de potencia mejorada, y/o toxicidad reducida con respecto a las ciclosporinas de origen natural y las conocidas actualmente. Se describieron también ciertos derivados alquilados, arilados, y deuterados de ISA_{TX}247.

Normalmente, las mezclas descritas en el documento WO 03/033527 oscilan desde aproximadamente el 10 hasta el 90 por ciento por peso del isómero *trans* y aproximadamente del 90 al 10 por ciento por peso del isómero *cis*; en otra realización, la mezcla contiene aproximadamente del 15 al 85 por ciento por peso del isómero *trans* y aproximadamente del 85 al 15 por ciento por peso del isómero *cis*; en otra realización, la mezcla contiene aproximadamente del 25 al 75 por ciento por peso del isómero *trans* y aproximadamente del 75 al 25 por ciento por peso del isómero *cis*; en otra realización, la mezcla contiene aproximadamente del 35 al 65 por peso del isómero *trans* y aproximadamente del 65 al 35 por ciento por peso del isómero *cis*; en otra realización, la mezcla contiene aproximadamente del 45 al 55 por ciento por peso del isómero *trans* y aproximadamente del 55 al 45 por ciento por peso del isómero *cis*. En otra realización, la mezcla isomérica es una mezcla de ISA_{TX}247 que comprende aproximadamente del 45 al 50 por ciento por peso del isómero *trans* y aproximadamente del 50 al 55 por ciento por peso del isómero *cis*. Estos porcentajes en peso se basan en el peso total de la composición. En otras palabras, una mezcla puede contener el 65 por ciento por peso del isómero (E) y el 35 por ciento por peso del isómero (Z), o viceversa. En una nomenclatura alternativa, el isómero *cis* puede también describirse como el isómero (Z), y el isómero *trans* también puede denominarse isómero (E).

En consecuencia, existe una necesidad en la técnica para métodos de preparación de análogos de ciclosporina, incluyendo isómeros de ISA_{TX}247. Se necesitan las rutas sintéticas que producen composiciones enriquecidas de los isómeros individuales, así como mezclas de los isómeros que tienen una razón deseada de los dos isómeros. Se necesitan también métodos de preparación de derivados de ISA_{TX}247.

Sumario de la invención

La ciclosporina y sus análogos son miembros de una clase de polipéptidos cíclicos que tienen actividad inmunosupresora potente. A pesar de las ventajas que estos fármacos ofrecen con respecto a sus actividades inmunosupresoras, antiinflamatorias, y antiparasitarias, hay numerosos efectos adversos asociados con la terapia con ciclosporina A que incluyen nefrotoxicidad y hepatotoxicidad. En consecuencia, existe una necesidad de nuevos agentes inmunosupresores que son tan activos farmacológicamente como el compuesto ciclosporina A de origen natural, pero sin los efectos secundarios tóxicos asociados.

La presente invención proporciona ciertas mezclas de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247, que son farmacéuticamente útiles. Las mezclas de isómeros de ISA_{TX}247 muestran una combinación de potencia mejorada y toxicidad reducida con respecto a las ciclosporinas de origen natural y las conocidas actualmente.

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que ciertas mezclas isoméricas de análogos de ciclosporina proporcionan efectos inmunosupresores superiores sin los efectos adversos asociados con la ciclosporina A. En particular, se ha encontrado inesperadamente que mezclas isoméricas (es decir, mezclas de isómeros tanto *cis* como *trans*) que oscilan desde aproximadamente 10:90 hasta aproximadamente 90:10 (*trans* con respecto a *cis*) de análogos de ciclosporina modificados en el residuo del aminoácido 1 proporcionan una eficacia y una seguridad superiores. Se describen ejemplos de dichos análogos en el documento WO 99/18120, e incluyen compuestos deuterados y no deuterados. En particular, se encuentra que las mezclas en el intervalo de aproximadamente 45:55 a aproximadamente 50:50 (*trans* con respecto a *cis*) y en el intervalo de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 55% *trans* y de aproximadamente el 45% a aproximadamente el 50% *cis* son particularmente eficaces.

Además, se ha demostrado que estas mezclas isoméricas muestran una combinación de potencia superior y de toxicidad reducida con respecto a las ciclosporinas de origen natural y otras ciclosporinas y derivados de ciclosporinas actualmente conocidos.

Un análogo particular (denominado en el presente documento "ISA_{TX}247") es estructuralmente similar a la ciclosporina A excepto por un grupo funcional modificado en la periferia de la molécula, en el residuo del aminoácido 1. En

ES 2 266 564 T3

las figuras 1A, 1B, 2A, 2B se muestra la estructura de esta mezcla de análogo isomérico particular comparada con la estructura de ciclosporina A.

Las mezclas isoméricas pueden usarse, entre otras cosas, para la inmunosupresión, y el cuidado de diversos trastornos, enfermedades y estados inmunitarios, incluyendo la prevención, control, alivio y tratamiento de los mismos.

Los isómeros de ISA_{TX}247 (y derivados de los mismos) pueden sintetizarse mediante rutas estereoselectivas que pueden variar en su grado de selectividad. Las rutas estereoselectivas producen composiciones que están enriquecidas en cualquiera de los isómeros (E) y (Z), y estas composiciones pueden combinarse de manera que la mezcla resultante tenga una razón deseada de los dos isómeros. Alternativamente, las condiciones de reacción de una ruta estereoselectiva pueden adaptarse para producir la razón deseada directamente en una mezcla preparada. El porcentaje de un isómero u otro en una mezcla puede verificarse usando espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) u otras técnicas bien conocidas en la técnica.

Normalmente, cada una de las rutas se realiza con la aplicación de un grupo protector en un grupo funcional alcohol sensible. En una realización, se protege el alcohol como un acetato; en otras realizaciones los grupos protectores son ésteres benzoato o sililéteres. Aunque los grupos protectores acetato son comunes en la técnica, es importante enfatizar que en muchas de las realizaciones a modo de ejemplo descritas en el presente documento pueden evitarse ciertas reacciones secundarias que implican un grupo protector acetato mediante el uso de grupos protectores tales como ésteres benzoato o sililéteres.

Entonces, el compuesto protegido puede servir como precursor para una diversidad de rutas sintéticas estereoselectivas que incluyen algunas que utilizan reactivos que contienen fósforo como participantes en una reacción de Wittig, y elementos inorgánicos como miembros de reactivos organometálicos. Este último tipo puede realizarse a través de estados de transición de anillos de seis miembros cuando el impedimento estérico dicta el resultado de la configuración. Muchos reactivos organometálicos están disponibles, incluyendo aquellos que se caracterizan por elementos inorgánicos tales como boro, silicio, titanio, litio, y azufre. Pueden prepararse isómeros individuales a partir de un único precursor o de precursores múltiples.

La razón de los isómeros (E) con respecto a (Z) en cualquier mezcla, tanto si se producen de manera estereoselectiva como de manera no estereoselectiva, puede tomar un amplio intervalo de valores. Por ejemplo, la mezcla puede comprender desde aproximadamente el 10 hasta el 90 por ciento del isómero (E) con respecto a aproximadamente del 90 al 10 por ciento del isómero (Z). En otras realizaciones, la mezcla puede contener desde aproximadamente el 15 hasta el 85 por ciento en peso del isómero (E) y aproximadamente del 85 al 15 por ciento del isómero (Z); en otra realización, la mezcla contiene aproximadamente del 25 al 75 por ciento en peso del isómero (E) y aproximadamente del 75 al 25 por ciento en peso del isómero (Z); en otra realización, la mezcla contiene aproximadamente del 35 al 65 por ciento en peso del isómero (E) y aproximadamente del 65 al 35 por ciento en peso del isómero (Z); en otra realización, la mezcla contiene aproximadamente del 45 al 55 por ciento en peso del isómero (E) y aproximadamente del 55 al 45 por ciento del isómero (Z). En otra realización, la mezcla isomérica es una mezcla de ISA_{TX}247 que comprende aproximadamente del 45 al 50 por ciento en peso del isómero (E) y aproximadamente del 50 al 55 por ciento en peso del isómero (Z). Estos porcentajes en peso se basan en el peso total de la composición, y se entenderá que la suma del porcentaje en peso del isómero (E) y del isómero (Z) es 100 por ciento en peso. En otras palabras, una mezcla puede contener el 65 por ciento en peso del isómero (E) y el 35 por ciento en peso del isómero (Z), o viceversa.

En consecuencia, en un primer aspecto, la invención proporciona un método de preparación de una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247, en el que la ruta sintética comprende las etapas de: calentar anacetil- η -halociclosporina A con trialkilfosfina, triarilfosfina (por ejemplo, trifenilfosfina), arilalkilfosfina, o triarilsina para producir un producto intermedio; preparar una mezcla de isómeros (E) y (Z) de acetil-1,3-dieno agitando el producto intermedio; y preparar una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247 tratando la mezcla de isómeros (E) y (Z) de acetil-1, 3-dieno con una base.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método de preparación de una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247, en los que la ruta sintética comprende las etapas de: convertir un aldehído de acetilciclosporina A en una mezcla de isómeros (E) y (Z) de acetil-1,3-dieno haciendo reaccionar el producto intermedio con un iluro de fósforo mediante una reacción de Wittig, opcionalmente en presencia de un haluro de litio; y preparar una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247 tratando la mezcla de isómeros (E) y (Z) de acetil-1,3-dieno con una base.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método de preparación de una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247, en el que la ruta sintética comprende las etapas de:

- proteger el β -alcohol de la ciclosporina A formando una primera acetilciclosporina A intermedia;
- oxidar la acetilciclosporina A para producir un segundo aldehído intermedio de acetilciclosporina A;

c) convertir un aldehído intermedio de acetilciclosporina A en una mezcla de isómeros (E) y (Z) de acetil-1,3-dieno haciendo reaccionar el producto intermedio con un iluro de fósforo por medio de una reacción de Wittig, opcionalmente en presencia de un haluro de litio; y

ES 2 266 564 T3

d) preparar una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247 tratando la mezcla de isómeros (E) y (Z) de acetil-1,3-dieno con una base.

5 En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un método de preparación de una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247, en el que la ruta sintética comprende las etapas de:

10 a) convertir un aldehído intermedio de acetilciclosporina A en una mezcla de isómeros (E) y (Z) de acetil-1,3-dieno haciendo reaccionar el producto intermedio con un iluro de fósforo preparado a partir de un haluro de tributilalilfosfonio o haluro de trifenilfosfonio mediante una reacción de Wittig, opcionalmente en presencia de un haluro de litio;

b) preparar una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247 tratando la mezcla de isómeros (E) y (Z) de acetil-1,3-dieno con una base.

15 En un quinto aspecto, la invención se refiere a un método de preparación de una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247, comprendiendo el método una ruta sintética que prepara un isómero (E) y un isómero (Z) de ISA_{TX}247 de manera que el isómero (E) y el isómero (Z) están presentes en la mezcla en una razón predeterminada, en el que la ruta sintética comprende las etapas de:

20 a) proteger el β -alcohol del aminoácido 1 de la ciclosporina A;

b) oxidar la ciclosporina A protegida para producir un aldehído de ciclosporina A protegido;

25 c) convertir el aldehído de ciclosporina A protegido en una mezcla de isómeros (E) y (Z) de 1,3-dieno protegido haciendo reaccionar el aldehído de ciclosporina A protegido con un iluro de fósforo por medio de una reacción de Wittig, opcionalmente en presencia de un haluro de litio; y

d) preparar una mezcla de isómeros (E) y (Z) desprotegiendo el 1,3-dieno protegido.

30 En un sexto aspecto, la invención se refiere a un método de preparación de una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247, en el que la ruta sintética comprende las etapas de:

35 a) convertir un aldehído intermedio de la TMS-ciclosporina A en una mezcla de isómeros (E) y (Z) de TMS-1,3-dieno haciendo reaccionar el producto intermedio con un iluro de fósforo preparado a partir de un haluro de tributilalilfosfonio o haluro de trifenilfosfonio por medio de una reacción de Wittig, opcionalmente en presencia de un haluro de litio; y

40 b) preparar una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247 desprotegiendo la mezcla de isómeros (E) y (Z) de TMS-1,3-dieno con un ácido.

Breve descripción de los dibujos

45 La figura 1A muestra la estructura de la ciclosporina A, ilustrando los 11 residuos de aminoácidos que comprenden el anillo peptídico cíclico de la molécula, así como la estructura de la cadena lateral del residuo del aminoácido 1;

la figura 1B es otra ilustración de la estructura de la ciclosporina A con un énfasis particular en la definición del término "CsA" tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva;

50 la figura 2A muestra la estructura del isómero E (o isómero trans) del análogo de ciclosporina A denominado ISA_{TX}247;

la figura 2B muestra la estructura del isómero Z (o isómero cis) del análogo de la ciclosporina A ISA_{TX}247;

55 la figura 3 muestra una vista general de rutas sintéticas a modo de ejemplo que pueden usarse para preparar los análogos de ciclosporina de la presente invención, en la que las rutas estereoselectivas están agrupadas según las condiciones de reacción;

60 la figura 4 ilustra una ruta sintética que produce una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247 a partir de un precursor bromo;

la figura 5 ilustra otra ruta sintética que produce una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247 a partir de un precursor aldehído;

65 la figura 6 ilustra un esquema de reacción estereoselectivo a modo de ejemplo que puede usarse para preparar composiciones enriquecidas en el isómero o bien (E) o bien (Z) de ISA_{TX}247, en el que cualquier isómero puede prepararse a partir del mismo alcohol precursor;

la figura 7 ilustra un esquema de reacción alternativo para la síntesis estereoselectiva de una composición enriquecida en el isómero (Z) de ISA_{TX}247;

la figura 8 ilustra un esquema de reacción alternativo para la síntesis estereoselectiva de una composición enriquecida en el isómero (E) de ISA_{TX}247;

las figuras 9A-C ilustran rutas sintéticas a modo de ejemplo para producir una mezcla de los isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247, habiéndose adaptado las condiciones de cada reacción para producir una razón particular a modo de ejemplo de los dos isómeros;

la figura 10 ilustra rutas estereoselectivas a modo de ejemplo para producir una mezcla de los isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247, en las que se preparan en primer lugar composiciones enriquecidas en uno de los dos isómeros, y luego se mezclan en consecuencia en proporciones predeterminadas para conseguir la razón deseada;

la figura 11 proporciona los resultados de un ensayo que muestra que la inhibición de la actividad de la calcineurina fosfatasa por ISA_{TX}247 (el 45-50% de isómero E y el 50-55% de isómero Z) fue hasta 3 veces más potente (según se determinó mediante CI₅₀) comparado con la ciclosporina A.

La figura 12 expone la estructura y composición isomérica de algunas mezclas isoméricas de análogos deuterados y no deuterados.

La figura 13 proporciona los resultados de un ensayo que muestra que la inhibición de la actividad de la calcineurina fosfatasa por diversas mezclas isoméricas de análogos deuterados y no deuterados fue al menos tan potente (según se determinó mediante CI₅₀) comparado con la ciclosporina A.

Descripción detallada de la invención

Síntesis

La ciclosporina y sus análogos son miembros de una clase de polipéptidos cíclicos que tienen una potente actividad inmunosupresora. A pesar de las ventajas que ofrecen estos fármacos con respecto a sus actividades inmunosupresora, antiinflamatoria y antiparasitaria, hay diversos efectos adversos asociados con el tratamiento por ciclosporina A que incluyen nefrotoxicidad y hepatotoxicidad. En consecuencia, hay una necesidad de nuevos agentes inmunosupresores que sean tan activos farmacológicamente como el compuesto ciclosporina A de origen natural, pero sin los efectos secundarios tóxicos asociados.

Los solicitantes han descrito previamente un análogo de ciclosporina A denominado "ISA_{TX}247". Este análogo es estructuralmente similar a la ciclosporina A, excepto por modificaciones en el residuo del aminoácido 1. Los solicitantes descubrieron que ciertas mezclas de isómeros cis y trans de ISA_{TX}247 mostraban una combinación de potencia mejorada, y toxicidad reducida, con respecto a ciclosporinas de origen natural y que se conocen en la actualidad.

Los isómeros de ISA_{TX}247 (y derivados de los mismos) pueden sintetizarse mediante rutas estereoselectivas que pueden variar en su grado de selectividad. Las rutas estereoselectivas producen composiciones que están enriquecidas en cualquiera de los isómeros (E) y (Z), y estas composiciones pueden combinarse de manera que la mezcla resultante tenga una razón deseada de los dos isómeros. Alternativamente, las condiciones de reacción de una ruta estereoselectiva pueden adaptarse para producir la razón deseada directamente en una mezcla preparada.

El nombre químico de un análogo de ciclosporina inmunosupresor de la presente invención, denominado ISA_{TX}247, se describe químicamente mediante el nombre ciclo{ {E,Z}-(2S,3R,4R)-3-hidroxi-4-metil-2-(metilamino)-6,8-nona-dienoil }-L-2-aminobutiril-N-metil-glicil-N-metil-L-leucil-L-valil-N-metil-L-leucil-L-alanil-D-alanil-N-metil-L-leucil-N-metil-L-leucil-N-metil-L-valil}. Su fórmula empírica es C₆₃H₁₁₁N₁₁O₁₂, y tiene un peso molecular de aproximadamente 1214,85. El término "ISA_{TX}247" es una denominación comercial dada a este compuesto farmacológicamente activo.

La estructura de ISA_{TX}247 se ha verificado en primer lugar mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Se asignaron los espectros tanto de ¹H como de ¹³C usando una serie de experimentos de RMN de una y dos dimensiones, y mediante comparación con las asignaciones de RMN conocidas para la ciclosporina A. La asignación absoluta de los isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247 se confirmó mediante experimentos de efecto nuclear de Overhauser (NOE - Nuclear Overhauser Effect). Se proporcionaron pruebas adicionales de apoyo mediante análisis de espectro de masa, que confirmó el peso molecular, y mediante el espectro infrarrojo, que se encontró que era muy similar al de la ciclosporina A. El último resultado era esperado, dada la similitud entre los dos compuestos.

La estructura de la ciclosporina A se ilustra en la figura 1A. La estructura incluye la identificación de los 11 residuos de aminoácidos que comprenden el anillo peptídico cíclico de la molécula. Estos 11 residuos de aminoácidos están marcados con números crecientes en sentido de las agujas del reloj, empezando en el aminoácido mostrado en el centro de la parte superior del anillo (e identificado con la etiqueta "aminoácido 1"). El primer aminoácido está encerrado en un recuadro de puntos para su claridad. La cadena lateral del residuo del aminoácido 1 se ha dibujado químicamente ya que es en esta posición general en la que tienen lugar las reacciones sintéticas descritas en el presente

documento. Convencionalmente, el carbono adyacente al grupo carbonilo de un aminoácido está marcado como un carbono α , usando letras progresivas del alfabeto griego para marcar los carbonos adyacentes en una dirección hacia abajo en la cadena, alejándose del anillo peptídico. En el caso de la ciclosporina A, tal como se muestra en la figura 1A, el carbono β de la cadena lateral está unido a un grupo hidroxilo, y hay un doble enlace orientado en trans entre los carbonos ε y ζ de la cadena lateral.

En la figura 1B se dibuja otro esquema de la estructura de la ciclosporina A, en el que se ha encerrado una parte diferente de la molécula en un recuadro de puntos. Esta figura define la nomenclatura que ha de usarse en la presente memoria descriptiva, en la que el término "CsA" se refiere a la parte de la ciclosporina A encerrada en el recuadro. La presente nomenclatura proporciona un medio abreviado de presentar la región en la que tendrán lugar las reacciones sintéticas descritas en el presente documento (es decir, la cadena lateral del residuo del aminoácido 1, que se ha dibujado fuera del recuadro de puntos en la figura 1B), sin tener que volver a dibujar el resto de la molécula cada vez que se describa una reacción. Resultará obvio para los expertos en la técnica que el enlace entre los carbonos α y β de la cadena lateral es de longitud normal, y se ha exagerado sólo en su dibujo para ayudar con la definición del término "CsA".

Tal como se mencionó anteriormente, un análogo particularmente preferido de la ciclosporina A se denomina ISA_{TX}247, y sus dos estereoisómeros E (o trans) y Z (o cis) se muestran en las figuras 2A y 2B, respectivamente. La naturaleza cis o trans de estos estereoisómeros se refiere a la configuración del doble enlace entre los carbonos ε y ζ de la cadena lateral; es decir, el doble enlace más próximo al anillo peptídico, opuesto al doble enlace en el extremo terminal de la cadena.

Debe mencionarse la nomenclatura estereoquímica. En la presente memoria descriptiva, los términos cis y (Z) se usarán de manera intercambiable, y los términos trans y (E) se usarán de manera intercambiable. El uso de los términos "eritro" y "treo" se mantendrá al mínimo debido a la aparente confusión en la bibliografía con respecto a su significado. Véase R. W. Hoffmann y H. -J Zei en "Stereoselective synthesis of Alcohols. 8. Diastereoselective Synthesis of β -Methylhomooallyl Alcohols via Crotylboronates", *J. Org. Chem.*, Vol. 46, págs. 1309-1314 (1981); A. Streitwieser y C. H. Heathcock, *Introduction to Organic Chemistry*, 2ª ed. (Macmillan, Nueva York, 1981), págs. 845-846; y M. B. Smith y J. March, *March's Advanced Organic Chemistry* (Wiley, Nueva York, 2001), págs. 144-147. En los pocos casos en los que se emplea la terminología treo/eritro en el presente documento, se usa la convención de Streitwieser y Heathcock, en la que isómeros "eritro" se refiere a las configuraciones (R, S) y (S, R), e isómeros "treo" se refiere a las configuraciones (R, R) y (S, S).

Un comentario final sobre la nomenclatura se refiere a doble enlace carbono-carbono terminal mostrado en las figuras 2A y 2B. En un esquema de numeración alternativo, pueden numerarse los carbonos en la cadena lateral del residuo del aminoácido 1 empezando en el carbono (θ) terminal, y volviendo atrás hacia el anillo peptídico. En este sistema, puede pensarse en los isómeros de ISA_{TX}247 como 1,3-dienos según la nomenclatura convencional en química orgánica, en la que cada doble enlace se identifica por su carbono de menor numeración.

Ahora se tratarán las rutas sintéticas ilustradas en las figuras 3-8. Según realizaciones de la presente invención, pueden prepararse mezclas isoméricas directamente, en las que las condiciones de reacción de una ruta sintética particular se adaptan para conseguir la razón deseada de isómeros en la mezcla. Alternativamente, pueden prepararse composiciones que están enriquecidas en uno de los dos isómeros geométricos de un análogo de ciclosporina A, y combinarse las composiciones en una razón preferida para conseguir la mezcla deseada.

En la figura 3 se facilita una vista general de las rutas sintéticas según realizaciones de la presente invención, en la que se hace énfasis particular en reagrupar las rutas de reacción según la química y la estereoselectividad. En referencia a la figura 3, generalmente se muestran las rutas sintéticas que utilizan reacciones de Wittig en la parte de la derecha del diagrama según se indica mediante el número de referencia 31, mientras que las rutas 32 y 33 que utilizan reactivos organometálicos que se piensa que forman estados de transición de seis miembros se muestran en las partes del medio y la izquierda del diagrama. Cualquiera de las rutas sintéticas puede dar una mezcla de los isómeros, o puede producir composiciones enriquecidas en uno de los dos isómeros.

Las realizaciones de la presente invención proporcionan una diversidad de rutas para llegar a la mezcla de isómeros deseada. La flexibilidad y versatilidad de las estrategias sintéticas descritas en el presente documento pueden reflejarse en parte por las simetrías y asimetrías de la figura 3. Una reacción que es común a cada una de las rutas es la protección de un grupo funcional en la ciclosporina A 34; en esta realización a modo de ejemplo esa reacción es la conversión de la ciclosporina A 34 en acetilciclosporina A 35. Una asimetría en la figura 3 es el uso de compuesto 51 de aldehído de acetilciclosporina A como precursor para todas las rutas de reactivo organometálico de titanio y litio, pero sólo algunas de las rutas de reacción de Wittig que contienen fósforo.

En general, las rutas sintéticas de la figura 3 cuyas condiciones de reacción pueden ajustarse para producir una mezcla que tiene la razón deseada de isómeros utilizan reactivos que contienen fósforo como participantes en una reacción de Wittig. Otras rutas estereoselectivas también emplean elementos inorgánicos, normalmente como elementos de reactivos organometálicos que avanzan a través de estados de transición de anillos de seis miembros en los que el impedimento estérico dicta el resultado de la conformación. Una plétora de reactivos organometálicos son útiles en la presente invención, incluyendo los que se caracterizan por elementos inorgánicos tales como boro, silicio, titanio, litio y azufre.

Pueden prepararse composiciones enriquecidas en uno y otro de una pareja de isómeros a partir de un único precursor; alternatively, pueden prepararse las dos composiciones a partir de diferentes precursores. En una de las rutas estereoselectivas de la figura 3 (ruta 32), un único precursor conduce a ambos isómeros de ISA_{TX}247, dependiendo de las condiciones de reacción que se eligen. En otra de las rutas estereoselectivas (ruta 33), se necesitan dos precursores diferentes para producir cada una de las composiciones enriquecidas.

Ahora se tratarán las reacciones de la figura 3 en detalle. Una reacción que es común a cada una de las rutas es la protección del alcohol en la posición β de la cadena lateral del residuo del aminoácido 1. Tal esquema de protección enfoca un problema que se encuentra comúnmente en la síntesis orgánica, en el que un primer grupo funcional se modifica inadvertidamente mediante una reacción que se pretende para un segundo grupo funcional (similar y/o idéntico) situado en otra parte de la molécula. Para llevar a cabo el esquema se hace reaccionar el primer grupo funcional con un grupo protector, se lleva a cabo la reacción deseada sobre el segundo grupo funcional, y entonces se elimina el grupo protector del primer grupo funcional.

Los grupos protectores se conocen bien en la síntesis orgánica, y se han tratado por J. R. Hanson en el capítulo 2, "The Protection of Alcohols" de la publicación *Protecting Groups in Organic Synthesis* (Sheffield Academic Press, Sheffield, Inglaterra, 1999), págs. 24-25. Hanson enseña cómo proteger grupos hidroxilo convirtiéndolos o bien en ésteres o bien en éteres. Los ésteres acetato son quizás el tipo más frecuentemente usado de química para la protección de grupos hidroxilo. Hay un amplio intervalo de condiciones que pueden usarse para introducir el grupo acetato. Estos reactivos y disolventes incluyen anhídrido acético y piridina; anhídrido acético, piridina y dimetilaminopiridina (DMAP); anhídrido acético y acetato de sodio; anhídrido acético y ácido tolueno-p-sulfónico, cloruro de acetilo, piridina y DMAP; y cetena. DMAP es un catalizador de la acilación útil debido a la formación de una sal de N-acilpiridinio sumamente reactiva a partir del anhídrido.

El β -alcohol de la ciclosporina A 34 puede protegerse como un acetato haciendo reaccionar 34 con un cloruro de acetilo, acetato de etilo, o combinaciones de los mismos, formando un compuesto acetilciclosporina A 35. Alternativamente, el β -alcohol experimenta una adición nucleófila al anhídrido acético, formando acetilciclosporina A 35 y ácido acético. Estas reacciones pueden llevarse a cabo en presencia de dimetilaminopiridina (DMAP) en las que un exceso de anhídrido acético actúa como disolvente. En estos casos puede usarse el prefijo "acetil" en la nomenclatura a lo largo de la ruta sintética, o hasta que se elimina el grupo acetilo. Por ejemplo, el último producto intermedio en una ruta que tiene un grupo acetilo en el carbono β se denomina "acetil-(E)-1,3-dieno".

Aunque la preparación de acetilciclosporina A está bien establecida en la bibliografía, se apreciará por los expertos en la técnica que pueden usarse grupos protectores distintos de ésteres acetato para proteger el β -alcohol del residuo del aminoácido 1 de la ciclosporina A 34. Estos grupos protectores pueden incluir ésteres benzoato, ésteres benzoato sustituido, éteres, y sililéteres. En ciertas condiciones de reacción, el grupo protector acetato es propenso a reacciones secundarias indeseables tales como eliminación e hidrólisis. Ya que los ésteres benzoato, éteres y sililéteres son a menudo más resistentes a tales reacciones secundarias en las mismas condiciones de reacción, a menudo es ventajoso emplear tales grupos protectores en lugar del acetato. La ciclosporina o derivados de ciclosporina que se han protegido por un grupo acetilo o cualquier otro grupo protector se denominan "ciclosporina A protegida". Del mismo modo, el último producto intermedio en la ruta a modo de ejemplo a la que se hace referencia anteriormente se denominaría "(E)-1,3-dieno protegido" en lugar de "acetil-(E)-1,3-dieno". La naturaleza del grupo protector elegido puede tener influencia sobre el transcurso deseado de las etapas adicionales en las secuencias de reacción.

Haciendo referencia a la figura 3, la acetilciclosporina A 35 tiene en esta ruta a modo de ejemplo un β -alcohol protegido, y este compuesto sirve como precursor para la síntesis de isómeros de ISA_{TX}247 en diversas rutas sintéticas. En primer lugar se tratarán las rutas con reacción de Wittig.

Síntesis de mezclas de los isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247 mediante la reacción de Wittig

Las rutas con reacción de Wittig expuestas como ejemplos en el presente documento se identifican por el número de referencia 31 en la figura 3. El método 1 avanza a través de la acetil- η -bromociclosporina 41 intermedia de bromo, mientras que el método 2 utiliza el aldehído de acetilciclosporina A 51 como punto de partida. Los métodos a modo de ejemplo descritos a continuación utilizan una reacción de Wittig para introducir una funcionalidad alqueno con una mezcla de configuraciones estereoquímicas.

Las reacciones de Wittig usadas en las realizaciones a modo de ejemplo descritas en el presente documento para sintetizar mezclas de los isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247 pueden llevarse a cabo opcionalmente en presencia de un haluro de litio. Se sabe bien que la presencia de haluros de litio en las reacciones de Wittig tiene un efecto sobre la razón de los isómeros geométricos producidos y, por lo tanto, la adición de un compuesto así puede ayudar a producir una mezcla deseada de los isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247.

Método 1

Puede prepararse una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247 tal como se muestra en la figura 4. El uso de la representación de la línea ondulada en la figura 4 (véase especialmente los compuestos 43 y 44) se pretende que represente que la secuencia de reacción a modo de ejemplo produce una mezcla de isómeros (E) y (Z). La razón en porcentaje de los isómeros (E) con respecto a (Z) producida oscila desde aproximadamente el 10 hasta el 90 por

ciento del isómero (E) con respecto a aproximadamente del 90 al 10 por ciento del isómero (Z), pero estos intervalos sólo son a modo de ejemplo, y son posibles muchos otros intervalos. Por ejemplo, la mezcla puede contener desde aproximadamente el 15 hasta el 85 por ciento en peso del isómero (E) y aproximadamente del 85 al 15 por ciento del isómero (Z). Alternativamente, la mezcla contiene aproximadamente del 25 al 75 por ciento en peso del isómero (E) y aproximadamente del 75 al 25 por ciento en peso del isómero (Z); aproximadamente del 35 al 65 por ciento en peso del isómero (E) y aproximadamente del 65 al 35 por ciento en peso del isómero (Z); y aproximadamente del 45 al 55 por ciento en peso del isómero (E) y aproximadamente del 55 al 45 por ciento del isómero (Z). Todavía en otra alternativa, la mezcla isomérica es una mezcla de ISA_{TX}247 que comprende aproximadamente del 45 al 50 por ciento en peso del isómero (E) y aproximadamente del 50 al 55 por ciento en peso del isómero (Z). Estos porcentajes en peso se basan en el peso total de la composición, y se entenderá que la suma del porcentaje en peso del isómero (E) y del isómero (Z) es 100 por ciento en peso. En otras palabras, una mezcla puede contener el 65 por ciento en peso del isómero (E) y el 35 por ciento en peso del isómero (Z), o viceversa.

Haciendo referencia a la figura 4, el carbono η terminal de la cadena lateral del residuo del aminoácido 1 de acetilciclosporina A se broma en la siguiente etapa de la reacción sometiendo a reflujo la acetilciclosporina A 35 con N-bromosuccinimida y azo-bis-isobutironitrilo en un disolvente tal como tetracloruro de carbono, produciendo la acetil- η -bromociclosporina A 41 intermedia. La N-bromosuccinimida es un reactivo que se usa a menudo para sustituir hidrógenos alílicos con bromo, y se cree que lo hace a través de un mecanismo de radicales libres. La preparación del producto intermedio 41 se describió esencialmente por M. K. Eberle y F. Nuninger en "Synthesis of the Main Metabolite (OL-17) of Cyclosporin A", *J. Org. Chem.*, Vol. 57, págs. 2689-2691 (1992).

El intermedio novedoso trifenilfosfoniobromuro de acetilciclosporina A 42 puede prepararse a partir de acetil- η -bromociclosporina A 41 calentando este último compuesto con trifenilfosfina en un disolvente tal como tolueno.

Se contemplan el producto intermedio 42 novedoso, y otros similares, como productos intermedios clave en la síntesis de una diversidad de análogos de la ciclosporina A que contienen un sistema dieno conjugado en el residuo del aminoácido 1. Por ejemplo, además de la trifenilfosfina, pueden hacerse reaccionar compuestos tales como triarilfosfinas, trialquilfosfinas, arilalquilfosfinas, y triarilarsinas con acetil- η -bromociclosporina A 41 para preparar otros compuestos activados similares al 42.

Haciendo referencia de nuevo a la figura 4, puede prepararse una mezcla de los isómeros (E) y (Z) de acetil-1,3-dieno 43 agitando el trifenilfosfoniobromuro de acetilciclosporina A 42 con un exceso de formaldehído en tolueno a temperatura ambiente. Tras la adición de formaldehído, se añade gota a gota una base tal como hidróxido de sodio, y se extrae la mezcla isomérica de dienos con acetato de etilo.

Varios libros de texto de química orgánica describen la reacción de Wittig. Una descripción en particular la proporciona J. McMurry, *Organic Chemistry*, 5ª ed. (Brooks/Cole, Pacific Grove, 2000), págs. 780-783. Puede usarse una reacción de Wittig para convertir una cetona o un aldehído en un alqueno. En un procedimiento así, puede hacerse reaccionar un iluro de fósforo, también denominado fosforano, con el aldehído o cetona para dar un producto intermedio dipolar denominado betaína. Normalmente, el producto intermedio de betaína no se aísla; más bien se descompone espontáneamente a través de un anillo de cuatro miembros para dar un alqueno y óxido de trifenilfosfina. El resultado neto es la sustitución del átomo de oxígeno del carbonilo por el grupo $R_2C=$ unido originariamente al fósforo.

Los expertos en la técnica apreciarán que puede sustituirse una amplia variedad de reactivos para los reactivos de la reacción de Wittig citados anteriormente a modo de ejemplo. Por ejemplo, pueden sustituirse varios compuestos alquilo, arilo, aldehído y cetona para el formaldehído para preparar un gran número de derivados de ciclosporina. Los solicitantes han llevado a cabo las síntesis anteriores con formaldehído, y en lugar de formaldehído, compuestos tales como acetaldehído, formaldehído deuterado, acetaldehído deuterado, 2-clorobenzaldehído, benzaldehído, y butiraldehído. Tales reacciones de Wittig pueden llevarse a cabo con compuestos distintos de derivados de trifenilfosfonio, tales como triarilfosfinas, trialquilfosfinas, arilalquilfosfinas y triarilarsinas. En lugar de usar hidróxido de sodio, pueden usarse muchas otras bases tales como carbonato de sodio, butil-litio, hexil-litio, amida de sodio, bases impedidas de litio tales como diisopropilamida de litio, y alcóxidos de metal alcalino. Además de variar estos reactivos, puede llevarse a cabo la reacción en diversos disolventes orgánicos o mezclas de disolventes orgánicos y agua, en presencia de diversas sales, particularmente haluros de litio, y a diversas temperaturas. Todos los factores enumerados anteriormente pueden seleccionarse razonablemente por un experto en la técnica para tener el efecto deseado sobre la estereoquímica del doble enlace formado; es decir, el efecto deseado sobre la razón del isómero cis con respecto al trans. En una realización de la presente invención, la reacción de Wittig se lleva a cabo en un disolvente seleccionado del grupo que consiste en tetrahidrofurano y tolueno, y en la que el disolvente se usa en presencia de un compuesto seleccionado del grupo comprendido por butil-litio, alcóxido inferior de sodio, alcóxido inferior de potasio, y carbonato de potasio a una temperatura de entre aproximadamente -80°C y 110°C. El óxido inferior de potasio puede ser un terc-butóxido de potasio. Además, el disolvente puede ser tetrahidrofurano usado en presencia de terc-butóxido de potasio a una temperatura de entre aproximadamente -70°C y -100°C.

En una etapa final de esta síntesis, el grupo protector en el carbono- β se elimina utilizando el procedimiento siguiente. Se disuelve la mezcla 43 de acetil-(E)-1,3-dieno y acetil-(Z)-1,3-dieno en metanol, y se añade entonces agua. Se añade una base tal como carbonato de potasio, y se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Pueden utilizarse otras bases a parte de carbonato de potasio que incluyen hidróxido de sodio, carbonato de sodio,

alcóxido de sodio y alcóxido de potasio. Se utiliza entonces acetato de etilo para extraer la mezcla 44 de producto final de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247.

Método 2

En una ruta de reacción alternativa para sintetizar una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247 por medio de una estrategia de reacción de Wittig, puede emplearse una ruta sintética de cuatro etapas tal como sigue: 1) protección del β -alcohol, tal como en el método 1, 2) oxidación de la acetilciclosporina A que se produce a partir de la primera etapa para producir un aldehído; 3) una reacción de Wittig; y 4) desacetilación del producto de reacción de Wittig, o equivalentemente, hidrólisis del éster de acetato para recuperar el alcohol. Esta secuencia de reacción se ilustra en la figura 5.

Esta ruta sintética empieza de una manera similar a la ruta de reacción de Wittig de la figura 4 en que la primera etapa protege el β -alcohol con un grupo éster de acetato. Las dos rutas se diferencian a partir de aquí, sin embargo, en que la siguiente etapa del método 2 convierte la acetilciclosporina A 35 en un aldehído, el aldehído 51 de acetilciclosporina A. Esta reacción utiliza un agente oxidante lo suficientemente fuerte para escindir un enlace C=C para producir dos fragmentos. La escisión del alqueno es conocida en la técnica. Ozono es quizás el reactivo de escisión de doble enlace más comúnmente utilizado, pero otros reactivos oxidantes tales como permanganato de potasio (KMnO₄) o tetróxido de osmio pueden provocar también una escisión de doble enlace.

La acetilciclosporina A puede convertirse en un aldehído con ozono como agente oxidante seguido de un tratamiento final con un agente reductor para formar aldehído de acetilciclosporina A. La etapa de ozonólisis se lleva a cabo en un intervalo de temperatura de desde aproximadamente -80°C hasta 0°C. El disolvente utilizado durante la ozonólisis puede ser un alcohol inferior tal como el metanol. El agente reductor puede ser una trialkilfosfina tal como tributilfosfina, una triarilfosfina, una trialkilamina tal como trietilamina, un alquilarilsulfuro, un tiosulfato o un dialquilsulfuro tal como dimetilsulfuro. Cuando se trabaja con tributilfosfina como agente reductor, la persona ordinaria experta en la técnica sabrá que la reacción se controla por dosificación.

El β -alcohol de ciclosporina A puede protegerse con un grupo trimetilsililo (TMS) y oxidarse con ozono como agente oxidante seguido de un tratamiento final con un agente reductor para formar aldehído de TMS ciclosporina A. La etapa de ozonólisis se lleva a cabo en un intervalo de temperatura de desde aproximadamente -80°C hasta 0°C. El disolvente utilizado durante la ozonólisis puede ser una mezcla de alcohol inferior y diclorometano. El agente reductor puede seleccionarse del grupo que consiste en trialkilfosfinas tal como tributilfosfina, triarilfosfinas, trialkilaminas tal como trietilamina, alquilarilsulfuros, tiosulfatos, o dialquilsulfuros tal como dimetilsulfuro. Cuando se trabaja con tributilfosfina como agente reductor, la persona ordinaria experta en la técnica sabrá que la reacción se controla por dosificación.

Adicionalmente, puede prepararse el aldehído de ciclosporina A mediante la protección del β -alcohol de ciclosporina A mediante la formación de acetilciclosporina A y entonces la conversión de acetilciclosporina A en epóxido de acetilciclosporina A con un monopersulfato, preferiblemente oxone, en presencia de una cetona, tal como acetoxiacetona o diacetoxiacetona. Esta etapa se realiza en un disolvente orgánico que es inerte en esas condiciones de reacción tales como acetonitrilo y agua. Se añade sal de disodio del ácido etilendiaminotetracético para capturar cualquier ión de metal pesado que pueda estar presente. La reacción de epoxidación se lleva a cabo preferiblemente a un pH superior a 7. Esta reacción de epoxidación se sigue por una escisión oxidativa del epóxido con ácido peryódico o sal de peryodato en condiciones ácidas. Opcionalmente, pueden combinarse la oxidación y la escisión oxidativa en un procedimiento de tratamiento final. Estas reacciones se han tratado por Dan Yang, *et al.*, en "A C₂ Symmetric Chiral Ketone for Catalytic Asymmetric Epoxidation of Unfunctionalized Olefins", *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 118, págs. 491-492 (1996), y "Novel Cyclic Ketones for Catalytic Oxidation Reactions", *J. Org. Chem.*, Vol. 63, págs. 9888-9894 (1998).

La utilización de agentes oxidantes a base de rutenio se ha tratado por H. J. Carlsen *et al.* en "A Greatly Improved Procedure for Ruthenium Tetroxide Catalyzed Oxidations of Organic Compounds", *J. Org. Chem.*, Vol. 46, n° 19, págs. 3736-3738 (1981). Carlsen *et al.* enseñan que, históricamente, el gasto de metal de rutenio proporcionaba un incentivo para el desarrollo de procedimientos catalíticos, el más popular de los cuales utilizaba peryodato o hipoclorito como oxidantes estequiométricos. Estos investigadores encontraron una pérdida de actividad catalítica durante el transcurso de la reacción con la utilización convencional de rutenio que ellos postularon debiéndose a la presencia de ácidos carboxílicos. Se encontró que la adición de nitrilos a la mezcla de reacción, especialmente acetonitrilo, potencia significativamente la velocidad y la extensión de la escisión oxidativa de alquenos en un sistema CCl₄/H₂O/OI₄⁻.

Puede producirse aldehído 51 de acetilciclosporina A a partir de acetilciclosporina A 35 disolviéndolo en una mezcla de acetonitrilo y agua, y entonces añadiendo primero peryodato de sodio y después cloruro de rutenio hidratado. El aldehído 51 puede extraerse con acetato de etilo. Debería observarse que la síntesis del aldehído 51 mediante esta estrategia de escisión oxidativa es importante para muchas rutas estereoselectivas que se discutirán posteriormente, y consecuentemente se remite al lector a esta sección.

Adicionalmente, puede prepararse el aldehído de ciclosporina A mediante la protección del β -alcohol de ciclosporina A mediante la formación de acetilciclosporina A y entonces la conversión de acetilciclosporina A en el epóxido de acetilciclosporina A con un monopersulfato, preferiblemente oxone, en presencia de una cetona, preferiblemente

una cetona activada, preferiblemente acetoxiacetona o diacetoxiacetona. Esta etapa se realiza en un disolvente orgánico que es inerte en esas condiciones de reacción tales como acetonitrilo y agua. Se añade sal de disodio de ácido etilendiaminotetracético para capturar cualquier ión de metal pesado que pueda estar presente. La reacción de epoxidación se lleva a cabo preferiblemente a un pH superior a 7. Esta reacción de epoxidación se sigue de una escisión oxidativa del epóxido con ácido peryódico o sal de peryodato en condiciones ácidas. Pueden combinarse la oxidación y la escisión oxidativa en un procedimiento de tratamiento final. Estas reacciones se han tratado por Dan Yang, *et al.*, en "A C₂ Symmetric Chiral Ketone for Catalytic Asymmetric Epoxidation of Unfunctionalized Olefins", *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 118, págs. 491-492 (1996), y "Novel Cyclic Ketones for Catalytic Oxidation Reactions", *J. Org. Chem.*, Vol. 63, págs. 9888-9894 (1998).

La tercera etapa del método 2 implica la conversión del aldehído 51 en una mezcla de (E) y (Z) dienos por medio de una reacción de Wittig, de un modo similar al del método 1. Tal como en el método 1, se añade un iluro de fósforo al aldehído para dar una betaína (que no se aísla), con el resultado neto que el átomo de oxígeno del carbonilo del aldehído se sustituye por el grupo R₂C= unido originalmente al fósforo. DE nuevo, la reacción de Wittig puede llevarse a cabo con otros compuestos que contienen fósforo distintos de los derivados de trifenilfosfonio, tales como triarilfosfinas, trialquilfosfinas, arilalquilfosfinas y triarilarsinas, a varias temperaturas, y utilizando una variedad de disoluciones y disolventes básicos o puede utilizarse la adición de varias sales inorgánicas para influenciar la estereoquímica del doble enlace recién formado.

Puede disolverse aldehído 51 de acetilciclosporina A en tolueno, al que se le añade una base tal como hidróxido de sodio en agua. Se añade entonces bromuro 52 de aliltrifenilfosfonio, y se agita la reacción durante algún tiempo. El tratamiento de la mezcla de producto de acetil (E) y (Z)-1,3-dienos 53 implica la extracción con hexano y/o acetato de etilo, en el que el término "tratamiento" pretende significar el proceso de extracción y/o aislamiento de los productos de reacción a partir de una mezcla de reactivos, productos, disolvente, etc.

En una etapa final del método 2, similar a la etapa final del método 1, se elimina el grupo éster de acetato que protege al alcohol en la posición del carbono-β con carbonato de potasio, dando una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247. Otras bases a parte del carbonato de potasio que pueden utilizarse para eliminar el grupo protector incluyen hidróxido de sodio, carbonato de sodio, alcóxido de sodio y alcóxido de potasio.

Síntesis de composiciones enriquecidas en isómeros tanto de (E) como (Z) de ISA_{TX}247 por medio de rutas organometálicas

Las rutas sintéticas estereoselectivas pueden emplear la utilización de reactivos inorgánicos que contienen elementos tales como silicio, boro, titanio, azufre, fósforo, y/o litio. Estas rutas pueden realizarse a través de un estado de transición de un anillo de seis miembros, en el que uno de los miembros del anillo es el elemento inorgánico de un reactivo organometálico. Efectos de obstáculos estéricos relacionados con el estado de transición pueden influenciar el desenlace estereoquímico de la reacción.

Dos esquemas estereoselectivos a modo de ejemplo se discutirán en la presente memoria descriptiva. En el primer esquema estereoselectivo (método 3, se muestra también como ruta 32 en la figura 3), se somete un compuesto que contiene silicio a una reacción de eliminación para producir el isómero tanto (E) como (Z), dependiendo de si la reacción de eliminación se lleva a cabo en condiciones ácidas o básicas. Este es un ejemplo de una olefinación de Peterson. En el segundo esquema estereoselectivo (método 4, se muestra también como ruta 33 en la figura 3), cada uno de los isómeros se produce a partir de un precursor diferente. El isómero (Z) se produce a partir de productos intermedios que contienen titanio y fósforo, mientras que el isómero (E) se produce a través de un producto intermedio que contiene litio.

Método 3

Esta ruta se realiza por medio del aldehído 51 de acetilciclosporina A.

Un esquema de reacción similar se ha tratado en general por D. J. S. Tsai y D. S. Matteson en "A Stereocontrolled Synthesis of (Z) and (E) Terminal Dienes from Pinacol (E)-1-Trimethylsilyl-1-Propene-3-Boronate", *Tetrahedron Letters*, Vol. 22, n° 29, págs. 2751-2752 (1981). Se ilustra el método en la figura 6. En general, la síntesis implica la preparación de un reactivo 62 de éster de trimetilsililalilboronato, y entonces el tratamiento del aldehído 51 de acetilciclosporina A con 62 para formar un alcohol 64 β-trimetilsilílico. Se cree que este alcohol se forma por medio de un estado 63 de transición que contiene boro. Como los ésteres de boronato son de reacción lenta en reacciones de alilboración, se apreciará por los expertos en la técnica que la utilización de un reactivo de borano de reacción más rápida tal como dietilborano de E-γ-trimetilsililo o 9-(E-γ-trimetilsililalil)-9-BBN tiene ventajas. El alcohol 64 β-trimetilsilílico puede entonces someterse a una olefinación de Peterson para preparar un alqueno, en este caso tanto el dieno 65 como el dieno 67.

La formación del alqueno sigue una de las dos rutas definidas, dependiendo de si la reacción de eliminación (la olefinación) se lleva a cabo en condiciones ácidas o básicas. En condiciones ácidas tiene lugar una *anti*-eliminación que forma el isómero (E), mientras que en condiciones básicas tiene lugar una *cis*-eliminación para formar el isómero (Z). Se apreciará por los expertos en la técnica que utilizando esta ruta sintética, cada isómero puede prepararse a partir del mismo precursor. El producto de cada reacción de eliminación comprende una composición enriquecida

en uno de los dos isómeros. Enriquecida puede significar, por ejemplo, que la composición contiene más de o igual que aproximadamente el 75 por ciento en peso de un isómero. Alternativamente, la composición enriquecida puede comprender el 80, el 85 y el 90 por ciento en peso de uno de los isómeros. La composición enriquecida en un isómero puede entonces combinarse en una razón predeterminada para llegar a la mezcla deseada tal como se ilustra en la figura 10.

Las reacciones en la figura 6 se discutirán ahora en detalle, empezando con la preparación del reactivo 62 que contiene boro. Una investigación general de la utilización de reactivos de silicio en la síntesis de reacciones de formación de enlace carbono-carbono se ha tratado por E. Ehlinger y P. Magnus en "Silicon in Synthesis. 10. The (Trimethylsilyl) allyl Anion: A β -Acyl Anion Equivalent for the Conversion of Aldehydes and Ketones into γ -Lactones", *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 102, n° 15, págs. 5004-5011 (1980). En particular, estos investigadores enseñan la reacción entre el anión (trimetilsilil)alilo y un aldehído. El anión puede prepararse mediante la desprotonación de aliltrimetilsilano con sec-butil-litio en tetrahidrofurano a -76°C que contiene un equivalente de tetrametiletilendiamina (TMEDA).

La desprotonación de aliltrimetilsilano (esta etapa no se muestra en la figura 6) se ha tratado por J. F. Biellmann y J. B. Ducep En "Allylic and Benzylic Carbanions Substituted by Heteroatoms", *Organic Reactions*, Vol. 27 (Wiley, Nueva York, 1982), pág. 9. Un protón alfa al heteroátomo en sistemas alílicos sustituidos puede eliminarse con un agente más básico. Una larga variedad de tales agentes están disponibles, siendo quizás n-butil-litio el más común. Se utiliza n-butil-litio en una cantidad estequiométrica con el compuesto que va a someterse a una metalación en disolución con tetrahidrofurano (THF). La temperatura se mantiene normalmente por debajo de 0°C (a menudo por debajo de -76°C) en la que el n-butil-litio tiene una baja reactividad debido a su naturaleza polimérica. La adición de un agente quelante tal como N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TMEDA) provoca que el polímero se disocie. Sin embargo, la reacción también puede realizarse a temperatura ambiente, incluso en ausencia de TMEDA.

Los alilsilanos se desprotonan fácilmente porque el anión que se genera no sólo se estabiliza a través de la conjugación del doble enlace adyacente, sino además mediante el grupo sililo contiguo. El anión puede reaccionar con electrófilos a través tanto de su carbono- α como su carbono- γ . El desenlace regio y estereoquímico de estas reacciones depende de varios factores, de los cuales uno de los más importantes es la identidad del contraión. Véase la discusión de alilsilanos por S. E. Thomas en *Organic Synthesis: The Roles of Boron and Silicon* (Oxford University Press, Nueva York, 1991), págs.84-87.

En este esquema de reacción, se somete entonces el alilsilano desprotonado a una captura electrofílica mediante trimetilborato para producir un producto intermedio, que, cuando reacciona con pinacol, da el compuesto 62 *trans*-(trimetilsilil)boronato. El boronato 62 puede llamarse también un "alilborano" (éster de alilboronato). Alternativamente, si se utiliza 9-metoxi-9-dialquilborano en la captura electrofílica conducirá un complejo boronato que puede desmetoxilarse utilizando un reactivo de trifluoruro de boro (tal como $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$) para generar el correspondiente 9-(γ -*trans*-trimetilsililalil)-9-dialquilborano.

La adición de un aldehído a un alilborano se ha tratado por S. E. Thomas en la referencia anterior en las páginas 34-35. La adición de un aldehído a un alilborano, en la que el último es sustituido asimétricamente en el extremo distal del doble enlace carbono-carbono (significando "distal" el más alejado del átomo de boro) produce un alcohol homoalílico que contiene dos centros quirales adyacentes. Los (E)-alilboranos dan origen al *treo*-diastereoisómero, mientras que los (Z)-alilboranos dan origen al *eritro*-diastereoisómero. Una reacción a modo de ejemplo de un (E)-alilborano 62 con aldehído 51 de ciclosporina A se muestra en la figura 6, en la que el producto 63 intermedio de boro se forma después de agitar los reactivos en una disolución de THF durante un periodo de varios días.

La referencia 69 numérica en el producto 63 intermedio de boro (figura 6) pretende indicar que cualquier número de estructuras son posibles en la posición de boro. Por ejemplo, si el reactivo 62 boronato es un éster de trialquilsililboronato, entonces la estructura en 69 comprendería un anillo de 5 miembros que incluye dos átomos de oxígeno. Sustituciones en los reactivos de boronato o borano que se emplean en 62 se presentarán en la estructura en 63.

Se ha postulado que la estereoselectividad que se alcanza en reacciones que implican alilboranos con aldehídos puede deberse al estado de transición tipo-silla del anillo de 6 miembros que se ejemplifica mediante el producto 63 intermedio de boro, y se representa en la figura 6. Sólo los dos átomos de carbonilo del aldehído (el carbono y el oxígeno que están unidos por doble enlace) se vuelven miembros de la transición del anillo de 6 miembros; el resto del aldehído se extiende fuera del anillo. Se postula que la parte CsA del aldehído que se extiende fuera del anillo de 6 miembros existe en una posición ecuatorial más que axial en relación al anillo porque la última configuración daría origen a un obstáculo estérico desfavorable entre ese sustituyente y un átomo de oxígeno del alilborano 62. Se apreciará también por los expertos en la técnica que la posición del grupo SiMe_3 del anión (trimetilsilil)alilo se muestra ocupando una posición ecuatorial en la figura 6 porque este ejemplo empezó con el diastereómero (E) del alilborano. Alternativamente, el grupo SiMe_3 podría haberse dibujado en una posición axial si el alilborano inicial hubiera sido el diastereómero (Z).

Alternativamente, se contempla preparar el alcohol *eritro*-silílico, para el que la eliminación de ácido daría el isómero *cis* y la eliminación de base daría isómero *trans*, de manera opuesta a las reacciones de eliminación tratadas anteriormente. Será obvio para los expertos en la técnica que se obtendrían los mismos productos al final de la síntesis.

El tratamiento del producto 63 de estado de transición trietanolamina, da el alcohol 64 β -trimetilsilílico. Por otra parte, el producto de la alilboración de borano de (trimetilsililalil)dialquilo da alcohol 64 silílico con oxidación utilizando NaOH/H₂O₂ o tratamiento final acuoso. El alcohol 64 que se describe en la figura 6 es el *treo*-diastereómero, ya que alilborano 63 del estado de transición estaba en la configuración (E), aunque se apreciará por los expertos en la técnica que el otro diastereómero podría haberse preparado también si se empezara a partir del reactivo *Z*-alilborano. La diastereoselectividad en el centro quiral recién creado no se determina en esta etapa debido a la eliminación de estos centros quirales en una etapa posterior de la síntesis. La estructura del alcohol 64 β -trimetilsilílico que se muestra en la figura 6 se ha confirmado por los solicitantes utilizando técnicas espectrales.

En un método de síntesis de alqueno conocido como una olefinación de Peterson, la eliminación del grupo trialquil-sililo y el grupo hidroxilo a partir del alcohol 64 β -trimetilsilílico conduce a un alqueno; en este caso un dieno, debido al doble enlace que ya está presente entre los dos carbonos terminales de la cadena. Una discusión de la conversión de β -hidroxisilanos a alquenos se ha presentado en la referencia S. E. Thomas en las páginas 68-69. Una discusión adicional de esta reacción se presenta por P. F. Hurdlik y D. Peterson en "Stereospecific Olefin-Forming Elimination Reactions of β -Hydroxysilanes", *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 97, n° 6, págs. 1464-1468 (1975).

En referencia a la figura 6, la reacción de eliminación que convierte el alcohol 64 en un dieno puede seguir una de dos rutas mecanísticas definidas dependiendo de si la reacción se lleva a cabo en condiciones ácidas o básicas. Una ruta conduce al dieno 65, mientras la otra ruta conduce al dieno 67. En condiciones ácidas tiene lugar la *anti*-eliminación, mientras en condiciones básicas tiene lugar la *sin*-eliminación. En otras palabras, las reacciones de eliminación de β -hidroxisilanos son estereoespecíficas, y las reacciones promovidas por ácidos o bases toman el curso estereoquímico opuesto. Ácidos típicos para la reacción promovida por ácidos pueden incluir ácido acético, ácido sulfúrico y varios ácidos de Lewis; bases típicas incluyen hidruro de sodio e hidruro de potasio o *tert*-butóxido de potasio. Puede ser el caso que las reacciones de eliminación que utilizan hidruro de sodio en THF son lentas a temperatura ambiente, mientras que las reacciones de eliminación que utilizan hidruro de potasio tienen lugar más rápidamente.

La estereoespecificidad tiene lugar en esta etapa de la ruta de reacción porque la eliminación en condiciones ácidas requiere que los grupos trimetilsililo e hidroxilo estén en una relación antiperiplanar. Por el contrario, la eliminación en condiciones básicas requiere que los grupos trimetilsililo e hidroxilo adopten una relación sinperiplanar. La última condición facilita la formación de un enlace silicio-oxígeno fuerte y un anillo de 4 miembros intermedio, que se rompe de manera análoga a la etapa final de una reacción de Wittig. Se apreciará por los expertos en la técnica que un enlace silicio-oxígeno fuerte reemplaza a un enlace silicio-carbono más débil, que anula el reemplazamiento de un enlace carbono-oxígeno fuerte con un enlace Π carbono-carbono más débil.

Por tanto los productos de la eliminación estereoespecífica de un β -hidroxialquilsilano son el compuesto 67 acetil-(E)-1,3-dieno y el compuesto 65 acetil-(Z)-1,3-dieno. Tal como en los métodos anteriores, el grupo protector puede ahora eliminarse de cada uno de esos dienos mediante el tratamiento con K₂CO₃ en metanol y agua. Esto elimina el grupo acetato enlazado al carbono- β del residuo aminoácido 1, devolviendo el grupo funcional en ese el carbono a un alcohol. Otras bases a parte de carbonato de potasio que pueden utilizarse para desplazar el grupo protector incluyen hidróxido de sodio, carbonato de sodio, alcóxido de sodio y alcóxido de potasio.

En esta etapa de la preparación la síntesis está sustancialmente completa. Las composiciones enriquecidas en uno u otro de los isómeros pueden mezclarse para conseguir la razón deseada de isómeros en la mezcla. Por "enriquecida" se quiere decir un producto que comprende al menos aproximadamente el 75 por ciento en peso de ese isómero; en otras palabras, el producto puede contener hasta un 25 por ciento en peso del isómero "no deseado". La mezcla se diseña para conseguir el resultado farmacológico deseado.

Método 4

Esta ruta además se realiza por medio del aldehído 51 de acetilciclosporina A.

Un esquema alternativo para producir isómeros estereoselectivos se ilustra en las figuras 7-8. Esta ruta sintética se diferencia de aquellas anteriormente tratadas, en que 1) la ruta sintética para producir el isómero (E) de ISA_{TX}247 se realiza a través de productos intermedios diferentes que aquellos para el isómero (Z), y 2) estas rutas sintéticas pueden utilizar productos intermedios y/o reactivos que contienen titanio y litio.

Los reactivos de titanio se conocen por ser particularmente útiles en síntesis orgánica porque son regio y estereoselectivos en sus reacciones con aldehídos y cetonas. La naturaleza general del titanio en la química estereoselectiva se ha tratado por M. T. Reetz en *Organotitanium Reagents in Organic Synthesis* (Springer-Verlag, Berlín, 1986), págs. VII, 148-149, y 164-165. Se expone aquí que la naturaleza del ligando de titanio puede variarse tal que la identidad electrónica y estérica del reactivo puede manipularse, y el desenlace estereoquímico de muchas reacciones que forman enlaces C-C puede predecirse. Según esta química, la unión de dos centros proquirales de moléculas aquirales crea dos centros de quiralidad. Una regla general que gobierna el desenlace estereoselectivo es que los enolatos de configuración (Z) o compuestos de metal crotilo forman preferentemente *sin*-aductos, mientras que los reactivos de configuración (E) favorecen los *anti*-diastereómeros. La tendencia puede explicarse otra vez asumiendo un estado de transición cíclico de 6 miembros que tiene una geometría de silla.

Un ejemplo específico de este tipo de síntesis estereoselectiva se ha tratado por Y. Ikeda *et al.* en “Stereoselective Synthesis of (Z)-and(E)-1,3-Alkadienes from Aldehydes Using Organotitanium and Lithium Reagents”, *Tetrahedron*, Vol. 43, nº 4, págs. 723-730 (1987). Esta referencia describe que puede utilizarse alildifenilfosfina para producir un reactivo [3-(difenilfosfino)alil]titanio, que a su vez puede condensarse con un aldehído seguido de una formación de sal de fosfonio para dar un (Z)-1,3-alcadieno de una manera altamente regio y estereoselectiva. Por el contrario, un óxido de alildifenilfosfina puede condensarse con un aldehído para dar un (E)-1,3-alcadieno directamente, de nuevo con la estereoselectividad deseada.

En referencia a la figura 7, la síntesis del isómero (Z) de ISA_{TX}247 se realiza (tal como en el esquema anterior) mediante la generación del aldehído 51 de acetilciclosporina A a partir de ciclosporina A 34. El reactivo [3-(difenilfosfino)alil]titanio 72 se prepara mediante la desprotonación de alildifenilfosfina 71 con una base fuerte tal como *t*-BuLi, y entonces la reacción del producto con tetraisopropóxido de titanio. Se propone teóricamente un estado 73 de transición que conduce al aducto 74 eritro- α , que puede entonces convertirse en la sal 75 de β -oxidofosfonio mediante el tratamiento de 74 con yodometano (MeI). Se postula que la existencia del estado 73 de transición es al menos en parte responsable de la estereoselectividad de esta ruta sintética.

De acuerdo con los métodos a modo de ejemplo explicados resumidamente en la presente memoria descriptiva, el sitio del metal del reactivo organometálico puede ser la entidad que controla la regioselectividad (Ikeda, pág. 725). Esto significa que el aldehído 51 en la figura 7 reacciona con el compuesto 72 difenilfosfino en su posición α para dar el correspondiente aducto 74 α , ya que el carbono- γ del grupo difenilfosfino se coordina al metal, que en este caso es titanio. La selectividad Z observada del producto dieno se explica considerando el estado 73 de transición de 6 miembros. Ya que tanto la cadena lateral voluminosa de la ciclosporina A del aldehído 35 como el grupo difenilfosfino se postulan para ocupar las posiciones ecuatoriales en el estado de transición, el aducto 74 eritro- α se forma selectivamente, dando origen al (Z)-1,3-dieno 76.

En contraste con la ruta de reacción descrita en la figura 7, en la que el isómero (Z) de ISA_{TX}247 se produce por medio de un estado de transición de titanio, el isómero (E) no se produce tan fácilmente por este método. De hecho, se ha notificado que los intentos para sintetizar el isómero (E) por este método generalmente dan resultados con bajos rendimientos. En lugar de esto, tal como se muestra en la figura 8, el derivado 82 de litio puede hacerse reaccionar con el aldehído 51 para producir el estado 83 de transición que contiene litio, que forma el 1,3-dieno en razones E/Z en un intervalo mayor que aproximadamente 75:25. Tal como en la figura 7, la alta estereoselectividad del producto de reacción es posible debido al estado 83 de transición, en el que el grupo vinilo del reactivo 82 de litio y la cadena lateral de la ciclosporina A del aldehído 51 se postulan para ocupar las posiciones ecuatoriales, produciendo mediante esto el (E)-1,3-dieno 84 de manera estereoselectiva. Tal como se trató anteriormente, pueden evitarse ciertas reacciones laterales indeseadas que implican al grupo protector acetato en todas las síntesis estereoselectivas a través de la utilización de grupos protectores tales como ésteres de benzoato o éteres de sililo.

Preparación de mezclas

Tal como se expuso anteriormente, se encontró que ciertas mezclas de *cis*- y *trans*-isómeros de ISA_{TX}247 exhiben una combinación de potencia aumentada y/o toxicidad reducida sobre las ciclosporinas de origen natural y conocidas actualmente.

Según las realizaciones de la presente invención, se sintetizan isómeros de ISA_{TX}247 (y los derivados de los mismos) por rutas estereoselectivas que pueden variar en su grado de estereoselectividad. Las rutas estereoselectivas pueden producir un primer material o composición enriquecida en el isómero (E), y un segundo material o composición enriquecida en el isómero (Z), y estos materiales pueden entonces combinarse de tal modo que la mezcla resultante tiene una razón deseada de los dos isómeros. Alternativamente, se contempla que el primer material puede prepararse mediante la separación de un producto de reacción para aislar y enriquecer el isómero (E), y el segundo material puede prepararse mediante la separación de un producto de reacción para aislar y enriquecer el isómero (Z). En todavía otra realización, las condiciones de reacción de una ruta estereoselectiva pueden adaptarse para producir la razón deseada directamente en una mezcla preparada.

Estos principios se ilustran en las figuras 9A-C y 10. En las figuras 9A-C, se muestran tres reacciones sintéticas hipotéticas que producen razones del isómero (E) con respecto al isómero (Z) de aproximadamente el 65 con respecto al 35 por ciento en peso, del 50 con respecto al 50 por ciento en peso, y del 35 con respecto al 65 por ciento en peso, respectivamente. Desde luego, estas razones son a modo de ejemplo y solamente para propósitos ilustrativos, y podría haberse elegido cualquier conjunto hipotético de números. Será obvio para los expertos en la técnica que las condiciones de reacción utilizadas para producir la razón en la figura 9A pueden ser diferentes de aquellas de las figuras 9B y 9C con el fin de conseguir una razón diferente de isómeros en la mezcla de producto. Las condiciones para cada reacción se han adaptado para producir una razón particular de los dos isómeros para este caso.

En contraste con algunas rutas sintéticas, en las que se produce una mezcla de isómeros, pueden prepararse en primer lugar los isómeros individualmente, y entonces mezclarse en proporciones predeterminadas para conseguir la razón deseada. Este concepto se ilustra en la figura 10, en la que el producto de una ruta estereoselectiva se enriquece en uno de los isómeros de tal modo que el producto comprende más de aproximadamente el 75 por ciento en peso del isómero (E), y el producto de la otra ruta estereoselectiva se enriquece en el otro isómero de tal modo que este producto comprende más de aproximadamente el 75 por ciento en peso del isómero (Z). Estos números son tan bien

a modo de ejemplo, y la pureza del isómero deseado que resulta a partir de una ruta estereoselectiva puede ser mayor que o igual a aproximadamente el 75 por ciento en peso en una realización. Un isómero deseado puede comprender más de o igual que aproximadamente el 80, el 85, el 90, y el 95 por ciento en peso, respectivamente.

Después de sintetizar individualmente los isómeros, pueden mezclarse para conseguir la razón deseada, tal como se ilustra en la figura 10. Para fines ilustrativos, se eligen las mismas razones hipotéticas en la figura 10 que aquellas utilizadas en las figuras 9A-C. En referencia a la figura 10, se mezclan los isómeros (E) y (Z) para dar tres mezclas diferentes que comprenden razones del isómero (E) con respecto al isómero (Z) de aproximadamente el 65 con respecto al 35 por ciento en peso, del 50 con respecto al 50 por ciento en peso, y del 35 con respecto al 65 por ciento en peso, respectivamente.

Puede separarse una mezcla de los isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247 de tal modo que la mezcla se enriquece en un isómero con respecto al otro. Por ejemplo, puede utilizarse una reacción de Diels-Alder para convertir el isómero *cis* en un compuesto de anillo cerrado haciéndolo reaccionar con un alqueno. Si el alqueno está unido a un sustrato que es capaz de aislarse (por ejemplo, filtrable), puede eliminarse sustancialmente el isómero *cis* de la mezcla, dejando una composición enriquecida en el isómero *trans*. Puede reconstituirse el isómero *cis* a partir del compuesto de anillo cerrado con la aplicación de calor, lo que produce una composición enriquecida en el isómero *cis*. Por tanto, de esta manera, pueden separarse los isómeros *cis* y *trans*.

En la práctica, la razón de los isómeros (E) con respecto a los (Z) en cualquier mezcla, independientemente del grado de estereoselectividad del método por el que se produce, puede tomar un intervalo amplio de valores. Por ejemplo, la mezcla puede comprender desde aproximadamente el 10 hasta el 90 por ciento del isómero (E) con respecto a aproximadamente desde el 90 hasta el 10 por ciento del isómero (Z). Por ejemplo, la mezcla puede contener desde aproximadamente el 15 hasta el 85 por ciento en peso del isómero (E) y aproximadamente desde el 85 hasta el 15 por ciento del isómero (Z); o aproximadamente desde el 25 hasta el 75 por ciento en peso del isómero (E) y aproximadamente desde el 75 hasta el 25 por ciento en peso del isómero (Z); o aproximadamente desde el 35 hasta el 65 por ciento en peso del isómero (E) y aproximadamente desde el 65 hasta el 35 por ciento en peso del isómero (Z); o aproximadamente desde el 45 hasta el 55 por ciento en peso del isómero (E) y aproximadamente desde el 55 hasta el 45 por ciento en peso del isómero (Z). La mezcla isomérica puede ser una mezcla de ISA_{TX}247 que comprende aproximadamente desde el 45 hasta el 50 por ciento en peso del isómero (E) y aproximadamente desde el 50 hasta el 55 por ciento en peso del isómero (Z). Estos porcentajes en peso se basan en el peso total de la composición, y se entenderá que la suma de los porcentajes en peso del isómero (E) y el isómero (Z) es un 100 por cien en peso. En otras palabras, una mezcla puede contener el 65 por ciento en peso del isómero (E) y el 35 por ciento en peso del isómero (Z), o viceversa.

El porcentaje de un isómero u otro en una mezcla puede verificarse utilizando resonancia magnética nuclear (RMN), u otras técnicas bien conocidas en la técnica.

Composiciones farmacéuticas

Esta invención es de interés en el tratamiento de pacientes que necesitan inmunosupresión que implica la administración de composiciones farmacéuticas que comprenden la mezcla según la invención como los constituyentes activos. Las indicaciones para las cuales es de interés esta combinación incluyen en particular estados autoinmunitarios e inflamatorios y estados asociadas con o debido a rechazo de transplante, por ejemplo, tratamiento (que incluye la mejora, reducción, eliminación o cura de la etiología o los síntomas) o prevención (que incluye la restricción sustancial o completa, profilaxis o evitación) de los siguientes:

- a) Rechazo de transplante de órgano o tejido agudo, por ejemplo, tratamiento de los receptores de por ejemplo, trasplantes de corazón, pulmón, corazón-pulmón combinado, hígado, riñón, páncreas, piel, intestino grueso, o córnea, especialmente prevención y/o tratamiento de rechazo mediado por células T, así como enfermedad de injerto-contra-huésped, tal como el siguiente transplante de médula ósea.
- b) Rechazo crónico de un órgano transplantado, en particular, prevención de enfermedad del vaso de injerto, por ejemplo, caracterizado por estenosis de las arterias del injerto como resultado de un espesamiento intimo debido a la proliferación de células de músculo liso y efectos asociados.
- c) Rechazo del xenoinjerto, que incluye el rechazo agudo, hiperagudo o crónico de un órgano que tiene lugar cuando el donante del órgano es de una especie diferente al receptor, más especialmente rechazo mediado por células B o rechazo mediado por anticuerpos.
- d) Enfermedad autoinmunitaria y estados inflamatorios, en particular estados inflamatorios con una etiología que incluye un componente inmunológico o autoinmunitario tal como artritis (por ejemplo artritis reumatoide, artritis crónica progresiva y artritis deformante) y otras enfermedades reumáticas. Enfermedades autoinmunitarias específicas para las que la combinación sinérgica según la invención puede emplearse incluye, trastornos hematológicos autoinmunitarios (que incluye por ejemplo anemia hemolítica, anemia aplásica, anemia de glóbulos rojos puros y trombocitopenia idiopática), lupus eritematoso sistémico, policondritis, esclerodoma, granulomatosis de Wegener, dermatomiositis, hepatitis activa crónica, miastenia grave (enfermedad de Goldflam), psoriasis, síndrome de Steven Jonson, mala absorción intestinal primaria

idiopática, enfermedad inflamatoria del intestino grueso (autoinmunitaria) (que incluye por ejemplo colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), oftalmopatía endocrina, enfermedad de Graves-Basedow, sarcoidosis, esclerosis múltiple, cirrosis biliar primaria, diabetes juvenil (diabetes mellitus tipo I), uveitis (anterior y posterior), queratoconjuntivitis seca y queratoconjuntivitis primaveral, fibrosis de pulmón intersticial, artritis psoriática, glomerulonefritis, (con o sin síndrome nefrótico, por ejemplo que incluye síndrome nefrótico idiopático o nefropatía de cambio mínimo) y dermatomiositis juvenil. Los estados autoinmunitarios e inflamatorios de la piel también se considera que pueden utilizarse para el tratamiento y prevención utilizando la combinación sinérgica según la invención, por ejemplo, psoriasis, dermatitis por contacto, dermatitis atópica, alopecia areata, eritema multiforme, dermatitis herpetiforme, esclerodermatitis, vitíligo, angéftis por hipersensibilidad, urticaria, penfigoide ampollar, lupus eritematoso, pénfigo, epidermólisis ampollar adquirida, y otros estados inflamatorios o alérgicos de la piel, como son estados inflamatorios de los pulmones y vías respiratorias que incluye asma, alergias, y pneumoconiosis.

Las mezclas de análogos isoméricos de esta invención pueden administrarse puras o con un excipiente farmacéutico a un animal de sangre caliente que necesita los mismos. El excipiente farmacéutico puede ser sólido o líquido. La mezcla según la invención puede administrarse por vía oral, tópica, parenteral, por spray de inhalación o por vía rectal en formulaciones de unidades de posología que contienen vehículos, adyuvantes y excipientes aceptables farmacéuticamente no tóxicos convencionales. El término parenteral, tal como se usa en el presente documento, incluye inyecciones subcutáneas, técnicas de inyección o infusión intravenosas, intramusculares, intraesternales.

Las composiciones farmacéuticas que contienen la mezcla según la invención puede estar preferiblemente en una forma adecuada para su uso oral, por ejemplo, como comprimidos, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas o aceitosas, gránulos o polvos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, o siropes o elixires. Las composiciones para el uso oral pueden prepararse según los procedimientos conocidos en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes preservativos con el fin de suministrar una preparación agradable y elegante farmacéuticamente. Los comprimidos que contienen el principio activo en mezcla con excipientes aceptables farmacéuticamente no tóxicos pueden fabricarse también mediante procedimientos conocidos. Los excipientes que se utilizan pueden ser por ejemplo, (1) diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; (2) agentes granulantes y desintegrantes tales como almidón de maíz, o ácido algínico; (3) agentes aglutinantes tales como almidón, gelatina o acacia, y (4) agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden no estar cubiertos o pueden cubrirse mediante técnicas conocidas para retrasar la desintegración y absorción en el tracto intestinal y así proporcionar una acción sostenida a lo largo de un período más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de tiempo retardado tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. También pueden cubrirse mediante las técnicas descritas en las patentes de EE.UU. números 4.256.108; 4.160.452; y 4.265.874 para formar comprimidos terapéuticos osmóticos para su liberación controlada.

En algunos casos, las formulaciones para uso oral pueden estar en forma de cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolina. Pueden estar también en forma de cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo se mezcla con agua o un medio de aceite, por ejemplo aceite de cacahuete, parafina líquida, o aceite de oliva.

Normalmente las suspensiones acuosas contienen los materiales activos en adición con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes pueden incluir: (1) agentes de suspensión tales como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto, y goma de acacia; o (2) agentes dispersantes o humectantes que pueden ser fosfátidos de origen natural tales como lecitina, un producto de condensación de un óxido de alqueno con un ácido graso, por ejemplo, estearato de polioxietileno, un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenoxietanol, un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol tal como monooleato de polioxietilensorbitol, o un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol anhídrido, por ejemplo monooleato de polioxietilensorbitano.

Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoato etilo o n-propilo; uno o más agentes colorantes; uno o más agentes saborizantes; uno o más agentes edulcorantes tales como sacarosa, aspartamo o sacarina.

Puede formularse una suspensión aceitosa mediante la suspensión del principio activo en una aceite vegetal, por ejemplo aceite de arachis, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, un aceite de pescado que contiene ácido graso omega 3, o un aceite mineral tal como la parafina líquida. Las suspensiones aceitosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Agentes edulcorantes y saborizantes pueden añadirse para proporcionar una preparación oral sabrosa. Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

Los polvos y gránulos dispersables son adecuados para la preparación de una suspensión acuosa. Proporcionan el principio activo en una mezcla con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados se dan a modo de ejemplo por

ES 2 266 564 T3

los ya mencionados anteriormente. También puede estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo, los agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes descritos anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas que contienen la mezcla de la invención también pueden estar en la forma de emulsiones de aceite en agua. La fase aceitosa puede ser un aceite vegetal tal como el aceite de oliva o aceite de arachis, o un aceite mineral tal como la parafina líquida o mezcla de los mismos. Agentes emulsionantes adecuados pueden ser (1) gomas de origen natural tal como la goma de acacia y la goma tragacanto, (2) fosfátidos de origen natural tal como semilla de soja y lecitina, (3) ésteres o éster parcial 30 derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitano, (4) productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitano. La emulsión puede además contener agentes edulcorantes y saborizantes.

Pueden formularse siropes y elixires con agentes edulcorantes, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sorbitol, aspartamo o sacarosa. Tales formulaciones también pueden contener un demulcente, un conservante y saborizante y agentes colorantes.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse según métodos conocidos utilizando los agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse, están agua, disolución de Ringer y disolución de cloruro de sodio isotónica. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos estériles como disolventes o medios de suspensión. Para este propósito puede emplearse cualquier aceite fijo suave incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, ácidos grasos tales como ácido oleico encuentran uso en la preparación de composiciones inyectables.

La mezcla de la invención también puede administrarse en forma de supositorios para la administración por vía rectal del fármaco. Estas composiciones pueden prepararse mediante el mezclado del fármaco con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperaturas ordinarias pero líquido a la temperatura rectal y se fundirá por tanto en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales son mantequilla de cacao y polietilenglicoles.

Para uso tópico, se emplean cremas, ungüentos, gelatinas, disoluciones o suspensiones, etc., que contienen las ciclosporinas descritas.

Preferiblemente, se utiliza una disolución líquida que contiene un tensioactivo, etanol, un disolvente lipófilo y/o anfífilo como principio no activo. Específicamente, se utiliza una fórmula de emulsión múltiple oral que contiene la mezcla de análogos isomérica y los siguientes componentes no medicinales: succinato de d-alfa-tocoferil-polietilenglicol 1000 (vitamina E TPGS), aceite de triglicéridos de cadena media (MCT), Tween 40, y etanol. También puede usarse preferiblemente como disolución oral una cápsula de gelatina blanda (que comprende gelatina, glicerina, agua y sorbitol) que contiene la mezcla de análogos isomérica y los mismos componentes no medicinales.

Los niveles de dosis del orden de desde aproximadamente 0,05 g hasta aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal por día son útiles en el tratamiento de los estados indicados anteriormente. El nivel de dosis y el programa de administración pueden variar dependiendo de la mezcla isomérica particular utilizada, la enfermedad que va a tratarse, y factores adicionales tales como la edad y el estado del sujeto. Las dosis preferidas son de desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 10 mg/kg/día y desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 10 mg/kg/día. En una realización preferida, se administran por vía oral desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 6 mg/kg/día dos veces al día. En una realización particularmente preferida, se administran por vía oral de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3 mg/kg/día dos veces al día.

La cantidad de principio activo que puede combinarse con los materiales vehículo para producir una forma de dosis única variará dependiendo del huésped tratado y del modo particular de administración. Por ejemplo, una formulación prevista para la administración por vía oral para seres humanos puede contener desde 2,5 mg hasta 2,5 g de principio activo compuesto con una cantidad conveniente y apropiada de material vehículo que puede variar desde aproximadamente el 5 hasta aproximadamente el 95 por ciento de la composición total. Las formas farmacéuticas unitarias contendrán generalmente entre desde aproximadamente 5 mg hasta aproximadamente 500 mg de principio activo. En una realización preferida, se emplean cápsulas individuales que contienen aproximadamente 50 mg de mezcla isomérica para la administración por vía oral. En otra realización preferida, se usan disoluciones orales que contienen aproximadamente 50 mg/ml de mezcla isomérica para la administración por vía oral.

Sin embargo, se entenderá que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores que incluyen la actividad de compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, vía de administración, tasa de excreción, combinación de fármaco y la naturaleza y gravedad de la enfermedad o estado particular que se somete a terapia.

Metodología

El uso de derivados de ciclosporina, una clase de polipéptidos cíclicos producidos por el hongo *Tolipocladium inflatum* Gams, esta aumentando en la terapia inmunosupresora debido a sus efectos preferenciales sobre reacciones mediadas por células-T. Se han observado derivados de ciclosporina para inhibir reversiblemente linfocitos inmunocompetentes, particularmente linfocitos-T, así como para inhibir la producción y liberación de linfoquina. Esta acción está mediada principalmente a través de la inhibición inducida por ciclosporina A de la calcineurina, una encima fosfatasa que se encuentra en el citoplasma de las células (Schreiber y Crabtree, 1992). Un indicador de la eficacia de la ciclosporina A o derivados de ciclosporina A es su capacidad para inhibir la actividad fosfatasa de la calcineurina. Los ensayos de inhibición de la calcineurina miden la actividad del fármaco en su sitio de acción, y, como tal, es la evaluación *in vitro* más exacta y directa de la potencia de los análogos de ciclosporina A (Fuman *et al.*, 1992).

ISA_{TX}247 es un análogo de la ciclosporina A que es similar a la ciclosporina A, excepto por una modificación novedosa de un grupo funcional en el residuo del aminoácido 1 de la molécula. Se ha encontrado que ISA_{TX}247 muestra una potencia hasta tres veces mayor que ciclosporina A en el ensayo de inhibición de la calcineurina *in vitro*.

Estudios farmacodinámicos (*in vivo* e *in vitro*) han demostrado que ISA_{TX}247 tiene más potencia que otros compuestos de ciclosporina existentes. La eficacia de mezclas isoméricas de análogos de ciclosporina que oscilan desde aproximadamente 10:90 hasta aproximadamente 90:10 (trans con respecto a cis), en particular ISA_{TX}247 que tiene un 50-55% de isómero Z y un 45-50% de isómero E, como agente inmunosupresor (frente a la ciclosporina A) se ha demostrado en un ensayo de actividad de calcineurina *in vitro*, un modelo de trasplante de corazón de rata, un modelo de ratón con alotrasplante con células de islote pancreático, un modelo de artritis inducida por colágeno en el ratón, y/o un modelo de artritis inducida por antígeno en el conejo. Los datos muestran que esas mezclas isoméricas son equivalentes a, o mas potentes que, la ciclosporina A, y por tanto útiles para el tratamiento de trastornos inmunorregulatorios.

Hay numerosos efectos adversos asociados con la terapia con ciclosporina A, incluyendo nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, cataratogénesis, hirsutismo, parestesia, e hiperplasia gingival por nombrar unos pocos (Sketris *et al.*, 1995). De estos, la nefrotoxicidad es uno de los efectos adversos más graves relacionados a la dosificación que resultan de la administración de ciclosporina A. No se conoce el mecanismo exacto mediante el cual la ciclosporina A provoca lesiones renales. Sin embargo, se propone que un aumento en los niveles de sustancias vasoconstrictoras en el riñón conduce a una vasoconstricción local de las arteriolas glomerulares aferentes. Esto puede dar como resultado isquemia, un descenso en la tasa de filtración glomerular, y a largo plazo, fibrosis intersticial.

Se ha evaluado la seguridad no clínica de ISA_{TX}247 en una variedad de especies animales. Estudios de toxicidad oral con dosificación repetida en ratas, perros, y primates mostraron que se toleraba bien el ISA_{TX}247 y que producía efectos que eran consistentes con la inmunosupresión. El único efecto toxicológico observado en todas las especies fue diarrea/heces sueltas.

ISA_{TX}247 no muestra actividad mutagénica tal como se demuestra en los ensayos *in vitro* de mutación inversa bacteriana y de aberración cromosómica, y en un ensayo *in vivo* del micronúcleo de rata. No se han completado estudios de carcinogenicidad hasta la fecha. Se han completado estudios de toxicidad reproductiva con ISA_{TX}247 en conejos y ratas encintas. No hubo alteraciones ni malformaciones relacionadas con el tratamiento. Para dosis que dieron como resultado toxicidad maternal, se observó la embriotoxicidad correspondiente.

Ejemplos

Ejemplo 1

50 Acetilación de ciclosporina A

Se añadió anhídrido acético (140 mililitros) a ciclosporina A (50,0 gramos, 41,6 milimoles) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N₂ hasta que se hubo disuelto toda la ciclosporina A. Se añadió dimetilaminopiridina (7,62 g, 62,4 mmoles) y se agitó la reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N₂ durante 3 horas o hasta que la reacción fue completa. Se enfrió la mezcla de reacción hasta 5°C y entonces se filtró. Se lavaron los sólidos recogidos con hexano para retirar el anhídrido acético adicional. Se transfirió lentamente el sólido pastoso resultante a una disolución de bicarbonato de sodio acuosa al 5% agitada vigorosamente (1,5 litros). Se agitó la suspensión resultante hasta que se obtuvo una suspensión acuosa espesa fina y hubo cesado la evolución de CO₂. Se recogieron los sólidos mediante filtración y se lavaron con agua hasta que el filtrado tuvo un pH neutro. Se secó el producto sólido en un horno a vacío durante la noche (55°C) para dar 44,0 g (85%) del producto como un sólido incoloro.

Ejemplo 2

65 Oxidación del producto del ejemplo 1

Se añadieron acetonitrilo (320 ml) y agua (80 ml) a la acetilciclosporina A (42,97 g, 34,54 mmoles) y se agitó la mezcla hasta que se disolvió todo el material. Se añadió peryodato de sodio (14,77 g, 69,08 mmoles), seguido de

ES 2 266 564 T3

la adición de cloruro de rutenio hidratado (0,358 g, 1,73 mmoles) y entonces se agitó la reacción durante 3 horas a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N₂. Se añadió agua (300 ml) y se transfirió la mezcla a un embudo de decantación. Se extrajo la mezcla dos veces con acetato de etilo (300 ml y luego 250 ml). Se combinaron los extractos de acetato de etilo negros oscuros y se lavaron con 250 ml de agua seguido de 250 ml de salmuera. Entonces se secó la disolución orgánica sobre MgSO₄ y se evaporó el disolvente para dar un sólido negro verdoso. Se cromatografió sobre gel de sílice el producto bruto utilizando 40% de acetona/60% de hexano como eluyente para dar el producto (29,1 g, 68%) como un sólido incoloro.

Ejemplo 3

Preparación de acetil-ISA_{TX}247

i) Generación in situ de iluros

Se añadió aldehído de acetilciclosporina A (31,84 g, 25,84 mmoles) a 340 ml de tolueno y se agitó la mezcla hasta que se disolvió completamente el material. A la disolución resultante se le añadieron 340 ml de hidróxido de sodio acuoso 1 normal. Se agitó la mezcla resultante vigorosamente y entonces se añadió bromuro de aliltrifenilfosfonio (58,22 g, 151,90 mmoles). Se agitó la reacción durante 24 horas a temperatura ambiente y entonces se añadió bromuro de aliltrifenilfosfonio adicional (16,64 g, 43,42 mmoles) y continuó la agitación durante 24 horas adicionales. Se transfirió la mezcla a un embudo de decantación y se separó la fase de tolueno. Se extrajo la fase acuosa con 200 ml adicionales de tolueno. Se combinaron los dos extractos de tolueno y se lavaron secuencialmente con 200 ml de agua desionizada y 200 ml de disolución de cloruro de sodio acuosa saturada. Se secó la disolución sobre MgSO₄, se filtró, y se evaporó el tolueno para dar un gel muy viscoso. Se trató este material con 142 ml de acetato de etilo y se agitó hasta que se formó una suspensión acuosa espesa fina. Se añadió hexano (570 ml) lentamente con agitación rápida. Se continuó con la agitación durante 30 minutos y entonces se filtró la suspensión resultante y se lavaron los sólidos recogidos con 160 ml de hexano/acetato de etilo 5:1. Se concentró el filtrado combinado en un rotavapor para dar un semisólido viscoso. Se trató este material con 75 ml de acetato de etilo y se agitó hasta que se obtuvo una suspensión acuosa espesa fina. Se añadió hexano (225 ml) lentamente con agitación rápida. Se continuó con la agitación durante 30 minutos y entonces se filtró la suspensión resultante y se lavaron los sólidos recogidos con 100 ml de hexano/acetato de etilo 5:1. Se concentró el filtrado en un rotavapor para dar un sólido amarillo pálido. Se cromatografió sobre gel de sílice el producto bruto utilizando 40% de acetona/60% de hexano como eluyente para dar el producto (14,09 g) como un sólido incoloro.

ii) Generación de iluros formados previamente y reacción en presencia de LiBr

A una suspensión agitada de bromuro de aliltrifenilfosfonio (7,67 g, 20 mmoles) en THF (20 ml) que se estaba enfriando hasta 0°C, se le añadió una disolución de KOBut en tetrahidrofurano (20 ml, 20 mmoles, disolución 1 M). Se continuó con la agitación a esta temperatura durante 30 minutos y se añadió una disolución de LiBr en THF (10 ml, 10 mmoles, disolución 1 M). Entonces se agitó la mezcla de reacción durante 30 minutos y se añadió una disolución de aldehído de acetil-CsA (4,93g, 4 mmoles) en THF (10 ml) a través de una cánula. Tras agitar durante 15 minutos a temperatura ambiente, se extinguió la mezcla de reacción con una disolución de NH₄Cl saturada (25 ml). Un tratamiento final y una cromatografía tal como anteriormente proporcionaron ISA_{TX}247 acetilado como un sólido incoloro (3,5 g).

Ejemplo 4

Preparación de ISA_{TX}247

Se disolvió acetil-ISA_{TX}247 (14,6 g, 11,62 mmoles) en 340 ml de metanol y después se añadieron 135 ml de agua desionizada. Se añadió carbonato de potasio (13,36 g, 96,66 mmoles) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante de 24 a 48 horas hasta que se completó la reacción. Se evaporó la mayoría del metanol y entonces se añadieron 250 ml de acetato de etilo con agitación. Se añadió lentamente una disolución de ácido cítrico acuosa al 10% (120 ml) y entonces se separó la fase de acetato de etilo. Se extrajo la fase acuosa con una parte adicional de 200 ml de acetato de etilo. Se lavaron los extractos de acetato de etilo combinados secuencialmente con 150 ml de agua desionizada, 100 ml de disolución de ácido cítrico acuosa al 10% y 150 ml de cloruro de sodio acuoso saturado y entonces se secaron sobre MgSO₄. Se evaporó el acetato de etilo para dar un sólido amarillo pálido. Se cromatografió sobre gel de sílice el producto bruto utilizando 40% de acetona/60% de hexano como eluyente para dar ISA_{TX}247 (10,51 g, 75%) como un sólido incoloro. El ISA_{TX}247 contiene el 45-50% de isómero E y el 50-55% de isómero Z.

Se caracterizaron los productos en los ejemplos 1-4 mediante espectrometría de masas y/o espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

Ejemplo 5

Preparación de acetil- η -bromociclosporina A

Se preparó acetilciclosporina A (41,8 g, 33,3 mmoles) tal como en el ejemplo 1, se disolvieron N-bromosuccinimida (10,39 g, 58,4 mmoles) y azo-bis-isobutironitrilo (1,09 g, 6,67 mmoles) en 250 ml de tetracloruro de carbono y

se calentó la mezcla resultante hasta reflujo durante 2,5 horas. Se enfrió la mezcla y se evaporó el disolvente. Se trató el residuo con 350 ml de dietil éter y se filtró para eliminar el material insoluble. Se lavó el filtrado secuencialmente con 150 ml de agua y 150 ml de salmuera, entonces se secó sobre sulfato de magnesio y se evaporó el disolvente. Se cromatografió sobre gel de sílice el material bruto con acetona/hexano (2:3) para dar 28,57 g (65%) de acetil- γ -bromociclosporina A como un sólido amarillo.

Ejemplo 6

Preparación de bromuro de trifenilfosfonio de acetilciclosporina A

Se disolvieron acetil- γ -bromociclosporina A (28,55 g, 21,6 mmoles) y trifenilfosfina (7,55 g, 28,8 mmoles) en 210 ml de tolueno y se calentó la disolución resultante hasta 100°C durante 21 horas. Se enfrió la disolución y se evaporó el tolueno. Se trató el semisólido aceitoso resultante con 250 ml de hexano/éter (1:4), se mezcló a conciencia y se eliminó el disolvente por decantación. Se repitió este procedimiento 3 veces más con 150 ml de éter. Entonces se disolvió el residuo en 50 ml de acetato de etilo y se precipitó con 220 ml de hexano. Entonces se recogió el sólido resultante mediante filtración para dar 22,5 g (66%) de bromuro de trifenilfosfonio de acetilciclosporina A como un sólido de color tostado.

Ejemplo 7

Reacción de Wittig

Se agitaron rápidamente el bromuro de trifenilfosfonio de acetilciclosporina (100 mg, 0,06 mmoles), un exceso de formaldehído al 37% (0,25 ml) y tolueno (2 ml) a temperatura ambiente. Se añadió gota o gota hidróxido de sodio acuoso como una disolución 1 N (2 ml) y se continuó la agitación durante 3,5 horas. Se diluyó la mezcla de reacción con acetato de etilo (20 ml) y agua (10 ml). Se separó la fase de acetato de etilo, se lavó secuencialmente con agua (10 ml) y salmuera (10 ml), se secó sobre sulfato de magnesio y se evaporó el disolvente. Se cromatografió sobre gel de sílice el material bruto con acetona/hexano (2:3) para dar 70 mg (88%) de una mezcla de isómeros (E) y (Z) de acetil-ISA_{TX}247 como un sólido incoloro.

Ejemplo 8

Desacetilación del producto de la reacción de Wittig

Se disolvió la mezcla de isómeros del ejemplo 7 (70 mg, 0,056 mmoles) en metanol (5 ml) y entonces se añadió agua (1 ml). Se añadió carbonato de potasio (75 mg) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 19 horas. Se evaporó la mayoría del metanol y se añadieron 15 ml de acetato de etilo al residuo seguido de 10 ml de ácido cítrico acuoso al 10%. Se separó la fase de acetato de etilo y se extrajo la fase acuosa con 10 ml adicionales de acetato de etilo. Se lavaron secuencialmente los extractos de acetato de etilo combinados con 10 ml de agua, 10 ml de ácido cítrico acuoso al 10% y 10 ml de salmuera antes de secarlos sobre sulfato de magnesio y de evaporar el disolvente. Se cromatografió sobre gel de sílice el material bruto con acetona/hexano (2:3) para dar 37 mg (54%) de ISA_{TX}247 como un sólido incoloro que contiene aproximadamente el 85% de isómero E y aproximadamente el 15% de isómero Z.

Se caracterizaron los productos en los ejemplos 5-8 mediante espectrometría de masas y/o espectrometría de resonancia magnética nuclear.

Ejemplo 9

Preparación de los isómeros geométricos de ISA_{TX}247

Pueden sintetizarse independientemente los isómeros *cis* y *trans* de ISA_{TX}247 utilizando el esquema de reacción siguiente. La secuencia supone la metalación conocida de aliltrimetilsilano, la captura electrófila por un trimetilborato, seguido de la hidrólisis y entonces la transesterificación para generar el éster intermedio de boronato de *trans*-(trimetilsilil)alilo. La alilboración de aldehído de ciclosporina proporcionó un producto intermedio de boro, que se convierte en el alcohol β -trimetilsilílico deseado, mediante secuestro. La diastereoselectividad en la creación de nuevos centros quirales no se determina en esta etapa debido a la eliminación de estos centros en una etapa posterior. Debe observarse que la estereoquímica relativa de los dos centros en el alcohol β -trimetilsilílico es *anti* de acuerdo con las expectativas y es debido al doble enlace *trans* en el precursor boronato de *trans*-(trimetilsililo).

La eliminación promovida por bases (Hudrick *et al.*, 1975) de alcohol β -trimetilsilílico proporcionó una composición enriquecida en acetil-(Z)-1,3-dieno mientras que la eliminación promovida por ácidos dio una composición enriquecida en acetil-(E)-1,3-dieno. La desprotección conduce a los alcoholes de dieno respectivos, los isómeros (Z) y (E) de ISA_{TX}247, respectivamente.

Un enfoque alternativo a los dienos utiliza los alilfosforanos. La metalación de alildifenilfosfina y después la transmetalación con Ti(OPrⁱ)₄ da el producto intermedio de titanio. La aliltitanación seguida de una eliminación esteo-específica generaría una composición enriquecida en el dieno (Z).

Por otro lado, cuando se somete el óxido de alildifenilfosfina a una secuencia similar (figura 8), se genera predominantemente el isómero E (75%).

i) *Alilboración de acetil-CsA-CHO*

Se preparó el 1-propen-3-boronato (E)-1-trimetilsililo según los métodos notificados previamente (Ikeda *et al.*, 1987). Se le añadió aldehído de acetilciclosporina A (1,026 g, 0,832 mmoles) a una disolución agitada de 1-propen-3-borato (E)-1-trimetilsililo (0,2 g, 0,832 mmoles) con nitrógeno. Se monitorizó la mezcla de reacción mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (columna C-8, fase inversa) y se agitó durante un periodo total de 7 días. Entonces se añadió trietanolamina (0,196 g, 1,3 mmoles) y se continuó con la agitación durante un periodo adicional de 4 días. Se obtuvo el alcohol β -trimetilsilílico mediante purificación sobre columna de gel de sílice. MS(ES) m/Z 1.368,9 (M + Na⁺).

A una suspensión de KH (3,5 mg, 26,4 μ moles, dispersión de aceite mineral al 30% lavada con hexanos anhidros) en THF anhidro (1 ml) se le añadió alcohol β -trimetilsilílico (10 mg, 7,4 micromoles) y se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Se diluyó la mezcla de reacción con dietil éter (10 ml) y entonces se lavó con una disolución de NaHCO₃ saturada (2 x 5 ml). El secado (Na₂SO₄) y la eliminación del disolvente proporcionaron el (Z)-acetil-1,3-dieno enriquecido. MS(ES) m/Z 1.294,8 (M + K⁺).

ii) *Alilitanación de acetil-CsA-CHO*

A una disolución agitada y enfriada (-78°C) de alildifenilfosfina (0,54 g, 2,4 mmoles) en THF anhidro (8 ml) se le añadió t-BuLi (1,42 ml, 2,4 mmoles, disolución 1,7 M, en pentano). Se agitó la disolución de color rojo ladrillo durante 15 min a esta temperatura y después a 0°C durante 30 min. Entonces se enfrió de nuevo hasta -78°C y se le añadió Ti(OPrⁱ)₄ (0,71 ml, 2,4 mmoles). Se agitó la disolución de color marrón a esta temperatura durante 15 minutos y entonces se añadió una disolución de acetil-CsA-CHO (2,5 g, 2 mmoles) en THF (10 ml) a través de una cánula. Se agitó la disolución de color amarillo pálido durante un periodo adicional de 30 minutos y entonces se calentó hasta temperatura ambiente durante la noche. A la mezcla de reacción se le añadió MeI (0,15 ml, 2,4 mmoles) a 0°C. Se continuó con la agitación durante 1 h a esta temperatura y después a temperatura ambiente durante 2 h. Se vertió la mezcla de reacción sobre HCl al 1% (100 ml) helado. Se extrajo la fase acuosa con EtOAc (3 x 50 ml). Se lavó el extracto orgánico combinado con agua (2 x 25 ml) y salmuera (25 ml). La eliminación del disolvente dio un sólido amarillo el cual se cromatografió sobre una columna de gel de sílice. La elución con una mezcla de acetona - hexanos 1:3 proporcionó el isómero enriquecido en (Z) de acetil-ISA_{TX}247. La desprotección tal como en el ejemplo 4 dio el isómero enriquecido en (Z) de ISA_{TX}247 (razón Z/E, 75:25).

Ejemplo 10

Preparación de una mezcla enriquecida en (E) de isómeros de ISA_{TX}247

A una disolución de óxido de alildifenilfosfina (1 mmol) y hexametilfosforamida (2 mmoles) en tetrahidrofurano (5 ml) a -78°C se le añadió n-butil-litio (1 mmol, en hexanos). Se agitó la mezcla a -78°C durante 30 minutos. Se añadió una disolución de aldehído de acetilciclosporina A (0,8 mmoles) en tetrahidrofurano (7 ml) y se permitió que la mezcla de reacción se calentara gradualmente hasta temperatura ambiente y entonces se agitó durante 18 horas. Se vertió la mezcla sobre ácido clorhídrico 1 N (50 ml) helado y entonces se extrajo en acetato de etilo. Se lavó el extracto orgánico con agua, se secó sobre sulfato de magnesio y se evaporó el disolvente. Se cromatografió sobre gel de sílice el residuo utilizando 25% de acetona/75% de hexanos como eluyente para dar una mezcla de los isómeros (E) y (Z) del acetil-ISA_{TX}247. La eliminación del grupo protector de acetato tal como se describió en el ejemplo 4 dio una mezcla enriquecida en (E) de los isómeros de ISA_{TX}247. La espectroscopía RMN de protones indicó que la mezcla estaba compuesta por el 75% del isómero (E) y del 25% del (Z) de ISA_{TX}247. También se llevó a cabo esta reacción según la modificación de Schlosser (R. Liu, M. Schlosser, *Synlett*, 1996, 1195). A una disolución agitada y enfriada (-78°C) de óxido de alildifenilfosfina (1,21 g, 5 mmoles) en THF (20 ml) se le añadió n-BuLi (2 ml, 5 mmoles, disolución 2,5 M, en hexanos). Se agitó la disolución de color rojo durante 40 minutos a -78°C. Entonces se añadió una disolución de acetil-CsA-CHO (1,25 g, 1,02 mmoles) en THF (12 ml) a través de una cánula durante 15 minutos. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Un tratamiento final y una cromatografía tal como anteriormente dieron acetil-ISA_{TX}247 (razón Z:E, 40:60 mediante análisis de ¹H RMN).

Ejemplo 11

Preparación de ciclosporina A protegida con benzoílo

Se disolvieron ciclosporina A (6,01 g, 5 mmoles) y 4-dimetilaminopiridina (305 mg, 2,5 mmoles) en piridina (5 ml). Se añadió anhídrido benzoico (3,4 g, 15 mmoles) y se agitó la mezcla durante 19 horas a 50°C. Se añadieron anhídrido benzoico adicional (1,7 g, 7,5 mmoles) y DMAP (305 mg, 2,5 mmoles) y se continuó con la agitación a 50°C durante otras 24 horas. Se añadió anhídrido benzoico (0,85 mg, 3,8 mmoles) y se agitó la reacción durante 23 horas adicionales. Entonces se vertió lentamente la mezcla de reacción sobre agua con agitación. Se eliminó por filtración el benzoato de ciclosporina A precipitado y se lavó con agua. Se disolvió la torta recogida en un volumen mínimo de metanol y se añadió a una disolución de ácido cítrico al 10% y se agitó durante 1 hora. Se recogió el

producto precipitado mediante filtración y se lavó con agua hasta que el pH del filtrado alcanzó el del agua. Se secó el benzoato de ciclosporina A sólido a 50°C a vacío para dar un sólido incoloro.

Ejemplo 12

Preparación de ciclosporina A protegida con trietilsilil éter

Se disolvió ciclosporina A (3,606 g, 3 mmoles) en piridina anhidra (8 ml) y entonces se añadió DMAP (122 mg, 1 mmol). Se enfrió la mezcla de reacción hasta 0°C y entonces se añadió gota a gota trifluorometanosulfonato de trietilsililo (3,6 mmoles). Se permitió que la mezcla se calentara hasta temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Entonces se vertió lentamente la mezcla de reacción sobre agua con agitación. Se eliminó por filtración el trietilsilil éter precipitado y se lavó con agua. Se disolvió la torta recogida en un volumen mínimo de metanol y se añadió a una disolución de ácido cítrico al 5% y se agitó durante 30 minutos. Se recogió el producto precipitado mediante filtración y se lavó con agua hasta que el pH del filtrado alcanzó el del agua. Se secó el trietilsilil éter sólido a 50°C a vacío para dar un sólido incoloro. También se introdujeron grupos protectores de triisopropilsililo y *tert*-butildimetilsililo siguiendo un procedimiento análogo.

Ejemplo 13

Actividad inmunosupresora utilizando el ensayo de inhibición de la calcineurina

Un indicador de la eficacia de la ciclosporina A o de un derivado de la ciclosporina A es su capacidad para inhibir la actividad fosfatasa de la calcineurina. El ensayo de inhibición de la calcineurina mide la actividad del fármaco en su sitio de acción y como tal es la evaluación directa *in vitro* de la potencia de los análogos de la ciclosporina A (Fruman *et al.*, 1992).

Se ha evaluado la actividad inmunosupresora de ISA_{TX}247 (el 45-50% de isómero (E) y el 50-55% de isómero (Z)) frente a la ciclosporina A utilizando el ensayo de inhibición de la calcineurina (CN). Los resultados de este ensayo muestran que la inhibición de la actividad fosfatasa de la calcineurina mediante ISA_{TX}247 (el 45-50% de isómero Z y el 50-55% de isómero E) era hasta 3 veces más potente (tal como se determinó mediante CI₅₀) en comparación con la ciclosporina A (figura 11).

Se ha evaluado la actividad inmunosupresora de varias mezclas de análogos isoméricos deuterados y no deuterados frente a la ciclosporina A utilizando el ensayo de inhibición de la calcineurina (CN). La estructura y la composición isomérica de estos análogos se exponen en la figura 12. En la figura 12, la designación "I4" corresponde a la estructura de ISA_{TX}247. I4-M2 indica ISA_{TX}247 producido mediante el método descrito en los ejemplos 5-8 (denominado método 2 en esta figura). I4-D4 indica ISA_{TX}247 de deuterado producido mediante el método descrito en los ejemplos 1-4. I4-D2 indica ISA_{TX}247 deuterado producido mediante el método descrito en los ejemplos 5-8. Se muestran otras mezclas isoméricas en la figura.

Los resultados de este ensayo muestran que la inhibición de la actividad fosfatasa de la calcineurina mediante estas mezclas de análogos isoméricos era al menos tan potente (tal como se determinó mediante CI₅₀) en comparación con la ciclosporina A (figura 13). CsA indica ciclosporina A; isociclo4 indica ISA_{TX}247 producido mediante el método descrito en los ejemplos 1-4. Isociclo5 corresponde a I5-M1 de la figura 12. Isociclo4-d4 corresponde a I4-D4 de la figura 12. Isociclo5-d5 corresponde a I5-D5 de la figura 12. Isociclo4-d2 corresponde a I4-D2 de la figura 12. Isociclo4-M2 corresponde a I4-M2 de la figura 12. Isociclo5-m2 corresponde a I5-M5 de la figura 12.

Ejemplo 14

Actividad inmunosupresora utilizando el modelo de trasplante de corazón de rata

Se evaluó la eficacia de ISA_{TX}247 (el 45-50% de isómero E y el 50-55% de isómero Z) para prevenir el rechazo de corazones trasplantados entre diferentes variedades de ratas y se comparó con la de la ciclosporina A. El modelo de trasplante de corazón de rata ha sido el modelo utilizado con más frecuencia para evaluar la potencia *in vivo* de nuevos fármacos inmunosupresores, ya que una supervivencia prolongada del injerto es difícil de conseguir en este modelo debido al rechazo inmunológico.

El procedimiento supuso el trasplante heterotópico (a la aorta abdominal y a la vena cava inferior) del corazón de ratas Wistar Furth a ratas Lewis. Se administraron inyecciones intraperitoneales o bien de ciclosporina A o bien de una mezcla de análogos isoméricos al receptor del trasplante comenzando 3 días antes del trasplante y continuando durante 30 días después del trasplante. Si se observó una disfunción del injerto durante el periodo de 30 días después del trasplante, se sacrificó el animal. Si el animal sobrevivió más de 30 días después del trasplante, se interrumpieron los artículos de prueba y de control y se permitió al animal que continuara hasta una disfunción del injerto o hasta 100 días después del trasplante.

En la tabla 1 se resumen las tasas de supervivencia promedio para cada grupo de animales receptores. Estos resultados muestran que ISA_{TX}247 (el 45-50% de isómero E y el 50-55% de isómero Z) a una dosis óptima de 1,75 mg/kg/día aumentó el tiempo de supervivencia en aproximadamente 3 veces con respecto a la ciclosporina A. Varios

de los animales que recibían ISA_{TX}247 todavía tenían injertos en funcionamiento 100 días después del trasplante (70 días después de la interrupción de la dosificación). Estos datos demuestran la actividad inmunosupresora de esta mezcla de análogos isoméricos para prevenir el rechazo de un injerto.

TABLA 1

Efecto de ISA_{TX}247 y ciclosporina A administrados mediante administración intraperitoneal sobre los tiempos de supervivencia promedio de corazones de rata trasplantados [promediados a partir de dos estudios separados, n 13]

Dosis (mg/kilogramo/día)	Tiempo de supervivencia promedio (días después de la operación) Media \pm MEB (microscopia electrónico de barrido)		
	Vehículo control	Ciclosporina A	ISA _{TX} 247
0	9 \pm 1		
0,5		13 ^a \pm 4	11 ^a \pm 2
1,75		18 ^b \pm 7	57 ^b \pm 32
3		50 ^c \pm 8	55 ^c \pm 12

^{a,c} No significativamente diferente

^b Significativamente diferente ($p < 0,01$)

También se evaluó la eficacia de diversas mezclas de análogos isoméricos deuterados y no deuterados (estructuras dadas en la figura 12) para prevenir el rechazo de corazones trasplantados entre diferentes variedades de ratas y se comparó con la de la ciclosporina A. Las dosis fueron de 1,75 mg/kg/día durante 30 días. Se resumen los resultados en la tabla 2. Estos resultados muestran que las mezclas isoméricas a 1,75 mg/kg/día aumentaron el tiempo de supervivencia al menos tanto como la ciclosporina A y demuestran la actividad inmunosupresora de estas mezclas de análogos isoméricos para prevenir el rechazo de un injerto.

TABLA 2

Efecto de varias mezclas de análogos isoméricos y ciclosporina A administradas mediante administración intraperitoneal a 1,75 mg/kg/día sobre los tiempos de supervivencia promedio de corazones de rata trasplantados

Compuesto de prueba	Tiempo de supervivencia promedio (días después de la operación)
Vehículo control	9
Ciclosporina A	20
I5-M1	20
I4-M2	20+
I4-D2	30

Ejemplo 15

Actividad inmunosupresora en el alotrasplante de células de islote pancreático

Se investigó la capacidad de ISA_{TX}247 (el 45-50% de isómero E y el 50-55% de isómero Z) frente a ciclosporina A para prolongar la supervivencia de las células de islote pancreático trasplantadas en un modelo de ratón en un estudio que suponía el trasplante de 500 islotes de un ratón CBA/J a la cápsula renal de ratones receptores Balb/c diabéticos.

Tras el trasplante, se administró ISA_{TX}247 o ciclosporina A mediante inyección intraperitoneal (i.p.) a un nivel de dosificación de 0 (vehículo), 1,75, 10, 20, o 25 mg/kg/día durante un total de 30 días. Se monitorizó la glucemia diariamente hasta el momento en el que falló el injerto, tal como se define mediante un nivel de glucosa superior a 17 mmol/l en dos días consecutivos.

Los resultados indican que ISA_{TX}247 aumentó la duración de la supervivencia del injerto en un 40% con una dosis de 20 mg/kg/día (tabla 3). También se observó que ISA_{TX}247 era menos tóxico que la ciclosporina A según aumentaron los niveles de dosificación. Esto era especialmente evidente en el nivel de dosificación de 25 mg/kg/día.

ES 2 266 564 T3

TABLA 3

La supervivencia de aloinjertos de islote de ratón en ratones diabéticos que reciben o bien ISA_{TX}247 o bien ciclosporina A mediante inyección intraperitoneal a un nivel de dosificación de 1,75, 10, 20, o 25 mg/kg/día

Dosis (mg/kg/día)	Tratamiento	N	Supervivencia mediana	Supervivencia media
0	Vehículo	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	Vehículo	12	16	15,9
20	CsA	9	19	20,2
20	ISA	9	> 28	> 28
0	Vehículo	5	21	21,1
25	CsA	10	NR*	NR*
25	ISA	8	50	46,4

* 7 de los 10 animales en este grupo murieron por toxicidad de la CsA. Por tanto, sólo 3 animales completaron en este grupo y no se realizaron estadísticas.

Ejemplo 16

Actividad inmunosupresora en artritis

A lo largo del transcurso de las últimas tres décadas, se han estudiado exhaustivamente tres modelos animales de artritis reumatoide humana y se han empleado ampliamente en la selección y el desarrollo preclínicos de agentes antirreumáticos novedosos. Estos incluyen los modelos de artritis inducida por adyuvante, inducida por colágeno, e inducida por antígeno. Se diseñaron los estudios siguientes para evaluar la eficacia antiinflamatoria de ISA_{TX}247 (el 45-50% de isómero E y el 50-55% de isómero Z) tanto en el modelo de artritis inducida por colágeno en el ratón como en el modelo de artritis inducida por antígeno en el conejo. La histopatología y la inmunopatología observadas en estos dos modelos se parecen a los descubrimientos en la enfermedad humana. En ambos modelos, se estudió la eficacia de ISA_{TX}247 para prevenir la aparición de la artritis (protocolo de prevención) y para tratar la artritis (protocolo de tratamiento). Estos estudios confirman la acción inmunosupresora de las mezclas de análogos isoméricos reivindicadas.

A. Artritis inducida por colágeno

Se inmunizaron ratones DBA/1 Lac J macho, mantenidos en condiciones libres de anticuerpos del virus, por vía subcutánea a las de 8 a 10 semanas de edad con 100 microgramos de colágeno de tipo II de pollo, emulsificado en adyuvante completo de Freund. Se administraron ISA_{TX}247, ciclosporina A, o vehículo (Cremophor EL/etanol 72:28, volumen/volumen) diariamente mediante inyección intraperitoneal (i.p.) de diluciones de 1 a 50 veces de fármaco concentrado (0,25, 0,5, o 1 mg/ml) en solución salina para dar concentraciones de 0 (vehículo); 125, 250, o 500 µg/ratón para ISA_{TX}247; y 250, o 500 µg/ratón para ciclosporina A. A los animales asignados al protocolo de prevención (12/grupo) se les administraron dosis comenzando el día de la inmunización con colágeno (día 0) hasta el sacrificio el día 40. A los animales asignados al protocolo de tratamiento (12/grupo) se les administraron dosis comenzando el día de la aparición de la enfermedad (~ día 28) hasta el sacrificio el día 38.

Los parámetros evaluados incluyeron la mortalidad, creatinina en suero, histología, y evaluaciones de desenlace, tales como puntuación clínica (visual), hinchazón de las patas traseras, puntuación histológica, puntuación de la erosión, e inmunohistoquímica.

Se realizó la puntuación de la erosión a ciegas examinando las secciones sagitales de la articulación interfalángica proximal (IFP) del dígito medio para determinar la presencia o ausencia de erosiones (definidas como defectos delimitados en un cartílago o hueso relleno con tejido inflamatorio). Este enfoque permitió las comparaciones de la misma articulación. Estudios previos han demostrado erosiones en > 90% de animales artríticos sin tratar en esta articulación.

Los resultados indican que las puntuaciones de erosión negativa en el grupo de tratamiento de dosis elevada con ISA_{TX}247 (500 µg/ratón) eran significativamente mayores que las puntuaciones de erosión negativa en el grupo de tratamiento con vehículo (p < 0,05). Tanto el grupo de tratamiento de ISA_{TX}247 con dosis media (250 µg/ratón) como

el de tratamiento de ciclosporina A de dosis elevada (500 $\mu\text{g/ratón}$) tenían puntuaciones de erosión negativa mayores en comparación con el grupo de tratamiento con vehículo ($p < 0,1$). Además, los grupos de tratamiento con ISA_{TX}247 de dosis baja (125 $\mu\text{g/ratón}$) y el de control de ciclosporina A de dosis media (250 $\mu\text{g/ratón}$) tienen, aunque no de manera estadísticamente significativa, puntuaciones de erosión negativa mayores cuando se comparan con el grupo de control de vehículo.

El único tratamiento para prevenir significativamente el desarrollo de erosiones de las articulaciones fue con ISA_{TX}247 a 500 $\mu\text{g/ratón}$. Esta reducción significativa en la proporción de las articulaciones IFP que muestran cambios en la erosión en los ratones tratados con ISA_{TX}247 con respecto a los ratones del grupo de control de vehículo demuestra que ISA_{TX}247 tiene propiedades que modifican la enfermedad.

B. Artritis inducida por antígeno

Se inmunizaron conejos blancos de Nueva Zelanda, mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos, con 10 mg de ovoalbúmina en solución salina emulsificada con adyuvante completo de Freund que se administró por vía intramuscular y subcutánea en varios sitios en la parte de la nuca del cuello. Catorce días más tarde, todos los animales comenzaron a recibir 2 inyecciones intraarticulares diarias de 5 mg de ovoalbúmina y 65 ng del factor de crecimiento 2 transformante recombinante humano en solución salina.

Se administraron ISA_{TX}247, ciclosporina A, o vehículo (Cremophor EL/etanol 72:28, v/v) diariamente mediante inyección subcutánea de diluciones de 1 a 4 veces del fármaco concentrado (en vehículo) en solución salina para dar concentraciones de 0 (vehículo); 2,5; 5,0, o 10 mg/kg/día para ISA_{TX}247; y 5,0, 10, o 15 mg/kg/día para ciclosporina A. A los animales asignados al protocolo de prevención (8/grupo) se les administraron dosis comenzando el día de la inmunización con ovoalbúmina (día 0) hasta el sacrificio el día 42. A los animales asignados al protocolo de tratamiento (8/grupo) se les administraron dosis comenzando el día de la aparición de la enfermedad (~ día 28) hasta el sacrificio el día 42.

Los parámetros evaluados incluyeron mortalidad, peso corporal, creatinina en suero, histología, y evaluaciones de desenlace tales como hinchazón de la articulación de la rodilla, recuentos del fluido sinovial, análisis post mortem general, e histología.

Se observó un descenso significativo en las puntuaciones histopatológicas sinoviales en animales con ISA_{TX}247 (P 0,05) y ciclosporina A (P 0,05) tras 28 días de terapia (protocolo de prevención) en comparación con los animales control con vehículo. Esto iba acompañado de reducciones significativas en los recuentos de fluido sinovial (ISA_{TX}247, P 0,05; ciclosporina A, P 0,05). También resultó evidente una mejora significativa en las puntuaciones histopatológicas sinoviales de los animales con artritis establecida tras 14 días de tratamiento con ISA_{TX}247 (P 0,05) y ciclosporina A (P 0,05) en comparación con los controles con vehículo (protocolo de tratamiento). Resultó evidente una reducción significativa en las puntuaciones de artritis macroscópica en los animales tratados con ISA_{TX}247 (P = 0,01), pero no con ciclosporina A. Se toleró bien el tratamiento sin una toxicidad significativa tras el análisis de la creatinina en suero o histología post mortem.

Los datos muestran que ISA_{TX}247 es equivalente o potencialmente más potente que la ciclosporina A en el tratamiento y prevención de artritis reumatoide en un modelo de artritis inducida por antígeno en el conejo.

Ejemplo 17

Propiedades farmacocinéticas y toxicocinéticas

Se probaron los parámetros farmacocinéticos y toxicocinéticos de ISA_{TX}247 (el 45-50% de isómero E y el 50-55% de isómero Z) y ciclosporina A en un modelo de conejo. También se ha utilizado el conejo como modelo para estudiar la nefrotoxicidad de la ciclosporina A, pero con mucha menos frecuencia que la rata. Los estudios han descubierto que la ciclosporina A administrada al conejo provoca cambios estructurales y funcionales con una dosis no sólo inferior que la que se ha notificado previamente en otros modelos animales, sino también dentro de al menos el nivel superior del intervalo terapéutico en humanos (Thliveris *et al.*, 1991, 1994). También, el descubrimiento de fibrosis intersticial y arteriopatía, además de los cambios citológicos en los túbulos, sugiere que el conejo es un modelo más apropiado para estudiar la nefrotoxicidad, puesto que estas unidades estructurales son distintivos de la nefrotoxicidad observada en humanos. Se administró ISA_{TX}247 por vía intravenosa (i.v.) durante los primeros 7 días y por vía subcutánea (s.c.) durante 23 días adicionales según el esquema siguiente.

ES 2 266 564 T3

TABLA 4

El esquema de administración de dosis para la investigación de las propiedades farmacocinéticas y toxicocinéticas de ISA_{TX}247 en el modelo de conejo

Grupo de tratamiento	Días 1-7: dosis i.v. (mg/kg)	Días 8-30: dosis s.c. (mg/kg)	Número de animales	
			Machos	Hembras
1. Control con vehículo	0	0	4	4
2. Control con ciclosporina A	10	10	6	6
3. Dosis baja	5	5	0	2
4. Dosis media	10	10	4	4
5. Dosis elevada	15	15	4	4

Se utilizaron conejos libres de patógenos (CLP) para garantizar que cualquier cambio renal observado se debía al efecto de ISA_{TX}247 y no se debía a patógenos. Se recogieron muestras de sangre los días 1 y 7, antes de la administración del fármaco y a las 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 18 y 24 h posteriores a la dosis para generar un perfil farmacocinético. Otros parámetros evaluados incluyeron observaciones clínicas, peso corporal, consumo de alimento, hematología, bioquímica clínica, patología general, y examen histopatológico de los tejidos/órganos seleccionados.

Se analizaron las muestras de sangre por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada con espectrometría de masas (LCMS). La tabla 5 a continuación resume los parámetros farmacocinéticos promedio en los conejos que recibieron 10 mg/kg de ciclosporina A o ISA_{TX}247.

TABLA 5

Parámetros farmacocinéticos de ciclosporina A y ISA_{TX}247 administrados por vía intravenosa en conejos macho que reciben 10 mg/kg/día. Resultados expresados como media \pm DE

Parámetro medido	Ciclosporina A		ISA _{TX} 247	
	Día 1	Día 7	Día 1	Día 7
t _{max} (horas)	0,5	0,5	0,5	0,5
C _{max} (μ g/l)	1.954 \pm 320	2.171 \pm 612	1.915 \pm 149	1.959 \pm 470
t _{1/2} (horas)	7,4 \pm 2,8	9,0 \pm 4,0	7,4 \pm 1,7	9,2 \pm 1,1
Área bajo la curva (μ g \approx h/l)	6.697 \pm 1.717	6.685 \pm 1.247	5.659 \pm 1.309	5.697 \pm 1.373

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros farmacocinéticos de ciclosporina A e ISA_{TX}247 en conejos macho que recibían 10 mg/kg/día. Los parámetros farmacocinéticos de ISA_{TX}247 en conejos hembra que recibían la misma dosis no fueron significativamente diferentes de los observados en los conejos macho, con la excepción de la concentración máxima el día 7.

No se observaron cambios significativos en los parámetros hematológicos de conejos que recibían un control con vehículo, ciclosporina A, o ISA_{TX}247. Se observó una diferencia en los niveles de creatinina en los diversos grupos a lo largo del transcurso del estudio, tal como se muestra en la tabla 6 a continuación. Estas diferencias indicaron que la ciclosporina A tenía un efecto negativo significativamente mayor sobre los riñones que tanto el control con vehículo como ISA_{TX}247. Debe observarse que incluso a una dosis un 50% mayor, 15 mg/kg/día, en comparación con 10 mg/kg/día de ciclosporina A, ISA_{TX}247 no dio como resultado ningún aumento significativo en los niveles de creatinina en suero.

TABLA 6

Cambio porcentual en los niveles de creatinina en suero con respecto al nivel inicial en conejos macho que reciben vehículo, ciclosporina A, o ISA_{TX}247 durante 30 días

Grupo de tratamiento	Día 15	Día 30
Vehículo	+ 6%	- 3%
Ciclosporina A (10 mg/kg)	+ 22%	+ 33%
ISA _{TX} 247 (10 mg/kg)	+ 1%	+ 10%
ISA _{TX} 247 (15 mg/kg)	- 19%	- 11%

ES 2 266 564 T3

El examen de los órganos de todos los conejos que recibían el control con vehículo, 10 mg/kg de ciclosporina A, 5 mg/kg de ISA_{TX}247, o 10 mg/kg de ISA_{TX}247 no reveló anomalías significativas. Esto era especialmente cierto para los riñones, en los que no se observó ninguna evidencia de fibrosis intersticial, observada normalmente en animales tratados con ciclosporina A (Thliveris *et al.*, 1991, 1994). Se observó un descenso en la espermatogénesis en los conejos macho que recibían 15 mg/kg de ISA_{TX}247. No se observó ningún cambio en los 3 conejos hembra que completaron el estudio con esta dosis de 15 mg/kg de ISA_{TX}247.

Ejemplo 18

Efectos inmunosupresores de ISA_{TX}247

Se incubó sangre completa de macacos de Java (n = 4) con ISA_{TX}247 o ciclosporina y se estimuló con diferentes mitógenos en un medio de cultivo. Se evaluó la proliferación de linfocitos mediante la incorporación de timidina marcada con tritio y mediante un análisis de citometría de flujo de la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en células en la fase SG₂M. También se utilizó la citometría de flujo para evaluar la producción de citocinas intracelulares por células T y la expresión de antígenos de activación del linfocito T. Se calculó la CE₅₀ (concentración de fármaco necesaria para obtener el 50% del efecto máximo) posteriormente utilizando el software WinNonlinTM. Los resultados mostraron que la proliferación de linfocitos, producción de citocinas, y expresión de antígenos superficiales de células T se inhibieron más potentemente mediante ISA_{TX}247 que mediante ciclosporina, tal como se muestra mediante la CE₅₀ (expresada en ng/ml) expuesta en la tabla 7 a continuación.

TABLA 7

Parámetro	ISA _{TX} 247	Ciclosporina
Absorción de ³ H-timidina	160,54	525,52
Expresión de PCNA	197,72	453,88
Producción de IL-2	103,35	504,80
Producción de IFN	102,67	465,65
Producción de TNF	90,58	508,29
Expresión de CD 71	149,84	486,82
Expresión de CD 25	121,00	431,53
Expresión de CD 11a	204,40	598,90
Expresión de CD 95	129,98	392,97
Expresión de CD 154	160,87	975,10

Por tanto, utilizando un ensayo de sangre completa *ex vivo* se ha encontrado que ISA_{TX}247 suprime las diversas funciones inmunitarias de una manera 2,3-6 veces más potente que la ciclosporina.

Ejemplo 19

Reacción de Wittig utilizando bromuro de tributililfosfonio

Se disolvió *tert*-butóxido de potasio (0,31 g, 2,8 mmoles) en 20 ml de tetrahidrofurano. A aproximadamente -40°C se añadió lentamente bromuro de tributililfosfonio (0,99 g, 3,1 mmoles) disuelto en 3 ml de tetrahidrofurano. Sea agitó la mezcla amarilla resultante durante aproximadamente 10 minutos a aproximadamente -40°C antes de que se añadiera lentamente una disolución de aldehído de acetilciclosporina A (1,5 g, 1,2 mmoles) en 6 ml de tetrahidrofurano. Tras agitar la mezcla de reacción amarilla-naranja durante 1,5 horas se completó la reacción. Para extinguir la mezcla de reacción se transfirió a ácido fosfórico acuoso (1,2 g, 1,0 mmol). Se extrajo la disolución acuosa resultante con 100 ml de tolueno seguido de 50 ml de tolueno. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con agua y se concentraron a presión reducida hasta la sequedad. Se obtuvo el producto, ISA_{TX}247 acetilado, como un sólido ligeramente amarillo con un rendimiento de aproximadamente el 90%. La razón de isómeros era de aproximadamente el 87% de isómero E y aproximadamente el 13% de isómero Z (tal como se determinó mediante espectroscopía ¹H-RMN).

ES 2 266 564 T3

Ejemplo 20

Reacción de Wittig utilizando bromuro de tributililfosfonio y una base de litio

5 Se disolvió bromuro de tributililfosfonio (1,38 g, 4,3 mmoles) en una mezcla de 20 ml de tolueno y 3 ml de tetrahidrofurano. A aproximadamente -78°C se añadió lentamente butil-litio (1,6 M en hexano, 2,43 ml, 3,9 mmoles). Se agitó la mezcla amarilla resultante durante aproximadamente 10 minutos a aproximadamente -78°C antes de que se añadiera lentamente una disolución de aldehído de acetilciclosporina A (1,5 g, 1,2 mmoles) en 6 ml de tolueno. Tras agitar la mezcla de reacción amarilla-naranja durante 3,5 horas se extinguió la reacción transfiriendo la mezcla
10 de reacción a una mezcla de 50 ml de tolueno y ácido fosfórico acuoso (0,25 g, 2,2 mmoles). Se permitió que la mezcla bifásica resultante se calentara hasta temperatura ambiente antes de que se separaran las dos fases. Se lavó la fase de tolueno con 20 ml de agua y se concentró a presión reducida hasta la sequedad. Se obtuvo el producto, ISA_{TX}247 acetilado, como un sólido ligeramente amarillo con un rendimiento de aproximadamente el 80%. La razón de isómeros fue de aproximadamente el 70% de isómero E y aproximadamente el 30% de isómero Z (tal como se
15 determinó mediante espectroscopía ¹H-RMN).

Ejemplo 21

Reacción de Wittig utilizando bromuro de tributililfosfonio y una base de litio

20 Se ejecutó SAP018 tal como se describió anteriormente pero sólo a aproximadamente -40°C. Se repitieron las condiciones experimentales del ejemplo 20, utilizando esta vez una temperatura de reacción de aproximadamente -40°C. En estas condiciones la razón de isómeros del producto aislado, ISA_{TX}247 acetilado, fue de aproximadamente el 74% en peso del isómero E, y hasta aproximadamente el 26% en peso del isómero Z, tal como se determinó mediante
25 espectroscopía ¹H-RMN.

Ejemplo 22

Reacción de Wittig utilizando bromuro de tributililfosfonio

30 Se enfrió una disolución de aldehído de acetilciclosporina A (1,5 g, 1,2 mmoles) y bromuro de tributililfosfonio (0,99 g, 3,1 mmoles) en 15 ml de tetrahidrofurano hasta aproximadamente -80°C. Se añadió lentamente *terc*-butóxido de potasio (0,19 g, 1,7 mmoles) disuelto en 9 ml de tetrahidrofurano. Se agitó la mezcla amarilla resultante durante una hora a aproximadamente -80°C para completar la reacción antes de que se añadiera lentamente una disolución de
35 6 ml de tetrahidrofurano. Tras agitar la mezcla de reacción amarilla-naranja durante 1,5 horas se completó la reacción. Para extinguir la mezcla de reacción se añadió ácido fosfórico acuoso (0,15 g, 1,3 mmoles). Se concentró la mezcla resultante y se disolvió el residuo en 5 ml de metanol. Entonces se añadió lentamente la mezcla a 5 ml de agua. Se filtró el precipitado resultante, se lavó con 4 ml de metanol/agua (1/1), y se secó a vacío. Se obtuvo el producto, ISA_{TX}247 acetilado, como un sólido incoloro con un rendimiento de aproximadamente el 90%. La razón de isómeros fue de
40 aproximadamente el 91% en peso de isómero E y el 9% en peso de isómero Z (determinada mediante espectroscopía ¹H-RMN).

Ejemplo 23

Ozonolisis de acetil-CsA

Se ozonizó una disolución de acetilciclosporina A (15 g, 12,1 mmoles) en 200 ml de metanol a -78°C utilizando un generador de ozono Sander a aproximadamente 1,1 bar con un flujo de corriente de 300 l O₂/h hasta que se completó la reacción (aproximadamente 5 minutos). Se gasificó la disolución con argón y se extinguió con sulfuro de dimetilo
50 disuelto en metanol. Para completar la reducción se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente. Tras la concentración hasta aproximadamente 50 ml se añadió lentamente la disolución a 500 ml de agua. Se filtró el precipitado resultante, se lavó con 60 ml de agua y se secó a vacío. Se obtuvo el producto, aldehído de CsA acetilado, como un sólido incoloro con un rendimiento aproximadamente del 95% y una pureza de aproximadamente el 98% (determinada mediante HPLC).

Ejemplo 24

Preparación de ciclosporina A protegida con trimetilsililo

60 Se disolvió ciclosporina A (40 g, 1 equivalente) en diclorometano (100 ml) a 30°C. Se añadió N,N-bis-(trimetilsilil) urea (1,1 equivalentes). Tras 5 minutos agitando a 30°C, se añadió ácido p-toluenosulfónico (0,02 equivalentes). Se calentó la mezcla de reacción a reflujo hasta la finalización de la reacción, tal como se midió mediante cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía de líquidos de alta presión o de alto rendimiento (HPLC) o espectrometría de masas (MS) y entonces se enfrió hasta temperatura ambiente. Se añadió una disolución de bicarbonato de sodio
65 acuosa semisaturada (100 ml). Se separó la fase acuosa y volvió a extraerse con diclorometano. Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. Se eliminó el disolvente a presión reducida proporcionando la ciclosporina A protegida con trimetilsililo bruta.

Ejemplo 25

Preparación de aldehído de ciclosporina A protegida con trimetilsililo

- 5 Se disolvió ciclosporina A protegida con trimetilsililo (5 g, 1 equivalente) en diclorometano (50 ml). Entonces se enfrió la disolución hasta una temperatura de aproximadamente -78°C, tras lo cual se burbujeó ozono a través de la disolución hasta la aparición de un color azul. Después, se burbujeó argón a través de la disolución hasta que se obtuvo una disolución incolora, con el fin de eliminar el exceso de ozono se volvió incolora; esta etapa se llevó a cabo para eliminar el exceso de ozono. Se añadió trietilamina (5 equivalentes) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 17 horas. Se obtuvo el aldehído de ciclosporina A protegida con trimetilsililo tras un tratamiento final acuoso.

Ejemplo 26

- 15 *Preparación de una mezcla 3:1 de isómeros de doble enlace Z con respecto a E de dieno de ciclosporina A protegida con trimetilsililo por medio de reacciones de Wittig*

- 20 A una mezcla de *tert*-butóxido de potasio (3 equivalentes) y bromuro de aliltrimetilfosfonio (2 equivalentes) en tolueno (10 ml) agitada previamente durante 60 minutos, se le añadió el aldehído de ciclosporina A protegida con trimetilsililo (1 g, 1 equivalente). El tratamiento final de la mezcla de reacción tras 1 hora de reacción a temperatura ambiente proporcionó una mezcla 3:1 (mediante RMN) de isómeros de doble enlace Z y E del dieno de ciclosporina A protegida con trimetilsililo.

Ejemplo 27

- 25 *Preparación de una mezcla 1:1 de isómeros de doble enlace Z con respecto a E de dieno de ciclosporina A protegida con trimetilsililo por medio de reacciones de Wittig*

- 30 Se disolvió el aldehído de ciclosporina A protegida con trimetilsililo (2,5 g) en 25 ml de tolueno y se trató con una disolución de hidróxido de sodio acuosa 1 N (10 equivalentes). Se agitó vigorosamente la mezcla de reacción y se añadió bromuro de aliltrimetilfosfonio (7,5 equivalentes, en partes). El tratamiento final de la mezcla de reacción tras varias horas de reacción a temperatura ambiente proporcionó una mezcla de cerca de 1:1 (mediante RMN) de isómeros de doble enlace Z y E del dieno de ciclosporina A protegida con trimetilsililo.

Ejemplo 28

Preparación de una mezcla 1:2 de isómeros de doble enlace Z con respecto a E de dieno de ciclosporina A protegida con trimetilsililo por medio de reacciones de Wittig

- 40 Se disolvió el aldehído de ciclosporina A protegida con trimetilsililo (1 g) en 5 ml de tolueno junto con carbonato de potasio (1,5 equivalentes) y bromuro de aliltrimetilfosfonio (1,5 equivalentes). El tratamiento final de la mezcla de reacción tras 4 horas de reacción a reflujo con agitación vigorosa proporcionó una mezcla de cerca de 1:2 (mediante RMN) de isómeros de doble enlace Z y E del dieno de ciclosporina A protegida con trimetilsililo.

Ejemplo 29

Preparación de una mezcla 1:3 de isómeros de doble enlace Z con respecto a E de dieno de ciclosporina A protegida con trimetilsililo por medio de reacciones de Wittig

- 50 Se disolvió bromuro de aliltributylfosfonio (3 equivalentes, preparado a partir de bromuro de alilo y tributylfosfina) en THF (3,5 ml). Se añadió tolueno (7,5 ml) seguido de *tert*-butóxido de potasio (4 equivalentes). Tras 1 hora de agitación a temperatura ambiente, se enfrió la disolución hasta cerca de -30°C. Se añadió gota a gota una disolución del aldehído de ciclosporina A protegida con trimetilsililo (1 g, 1 equivalente) en tolueno (5 ml). Tras 45 minutos a aproximadamente -30°C, se realizó un tratamiento final de la mezcla de reacción, proporcionando una mezcla de aproximadamente 1:3 (mediante RMN) de isómeros de doble enlace Z y E del dieno de ciclosporina A protegida con trimetilsililo.

Los dos ejemplos siguientes, ejemplos 30 y 31, se refieren a las alilmetalaciones.

Ejemplo 30

Preparación de β -trimetilsililalcohol de ciclosporina A protegida con acetilo

- 65 A una disolución de aliltrimetilsilano (10,1 equivalentes) en THF (15 ml) se le añadió butil-litio (1,6 m en hexanos, 10 equivalentes) a temperatura ambiente. Tras 30 minutos de reacción, se enfrió la disolución hasta -75°C, y se trató con dietil-B-metoxiborano (10,1 equivalentes). Tras 1 hora, se añadió el complejo trifluoruro de boro dietil éter (10,1 equivalentes) para generar el reactivo B-(γ -trimetilsililalil)-dietilborano. Tras 1 hora, se añadió gota a gota una disolución de aldehído de ciclosporina A protegida con acetilo (5 g, 1 equivalente) en THF (15 ml). Tras 20 minutos,

ES 2 266 564 T3

- se calentó la mezcla de reacción hasta -10°C y se añadió una disolución de NH_4Cl acuosa saturada. Tras agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, se añadió agua (45 ml) y se extrajo la mezcla de reacción 3 veces con 25 ml de acetato de etilo. Se lavaron las fases orgánicas secuencialmente con agua (25 ml) y una disolución de NH_4Cl acuosa saturada (25 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na_2SO_4 , se filtraron, y se concentraron a presión reducida.
- 5 Se cromatografió el producto bruto (gel de sílice, diclorometano/metanol o acetato de etilo/heptano) para dar el β -trimetilsililalcohol de ciclosporina A protegida con acetilo.

Ejemplo 31

10 Preparación de β -trimetilsililalcohol de ciclosporina A protegida con trimetilsililo

- A una disolución de aliltrimetilsilano (10,1 equivalentes) en THF (15 ml) se le añadió butil-litio (1,6 m en hexanos, 10 equivalentes) a temperatura ambiente. Tras permitir que la reacción tuviera lugar durante aproximadamente 30 minutos, se enfrió la disolución hasta -65°C , y se trató con dietil-B-metoxiborano (10,1 equivalentes). Tras 1 hora,
- 15 se añadió el complejo trifluoruro de boro dietil éter (10,1 equivalentes) para generar el reactivo B-(γ -trimetilsililalil)-dietilborano. Tras 1 hora, se añadió gota a gota una disolución de aldehído de ciclosporina A protegida con trimetilsililo (5 g, 1 equivalente) en THF (15 ml). Tras 15 minutos, se calentó la mezcla de reacción hasta 10°C y se añadió una disolución de NH_4Cl acuosa saturada. Tras agitar [1 hora] durante una hora a temperatura ambiente, se añadieron agua (12,5 ml) y NaHCO_3 saturado (25 ml). Se extrajo la mezcla de reacción dos veces con 25 ml de metil-t-butil
- 20 éter. Se lavaron las fases orgánicas dos veces secuencialmente con agua (2 x 25 ml) y una disolución de NaCl acuosa saturada (25 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na_2SO_4 , se filtraron, y se concentraron a presión reducida. Se cromatografió el producto bruto (gel de sílice, heptano/acetato de etilo) para dar el β -trimetilsililalcohol de ciclosporina A protegida con trimetilsililo.

- 25 Los tres ejemplos siguientes, ejemplos 32, 33, y 34, se refieren a las reacciones de eliminación de Peterson.

Ejemplo 32

Preparación de dieno E de ciclosporina A protegida con acetilo

- 30 Se disolvió el β -trimetilsililalcohol de ciclosporina A protegida con acetilo (10 g, 1 equivalente) en THF (50 ml). Se añadió H_2SO_4 concentrado (1,24 ml, 3 equivalentes) y se agitó la mezcla de reacción durante 20 h a temperatura ambiente. Se añadió agua (150 ml) y se extrajo la mezcla de reacción con metil-t-butil éter (200 ml). Volvió a extraerse la fase acuosa con metil-t-butil éter (150 ml). Se lavaron las fases orgánicas con agua (150 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar el dieno de ciclosporina A protegida con acetilo bruto ($\text{ISA}_{\text{TX}247}$ protegido con acetilo). Se cristalizó el producto bruto en metil-t-butil éter/THF y entonces se recrystalizó en metil-t-butil éter/DCM para dar dieno de ciclosporina A protegida con acetilo ($\text{ISA}_{\text{TX}247}$ protegido con acetilo) como una mezcla al 99-97%:1-3% de isómeros de doble enlace E y Z (mediante RMN de 400 MHz , error de medición del 2%).
- 35 40

- Se llevó a cabo la hidrólisis del dieno E de ciclosporina A protegida con acetilo tal como sigue: se disolvió dieno de acetilciclosporina A (4 g, 1 equivalente) en metanol (80 ml) y agua (32 ml). Se añadió carbonato de potasio (3,65 g, 8,3 equivalentes). Tras agitar durante 15 horas a temperatura ambiente, se calentó la mezcla de reacción hasta 40°C durante 4 horas. Se concentró la mezcla de reacción a presión reducida y se llevó el residuo a acetato de etilo (70 ml). Se añadió lentamente una disolución de ácido cítrico acuosa al 15% (30 ml) seguida de agua (10 ml). Se separó la fase acuosa y volvió a extraerse con acetato de etilo (56 ml). Se lavaron las fases orgánicas con agua (30 ml), disolución de ácido cítrico al 15% (40 ml) y disolución de NaCl saturada (30 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron a presión reducida para dar dieno de ciclosporina A ($\text{ISA}_{\text{TX}247}$) como una mezcla 98:2 E/Z de isómeros de doble enlace (mediante RMN de 400 MHz , cerca del 2-3% de error). Véase R. W. Hoffmann, *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 555 (1982); W. R. Roush, "Allylorganometallics", *Comprehensive Organic Synthesis*, Pergamon Press, Vol. 2, págs. 1-53; y Y. Yamamoto, N. Asao, *Chemical Reviews*, pág. 2307 (1993).
- 45 50

Ejemplo 33

- 55 Preparación de dieno Z de ciclosporina A protegida con trimetilsililo y su conversión a dieno Z de ciclosporina A ($\text{ISA}_{\text{TX}247}$)

- Se disolvió el β -trimetilsililalcohol de ciclosporina A protegida con trimetilsililo (2 g, 1 equivalente) en THF (20 ml). Se enfrió la disolución hasta $0-2^{\circ}\text{C}$ y se añadió t-butoxido de potasio (4 equivalentes). Tras 1,5 horas de reacción, se añadieron acetato de etilo (20 ml) y agua (40 ml). Se separó la fase acuosa y volvió a extraerse con acetato de etilo (20 ml). Se lavaron las fases orgánicas con una disolución de NaCl acuosa saturada (20 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na_2SO_4 , se filtraron, y se concentraron a presión reducida para dar una mezcla de dieno Z de ciclosporina A protegida con trimetilsililo ($\text{ISA}_{\text{TX}247}$ protegido con trimetilsililo), y dieno Z de ciclosporina A (el isómero Z de $\text{ISA}_{\text{TX}247}$). Se completó la desililación disolviendo la mezcla de producto bruto en metanol (el 10% en peso en la disolución) y añadiendo una disolución de ácido clorhídrico acuosa 1 M (1 equivalente). Tras 15 minutos a temperatura ambiente, se añadieron agua y acetato de etilo. Se separó la fase acuosa y volvió a extraerse con acetato de etilo. Se lavaron las fases orgánicas con una disolución de NaCl acuosa saturada. Se secaron las fases orgánicas
- 60 65

ES 2 266 564 T3

combinadas sobre Na_2SO_4 , se filtraron, y se concentraron a presión reducida, proporcionando dieno de ciclosporina A ($\text{ISA}_{\text{TX}247}$) como una mezcla 94:6 de isómeros de doble enlace Z y E (mediante RMN).

Ejemplo 34

Preparación de dieno E de ciclosporina A ($\text{ISA}_{\text{TX}247}$)

Se disolvió el β -trimetilsililalcohol de ciclosporina A protegida con trimetilsililo (500 mg, 1 equivalente) en diclorometano. Se enfrió esta disolución dentro de un intervalo de aproximadamente 0-2°C, y se trató con el complejo trifluoruro de boro dietil éter (5 equivalentes). Tras 1 hora, se añadieron agua (20 ml) y diclorometano (20 ml). Se separó la fase orgánica y se lavó con agua (20 ml), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró, y se concentró a presión reducida para proporcionar directamente dieno de ciclosporina A ($\text{ISA}_{\text{TX}247}$) como una mezcla 91:9 en peso de isómeros de doble enlace E y Z (mediante RMN).

Ejemplo 35

Desprotección de dieno de ciclosporina A protegida con trimetilsililo

Se disolvió dieno de ciclosporina A protegida con trimetilsililo en metanol (el 10% en peso en la disolución). Se trató esta disolución con una disolución de ácido clorhídrico acuosa 1 M (1 equivalente). Tras 15 minutos a temperatura ambiente, se añadieron agua y acetato de etilo. Se separó la fase acuosa y volvió a extraerse con acetato de etilo. Se lavaron las fases orgánicas con una disolución de NaCl acuosa saturada. Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida, proporcionando dieno de ciclosporina A ($\text{ISA}_{\text{TX}247}$).

Ejemplo 36

Epoxidación de acetilciclosporina A

Se disolvió acetilciclosporina A (2,0 g, 1,61 mmoles) en acetonitrilo (30 ml). Se añadió 1,3-diacetoxiacetona (0,14 g, 0,8 mmoles), seguido de una sal de disodio del ácido etilendiaminotetracético acuosa 0,0004 M (20 ml) y bicarbonato de sodio (0,405 g, 4,82 mmoles). A la mezcla agitada, se le añadió oxone (KHSO_5 al 43,8%) (2,23 g, 6,43 mmoles) en partes a lo largo de 2 horas. Se mantuvo el pH a 8,2 mediante la adición constante de NaOH 1 N (cantidad total de 6,4 ml) usando un pH-stat. Se mantuvo la temperatura a 22-25°C mediante un enfriamiento ocasional utilizando un baño de agua fría. Tras 2,5 horas se extinguió la mezcla de reacción mediante unas pocas gotas de una disolución de bisulfito de sodio. Se añadió agua (100 ml) y se extrajo la mezcla dos veces con *tert*-butilmetil éter (100 ml, después 75 ml). Se lavaron los extractos orgánicos con cloruro de sodio acuoso diluido (100 ml), se combinaron, se secaron sobre Na_2SO_4 , y se concentraron para dar un epóxido de acetilciclosporina A bruto (1,92 g, 95%; HPLC: el 99,4% del área) como una espuma sólida blanca.

Ejemplo 37

Preparación de aldehído de acetilciclosporina A

Se disolvió epóxido de acetilciclosporina A bruto (1,92 g, 1,52 mmoles) en acetonitrilo (25 ml). Se añadió agua (20 ml), seguida de peryodato de sodio (489 mg, 2,28 mmoles) y ácido sulfúrico 0,5 M (3,05 ml, 1,52 mmoles). Se agitó la mezcla de reacción a 40°C durante 18 horas, entonces se extinguió el exceso de peryodato de sodio mediante la adición de bisulfito de sodio acuoso. Se añadió cloruro de sodio acuoso diluido (100 ml) y se extrajo la mezcla dos veces con *tert*-butilmetil éter (100 ml cada vez). Se lavaron los extractos orgánicos con cloruro de sodio acuoso diluido (100 ml), se combinaron, se secaron sobre Na_2SO_4 , y se concentraron para dar aldehído de acetilciclosporina A bruto (1,74 g, 92%; HPLC: el 95,7% del área) como una espuma blanca. Se cromatografió sobre gel de sílice el producto bruto utilizando 40% de acetona/60% de hexano como eluyente para dar el producto (1,41 g, 71% basado en acetilciclosporina A; HPLC: el 100% del área) como una espuma sólida blanca.

Ejemplo 38

Preparación de aldehído de acetilciclosporina A utilizando un procedimiento de una sola etapa

Se disolvió acetilciclosporina A (2,0 g, 1,61 mmoles) en acetonitrilo (30 ml). Se añadió 1,3-diacetoxiacetona (0,084 g, 0,48 mmoles), seguida de una sal de disodio del ácido etilendiaminotetracético acuosa 0,0004 M (20 ml) y bicarbonato de sodio (0,405 g, 4,82 mmoles). A la mezcla agitada, se le añadió oxone (KHSO_5 al 43,8%) (1,67 g, 4,82 mmoles) en partes a lo largo de 2 horas. Se mantuvo el pH a 8,2 mediante la adición constante NaOH 1 N (cantidad total 3,4 ml) utilizando un pH-stat. Se mantuvo la temperatura a 20-25°C. Tras 3,5 horas, se añadió ácido sulfúrico 0,5 M (5 ml, 2,5 mmoles) a la mezcla de reacción, seguido de unas pocas gotas de ácido sulfúrico concentrado, hasta que se alcanzó pH 1,3. Entonces, se añadió peryodato de sodio (516 mg, 2,41 mmoles), y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas y a 40°C durante 22 horas. Se añadió agua (100 ml) y se extrajo la mezcla dos veces con *tert*-butilmetil éter (100 ml, después 75 ml). Se lavaron los extractos orgánicos con cloruro de sodio acuoso diluido (100 ml), se combinaron, se secaron sobre Na_2SO_4 , y se concentraron para dar aldehído de acetilciclosporina A bruto (1,9 g, 96%; HPLC: el 83,4% del área) como una espuma blanca. Se cromatografió sobre gel de sílice el

ES 2 266 564 T3

producto bruto utilizando 40% de acetona/60% de hexano como eluyente para dar el producto (1,35 g, 68% basado en acetilciclosporina A; HPLC: el 100% del área) como una espuma sólida blanca.

Ejemplo 39 (ISO)

Reacción de Wittig de aldehído de acetilciclosporina A con 3-dimetilaminopropiltrifenilfosforilideno

Se ha descrito una síntesis estereoselectiva de 1,3-dienos por E. J. Corey y M. C. Desai en *Tetrahedron Letters*, Vol. 26, n° 47, págs. 5747-8, (1985). Esta referencia describe que el iluro obtenido tratando 3-(dimetilamino)propiltrifenilfosforano con hexametildisilazida de potasio puede someterse a una reacción de Wittig con un aldehído para formar selectivamente una Z-alquenildimetilamina. La oxidación de la amina con el ácido *m*-cloroperbenzoico da el N-óxido correspondiente que entonces puede calentarse en lo que se conoce como una eliminación de Cope para formar el 1,3-dieno deseado en el que la configuración de la olefina formada durante la etapa de Wittig es exclusivamente Z, o *cis*.

Análogamente, puede prepararse el isómero Z de ISA_{TX}247 haciendo reaccionar aldehído de acetilciclosporina A con un iluro obtenido tratando bromuro de 3-(dimetilamino)-propiltrifenilfosfonio con hexametildisilazida de potasio. Entonces se somete el producto intermedio resultante a una oxidación, seguido de la eliminación de Cope para dar acetil-(Z)-ISA_{TX}247. La desprotección utilizando una base da como resultado (Z)-ISA_{TX}247. El reactivo oxidante puede ser ácido metacloroperbenzoico.

A una suspensión agitada de bromuro de 3-dimetilaminopropiltrifosfonio (2,5 g, 5,83 mmoles) en tolueno anhidro (20 ml) se le añadió hexametildisilazida de potasio (11,6 ml, 5,8 mmoles, disolución 0,5 M en tolueno) a través de una jeringuilla. Tras agitar durante 1 h a temperatura ambiente, se centrifugó la disolución de color rojo y se transfirió el sobrenadante a un matraz de reacción a través de una cánula. Al sólido se le añadió tolueno anhidro (10 ml), se agitó y se centrifugó. Se transfirió el sobrenadante al matraz de reacción y al iluro de color rojo combinado se le añadió OAc-CsA-CHO (1,44 g, 1,17 mmoles). Se continuó con la agitación durante un periodo adicional de 2 h a temperatura ambiente cuando el color pasó a ser amarillo claro. Se diluyó la mezcla de reacción con EtOAc (50 ml) y se lavó posteriormente con una disolución de NaHCO₃ saturada (50 ml) y salmuera (50 ml). El secado y la eliminación del disolvente proporcionaron un sólido amarillo pálido. La cromatografía sobre columna de gel de sílice y la elución con una mezcla de acetona - hexanos (gradiente: del 10 al 75% de acetona y del 90 al 25% de hexanos) eliminaron todas las impurezas relacionadas con el fósforo. Una elución adicional con acetona proporcionó el producto deseado como un sólido incoloro (1,28 g, rendimiento del 84%). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 2,23 (s, 6H), 2,03 (s, 3H), ¹³C RMN (300 MHz, CDCl₃): 129,33, 126,95; MS *m/z*: 1301 (M⁺), 1324(M+Na⁺).

Conversión en N-óxido

A una disolución agitada y enfriada (0°C) del compuesto dimetilamino obtenido en la reacción de Wittig (0,44 g, 0,34 mmoles) en CHCl₃ (3 ml) se le añadió una disolución de *m*-CPBA (0,07 g, 0,405 mmoles) en CHCl₃ (2 ml). Tras agitar durante 30 minutos, se añadió sulfuro de dimetilo (0,5 ml) seguido de CH₂Cl₂ (50 ml). Un tratamiento final lavando con una disolución de NaHCO₃ (25 ml) y agua (25 ml), secado y eliminación del disolvente proporcionaron un sólido (0,43 g). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 3,19 (s, 3H), 3,18 (s, 3H), 2,03 (s, 3H). ¹³C RMN (300 MHz, CDCl₃): 131,89, 124,13; MS *m/z*: 1340(M+Na⁺).

Eliminación de Cope de N-óxidos. Preparación del isómero Z de acetil-ISA_{TX}247

Se agitó el N-óxido (350 mg) puro y se calentó a 100°C a vacío durante 2 h. Entonces se hizo pasar esto a través de una columna de gel de sílice. La elución con una mezcla de acetona - hexanos (gradiente, del 5 al 25% de acetona y del 95 al 75% de hexanos) proporcionó un sólido incoloro (314 mg). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): 6,49 (dt, *J* = 16,99, 10,5 Hz, 1H); ¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃): 132,20, 131,09, 129,70, 116,85; MS *m/z*: 1279 (M+Na⁺).

Isómero Z de ISA_{TX}247

A una disolución de (Z)-acetil ISA_{TX}247 (50 mg) en MeOH (4 ml) se le añadió agua (1,5 ml) y K₂CO₃ (60 mg) y se agitó durante 48 h a temperatura ambiente. Se quitaron los disolventes de la mezcla de reacción y se extrajo con EtOAc (20 ml). Se lavó la fase orgánica con agua (10 ml) y salmuera (10 ml). El secado y la eliminación del disolvente proporcionaron un sólido incoloro. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): 6,58 (dt, *J* = 16,99, 10,5 Hz, 1H); MS *m/z*: 1236,8 (M+Na⁺). El compuesto resultante era el isómero Z de ISA_{TX}247. No se observó ningún isómero E medible mediante RMN.

REIVINDICACIONES

1. Método para preparar una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247, en el que la ruta sintética comprende las etapas de:

a) calentar una acetil- η -halociclosporina A con un primer compuesto seleccionado del grupo que consiste en triarilfosfina, trialquilfosfina, arilalquilfosina, y triarilarsina para producir un producto intermedio;

b) preparar una mezcla de isómeros (E) y (Z) de acetil-1,3-dieno agitando el producto intermedio con formaldehído;

c) preparar una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247 tratando la mezcla de isómeros (E) y (Z) de acetil-1,3-dieno con una base.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la acetil- η -halociclosporina A es acetil- η -bromociclosporina A.

3. Método según la reivindicación 1, que incluye adicionalmente la etapa de halogenación del η -carbono de la cadena lateral del residuo de aminoácido 1 de la ciclosporina A utilizando una reacción de bromación llevada a cabo sometiendo a reflujo la acetilciclosporina A con N-bromosuccinimida y azo-bis-isobutironitrilo.

4. Método según la reivindicación 1, en el que el primer compuesto es trifenilfosfina y el producto intermedio es haluro de trifenilfosfonio de acetilciclosporina A.

5. Método para preparar una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247, en el que la ruta sintética comprende las etapas de:

a) convertir un aldehído de acetilciclosporina A en una mezcla de isómeros (E) y (Z) de acetil-1,3-dieno haciendo reaccionar el aldehído de acetilciclosporina A con un iluro de fósforo por medio de una reacción de Wittig, opcionalmente en presencia de un haluro de litio; y

b) preparar una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247 tratando la mezcla de isómeros (E) y (Z) de acetil-1,3-dieno con una base.

6. Método según la reivindicación 5, en el que el iluro de fósforo utilizado en la reacción de Wittig se prepara a partir de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en trifenilfosfina, triarilfosfina, trialquilfosfina, y arilalquilfosfina.

7. Método para preparar una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247, en el que la ruta sintética comprende las etapas de:

a) proteger el β -alcohol de la ciclosporina A formando una primera acetilciclosporina A intermedia;

b) oxidar la acetilciclosporina A para producir un segundo aldehído intermedio de acetilciclosporina A;

c) convertir un aldehído intermedio de acetilciclosporina A en una mezcla de isómeros (E) y (Z) de acetil-1,3-dieno haciendo reaccionar el producto intermedio con un iluro de fósforo por medio de una reacción de Wittig, opcionalmente en presencia de un haluro de litio; y

d) preparar una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247 tratando la mezcla de isómeros (E) y (Z) de acetil-1,3-dieno con una base.

8. Método según la reivindicación 7, en el que la etapa de oxidación se lleva a cabo con un agente oxidante seleccionado del grupo que consiste en ozono, permanganato de potasio, tetróxido de rutenio, tetróxido de osmio, tetróxido de osmio soportado sobre polímero y cloruro de rutenio.

9. Método según la reivindicación 8, en el que los agentes oxidantes tetróxido de rutenio y cloruro de rutenio se utilizan con un cooxidante seleccionado del grupo que consiste en peryodato e hipoclorito.

10. Método según la reivindicación 8, en el que los agentes oxidantes tetróxido de rutenio y cloruro de rutenio se utilizan con acetonitrilo.

11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 5 ó 7, en el que la base que se utiliza para tratar el acetil-1,3-dieno se selecciona del grupo que consiste en hidróxido de sodio, carbonato de sodio, carbonato de potasio, alcóxido de sodio, y alcóxido de potasio.

12. Método según la reivindicación 1, en el que el producto intermedio es bromuro de trifenil o trialquilfosfonio

ES 2 266 564 T3

de acetilciclosporina A, y en el que la etapa que agita el producto intermedio con formaldehído se realiza en presencia de un haluro de litio.

13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 en el que el aldehído de acetilciclosporina se prepara mediante un método que comprende las etapas de:

a) proteger el β -alcohol de ciclosporina A formando acetilciclosporina A; y

b) oxidar la acetilciclosporina A con ozono como agente oxidante seguido de un tratamiento con un agente reductor.

14. Método según la reivindicación 13, en el que la etapa de ozonólisis se realiza a una temperatura que oscila desde -80°C hasta 0°C .

15. Método según la reivindicación 13, en el que el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en trialquilfosfinas, triarilfosfinas, y trialquilaminas.

16. Método según la reivindicación 13, en el que el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en sulfuros de alquilarilo, tiosulfatos, y sulfuros de dialquilo.

17. Método según la reivindicación 16, en el que el agente reductor es sulfuro de dimetilo.

18. Método según la reivindicación 15, en el que el agente reductor es tributilfosfina.

19. Método según la reivindicación 15, en el que el agente reductor es trialquilamina.

20. Método según la reivindicación 19, en el que el agente reductor es trietilamina.

21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, en el que el disolvente utilizado para la ozonólisis de acetilciclosporina A es un alcohol inferior.

22. Método según la reivindicación 21, en el que el alcohol es metanol.

23. Método según la reivindicación 13, en el que el disolvente utilizado para la ozonólisis se selecciona del grupo que consiste en diclorometano y una mezcla de diclorometano y un alcohol inferior.

24. Método según la reivindicación 23, en el que el alcohol inferior es metanol.

25. Método para preparar una mezcla de isómeros (E) y (Z) de $\text{ISA}_{\text{TX}247}$, en el que la ruta sintética comprende las etapas de:

a) convertir un aldehído intermedio de acetilciclosporina A en una mezcla de isómeros (E) y (Z) de acetil-1,3-dieno haciendo reaccionar el producto intermedio con un iluro de fósforo preparado a partir de un haluro de tributilalilfosfonio o haluro de trifenilfosfonio mediante una reacción de Wittig, opcionalmente en presencia de un haluro de litio; y

b) preparar una mezcla de isómeros (E) y (Z) de $\text{ISA}_{\text{TX}247}$ tratando la mezcla de isómeros (E) y (Z) de acetil-1,3-dieno con una base.

26. Método según la reivindicación 25, en el que el haluro de fosfonio es un bromuro de fosfonio.

27. Método según la reivindicación 26, en el que la reacción de Wittig se lleva a cabo en un disolvente seleccionado del grupo que comprende tetrahidrofurano y tolueno, y en el que el disolvente se utiliza en presencia de un compuesto seleccionado del grupo que se compone de butil-litio, alcóxido inferior de sodio, alcóxido inferior de potasio, y carbonato a una temperatura de entre -80°C y 110°C .

28. Método según la reivindicación 27, en el que el alcóxido inferior de potasio es *tert*-butóxido de potasio.

29. Método según la reivindicación 28, en el que el disolvente es tetrahidrofurano utilizado en presencia de *tert*-butóxido de potasio a una temperatura de entre -70°C y -100°C .

30. Método para preparar una mezcla de isómeros (E) y (Z) de $\text{ISA}_{\text{TX}247}$, comprendiendo el método una ruta sintética que prepara un isómero (E) y un isómero (Z) de $\text{ISA}_{\text{TX}247}$ tal que el isómero (E) y el isómero (Z) están presentes en la mezcla en una razón predeterminada, en el que la ruta sintética comprende las etapas de:

a) proteger el β -alcohol del aminoácido 1 de la ciclosporina A;

b) oxidar la ciclosporina A protegida para producir un aldehído de ciclosporina A protegido;

ES 2 266 564 T3

c) convertir el aldehído de ciclosporina A protegido en una mezcla de isómeros (E) y (Z) de 1,3-dieno protegido haciendo reaccionar el aldehído de ciclosporina A protegido con un iluro de fósforo por medio de una reacción de Wittig, opcionalmente en presencia de un haluro de litio; y

5 d) preparar una mezcla de isómeros (E) y (Z) desprotegiendo el 1,3-dieno protegido.

31. Método según la reivindicación 31, en el que el β -alcohol del aminoácido 1 de la ciclosporina A se protege haciendo reaccionar la ciclosporina A con un reactivo para dar una ciclosporina A protegida seleccionada del grupo que consiste en ésteres de acetato, ésteres de benzoato, ésteres de benzoato sustituidos, éteres y silil éteres.

10

32. Método para preparar una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247, en el que la ruta sintética comprende las etapas de:

15 a) convertir un aldehído intermedio de la TMS-ciclosporina A en una mezcla de isómeros (E) y (Z) de TMS-1,3-dieno haciendo reaccionar el producto intermedio con un iluro de fósforo preparado a partir de un haluro de tributililfosfonio o haluro de trifenilfosfonio por medio de una reacción de Wittig, opcionalmente en presencia de un haluro de litio; y

20 b) preparar una mezcla de isómeros (E) y (Z) de ISA_{TX}247 desprotegiendo la mezcla de isómeros (E) y (Z) de TMS-1,3-dieno con un ácido.

33. Método según la reivindicación 32, en el que el haluro de fosfonio es un bromuro de fosfonio.

25 34. Método según la reivindicación 32, en el que la etapa a) se lleva a cabo en un disolvente que comprende tetrahidrofurano y/o tolueno utilizado en presencia de un alcóxido inferior de sodio o potasio, o un carbonato, a una temperatura de entre -80°C y 110°C.

35. Método según la reivindicación 34, en el que el alcóxido inferior de sodio o potasio es *tert*-butóxido de potasio.

30 36. Método según la reivindicación 32, en el que se selecciona el ácido del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido acético, ácido cítrico, un ácido de Lewis, y reactivos a base de HP.

35

40

45

50

55

60

65

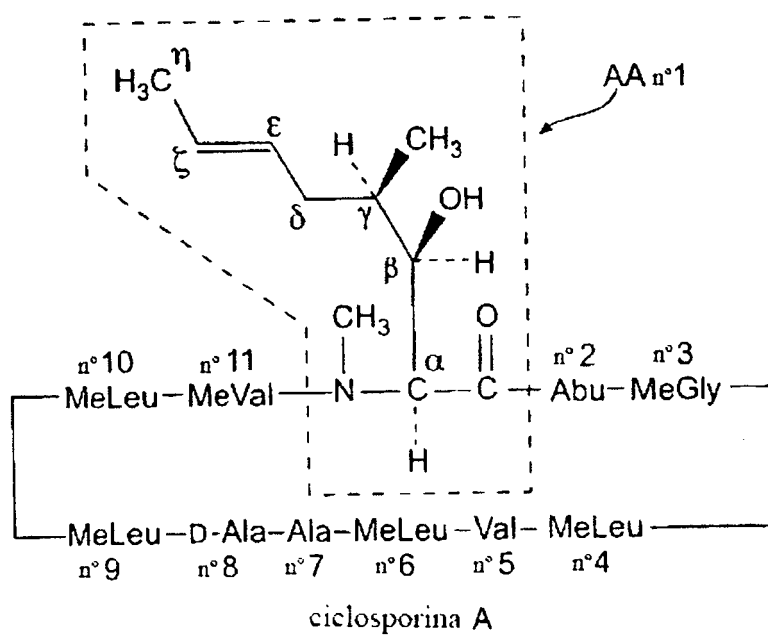
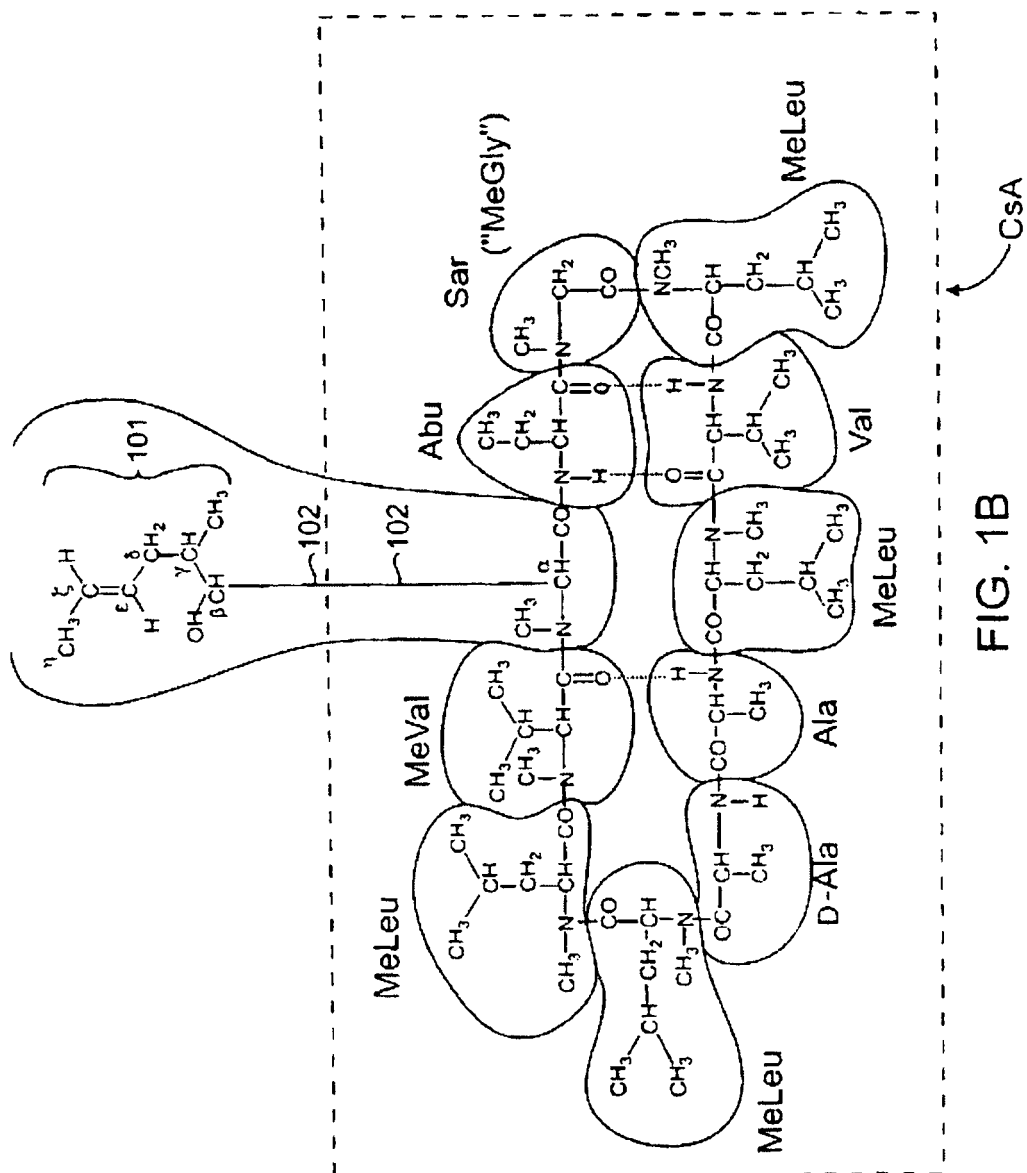


FIG. 1A



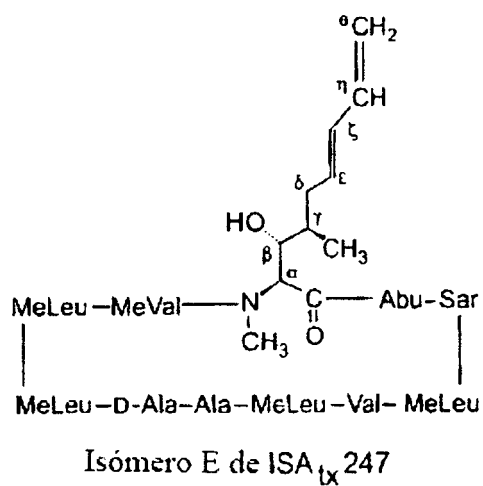


FIG. 2A

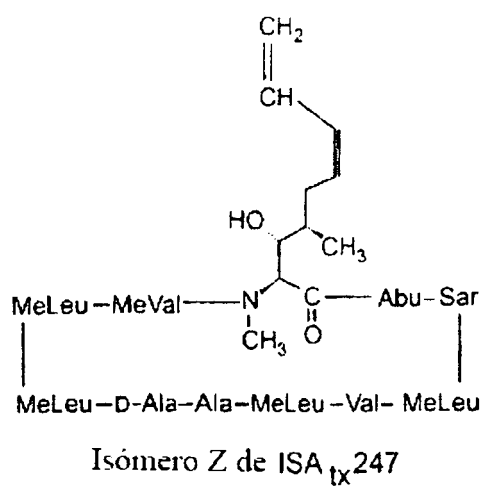


FIG. 2B

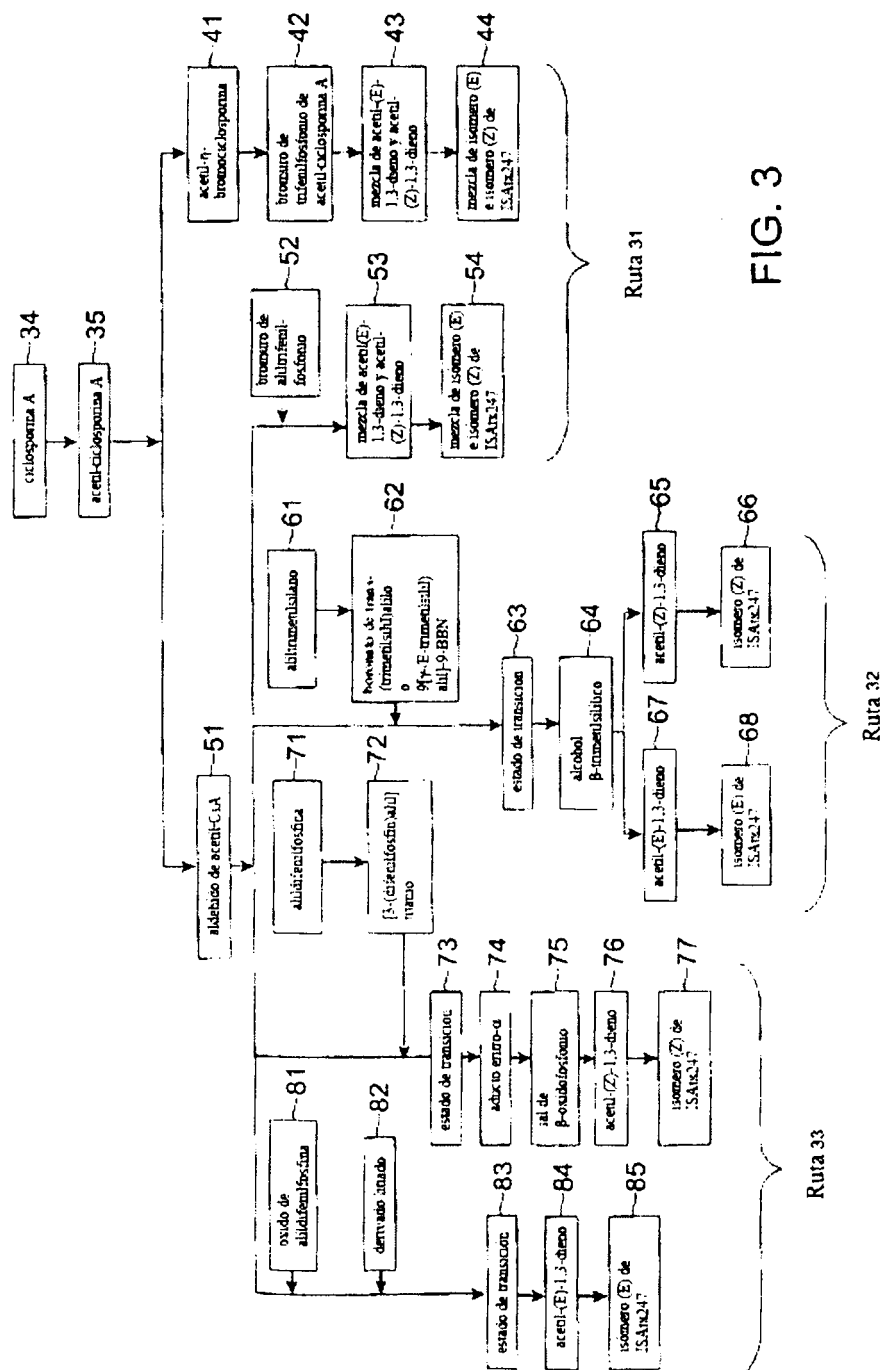


FIG. 3

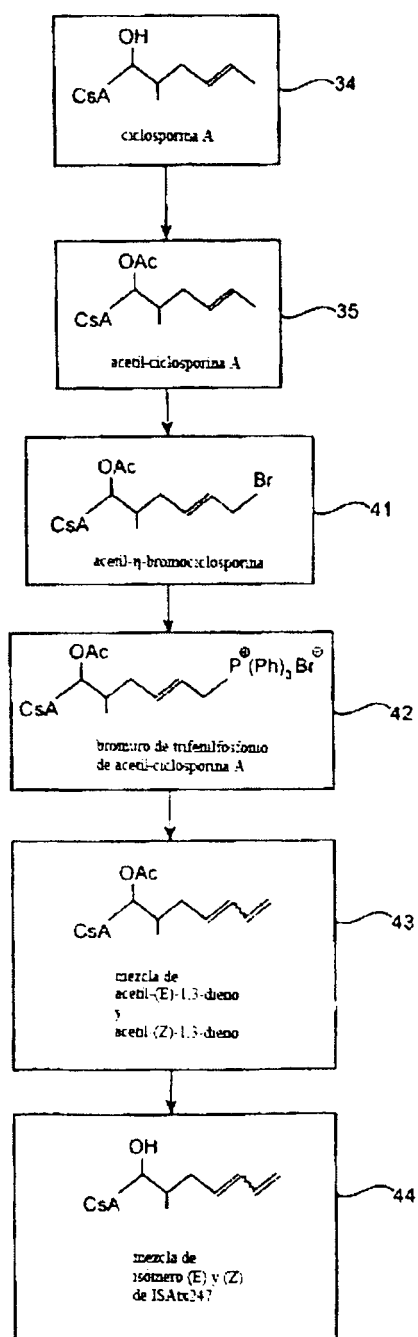


FIG. 4

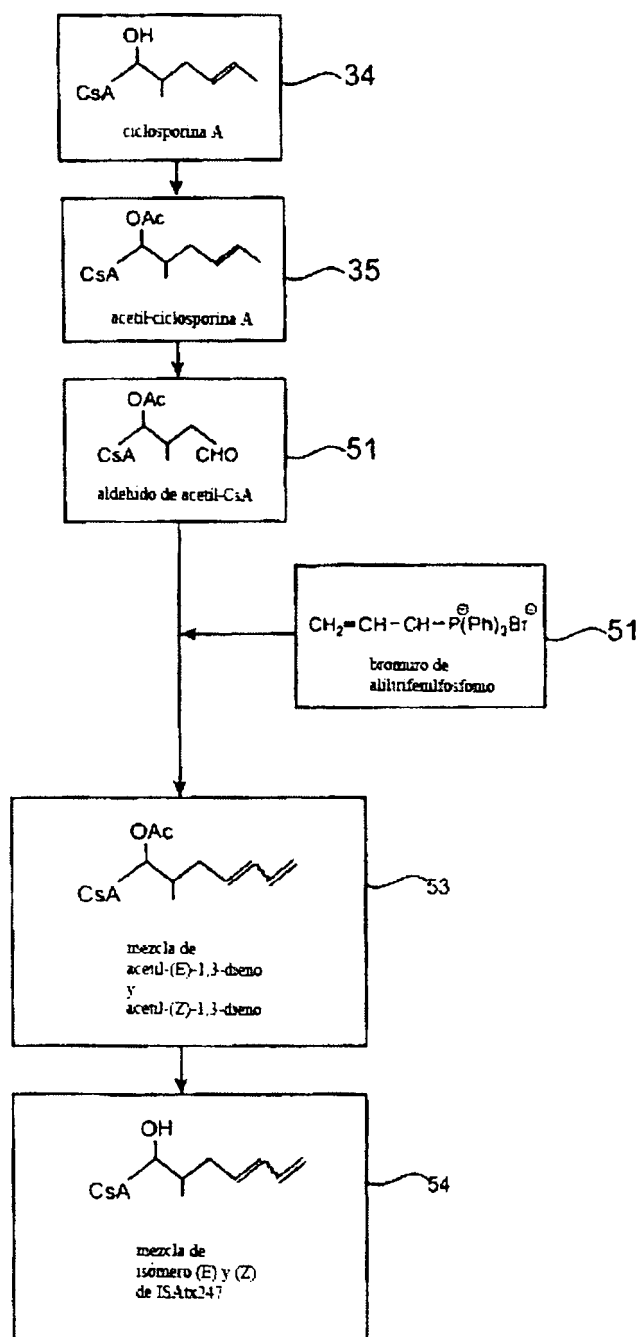


FIG. 5

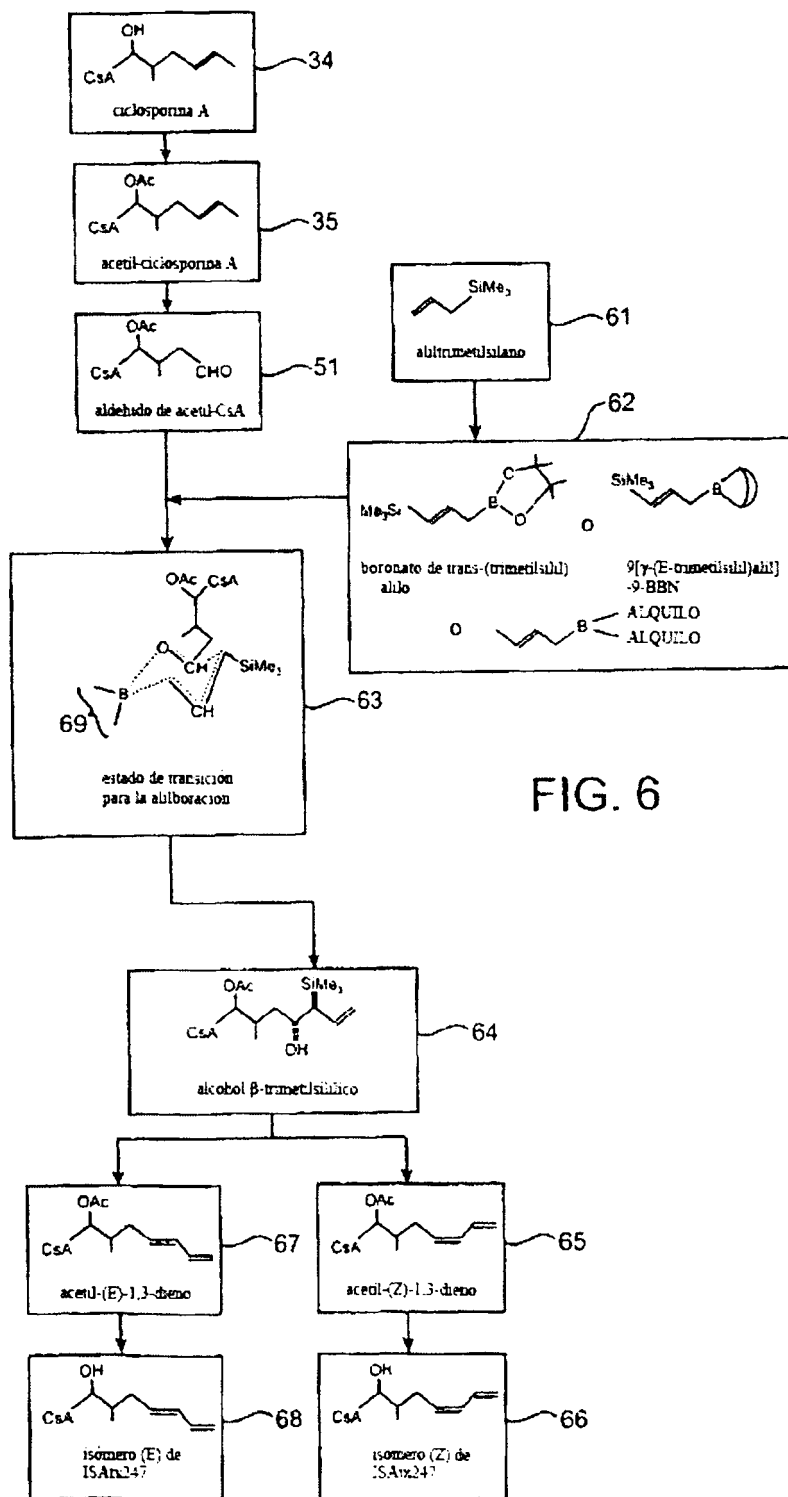
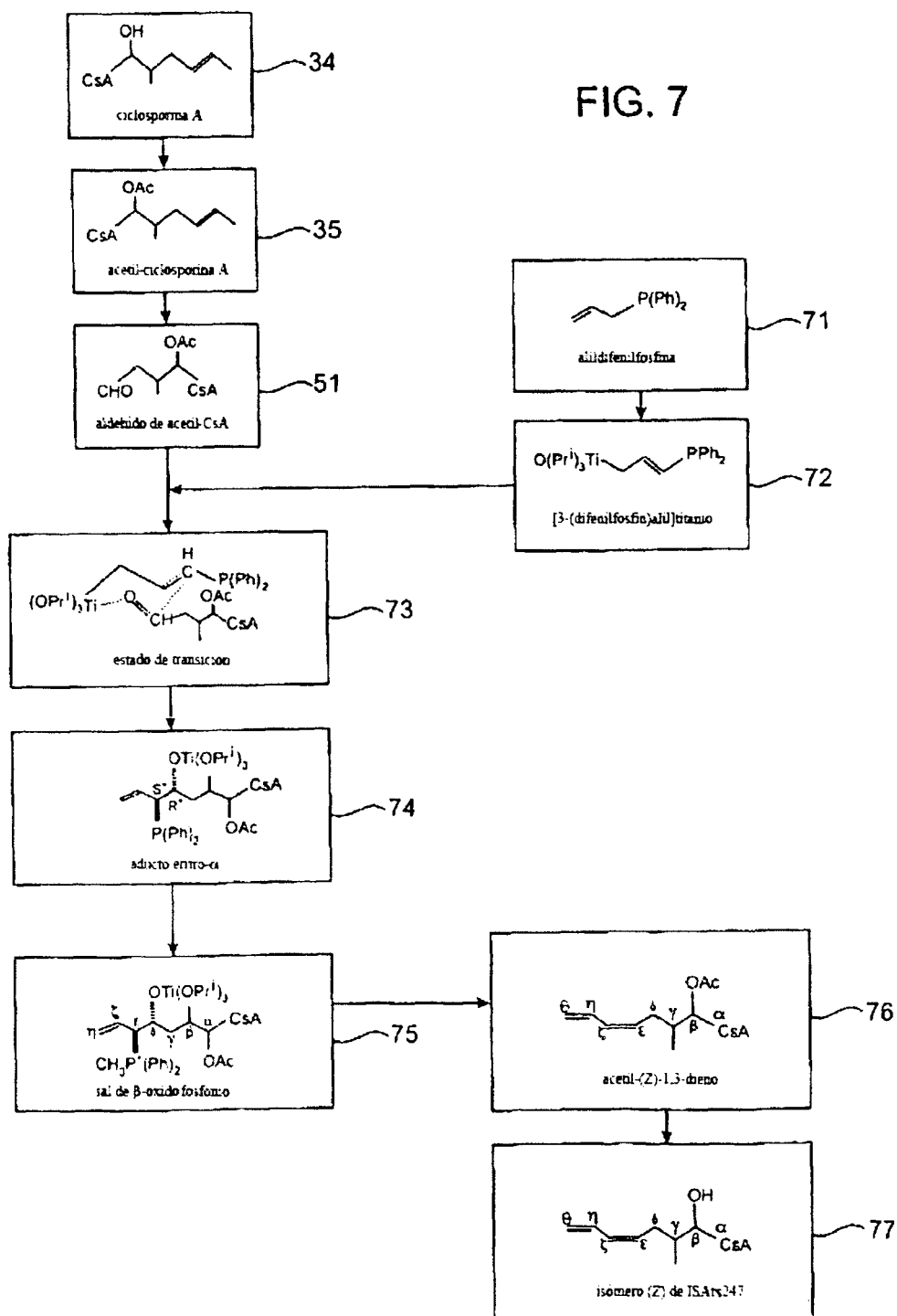


FIG. 6

FIG. 7



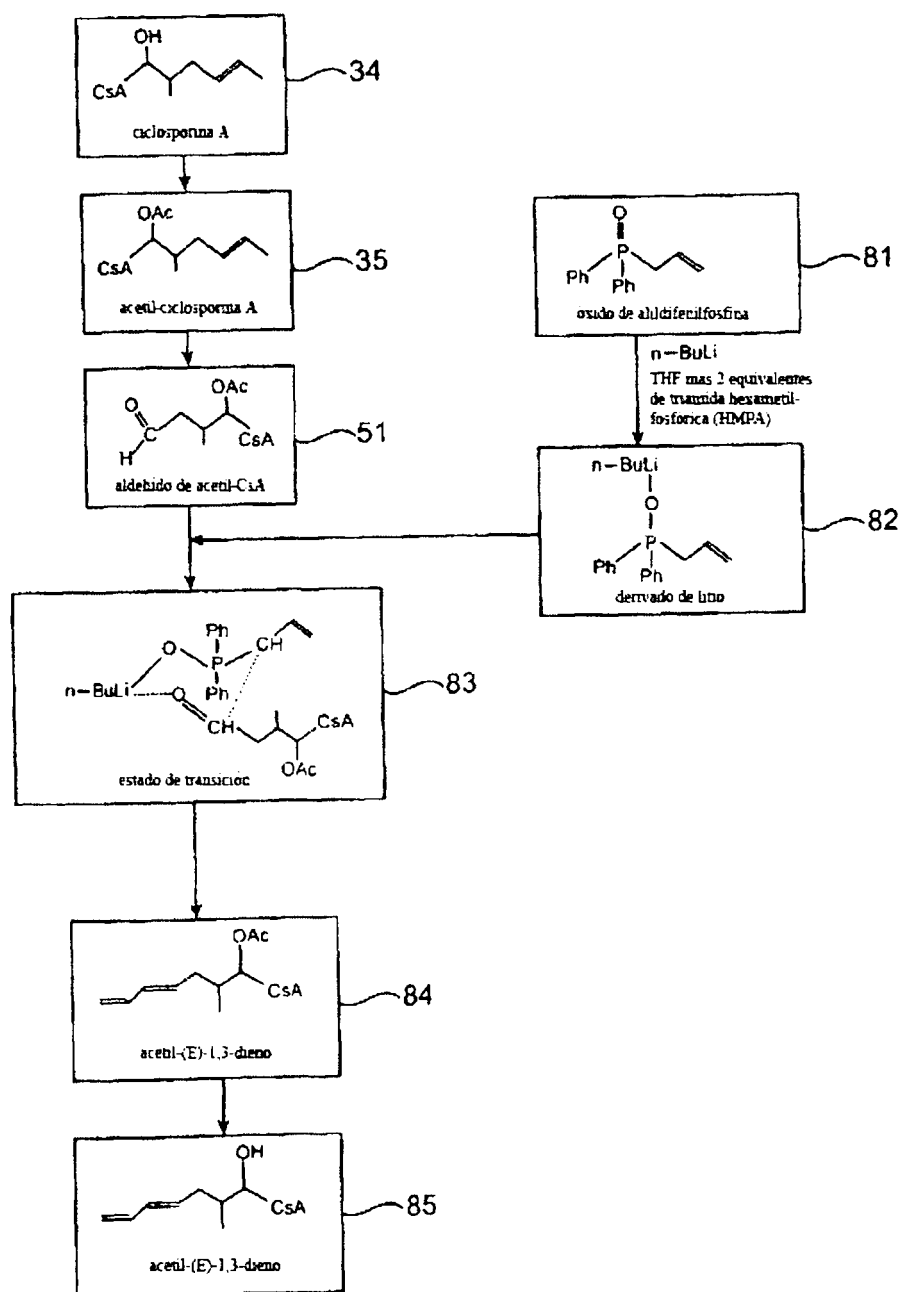


FIG. 8

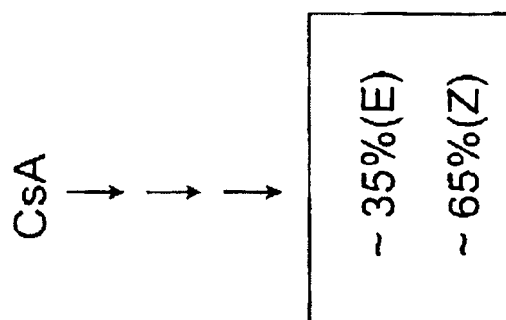


FIG. 9C

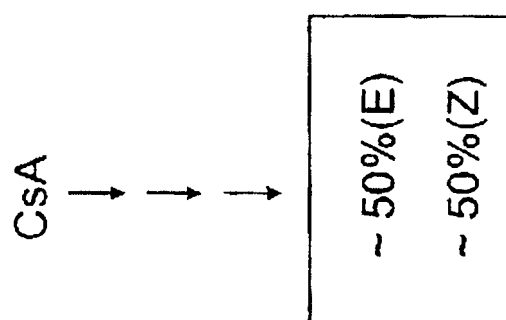


FIG. 9B

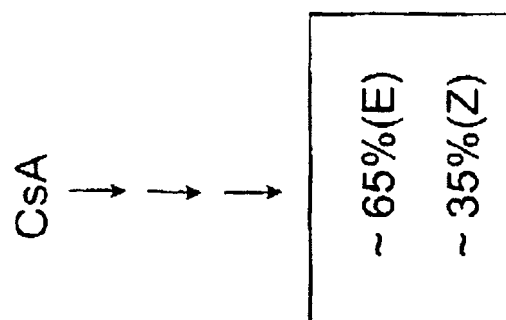


FIG. 9A

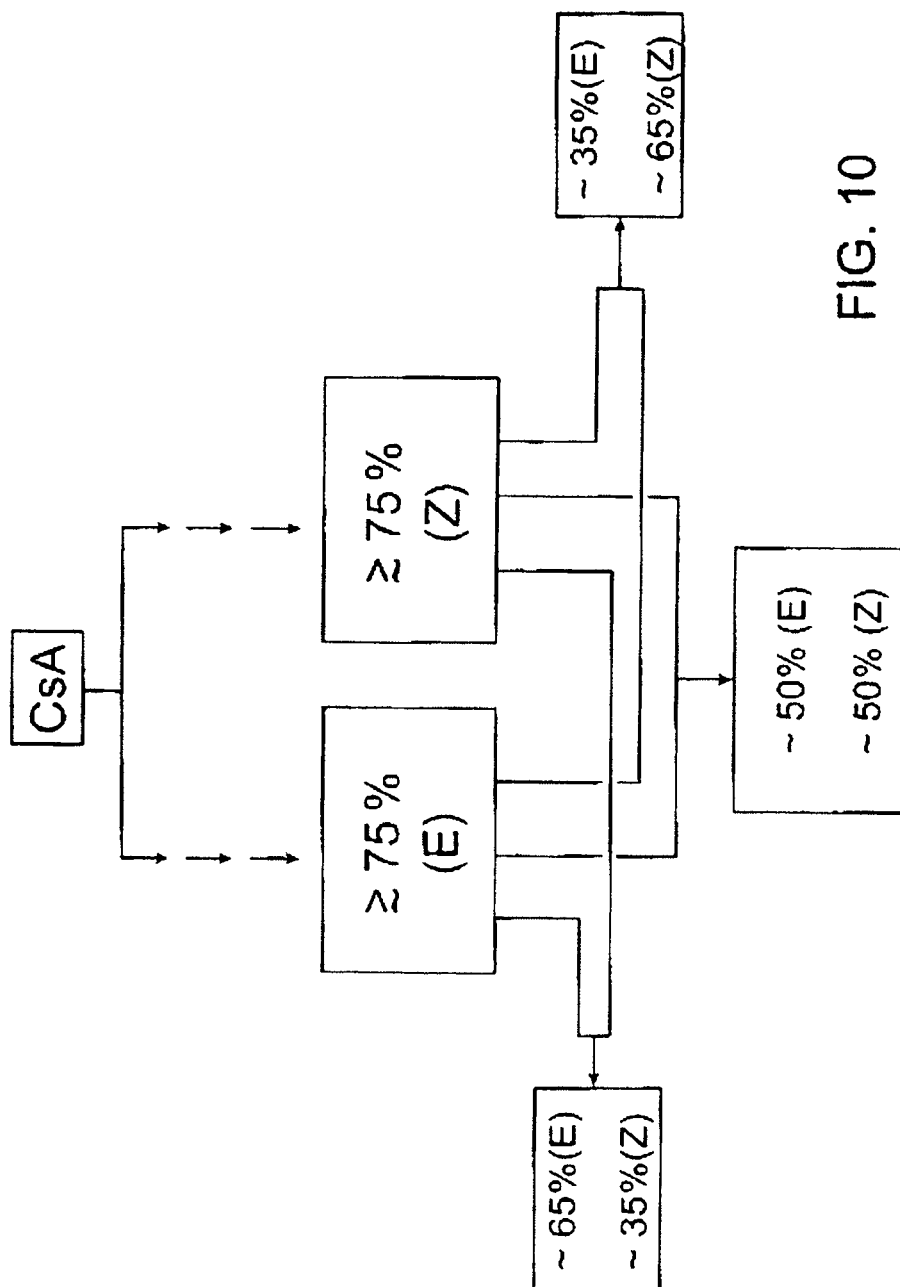


FIG. 10

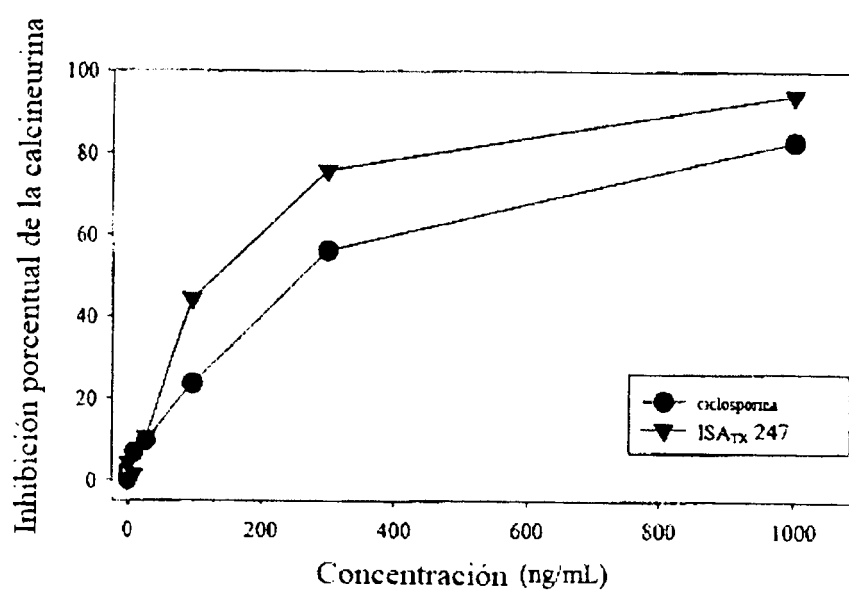


FIG. 11

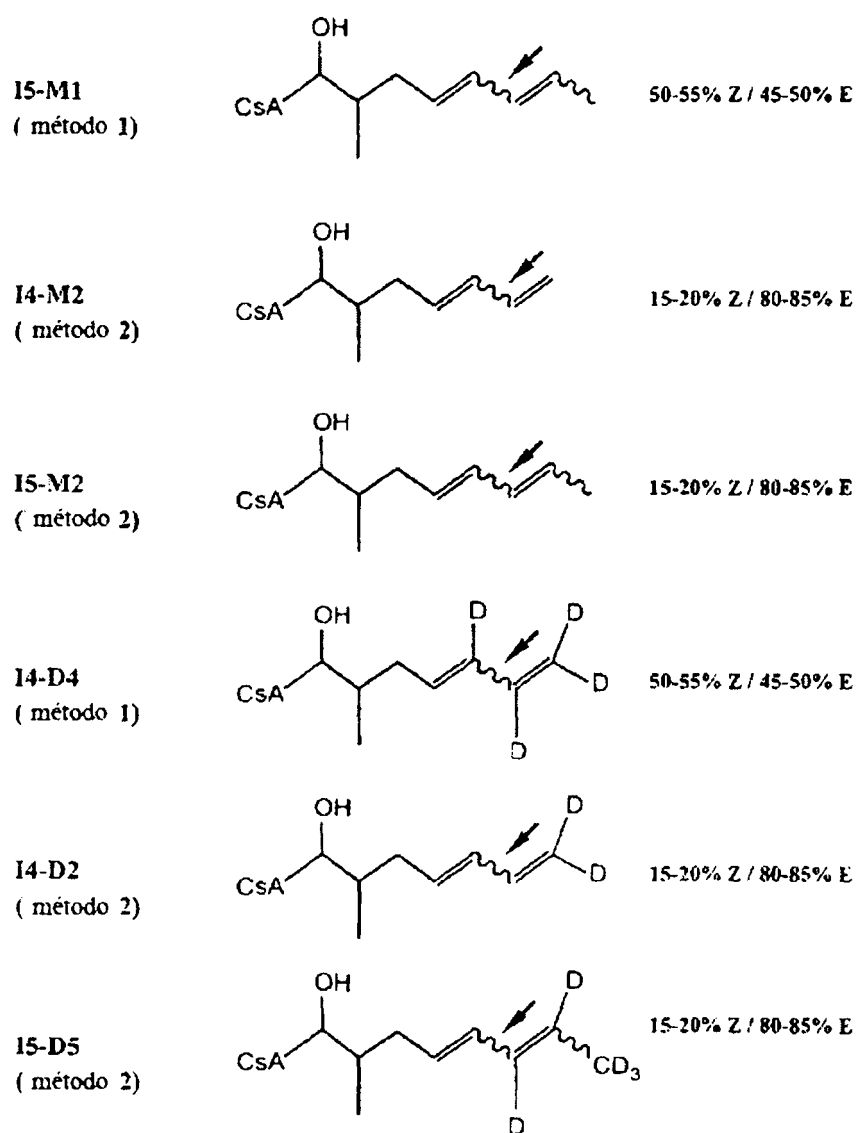


FIG. 12

Inhibición porcentual de la calcineurina
en sangre completa utilizando
ciclosporinas modificadas
(media \pm EEM)

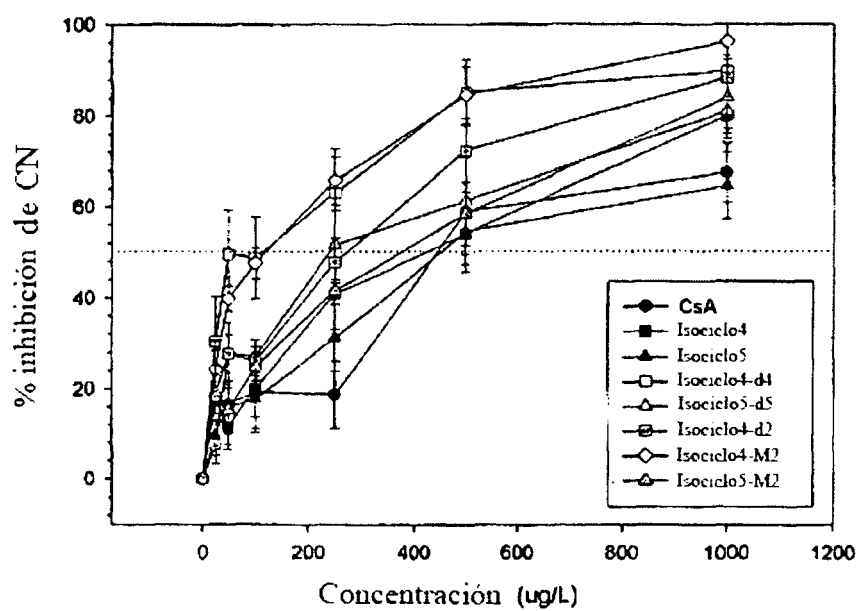


FIG. 13