

2075/93

KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY

11706  
70207

**21-Norrapamicin, e vegyületet hatóanyagként tartalmazó  
gyógyászati készítmények és eljárás előállításukra**

American Home Products Corporation,  
New York, New York, Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1993. 09. 22.

Elsőbbsége: 1992. 09. 24. (07/949,964)

Amerikai Egyesült Államok

K I V O N A T

A találmány tárgya a rapamicin egy analógja, a 21-norrapamicin és gyógyászati szempontból elfogadható sói, valamint e vegyületeket hatóanyagként tartalmazó gyógyászati készítmények, továbbá mindezek előállítása. A találmány arra a módszerre is vonatkozik, amelynek útján a 21-norrapamicin alkalmazásával immunszuppresszió idézhető elő.

A 21-norrapamicinnek immunszuppresszív, gyulladáscsökkentő, gombaellenes, daganatgátló és sejtburjánzást (szaporodást) gátló hatása van. Ennek az alapján transzplantátumok kilökésének, autoimmun megbetegedések, gyulladásos betegségek, szilárd daganatok, gombás fertőzések és simaizomsejtek burjánzásával járó érmegbetegedések kezelésére vagy megelőzésére alkalmazható önmagában vagy más immunszuppresszív hatóanyagokkal kombináltan. A 21-norrapamicint a *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 5491 törzs fermentációjával állítják elő.

2625/93

**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

11708

A

Képviselő:

Danubia Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

**21-Norrapamicin, e vegyületet hatóanyagként tartalmazó  
gyógyászati készítmények és eljárás előállításukra**

**AMERICAN HOME PRODUCTS CORPORATION,**

*Madison, New Jersey*

~~(New York, New York)~~ Amerikai Egyesült Államok

Feltalálók:

RUSSO Ralph James, Piscataway, New Jersey,

HOWELL Stanley Ray, San Diego, California,

SEHGAL Surendra Nath, Plainsboro, New Jersey,

Amerikai Egyesült Államok

Bejelentés napja: 1993.09.22.

Elsőbbsége: 1992.09.24. (07/949,964)

Amerikai Egyesült Államok

78038-1955-TEL

A találmány tárgya a rapamicin egy analógja, nevezetesen a 21-norrapamicin és gyógyászati szempontból elfogadható sói; e vegyületeket hatóanyagként tartalmazó gyógyászati készítmények; módszer a 21-norrapamicin alkalmazására immun-suppresszió kiváltására és transzplantátumok kilökésének meggátlására, valamint a gazdaszervezet/implantátum-betegség, autoimmun-megbetegedések, gyulladásos betegségek, szilárd daganatok, gombás fertőzések és a burjánzással járó (hiperproliferatív, túlburjánzásos) érmegbetegedések kezelésére vagy megelőzésére.

A rapamicin makrociklusos (nagy tagszámú) gyűrűs trién antibiotikum, melyet a *Streptomyces hygroscopicus* mikroorganizmus termel. Azt találták, hogy e vegyületnek gombaellenes hatása van, és különösen a *Candida albicans* ellen hatásos mind in vitro, mind in vivo körülmények között [C. Vezina és munkatársai: J. Antibiot. 28, 721 (1975); S. N. Sehgal és munkatársai: J. Antibiot. 28, 727 (1975); H. A. Baker és munkatársai: J. Antibiot. 31, 539 (1978); 3 929 992 és 3 993 749 számú Egyesült Államok-beli szabadalmi leírások].

Kimutatták, hogy a rapamicin önmagában (4 885 171 számú Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás) vagy picibanil-lal kombinálva (4 401 653 számú Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás) daganatgátló hatást fejt ki. R. Martel és munkatársai [Can. J. Physiol. Pharmacol. 55, 48 (1977)] közölték, hogy a rapamicin hatásos a kísérletesen előidézett, allergiás agyvelő-gerincvelő-gyulladás (encephalomyelitis), azaz a sclerosis multiplex modelljén; továbbá hatásos az adjuváns

izületi gyulladás, azaz a reumás izületi gyulladás modelljén; valamint hatékonyan gátolja az IgE-szerű antitestek kialakulását.

A rapamicin immunszuppresszív hatásait a FASEB 3, 3411 (1989) irodalmi helyen ismertették. Kimutatták továbbá, hogy a ciklosporin A és az FK-506 anyagok - amelyek szintén makrociklusos vegyületek - is immunszuppresszív hatóanyagok, tehát felhasználhatók transzplantátumok kilökésének a megelőzésére [FASEB 3, 3411 (1989); FASEB 3, 5256 (1989); R. Y. Calne és munkatársai Lancet 1183 (1978); valamint az 5 100,899 számú Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás].

Igazolták továbbá, hogy a rapamicin a szisztémás lupus erythematosus (5 078 999 számú Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás), tüdőgyulladás (5 080 899 számú Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás), az inzulinfüggő cukorbetegség [Fifth Int. Conf. Inflamm. Res. Assoc. 121 (Abstract) (1990)], valamint az érfal simaizomzatának érsérülést követő sejtburjánzásainak és az intima réteg vastagodásának megelőzésére és kezelésére alkalmazható [R. J. Morris; Heart Lung Transplant, 11, 197 (1992)].

Megmutatták továbbá, hogy a rapamicin 28- és 43-helyzetben észterezett, mono- és diacelizett származékai gombaelenes hatóanyagokként alkalmazhatók (4 316 885 számú Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás); e származékokat felhasználták a rapamicin vízben oldható "prodrug"-jainak (gyógyszer-előanyagainak) az előállítására (4 650 803 számú Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás). Újabban a rapami-

cin molekula konvencionális számozását megváltoztatták: a Chemical Abstracts nomenklatúrája szerint a fentebb említett észterek a 31- és 42-helyzetben észterezettek. Az új nevezéktan szerinti 21-norrapamicin a régebbi nomenklatúra szerint 19-norrapamicinnek is nevezhető.

E találmány tárgya a 21-norrapamicin és annak gyógyászati szempontból elfogadható sói. E vegyületek immunszuppresszív, gyulladásgátló, gombaellenes, daganatgátló és burjánzásgátló (antiproliferatív) hatóanyagokként alkalmazhatók. A 21-norrapamicin szerkezetét az (I) képlet mutatja.

E találmány a lényegileg tiszta 21-norrapamicinre is vonatkozik; a "lényegileg tiszta" meghatározáson azt értjük, hogy tisztasága 98%-nál nagyobb, és rapamicint nem tartalmaz.

A 21-norrapamicin gyógyászati szempontból elfogadható sóit szervetlen kationokkal, így nátrium-, kálium-, és ezekhez hasonló kationokkal, vagy szerves bázisokkal - például mono-, di- vagy trialkil-aminokkal, amelyek alkilrészenként 1-6 szénatomot tartalmaznak, vagy alkilrészenként 1-6 szénatomot tartalmazó mono-, di-, vagy tri(hidroxi-alkil)-aminokkal - alakíthatjuk ki.

A jelen találmány olyan gyógyászati készítményekre is vonatkozik, amelyek immunszuppressziót váltanak ki egy erre szoruló emlősállaton. E készítmények a 21-norrapamicin gyógyászati szempontból hatásos mennyiségét és gyógyászati szempontból alkalmas vivőanyagot tartalmaznak. A találmány tárgyát képezi továbbá az a módszer is, amelynek segítségével

vel egy erre szoruló emlősállaton immunszuppressziót idézünk elő; ez a módszer abban áll, hogy az emlősállatnak 21-norrapamicin immunszuppresszív hatású mennyiségét adagoljuk.

A 21-norrapamicin a *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 5491 törzs tenyészetének fermentálásával állítható elő; e törzs a National Center for Agricultural Utilization Research; USDA, ARS (Peoria, IL.) tenyészetgyűjteményéből kaptuk; az NRRL 5491 törzs az American Type Culture Collection (Rockville, MD) országos gyűjteményből is beszerezhető (tételszáma ATCC 29253).

A 21-norrapamicin az NRRL-5491 törzs levegőzött fermentációjával, standard fermentációs, elkülönítési és tisztítási eljárásokkal kapható. Az első lépésben alkalmazható oltvány előállításának és az NRRL 5491 fermentációjának a módszereit a 3 929 992 számú Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban közölték, melyet hivatkozásként foglalnunk e leírásunkba. Az 1. példában leírjuk az NRRL 5491 törzs fermentációjának konkrét megvalósítását, valamint a kapott 21-norrapamicin elkülönítését és tisztítását. A 21-norrapamicint előnyösen tudták termelni egy prekuzorral erősített fermentáció útján [N. L. Pavia: J. Nat. Prod. 51, 167 (1991)]. Az NRRL 5491 törzset meghatározott közegben fermentálták, amelyben a lizin koncentrációját korlátozták, a prolin koncentrációját kiegészítették, s így a mikroorganizmust arra készítették, hogy a makrolid molekulába lizin helyett prolint építsen be (mivel lizin a rapamicin makrolid gyűrűjében lévő pipekolinsav-egység prekuzora). A 2. példában

olyan előállítást írunk le 21-norrapamicin előállítására, amelyben prekuzorral segített fermentációt végzünk.

A 21-norrapamicin immunszuppresszív hatását in vitro körülmények között standard farmakológiai vizsgálattal állapítottuk meg: ennek során a 21-norrapamicin limfociták proliferációját (szaporodását) gátló képességét mértük. Összehasonlításra rapamicint is alkalmaztunk. Az alkalmazott eljárást és a kapott eredményeket az alábbiakban ismertetjük.

A komitogénnel előidézett timocita-szaporodás (burjánzás) eljárását alkalmaztuk, hogy reprezentatív vegyületek immunszuppresszív hatását in vitro körülmények között mérjük. Röviden összefoglalva úgy jártunk el, hogy normális BALB/c egerek timuszsejtjeit 72 órán át PHA-val, IL-1 jelenlétében tenyésztettük, és az utolsó 6 óra folyamán triciált timidinnel hoztuk kölcsönhatásba. A sejteket különböző koncentrációban vett rapamicinnel vagy anélkül, illetve vizsgálati vegyülettel vagy anélkül tenyésztettük. A sejteket összegyűjtöttük, és a beépített radioaktivitást meghatároztuk. A limfociták szaporodásának a gátlását a hatóanyaggal nem kezelt kontrollokon mért percenkénti beütésszám százalékos változásával értékeltük ki. Két kiértékelés során a 21-norrapamicin esetében az  $IC_{50}$  értéket 33,2, illetve 32,0 nM-nak, a rapamicin esetében az  $IC_{50}$  értékét 7,8, illetve 7,5 nM-nak találtuk. A 21-norrapamicin a proliferációt 1  $\mu$ M dózisban adagolva 96%-ban, 0,1  $\mu$ M dózisban adagolva 90%-ban gátolta. Ugyanezen koncentrációkban a rapami-

cin a proliferációt 97%-ban, illetve 96%-ban gátolta.

A fenti standard farmakológiai vizsgálati eljárás eredményei mutatják, hogy a 21-norrapamicin immunszuppresszív hatással rendelkezik, mivel képes a mitogén serkentésre válaszképpen fellépő T-sejtszaporodás gátlására.

Mivel a 21-norrapamicin szerkezeti szempontból a rapamicinhez hasonló, és hatásprofilja is hasonló a rapamicin profiljához, várható, hogy a 21-norrapamicin daganatgátló, gombaellenes, gyulladáscsökkentő és simaizomsejtek proliferációját gátló hatással rendelkezik.

Közelebbről a 21-norrapamicin az alábbi kóros állapotok és betegségek kezelésére vagy megelőzésére alkalmazható: átültetett szervek, így a vese, szív, máj, tüdő, csontvelő, hasnyálmirigy (szigetsejtek), szaruhártya, vékonybél és bőr-implantátumok, valamint szívbillentyű-átültetések kilökésének meggátlására; autoimmun-megbetegedések, például a lupus, reumás ízületi gyulladás, cukorbetegség, súlyos izomgyengeség és sclerosis multiplex, továbbá gyulladásos megbetegedése, például a pszoriázis, bőrgyulladás, ekcéma, seborrhea, a gyulladásos bélmegbetegedés, a szem uveagyulladása, szilárd daganatok, gombafertőzések, a tüdő gyulladásos megbetegedései, így az asztma, a krónikus, elzáródással járó tüdőbetegség, emfizéma, az akut légzéselégtelenségi tünetcsoport és bronchitisz kezelésére és megelőzésére; valamint olyan betegségformák kezelésére és megelőzésére, amelyek az érfal intima-rétege simaizomsejtjeinek szaporodásával járnak, ilyen például a biológiai vagy mechanikai eredetű érkároso-

dást követő érszűkülés.

A 21-norrapamicin más, immunszuppresszív hatóanyagokkal kombinálva is alkalmazható. Ilyen hatóanyagok például: az azatioprin, kortikoszteroidok - például a prednizon és a metil-prednizolon - ciklofoszfamid, rapamicin, ciklosporin A, OKT-3 és az ATG. Ha a 21-norrapamicint ezekkel az egyéb immunszuppresszív hatóanyagokkal vagy gyógyszerekkel kombináljuk, akkor ez utóbbiak toxicitása csökkenthető, mivel az immunszuppresszív kiváltásához kisebb mennyiségekben szükségesek. E kombinációs terápia alapjait Stepkowski vetette meg [Transplantation Proc. 23, 507 (1991)]; eredményei azt mutatták, hogy a rapamicin és a ciklosporin A terápiásánál kisebb dózisainak a kombinálásával egy idegenből beültetett szív túlélési ideje jelentősen meghosszabbodott.

A 21-norrapamicin önmagában vagy gyógyászati szempontból elfogadható vivőanyaggal gyógyszerformává alakítható. Ez utóbbi szilárd vagy folyékony lehet.

A szilárd vivőanyag egy vagy több komponensből állhat, amelyek egyszersmind ízesítőszer, csúsztatószer (gördülékenységet elősegítő szer), szolubilizáló-szuszpendálószerek, töltőanyagok, kenőanyagok, a sajtolást elősegítő anyagok, kötőanyagok és a tablettá szétválasztását elősegítő szerek is lehetnek; ilyen szer kapszulázó anyag is lehet. A porszerű gyógyszerformákban a vivőanyag finom eloszlású szilárd termék, amelyet a finoman elosztott hatóanyaggal összekeverünk. Tablettákban a hatóanyagot olyan vivőanyaggal keverjük, amely a szükséges préselési sajátságokkal rendelke-

zik (megfelelő arányban véve), majd a keveréket a kívánt alakká és méretté préseljük. A porok és tabletták előnyösen a hatóanyagot 99%-ig terjedő mennyiségben tartalmazzák. Szilárd vivőanyagként például kalcium-foszfát, magnézium-sztearát, talkum, cukrok, laktóz, dextrin, keményítő, zselatin, cellulóz, metil-cellulóz, (karboxi-metil)-cellulóz-nátrium-só, poli(vinil-pirrolidon), alacsony olvadáspontú viaszok és ioncserélő gyanták használhatók.

Oldatok, szuszpenziók, emulziók, szirupok, elixírek és nyomás alá helyezett készítmények előállítására folyékony vivőanyagokat alkalmazunk. A hatóanyagot a gyógyászati szempontból alkalmas, folyékony vivőanyagban - például vízben, szerves oldószerben, ezek keverékében vagy gyógyászati szempontból elfogadható olajokban vagy zsírokban - feloldhatjuk vagy szuszpendálhatjuk. A folyékony vivőanyag egyéb, gyógyászati szempontból elfogadható segédanyagokat - például szolubilizáló-, emulgeálószeret, pufferanyagokat, stabilizáló-, édesítő-, ízesítő-, szuszpendáló-, tömörítő-, színezőszereket, a viszkozitást és az ozmózisnyomást beállító anyagokat is tartalmazhat. Célszerűen alkalmazható folyékony vivőanyag - mind orális, mind parenterális adagolás céljára - például a víz [amely részben a fentebb említett adalékokat, például cellulózszármazékokat, előnyösen (karboxi-metil)-cellulóz-nátriumsó-oldatot is tartalmazhat], alkoholok (akár egyértékű, akár többértékű alkoholok, például glikolok) és azok származékai, valamint olajok (például frakcionált kókuszdióolaj vagy arahiszolaj) használhatók.

Parenterális adagolás céljára vivőanyagként olajszerű észtert, például etil-oleátot vagy izopropil-mirisztátot is alkalmazhatunk. Parenterális adagolás céljára steril folyékony készítményekben steril folyékony vivőanyagokat használhatunk. Nyomás alá helyezett készítményekben a folyékony vivőanyag például halogénezett szénhidrogén vagy gyógyászati szempontból elfogadható, más hajtószer lehet.

Azokat a folyékony gyógyászati készítményeket, amelyek steril oldatok vagy szuszpenziók, például intramuszkuláris, intraperitoneális vagy szubkután befecskendezéssel adagolhatjuk. Steril oldatokat intravénás úton is alkalmazhatunk. Orális alkalmazás során akár folyékony, akár szilárd gyógyszerformát alkalmazhatunk.

A 21-norrapamicin megfelelő végbélkúp alakjában rektálisan (végbélen át) is adagolható. Orrnyálkahártyán vagy hörgőkön át belégzéssel végzett adagolás céljára a 21-norrapamicin vizes vagy részben vizes oldattá alakíthatjuk, melyet aeroszol alakjában használhatunk. A 21-norrapamicin továbbá bőrön át (transzdermálisan) is adagolható; erre a célra transzdermálisan ható tapaszt alkalmazhatunk, amely a hatóanyagot és a hatóanyaggal szemben közömbös (inert) vivőanyagot tartalmazza, a bőrre nem toxikus, és lehetővé teszi a hatóanyag felszabadulását és a vérpályákba történő szisztémás felszívódását a bőrön át. A vivőanyag formája sokféle lehet, például krémek, kenőcsök, paszták, gélek, vagy záróeszköz. A kenőcsök és krémek olaj/víz vagy víz/olaj típusú, viszkózus, folyékony vagy félszilárd emulziók lehetnek. Ab-

szorpcióképes porokból álló paszták is alkalmazhatók, amelyek a hatóanyagot tartalmazó petróleum-származékban vagy hidrofil petróleumban diszpergálva vannak. Számos fedőeszköz alkalmazható, amely alkalmas arra, hogy a hatóanyagot a véráramba felszabadítsa. Ilyenek például a félig átjárható (szemipermeábilis) membránok: ezek egy üreget fednek be, amely a hatóanyagot vivőanyaggal együtt vagy vivőanyag nélkül tartalmazza; továbbá hatóanyagot tartalmazó matrixot is használhatunk. Az irodalomban más fedőeszközök is ismertek.

A gyógyászati készítményeket előnyösen az adagolási egység formájában, például tabletta vagy kapszula formájában alakítjuk ki. Ezekben a gyógyszerformákban a készítményt a hatóanyag megfelelő mennyiségét tartalmazó adagolási egységekre osztjuk. Az adagolási egység lehet csomagolt készítmény alakjában is, ilyenek például a csomagolt porok, fiolák, ampullák, előre megtöltött injekciós tűk vagy folyadékot tartalmazó zsákocskák. Az adagolási egység lehet maga a kapszula vagy a tabletta; a csomagolt forma e készítmények többszörösét tartalmazhatja. A kezelés során alkalmazható dózist a kezelőorvosnak kell megállapítania.

A 21-norrapamicin továbbá oldat-, krém- vagy öblítőoldat formájában is alkalmazható; ezeket gyógyászati szempontból elfogadható vivőanyagokkal alakítjuk ki, melyek a hatóanyagot 0,1-5%, előnyösen 2% mennyiségben tartalmazzák, és az érintett testterületre adagolhatók.

A szükséges dózis az adott készítménytől, az adagolás útjától, a tünetek súlyosságától és a kezelésre szoruló

egyéntől függ. A standard farmakológiai vizsgálatok során kapott eredmények alapján a 21-norrapamicin intravénás adagolására 0,001-100 mg/kg, előnyösen 0,005-20 mg/kg dózist, még előnyösebben 0,01-2 mg/kg dózist javasolunk. Napi orális adagolás céljára 0,005-300 mg/kg, előnyösen 0,01-200 mg/kg, még előnyösebben 0,05-40 mg/kg dózis alkalmazása javasolt.

A kezelést általában a vegyület legkedvezőbb dóziséknél kisebb adagokkal kezdjük, majd a dózist növeljük, amíg az adott körülmények között a legkedvezőbb hatást el nem érjük. Az orális, parenterális, orrnyálkahártyán át végzett, bronchusokon át, bőrön át végzett vagy rektális adagolás céljára szolgáló pontos adagokat a kezelőorvos határozza meg az adott, kezelésre szoruló egyén ismeretének az alapján. A 21-norrapamicint igen kívánatos általában olyan koncentrációban adagolni, amely kedvező eredményeket ad káros mellékhatások előidézése nélkül.

Az alábbi, nem korlátozó jellegű példákban bemutatjuk a 21-norrapamicin előállítását konvencionális úton, valamint a prekürzorral segített fermentáció útján.

### 1. példa

A *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 5491 törzset zabliszt-paradicsompasztás ferdeagarlemezen (T. G. Pridham és munkatársai: Antibiotic Annual 1956-1957, Medical Encyclopedia Inc., New York, 947. old.), valamint ugyanazt a közeget tartalmazó Roux edényekben szaporítottuk és tartottuk. Kedvező szaporulatot értünk el 28 °C hőmérsékleten végzett 7 napos

inkubálással. Az egyik Roux-edényből származó spórákat leöblítettük, és 50 ml steril desztillált vízben szuszpendáltuk. Ezt a szuszpenziót használtuk fel az első lépésben végzett oltásra.

Az első lépésben alkalmazott oltvány: 500 ml térfogatú Erlenmeyer lombikokba 100 ml-t töltöttünk az alábbi összetételű közegből:

|                                                               | <u>tömeg/térf. %</u> |
|---------------------------------------------------------------|----------------------|
| Szójababliszt (Archer-Daniels, Midland,<br>Mich. "Special X") | 4                    |
| Glükóz (Cerelese)                                             | 2                    |
| Ammónium-szulfát                                              | 0,3                  |
| Kalcium-karbonát                                              | 0,15                 |

A lombikokat 121 °C hőmérsékleten 35 percig sterilizáltuk, majd 25 °C-ra hűtöttük. A lombikokba 4% (4 ml) fentebb leírt spóraszuszpenziót oltottunk, és forgó-rázóasztalon 240 percenkénti fordulatszámmal (rpm) 24 órán át 25 °C hőmérsékleten forgattuk.

A második lépésben alkalmazott oltvány: 24 literes, 3,2 liter fentebb leírt oltványközeget tartalmazó, laposaljú lombikokat (pH 7,1-7,3) 121 °C hőmérsékleten 35 percig autoklávozva sterilizáltunk, utána az oldatlan anyag ismételt szuszpendálása céljából ráztuk, majd további 45 percig ismételten sterilizáltuk. Ekkor a lombikokat 25 °C-ra hűtöttük, és 64 ml, első lépésből származó inokulummal oltottuk, váltakozó mozgást végző rázóasztalra helyeztük, és percenként 65 átfordítással 18 órán át 25 °C hőmérsékleten inkubáltuk.

A termelő lépés: e lépést 250 literes New Brunswick Model F-250 fermentorokban hajtottuk végre, amelyeket automatikus habzásgátló-adagoló rendszerrel és pH-szabályzóval láttunk el. A fermentorokba 160 liter, alábbi komponenseket tartalmazó, termelő közeget töltöttünk:

|                                                                     | <u>tömeg/térf.%</u> |
|---------------------------------------------------------------------|---------------------|
| Szójababliszt (Archer-Daniels, Midland,<br>Mich. "Special X")       | 3                   |
| Glükóz (Cerelese)                                                   | 2                   |
| Ammónium-szulfát                                                    | 0,1                 |
| Kálium-foszfát (egyszer bázisos)                                    | 0,5                 |
| Habzásgátlószer ("DF-143-PX" Mazer<br>Chemicals, Inc. Gurnee, Ill.) | 0,05                |

A fermentorokat 121 °C hőmérsékleten 30 percig sterilizáltuk, majd lehűtöttük, és a pH értékét ammónium-hidroxiddal 5,8-6,2-re állítottuk. Ekkor a fermentorokat egy lombiknyi (2%), második lépésből származó inokulummal oltottuk, és a fermentációt lejátszattuk 25 °C hőmérsékleten, miközben 0,25 térf./térf./perc sebességgel levegőztettük, és 200 rpm sebességgel kevertük.

A fermentációs folyadék pH-értéke 30-35 óra elmúltával csökkenni kezdett; 6,0-ra szabályoztuk ammónium-hidroxid automatikus, szükség szerinti hozzáadásával a fermentáció végéig. A tenyésztésnek körülbelül 48 órája után a folyadékban a glükóz koncentrációja körülbelül 0,5%-ra csökkent, ezért folyamatosan 40%-os glükózoldatot adagoltunk hozzá naponta a fermentációs elegyre számítva 3,75% mennyiségben a

fermentáció befejezéséig. *Candida albicans*-sal oltott agar-lemezeken végzett mikrobiológiai mérés alapján 4-5 nap alatt a fermentációs folyadék titere 60  $\mu\text{g/ml}$ -re állt be, ekkor a fermentációt leállítottuk.

A 21-norrapamicint az alábbi eljárással extraháltuk és izoláltuk.

A micéliumos tenyésztőfolyadékot acetonnal extraháltuk, majd vákuumban bepároltuk, amíg csak a vizes része maradt vissza. Ezt a vizes részt diklór-metánnal háromszor extraháltuk, a diklór-metános kivonatokat egyesítettük, és vákuumban bepároltuk. A maradékot kis térfogatú diklór-metánban oldottuk, és kis méretű szilikagéloszlopra vittük. A szilikagélt "flash" kromatográfiával eluáltuk; gradiens elúciót végeztünk úgy, hogy az eluálást hexán és etil-acetát 1:1 térfogatarányú elegyével kezdtük, és 100%-os etil-acetáttal fejeztük be. Végül az oszlopot acetonnal mostuk. Minden egyes frakcióból vett alikvotot nitrogéngáz alatt bepároltunk, és a maradékot acetonitrilben oldva HPLC módszerrel elemeztük. A mintákat Nova Pak C18 15 cm x 3,9 mm oszlopra (Waters) vittük, mozgó fázisként 60:40 arányú dioxán-víz-keveréket alkalmaztunk 1,0 ml/perc áramlási sebességgel. A retenciós idő megállapítása céljából 280 nm hullámhosszúságú UV fénnel végeztük a detektálást. A fenti HPLC körülmények között a 21-norrapamicin retenciós idejét 7,3 percnél találtuk.

A 21-norrapamicint tartalmazó frakciókat bepároltuk, és a maradékot Dynamax C18 oszlopon (belső átmérője 2,5 cm)

preparatív kromatográfiával tisztítottuk. Mozgó fázisként acetonitril és víz 70:30 térfogatarányú elegyét alkalmaztuk 15 ml/perc áramlási sebességgel. A detektálást 280 nm hullámhosszúságú UV fénnnyel végeztük. A frakciók tisztaságát a fentebb leírtak szerint analitikai HPLC eljárással ellenőriztük, a 21-norrapamicint tartalmazó frakciókat egyesítettük, bepároltuk, s így tiszta 21-norrapamicinhez jutottunk.

A negatív ionokkal végzett FAB (gyorsatombombázásos) tömegszínekép  $m/z = 899$  és  $898$  keverékét, valamint egy fragmentum-iont mutatott  $m/z = 576$  helyen (ez a molekula makrociklusának C-21-től C-1-ig/C-1-től C-29-ig terjedő része). Megfigyeltünk továbbá egy fragmentumot  $m/z = 590$  értéknél, amely a molekula C-32-től C-36-ig és C-1-től C-23-ig terjedő részéből származik.

$^1\text{H}$ -NMR színekép (alumínium-oxiddal közömbösített  $\text{CDCl}_3$ , amely belső standardként TMS-t tartalmaz; 400 MHz): az asszignált rezonanciák ( $\delta$ , ppm): 3,38 (C-41  $\text{OCH}_3$ ), 3,36 (C-32  $\text{O-CH}_3$ ), 3,11 (C-7  $\text{OCH}_3$ ), 1,75 (C-30 vinyl- $\text{CH}_3$ ), 1,64 (C-6 vinyl- $\text{CH}_3$ ), 1,09 (C-28 szekunder  $\text{CH}_3$ ), 1,03 (C-36 szekunder- $\text{CH}_3$ ), 1,01 (C-34 szekunder  $\text{CH}_3$ ), 0,93 (C-12 szekunder  $\text{CH}_3$ ) és 0,89 (C-37 szekunder  $\text{CH}_3$ ). 5,44 ppm-nél a H-22 proton volt megfigyelhető.

## 2. példa

A *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 5491 törzset az 1. példában leírt módon tenyésztettük és tartottuk, és a spóraszuszpenziót is az 1. példa szerint állítottuk elő. A

spórák szaporítására és érlelésére 7-15 napos inkubálás elegendő volt. Ezután a spórákat minimális térfogatú steril vízzel lekaparva erősen viszkózus oltványt kaptunk. E spóraszuszpenzió megközelítőleg 5 ml térfogatát alkalmaztuk 500 ml alábbi összetételű közeg oltására, amelyhez a 21-norrapamicin termelésének fokozására prolint és lizint adtunk.

|                                                                     |         |
|---------------------------------------------------------------------|---------|
| Víz                                                                 | 1800 ml |
| Kálium-dihidrogén-foszfát                                           | 4 g     |
| Dikálium-hidrogén-foszfát                                           | 4 g     |
| Nátrium-klorid                                                      | 10 g    |
| Kalcium-karbonát                                                    | 3 g     |
| Glicerín                                                            | 40 ml   |
| L-Glutamát                                                          | 4 g     |
| L-Leucin                                                            | 2 g     |
| Élesztőkivonat                                                      | 10 g    |
| Nátrium-szulfát                                                     | 0,71 g  |
| Magnézium-szulfát-heptahidrát                                       | 0,51 g  |
| Vas(II)-szulfát-heptahidrát                                         | 0,2 g   |
| Magnézium-klorid-hexahidrát                                         | 1,02 g  |
| Kobalt(II)-klorid                                                   | 20 mg   |
| Borax                                                               | 20 mg   |
| $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 36 mg   |
| Mangán(II)-szulfát-monohidrát                                       | 24 mg   |
| Cink-szulfát                                                        | 120 mg  |
| Réz(II)-klorid-dihidrát                                             | 2,6 mg  |

A közeg pH-értékét 6,0-ra állítottuk, és prolint,

valamint lizint adtunk a közeghez különböző koncentrációkban, amint ez az alábbi táblázatból kitűnik. Az oltott lombikokat 25 °C hőmérsékleten forgó rázógépen 200 rpm sebességgel mozgatva inkubáltuk. Hét napos inkubálás után a micéliumot elkülönítettük úgy, hogy a fermentációs folyadékot 1300 x g sebességgel 12 percig centrifugáltuk. A micéliumkalácsot (pelletet) háromszoros térfogatú acetonnal háromszor extraháltuk erélyes keverés közben. Ezután az 1. példában leírt eljárással HPLC elemzést végeztünk és a terméket tisztítottuk. Az alábbi táblázatban bemutatjuk a prolin és lizin koncentrációjának változtatásával nyert 21-norrapamicin, illetve rapamicin hozamát.

**Prekurzorral segített fermentációban termelt 21-norrapamicin hozama**

| Prolin | Lizin | 21-norrapamicin<br>(mg/liter) | rapamicin<br>(mg/liter) |
|--------|-------|-------------------------------|-------------------------|
| 0,6%   | 0,05% | 14,6                          | 60                      |
| 0,6%   | 0,1%  | 10,6                          | 53                      |
| 0,6%   | 0,0%  | 12,6                          | 36                      |
| 0,4%   | 0,05% | 9,5                           | 60                      |
| 0,3%   | 0,05% | 7,4                           | 57                      |
| 0,2%   | 0,05% | 5,0                           | 57                      |

### Szabadalmi igénypontok

1. Az (I) képletű 21-norrapamicin és gyógyászati szempontból elfogadható sói.
2. Gyógyászati készítmény, amely egy rásszoruló emlősből immunszuppressziót idéz elő, **azzal jellemezve**, hogy 21-norrapamicin gyógyászati szempontból hatásos mennyiségét és valamilyen, gyógyászati szempontból elfogadható vivőanyagot tartalmaz.
3. Módszer immunszuppresszió előidézésére egy rásszoruló emlőszállatban, **azzal jellemezve**, hogy ennek az emlőszállatnak 21-norrapamicin immunszuppresszív hatású mennyiségét adagoljuk.
4. Módszer átültetett szerv kilökésének, gazdaállat/beültetett szerv kapcsolatú betegség, autoimmun betegségek, gyulladásos megbetegedések, szilárd daganatok, gombás fertőzések, a tüdő gyulladásos megbetegedései, valamint az érfal simaizomsejtjeinek burjánzásával járó kóros állapotok kezelésére vagy megelőzésére, **azzal jellemezve**, hogy 21-norrapamicin hatásos mennyiségét adagoljuk.
5. A 4. igénypont szerinti módszer, **azzal jellemezve**, hogy az átültetett szerv vese, szív, máj, tüdő, csontvelő, hasnyálmirigy (szigetsejtek) szaruhártya, vékonybél, bőr vagy szívbillentyű.
6. A 4. igénypont szerinti módszer, **azzal jellemezve**, hogy az autoimmun megbetegedés lupus, reumás ízületi gyulladás, cukorbetegség, súlyos izomgyengeség vagy sclerosis

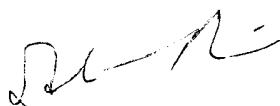
multiplex.

7. A 4. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a gyulladásos megbetegedés pszoriázis, bőrgyulladás, ekcéma, seborrhoea, gyulladásos bélmegbetegedés vagy a szem uveagyulladása.

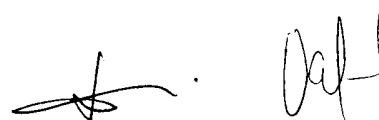
8. A 4. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a tüdő gyulladásos megbetegedése asztma, elzáródással járó krónikus tüdőmegbetegedés, emfizéma, akut légzéselégtelenségi tünetcsoport vagy bronchitisz.

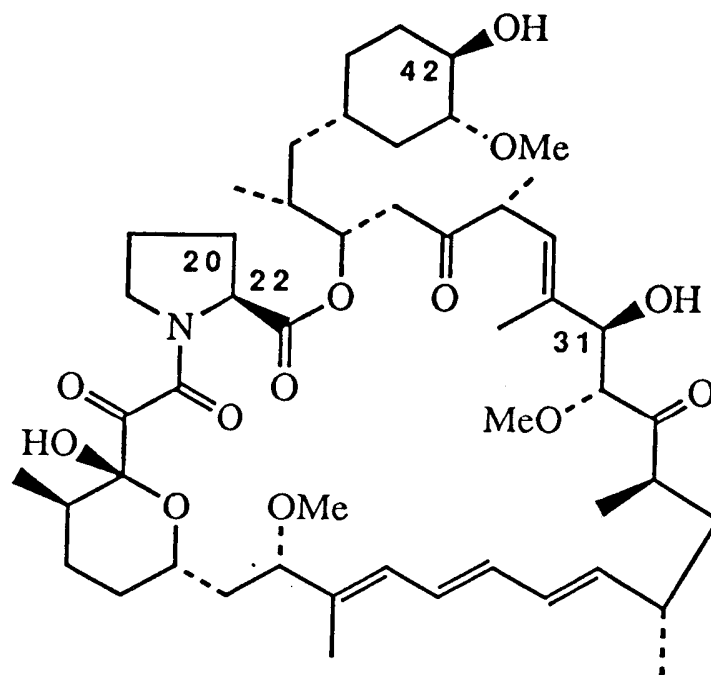
9. A 4. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a kóros állapot az érfalnak a simaizomsejtjei burjánzása következtében beálló szűkülése (restenosis).

10. Eljárás rászoruló emlőszállaton immunszuppressziót előidéző gyógyászati készítmény előállítására, azzal jellemezve, hogy hatóanyagként egy 1. igénypont szerinti (I) képletű 21-norrapamicinnek vagy gyógyászati szempontból elfogadható sójának gyógyászati szempontból hatásos mennyiségét a gyógyszerkészítésben szokásos hígítószerekkel, vivő- és/vagy segédanyagokkal összekeverve gyógyászati készítménnyé alakítjuk.



A bejelentő helyett  
a meghatalmazott:





(I)

*[Handwritten signature]*