



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 11 678 T2** 2005.07.14

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 246 839 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 11 678.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/33169**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 983 997.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/042282**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.12.2000**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **14.06.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.10.2002**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **16.06.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.07.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C07K 11/00**

C07K 5/10, A61K 38/15

(30) Unionspriorität:

169731 P **08.12.1999** **US**

193582 P **30.03.2000** **US**

(73) Patentinhaber:

Xcyte Therapies, Inc., Seattle, Wash., US

(74) Vertreter:

Eisenführ, Speiser & Partner, 28195 Bremen

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**SKOV, The Panum institute, Soren, 2200
Copenhagen N, DK**

(54) Bezeichnung: **DEPSIPEPTIDE UND DEREN ANALOGE ZUR VERWENDUNG ALS IMMUNOSUPPRESSIVA**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Depsipeptide oder Kongenere davon sowie die Verwendung derselben als Immunsuppressivum und insbesondere die Verwendung eines Depsipeptids wie FR901228 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Verhinderung einer Immunstörung wie beispielsweise Autoimmun- oder Entzündungskrankheiten, und zur Reduzierung der Immunabstoßung von transplantiertem Material.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Modulation des Immunsystems ist in einer Vielzahl von Zusammenhängen, von der Hemmung einer Autoimmunantwort bis zur Kontrolle von Infektionskrankheiten und der Hemmung von Transplantat-/Gewebeabstoßung, wünschenswert. Der grundsätzliche Ansatz, die Abstoßung zu mildern, besteht in der pharmakologischen Suppression des Immunsystems des Empfängers. Mit Blick hierauf sind die meisten derzeit verwendeten immunmodulatorischen Verbindungen Immunsuppressiva. Seit den frühen 1960ern ist die Verfügbarkeit dieser immunsuppressiven Mittel auf einige wenige Arzneimittel beschränkt worden. In den frühen 1980ern ist Cyclosporin jedoch neben Azathioprin und Corticosteroiden weithin erhältlich geworden und ist seither das Arzneimittel der Wahl gewesen. (Kobashigawa, Trans. Proc. 30: 1095–1097, 1998; Isoniemi, Ann. Chi. Gyn. 86: 164–170, 1997). Die neueren immunsuppressiven Mittel sind jedoch in nur geringer Zahl vorhanden und leiden unter vielen der unerwünschten Nebenwirkungen, die mit früheren Mitteln verbunden waren. Obwohl diese Arzneimittel, entweder als einzelne Mittel oder in Kombination mit anderen Immunsuppressiva, dazu verwendet wurden, die Überlebensdauern von transplantierten Organen zu erhöhen, sind viele auch zur Behandlung von Entzündungs- und Autoimmunkrankheiten, verzögerter Überempfindlichkeit, Transplantat-gegen-Wirt-Krankheiten und ähnlicher mit dem Immunsystem verbundenen Krankheiten geeignet.

[0003] Gegenwärtig verwendete immunsuppressive Arzneimittel beinhalten antiproliferative Mittel wie Methotrexat, Azathioprin und Cyclophosphamid. Da diese Arzneimittel die Mitose und die Zellteilung beeinträchtigen, haben sie schwere toxische Wirkungen auf alle Zellen mit hohen Umsatzraten, wie beispielsweise Knochenmarkszellen und die Auskleidung des Magendarmtraktes (Miller, Semin. Vet. Med. Surg (3) : 144–149, 1997). Entsprechend sind Knochenmarkdepression und Leberschäden häufige Nebenwirkungen.

[0004] Antientzündliche Verbindungen, die zur Induktion einer Immunsuppression verwendet wurden, beinhalten adrenale Corticosteroide wie Dexamethason und Prednisolon. Die häufigen Nebenwirkungen, die bei Verwendung dieser Verbindungen beobachtet werden, sind häufige Infektionen, anormaler Metabolismus, Hypertonie und Diabetes.

[0005] Andere immunsuppressive Verbindungen, die gegenwärtig verwendet werden, um die Lymphozytenaktivierung und anschließende Proliferation zu hemmen, beinhalten Cyclosporin, FK506 und Rapamycin. Diese Arzneimittel hemmen entweder die kalziumabhängige Phosphatase Calcineurin (Cyclosporin und FK506) oder hemmen die p70S6-Kinase, die für wachstumsfaktorinduzierte Signalübertragung verantwortlich ist (Rapamycin). (Liu et al., Cell 66: 807–815, 1991; Henderson et al., Immun. 73: 316–321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5: 763–773, 1993; Isoniemi (supra)). Cyclosporin und verwandte Verbindungen befinden sich unter den am häufigsten verwendeten Immunsuppressiva. Cyclosporin wird typischerweise zur Verhinderung oder Behandlung einer Organabstoßung bei Nieren-, Leber-, Herz-, Pankreas-, Knochenmarks-, und Herz-Lungen-Transplantaten verwendet sowie zur Behandlung von Autoimmun- und Entzündungskrankheiten wie Crohn-Krankheit, aplastische Anämie, Multiple Sklerose, Myasthenia gravis, Uveitis, biliäre Zirrhose etc. Cyclosporin leidet jedoch unter einem schmalen therapeutischen Dosisfenster und schweren toxischen Wirkungen einschließlich Nephrotoxizität, Hepatotoxizität, Hypertonie, Hirsutismus, Krebs und Neurotoxizität. (Philip und Gerson, Clin. Lab. Med. 18 (4): 755–765, 1998; Hojo et al., Nature 397: 530–534, 1999).

[0006] Darüber hinaus wurden monoklonale Antikörper wie OKT3 verwendet, um die Transplantatabstoßung zu verhindern und/oder zu behandeln. Die Einführung von monoklonalen Antikörpern in einen Patienten induziert wie bei vielen biologischen Verfahren verschiedene Nebenwirkungen, wie beispielsweise Rigor und Dyspnoe. (Richardset al., Cancer Res. 59 (9): 2096–2101, 1999).

[0007] Im Zusammenhang mit vielen lebensbedrohlichen Krankheiten wird die Organtransplantation als Standardbehandlung und in vielen Fällen als einzige Alternative zum Tod angesehen. Die Immunantwort gegen fremde Zelloberflächenantigene auf dem Transplantat, die durch den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)

kodiert werden und auf allen Zellen zugegen sind, schließt eine erfolgreiche Transplantation von Geweben und Organen im allgemeinen aus, sofern die Transplantatgewebe nicht von einem kompatiblen Spender stammen und die normale Immunantwort unterdrückt wird. Wenn es sich nicht um identische Zwillinge handelt, wird die höchste Kompatibilität und in der Folge davon Langzeittransplantationsrate durch Verwendung von MHC-identischen Geschwisterspendern oder MHC-identischen nichtverwandten Leichenspendern erreicht (Strom, Clin. Asp. Autoimm. 4: 8–19, 1990). Solche idealen Übereinstimmungen sind jedoch schwer zu erreichen. Darüber hinaus existiert bei dem steigenden Bedarf an Spenderorganen gegenwärtig eine zunehmende Knappheit von transplantierten Organen. Entsprechend hat sich die Xenotransplantation zu einem intensiv untersuchten Gebiet entwickelt, die jedoch in Bezug auf die Abstoßung innerhalb des Empfängers auf viele Hindernisse stößt (Kaufman et al., Annu. Rev. Immunol. 13 : 339–367, 1995).

[0008] Die Wirtsantwort auf ein Allogtransplantat beinhaltet eine komplexe Reihe von zellulären Wechselwirkungen unter T- und B-Lymphozyten sowie Makrophagen oder dendritischen Zellen, die Fremdanigen erkennen und dadurch aktiviert werden (Strom, s. oben; Cellular and Molecular Immunology, Abbas et al. (Hrsg.), WB Saunders Co., Penn., 1994). Kostimulatorische Faktoren, in erster Linie Zytokine und spezifische Zell-Zell-Wechselwirkungen, bereitgestellt durch aktivierte akzessorische Zellen wie Makrophagen oder dendritische Zellen, sind wesentlich für die T-Zell-Proliferation. Diese Makrophagen und dendritischen Zellen heften sich entweder direkt durch spezifische Adhäsionsproteine an T-Zellen oder sie sekretieren Zytokine, die T-Zellen stimulieren, wie beispielsweise IL-12 und IL-15 (Strom, In : Organ Transplantation : Current Clinical and Immunological Concepts, 1989). Akzessorische zellabgeleitete kostimulatorische Signale stimulieren die Aktivierung der Interleukin-2-(IL-2)-Gentranskription und die Expression von hochaffinen IL-2-Rezeptoren in T-Zellen (Pankewycz et al., Transplantation 47: 318, 1989 ; Cantrell et al., Science 224: 1312, 1991 ; Williams et al., J. Immunol. 132 :2330–2337, 1984). IL-2, ein 15-kDa-Protein, wird bei Antigenstimulation durch T-Lymphozyten ausgeschieden und ist für eine normale Immunreaktivität erforderlich. IL-2 stimuliert die Proliferation und Differenzierung lymphoider Zellen durch Bindung an IL-2-spezifische Zelloberflächenrezeptoren (IL-2R). IL-2 initiiert auch die T-Helferzellen-Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und stimuliert die Sekretion von Interferon-(IFN-), das wiederum die zellzerstörerischen Eigenschaften von Makrophagen aktiviert (Farrar et al., J. Immunol. 126 : 1120–1125, 1981). Des weiteren sind IFN- und IL-4 ebenfalls wichtige Aktivatoren der MHC-Klasse-II-Expression in den transplantierten Organen, wodurch sie die Abstoßungskaskade durch Steigerung der Immunogenität des verpflanzten Organs ausweiten (Pober et al., J. Exp. Med. 157: 1339, 1983 ; Kelley et al., J. Immunol. 132 : 240–245, 1984).

[0009] Das gegenwärtige Modell einer T-Zell-vermittelten Antwort legt nahe, dass T-Zellen in der T-Zell-Zone von sekundären lymphatischen Organen, vor allem durch dendritische Zellen, vorbereitet werden. Die anfängliche Wechselwirkung erfordert einen Zell-zu-Zell-Kontakt zwischen antigenbeladenen MHC-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen (APZs) und dem T-Zell-Rezeptor(TZR)/CD3-Komplex auf T-Zellen. Der Eingriff des TZR/CD3-Komplexes induziert die CD154-Expression vornehmlich auf CD4-T-Zellen, die wiederum durch den CD40-Eingriff die APZ aktivieren, was zu einer verbesserten Antigenpräsentation führt (Grewal et al., Ann. Rev Immunol. 16: 111–135, 1998). Diese wird teilweise verursacht durch Hochregulierung der CD80- und CD86-Expression auf den APZ, die beide Liganden für das wichtige kostimulatorische Molekül CD28 auf T-Zellen sind. Der Eingriff von CD40 führt jedoch auch zu verlängerter Oberflächenexpression des MHC-Antigen-Komplexes, Expression von Liganden für 4-1BB und OX-40 (wirksame auf aktivierten T-Zellen exprimierte kostimulatorische Moleküle). Darüber hinaus führt die CD40-Beteiligung zur Sekretion von verschiedenen Zytokinen (z. B. IL-12, IL-15, TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8) und Chemokinen (z.B. Rantes, MIP-1 α und MCP-1), die alle wichtige Wirkungen sowohl auf die APZ als auch die T-Zell-Aktivierung und -Reifung haben (Mackey et al., J. Leukoc. Biol. 63 : 418–428, 1998).

[0010] Ähnliche Mechanismen sind bei der Entwicklung von Autoimmunkrankheiten wie beispielsweise Typ-I-Diabetes beteiligt. Bei Menschen und nicht-fettleibigen diabetischen Mäusen (NOD) ist der insulinabhängige Diabetes mellitus (IDDM) auf eine spontane T-Zell-abhängige Autoimmunzerstörung von insulinproduzierenden pankreatischen β -Zellen zurückzuführen, die mit dem Alter zunimmt. Dem Prozess geht die Infiltration der Inselchen mit vor allem aus T-Lymphozyten zusammengesetzten mononukleären Zellen (Insulitis) voraus (Bottazzo et al., J. Engl.J. Med. 113: 353, 1985; Miyazaki et al., Clin. Exp. Immunol. 60: 622, 1985). Eine empfindliche Balance zwischen autoaggressiven T-Zellen und Immunphänomenen vom Suppressortyp bestimmt, ob die Expression einer Autoimmunität auf Insulitis beschränkt ist oder sich zu IDDM entwickelt. Bei NOD-Mäusen, einem Modell für menschlichen IDDM, sind therapeutische Strategien, die gezielt auf T-Zellen gerichtet sind, bei der Verhinderung von IDDM erfolgreich gewesen (Makino et al., Exp. Anim. 29: 1, 1980). Diese beinhalten neonatale Thymektomie, die Verabreichung von Cyclosporin und die Infusion von monoklonalen Anti-Pan-T-Zell-, Anti-CD4- oder Anti-CD25(IL-2R)-Antikörpern (mAk) (Tarui et al., Insulitis and Type I Diabetes. Lessons from the NOD Mouse, Academic Press, Tokyo, 5.143, 1986). Andere Modelle beinhalten jene, die ty-

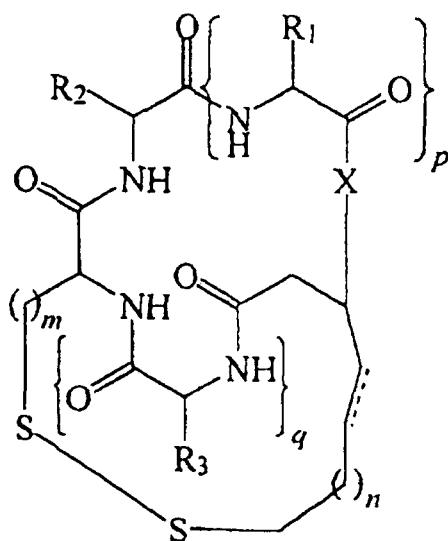
pischerweise für Autoimmun- und Entzündungskrankheiten verwendet werden, wie beispielsweise Multiple Sklerose (EAE-Modell), rheumatoide Arthritis, Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit, systemischer Lupus erythematosus (systemische Autoimmunität – NZBxNZWF, Model) und dergleichen. (Siehe z. B. Theofilopoulos und Dixon, Adv. Immunol. 37: 269–389, 1985; Eisenberg et al. J. Immunol. 125: 1032–1036, 1980; Bonneville et al., Nature 344: 163–165, 1990; Dent et al., Nature 343: 714–719, 1990; Todd et al., Nature 351: 542–547, 1991; Watanabe et al., Biochem Genet. 29: 325–335, 1991; Morris et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 57: 263–273, 1990; Takahashi et al., Cell 76: 969–976, 1994; Current Protocols in Immunology, Richard Coico (Hrsg.), John Wiley & Sons, Inc., Kapitel 15, 1998).

[0011] Das US-Patent Nr. 5,294,603 offenbart Didemnín-Derivate, die Zytotoxizität, antivirale und immunsuppressive Wirkungen aufweisen.

[0012] Das Ziel aller Abstoßungspräventions- und Autoimmunitätsumkehrstrategien besteht daran, die Immunreaktivität des Patienten gegen das antigene Gewebe oder Mittel mit einem Minimum an Morbidität und Mortalität zu unterdrücken. Entsprechend wird gegenwärtig eine Anzahl von Arzneimitteln wegen ihrer immunsuppressiven Eigenschaften verwendet oder daraufhin untersucht. Wie oben beschrieben, ist das am meisten verwendete Immunsuppressivum Cyclosporin, die Verwendung von Cyclosporin hat jedoch zahlreiche Nebenwirkungen. Entsprechend besteht angesichts der relativ geringen Wahlmöglichkeiten für Mittel, die bei geringen Toxizitätsprofilen und handhabbaren Nebeneffekten bei der Immunsuppression wirksam sind, in der Fachwelt ein Bedürfnis, alternative immunsuppressive Mittel zu identifizieren. Die vorliegende Erfindung befriedigt diesen Bedarf und stellt andere damit verbundene Vorteile bereit.

Zusammenfassung der Erfindung

[0013] Kurz gesagt, ist die vorliegende Erfindung gerichtet auf Depsipeptide und Kongenere davon, (hier auch als "Verbindungen" bezeichnet), die eine Aktivität als immunsuppressives Mittel aufweisen. In einer Ausführungsform offenbart diese Erfindung eine Verwendung einer Verbindung mit der folgenden Struktur (I):



(I)

wobei m, n, p, q, X, Y, R₁, R₂ und R₃ wie unten definiert sind, einschließlich pharmazeutisch annehmbarer Salze und Stereoisomere davon, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Unterdrückung der Immunantwort eines Lebewesens.

[0014] In einer anderen Ausführungsform werden neue Verbindungen offenbart, die die obige Struktur (I) aufweisen, jedoch bestimmten bekannte Verbindungen ausschließen (d.h. FR901228). Weitere Ausführungsformen beinhalten Zusammensetzungen, die eine erfindungsgemäße Verbindung beinhalten, in Kombination mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger.

[0015] Bei der Ausführung der Verfahren der vorliegenden Erfindung können die Verbindungen sowohl verabreicht werden, um die Immunantwort eines Lebewesens mit einer Autoimmunkrankheit, Entzündungskrank-

heit oder Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit zu unterdrücken, als auch an Lebewesen verabreicht werden, die einer allogenen Transplantation oder xenogenen Transplantation unterzogen wurden. Weitere erfindungsgemäße Verfahren beinhalten die Verabreichung einer erfindungsgemäßen Verbindung zur Hemmung der Proliferation von Lymphozyten, zur Förderung des Überlebens von Transplantaten im Anschluss an die Transplantation durch Verabreichung vor, zusammen mit oder nach einer Transplantationsprozedur (einschließlich allogener und xenogener Transplantation), zur Verminderung der IL-2-Sekretion aus Lymphozyten, zur Hemmung der Induktion von CD25 oder CD154 auf Lymphozyten nach Stimulation und/oder zur Induktion von Anergie oder Apoptose in aktivierten T-Zellen, während die Gesamt-T-Zellzahl aufrechterhalten wird.

[0016] In einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung Verfahren zur Induktion von Immunsystemtoleranz gegenüber einem Antigen durch Verabreichung einer Dosis einer Verbindung der Struktur (1) an ein Lebewesen bereit. Ebenfalls bereitgestellt werden Verfahren zur Verminderung der Sekretion von TNF- α und zur Hemmung des Zellzyklus von aktivierten T-Zellen vor dem Eintritt in die S-Phase durch Verabreichung einer Verbindung der Struktur (I).

[0017] Diese und andere Aspekte der Erfindung werden unter Bezugnahme auf die folgende ausführliche Beschreibung ersichtlich. Zu diesem Zweck sind verschiedene Referenzen hier aufgeführt, die bestimmte Hintergrundinformationen, Verfahren, Verbindungen und/oder Zusammensetzungen in größerer Ausführlichkeit darstellen.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0018] [Fig. 1](#) ist eine Balkengraphik, die die dosisabhängige Hemmung der Proliferation von peripheren Blutlymphozyten (PBL) im Anschluss an die Inkubation mit FR901228 und Stimulation durch Kügelchen mit daran angehefteten Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörpern darstellt.

[0019] [Fig. 2](#) ist eine Balkengraphik, die die dosisabhängige Hemmung der Proliferation peripherer Blutlymphozyten (PBL) im Anschluss an die Inkubation mit FR901228 und Stimulation mit Ionomycin/PMA zeigt.

[0020] [Fig. 3](#) ist eine Balkengraphik, die die dosisabhängige Hemmung der CD4-positiven T-Zell-Proliferation im Anschluss an die Inkubation mit FR901228 und Stimulation durch Kügelchen mit daran angehefteten Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörpern zeigt.

[0021] [Fig. 4](#) ist eine Balkengraphik, die die dosisabhängige Hemmung der CD4-positiven T-Zell-Proliferation im Anschluss an die Inkubation mit FR901228 und Simulation mit in vitro erzeugten allogenen dendritischen Zellen zeigt.

[0022] Die [Fig. 5A–Fig. 5D](#) sind Balkengraphiken, die durchflusszytometrische Messungen der (A) CD154-Expression, (B) CD25-Expression, (C) CD69-Expression und (D) der Zell-Lebensfähigkeit im Anschluss an die T-Zell-Aktivierung in Gegenwart verschiedener Titer von FR901228.

[0023] [Fig. 6](#) ist eine Balkengraphik, die die IL-2-Expression zeigt, gemessen durch ELISA 24 Stunden nach 3×28-Kügelchen-Stimulation (Anti-CD3- und Anti-CD28-konjugierte Kügelchen) von T-Zellen in Gegenwart verschiedener Titer von FR901228.

[0024] [Fig. 7](#) ist eine Balkengraphik, die die mittlere Fluoreszenzintensität von mit CFDA-SE gefärbten CD4-Zellen am Tag 6 auf 3×28-Kügelchen-Stimulation oder ohne Stimulation in Kombination mit der Zugabe von FR901228 zu verschiedenen Zeitpunkten zeigt.

[0025] Die [Fig. 8A–Fig. 8B](#) sind Balkengraphiken, die durchflusszytometrische Messungen (A) der CD137w-, CD154-, CD25-, CD62L- und CD49d-Expression und (B) der CD11a-, CD134-, CD26-, CD54-, CD95- und CD69-Expression auf Stimulation oder ohne Stimulation mit 3×28-Kügelchen in Gegenwart oder Abwesenheit von FR901228 (20 ng/ml).

[0026] [Fig. 9](#) ist eine Balkengraphik, die die CD154-Expression auf CD4-Zellen im Anschluss an eine anfängliche Stimulation mit 3×28-Kügelchen in Gegenwart von 20 Einheiten IL-2 und eine nachfolgende Stimulation an Tag 3 bis 4 mit 3×28-Kügelchen, 20 Einheiten IL-2, 3×28-Kügelchen w/20 Einheiten IL-2 oder ohne Stimulation und 20 ng/ml FR 901228 (zugegeben an Tag drei) zeigt.

[0027] Die [Fig. 10A–Fig. 10B](#) sind Balkengraphiken, die die Anwesenheit von IL-2 und TNF- α in Überständen

von PBL-Zellen im Anschluss an Stimulation durch 3×28-Kügelchen in Gegenwart von FR901228 (20 ng/ml) und Cyclosporin (500 ng/ml) zeigen.

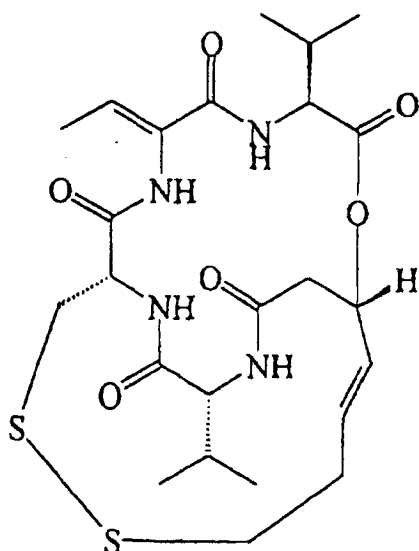
[0028] Fig. 11 zeigt Flussdaten von Jurkat-T-Zellen, die stabil mit einem Vektor transfiziert sind, der die Nukleinsäuresequenz für grün fluoreszierendes Protein unter Kontrolle des CD154-Promotor enthält, 24 Stunden nach Stimulation mit 3×28-Kügelchen in Gegenwart von 0, 10, 50 und 100 ng/ml FR901228.

[0029] Fig. 12 zeigt Flussdaten der Färbung intrazellulärer DNA von CD4-T-Zellen im Anschluss an keine Stimulation oder Stimulation mit 3×28-Kügelchen für 24 Stunden, in Gegenwart von 0, 1, 10, 50 und 100 ng/ml FR901228.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0030] Wie oben erwähnt, ist die Erfindung auf Verbindungen gerichtet, insbesondere FR901228 und Kongenere davon, die in Zusammenhang mit der Immunsuppression nützlich sind. FR901228 ist ein Depsipeptid, das aus dem terrestrischen Bakterium *Chromobacterium violaceum* isoliert wurde. Es wurde anschließend gezeigt, was FR901228 die Transformation von Ha-ras-transfizierten Mausfibroblasten (NIH-3T3) hemmen könnte. Das mutierte ras-Protein, bei dem Valin durch Glycin-12 ersetzt ist, ist in der Lage, morphologische Änderungen in NIH-3T2-Zellen hervorzurufen. In diesen Zellen zeigt der transformierte Phänotyp onkogene Aktivierung an und korreliert mit ansteigender Tumorigenizität. Kürzlich ist sowohl eine große Zahl von Arzneimittelkandidaten als auch von natürlichen Produkten identifiziert worden, die diesen Phänotyp umkehren und auf diese Weise die Transformation von tumorigenen Zelllinien umkehren. FR901228 ist ein natürliches Produkt, das bei diesen Arbeiten identifiziert wurde und hat sich in der Folge in tierbasierten Modellen als hochaktiv erwiesen. Im Ergebnis hat FR901228 beträchtliche Aufmerksamkeit als Antitumormittel erhalten.

[0031] Insbesondere ist FR901228 ein bizyklisches Depsipeptid (d. h. ein Peptid, das sowohl Esterbindungen als auch Amidbindungen enthält) mit der folgenden Struktur:



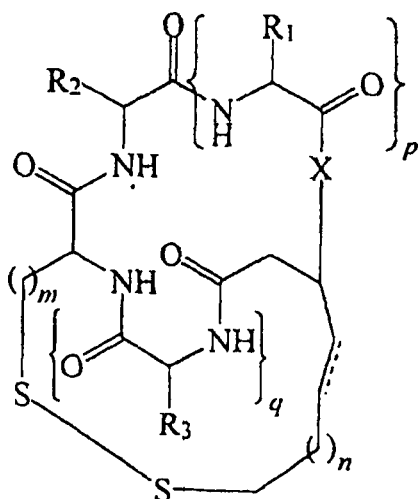
FR901228

[0032] Obwohl die molekulare Grundlage für die Aktivität von FR901228 nicht bekannt ist, ist postuliert worden, dass die Disulfid-Bindung als redoxkontrollierter Konformationsschalter fungiert und dass die reduzierende Umgebung innerhalb einer Zelle diese Verbindung zur monozyklischen Dithiolform konvertieren könnte (Khan et al., J. Am. Chem. Soc. 118:7237–7238, 1996).

[0033] Die Herstellung von FR901228 durch ein Fermentationsverfahren ist im US-Patent Nr. 4,977,138, übertragen auf Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., offenbart. In diesem Patent wird die Fermentationen des Stammes eines zur Gattung *Chromobacterium violaceum* WB968 gehörenden Bakteriums in einem Nährmedium angezogen, das Quellen assimilierbaren Kohlenstoffs und Stickstoffs enthält, und unter aeroben Bedingungen. Nach Vervollständigung der Fermentation wird FR901228 erlangt und durch konventionelle Techniken wie beispielsweise Lösungsmittelextraktion, Chromatographie oder Umkristallisierung gereinigt.

[0034] Über die Isolierung von FR901228 als natürliches Produkt hinaus ist die vollständige Synthese dieser Verbindung nunmehr durch Kahn et al. (oben) beschrieben worden. Dieses Verfahren beinhaltet ein 14-Schritte-Verfahren, das FR901228 mit 18% Gesamtertrag bereitstellt. Kurz gesagt, beinhaltet die Synthese zunächst die katalytische asymmetrische Aldol-Reaktion nach Carreira, um eine thiolhaltige α -Hydroxysäure zu ergeben. Der Peptidteil der Verbindung wurde durch Standard-Peptid-Synthese-Verfahren zusammengebaut. Die thiolhaltige β -Hydroxysäure wurde dann an den Peptidteil gekoppelt und durch Bildung der Ester(Depsipeptid)-Bindung ein monozyklischer Ring erzeugt. Das bityklische Ringsystem von FR901228 wurde dann bei Umwandlung des geschützten Thiols zu einer Disulfidbindung gebildet.

[0035] Bei der Ausführung der vorliegenden Erfindung ist gefunden worden, dass insbesondere FR901228 oder Verbindungen der Struktur (I) allgemein immunsuppressive Eigenschaften aufweisen. Hierzu beinhalten die Verbindungen der vorliegenden Erfindung, zusätzlich zu FR901228, Verbindungen, die die folgenden Struktur (I) aufweisen:



(I)

einschließlich pharmazeutisch annehmbarer Salze und Stereoisomere davon, wobei

m 1, 2, 3 oder 4 ist;

n 0, 1, 2 oder 3 ist;

p und q unabhängig voneinander 1 oder 2 sind;

X O, NH oder NR ist;

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden sind und unabhängig voneinander ein Aminosäureseitenkettenrest oder ein Aminosäureseitenkettenderivat sind; R ein niederkettiger Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist.

[0036] Wie hier verwendet, bedeutet der Begriff "Aminosäureseitenkettenrest" jeden Aminosäureseitenkettenrest, der in natürlich vorkommenden Proteinen zugegen ist, einschließlich (aber nicht beschränkt auf) die natürlich vorkommenden Aminosäureseitenkettenreste, die unten in Tabelle 1 angegeben sind. Andere erfindungsgemäße natürlich vorkommende Seitenkettenreste beinhalten (sind aber nicht beschränkt auf) die Seitenkettenreste von Phenylglycin, 3,5-Dibromtyrosin, 3,5-Diodotyrosin, Hydroxylysin, Naphthylalanin, Thienylalanin, Carboxyglutamat, Phosphotyrosin, Phosphoserin und glykosylierte Aminosäuren wie glykosyliertes Serin, Asparagin und Threonin.

Tabelle 1

Repräsentative Aminosäureseitenkettenreste

Aminosäureseitenkettenrest

-H

-CH₃

-CH(CH₃)₂

-CH₂CH(CH₃)₂

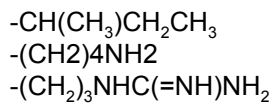
Aminosäuren

Glycin

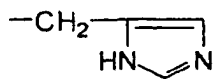
Alanin

Valin

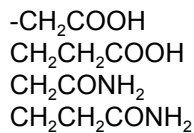
Leucin



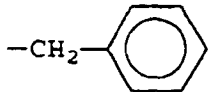
Isoleucin
Lysin
Arginin



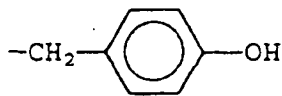
Histidin



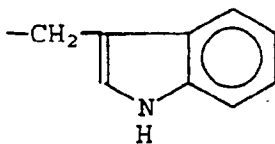
Asparaginsäure
Glutaminsäure
Asparagin
Glutamin



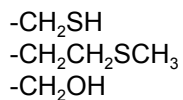
Phenylalanin



Tyrosin



Tryptophan



Cystein
Methionin
Serin

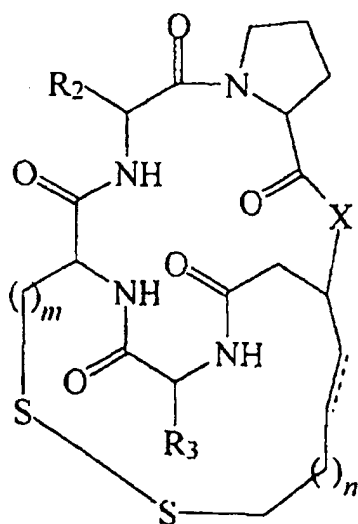


Prolin



Threonin

[0037] Wenn der Aminosäureseitenkettenrest Prolin ist, sollte verstanden werden, dass die R_1 -, R_2 - oder R_3 -Gruppe mit dem benachbarten Stickstoffatom verbunden ist, um den Pyrrolidinring von Prolin zu bilden. Zum Beispiel kann in einer Ausführungsform der Struktur (I), bei der m, n, p und q 1 sind, die R_1 -Gruppe Prolin sein – das heisst, R_1 zusammengekommen mit dem benachbarten Stickstoffatom bildet einen Pyrrolidinring, wie er durch die folgende Struktur (II) wiedergegeben wird:

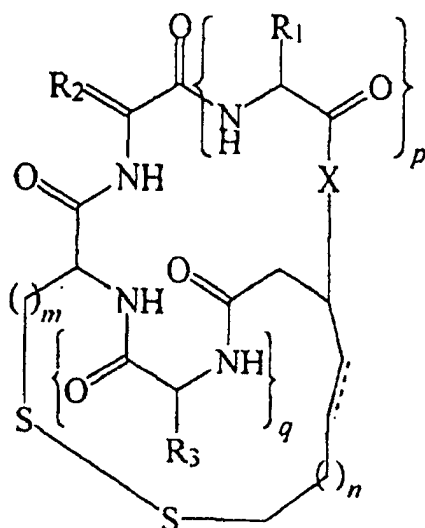


(II)

[0038] Zusätzlich zu den natürlich vorkommenden Aminosäureseitenkettenresten beinhalten die erfindungsgemäßen Aminosäureseitenkettenreste auch verschiedene Derivate davon. Wie hier verwendet, beinhaltet ein "Aminosäureseitenkettenrestderivat" Modifikationen und/oder Variationen von natürlich vorkommenden Aminosäureseitenkettenresten und beinhaltet Ausführungsformen, bei denen R_1 , R_2 und/oder R_3 durch eine Doppel- oder Dreifachbindung an den bicyklischen Ring der Struktur (I) gebunden sind. Zum Beispiel können die Aminosäureseitenkettenreste von Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylglycin und Phenylalanin allgemein als Niederkettenalkyl-, -aryl- oder arylalkylreste klassifiziert werden. Derivate von Aminosäureseitenkettenresten beinhalten andere geradkettige oder verzweigte, zyklische oder nichtzyklische, substituierte oder unsubstituierte, gesättigte oder ungesättigte Niederkettenalkyl-, -aryl oder aralkylreste.

[0039] Wie hier verwendet, enthalten "Niederkettenalkylreste" 1–12 Kohlenstoffatome, "Niederkettenarylreste" enthalten 6–12 Kohlenstoffatome und "Niederkettenaralkylreste" enthalten 7–12 Kohlenstoffatome. In einer Ausführungsform ist das Aminosäureseitenkettenderivat daher ausgewählt aus einem C_{1-12} -Alkyl, einem C_{6-12} -Aryl und einem C_{7-12} -Alkyl, und in einer besonders bevorzugten Ausführungsform aus einem C_{1-7} -Alkyl, einem C_{6-10} -Aryl und einem C_{6-12} -Alkyl.

[0040] Wenn R_1 , R_2 und R_3 , wie in Struktur (I) dargestellt, entweder durch eine Doppel- oder Dreifachbindung angeheftet sind, beinhaltet eine repräsentative Ausführungsform Verbindungen der Struktur (III), wobei R_2 durch eine Doppelbindung verbunden ist:

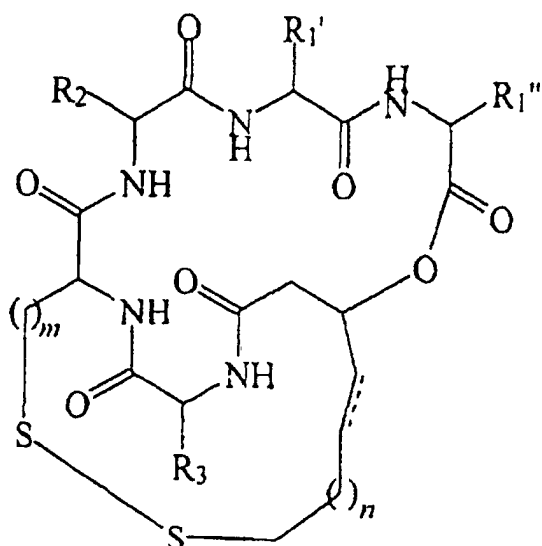


(III)

[0041] In einer Ausführungsform der Struktur (III) ist R_2 ein ungesättigtes Niederkettenalkyl wie $=CHCH_3$, $=CHCH_2CH_3$ und dergleichen. Im Falle von FR 901288 ist R_2 in der Struktur (III) $=CHCH_3$ und m , n , p , q sind jeweils 1, X ist Sauerstoff und die optionale Doppelbindung ist vorhanden (und in der trans-Konfiguration).

[0042] Erfindungsgemäße Aminosäureseitenkettenderivate enthalten ferner substituierte Derivate von Niederkettenalkyl-, -aryl- und -aralkylresten, wobei der Substituent ausgewählt ist aus (jedoch nicht beschränkt ist auf) einem oder mehreren der folgenden chemischen Reste: $-OH$, $-OR$, $-COOH$, $-COOR$, $-CONH_2$, $-NH_2$, $-NHR$, $-NRR$, $-SH$, $-SR$, $-SO_2R$, $-SO_2H$, $-SOR$, $-PO_3R$, $-OPO_3R$ und Halogen (einschließlich F, Cl, Br und I), wobei jedes Auftreten von R unabhängig ausgewählt ist aus einem Niederkettenalkyl-, -aryl- oder -aralkylrest. Darüber hinaus beinhalten erfindungsgemäße zyklische Niederkettenalkyl-, -aryl- und -aralkylreste Naphthalin sowie heterozyklische Verbindungen wie Thiophen, Pyrrol, Furan, Imidazol, Oxazol, Thiazol, Pyrazol, 3-Pyrrolin, Pyrrolidin, Pyridin, Pyrimidin, Purin, Quinolin, Isoquinolin und Carbazol. Aminosäureseitenkettenderivate beinhalten weiter Heteroalkylderivate des Alkylteils der Niederkettenalkyl- und -aralkylreste, einschließlich (aber nicht beschränkt auf) Alkyl- und Aralkylphosphonate und -silane.

[0043] Hinsichtlich p und q der Struktur (I) sollte verstanden werden, dass die Größe des Peptidteils des Rings durch Hinzufügen von einem (d.h. wenn entweder p oder q 2 ist) oder zwei (d.h. wenn p und q beide 2 sind) Aminosäureresten erhöht werden kann. Wenn zum Beispiel p 2 ist und q 1 ist (und X Sauerstoff ist) beinhalten erfindungsgemäße Verbindungen zum Beispiel die der folgenden Struktur (IV):

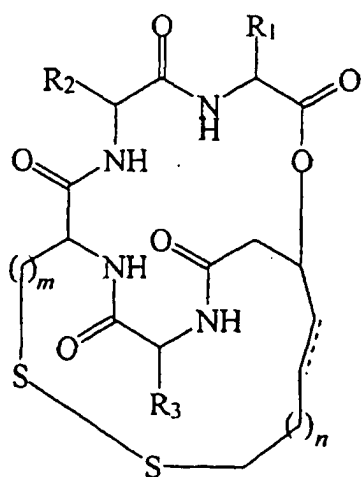


(IV)

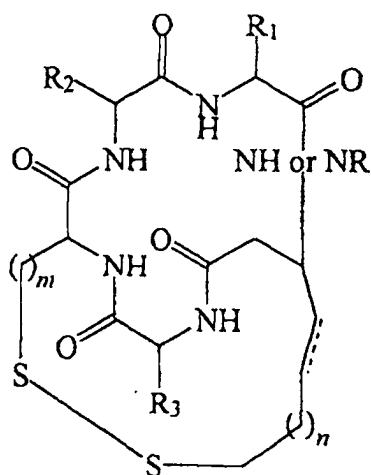
[0044] In der obigen Struktur (IV) wird der Aminosäureseitenkettenrest, der der R_1 -Gruppe der Struktur (I) entspricht, beim ersten Auftreten als R_1' und beim zweiten Auftreten als R_1'' bezeichnet (da p in dieser Ausführungsform 2 ist), um klarzustellen, dass diese Aminosäureseitenkettenreste identisch oder verschieden sein können. In weiteren Ausführungsformen ist p 1 und q ist 2, oder sowohl p als auch q sind 2.

[0045] In Struktur (I) stellt die Angabe "-----" eine optionale Doppelbindung dar. Wenn sie anwesend ist, kann die Doppelbindung entweder in cis- oder trans-Konfiguration vorliegen. In einer Ausführungsform liegt die Doppelbindung in der trans-Konfiguration vor, wie dies bei FR901288 der Fall ist.

[0046] Abhängig von der Wahl der X- und Y-Reste beinhalten die erfindungsgemäßen Verbindungen Ester, wenn X Sauerstoff ist, Amide, wenn X NH oder NR ist. Wenn zum Beispiel sowohl p als auch q 1 sind, beinhalten repräsentative Verbindungen gemäß der Erfindung Ester und Amide, wie sie durch die Strukturen (VI) bzw. (VII) dargestellt sind:



(VI)



(VII)

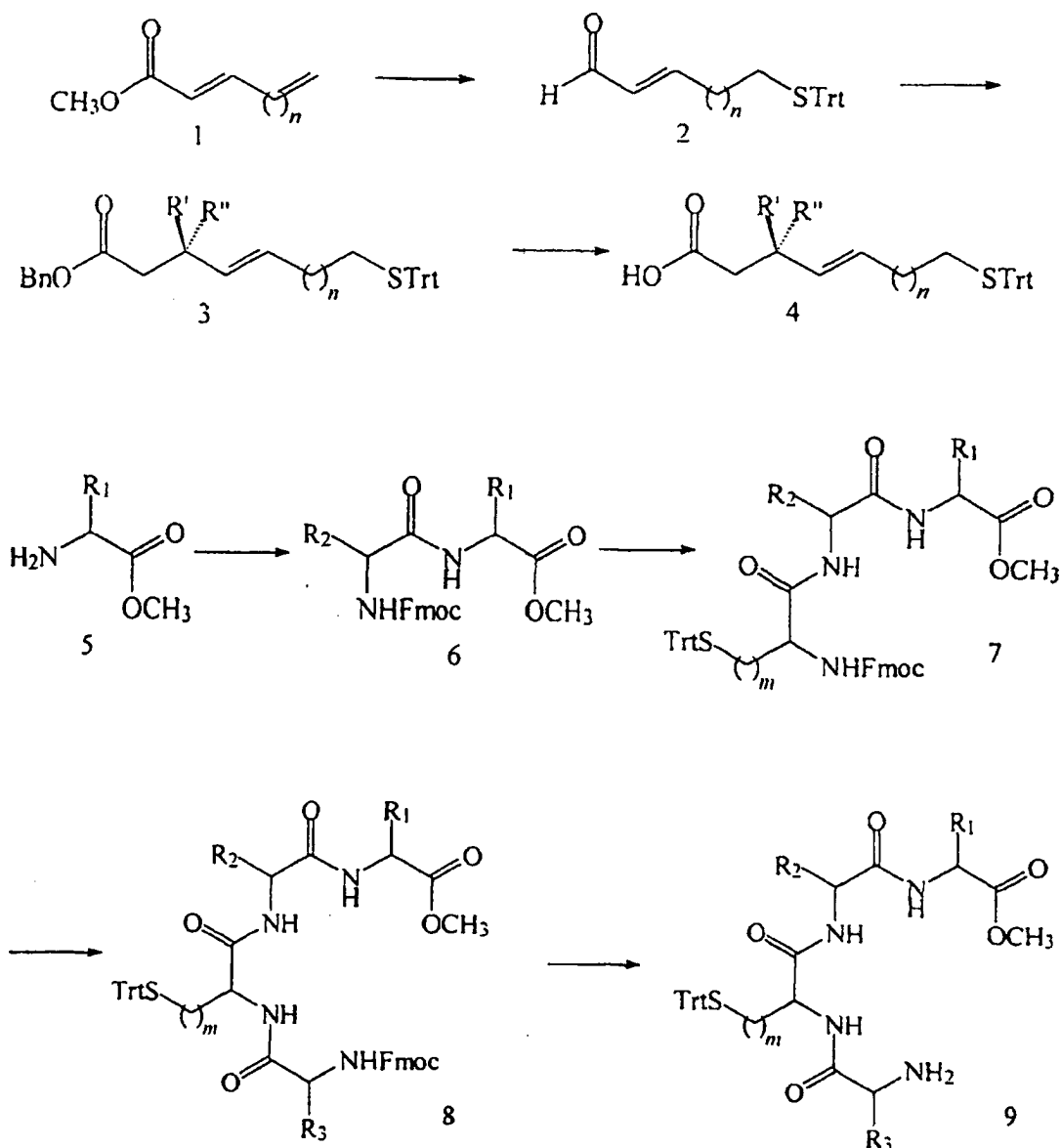
[0047] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können nach dem folgenden Reaktionenschema 1 hergestellt werden:

Reaktionenschema 1

Schritt (1):

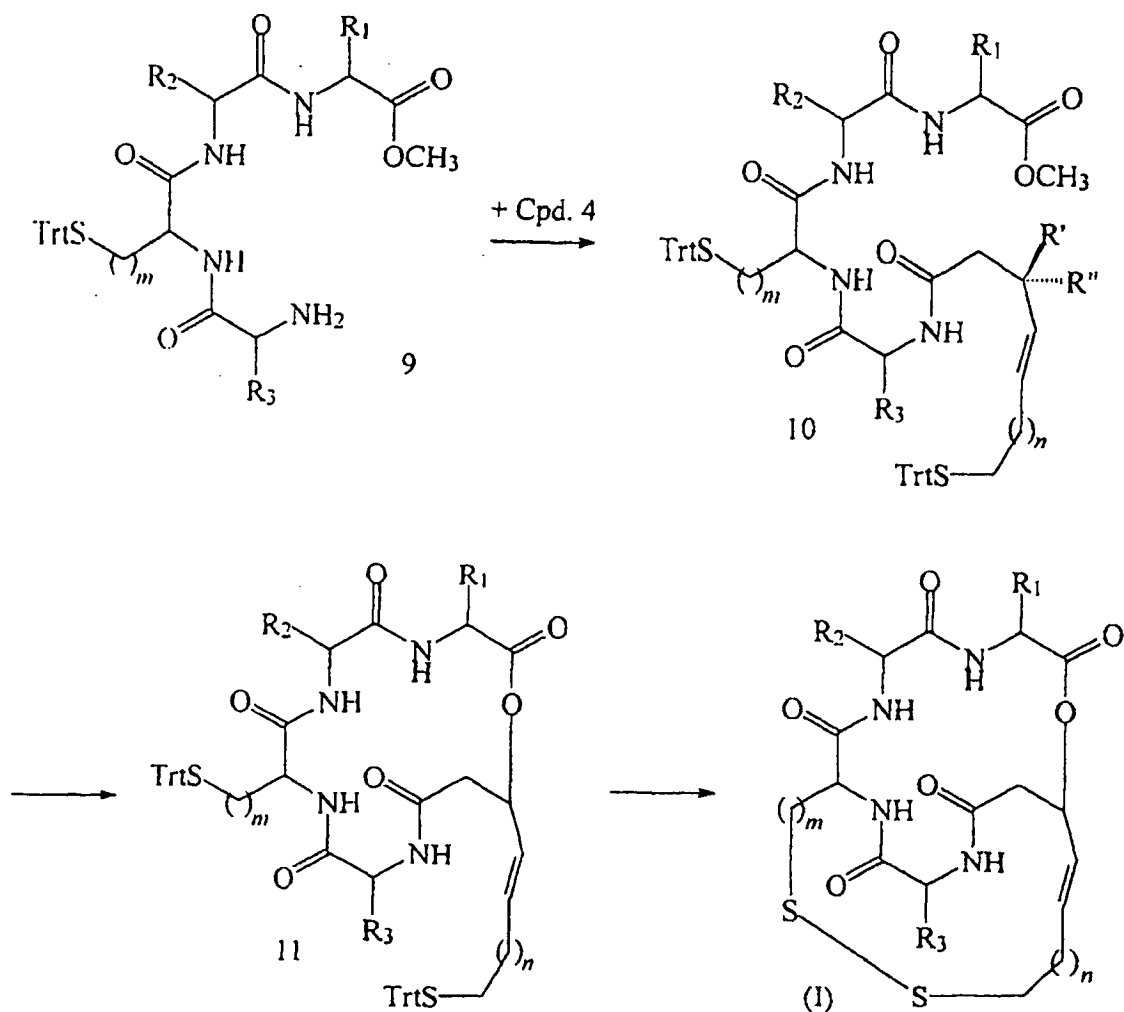
[0048] In Schritt (1) wird der Aldehyd 2 durch das von Kahn et al., J. Am. Chem. Soc. 118 : 7237-7238, 1996, dargelegte Drei-Schritt-Verfahren aus dem Dienoat 1 (wobei $n = 1, 2$ oder 3) hergestellt. Der Benzylester 3 wird durch Ti-(IV)-katalysierte Addition von O-Benzyl-, O-TMS-Ketenacetal an den Aldehyd 2 (wobei $R' = H$ und $R'' = OH$, oder $R' = OH$ und $R'' = H$) hergestellt. Die Hydrolyse des Benzylesters 3 mit LiOH in MeOH/H₂O ergibt die Hydroxysäure 4.

Schritt (2):



[0049] In Schritt (2) wird der Peptidteil der Verbindung durch Standard-Peptidsynthesetechniken hergestellt, beginnend mit einem geeigneten Aminosäuremethylester 5. Der Methylester 5 wird mit einer N-geschützten Aminosäure unter Verwendung des BOP-Reagenz in Reaktion gebracht, um das Peptid 6 zu erhalten, mit anschließender Kopplung an N-Fmoc-Cystein-(S-Triphenylmethyl), wenn $m = 1$ ist oder einem Analogon davon, wenn $m = 2$ ist, um das Tripeptid 7 zu erhalten. Das Tripeptid 7 wird zu N-geschütztem Tetrapeptid 8 umgewandelt, mit anschließender Entschützung der Fmoc-Gruppe, um das Tetrapeptid 9 zu erhalten. In dem obigen Reaktionenschema sind R_1, R_2 und R_3 identisch oder verschieden und repräsentieren unabhängig voneinander einen Aminosäureseitenkettenrest oder ein Derivat davon, wie oben definiert. Es wird erkannt werden, dass die obigen Technik der Synthese von Verbindungen der Struktur (I) entspricht, wenn p und q beide 1 sind. In Ausführungsformen, bei denen p oder q oder beide 2 sind, wird die obigen Technik verwendet, um eine oder zwei zusätzliche Aminosäuregruppen in den Peptidteil der Verbindung einzubauen.

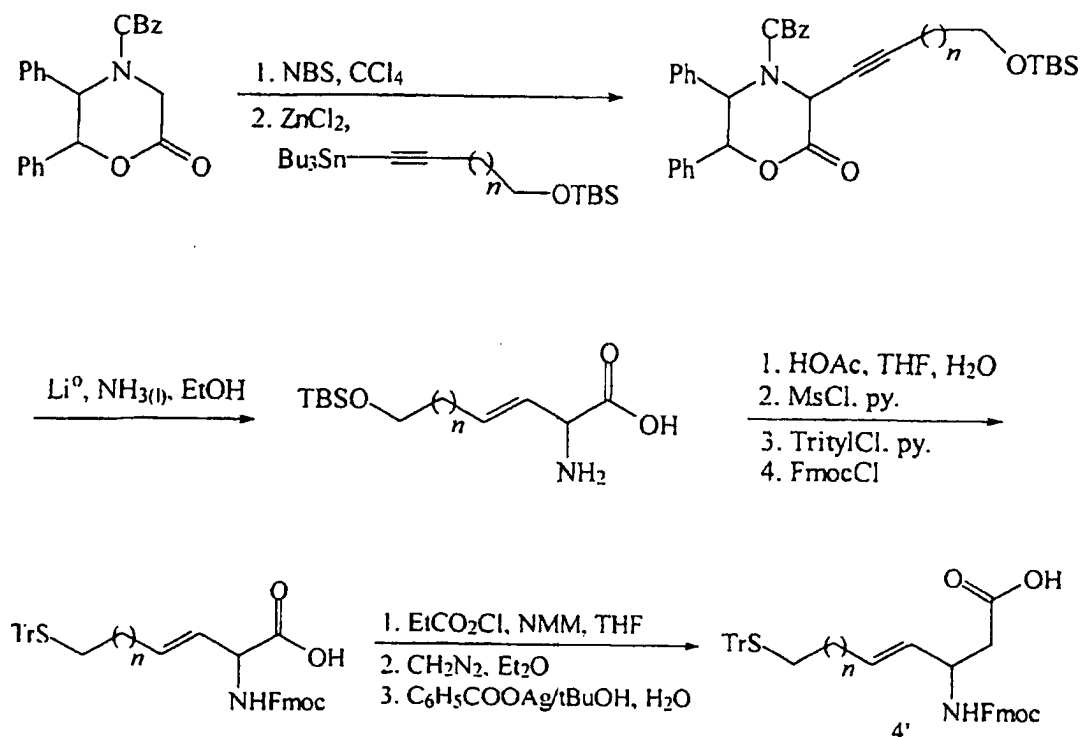
Schritt (3)



[0050] In Schritt (3) ergibt die Kopplung des Tetrapeptids 9 und der Hydroxysäure 4 mit BOP und DIEA den Hydroxymethylester 10. LiOH-vermittelte Hydrolyse des Methylesters 10 stellt die entsprechende Carbonsäure bereit, die dann durch zur Ringschluss mit DEAD und PPh₃ zu dem monozyklischen Laktone-Intermediat 11 umgewandelt werden kann.

[0051] Alternativ können die erfindungsgemäßen Verbindungen auch durch die folgende Technik hergestellt werden:

Alternativer Schritt (1)



[0052] Bei dieser Ausführungsform wird die Verbindung 4' durch die obigen Verfahren hergestellt und dann, im obigen Schritt (3), zu dem durch Schritt (2) hergestellten peptidischen Teil zugegeben. Das erhaltene Zwischenprodukt wird, wie vorher offenbart, zyklisiert, um die Verbindungen der Struktur (I) zu ergeben.

[0053] Für den Fall, dass X NH oder NR ist, können solche Verbindungen hergestellt werden, wenn R' oder R'' der Verbindung 4 NH bzw. NHR sind. Darüber hinaus können dieselben Techniken eingesetzt werden, wenn die optionale Doppelbindung der Struktur (I) nicht anwesend ist, jedoch unter Verwendung der entsprechenden gesättigten Zwischenprodukte.

[0054] Die erfindungsgemäßen Verbindungen beinhalten auch Säureadditionssalze, die durch die im Stand der Technik gut bekannten Verfahren hergestellt werden können, und die aus organischen und anorganischen Säuren gebildet werden können. Geeignete organische Säuren beinhalten Malein-, Fumar-, Benzoe-, Ascorbin-, Bernstein-, Methansulfon-, Essig-, Trifluoressig-, Oxal-, Propion-, Wein-, Salicyl-, Zitronen-, Glucon-, Milch-, Mandel-, Zimt-, Asparagin-, Stearin-, Palmitin-, Glykol-, Glutamin- und Benzolsulfonsäuren. Geeignete anorganische Säuren beinhalten Salz-, Hydrobrom-, Schwefel-, Phosphor- und Salpetersäuren. Wie hier verwendet, soll der Begriff "pharmazeutisch annehmbares Salz" der Struktur (I) jede und alle geeigneten Salzformen umfassen.

[0055] Mit Bezug auf Stereoisomere können die Verbindungen der Struktur (I) chirale Zentren aufweisen, und können als Razemate, razemische Mischungen und als einzelne Enantiomere oder Diastereomere auftreten. All diese isomeren Formen, einschließlich Mischungen davon, sind in die vorliegende Erfindung eingeschlossen. Darüber hinaus können einige der kristallinen Formen der Verbindungen der Struktur (I) als Polymorphe existieren, die in die vorliegende Erfindung eingeschlossen sind. Zusätzlich können einige der Verbindungen der Struktur (I) auch Solvate mit Wasser oder anderen organischen Lösungsmitteln bilden. Solche Solvate sind gleichermaßen vom Bereich dieser Erfindung eingeschlossen.

[0056] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Verbindungen der Struktur (I) zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Verhinderung der Immunantwort oder immunvermittelter Antworten und Krankheiten wie der Verhinderung oder Behandlung einer Abstoßung im Anschluss an eine Transplantation von synthetischen organischen Verpflanzungsmaterialien, Zellen, Organen oder Gewebe, um alle oder einen Teil der Funktion von Geweben wie Herz, Niere, Leber, Knochenmark, der Haut, Kornea, Gefäßen, Lunge, Pankreas, Darm, Glied, Muskel, Nervengewebe, Duodenum, Pankreas, Dünndarm, Pankreasinseln, einschließlich Xenotransplantaten etc. zu ersetzen; Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit, Autoimmunkrankheiten wie rheumatoide Arthritis, systemischen Lupus erythematosus, Thyreoiditis, Hashimoto-Thyreoiditis, Mul-

tiple Sklerose, Myasthenia gravis, Typ-I-Diabetes Uveitis, juvenile oder neu manifestierter Diabetes mellitus, Uveitis, Basedow-Krankheit, Psoriasis, atopische Dermatitis, Crohn-Krankheit, ulzerierende Colitis, Vasculitis, autoantikörpervermittelte Krankheiten, aplastische Anämie, Evans-Syndrom, autoimmune hämolytische Anämie und dergleichen zu behandeln oder zu verhindern; und ferner infektiöse Krankheiten, die eine getrennte Immunantwort und/oder -aktivierung hervorrufen, wie die traumatisch oder pathogeneninduzierte Immunfehlregulation, einschließlich zum Beispiel derjenigen, die durch Hepatitis-B- und -C-Infektionen, Staphylococcus-aureus-Infektion, virale Encephalitis, Sepsis, parasitische Krankheiten, bei denen der Schaden durch eine Entzündungsantwort hervorrufen wird (z. B. Lepra), verursacht werden, zu behandeln; und Blutkreislaufkrankungen wie Arteriosklerose, Atherosklerose, Vasculitis, Polyarteritis nodosa und Myokarditis zu verhindern oder zu behandeln. Darüber hinaus kann die vorliegende Erfindung verwendet werden, um eine Immunantwort, die mit einer Gentherapiebehandlung verbunden ist, wie der Einführung von Fremdgenen in autologe Zellen und die Expression des kodierten Produktes zu verhindern/unterdrücken.

[0057] Wie hier verwendet, bezieht sich "eine Immunantwort" auf die Reaktion des Körpers gegenüber Fremd- oder Selbstantigenen, so dass sie neutralisiert und/oder eliminiert werden. Die zellvermittelte Immunantwort beinhaltet die Bildung von Lymphozyten durch den Thymus (T-Zellen) als Antwort auf eine Antigenexposition. Diese Reaktion ist wichtig bei verzögerter Überempfindlichkeit, Abstoßung von Gewebetransplantaten und bei einigen Infektionen. Bei der humoralen Immunantwort werden Plasma-Lymphozyten (B-Zellen) als Antwort auf eine Antigenexposition gebildet, mit nachfolgender Antikörperbildung. Diese Antwort kann die Immunität oder Überempfindlichkeit hervorrufen. Die nichtspezifische Immunantwort oder Entzündung ist eine Antwort der Gewebe und Zellen des Körpers auf eine Verletzung von jedweder Quelle (z. B. Trauma, Organismen, chemisch, Ischämie, etc.). Die anfängliche Antwort des Immunsystems auf jede Bedrohung beinhaltet vaskuläre, chemische und Blutzellaktivitäten. Eine spezifische Immunantwort ist erforderlich, wenn eine Entzündung unangemessen ist, um mit einer Verletzung oder Invasion durch einen Organismus oder ein Mittel fertig zu werden. Sie wird durch B- und T-Zellen gesteuert und kontrolliert. Zelluläre Immunität bezieht sich auf die T-Zell-Antwort: humorale Immunität ist der früher zur Bezeichnung für B-Zell-Antworten verwendete Begriff. Darüber hinaus soll der Verweis auf CD4- oder CD8-Zellen oder dergleichen hier bedeuten, dass diese Zellen positiv für die CD4- oder CD8-Zelloberflächenmarker sind.

[0058] Weitere Verwendungen können die Behandlung und/oder Prophylaxe von entzündlichen und hyperproliferativen Hautkrankheiten und kutanen Manifestationen von immunologisch vermittelten Erkrankungen wie beispielsweise seborrhoische Dermatitis, Angioödem, Erytheme, Akne und Alopecia areata; verschiedenen Augenkrankheiten (autoimmun und auf andere Weise); allergischen Reaktionen wie Pollenallergien, reversiblen obstruktiven Atemwegserkrankungen, die Zustände wie Asthma einschließen (z. B. Bronchialasthma, allergisches Asthma, intrinsisches Asthma, extrinsisches Asthma und Staubasthma), insbesondere chronisches oder hartnäckiges Asthma (z. B. spätes Asthma und Atemwegsüberansprechbarkeit), Bronchitis, allergischer Rhinitis und dergleichen; Entzündung von Schleimhaut und Blutgefäßen; Aktivität bestimmter virale Infektionen wie Cytomegalovirusinfektion und Epstein-Barr-Virus-Infektion beinhalten.

[0059] In einer Ausführungsform wird eine Verwendung von Verbindungen der Struktur (I) zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines Zustandes in einem Lebewesen bereitgestellt, dessen Behandlung durch Verminderung der Lymphozytenproliferation und/oder -aktivierung (z. B. Herunterregulierung von CD25 und/oder CD154) beeinflusst oder erleichtert wird. Das Verfahren zur Behandlung eines Zustandes bei einem Lebewesen, dessen Behandlung durch Hemmung der Lymphozytenproliferation und/oder Hemmung von Aktivierungsmarkern (z. B. CD25 und CD154), und Hemmung der Immunfunktion erleichtert wird, wobei der Zustand Autoimmunität, Entzündung, Transplantat/Gewebeabstoßung ist oder irgendeine einer Anzahl von Indikationen beinhaltet, wie sie hier beschrieben sind, die immunologisch induziert oder erschwert sind, wird bereitgestellt.

[0060] Entsprechend ist eine Ausführungsform der Erfindung die Verwendung von Verbindungen der Struktur (I) zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten. Eine andere Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung von Verbindungen der Struktur (I) zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verhinderung oder Behandlung der Abstoßung von fremden Organtransplantaten.

[0061] Wie oben angegeben, ist Cyclosporin gegenwärtig das führende zur Verhinderung der Abstoßung von transplantierten Organen verwendete Arzneimittel. Das Arzneimittel wirkt durch Hemmung der Funktion von Calcineurin in Lymphozyten, wodurch es das Immunsystem des Körpers daran hindert, sein großes Arsenal von natürlichen Schutzmitteln zur Abstoßung der Fremdproteine des Transplantats zu mobilisieren. Obwohl Cyclosporin bei der Bekämpfung der Transplantatabstoßung wirksam ist, ist es nephrotoxisch und bekannt dafür, dass es mehrere unerwünschte Nebenwirkungen verursacht, einschließlich Nierenversagen, anomale Le-

berfunktion, Unwohlsein des Magendarmtraktes und Induktion von Krebs. (Hojo et al., Nature 397:530–534, 1999).

[0062] Es wird in der Fachwelt ständig nach neueren, sichereren Arzneimitteln gesucht, die weniger Nebenwirkungen zeigen. Die vorliegende Erfindung stellt solche immunsuppressiven Mittel bereit, die, ohne an einen besonderen bestimmten Wirkungsmechanismus gebunden sein zu wollen, eine langanhaltende Immuntoleranz zu induzieren scheinen. FR901228 ermöglicht die teilweise Aktivierung von CD4-T-Zellen (z.B. die Induktion von CD69, jedoch die Verminderung der CD25-, CD137w-, CD11a-, CD134-, CD54-, CD95- und CD154-Oberflächenexpression sowie die IL-2 und/oder TNF- α -Bildung).

[0063] CD4-T-Zellen, die in Gegenwart von FR901228 aktiviert wurden, machen keinen aktivierungsinduzierten Zelltod (activation induced cell death, AICD) durch, sie machen jedoch anschließend in vitro eine Apoptose durch, höchstwahrscheinlich aufgrund der mangelnden IL-2-Sekretion und/oder IL-2-Rezeptorstimulation. Ferner hemmt die Behandlung von vorher aktivierten CD4- und CD8-T-Zellen mit Verbindungen der FR901228-Klasse, wie den in Struktur (I) wiedergegebenen, ihr Wachstum und induziert Apoptose innerhalb einer kurzen Zeit, während ruhende T-Zellen anscheinend unbeeinflusst bleiben. Die Induktion von Apoptose in reagierenden T-Zellen eliminiert nicht nur die aktivierten T-Zellen, sondern induziert auch einen Zustand von Langzeit-Immuntoleranz (Ferguson und Green, Nature Med. 5(11):1231–1232, 1999). Der Grund für diese spezifische Toleranz wird nicht gut verstanden. Trotzdem kann die Immunisierung mit sich nicht teilenden Spenderzellen (z. B. dendritischen Zellen oder bestrahlten Lymphozyten des peripheren Blutes) in Gegenwart von FR901228 vor der Transplantation sehr gut eine spezifische Toleranz gegenüber zukünftigen Wirt-gegen-Transplantat-Antworten ohne weitere Anwesenheit von FR901228 vermitteln.

[0064] Der hier verwendete Begriff "Toleranz" bezieht sich auf einen Zustand der Nicht-Reaktivität des Immunsystems gegenüber einem Antigen, gegen das es reagieren kann. Ohne an einen bestimmten Mechanismus gebunden sein zu wollen, wird angenommen, dass durch Induktion von Apoptose in aktivierten T-Zellen Toleranz durch die erfindungsgemäßen Verbindungen induziert wird. Zum Beispiel wird, wenn T-Zellen durch ein Antigen aktiviert werden und anschließend eine Apoptose durchmachen, eine nachfolgende Immunantwort gegen das Antigen nicht auftreten. Die Induktion von Toleranz durch eine bestimmte Verbindung kann durch jedes im Stand der Technik bekannte Verfahren oder Modell getestet werden. In einem Beispiel kann die primäre und sekundäre Stimulation durch ein Antigen in Gegenwart der Verbindungen gemäß der vorliegenden Erfindung getestet werden. Kurz gesagt wird ein Lebewesen mit einem Antigen inokuliert, gefolgt von einer Inokulation mit der Verbindung, etwa 2 Wochen später kann das Lebewesen mit demselben Antigen in Abwesenheit der Verbindung inokuliert und die sekundäre Immunantwort gemessen werden. Entsprechend können sowohl die primäre als auch die sekundäre Antwort durch einfache Blutanalyse gemessen werden. Eine Probe, die keine sekundäre Immunantwort zeigt, zeigt eine durch die immunsuppressive Verbindung induzierte Toleranz. Darüber hinaus können Standard-in-vitro-Tests verwendet werden, um die T-Zell-Aktivierung zu untersuchen, wie beispielsweise CTL-Tests oder Tests auf IL-2-Sekretion.

[0065] Über die Induktion von Apoptose hinaus zeigen CD4- und CD8-T Zellen, die mit einer Anzahl von Stimuli induziert waren, einschließlich gleichzeitigem CD3- und CD28-Eingriff, Ionomycin/Phorbolmyristinsäure(PMA)-Stimulierung und Stimulierung durch allogene dendritische Zellen eine Wachstumshemmung bei Behandlung mit FR901228 entweder gleichzeitig mit der Stimulierung oder im Anschluss an die Stimulierung. Entsprechend sind solche Zusammensetzungen gegenüber Arzneimitteln wie Cyclosporin deutlich verbessert, die die CD4-T Zellen sehr früh in der Aktivierungskaskade hemmen. Dies führt dazu, dass CD4-T Zellen, die in Gegenwart von Cyclosporin aktiviert wurden, de facto natürliche oder nichtaktivierte Zellen sind, die keine Apoptose durchmachen. Wenn die Cyclosporin-Behandlung beendet wird, wird sich die gehemmte Immunantwort daher erneut entwickeln. Mit anderen Worten, wenn CD4-Zellen in Gegenwart der Verbindungen gemäß der vorliegenden Erfindung in einem aktiven Stadium sind, werden diese Zellen eine Apoptose und daher eine andauernde Toleranz gegenüber dem Antigen durchmachen, während, wenn dieselben Zellen mit Cyclosporin behandelt werden, die Immunantwort nur solange gehemmt ist, wie Cyclosporin anwesend bleibt.

[0066] Darüber hinaus führt die Immunsuppression nur bei aktivierten T-Zellen durch FR901228 zur Induktion von Anergie und/oder Apoptose; die generellen Titer von T-Zellen und anderen hämatopoetischen Zellen bleiben daher erhalten. Im Gegensatz dazu blockieren sowohl Cyclosporin als auch FK506 die frühesten Ereignisse der T-Zell-Aktivierung und hindern die Zellen daher daran, in ein Stadium zu einzutreten, bei dem sie empfindlich gegenüber der Induktion von Apoptose werden.

[0067] FR901228 hat einer Reihe von Merkmalen, die seine Fähigkeit befördern, als ein potentes Immunsuppressivum zu wirken. Entsprechend können Verbindungen der in Struktur (I) wiedergegebenen Klasse, ein-

schließlich FR901228, eine oder mehrere der folgenden Eigenschaften aufweisen: Hemmung des Wachstums von CD4- und CD8-T-Zellen, induziert durch CD3- und CD8-Eingriff, Ionomycin/PMA oder allogene dendritische Zellen; Hemmung des laufenden Wachstums von CD4- und/oder CD8-T-Zellen bei Zugabe nach anfänglicher Aktivierung; Hemmung der Signaltransduktionswege sowohl für CD3/CD28-Eingriff und IL-2-Simulation; Hemmung der Induktion von CD25, CD134, CD137w, CD154, CD11a, CD54 und CD95 auf CD4-T-Zellen; keine signifikante Wirkung auf CD69-Induktion oder aktivierungsinduzierte Herunterregulierung von CD62L; Reduktion der IL-2-Sekretion aus Lymphozyten des peripheren Blutes; Verminderung der TNF- α -Sekretion aus Lymphozyten des peripheren Blutes; Hemmung des Zellzyklus vor dem Eintritt in die S-Phase für aktivierte T-Zellen; Hemmung von p21-cip/waf- und D/EPB- α -Induktion bei aktivierten T-Zellen; Hemmung der c-myc-Expression bei aktivierten T-Zellen; Hemmung von IL-2-induzierter Proliferation von aktivierten T-Zellen; und Hemmung von CD154 auf Transkriptionsebene. Darüber hinaus beeinflusst FR901228 die Phosphorylierung im großen und ganzen nicht, wie durch Phosphotyrosin-Western-Blots gemessen wurde. Die obigen werden Beobachtungen deuten daraufhin hin, dass Verbindungen der Struktur (I) die T-Zell-Aktivierung an mehreren Punkten beeinflussen, wodurch sie das Fortschreiten der Aktivierung zu frühen Stadien, wie beispielsweise die Phosphorylierung, möglich machen, jedoch nachfolgende Ereignisse der Aktivierung und Proliferation verhindern.

[0068] Um festzustellen, ob eine bestimmte Verbindung ein wirksames Immunsuppressivum ist, kann eine Vielzahl von Methodiken eingesetzt werden, die in der Fachwelt bekannt sind. In dieser Hinsicht kann die Lymphozytenproliferation und/oder -aktivierung im Anschluss an den Kontakt mit der interessierenden Verbindung vor, gleichzeitig mit oder nach Stimulierung gemessen werden. Zum Beispiel ist ein Schlüsselkennzeichen der T-Zellaktivierung und nachfolgenden Induktion der Proliferation (sowie dafür, ein Entzündungsinitiator zu sein) die Bildung von IL-2, IFN γ , CD25, CD69 oder CD154, die durch verschiedene Verfahren, einschließlich ELISA und Durchflusszytometrie, gemessen werden können. Andere experimentelle Verfahren, die gewöhnlich eingesetzt werden, um die Zellproliferation und Zytokinsekretion zu messen, können ebenfalls verwendet werden, einschließlich eines kolorimetrischen Tests, der Propidiumiodidfärbung, MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl], 2-5-diphenyltetrazoliumbromid), Lebendfärbung auf, CFDA-SE (5-(und 6)-Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester), Zellzahlen, Bromdesoxyuridin-Aufnahme oder ein Thymidinaufnahmetest eingesetzt werden. (siehe, z.B., Avian Dis. 43(2):172–181, 1999; Anticancer Res. 17(1B):725–728, 1997; Geller, Scand. J. Immunol. 35:327–334, 1992; Levine et al., Int. J. Immun. 7(6):891–904, 1995; Hara et al., J. Exp. Med. 161:1513–1524, 1985; Harding et al., Nature 356:607–609, 1992; Linsley et al., Science 257:792–795, 1992; PCT-Veröffentlichungs-Nr. WO 95/33823).

[0069] Verfahren zur Aktivierung von Lymphozyten und Stimulierung der Lymphozytenproliferation sind in der Fachwelt gut bekannt und schließen die Stimulierung in Gegenwart oder Abwesenheit von IL-2 mit Phytohämagglutinin (PHA), Concanavalin A (ConA), Anti-CD3-Antikörpern (in Gegenwart oder Abwesenheit von Anti-CD28-Antikörpern), allogenen Zellen, Superantigenen oder Ionomycin/PMA ein.

[0070] Es gibt eine Vielzahl von In-vitro-Tiermodellen zur Untersuchung und Auswertung von immunsuppressiven Verbindungen gemäß der vorliegenden Erfindung und ihre Anwendbarkeit auf eine bestimmte mit dem Immunsystem verbundene Krankheit oder Indikation. Entsprechend könnte ein Durchschnittsfachmann das geeigneten Modell einfach aus den bereits im Stand der Technik vorhanden auswählen. Solche Modelle beinhalten die Verwendung von NOD-Mäusen, bei denen IDDM aus einer spontanen chemischen T-Zellabhängigen Autoimmunzerstörung von insulinproduzierenden pankreatischen β -Zellen resultiert, die mit dem Alter weiter zunimmt (Bottazzo et al., J. Engt. J. Med., 113:353, 1985; Miyazaki et al., Clin. Exp. Immunol., 60:622, 1985). Bei NOD-Mäusen, einem Modell für menschlichen IDDM, sind therapeutische Strategien, die gezielt auf T-Zellen gerichtet sind, bei der Verhinderung von IDDM erfolgreich gewesen (Makino et al., Exp. Anim. 29: 1, 1980). Diese beinhalten neonatale Thymektomie, die Verabreichung von Cyclosporin und die Infusion von monoklonalen Anti-Pan-T-Zell-, Anti-CD4- oder Anti-CD25(IL-2R)-Antikörpern (mAk) (Tarui et al., Insulinitis and Type I Diabetes. Lessons from the NOD Mouse, Academic Press, Tokyo, S.143, 1986). Andere Modelle beinhalten jene, die typischerweise für Autoimmun- und Entzündungskrankheiten verwendet werden, wie beispielsweise Multiple Sklerose (EAE-Modell), rheumatoide Arthritis, Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit (Transplantationsmodelle zur Untersuchung von Transplantatabstoßung unter Verwendung von Hauttransplantaten, Herztransplantaten, Inselchen von Langerhans-Transplantaten und Dick- und Dünndarmtransplantaten und dergleichen), systemischer Lupus erythematosus (systemische Autoimmunität – NZBxNZWF $_1$ Model) und dergleichen. (Siehe z. B. Takakura et al., Exp. Hematol. 27(12): 1815–821, 1999; Hu et al., Immunology 98(3):379–385, 1999; Blyth et al., Am J. Respir. Cell Mol. Biol. 14(5):425–438, 1996; Theofilopoulos und Dixon, Adv. Immunol. 37:269–389, 1985; Eisenberg et al., J. Immunol. 125:1032–1036, 1980; Bonneville et al., Nature 344:163–165, 1990; Dent et al., Nature 343:714–719, 1990; Todd et al., Nature 351:542–547, 1991; Watanabe et al., Biochem Genet. 29:325–335, 1991; Morris et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 57:263–273, 1990; Ta-

kahashi et al., Cell 76:969–976, 1994; Current Protocols in Immunology, Richard Coico (Hrsg.), John Wiley & Sons, Inc., Kapitel 15, 1998).

[0071] Subjekte, die eine Behandlung benötigen, um das Immunsystem zu unterdrücken, beinhalten Subjekte mit Autoimmunkrankheiten; Subjekte, die sich einer Transplantation unterziehen; und Subjekte mit kardiovaskulären Krankheiten; Subjekte mit allergischen Reaktionen; und Subjekte mit Trauma oder pathogeninduzierter Immunfehlregulation. Beispiele für Autoimmunkrankheiten schließen ein insulinabhängigen Diabetes mellitus, Asthma, Psoriasis, ulcerative Colitis, Crohn-Krankheit, rheumatoide Arthritis, multiple Sklerose, systemischen Lupus erythematosus sowie andere, die oben beschrieben sind. Subjekte mit einem Organ- oder Zell-/Gewebetransplantat benötigen ebenfalls eine Behandlung zur Unterdrückung des Immunsystems, um die Abstoßung des Organtransplantats zu unterdrücken oder zu verhindern. Ein "Organtransplantat" bezieht sich auf die Übertragung oder "Transplantation" eines inneren Organs (z. B. Herz, Lunge, Niere, Leber, Pankreas, Magen, Dickdarm und Dünndarm und Knochenmark) oder externer Organe (z.B. Haut) von einem Spender auf einen Empfänger, wobei der Empfänger sich von dem Individuum oder Lebewesen, das das Transplantat empfängt, genetisch unterscheidet. Ein "Organtransplantat" beinhaltet auch Transplantation über Artgrenzen hinweg (d.h. Xenotransplantation).

[0072] "Eine wirksame Menge" ist die Dosierung der Verbindungen, die erforderlich ist, um die gewünschte therapeutische und/oder prophylaktische Wirkung zu erreichen; z. B. die Dosierung einer Verbindung, die zur Unterdrückung einer natürlichen oder Gedächtnis-Immunantwort in dem Individuum oder Lebewesen führt oder zur Unterdrückung einer Organtransplantat-Abstoßung bei dem Subjekt führt. Eine "gewünschte therapeutische Wirkung und/oder prophylaktische Wirkung" beinhaltet, zum Beispiel, die Erhöhung der Lebensspanne oder Besserung der Symptome eines Individuums oder Lebewesens, das eine Immunkrankheit hat oder wahrscheinlich eine solche hat, wie beispielsweise Asthma, Psoriasis, ulcerative Colitis, rheumatoide Arthritis, multiple Sklerose, systemischer Lupus erythematosus und dergleichen. Beispiele für Symptome, die gelindert werden können, beinhalten: Hyperglykämie bei Diabetes; Gelenkschmerzen; Steifheit und Immobilität bei rheumatoider Arthritis; Paralyse bei multipler Sklerose; und Ausschlag und Hautläsionen bei systemischem Lupus erythematosus. Mit Bezug auf insulinabhängigen Diabetes mellitus beinhaltet eine "gewünschte therapeutische oder prophylaktische Wirkung" die Linderung oder Verhinderung von sekundären Komplikationen, die aus der Krankheit resultieren, wie beispielsweise vaskuläre Fehlfunktionen. Geeignete Dosierungen hängen vom Alter, der Gesundheit und dem Gewicht des Empfängers, dem Ausmaß der Krankheit, der Art der zeitgleich stattfindenden Behandlung, sofern vorhanden, der Behandlungsfrequenz und der Art der gewünschten Wirkung ab. Zum Beispiel können Dosierungen von etwa 0,001–100 Milligramm pro Tag reichen. Üblicherweise sind 0,1 bis 50 mg pro Tag in einer oder mehr Anwendungen wirksam, um die gewünschten Ergebnisse zu erhalten. In bestimmten Ausführungsformen kann die Dosierung angepasst werden, so dass nichtaktivierte T-Zellen erhalten bleiben und im wesentlichen nur aktivierte T-Zellen der Apoptose, Anergie und/oder temporär auftretender Nichtreaktivität zugeführt werden (d. h. der allgemeine Titer von T-Zellen und/oder anderer sich teilender Zellen wird beibehalten). In anderen Ausführungsformen erreicht die Dipeptid-Behandlung eine immunsuppressive Wirkung, während in anderen Ausführungsformen die verwendete Dosierung die Teilung hämatopoetischer Zellen nicht beeinflusst, und in noch anderen Ausführungsformen beeinflusst die Dosierung die Zellteilung im allgemeinen nicht wesentlich. Die wirksamen Dosierungsbereiche können jedoch leicht im Laufe klinischer Tests und Standard-Testverfahren, die im Stand der Technik verfügbar sind, festgestellt werden. Die Dosierungen sind die wirksamen Mengen zur Verhinderung oder Behandlung von Autoimmunkrankheiten, Verhinderung oder Behandlung von Fremdtransplantatabstoßung und/oder verwandte Beschwerden, Krankheiten und Erkrankungen.

[0073] Ein "Subjekt" ist bevorzugt ein Säugetier wie beispielsweise ein Mensch, kann jedoch auch ein Tier sein, das eine Veterinärbehandlung benötigt, zum Beispiel domestizierte Tiere (z. B. Hunde, Katzen und dergleichen), Nutztiere (z. B. Kühe, Schafe, Schweine, Pferde, Hühner und dergleichen) und Labortiere (zum Beispiel Ratten, Mäuse, Meerschweinchen und dergleichen).

[0074] Die Verbindung kann allein oder in Verbindung mit anderen, pharmakologisch wirksamen Mitteln, zum Beispiel zusammen mit anderen immunsuppressiven Mitteln oder zusammen mit Antibiotika und/oder antiviralen Mitteln verabreicht werden. Verbindungen, die gleichzeitig verabreicht werden können, beinhalten Steroide (z.B. Methylprednisolonacetat), NSAIDs und andere bekannte Immunsuppressiva wie Azathioprin, 15-Desoxypergualin, Cyclosporin, Mizoribin, Mycophenolatmofetil, Brequinar-Natrium, Leflunomid, FK-506, Rapamycin und verwandte Verbindungen. Dosierungen dieser Arzneimittels hängen ebenfalls von dem zu behandelnden Zustand und Individuum ab.

[0075] Eine wirksame Menge der Verbindung kann auf einem geeigneten Weg in einer einzelnen Dosis oder

in mehreren Dosen verabreicht werden.

[0076] Pharmazeutisch annehmbare Salze beinhalten sowohl die Metall-(anorganischen)Salze als auch organische Salze, von denen eine Liste in Remington's Pharmaceutical Sciences, 17. Auflage, S. 1418 (1985) wiedergegeben ist. Es ist dem Fachmann wohlbekannt, dass eine geeignete Salzform auf Basis der physikalischen und chemischen Stabilität, Fließfähigkeit, Hydroskopizität und Löslichkeit ausgewählt wird. Wie dem Fachmann ersichtlich sein wird, beinhalten pharmazeutisch annehmbare Salze, sind jedoch nicht beschränkt auf Salze von anorganischen Säuren wie Hydrochlorid, Sulfat, Phosphat, Diphosphat, Hydrobromid und Nitrat oder Salze von organischen Säuren wie Malat, Maleat, Fumarat, Tartrat, Succinat, Citrat, Acetat, Laktat, Methansulfonat, p-Toluolsulfonat oder Palmoat, Salicylat und Stearat. Gleichermaßen beinhalten pharmazeutisch annehmbare Kationen, sind aber nicht beschränkt auf Natrium, Kalium, Calcium, Lithium und Ammonium (insbesondere Ammoniumssalze mit sekundären Aminen). Bevorzugte erfindungsgemäße Salze beinhalten aus den obigen Gründen Kalium, Natrium, Calcium und Ammoniumssalze. Ebenfalls einbezogen in den Bereich der Erfindung sind Stereoisomere, Kristallformen, Hydrate und Solvate der erfindungsgemäßen Verbindungen.

[0077] Als Immunsuppressiva sind diese Verbindungen nützlich bei der Behandlung von Autoimmunkrankheiten, der Verhinderung der Abstoßung von Fremdorgantransplantaten und/oder ähnlichen Beschwerden, Krankheiten und Erkrankungen.

[0078] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten, der Verhinderung der Abstoßung von Fremdorgantransplantaten und/oder ähnlichen Beschwerden, Krankheiten und Erkrankungen gemäß der Erfindung durch jedes Verfahren verabreicht werden, das einen Kontakt der wirksamen Verbindung mit dem Wirkort im Körper eines warmblütigen Tieres bewirkt. Zum Beispiel kann die Verabreichung oral, topisch, einschließlich transdermal, ocular, bukkal, intranasal, Inhalation, intravaginal, rektal, intrazisternal und parenteral sein. Der hier verwendete Begriff "parenteral" bezieht sich auf Verabreichungsarten, die subkutan, intravenös, intramuskulär, intraartikuläre Injektion oder Infusion, intrasternal oder intraperitoneal einschließen.

[0079] Die Verbindungen können durch jedes konventionelle Mittel verabreicht werden, das zur Verwendung in Verbindung mit Pharmazeutika erhältlich ist, entweder als einzelne therapeutische Mittel oder in einer Kombination aus therapeutischen Mitteln. Sie können allein verabreicht werden, werden jedoch im allgemeinen mit einem pharmazeutischen Träger verabreicht, der auf Basis der gewählten Verabreichungsart und pharmazeutischen Standardpraktiken ausgewählt wurde.

[0080] Der wirksame Bestandteil kann oral in festen Dosierformen wie Kapseln, Tabletten, Pastillen, Dragees, Granula und Pulver, oder in Flüssigdosierformen wie Elixieren, Sirupen, Emulsionen, Dispersionen und Suspension verabreicht werden (siehe Chan et al., Invest. New Drugs 15:195–206, 1997, die die Bioverfügbarkeit von oralen Dosierungen von FR901228 zeigen). Der wirksame Bestandteil kann auch parenteral verabreicht werden, in sterilen Flüssigdosierformen wie beispielsweise Dispersionen, Suspension oder Lösungen. Andere Dosierungsformen, die ebenfalls dazu verwendet werden können, den wirksamen Bestandteil zu verabreichen als Salbe, Creme, Tropfen, transdermale Pflaster oder Pulver für die topische Verabreichung, als eine ophthalmische Lösungs- oder Suspensionsformierung, d. h. Augentropfen für die okuläre Verabreichung, als Aerosol-spray oder Pulverzusammensetzung zur Inhalation oder intranasalen Verabreichung, oder als eine Creme, Salbe, Spray oder Suppositorium für die rektale oder vaginale Verabreichung.

[0081] Gelatinekapseln enthalten den wirksamen Bestandteil und pulverisierte Träger wie Laktose, Stärke, Zellulosederivate, Magnesiumstearat, Stearinsäure und dergleichen. Ähnliche Verdünnungsmittel können verwendet werden, um komprimierte Tabletten herzustellen. Sowohl Tabletten als auch Kapseln können als Produkte mit anhaltender Abgabe hergestellt werden, um eine kontinuierliche Freisetzung der Medikation über eine Zeitspanne von Stunden bereitzustellen. Komprimierte Tabletten können zuckerbeschichtet oder folienbeschichtet sein, um jedweden unangenehmen Geschmack zu maskieren und um die Tablette vor der Atmosphäre zu schützen, oder zur selektiven Auflösung im Magendarmtrakt magensaftresistent überzogen sein.

[0082] Flüssig Dosierungen zur orale Verabreichung können Farbstoffe und Geschmacksstoffe enthalten, um die Akzeptanz des Patienten zu erhöhen.

[0083] Im allgemeinen sind Wasser, ein geeignetes Öl, Salzlösung, wässrige Dextrose (Glucose) und ähnliche Zuckerlösungen und Glykole wie Propylenglykol oder Polyethylenglykole geeignete Träger für parenterale Lösungen. Lösungen für die parenterale Verabreichung enthalten vorzugsweise ein wasserlösliches Salz des wirksamen Bestandteils, geeignete Stabilisierungsmittel und, falls erforderlich, Puffersubstanzen. Antioxidan-

ten wie Natriumbisulfit, Natriumsulfit oder Ascorbinsäure sind entweder allein oder kombiniert geeignete Stabilisierungsmittel. Es werden auch Zitronensäure und dessen Salze sowie Natriummethyldiamintetraacetat (EDTA) verwendet. Darüber hinaus können parenterale Lösungen Konservierungsmittel wie Benzalkoniumchlorid, Methyl- oder Propylparaben und Chlorbutanol enthalten. In bestimmten Ausführungsformen wird die Zusammensetzung hergestellt durch Verdünnen von 10 mg lyophilisierten Depsipeptids und 20 mg Povidon, USP, mit 2 ml einer Lösung enthaltend 20% Ethanol USP in Propylenglykol, USP. Die Lösung wird dann weiter mit 0,9 % Natriumchlorid für die Injektion, USP, zu einer endgültigen Arzneimittelkonzentration im Bereich von 0,02 bis 5,0 mg/ml verdünnt.

[0084] Für die Verabreichung durch Inhalation können die Verbindungen gemäß der vorliegenden Verbindung in geeigneter Weise in Form einer Aerosolspraydarreichungsform aus druckbeaufschlagten Packs oder Verneblern zugeführt werden. Die Verbindungen können auch als Pulver zugeführt werden, die formuliert sein können, und die Pulverzusammensetzung kann mit Hilfe einer Insufflationspulverinhalationsvorrichtung inhaliert werden. Das bevorzugte Zuführsysteme für die Inhalation ist ein Dosierinhalations("metered-dose inhalation", MDI)-Aerosol, das als Suspension oder Lösung einer erfindungsgemäßen Verbindung in geeigneten Treibmitteln wie Fluorkohlenstoffen oder Kohlenwasserstoffen formuliert sein kann.

[0085] Für die okulare Verabreichung kann eine ophthalmische Zubereitung mit einem geeigneten gewichtsprozentualen Anteil Lösung oder Suspension der erfindungsgemäßen Verbindung in einem geeigneten ophthalmischen Vehikel formuliert werden, so dass die Verbindung mit der Augenoberfläche für eine ausreichende Zeitspanne in Kontakt gehalten wird, um es der Verbindung zu ermöglichen, die Schleimhautoberfläche zu behandeln oder die Cornea- und inneren Bereiche des Auges zu durchdringen.

[0086] Dieselben Dosierformen können im allgemeinen verwendet werden, wenn die erfindungsgemäßen Verbindungen schrittweise oder in Verbindung mit anderen therapeutischen Mitteln verabreicht werden.

[0087] Wenn Arzneimittel in physikalischer Kombination verabreicht werden, sollten die Dosierformen und die Verabreichungsart in Abhängigkeit von der Kompatibilität der kombinierten Arzneimittel ausgewählt werden. Der Begriff gemeinsame Verabreichung wird daher so verstanden, dass er die zeitgleiche oder aufeinanderfolgende Verabreichung von zwei Mitteln, oder alternativ die Verabreichung als eine festgelegte Dosiskombination der zwei wirksamen Bestandteile beinhaltet.

[0088] Aus dem Vorstehenden wird ersichtlich, dass, obwohl spezifische Ausführungsformen der Erfindung hier zu Zwecken der Veranschaulichung beschrieben sind, verschiedene Modifikationen vorgenommen werden können, ohne vom Bereich der Erfindung abzuweichen. Entsprechend ist die Erfindung außer durch die beigefügten Ansprüche nicht beschränkt.

BEISPIELE

Beispiel 1

Zellwachstum und -herstellung

[0089] Aus menschlichem Blut isolierte Zellen werden in X-vivo-Medium (Biowhittaker Inc., Walkersville, MD) angezogen und in Abhängigkeit von der Verwendung mit oder ohne 20 U/ml IL-2 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) versetzt und mit 5% Humanserum (Biowhittaker), 2 mM Glutamin (Life Technologies, Rockville, MD) und 20 mM HEPES (Life Technology) versetzt. Jurkat-E6-1-Zellen (ATCC, Manassas, VA) werden in RPMI 1640 (Life Technologies), versetzt mit 10% fötalem Rinderserum (FBS) (Biowhittaker), 2 mM Glutamin (Life Technologies), 2 mM Penicillin (Life Technologies) und 2 mM Streptomycin (Life Technologies) angezogen.

[0090] Leukozytenfilme werden aus gesunden freiwilligen menschlichen Spendern erhalten (American Red Cross, Portland, OR). Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) werden unter Verwendung von Lymphozytenabtrennmedien (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA) nach Herstelleranweisungen erhalten.

[0091] Periphere Blutlymphozyten (PBL) werden aus der PBMC-Fraktion durch Inkubation in einem Kulturkolben (Costar, Pittsburgh, PA) oder mit unbeschichteten "Dynabeads" (Dynal, Oslo, Norwegen), 1×10^8 Zellen/ml, 2 Kügelchen/Zelle, 2 h bei 37 °C erhalten. Monozyten und Makrophagen werden durch Anheftung an den Kulturkolben oder Phagocytose der durch magnetische Zelltrennung nach Herstelleranweisungen (Dynal) abgereicherten paramagnetischen Kügelchen entfernt. CD-4 Zellen werden aus der PBL-Fraktion durch Inku-

bation mit 10 µg/ml monoklonalem Antikörper gegen CD8 (Klon G10-1), CD20 (Klon IF5), CD14 (Klon F13) und CD16 (Coulter), 10⁸ Zellen/ml, 20 min bei 4 °C gereinigt. Nach der Waschung werden die Zellen zweimal mit Schafs-Anti-Maus-Ig-gekoppelten Dynabeads (10⁶ Zellen/ml, 6 Kügelchen/Zelle, 20 min bei 4 °C) und magnetischer Zelltrennung angereichert. Die Reinheit der CD4-Zellen liegt routinemäßig bei 91–95%, bestimmt durch Durchflusssyztometrie.

[0092] Dendritische Zellen werden aus an dem Kulturkolben (Costar) angehefteten PBMC, 10⁸ Zellen/ml, 2 h bei 37 °C, (ohne Dynabeads) erzeugt. Nach ausgiebigem Waschen werden die anheftenden Zellen über 7 Tage in Medien enthaltend 500 U/ml GM-CSF (Boehringer-Mannheim) und 12,5 U/ml IL-4 (Boehringer-Mannheim) kultiviert. Die resultierende Zellpopulation ist schwach anheftend und exprimiert Oberflächenmarker, die für dendritische Zellen kennzeichnend sind (positiv für HLA-DR, CD86, CD83, CD11c und negativ für CD4). (Beachte: sämtliche Antikörper wurden von Becton Dickinson, CA, erhalten).

[0093] Die Anti-CD3-mAk (OKT3) können von Ortho Biotec, (Raritan, NJ) erhalten werden und die Anti-CD28-mAk (9.3) können von Bristol-Myers Squibb, (Stamford, Conn.) erhalten werden.

Beispiel II

T-Zell-Stimulation und Messung derselben

[0094] Die Zellen werden durch drei verschiedene Verfahren stimuliert 1) Dynabeads (M-450), nach Herstelleranweisungen (Dyna) kovalent an Anti-CD3-(OKT-3-) und Anti-CD28-(9.3-)Antikörper (3 × 28-Kügelchen) gebunden, 3 Kügelchen/Zelle, 2) Ionomycin (Calbiochem, La Jolla, CA) (100 ng/ml) und Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (Calbiochem) (10 ng/ml), 3) allogene dendritische Zellen (25.000 dendritische Zellen/200.000 CD4-Zellen). Alle Zellen werden bei einer Konzentration von 1 × 10⁶ Zellen/ml stimuliert. Die Zellen werden mit Verbindungen der Struktur (I) (z. B. FR901228) (NCI, Bethesda, MD) über 1 bis 2 Stunden vor der Simulation wie oben skizziert inkubiert. Proliferationstests werden in vier Parallelansätzen in 96-Napf-Flachbodenplatten durchgeführt. Die Zellen werden bei 1 × 10⁶ Zellen/ml in einem endgültigen Volumen von 200 stimuliert. 1. die Proliferation wird durch MTT-Test gemessen (MTT-Testkit, Chemicon International Inc., Temecula, CA) an Tag 3 (Stimulationsverfahren 1 und 2) oder an Tag 6 (Stimulationsverfahren 3) gemessen und die Ergebnisse werden als Mittelwerte der vier Parallelansätze wiedergegeben. PBL-Kulturen oder gereinigte CD4-Zellkulturen werden mit 3×28-Kügelchen, Ionomycin/PMA oder allogenen dendritischen Zellen stimuliert. Wie in den [Fig. 1–Fig. 4](#) dargestellt, hemmten so niedrige Konzentrationen wie 10 ng/ml FR901228 die Proliferation von CD4-Zellen, die mit 3×28-Kügelchen oder Ionomycin/PMA stimuliert wurden, vollständig, während Konzentrationen von 1 ng/ml FR901228 oder niedriger keine signifikante Wirkung haben (diese Versuche werden durchgeführt unter Einsatz einer 2stündigen Inkubation mit FR901228 vor der Simulation). Interessanterweise wird die Proliferation, die durch allogene dendritische Zellen induziert wurde, durch FR901228 bei so niedrigen Konzentrationen wie 1 ng/ml signifikant gehemmt. Darüber hinaus wird ein besseres Überleben der Zellen durch FR901228 nicht beeinflusst, wie durch Sub-G1-DNA-Messung und die Integrität der Zellmembran ([Fig. 5D](#)) abgeleitet wurde. Der Mangel an Zytotoxizität von FR 901228 befindet sich in Übereinstimmung mit Ergebnissen, die von Byrd et al., Blood 94(4):1401–1408, 1999; Bates et al., Clinical Pharmacology, Programs and Proceedings of American Society of Clinical Oncology, Abstract 693, 1999; und Chassaing et al., J. Chromatogr. B 719:169–176, 1998, beschrieben wurden.

[0095] Die Wachstums- und Aktivierungsprotokolle sind dieselben wie oben beschrieben.

Beispiel III

Aktivierungsmarkertests

[0096] Die Wirkung von FR901228 auf die Induktion von verschiedenen Aktivierungsmarkern auf CD4-Zellen wird untersucht. In dieser Hinsicht werden die Zellen mit einem oder mehreren der folgenden Antikörper markiert: Anti-Human-CD4-Ak (Immunotech, Fullerton, CA), FITC-gekoppelte Anti-Human-CD11a-Ak (Pharmingen), FITC-gekoppelte Anti-Human-CD26-Ak (Pharmingen), FITC-gekoppelte Anti-Human-CD49d-Ak (Coulter), FITC-gekoppelte Anti-Human-CD54-Ak (Pharmingen und Becton Dickinson), FITC-gekoppelte Anti-Human-CD95-Ak (Pharmingen), FITC-gekoppelte Anti-Human-CD134-Ak (Pharmingen), FITC-gekoppelte Anti-Human-CD25-Ak (Becton Dickinson, Fullerton, CA), FITC-gekoppelte Anti-Human-CD69-Ak (Becton Dickinson), FITC- oder PE-gekoppelte Anti-Human-CD154-Ak (Becton Dickinson) oder FITC- oder PE-gekoppelte IgG1-Isotyp-Kontroll-Ak. Zellen, 2 × 10⁵, werden für 20 Minuten bei 4 °C mit 2 µl jedes Antikörpers in einem Endvolumen von 30 µl markiert, gewaschen und in 1 % Paraformaldehyd (Sigma, St. Louis, MO) resuspen-

diert. Interessanterweise ist die CD25- und CD154-Expression nach 3×28-Stimulation bei so niedrigen Konzentrationen wie 10 ng/ml FR901228 stark supprimiert ([Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#)). Im Gegensatz dazu wird die CD69-Induktion durch 100 ng/ml FR901228 nicht beeinflusst ([Fig. 5C](#)). Darüber hinaus zeigen die [Fig. 8A–Fig. 8B](#) die Hemmung der Induktion von CD25, CD134, CD137w, CD154, CD11a, CD54 und CD95 auf CD4-T-Zellen mit keinem signifikanten Einfluss auf die CD69-Induktion oder die aktivierungsinduzierte Herunterregulierung von CD62L ([Fig. 8A–Fig. 8B](#)). Dies deutet daraufhin, dass FR901228 eine spezifische, jedoch nicht vollständige, Hemmung der proximalen CD4-Zellaktivierung ausübt. Darüber hinaus wird die höhere Zellebensfähigkeit nicht signifikant durch Konzentrationen von bis zu 100 ng/ml FR901228 beeinflusst, wie durch Propidiumiodid(PI)-Ausschluss unter Verwendung von durchflusszytometrischen Standardverfahren gemessen wurde (siehe Dengler et al., *Anticancer Drugs*. 6(4):522-532, 1995).

[0097] Die FR901228-Hemmung kann nicht durch Ionomycin/PMA-Aktivierung umgangen werden, was impliziert, dass die FR902228-Hemmung dem intrazellulären Calziumanstieg, der unmittelbar nach CD3-Stimulation von CD4-Zellen beobachtet wurde, nachgeschaltet ist.

Beispiel IV

IL-2- und TNF- α -Tests

[0098] Die Zellen werden wie oben beschrieben hergestellt. Die Überstände von Zellen, die 24 h stimuliert wurden, werden nach den Herstelleranweisungen (Biosource International, Sunnyvale, CA) einem IL-2- oder TNF- α -enzymgekoppelten-Immunoassay (ELISA) unterzogen.

[0099] In einem alternativen Test wird IL-2 durch intrazelluläre Färbung von CD4-T-Zellen unter Anwendung von Durchflusszytometrie gemessen. Zur intrazellulären Markierung von IL-2 oder IFN- werden die Zellen zunächst für 4 Stunden vor dem Test mit 1 g/ml Monensin (Calbiochem) inkubiert. Die Zellen werden anschließend auf Oberflächenproteine wie oben beschrieben gefärbt, fixiert und unter Verwendung des intrazellulären Färbekits von Becton Dickinson permeabilisiert, mit PE-gekoppeltem Anti-Human-IL-2-Ak und FITC-gekoppeltem Anti-Human-IFN- oder den entsprechenden Kontroll-Aks wie durch den Hersteller beschrieben markiert. Die Datenerfassung und durchflusszytometrische Analyse werden auf einem FACSCalibur-Durchflusszytometer von Becton Dickinson unter Verwendung von Cellquest-Software nach den Herstellerprotokollen (Becton Dickinson) durchgeführt.

[0100] Um den Mechanismus hinter der FR901228-Hemmung der CD4-Zellproliferation zu untersuchen, wurde die IL-2- und TNF- α -Bildung durch aktivierte CD4-Zellen analysiert. FR901228 hemmte die IL2-Bildung, gemessen durch ELISA nach 24 h 3×28-(Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörper-gekoppelte Kügelchen)-Kügelchen-Stimulation von gereinigten CD4-Zellen bei so niedrigen Konzentrationen wie 10 ng/ml beträchtlich ([Fig. 6](#)). Eine ähnliche Hemmung wurde beobachtet unter Verwendung der intrazellulären IL-2-Messung (nicht dargestellt). Die verminderte IL-2-Produktion ist jedoch nicht allein für das Fehlen der T-Zell-Proliferation verantwortlich, da die Zugabe von 100 U/ml IL-2 (Boehringer Mannheim) die Proliferation nicht wiederherstellt. Die Beobachtung, dass FR901228 die IL-2-Bildung hemmt, steht im Gegensatz zu vorangegangenen Ergebnissen, die von Wang et al. berichtet wurden, die berichteten, dass FR901228 die CD3-induzierte IL-2-Produktion des A1.1-T-Zell-Hybridoms nicht hemmen (*Oncogene* 17(12):1503–1508, 1998). Der Grund für diese Differenz ist gegenwärtig unbekannt.

[0101] In weiteren Versuchen wurden sowohl IL-2 als auch TNF- α durch ELISA im Anschluss an eine 24stündige Stimulation von peripheren Blutlymphozyten (PBL) mit 3 × 28-Kügelchen in Anwesenheit und Abwesenheit von 20 ng/ml FR901228 und 500 ng/ml Cyclosporin ([Fig. 10A](#) und [Fig. 10B](#)).

T-Zell-Stimulation und Messung derselben

[0102] Die Zellen werden durch drei verschiedene Verfahren stimuliert 1) Dynabeads (M-450), nach Herstelleranweisungen (Dyna) kovalent an Anti-CD3-(OKT-3-) und Anti-CD28-(9.3-)Antikörper (3 × 28-Kügelchen) gebunden, 3 Kügelchen/Zelle, 2) Ionomycin (Calbiochem, La Jolla, CA) (100 ng/ml) und Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (Calbiochem) (10 ng/ml), 3) allogene dendritische Zellen (25.000 dendritische Zellen/200.000 CD4-Zellen). Alle Zellen werden bei einer Konzentration von 1 × 10⁶ Zellen/ml stimuliert. Die Zellen werden mit Verbindungen der Struktur (I) (z. B. FR901228) (NCI, Bethesda, MD) über 1 bis 2 Stunden vor der Simulation wie oben skizziert inkubiert. Proliferationstests werden in vier Parallelansätzen in 96-Napf-Flachbodenplatten durchgeführt. Die Zellen werden bei 1 × 10⁶ Zellen/ml in einem endgültigen Volumen von 200 stimuliert. 1. die Proliferation wird durch MTT-Test gemessen (MTT-Testkit, Chemicon International Inc., Temecu-

la, CA) an Tag 3 (Stimulationsverfahren 1 und 2) oder an Tag 6 (Stimulationsverfahren 3) gemessen und die Ergebnisse werden als Mittelwerte der vier Parallelansätze wiedergegeben. PBL-Kulturen oder gereinigte CD4-Zellkulturen werden mit 3×28-Kügelchen, Ionomycin/PMA oder allogenen dendritischen Zellen stimuliert. Wie in den [Fig. 1–Fig. 4](#) dargestellt, hemmten so niedrige Konzentrationen wie 10 ng/ml FR901228 die Proliferation von CD4-Zellen, die mit 3×28-Kügelchen oder Ionomycin/PMA stimuliert wurden, vollständig, während Konzentrationen von 1 ng/ml FR901228 oder niedriger keine signifikante Wirkung haben (diese Versuche werden durchgeführt unter Einsatz einer 2ständigen Inkubation mit FR901228 vor der Simulation), Interessanterweise wird die Proliferation, die durch allogene dendritische Zellen induziert wurde, durch FR901228 bei so niedrigen Konzentrationen wie 1 ng/ml signifikant gehemmt. Darüber hinaus wird ein besseres Überleben der Zellen durch FR901228 nicht beeinflusst, wie durch Sub-G1-DNA-Messung und die Integrität der Zellmembran ([Fig. 5D](#)) abgeleitet wurde. Der Mangel an Zytotoxizität von FR 901228 befindet sich in Übereinstimmung mit Ergebnissen, die von Byrd et al., Blood 94(4):1401–1408, 1999; Bates et al., Clinical Pharmacology, Programs and Proceedings of American Society of Clinical Oncology, Abstract 693, 1999; und Chassaing et al., J. Chromatogr. B 719:169–176, 1998, beschrieben wurden.

[0103] Die Wachstums- und Aktivierungsprotokolle sind dieselben wie oben beschrieben.

Beispiel III

Aktivierungsmarkertests

[0104] Die Wirkung von FR901228 auf die Induktion von verschiedenen Aktivierungsmarkern auf CD4-Zellen wird untersucht. In dieser Hinsicht werden die Zellen mit einem oder mehreren der folgenden Antikörper markiert: Anti-Human-CD4-Ak (Immunotech, Fullerton, CA), FITC-gekoppelte Anti-Human-CD11a-Ak (Pharmingen), FITC-gekoppelte Anti-Human-CD26-Ak (Pharmingen), FITC-gekoppelte Anti-Human-CD49d-Ak (Coulter), FITC-gekoppelte Anti-Human-CD54-Ak (Pharmingen und Becton Dickinson), FITC-gekoppelte Anti-Human-CD95-Ak (Pharmingen), FITC-gekoppelte Anti-Human-CD134-Ak (Pharmingen), FITC-gekoppelte Anti-Human-CD25-Ak (Becton Dickinson, Fullerton, CA), FITCgekoppelte Anti-Human-CD69-Ak (Becton Dickinson), FITC- oder PE-gekoppelte Anti-Human-CD154-Ak (Becton Dickinson) oder FITC- oder PE-gekoppelte IgG1-Isotyp-Kontroll-Ak. Zellen, 2×10^5 , werden für 20 Minuten bei 4 °C mit 2 µl jedes Antikörpers in einem Endvolumen von 30 µl markiert, gewaschen und in 1 % Paraformaldehyd (Sigma, St. Louis, MO) resuspendiert. Interessanterweise ist die CD25- und CD154-Expression nach 3×28-Stimulation bei so niedrigen Konzentrationen wie 10 ng/ml FR901228 stark supprimiert ([Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#)). Im Gegensatz dazu wird die CD69-Induktion durch 100 ng/ml FR901228 nicht beeinflusst ([Fig. 5C](#)). Darüber hinaus zeigen die [Fig. 8A–Fig. 8B](#) die Hemmung der Induktion von CD25, CD134, CD137w, CD154, CD11a, CD54 und CD95 auf CD4-T-Zellen mit keinem signifikanten Einfluss auf die CD69-Induktion oder die aktivierungsinduzierte Herunterregulierung von CD62L ([Fig. 8A–Fig. 8B](#)). Dies deutet daraufhin, dass FR901228 eine spezifische, jedoch nicht vollständige, Hemmung der proximalen CD4-Zellaktivierung ausübt. Darüber hinaus wird die höhere Zellebensfähigkeit nicht signifikant durch Konzentrationen von bis zu 100 ng/ml FR901228 beeinflusst, wie durch Propidiumiodid(PI)-Ausschluss unter Verwendung von durchflusszytometrischen Standardverfahren gemessen wurde (siehe Dengler et al., Anticancer Drugs. 6(4):522-532, 1995).

[0105] Die FR901228-Hemmung kann nicht durch Ionomycin/PMA-Aktivierung umgangen werden, was impliziert, dass die FR902228-Hemmung dem intrazellulären Calziumanstieg, der unmittelbar nach CD3-Stimulation von CD4-Zellen beobachtet wurde, nachgeschaltet ist.

Beispiel IV

IL-2- und TNF-α-Tests

[0106] Die Zellen werden wie oben beschrieben hergestellt. Die Überstände von Zellen, die 24 h stimuliert wurden, werden nach den Herstelleranweisungen (Biosource International, Sunnyvale, CA) einem IL-2- oder TNF-α-enzymgekoppelten-Immunassay (ELISA) unterzogen.

[0107] In einem alternativen Test wird IL-2 durch intrazelluläre Färbung von CD4-T-Zellen unter Anwendung von Durchflusszytometrie gemessen. Zur intrazellulären Markierung von IL-2 oder IFN- werden die Zellen zunächst für 4 Stunden vor dem Test mit 1 g/ml Monensin (Calbiochem) inkubiert. Die Zellen werden anschließend auf Oberflächenproteine wie oben beschrieben gefärbt, fixiert und unter Verwendung des intrazellulären Färbekits von Becton Dickinson permeabilisiert, mit PE-gekoppeltem Anti-Human-IL-2-Ak und FITCgekoppeltem Anti-Human-IFN- oder den entsprechenden Kontroll-Aks wie durch den Hersteller beschrieben markiert.

Die Datenerfassung und durchflusszytometrische Analyse werden auf einem FACSCalibur-Durchflusszytometer von Becton Dickinson unter Verwendung von Cellquest-Software nach den Herstellerprotokollen (Becton Dickinson) durchgeführt.

[0108] Um den Mechanismus hinter der FR901228-Hemmung der CD4-Zellproliferation zu untersuchen, wurde die IL-2- und TNF- α -Bildung durch aktivierte CD4-Zellen analysiert.

[0109] FR901228 hemmte die IL2-Bildung, gemessen durch ELISA nach 24 h 3×28-(Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörper-gekoppelte Kügelchen)-Kügelchen-Stimulation von gereinigten CD4-Zellen bei so niedrigen Konzentrationen wie 10 ng/ml beträchtlich ([Fig. 6](#)). Eine ähnliche Hemmung wurde beobachtet unter Verwendung der intrazellulären IL-2-Messung (nicht dargestellt). Die verminderte IL-2-Produktion ist jedoch nicht allein für das Fehlen der T-Zell-Proliferation verantwortlich, da die Zugabe von 100 U/ml IL-2 (Boehringer Mannheim) die Proliferation nicht wiederherstellt. Die Beobachtung, dass FR901228 die IL-2-Bildung hemmt, steht im Gegensatz zu vorangegangenen Ergebnissen, die von Wang et al. berichtet wurden, die berichteten, dass FR901228 die CD3-induzierte IL-2-Produktion des A1.1-T-Zell-Hybridoms nicht hemmen (Oncogene 17(12):1503–1508, 1998). Der Grund für diese Differenz ist gegenwärtig unbekannt.

[0110] In weiteren Versuchen wurden sowohl IL-2 als auch TNF- α durch ELISA im Anschluss an eine 24stündige Stimulation von peripheren Blutlymphozyten (PBL) mit 3 × 28-Kügelchen in Anwesenheit und Abwesenheit von 20 ng/ml FR901228 und 500 ng/ml Cyclosporin ([Fig. 10A](#) und [Fig. 10B](#)).

Beispiel V

Proliferationshemmtests

[0111] Periphere Blutlymphozyten werden wie oben beschrieben hergestellt, mit 3×28-Kügelchen stimuliert und mit Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester (CSDA-SE) am Tag 6 nach der Stimulation gefärbt. Die Zellstimulation wurde wie oben angegebenen durchgeführt und die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in Medien resuspendiert und mit CSDA-SE (Molecular Probes, OR) inkubiert. Nach etwa 10 Minuten Färbung wurden die Zellen mit Medien und FPS gewaschen und die Farbstoffaufnahme wurde gemessen. FR901228 wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Stimulation zugegeben, bei Zeit 0 oder 24, 72 und 120 Stunden nach der Stimulation. [Fig. 7](#) zeigt Flussdaten, die durch CSDA-SE-Färbung erzeugt wurden. Die y-Achse stellt die mittlere Fluoreszenzintensität dar, die in Beziehung steht zum inversen Zellwachstum. Entsprechend geben die Daten an, dass das Zellwachstum von aktivierten T-Zellen durch FR901228 gehemmt wird, entweder durch Inkontaktbringen der Zellen mit FR901228 vor der, gleichzeitig mit oder nach der Stimulation mit 3×28-Kügelchen.

Beispiel VI

CD154-Expression auf CD4-Zellen

[0112] Die Wirkung von FR901228 auf die Induktion von CD154-Aktivierungsmarkern auf CD4-Zellen wird untersucht. In dieser Hinsicht werden die Zellen mit FITC-gekoppeltem Anti-Human-CD4-Ak (Immunotech, Fullerton, CA), PE-gekoppeltem Anti-Human-CD154-Ak (Becton Dickinson, Fullerton, CA) oder FITC- oder PE-gekoppeltem IgG1-Isotyp-Kontroll-Ak markiert. Zellen, 2×10^5 , werden für 20 Minuten bei 4 °C, mit 2 μ l jedes Antikörpers in einem Endvolumen von 30 μ l markiert, gewaschen und in 1 % Paraformaldehyd, (Sigma, St. Louis, MO) resuspendiert. Die Zellen werden für vier Tage in Gegenwart von 3×28-Kügelchen und/oder 20 Einheiten/ml IL-2 oder einem Anti-IL-2-Antikörper an Tag drei stimuliert, FR901228 wird zu der Kultur zu einer Konzentration von 20 ng/ml zugegeben. An Tag 4 wird die mittlere Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie gemessen. Wie in [Fig. 9](#) dargestellt ist, kompensierte die Anwesenheit und Abwesenheit von IL-2 die Unterdrückung der durch FR 901228 induzierten CD154-Expression nicht.

Beispiel VII

Repression von CD154 auf Transkriptionsebene

[0113] Bei diesem Experiment wurden Jurkat-T-Zellen stabil mit einem Vektorkonstrukt (p-EGFP1, Clontech) transfiziert, wobei die Nukleotidsequenz, die für das grün fluoreszierende Protein kodiert, funktionsfähig mit dem aus Jurkat-Zellen klonierten CD154-Promotor funktionsfähig verbunden war. Im Anschluss an die Selektion der Zellen, die den interessierenden Vektor enthalten, wurden die Zellen einer Stimulation für 24 Stun-

den mit 3×28-Kügelchen in Gegenwart verschiedener Konzentrationen (0 bis 100 ng/ml) FR901228 ausgesetzt. Anschließend wurde die Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie detektiert. Wie durch [Fig. 11](#) gezeigt wird, wiesen nur Zellen mit 0 ng/ml FR901228 eine Induktion der GFB-Expression über jene Zellen hinaus auf, die keine Stimulation erfuhren.

[0114] In getrennten Versuchen wurde eine RT-PCR des CD154-Transkripts nach 18stündiger Simulation mit 3×28-Kügelchen und verschiedenen Mengen FR901228 durchgeführt. Diese Versuche zeigten verminderte Niveaus der CD154-Expression bei ansteigenden Mengen FR901228 (Daten nicht dargestellt). Die Experimente wurden auch unter Verwendung von CD4-Zellen, die mit Antisense-Konstrukten von c-myc inkubiert wurden, durchgeführt. Nach Stimulation durch 3×28-Kügelchen für vierundzwanzig Stunden verminderte das Antisense-c-myc-Konstrukt die CD154-Expression, wie mittels Durchflusszytometrie festgestellt wurde, um etwa 50% im Vergleich zu Kontrollen, einschließlich: kein Konstrukt, Sense oder Transfektion mit einem Zufalls-c-myc-Konstrukt (Daten nicht dargestellt). Entsprechend können FR901228 und ähnliche Verbindungen die Aktivität von c-myc und dessen Induktion von CD154 als einen Mechanismus der Immunsuppression ansteuern.

Beispiel VIII

Hemmung des Zellzyklus vor Eintritt in die S-Phase

[0115] Unstimulierte und stimulierte (3×28-Kügelchen-stimulierte) CD4-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen FR901228 inkubiert und der intrazelluläre DNA-Gehalt wurde durch Färbung mit Propidiumiodid (PI) unter Anwendung von Standardverfahren gemessen. Kurz gesagt, wurden die Zellen mit einer Mischung aus 1 µg/ml PI und 0,03% Saponin in PBS für etwa 20 bis 30 Minuten gefärbt. Wie durch [Fig. 12](#) gezeigt, findet in nicht-stimulierten Zellen oder in stimulierten Zellen, die mit 10 bis 100 ng/ml FR901228 inkubiert wurden, keine DNA-Synthese statt. Entsprechend scheint FR901228 den Zellzyklus von aktivierten T-Zellen vor dem Eintritt in die S-Phase zu hemmen.

Beispiel IX

Radioisotopen-T-Zell-Proliferationstests

[0116] Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) aus gesunden Spendern wurden durch dichte Zentrifugation mit Ficoll-hypaque (LSM, Organon Teknika, Durham, North Carolina) getrennt. Nach dem Waschen der PBMC mit Vollmedien (RPMI-1640-Medium mit 5% Humanserum, 100 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 0.1 mM nicht-essentieller Aminosäure, 2 mM Penicillin (Life Technologies) und 2 mM Streptomycin (Life Technologies)), werden sie anschließend bei 7.500 RAD bestrahlt und zu $4-4,5 \times 10^6$ Zellen/ml in Vollmedien resuspendiert. Eine andere Teilmenge PBMCs werden mit neuraminidasebehandelten roten Blutzellen des Schafs (SRBC) rosettiert. Nach Zentrifugation mit LSM werden die SRBC dieser rosettierten T-Zellen anschließend mit Ammoniumchlorid-Lysepuffer (Life Technologies) lysiert. Nach zweimaligem Waschen mit Komplettmedium werden diese gereinigten T-Zellen ebenfalls zu $2-2,5 \times 10^6$ Zellen/ml in Vollmedium resuspendiert. Die verschiedenen Verdünnungen der Testverbindung werden in drei Parallelen zu 50 l/Napf in eine 96-Napf-Flachboden-Mikrokulturplatte (Costar, Cambridge, Massachusetts) zugegeben. Die T-Zell-Suspension wird dann sofort zu 100 l/Napf auf die Näpfe verteilt. Nach Inkubation der Zellen mit der Testverbindung für 30 Min bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO₂ – 95% Luft, wird Anti-CD3-Ak (OKT-3, Ortho Diagnostic, New Jersey) je Napf zugegeben (Endkonz. von 10 ng/ml), gefolgt von 50 l der bestrahlten PBMC. Die Kulturplatte wird dann bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre von 5% CO₂ – 95% Luft über 72 Stunden inkubiert. Die Proliferation der T-Lymphozyten wird durch Messung der Aufnahme von tritüertem (³H) Thymidin ermittelt. Während der letzten 18–24 Stunden der Kultur werden die Zellen mit 2 Ci/Napf tritüertem Thymidin (NEN, Cambridge, Massachusetts) pulsmarkiert. Die Kulturen werden unter Verwendung einer Aberntemaschine für mehrere Proben (MACH-11, Wallace, Gaithersburg, Maryland) auf Glasfaserfiltern geerntet. Die den einzelnen Näpfen entsprechende Radioaktivität der Filterscheiben wird durch Standard-Flüssigszintillationszählungsverfahren (Betaplate Scint Counter, Wallace) gemessen. Durchschnittliche Impulse pro Minute von Parallelansätzen werden errechnet und die Ergebnisse als die Konzentration der Verbindung ausgedrückt, die erforderlich ist, um die Aufnahme tritüerten Thymidins durch T-Zellen um 50% zu hemmen.

Beispiel X

[0117] Verhinderung und/oder Verzögerung des Beginns von Diabetes in NOD- oder NODSCID-Mäusen Dieses Beispiel veranschaulicht die Fähigkeit einer repräsentativen Depsipeptid-Verbindung FR901228, den Be-

ginn von Diabetes bei NOD- und NODSCID-Mäusen zu verhindern oder zu verzögern.

[0118] FR901228 wurde in 10% DMSO in PBS gelöst und jeden zweiten Tag i.p. an NOD- und NODSCID-Mäuse verabreicht. Kontrollen enthielten nur den Träger DMSO (10% DMSO in PBS). Unter der Voraussetzung, dass NODSCID-Mäuse nicht spontan Diabetes entwickeln, wurden 30×10^6 NOD-Milzzellen aus einer 10 Wochen alten NOD-Maus in jede NODSCID-Maus im Alter von 4 Wochen injiziert (i.v.), um Diabetes auszulösen. 0,5 mg/kg FR901228 wurden bei jeder Behandlung an 20 Tiere (zehn NOD-Tiere und zehn NODS-CID-Tiere) verabreicht. Alle zwei Wochen wurde die Zahl der Mäuse in jeder Behandlungsgruppe, die diabetische geworden waren, durch Messung des Blutglucosetiters unter Verwendung eines Glucometers in zweiwöchentlichen Intervallen ermittelt. Ein Wert von mehr als 200 mg/dl Blutglucose bei zwei aufeinanderfolgenden Beobachtungen wurde als Zeichen für offene Diabetes gewertet. Durchschnittliche Glucosezahlen für diese Gruppen sind unten in Tabelle 2 dargestellt.

[0119] Wie in Tabelle 2 dargestellt, wurde das Einsetzen offener Diabetes bei NODSCID-Mäusen um mindestens zwei Wochen bei jenen Mäusen mit der Verbindung im Vergleich zu den nur mit dem Träger behandelten Mäusen verzögert. Überraschenderweise waren die Ergebnisse für die NOD-Mäuse noch weitaus dramatischer, da keine mit der Verbindung behandelte NOD-Mäuse innerhalb der 18wöchigen Untersuchung offene Diabetes entwickelte, während 8 von 10 trägerbehandelte Mäuse im selben Zeitraum offene Diabetes entwickelten. Diese Daten zeigen eindeutig eine immunsuppressive Wirkung bei der Verzögerung des Einsetzens phänotypischer Diabetes.

TABELLE 2A

Mit FR901228 injizierte NOD-SCID-Mäuse gegen Injektion mit DMSO-Vehikel

<u>Spender</u>			<u>Injektion</u>		<u>Empfänger</u>															
Alter (Wochen)	Genot.	Geschl.	Datum	Käfig karte	ID	Genot.	NODSCID	F	BSLC	Alter(Wo) beider Injektion	DOB	Alter (Wo.)	5/9	5/23	6/6	6/20	7/4	7/18	8/1	8/15
10	NOD		27.03.00	518374	2659					4	aufgez.		6	8	10	12	14	16	18	20
-	-		-		2660	-	-	-	-	-	22.Mär		-	547	526	566	402	getöt durch B.S.		
-	-		-		2661	-	-	-	-	-	bei 4-6 Wochen		-	-	343	596	tot	tot		
-	-		-		2662	-	-	-	-	-			-	-	317	568	tot			
-	-		-		2663	-	-	-	-	-			-	-	299	539	494	getöt durch B.S.		
-	-		-	518375	2654	-	-	-	-	-			-	-	412	338	tot			
-	-		-		2655	-	-	-	-	-			-	-	441	240	tot			
-	-		-		2656	-	-	-	-	-			261	527	494	tot				
-	-		-		2657	-	-	-	-	-			-	-	399	hoch	tot			
-	-		-		2658	-	-	-	-	-			-	-	285	576	558	571	tot	
10	NOD		27.03.00	518376	2675					4	aufgez.		383	tot	5/25					
-	-		-		2676	-	-	-	-	-	22.Mär		-	439	428	tot	6/13			
-	-		-		2677	-	-	-	-	-	bei 4-6 Wochen		-	254	377	hoch	337	7/12 getöt durch B.S.		
-	-		-		2678	-	-	-	-	-			-	223	448	hoch	523	7/12 getöt durch B.S.		
-	-		-		2679	-	-	-	-	-			287	hoch	hoch	tot	6/8			
-	-		-	518377	2381	-	-	-	-	-			-	-	311	getöt. durch B.S.				
-	-		-		2382	-	-	-	-	-			-	447	516	"				
-	-		-		2383	-	-	-	-	-			-	324	405	"				
-	-		-		2384	-	-	-	-	-			-	-	456	"				
-	-		-		2385	-	-	-	-	-			-	423	463	"				

TABELLE 2B

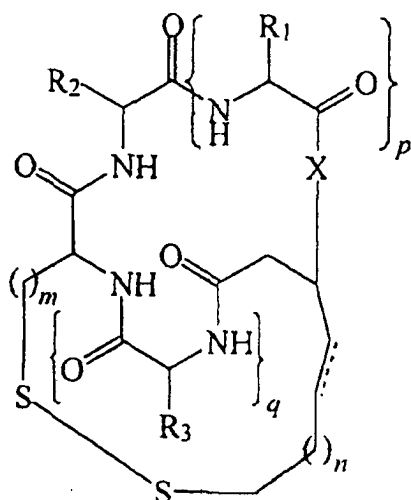
Mit FR901228 injizierte NOD-SCID-Mäuse gegen Injektion mit DMSO-Vehikel

	Empfänger						Alter (Wo.) bei der Injektion	DOB	Alter (Wo.) nach Transfer							
	Käfig karte	ID	Genot.	Geschl.	Herkunft	5/9			5/23	6/6	6/20	7/4	7/18	8/1	8/15	
FR901228-behandelt	518450	2664	NOD	F	BSLC	N/A	aufgez.	-	-	-	-	-	-	-	-	
-		2665	-	-	-	-	23.Mär bei 4 Wochen	-	-	-	-	-	-	-	-	
-		2666	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	
-		2667	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	
-	518449	2668	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	
-		2669	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	
-		2670	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	
-		2671	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	
-		2672	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	
-		2674	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	
Kontrollen mit 10% DMSO-Vehikeln	518448	2386	NOD	F	BSLC	N/A	aufgez.	-	-	-	238	423	452			
-		2387	-	-	-	-	23.Mär bei 4 Wo.	-	-	-	-	-	-	-	-	
-		2388	-	-	-	-		-	302	513	getöt. durch B.S.	-	-	-	-	
-		2389	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	310		
-	518451	2390	-	-	-	-		-	-	-	545	554	getöt. 7/12 durch B.S.	-		
-		2391	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	
-		2392	-	-	-	-		-	-	-	-	308	455	504		
-		2393	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	466		
-		2394	-	-	-	-		-	390	391	getöt. durch B.S.	-	-	-	-	
-		2395	-	-	-	-		-	-	-	-	207	354	126		

[0120] Aus dem Vorstehenden wird offenkundig sein, dass, obwohl hier bestimmte Ausführungsformen der Erfindung beschrieben wurden, um die Erfindung zu veranschaulichen, verschiedene Modifikationen vorgenommen werden können, ohne vom Geist und Bereich der Erfindung abzuweichen.

Patentansprüche

1. Verbindung mit der folgenden Struktur:



(I)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Stereoisomer davon, wobei

m 1, 2, 3 oder 4 ist;

n 0, 1, 2 oder 3 ist;

p und q unabhängig 1 oder 2 sind;

X O, NH oder NR ist;

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden und unabhängig ein Aminosäureseitenkettenrest oder ein Aminosäureseitenkettenderivat sind; und

R ein niederkettiger Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist, mit der Maßgabe, dass die Verbindung nicht FR901228 ist.

2. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass m 1 ist und n 0, 2 oder 3 ist.

3. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass m 2, 3 oder 4 ist und n 1 ist.

4. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eines von p oder q 2 ist oder sowohl p als auch q 2 sind.

5. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass X O ist.

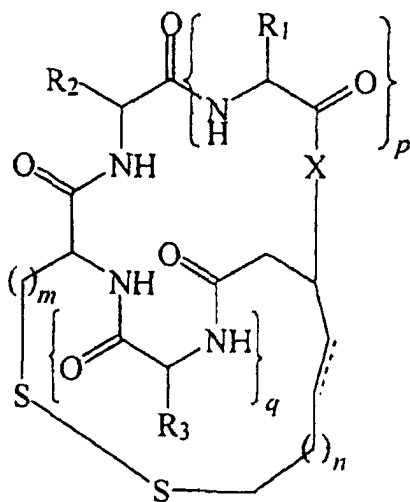
6. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass X NH oder NR ist.

7. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R₁ und R₃ Aminosäureseitenkettenreste sind.

8. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R₂ ein Aminosäureseitenkettenderivat ist.

9. Zusammensetzung, die eine Verbindung nach Anspruch 1 und einen pharmazeutisch annehmbaren Trägerstoff umfasst.

10. Verbindung mit der folgenden Struktur:



(I)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Stereoisomer davon, wobei

m 1, 2, 3 oder 4 ist; n 0, 1, 2 oder 3 ist;

p und q unabhängig 1 oder 2 sind; X O, NH oder NR ist;

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden und unabhängig ein Aminosäureseitenkettenrest oder ein Aminosäureseitenkettenderivat sind; und

R ein niederkettiger Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist, zur Verwendung in einem Verfahren zur Verhinderung oder Unterdrückung einer Immunreaktion oder immunvermittelten Reaktion eines Lebewesens, mit der Maßgabe, dass die Verbindung nicht FR901228 ist.

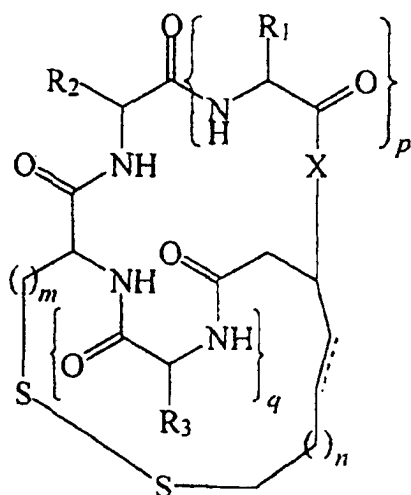
11. Verbindung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Lebewesen an einer Autoimmunerkrankung leidet oder unter dem Risiko steht, daran zu leiden.

12. Verbindung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Lebewesen an einer entzündlichen Erkrankung leidet oder unter dem Risiko steht, daran zu leiden.

13. Verbindung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Lebewesen an einer Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung leidet oder unter dem Risiko steht, daran zu leiden.

14. Verbindung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Lebewesen eine allogene Transplantation durchlaufen wird oder durchlaufen hat.

15. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Lebewesen eine xenogene Transplantation durchlaufen wird oder durchlaufen hat. 16. Verbindung mit der folgenden Struktur:



(I)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Stereoisomer davon, wobei

m 1, 2, 3 oder 4 ist;

n 0, 1, 2 oder 3 ist;

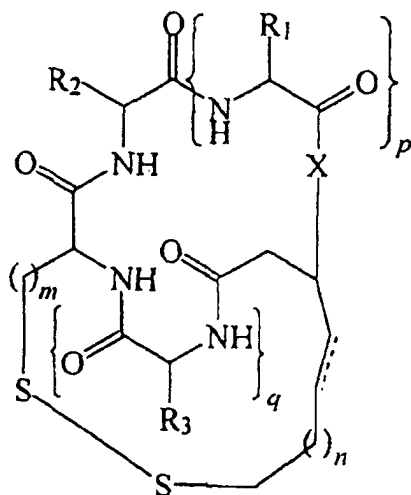
p und q unabhängig 1 oder 2 sind;

X O, NH oder NR ist;

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden und unabhängig eine Aminosäureseitenketteneinheit oder ein Aminosäureseitenkettenderivat sind; und

R ein niederkettiger Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist, zur Verwendung in einem Verfahren zum Inhibieren der Proliferation von Lymphozyten, mit der Maßgabe, dass die Verbindung nicht FR901228 ist.

16. Verbindung mit der folgenden Struktur;



(I)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Stereoisomer davon, wobei

m 1, 2, 3 oder 4 ist;

n 0, 1, 2 oder 3 ist;

p und q unabhängig 1 oder 2 sind;

X O, NH oder NR ist;

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden und unabhängig ein Aminosäureseitenkettenrest oder ein Aminosäureseitenkettenderivat sind; und

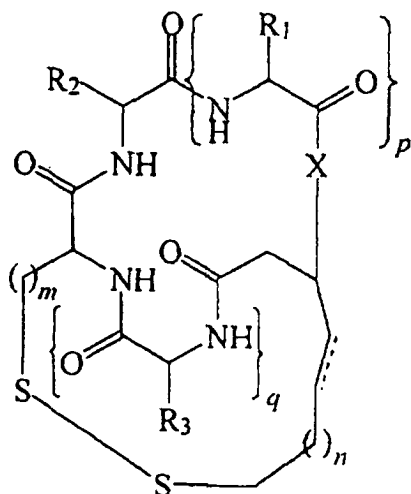
R ein niederkettiger Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist, zur Verwendung in einem Verfahren zur Erhöhung des Überlebens des Transplantates im Anschluss an eine Transplantation, mit der Maßgabe, dass die Verbindung

nicht FR941228 ist,

17. Verbindung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Transplantation eine allogene Transplantation ist.

18. Verbindung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Transplantation eine xenogene Transplantation ist.

19. Verbindung mit der folgenden Struktur:



(I)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Stereoisomer davon, wobei

m 1, 2, 3 oder 4 ist;

n 0, 1, 2 oder 3 ist;

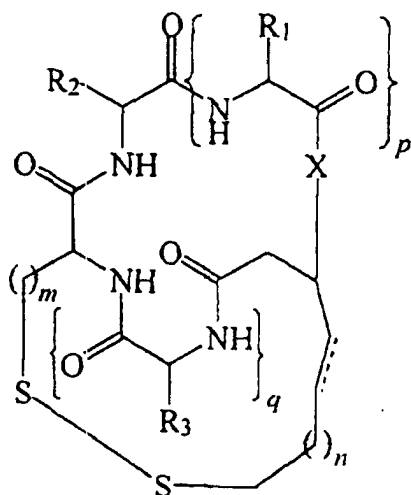
p und q unabhängig 1 oder 2 sind;

X O, NH oder NR ist;

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden und unabhängig ein Aminosäureseitenkettenrest oder ein Aminosäureseitenkettenderivat sind; und

R ein niederkettiger Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist, zur Verwendung in einem Verfahren zur Verringerung der Interleukin-2-Sekretion aus Lymphozyten, mit der Maßgabe, dass die Verbindung nicht FR901228 ist.

20. Verbindung mit der folgenden Struktur:



(I)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Stereoisomer davon, wobei

m 1, 2, 3 oder 4 ist;

n 0, 1, 2 oder 3 ist;

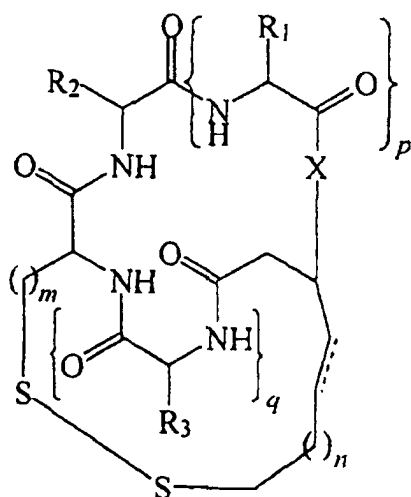
p und q unabhängig 1 oder 2 sind;

X O, NH oder NR ist;

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden und unabhängig ein Aminosäureseitenkettenrest oder ein Aminosäureseitenkettenderivat sind; und

R ein niederkettiger Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist, zur Verwendung in einem Verfahren zum Inhibieren der Induktion von CD25 und CD154 auf Lymphozyten im Anschluss an Lymphozytenstimulation, mit der Maßgabe, dass die Verbindung nicht FR901228 ist.

21. Verbindung mit der folgenden Struktur:



(I)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Stereoisomer davon, wobei

m 1, 2, 3 oder 4 ist;

n 0, 1, 2 oder 3 ist;

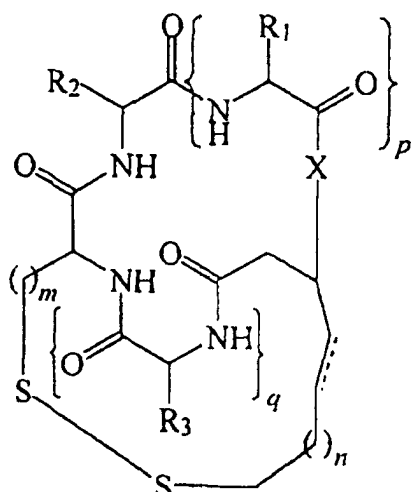
p und q unabhängig 1 oder 2 sind;

X O, NH oder NR ist;

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden und unabhängig ein Aminosäureseitenkettenrest oder ein Aminosäureseitenkettenderivat sind; und

R ein niederkettiger Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist, zur Verwendung in einem Verfahren zum Induzieren von Anergie oder Apoptose in aktivierten T-Zellen, während die Gesamt-T-Zellzahl aufrechterhalten wird, mit der Maßgabe, dass die Verbindung nicht FR901228 ist.

22. Verbindung mit der folgenden Struktur:



(I)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Stereoisomer davon, wobei

m 1, 2, 3 oder 4 ist;

n 0, 1, 2 oder 3 ist;

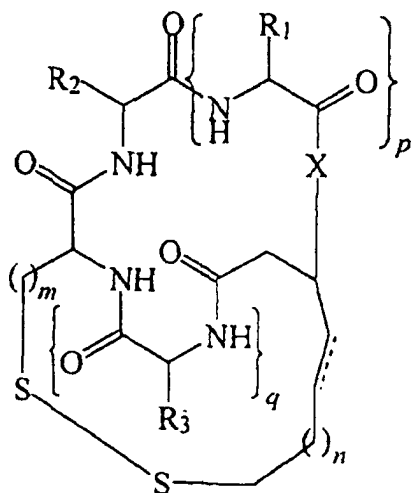
p und q unabhängig 1 oder 2 sind;

X O, NH oder NR ist;

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden und unabhängig ein Aminosäureseitenkettenrest oder ein Aminosäureseitenkettenderivat sind; und

R ein niederkettige Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist, zur Verwendung in einem Verfahren zum Induzieren der Toleranz des Immunsystems gegen ein Antigen, mit der Maßgabe, dass die Verbindung nicht FR901228 ist.

23. Verbindung mit der folgenden Struktur;



(I)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Stereoisomer davon, wobei

m 1, 2, 3 oder 4 ist;

n 0, 1, 2 oder 3 ist;

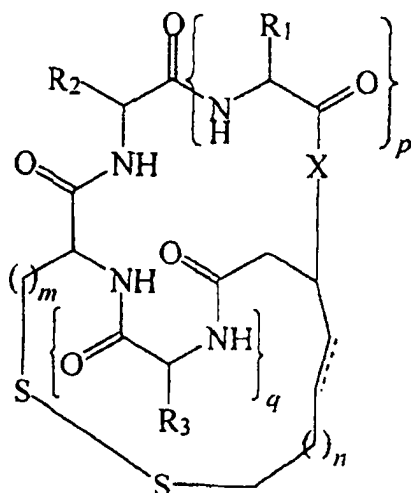
p und q unabhängig 1 oder 2 sind;

X O, NH oder NR ist;

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden und unabhängig ein Aminosäureseitenkettenrest oder ein Aminosäureseitenkettenderivat sind; und

R ein niederkettiger Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist, zur Verwendung in einem Verfahren zur Verringerung der Sekretion von Tumornekrosefaktor-Alpha, mit der Maßgabe, dass die Verbindung nicht FR901228 ist.

24. Verbindung mit der folgenden Struktur;



(I)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Stereoisomer davon, wobei

m 1, 2, 3 oder 4 ist;

n 0, 1, 2 oder 3 ist;

p und q unabhängig 1 oder 2 sind;

X O, NH oder NR ist;

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden und unabhängig ein Aminosäureseitenkettenrest oder ein Aminosäureseitenkettenderivat sind; und

R ein niederkettiger Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist, zur Verwendung in einem Verfahren zum Inhibieren des Zellzyklus einer aktivierten T-Zelle vor dem Eintritt in die S-Phase, mit der Maßgabe, dass die Verbindung nicht FR901228 ist.

25. Verbindung nach einem der Ansprüche 10, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass m 1 ist.

26. Verbindung nach einem der Ansprüche 10, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass m 2, 3 oder 4 ist.

27. Verbindung nach einem der Ansprüche 10, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass n 1 ist.

28. Verbindung nach einem der Ansprüche 10, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass n 0, 2 oder 3 ist.

29. Verbindung nach einem der Ansprüche 10, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass p und q beide 1 sind.

30. Verbindung nach einem der Ansprüche 10, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass eines von p oder q 2 ist oder sowohl p als auch q 2 sind.

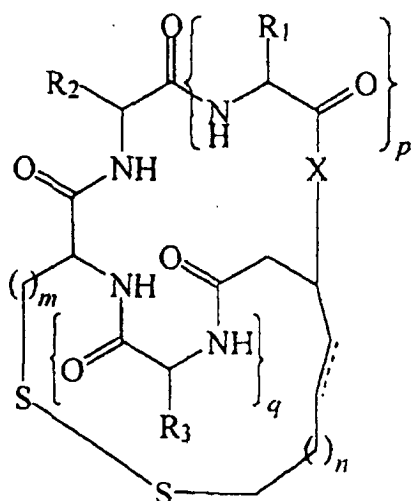
31. Verbindung nach einem der Ansprüche 10, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass X O ist.

32. Verbindung nach einem der Ansprüche 10, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass X NH oder NR ist.

33. Verbindung nach einem der Ansprüche 10, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass R₁ und R₃ identisch oder verschieden und unabhängig ein Aminosäureseitenkettenrest sind.

34. Verbindung nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, dass R₁ und R₃ beide -CH(CH₃)₂ sind.

35. Verbindung nach einem der Ansprüche 10, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass R_2 ein Aminosäureseitenkettenderivat ist.
36. Verbindung nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, dass $R_2 = CHCH_3$ ist.
37. Verbindung nach einem der Ansprüche 10, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass die fakultative Doppelbindung vorhanden ist.
38. Verbindung nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass die Doppelbindung in der trans-Konfiguration ist.
39. Verwendung von FR901228 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verhinderung oder Unterdrückung einer Immunreaktion oder immunvermittelten Reaktion eines Lebewesens.
40. Verbindung nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass das Lebewesen an einer Autoimmunerkrankung leidet oder unter dem Risiko steht, daran zu leiden.
41. Verbindung nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass das Lebewesen an einer entzündlichen Erkrankung leidet oder unter dem Risiko steht, daran zu leiden.
42. Verbindung nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass das Lebewesen an einer Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung leidet oder unter dem Risiko steht, daran zu leiden.
43. Verbindung nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass das Lebewesen eine allogene Transplantation durchlaufen wird oder durchlaufen hat.
44. Verfahren nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass das Lebewesen eine xenogene Transplantation durchlaufen wird oder durchlaufen hat.
45. Verwendung von FR901228 zur Herstellung eines Arzneimittels zum Inhibieren der Proliferation von Lymphozyten.
46. Verwendung von FR901228 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Erhöhung des Überlebens eines Transplantates im Anschluss an eine Transplantation.
47. Verwendung nach Anspruch 47, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Transplantation eine allogene Transplantation ist.
48. Verwendung nach Anspruch 47, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Transplantation eine xenogene Transplantation ist.
49. Verwendung von FR901228 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verringerung der Interleukin-2-Sekretion aus Lymphozyten.
50. Verwendung von FR901228 zur Herstellung eines Arzneimittels zum Inhibieren der Induktion von CD25 oder CD154 auf Lymphozyten im Anschluss an Lymphozytenstimulation.
51. Verwendung von FR901228 zur Herstellung eines Arzneimittels zum Induzieren von Anergie oder Apoptose in aktivierten T-Zellen, während die Gesamt-T-Zellzahl aufrechterhalten wird.
52. Verwendung von FR901228 zur Herstellung eines Arzneimittels zum Induzieren der Toleranz des Immunsystems gegen ein Antigen.
53. Verwendung von FR901228 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verringerung der Sekretion von Tumornekrosefaktor-Alpha.
54. Verwendung von FR901228 zur Herstellung eines Arzneimittels zum Inhibieren des Zellzyklus einer aktivierten T-Zelle vor dem Eintritt in die S-Phase,
55. Verbindung mit der folgenden Struktur:



(I)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Stereoisomer davon, wobei

m 1, 2, 3 oder 4 ist;

n 0, 1, 2 oder 3 ist;

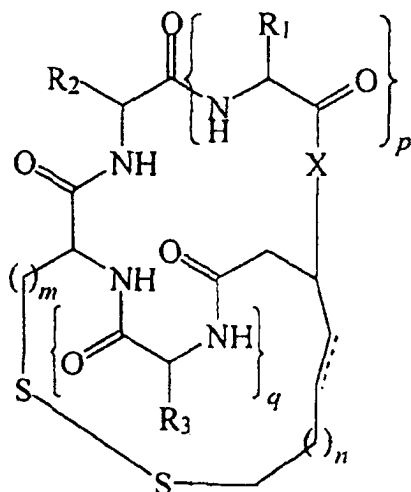
p und q unabhängig 1 oder 2 sind;

X O, NH oder NR ist;

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden und unabhängig ein Aminosäureseitenkettenrest oder ein Aminosäureseitenkettenderivat sind; und

R ein niederkettiger Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist, zur Verwendung in einem Verfahren zum Inhibieren der Proliferation von CD4-T-Zellen, mit der Maßgabe, dass die Verbindung nicht FR901228 ist.

56. Verbindung mit der folgenden Struktur:



(I)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Stereoisomer davon, wobei

m 1, 2, 3 oder 4 ist;

n 0, 1, 2 oder 3 ist;

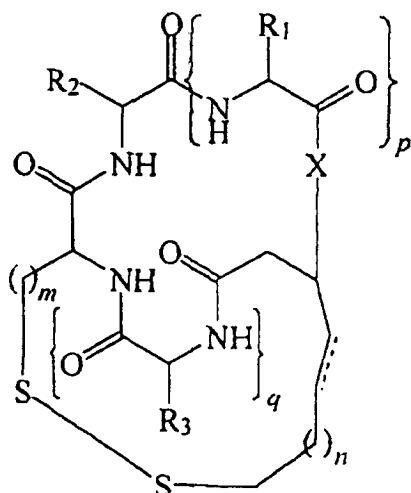
p und q unabhängig 1 oder 2 sind;

X O, NH oder NR ist;

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden und unabhängig ein Aminosäureseitenkettenrest oder ein Aminosäureseitenkettenderivat sind; und

R ein niederkettiger Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist, zur Verwendung in einem Verfahren zum Inhibieren der Proliferation von CD8-T-Zellen, mit der Maßgabe, dass die Verbindung nicht FR901228 ist.

57. Eine Verbindung mit der folgenden Struktur:



(I)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Stereoisomer davon, wobei

m 1, 2, 3 oder 4 ist;

n 0, 1, 2 oder 3 ist;

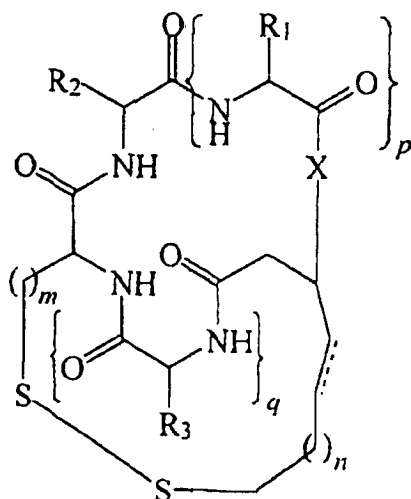
p und q unabhängig 1 oder 2 sind;

X O, NH oder NR ist;

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden und unabhängig ein Aminosäureseitenkettenrest oder ein Aminosäureseitenkettenderivat sind; und

R ein niederkettiger Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist, zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung einer Infektionskrankheit, mit der Maßgabe, dass die Verbindung nicht FR901228 ist.

58. Verbindung mit der folgenden Struktur:



(I)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Stereoisomer davon, wobei

m 1, 2, 3 oder 4 ist;

n 0, 1, 2 oder 3 ist;

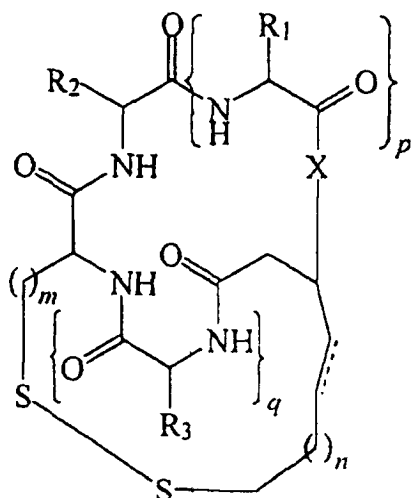
p und q unabhängig 1 oder 2 sind;

X O, NH oder NR ist;

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden und unabhängig ein Aminosäureseitenkettenrest oder ein Aminosäureseitenkettenderivat sind; und

R ein niederkettiger Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist, zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung von Parasitenkrankheiten, wobei die Schädigung durch eine entzündliche Reaktion induziert wird, mit der Maßgabe, dass die Verbindung nicht FR901228 ist.

59. Verbindung mit der folgenden Struktur:



(I)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Stereoisomer davon, wobei

m 1, 2, 3 oder 4 ist;

n 0, 1, 2 oder 3 ist;

p und q unabhängig 1 oder 2 sind;

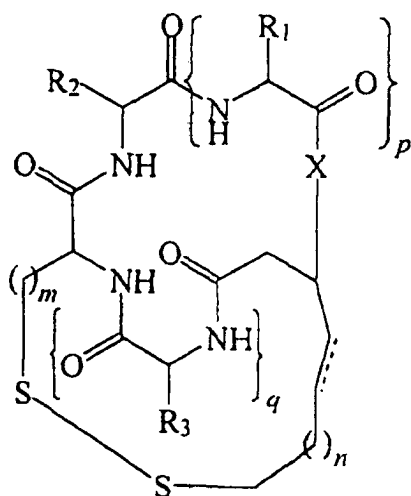
X O, NH oder NR ist;

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden und unabhängig ein Aminosäureseitenkettenrest oder ein Aminosäureseitenkettenderivat sind; und

R ein niederkettiger Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist, zur Verwendung in einem Verfahren zur Verhinderung oder Behandlung von Kreislauferkrankungen, mit der Maßgabe, dass die Verbindung nicht FR901228 ist.

60. Verbindung nach Anspruch 60, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Kreislauferkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus Arteriosklerose, Atherosklerose, Vaskulitis, Polyarteriitis nodosa und Myokarditis besteht,

61. Verbindung mit der folgenden Struktur:



(I)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Stereoisomer davon, wobei

m 1, 2, 3 oder 4 ist:

n 0, 1, 2 oder 3 ist:

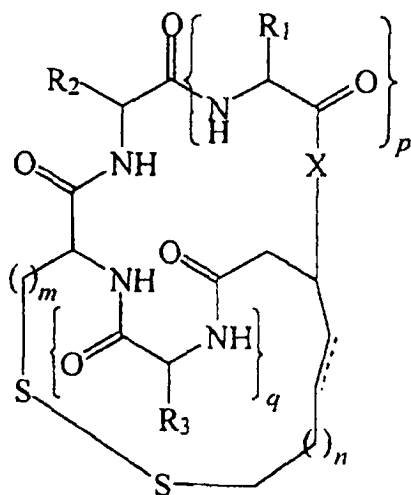
p und q unabhängig 1 oder 2 sind:

X O, NH oder NR ist:

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden und unabhängig ein Aminosäureseitenkettenrest oder und Aminosäureseitenkettenderivat sind: und

R ein niederkettiger Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist, zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung eines Zustandes bei einem Lebewesen, dessen Behandlung durch Verringern der Lymphozytenproliferation und/oder -aktivierung beeinflusst oder erleichtert wird, mit der Maßgabe, dass die Verbindung nicht FR901228 ist.

62. Verbindung mit der folgenden Struktur:



(1)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Stereoisomer davon, wobei

m 1, 2, 3 oder 4 ist:

n 0, 1, 2 oder 3 ist:

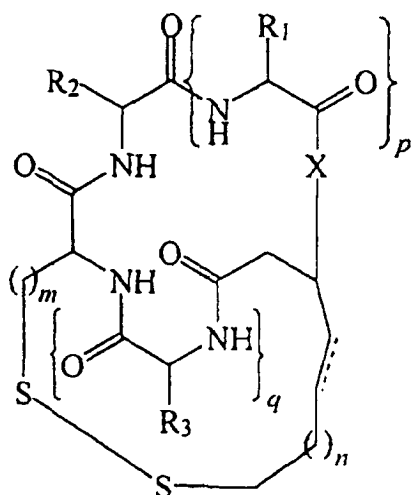
p und q unabhängig 1 oder 2 sind:

X O, NH oder NR ist;

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden und ein Aminosäureseitenkettenrest oder ein Aminosäureseitenkettenderivat sind; und

R ein niederkettiger Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist, zur Verwendung in einem Verfahren zur Verhinderung oder Behandlung entzündlicher Erkrankungen, mit der Maßgabe, dass die Verbindung nicht FR901228 ist.

63. Verbindung mit der folgenden Struktur;



(I)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Stereoisomer davon, wobei

m 1, 2, 3 oder 4 ist;

n 0, 1, 2 oder 3 ist;

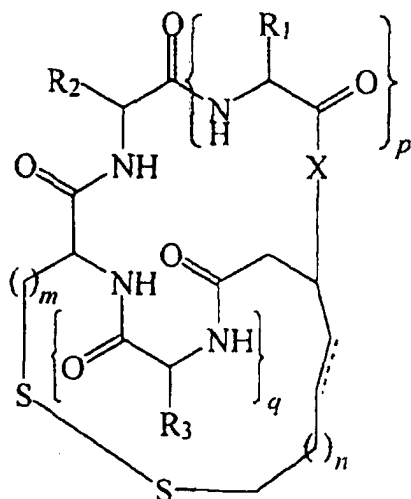
p und q unabhängig 1 oder 2 sind;

X O, NH oder NR ist;

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden und unabhängig ein Aminosäureseitenkettenrest oder ein Aminosäureseitenkettenderivat sind; und

R ein niederkettiger Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist, zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung einer hyperproliferativen Hauterkrankung, mit der Maßgabe, dass die Verbindung nicht FR901228 ist.

64. Verbindung mit der folgenden Struktur:



(I)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Stereoisomer davon, wobei

m 1, 2, 3 oder 4 ist;

n 0, 1, 2 oder 3 ist;

p und q unabhängig 1 oder 2 sind;

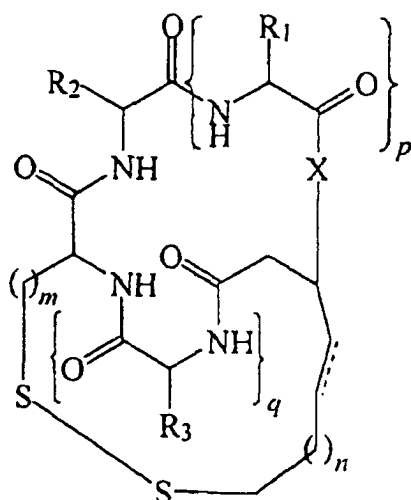
X O, NH oder NR ist;

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden und unabhängig ein Aminosäureseitenkettenrest oder ein Aminosäureseitenkettenderivat sind; und

R ein niederkettiger Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist, zur Verwendung in einem Verfahren zum Inhibieren des Wachstums von CD4-T-Zellen und Induzieren von Apoptose darin, mit der Maßgabe, dass die Verbindung

nicht FR901228 ist.

65. Verbindung mit der folgenden Struktur:



(I)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Stereoisomer davon, wobei

m 1, 2, 3, oder 4 ist;

n 0, 1, 2 oder 3 ist;

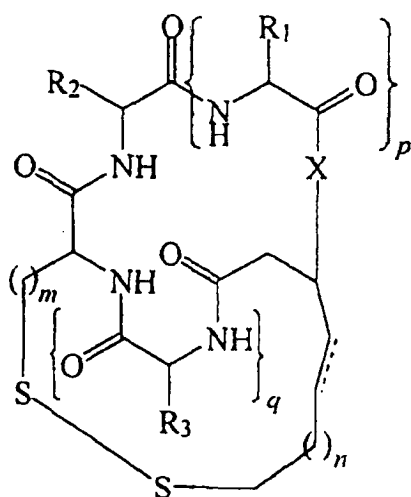
p und q unabhängig 1 oder 2 sind;

X O, NH oder NR ist;

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden und unabhängig ein Aminosäureseitenkettenrest oder ein Aminosäureseitenkettenderivat sind; und

R ein niederkettiger Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist, zur Verwendung in einem Verfahren zum Inhibieren des Wachstums von CD8-T-Zellen und Induzieren von Apoptose darin, mit der Maßgabe, dass die Verbindung nicht FR901228 ist.

66. Verbindung mit der folgenden Struktur:



(I)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Stereoisomer davon, wobei

m 1, 2, 3 oder 4 ist;

n 0, 1, 2 oder 3 ist;

p und q unabhängig 1 oder 2 sind;

X O, NH oder NR ist;

R₁, R₂ und R₃ identisch oder verschieden und unabhängig ein Aminosäureseitenkettenrest oder ein Aminosäureseitenkettenderivat sind; und

R ein niederkettiger Alkyl-, Aryl- oder Arylalkylrest ist, zur Verwendung in einem Verfahren zum Inhibieren der c-myc-Expression in aktivierten T-Zellen, mit der Maßgabe, dass die Verbindung nicht PR901228 ist.

67. Verwendung von FR901228 zur Herstellung eines Arzneimittels zum Inhibieren der Proliferation von CD4-T-Zellen.

68. Verwendung von FR901228 zur Herstellung eines Arzneimittels zum Inhibieren der Proliferation von CD8-T-Zellen.

69. Verwendung von FR901228 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung einer Infektionskrankheit.

70. Verwendung von FR901228 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Parasitenkrankheiten, wobei die Schädigung durch eine entzündliche Reaktion induziert wird.

71. Verwendung von FR901228 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verhinderung oder Behandlung von Kreislauferkrankungen.

72. Verwendung nach Anspruch 72, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Kreislauferkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus Arteriosklerose, Atherosklerose, Vaskulitis, Polyarteriitis nodosa und Myokarditis besteht.

73. Verwendung von FR901228 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines Zustandes bei einem Lebewesen, dessen Behandlung durch die Verringerung der Lymphozytenproliferation und/oder -aktivierung beeinflusst oder erleichtert wird.

74. Verwendung von FR901228 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verhinderung oder Behandlung von entzündlichen Erkrankungen.

75. Verwendung von FR901228 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung einer hyperproliferativen Hauterkrankung.

76. Verwendung von FR901228 zur Herstellung eines Arzneimittels zum Inhibieren des Wachstums von CD4-T-Zellen und Induzieren von Apoptose darin.

77. Verwendung von FR901228 zur Herstellung eines Arzneimittels zum Inhibieren des Wachstums von CD8-T-Zellen, und Induzieren von Apoptose darin.

78. Verwendung von FR901228 zur Herstellung eines Arzneimittels zum Inhibieren der c-myc-Expression in aktivierten T-Zellen.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

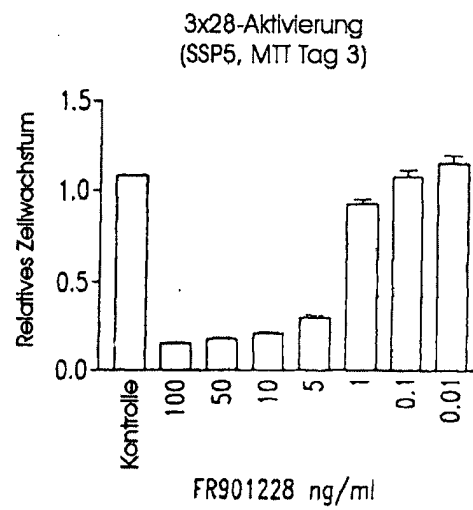


Fig. 1

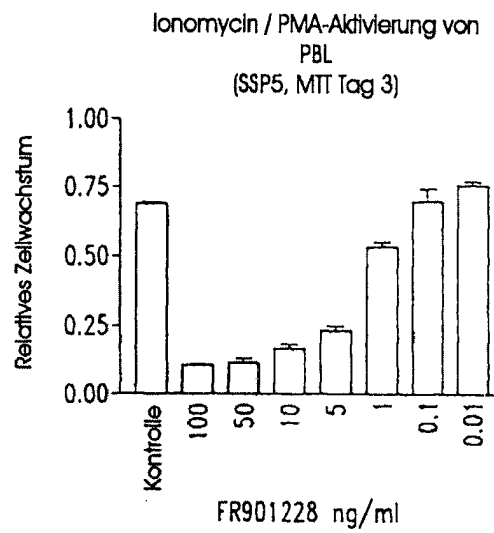


Fig. 2

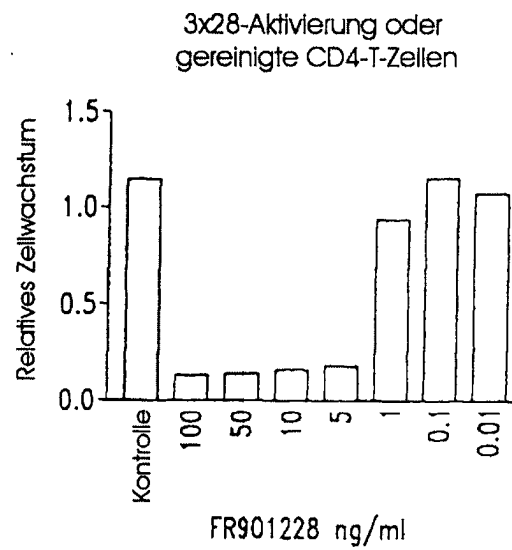


Fig. 3

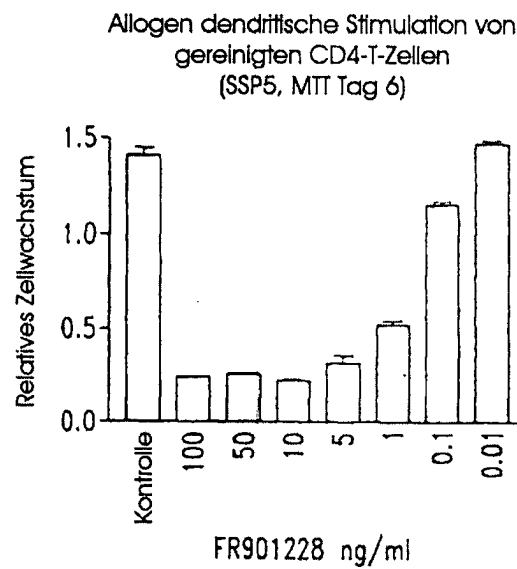


Fig. 4

Wirkung von FR901228 auf Lymphozytenaktivierungsmarker

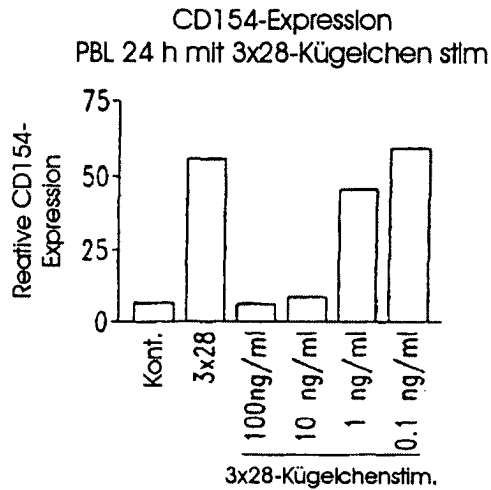


Fig. 5A

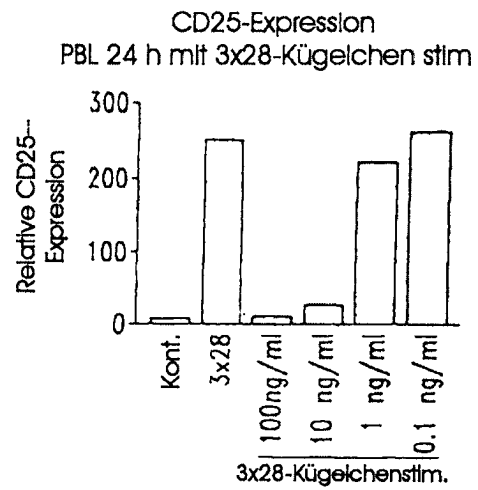


Fig. 5B

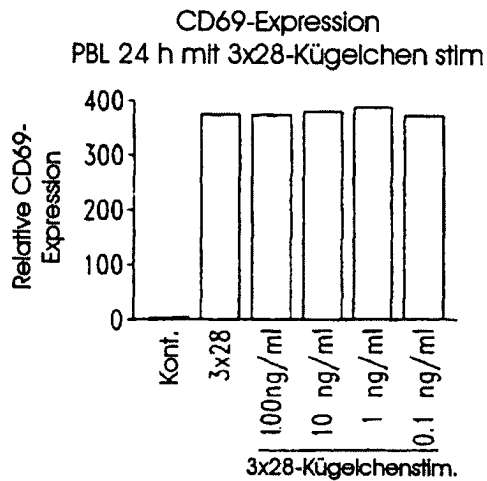


Fig. 5C

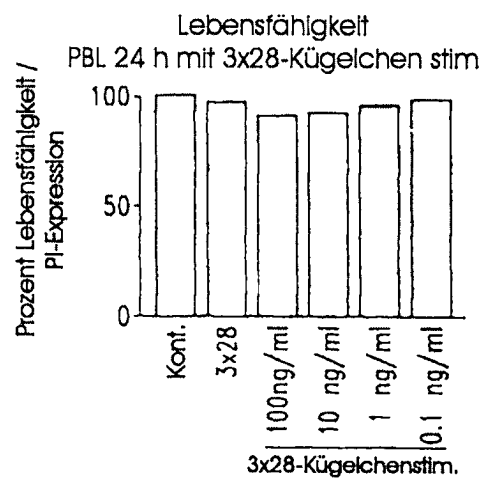


Fig. 5D

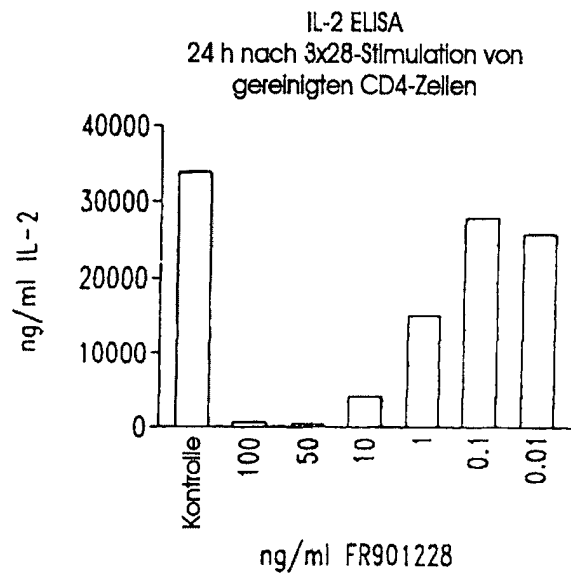


Fig. 6

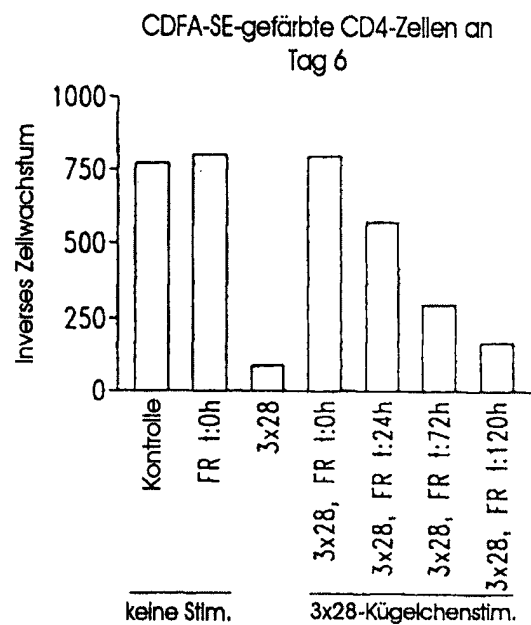


Fig. 7

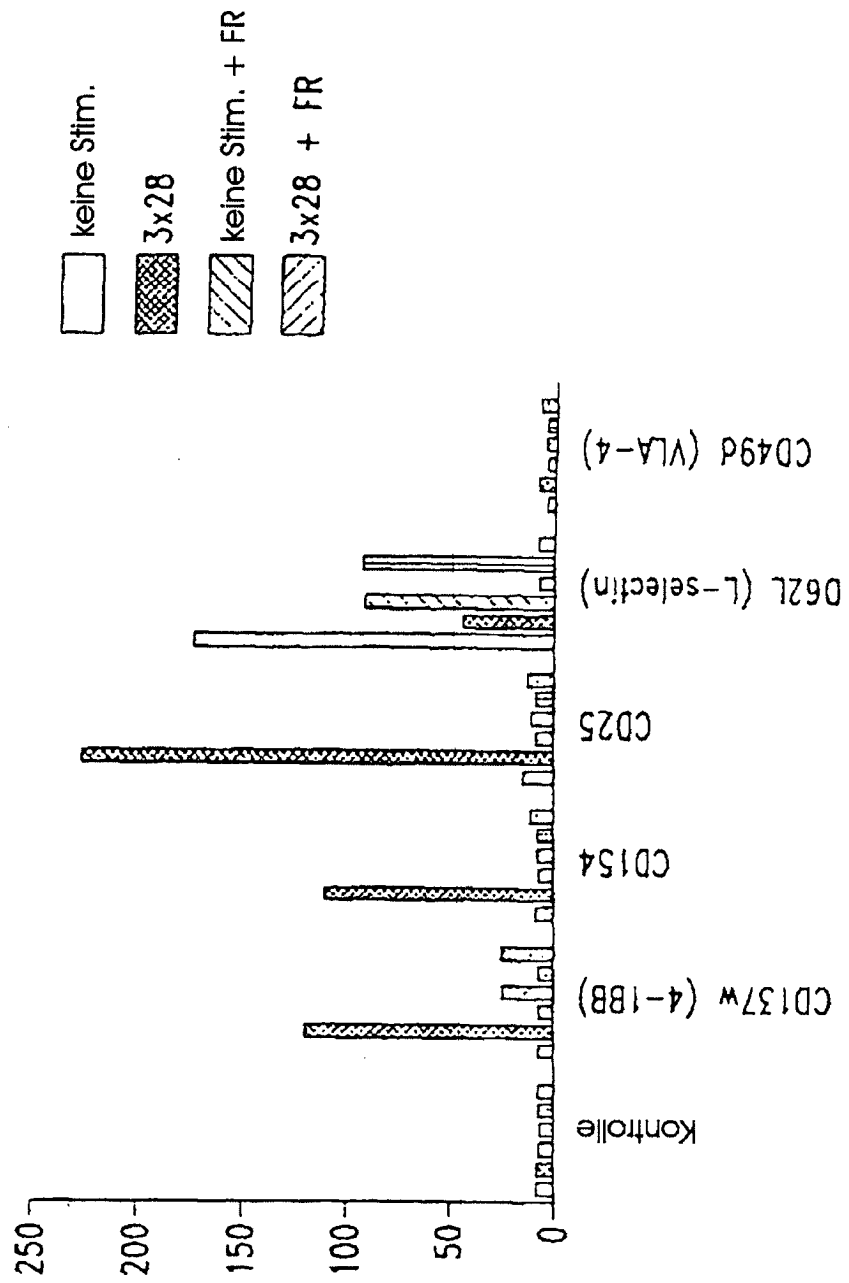


Fig. 8A

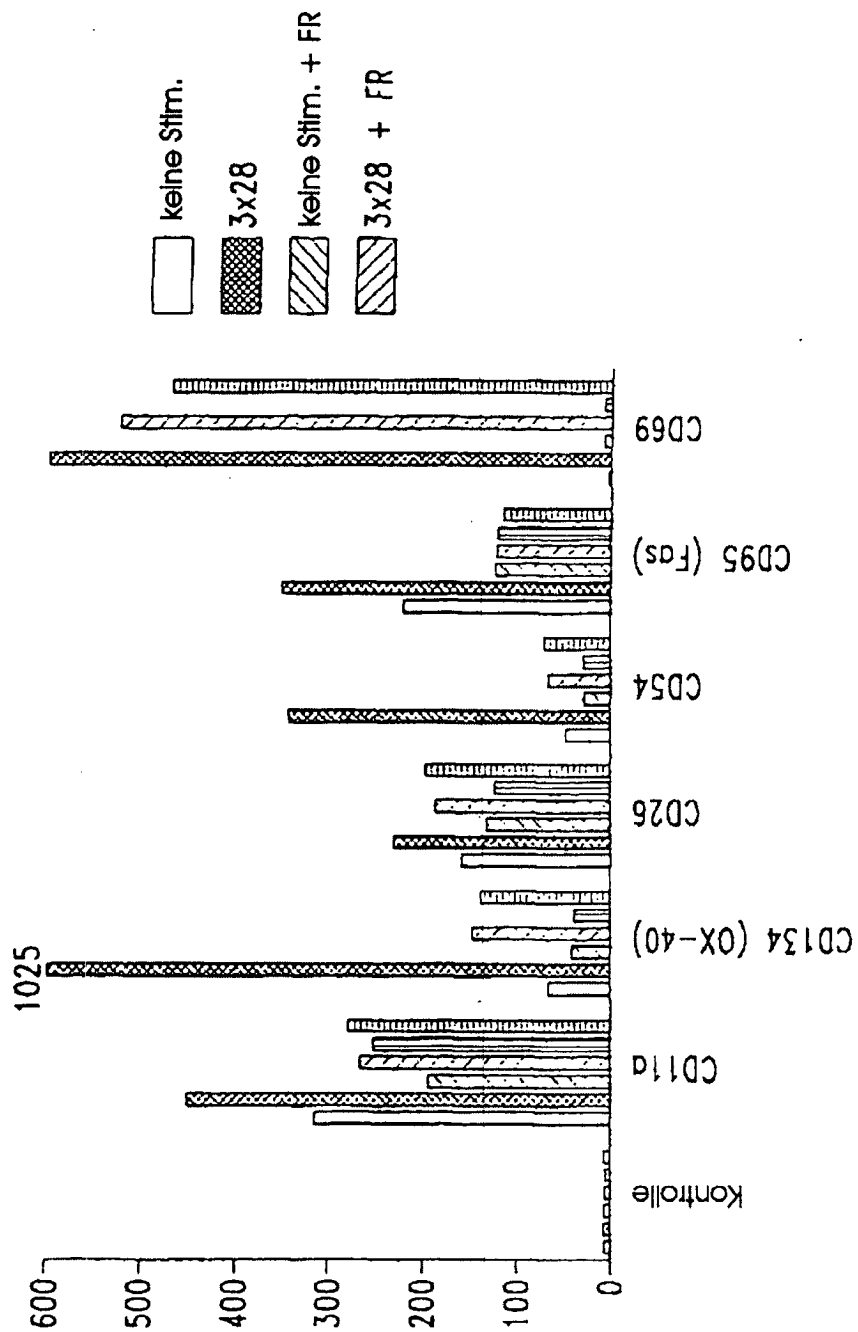
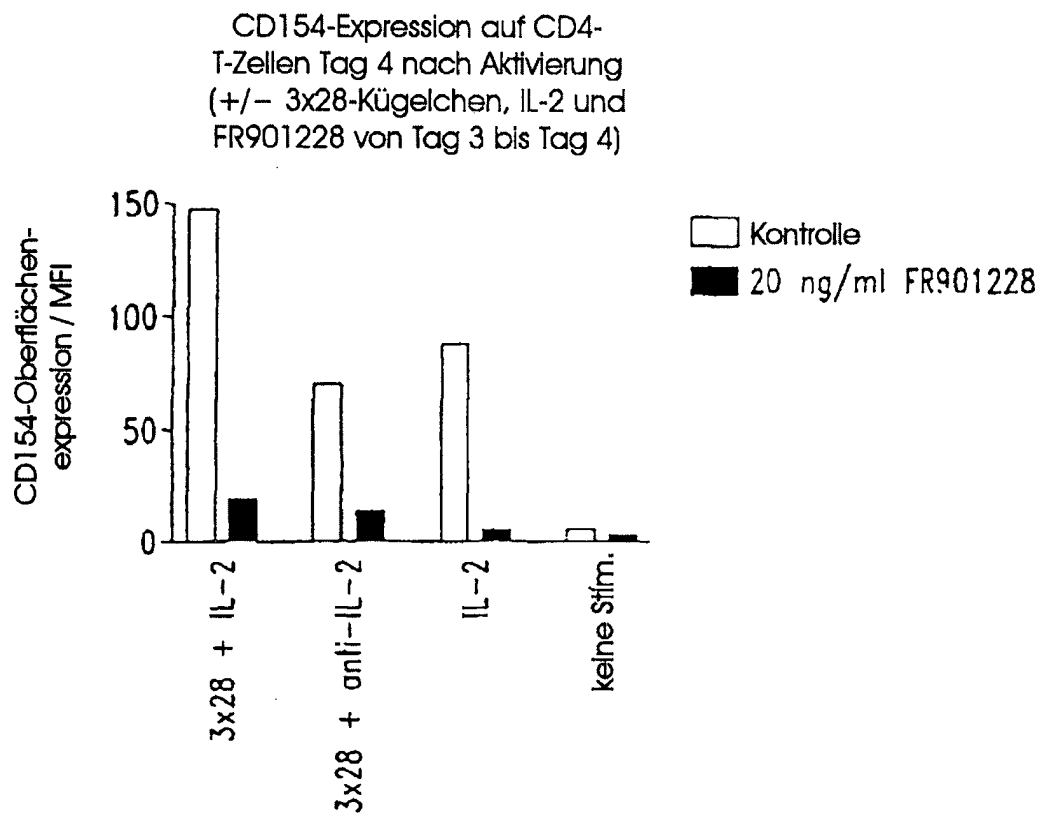
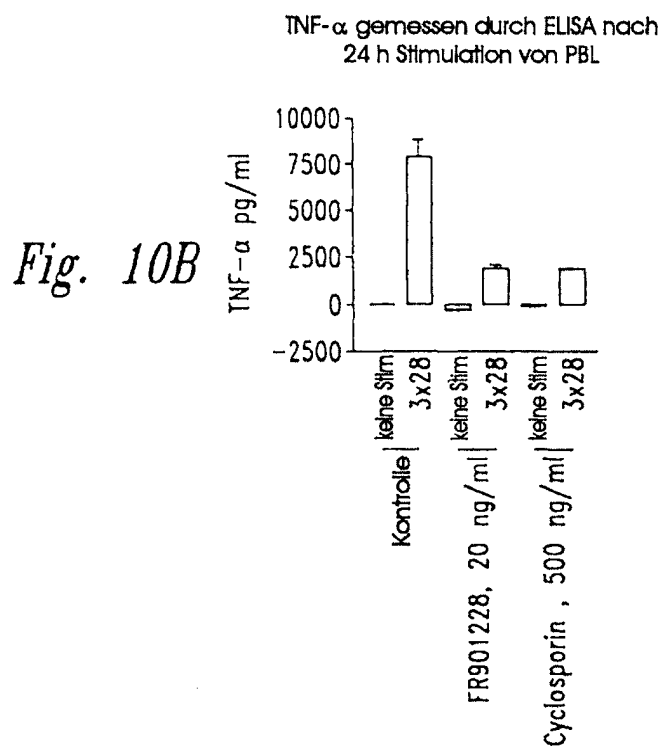
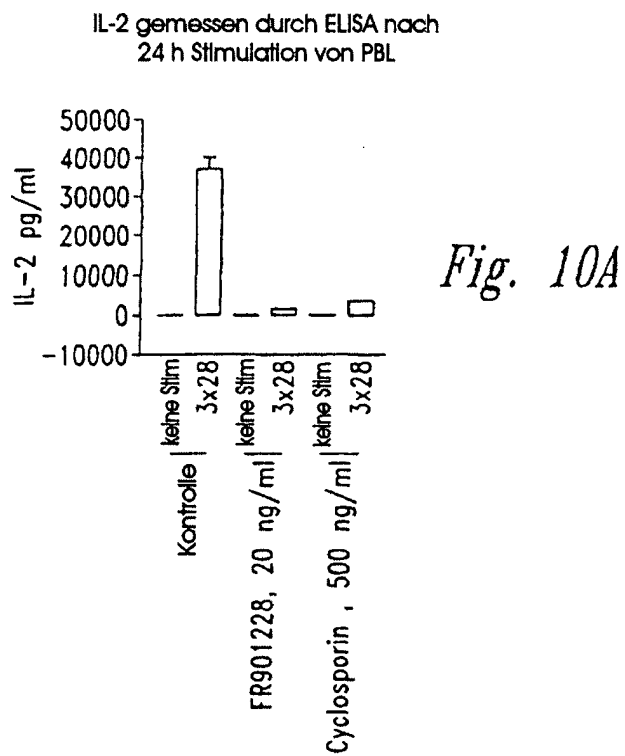


Fig. 8B

*Fig. 9*



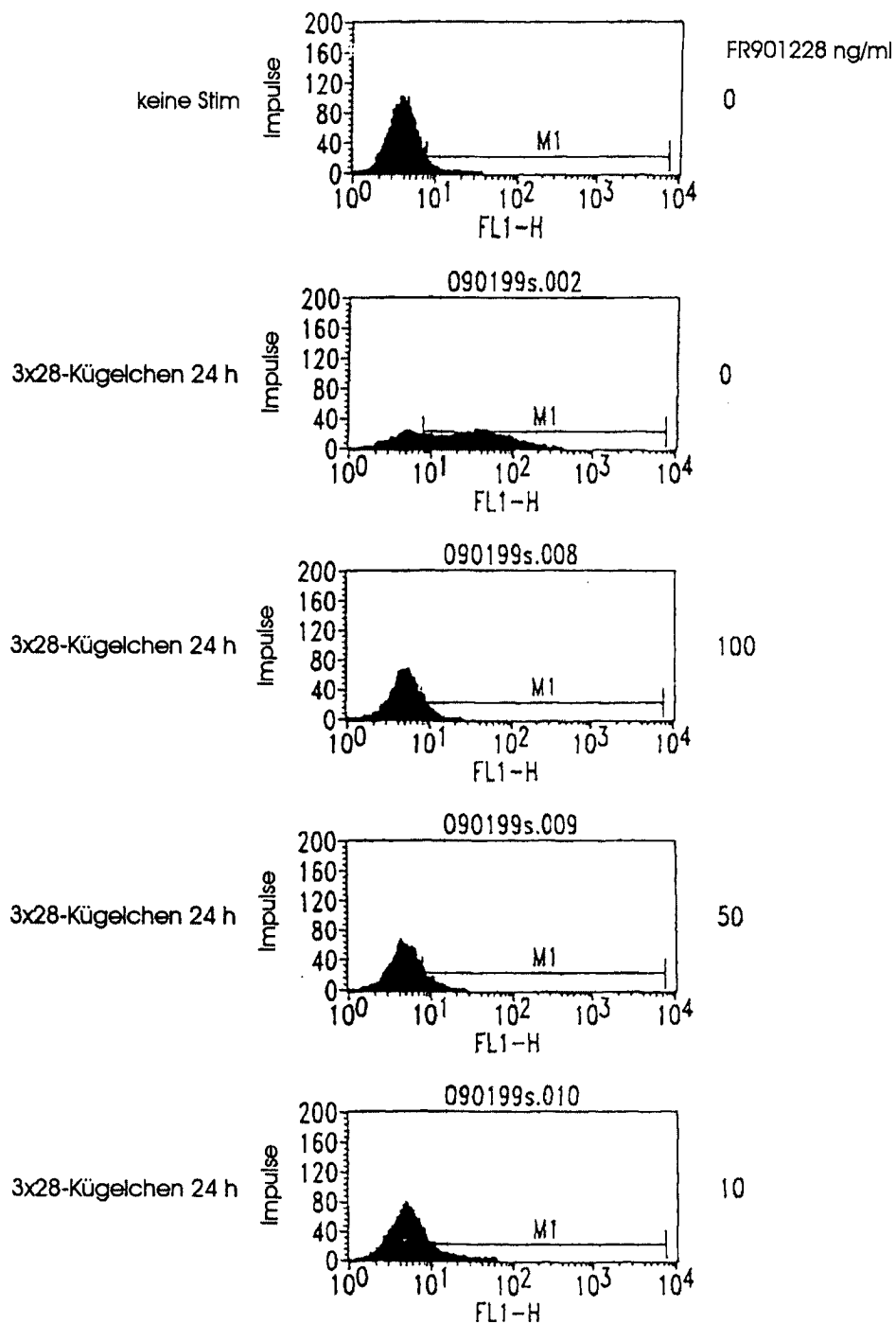


Fig. 11

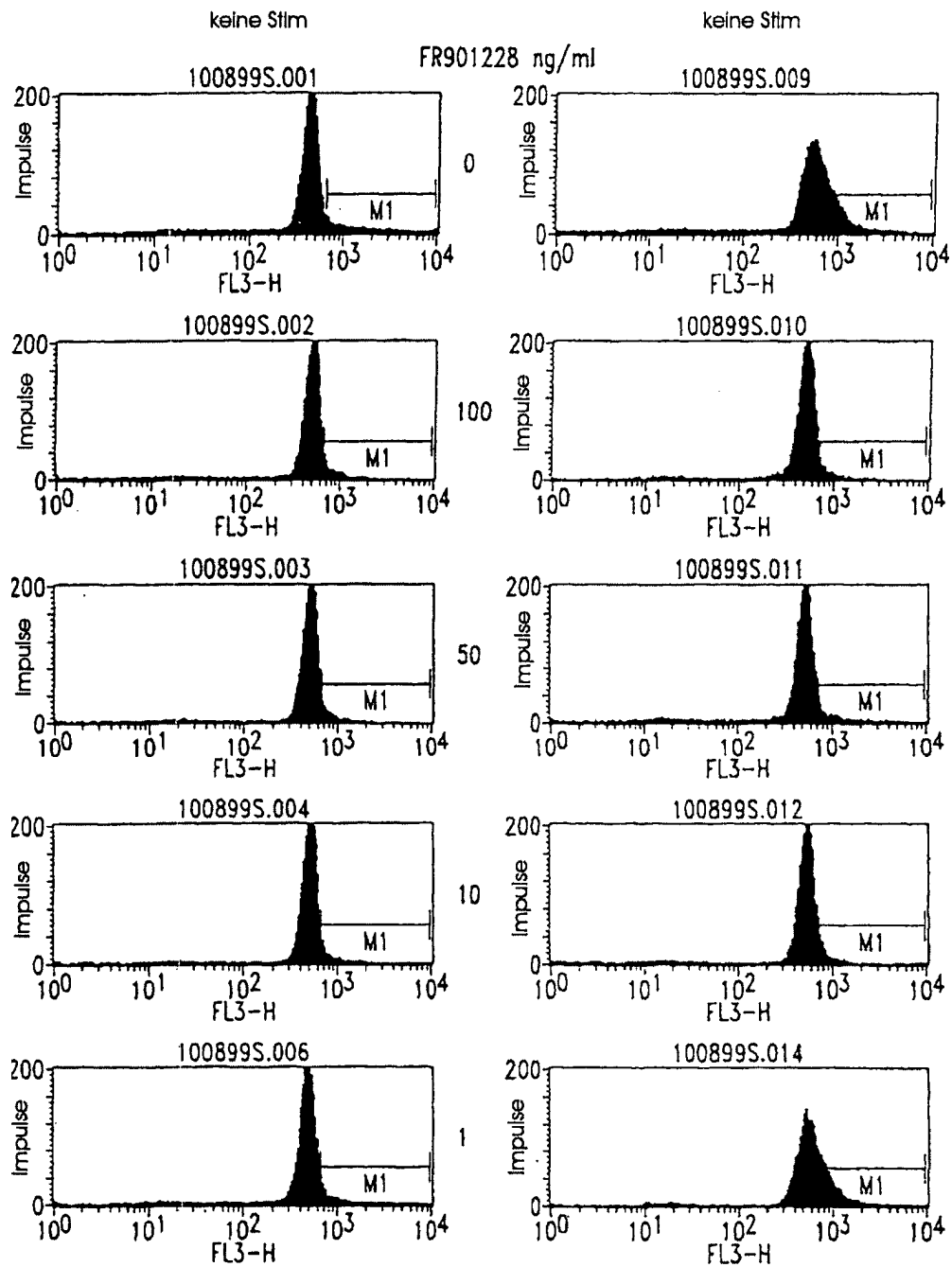


Fig. 12