[19] المملكة العربية السعودية SA
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

[11] رقم البراءة: ٩٤
[45] تاريخ المنح: ١٤٢٤/١٢/٠٢هـ
الموافق: ٢٠٠٤/٠١/٢٤م

[12] براءة اختراع

[72] اسم المخترع: سو يونج كو،هانز كوبل، بريجيت روزنويرث،ديتر سيباش، رينيه بي. ترابر، رونالد وينجر، بيترو بولينجر

[73] مالك البراءة: نوفارتيس ايه جي
عنوانه: شوارزوالدالليي ٢١٥، ٤٠٥٨، بازل سويسرا

[74] الوكيل: احمد نجدت بازارباشي

[21] رقم الطلب: ٩٢١٢٠٣٤٤

[22] تاريخ الإيداع: ١٤١٢/٠٧/١٥هـ
الموافق: ١٩٩٢/٠١/١٩م

[24] بداية سريان حقوق الملكية الفكرية:
١٤٢٤/١٢/٠٢ هـ الموافق: ٢٠٠٤/٠١/٢٤ م

[30] بيانات الأسبقية:

٠٥/٠٨/١٩٩١م	بريطانيا [GB]	٩١١٦٨٣٦
١٩٩٠/١١/٠٢م	بريطانيا [GB]	٩٠٢٣٨٥٩
١٩٩٠/١١/٠٥م	بريطانيا [GB]	٩٠٢٣٩٧٠
١٩٩٠/١١/٠٥م	بريطانيا [GB]	٩٠٢٣٩٧١
١٩٩٠/١١/٠٥م	بريطانيا [GB]	٩٠٢٣٩٧٢

[51] التصنيف الدولي[٧] :
Int. Cl.[7]: C07K 7/64, A61K 38/12

[56] المراجع:

براءة امريكية	٤٨١٤٣٢٣	١٩٨٩/٠٣/٢١م
طلب اوروبي	٣٧٣٢٦٠	١٩٩٠/٠٦/٢٠م

[54] اسم الاختراع:سبورينات حلقية(سايكلوسبورينات) cyclosporins جديدة

[57] الملخص: لقد وجد أن عدم كبت المناعة non-immunosuppressive بواسطة سبورينات حلقية (سايكلوسبورينات) مرتبطة مع فيلين حلقي (سايكلوفيلن) cyclophilin - binding cyclosporins تكون مفيدة في معالجة ومنع متلازمة أو مرض نقص المناعة المكتسبة (الإيدز) AIDS والاعتلالات المتعلقة بالإيدز AIDS – related disorders.
تتضمن تلك السبورينات الحلقية على مشتقات سيكلوسبورينات ciclosporin جديدة معدلة عند المواضع ٤ و / أو ٥.

١٣ عنصر حماية ، ٣ أشكال

سبورينات حلقية (سايكلوسبورينات) cyclosporins جديدة

الوصف الكامل

خلفية الاختراع :-

يتعلق هذا الاختراع بسبورينات حلقية(سايكلوسبورينات) cyclosporins جديدة ، وباستعمالها كمركبات صيدليةpharmaceuticals وتركيبات صيدلية pharmaceutical compositions متضمنة عليها وكذلك بعمليات لإنتاجها .

تتضمن السبورينات الحلقية مجموعة مميزة بنائيا structurally distinctive وحلقية cyclic من poly- N–methylated undecapeptides تمتلك بشكل عام فعالية طبية Pharmacological وبصفة خاصة فعالية كبت المناعة immunosuppressive و/ أو مضادة للالتهابات antinflammatory و/ أو مضادة للطفليات antiparasitic. أول السبورينات الحلقية التى تم عزلها كانت الايضة الفطرية fungal metabolite السيكلوسبورينية Ciclosporin أو السايكلوسبورينية cyclosporin الموجودة طبيعيا والمعروفة أيضا بالسبورين الحلقي (السايكلوسبرين) A (cyclosporins A) ومتوافرة تجاريا تحت اسم العلامة التجارية ساندااميونSANDIMMUN أو SANDIMMUNE® أن السيكلوسبورين هو السايكلوسبورين cyclosporins ذى الصيغة

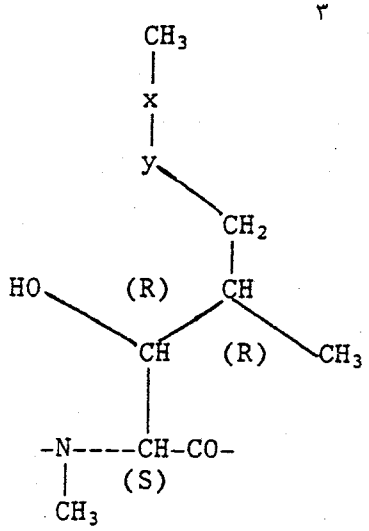
MeBmt-αAbu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-(D)Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 (A)

حيث تمثل MeBmt

N- methyl- (4R)- 4- but- 2E- en- 1- yl- 4- methyl-(L) threonyl

المتبقى من الصيغه B .



(B)

حيث -X-y تكون CH=CH—(trans)

الوصف العام للاختراع

منذ الاكتشاف الجديد للسيكلوسبورين ciclosporin ، تم عزل أنواع عديدة من السبورينات الحلقية cyclosporins الموجودة طبيعيا وتم التعرف عليها ،وتم تحضير العديد من السبورينات الحلقية cyclosporins الغير طبيعية عن طريق وسائل تشييدية تامة total- synthetic او شبه تشييدية semi- synthtic أو عن طريق تقنيات معدلة مطبقة للاستنبات modified culture techniques ، والمجموعة class المتضمنة على سبورينات حلقية أصبحت الآن جوهرية substatial وتشمل على سبيل المثال ،على سبورينات حلقية A الى Z الموجودة طبيعياً (ترابر Traber وآخرين Helv Chim Acta ٦٠، ١٢٤٧-١٢٥٥ (١٩٧٧م)؛ ترابرTraber واخرين Helv Chim Acta ٦٥، ١٦٥٥-١٦٦٧(١٩٨٢م) ؛ كوبل Kobel وآخرين المجلة الأوروبية لعلوم الكائنات الدقيقة التطبيقية والتقنية الحيوية Europ. J. Applied Micrbiology and Biotechnology ، ١٤ ، ٢٣٧ -٢٤٠(١٩٨٢م)؛ فون وارثبورجVon Warthurg وآخرين، التقدم فى مرض الحساسية Progress In Allergy ، ٣٨،٢٨-٤٥،(١٩٨٦م)،وأيضا مشتقات سبورين حلقى متنوعة غير طبيعية وسبورينات حلقية صناعية artificial أو مشيدة synthetic تشمل ثنائى هيدروسبورينات حلقية dihydro- cyclosporins[حيث الجزء -x-y- من المتبقى MeBmt(الصيغةB السابقة)يكون مشبعا لكى يعطى-CH2-CH2-=-y-x-]

وسبورينات حلقية مشتقة derivatised cyclosporins (مثلا حيث الذرة 3'-o من المتبقى MeBmt تكون عليها مجموعه استيلacylated او يتم وضع احلال substituent إضافى عند ذرة الكربون – ألفا(α) من المتبقى ساركوسيل sarcosyl residue عند الموقع٣) ،وسبورينات حلقية حيث يتواجد المتبقى MeBmt فى شكل متماثلات isomeric form(مثلا حيث يكون الترتيب الفراغى configuration خلال المواقع ٦ ' ، ٧ ' من المتبقى MeBmt عبارة عن cis بالأحرى عن trans) ،والسبورينات الحلقية حيث تدمج احماض أمينية amino acids عديدة عند مواقع محددة خلال التتابع الببيتدى peptide sequence ، مثلا استخدام طريقة التشييد التامةtotal synthetic method لإنتاج سبورينات حلقية مطورة بواسطة R.Wenger ر. وينجر أنظر ترابر Traber وآخرين(١) ،وترابر Traber وآخرين (٢) ،وكوبلKobel وآخرين ، loc. Cit. ؛ والبراءات الامريكية أرقام ٤,١٠٨,٩٨٥، ٤,٢٢٠,٦٤١، ٤,٢٨٨,٤٣١، ٤,٥٥٤,٣٥١، ٤,٣٩٦,٥٤٢، ٤,٧٩٨,٨٢٣ ونشرات البراءات الأوربية أرقام ٣٤,٥٦٧أ ، ٥٦,٧٨٢أ ، ٣٠٠,٧٨٤أ ، ٣٠٠,٧٨٥، ٤١٤,٦٣٢أ ؛ نشرات البراءة الدولية رقم WO86/02080 ؛ ونشرات البراءات الإنجليزية رقم ٢,٢٠٦,١١٩، ٢,٢٠٧,٦٧٨؛و وينجر Wenger(١)، Transpl.proc. ، ١٥ ، 2230 : 1 suppl. (١٩٨٣) ، و وينجرWenger (٢) Angew.Chem.Int.Ed. ٢٤، ٧٧(١٩٨٥) ، و وينجر Wenger(٣) ،والتقدم فى كيمياء المنتجات الطبيعية العضوية Progress in Chemistry of Organic Natural Products ،٥٠ ،(١٩٨٦)،١٢٣.

وتعتبرالمجموعةclass المتضمنةالسبورينات الحلقيةcyclosporinsكبيرةجدا حقيقةوتتضمن على سبيل المثال السيكلوسبورينات(cyclosporins)التالية -^{2} (Thr) ، - ^{2} (Val) ، -$(Nva)^{2}$ ، و -$(Nva)^{2}$-$(Nva)^{5}$ (أيضا تعرف ك Cyclosporins C,D,G and M ،على التوالى)، و -(3-o

Dihydro- و ، (cycloporin A acetate بـــ أيضا تعرف)acetyl- MeBmt)[1]-Ciclosporin

(D) Ser)[8]- ، (dihydro-cyclosporin D بـــأيضاتعرف ،MeBmt)[1]-(Val)[2]-Ciclosporin

Ciclosporin،و (MeIle)11- Ciclosporin ،و[(D)MeVal]11 –Ciclosporin (أيضا تعرف بـــ

(cyclosporin H ، و(MeAla)[6]-Ciclosporin ، و (D) pro)- Ciclosporin ... الخ.

طبقا للتسميةالتقليديةConventional nomenclature للسبورينات الحلقية cyclosporins فإنها تعرف خلال الوصف الحالى وعناصر الحماية بواسطة الرجوع إلى التركيب البنائى للسيكلوسبورين Ciclosporin(سبورين حلقىCyclosporin Aمثلا) ويتم ذلك بواسطة توضيح المتبقيات residues فى الجزيء التى تختلف عن تلك الموجودة فى السيكلوسبورين Ciclosporinثم يطبق المصطلح " سيكلوسبورين Ciclosporin " لكى يميز المتبقيات الباقية والتى تكون مطابقة لتلك الموجودة فى السيكلوسبورين Ciclosporin . وفى نفس الوقت تستخدم البادئة prefex "ثنائى هيدرو dihydro " لكى تحدد السبورينات الحلقية التى يكون فيها المتبقى MeBmt مهدرجا hydrogenated(dihydro MeBmt) على سبيل المثال حيث -x-y- في الصيغة B عبارة عن $-CH_2-CH_2-$. وبذا يكون [Thr]²-Ciclosporin هو يتضمن التتابع الموضح فى الصيغه A ، ولكن حيث تستبدل αAbu عند الموضع ٢ بواسطة Thr ، ويكون (Dihydro-MeBmt)[1]-(Val)[2]-Ciclosporinعبارة عن سبورين حلقى cyclosporin متضمن التتابع الموضح فى صيغة A ، ولكن يكون المتبقى MeBmt مهدرجا عند الموقع ١ ويستبدل αAbu عند الموقع ٢ بواسطة Val .

بالاضافة ، فإن المتبقيات الحمضية الامينية amino acid residues المشار اليها بالاختصار مثلا Ala ، MeVal ، αAbu .. الخ ، طبقا للممارسة التقليدية ، ينبغى أن يفهم بأنها تتضمن الترتيب الفراغى-L مالم يوضح شيئ آخر ، مثلا فى حالة (D)-Ala. اختصارات المتبقى residues abbreviations التى تسبق بواسطة "Me "كما فى حالة "MeLeu" ، تمثل-α)

(N-Methylated residues . وترقم المتبقيات الفرديةIndividual residues من جزئ سبورين حلقى cyclosporin ، كما هو مألوف فى هذا التخصص ، مع اتجاه دوران عقارب الساعة وتبدأ بواسطة المتبقى MeBmt أو dihydro-MeBmt عند الموقع ١ . يتم العمل بنفس الترتيب الرقمى خلال الوصف الحالى وعناصر الحماية .

الوصف التفصيلى:-

لقد اقر جيدا الآن أن السيكلوسبورين cyclosporin يعمل بطريقة التداخل interfering مع عملية تنشيط خلية T (T-cell activation)بواسطة منع ابتداء نسخ IL-2 (blocking transcription initiation of IL-2) ، على الرغم من أن الآلية الدقيقة لم يتم توضيحها بعد . ولقد وضح أن السيكلوسبورين ciclosporin يكون معقداً complex مع بروتين العصارة الخلوية 17KD cytosolic protein (فيلين حلقى ,cyclophilin) ، الذى يحدث فى العديد من أنواع الخلايا واتضح انها تكون مطابقة ل peptidyl- prolyl- cis- trans isomerase ،وهو إنزيم يدخل فى انثناء البروتين protein folding . حتى الآن ، على أية حال ، فإنه لم يتضح عما إذا كان الارتباط binding مع فيلن حلقى cyclophilin مرتبط correlated مباشرة مع فعالية كبت المناعة immunosuppressive activity للسبورينات الحلقية ، أو فى الحقيقة ،عما إذا كان ارتباط فيلن حلقى bindingcyclophiline هو نفسه مقياس criterion كافى لفعالية كبت المناعة .

ولقد وجد الآن أن هناك سبورينات حلقية cyclosporins ترتبط بقوة مع فيلن حلقى cyclophilin ، ولكنها لاتكون كابتة للمناعة كلية . ولذا فهى توضح بأن الارتباط مع فيلن حلقى هو مقياس ضرورى ولكنه غير كاف لفعالية كبت المناعة .

يزود الاختراع الحالى بسبورينات حلقية cyclosporins حيث تكون فعالة ضد نسخ HIV-1 (HIV-1 replication) .

يصيب فيروس نقص المناعة البشرية (HIV) Human immune deficiency virus ، بتفضيل أكثر ، الخلايا اللمفاوية lymphocytes من نوع (T4)T-helper ، على الرغم من أنه يستنسخ replicates أيضا فى أنواع متعددة من الخلايا خاصة تلك السلالة وحيدة الخلية monocytic lineage وهو يسبب مرضا متطورا بطيئا لجهاز المناعة immune system وهذا المرض مميز بتدمير متدرج للخلية T4 ويسمى الإيدزAIDS. وتكون الشواذ المناعية immunological abnormalities الأخرى للإيدز عبارة عن زيادة سمية الخلية/كبت الخلايا اللمفاوية للنوع T8 (cytotoxic/suppressor (T8) lymphocytes ، وخلل فى عملية منع المولد المضاد /طرق التمييز (antigen presentation / recognition process ، والتشيط المتعدد لمجموعة الخلايا للنوع B- (polyclonal activation of B-) . وتعتبر آلية mechanism تدمير خلايا T4 (T4-cell destruction)غير واضحة حتى الآن . عدد قليل نسبيا من خلايا T4 تبدو مصابة إلا أن التأثير المباشر الممرض للخلية (cytopathic effect) الحادث بواسطة الفيروس ربما لايكون السبب الوحيد لنضوب خلايا T4 (T4-cell depletion) .

ولقد افترض أن تدمير خلايا T4 يضخم بواسطة طرق المناعةالذاتية autoimmune process الحادثة بواسطة خلايا T4 المنتجة لـــ HIV (HIV-producing T4-cells)أو خلايا T4 فيها HIV ذو غلاف بروتينى HIV-protein-coated T4 –cells . يمكن ان يؤدى ذلك التنبيه المولد للمضاد antigenic stimulation والمستمر إلى حالة تنشيط دائمة لخلايا T4 ، مما يؤدى إلى زيادة نسخ HIV فى هذه الخلايا وإطالة مجموعة الخلايا المسممه للخلية (T- cytotoxic clones) T. من الممكن جعل خلايا T4 الغير مصابة مولدة للمضاد antigenic بواسطة ربط مجموعة فيروس خارجية ١٢٠ exogenous viral gp 120 الى جزيئات CD4 وبذا تكون هدفا لاستجابة سمية الخلية T (T-cytotoxic response) .

أوضحت البراءة الامريكية رقم ٤,٨١٤,٣٢٣ بان السيكلوسبورين Ciclosporin ذو فعالية مضادة للايدز AIDS ، وبصفة عامة ، "السبورينات الحلقية cyclosporins المعروفة بكابتة المناعة immunosuppressors " من الممكن أن تكون مفيدة فى ذلك التوجه، لايوجد اقتراح بأن السبورينات الحلقية الغير كابتة للمناعة non-immunosuppressive cyclosporins من المتوقع ان يكون لها تلك الخاصية .

ومن المدهش أنه وجد الآن أن السبورينات الحلقية cyclosporins المرتبطة بفيلن حلقى cyclophilin ، ولكنها غير كابتة للمناعة ، تبدى تأثيراً مثبطا inhibiting effect لنسخ فيروس نقص المناعة البشرية النوع ١ (HIV-1 replication).

يعتبر السبورين الحلقى مرتبطا بفيلن حلقى عندما يرتبط بفيلن حلقى معاد تركيبه البشرى human recombinant cyclophilin بالخمس على الأقل كما هو الحال فى السيكلوسبورين فى إختبار إليسا التنافسى(competitive ELISA test) الموصوف بواسطة كونيكس فى مجلةعلم المناعةالأوربية١٩٨٧،١٧،١٣٥٩- ١٣٦٥ (Quesniaux in Eur. J.Immunol.1987 17 1359-1365) . وفى ذلك الاختبار ، يضاف السبورين الحلقى المطلوب اختباره أثناء تحضين الفيلن الحلقي مع سيكلوسبورين BSA مغلف (coated BSA-Ciclosporin) ويتم حساب التركيز المطلوب (IC_{50}) لكى يعطى تثبيطا قدره ٥٠% من التفاعل المرجعى control reaction بدون مقارنة competitor . يعبر عن النتائج بنسبة الارتباط (Binding Ratio (BR) ، والذى هو لوغاريتم الأساس ١٠ للنسبه IC_{50} من المركب المختبر test compound و للنسبة IC_{50} فى اختبار تزامن للسيكلوسبورين نفسه، ولذلك فعندما يساوى ١,٠BR فذلك يدل على أن المركب المختبر يرتبط بالفيلين الحلقى بجزء من عشرة أقل من ارتباط السيكلوسبورين ciclosporin والنتيجة السالبة تشير الى أن الارتباط يكون أقوى من حالة السيكلوسبورين.

السبورينات الحلقية الفعالة ضد HIV لها BR أقل من ٠,٧ (حيث لو.١ ٥=٠,٧ تقريبا) يفضل أن يكون مساوياً للصفر أو أقل منه.

ويعتبر السبورين الحلقى غير كابت للمناعة عندما تكون فعاليته فى تفاعل خلايا اللمف المخلوطة (Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) لا تزيد عن ٥% ويفضل ألا تزيد عن ٢% ، لما هى للسيكلوسبورين . يتم وصف تفاعل خلايا اللمف المخلوطة MLR بواسطة T.Meo in Immunological Methods , L.Lefkovits and B.peris , Eds., Academic Press, N.Y.,PP.227-239, (1979) . تحضن خلايا طحال spleen cells(٠,٥ x ١٠ ٦) من فأر Balb/c(أنثى،٨-١٠ أسبوع) لمدة خمسة أيام مع خلايا طحال(٠,٥ x ١٠ ٦) معالجة بواسطة mitomycin C أو معالجة بأشعة سينية (Irradiated, 2000 rads) من فأر CBA(أنثى، ٨-١٠ أسبوع) .

تحدث الخلايا الحادثه المشععة irradiated allogenic cells إستجابة متكاثرة proliferative response فى خلايا طحال Balb/C يمكن قياسها بواسطة إدماج مادة لاصقة labeled precursor فى DNA . حيث أن الخلايا المحفزة stimulator cells معالجة بالأشعة (أو معالجة بواسطة mitomycin C)فإنها لا تستجيب إلى خلايا Balb/C مع التكاثر proliferation ولكنها تحتفظ بقدرتها على إنتاج الأجسام المناعية المضادة antigenicity .

يقارن IC_{50} الموجود للمركب المختبر فى MLR مع ذلك الموجود للسيكلوسبورين ciclosporin فى تجربة مماثلة.

يمكن إظهار فعالية السبورينات الحلقية cyclosporins كمثبطات HIV- 1 فى أنظمة الاختبار التالية:-

١- تثبيط HIV-1 مسببة لتأثير ممرض خلوى فى خلايا MT4

Inhibition of HIV-1 –induced cytopathic effect in MT4-cells)

تستخدم طريقة الاختبار الموصوفه بواسطة pauwels et al,J. Virol. Meth.20/309(1988) ، مع قليل من التعديلات . يستعمل كل من خط خلية T4 المتحول إلى HLTV-1 ، و MT4 ، الذى تبين الاشارة مسبقا إلى أنها عالية الإجازة للإصابة بـــ HIV ، على أنها الخلية المستهدفة (target cell) . يقدر منع HIV-1 ، نوع HTLV III- B المسبب للتأثير المرضى الخلوى cytopathicعن طريق قياس قابلية نمو viability كلا من الخلايا المصابة بـــ HIV والخلايا المحاكية للإصابة mock –infected cells .تحدد قابلية النمو سبكتروفوتومتريا spectrophotometricallyعن طريق إختزال 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) فى وسط التفاعل(in-situ) . يتم إعتبار المستنبتات المصابة بالفيروس virus-infected cultures والغير مصابة uninfected بدون المركب كمرجعية controls كخلايا غير مصابة معالجة بالمركب . ينتقى تركيز الخلايا cell concentration بحيث يتزايد عدد الخلايا/ مل (cells per ml) بمعامل factor من ١٠ خلال ٤ أيام من تحضين incubation المستنبتات المحاكية للاصابة mock-infected culture . يضبط اللقاح الفيروسى virus inoculum بحيث يسبب موت الخلية فى ٩٠% من الخلايا المستهدفة بعد ٤ أيام من التحضين. يمتز adsorb الفيروس خلال معلق خلوى مركز ١٠ مرات 10 fold concetrnted cell suspension عند ٣٧ درجة مئوية لمدة ساعة ، ثم تخفف الخلايا المصابة حتى ١٠:١ وتضاف إلى صحون المعايرة الحيوية الدقيقة microtiter plates متضمنة المركب المختبر .

٢-السمية الخلوية أو سمية الخلية (Cytotoxicity)

لتقييم فعالية potential تضاد anti –HIV فى خطوط خلوية إضافية additional cell lines وبصفة خاصة خط خلية أحادية الخلية (U937) monocytic cell line، تعين السمية الخلوية cellular toxicity أولا للمركب المختبر لتلك الخطوط الخلوية. تضبط معلقات خلايا Jurkat و U937 إلى ١٠x١ ° خلية/ مل وتحضن فى وجود تركيزات مختلفة من المركب

المختبر . بعد ٤٨ ساعة ، تقارن كمية الخلايا /مل بواسطة الصبغ staining بـــMTT . يمكن قياس السمية الخلوية فى خلايا MT4 بطريقة مماثلة .

٣- تثبيط نسخ HIV-1 فى خلايا Jurkat و U937 (Inhibition of HIV-1 replication in Jurkat and U937 cells)

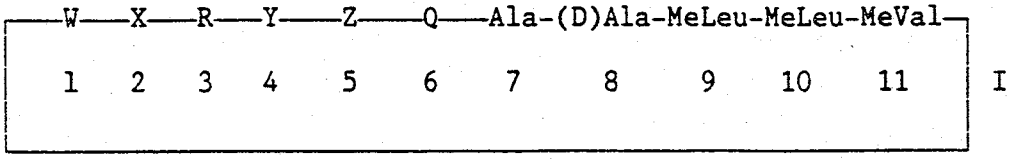
تتم إصابة خط خليه Jurkat -T4 وخط خلية أحادية U937 بواسطة تعليق الخلايا ١٠ مرات مركزة فى محلول فيروس. يسمح للامتزاز لمدة ساعتين عند ٣٧ درجة مئوية . ثم تدور الخلايا مغزليا ، يزال اللقاح inoculum ويعاد تعليق الخلايا عند تركيزها الأصلى فى وسط استنبات حديث fresh medium culture متضمناً المركب المختبر. وبذلك تضاف المادة بعد الامتزاز . عند الأيام ٢ ، ٥ ، ٨ ، ١٢ ، ١٥ ، ١٩ بعد الإصابة ، تزال أحجام صغيرة مقاسة aliquots من المستنبتات المصابة . تدور الخلايا مغزلياً وتجمع المواد الرائقة supernatants . يقدر تركيز المولد المضاد p24 الفيروسى viral p24 antigen فى المواد الرائقة بواسطة commercial ELISA kit وتخدم كمعامل parameter لإنتاج الفيروس . بعد كل عملية إزالة للأحجام الصغيرة المقاسة ، يحصى عدد الخلايا وتضبط إلى ٢x١٠ ^{٥} خلية/ مل عن طريق إضافة وسط طازج (محضر حديثا) fresh medium متضمنا المركب المختبر عند التركيز المخصص .

المركبات طبقا للاختراع والتى هى على سبيل المثال ، سبورينات حلقية مرتبطة بفيلن حلقى cyclophilin-binding cyclosporins وكابتة للمناعة non-immunosuppresive وفعالة كمضادة لـــ HIV (مركبات فعالة)، البعض منها جديد والاخر معروف ،وعلى أية حال ، لم تتم من قبل إفشاء الفعالية المضادة لـــHIV المركبات الفعالة المعروفة ،و فى العديد من الحالات فإنه لم يتم إفشاء أن المركبات الفعالة المعروفة تتضمن أية فعالية علاجية على الإطلاق.

ولقد اكتشف أن العديد من المركبات الفعالة تتضمن بناءات structures تختلف عن تلك التى هى للسيكلوسبورين ciclosporins بخاصة عند المواضع ٤ و/أو ٥.

إحدى مجموعات المركبات الفعالة عبارة عن السبورينات الحلقية cyclosporins التى فيها تستبدل المجموعة MeLeu عند الموقع ٤ بواسطة N- methylated amino acid مختلف وعلى سبيل المثال γ-hydroxy-MeLeu,MeIle, MeVal,MeThr or MeAla . بالإضافة إلى MeIle و MeThr ، يمكن استعمال الصيغ allo من MeaThr, Mealle . فى الصيغة allo ،فإن الكيمياء الفراغية stereochemistry عند الموقع β تتضمن الهيئة الفراغية configuration المعاكسة لتلك الخاصة بالحمض الأمينى الطبيعى ، لذلك تكون الصيغة الطبيعية والصيغة allo تشكلان زوج من الدياستيريوايزومرات diastereoisomers . مجموعةأخرى من المركبات الفعالةهى حيث تستبدل Val عند الموقع ٥بواسطة N-alkyl ،ويفضل N- methyl، amino acid . ويفضل أن يكون الحمض الأمينى الذى هوN-alkylated أن يكون Val أوLeu . ويفضل أن يستبدل هيدروجين مجموعة الأمينو (amino) من ^{5}(val)بواسطة مجموعةالكيل١-٦غير متفرعة C1-C6 وalkyl group C_{1-6} non-branched ،ويفضل مثيل(methyl) ، أو اثيل (ethyl) أو بروبيل عادى (n- propyl) ، وبصفة خاصة مثيل ، وتعتبر المجموعة الأخيرة المفضلة من المركبات الفعالة كلها جديدة .

بالإضافه أو بالتبادل ، يمكن أن تختلف بعض المركبات الفعالة عن السيكلوسبورين Ciclosporin عند المواقع ١ ، ٢ ، ٣ ، و /أو ٦ ، تتكون المجموعة المفضلة من المركبات الفعالة بواسطة مركبات من الصيغة I :



حيثW تكون MeBmt ، أوdihydro- MeBmt ، أو 8'- hydroxy-MeBmt ،

X تكون αAbu أوVal أو Thr ، أوNva ، أو (MeOThr)O-methyl threonine ،

R تكونSar أو (D)-MeAla ؛

Y تكون Meleu ، أو γ-hydroxy- Meleu ، أو MeIle ، أو MeVal ،أوMeThr ، أو MeAla ، أوMeaIle أوMeaThr ؛

Z تكون Val ، أو Leu ، أو MeVal أوMeLeu ، و

Q تكونMeLeu ، أوγ-hydroxy- MeLeu أوMeAla ؛

بشرط أنه عندما تكون Y عبارة عن MeLeu فإنه إما أن تكون Z عبارة عن MeVal أو MeLeu ، أو تكون W عبارة 8'-hydroxy-MeBmt .

تتضمن المجموعات W ، X ، Y ، Z ، Q ، R ، بشكل مستقل ، على الدلائل المفضلة التالية:-

يفضل ان تكون W هى W' حيث تكون W' عبارة عن MeBmt أو dihydro- MeBmt ؛

يفضل ان تكون Xهى X' حيث تكون X' عبارة عن αAbu أوNva ، والأكثر تفضيلاً "X حيث تكون "X عبارة عن αAbu ؛

يفضل أن تكون R هى R' حيث تكون R' عبارة عن Sar ؛

يفضل ان تكونY هى Y' حيث تكون Y' عبارة عن γ-hydroxyl-MeLeu ، أوMeVal ، أوMeThr ، أو MeIle ؛

يفضل أن تكون Z هى Z' حيث تكون Z' عبارة عن Val ، أو MeVal ؛ و

يفضل ان تكون Q هى Q' حيث تكون Q' عبارة عن Meleu .

وتعتبر إحدى المجموعات المفضلة ،على وجه الخصوص ، من المركبات الفعالة هى مركبات الصيغة I حيث تكون W هى W' ، X هى X' ، Y هى Y' ، Z هى Z' ، Q هي Q' ، R هى R' .

مركبات الصيغة I المفضلة بصفة خاصة هى:-

a) [dihydro-MeBmt]^{1} –[γ-hydroxy-MeLeu]^{4}-Ciclosporin

b) [MeVal]^{4}-Ciclosporin

c) [MeIle]^{4} –Ciclosporin

d) [MeThr]^{4}-Ciclosporin

e) [γ-hydroxy-MeLeu]^{4}-Ciclosporin

f) [Nva]^{2}-[γ-hydroxy-MeLeu]^{4}-Ciclosporin

g) [γ-hydroxy-MeLeu]^{4}-[γ-hydroxy-MeLeu]^{6}-Ciclosporin

h) [MeVal]^{5}-Ciclosporin

i) [MeOThr]^{2}-[(D)MeAla]^{3}-[MeVal]^{5}-Ciclosporin

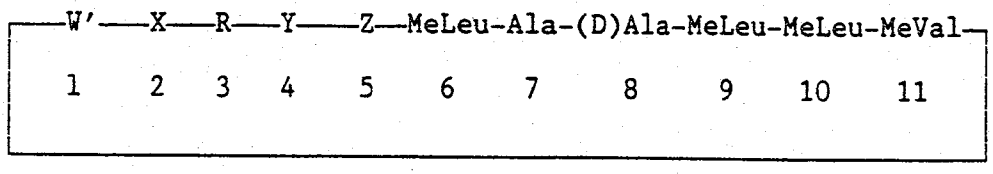
j) [8'-hydroxy-MeBmt]^{1}-Ciclosporin

بالإضافة ، فإن مركبات معينة ليست داخل مجال الصيغة I هى مركبات فعالة، على سبيل المثال :

K) [MeAla]^{6} –Ciclosporin

l) [γ-hydroxy-MeBmt]^{1} -Ciclosporin

أيضا يقدم الاختراع مركبات فعالة جديدة هى مركبات الصيغة II :



حيث تكون W'،X،R،Y،Z كما سبق تعريفه بشرط أن:-

١) عندما تكون Y عبارةعن MeLeu أوMeAla فإن Z تكون MeVal أوMeLeu و

٢) عندما تكون 'W عبارةعن MeBmt ، Rعبارةعن Sar و Y عبارة عن γ-hydroxy-MeLeu ، ومن ثم فإن Z تكون غير Val .

تتكون المجموعة المفضلة من المركبات الفعالة الجديدة من مركبات الصيغة II حيث تكون X عبارة عن "X، Y عبارة عن 'Y ، Z عبارة عن 'Z بشرط أنه عندما تكون 'W عبارة عن MeBmt فإن 'Y تكون غير γ-hydroxy-MeLeu .

والمركبات الفعالة الجديدة المفضلة ،على وجه الخصوص ، هى المركبات a) ، (b) ، (c) ، (d) ، (f) ، و (h) السابقة .

وجد أن بعض هذه المركبات على سبيل المثال المركبات (b) و (c) تمنع مفعول كبت المناعة للسيكلوسبورين immunosuppressive action of Ciclosporin عن طريق منع إرتباطها مع فيلن حلقي cyclophilin و بناءً على ذلك تعمل كعوامل مضادة للسيكلوسبورين Ciclosporin antagonist .

يتم الحصول على المركبات الفعالة بواسطة طرق متعددة ، حيث من الممكن أن تصنف كالآتى:-

١-	التخمير	Fermentation
٢-	التحول الحيوي	Biotransformation
٣-	الاشتقاق	Derivatisation
٤-	التشييد الجزئي	Partial Synthesis
٥-	التشييد التام	Total Synthesis

تُنتج مركبات فعالة معينه كمنتجات ثانوية by-products من تخمر fermentation سلالات أصليه أو متحورة original or modified strains من كائنات منتجة للسيكلوسبورين

Ciclosporin-producing organisms مثل Tolypocladium inflatum Gams ، كما هو ممثلا عند إنتاج المركب (C) الموصوف فيما بعد فى مثال (١) .

٢)تكون المركبات الفعالة الأخرى ، بما فيها المركبات المعروفة (J) و(l) عبارة عن أيضات سيكلوسبورينية metabolites of Ciclosporin ، ويمكن أن تعزل بواسطة طرق كروماتوجرافية Chromatographic methods من بول إنسان أو حيوان معالج بالسيكلوسبورين dosed with ciclosporin . علاوة على ذلك ، تكون هذه التحولات وغيرها من التحولات الأيضية metabolic transformations ، ممكنة باستعمال كائنات دقيقةmicroorganisms ،على سبيل المثال ، إنتاج المركبين (e)، و(g) عن طريق التحول الحيوى biotransformation للسبورين الحلقى A ، كما هو موصوف فى المثالين (٢)،و(٣) ، أو للمركب (f)بواسطة التحول الحيوى للسبورين الحلقى (G) (مثال٤) .

تبين هذة الامثلة طرقاً جديدة لتحضير سبورينات حلقية ذات واحد أو أكثر من γ- hydroxy-MeLeu residues ، تتضمن الخطوات التالية:-

استنبات culturing سلالة محورة جديدة من Sebekia benihana وإضافة سبورين حلقى متضمن على واحد أو أكثر من متبقيات MeLeu ، وعزل الناتج من حساء التخمير fermentation broth .

٣) يقصد بالاشتقاق derivatisation أنه يمكن تحويل السبورينات الحلقيةcyclosporins الطبيعية أو المشيدة إلى مركبات فعالة بواسطة تفاعل كيميائى واحد أو أكثر حيث يحور فيه واحد أو أكثر من الأحماض الأمينية بدون فتح أو إعادة تكوين الروابط الببتيدية peptide bonds . على سبيل المثال ، يحصل على طائفة class من المركبات الفعالة حيث تكون Val عند الموقع(٥)عبارة عن N-alkylated عن طريق تفاعل reacting السبورين الحلقى المطابق المتضمن على Val عند الموضع(٥) مع بيوتيل

الليثيوم butyl lithium ، متبوعاً بالتفاعل مع عامل الكيلى alkylating agent ، كما هو ممثل بالنسبة في المركب (h) فى مثال (٥) وبالنسبة للمركب (i) فى مثال(٦) .

كأمثلة أخرى ، يمكن تحضير المركب (a) بواسطة هدرجةhydrogenation المركب (e) (مثال٧) ، ويمكن تحضير المركب (j) ، والذى هو أيضا أيضة كبيرة maior metabolite من سيكلوسبورينCiclosporin ،من المركب المعروف خلات السيكلوسبورين Ciclosporin acetate كما هو موصوف فى مثال (٨) .

٤) يستعمل التعبير تشييد جزئىpartial synthesis ليعنى سلسلة من التفاعلات الكيميائية حيث يتم جعل حلقة سيكلوسبورين طبيعى natural Ciclosporin مفتوحة، ثم يتم إزالة واحد أو أكثر من الأحماض الأمينية ، ثم يتم اضافة أحماض أمينية مختلفة ، ثم يتم إغلاق الحلقة ثانية .

٥) يتم التشييد التامtotal synthesis للسبورينات الحلقية cyclosporins بواسطة بناء ببتيدات غير عشارية خطية linear undecapeptide والتحليقcyclising ، كما هو موصوف بواسطة Wenger (loc. cit) ، أنظر أيضا البراءتين الأمريكيتين رقم ٤,٣٩٦,٥٤٢ ،و رقم ٤,٧٩٨,٨٢٣ . فى الأساس ، يمكن تحضير أى سبورين حلقى بواسطة طريقة التشييد التام ، على الرغم من ذلك ، فإنه وحيثما تتاح طريقة أخرى ، فإنها تكون أنسب من التشييد التام.

يمكن استخدام التشييد التام لتحضير المركب(d) (مثال٩) ، ولتحضير مركب الأيضة المعروفة (1) .

المركب (k) عبارة عن مادة معروفه حيث يتم وصف خصائصها بواسطة quesniaux وآخرين ، علم المناعة الجزيئى.Mol.Immunol ، العدد ٢٤ ،١١٥٩ ١٩٨٧ وأيضا

يمكن تحضيرها بواسطة التشييد التام . على سبيل المثال ، وُصف التشييد التام لذلك المركب فى البراءة الأمريكية ٤٩١٤١٨٨.

الوصف التفصيلي

مثال(١):-

[MeIle]^4 - سيكلوسبورين (مركب c)

[MeIle]^4 -Ciclosporin(Compound c)

إنتاج السلالة Producing Strain

يتم الحصول على المركب(c) عن طريق تخمر fermentation سلالة فطرية fungal strain من Cy E Tolypocladium inflatum 4556،المودعة فى Deutsche Sammlung För Mikroorganismen بموجب أحكام معاهدة بوادبست Budapest بتاريخ ٢٤ يوليو ١٩٩١ تحت رقم إدخال (accession number) DSM 6627 . تكون هذه السلالة عبارة عن طفرة mutant السلالة NRRL 8044 للنوع Tolypocladium inflatum Gams تكون مطابقة من الناحية التصنيفية taxonomically مع السلالة الأم parent strain ، التى وصفت بشكل تام ،مثلاً ، فى البراءة البريطانية رقم ١,٤٩١,٥٠٩ .

١) المزرعة (المستبت)Culture :

يتم تنمية مزرعة أجارية أو غروية منحرفة slant من السلالة DSM 6627 لمدة ١٤ يوماً عند ٢٧درجة مئوية فى الوسط الغروي (الأجارى) agar medium التالى:-

خلاصة خميرة	Yeast extract (Gistex)	٤ جم
خلاصة مالت	Malt extract (Wander)	٢٠ جم
آجـــــــــار	Agar	٢٠ جم
ماء غير معدنى	Demineralised water	حتى ١٠٠٠ مل

يكون الوسط ذى أس هيدروجيني (P^H) =٥,٤-٥,٦ ويعقم لمدة ٢٠ دقيقة عند ١٢٠ درجة مئوية .

٢) المزرعة الأولية (المستنبت المُسبق) Preculture:-

تعلق أبواغ Spores من ميسليوم mycelium لأربعة مستنبتات (مزارع) بادئة فى ٤٠ مل من محلول ملحى salt solution ٠,٩% . تلقح مجموعة من دوراق إرلين ماير (Erlenmeyer flasks)٥٠٠ مل حيث يحتوى كل واحد على ١٠٠ مل من الوسط المسبق استنباته(preculture medium) ، مع ٢٠ مل من ذلك المعلق . ويكون تركيب وسط المستنبت المُسبق (تركيب وسط المزرعة الأولية) preculture medium كما يلى:

كازيين	Casein (Amber EHC)	٢٥ جم
مالتـــوز	Maltose	٧٥ جم
KH2PO4		١ جم
KCl		٢,٥ جم
ماء غير معدنى	Demineralised water	حتى ١٠٠٠ مل

تضبط درجه P^H للوسط عند ٥,٢- ٥,٥ بواسطة HCl ، ثم يعقم لمدة ٢٠ دقيقة عند ١٢٠ درجة مئوية . يتم تخمير المستنبتات الأولية لمدة ٢٤ ساعة عند ٢٧ درجة مئوية فى هزاز دوار بمعدل ٢٠٠ لفة/ دقيقة (rpm) عند شذوذ مركزى eccentricity يساوي ٢٠ مم .

٣) المزرعة الوسيطة (المستنبت الوسيط) Intermediate culture :

يلقح inoculate إناء تخمر صلبsteel fermenter سعة٢٥ لتر يحوى على ٢٠ لتر من الوسط المسبق استنباته preculture medium مع ٢٠٠ مل من المستنبت المسبقpreculture .

يُخمر المستنبت الوسيط خلال ٥ أيام عند ٢٧ درجة مئوية ، مع معدل تقليب ١٥٠ لفة/ دقيقة ومعدل تدفق الهواء ٠,٥ لتر/دقيقة لكل لتر من الوسط عند ضغط ٠,٥ بار (bar) .

٤)المزرعة الرئيسية (المستنبت الرئيسى) Main culture :

يلقح ١٠٠ لتر من الوسط المسبق استنباته بـــ١٠ لتر من المستنبت الوسيط وتخمر فى إناء تخمر صلب سعة ١٢٠ لتر . يضاف ٤ جم/ لتر من D- Threonin إلى هذا الوسط ، تعقم sterilized بواسطة الترشيح filtration .

يتم التخمير عند ٢٧ درجة مئوية لمدة ١٤ يوم ، مع معدل تقليب ٧٠ لفة/دقيقة ومعدل تدفق هواء ٠,٤ لتر/ دقيقة لكل لتر من الوسط عند ضغط ٠,٥ بار وذلك عند أول خمسة أيام . يتم زيادة معدل التقليب حتى ١٠٠ لفة/ دقيقة ومعدل تدفق الهواء إلى ٠,٥ لتر/دقيقة لكل مدة التخمير المتبقية .

العزل Isolation : يفصل الميسليوم mycelium من وسط المستنبت culture medium ويستخلص فى جهاز Turrax عن طريق الطحن crushing والتقليب ٣ مرات مع ١٠ لترات من الكحول الميثيلى/ ماء (methanol/ water)١:٩ بالحجم.

يفصل الميسليوم المطحون crushed mycelium من المذيب بواسطة الترشيح عن طريق المص suction – filtration ويركز الرشيح filtrates بالتبخير تحت ضغط evaporation under vacuum عند درجة حرارة ٤٠ درجة مئوية حتى يكون البخار يتكون بشكل أساسى من الماء فقط. يستخلص المخلوط الناتج ٤ مرات باستعمال ٢ لتر من 1,2 -dichloroethane عند كل استخلاص وتركز محاليل 1,2-dichloroethane المتحدة بواسطة التبخير تحت ضغط عند درجة حرارة ٤٠ درجة مئوية .

يعرض المتبقى residue إلى كروماتوجرافياعمود هلام السليكا silica gel column chromatography(١٠ كجم هلام سليكا silica gel ، حجم الحبيبة granulate size ٠,٠٢-٠,٠٤٥ مم ، "Grace") باستعمال خلات اثيل /ماء (ethyl acetate/water) كمادة أو كمذيب الشطف eluent (الأجزاء ١:٢,٥) . تجمع الأجزاء٢٠-٢٣ المحتوية على [MeIle]٤-Ciclosporin ثم تفصل أكثر بواسطة كرماتوجرافيا عمود هلام السليكا (٦٠٠ جم هلام سليكا،حجم الحبيبة ٠,٠٤- ٠,٠٦٣مم " Merck ") باستعمال كلورفورم/ كحول ميثيلى (chloroform/ methanol) (٩٨ : ٢ بالحجم) كمذيب الشطف eluent (حجم الجزء ٣٠٠ مل). تتم أو تنجز تنقيةpurification إضافية بواسطة كروماتوجرافيا عمود هلام السليكا(٤٠٠ جم هلام سليكا،حجم الحبيبة ٠,٠٤-٠,٠٦٣ مم، "Merck") باستعمال كلوريد ميثلين/ الكحول الميثيلى (methylene chloride/ methanol) (٢:٩٨ بالحجم) كمذيب الشطف (حجم الجزء ٢٠٠ مل) منتجاً [MeIle]4 -Ciclosporin نقى كمسحوق أبيض غير متبلور amorphous white powder درجة الإنصهار (m.p.) ١٥٥-١٥٨ درجة مئوية ، الدوران الفوقي 20/D (α)=-٢٣٥ درجة (c=٠,٦٨ فى $CHCl_3$) و -١٩٣ درجة (c=٠,٧٤ فى CH_3OH) .

يكون طيف الاشعة تحت الحمراء IR spectrum فى CH_2Cl_2 كما هو موضح فى شكل ١ ، وطيف برتون الرنين النووى المغناطيسىproton NMR spectrum فى$CDCl_3$ كما هو موضح فى شكل ٢ .

مثال ٢ : [γ- هيدروكسى- MeLeu]٤- سيكلوسبورين(مركب (e)

[γ-hydroxy- MeLeu] 4 -Ciclosporin (Compound e)

يتم الحصول على مركب(e) من تحول حيوى للسيكلوسبورين Ciclosporin biotransformation بواسطة الكائن الدقيق Sebekia benihana . تسمى السلالة الأصلية

المتخذة RLL 11111وتنتمى إلى النوع Sebekia benihana (دايتز ولى : Sebekia، جنس جديد من العائلة Actinoplanaceae (Dietz and Li: Sebekia , a new genus of the family Actinoplanaceae) . الملخصات ، الإجتماع السنوي الثاني والثمانين لجمعية الأحياء الدقيقة الأمريكية ، ١٦٣ ، أطلانطا ، ١٩٨٢ (Abstrs. 82 nd Ann Meet. Amer. Soc. Microbiol., 163,Atlanta, 1982) .

تستطيع تلك السلالة أن تُدخل مجموعة هيدروكسيل فى النوفوبيوسين hydroxylate novobiocin . تم ايداع السلالة قليلة الاستنباتsubcultured strain المستعملة لتحضير المركب (e) والمركبات المتعلقة بها عند المجموعة الألمانية للكائنات الدقيقة German Collection of Microorganisms (D-3300 Braunschweig) تحت الرقم DSM6182 .

١-المزرعه البادئة الغروية(Agar starting culture) :-

يتم تنمية مزرعة أحادية (أو غروية) منحرفة من السلالة DSM 6182 لمدة ١٠ أيام عند ٢٧ درجة مئوية فى الوسط الغروى التالى:-

جلوكوز	Glucose	١٠ جم
نشا (مذاب)	Starch (soluble)	٢٠ جم
خلاصة خميرة	Yeast extract (Gistex)	٥ جم
ببتـــــون	Pepton (N-Z-Amine Typ A,Sheffield)	٥ جم
$CaCO_3$		١ جم
آجـــــار (بكتو)	Agar(Bacto)	١٨ جم
ماء غير معدنى حتى ١ لتر		

٢- المزرعة الأولية (المستنبت المسبق) preculture :

تعلق أبواغ Spores وميسيليوم mycelium أحد المستنبتات البادئة فى ١٠ مل من محلول ملحى٠,٩% . تلقح inoculate سلسلة من دوارق إرلين ماير Erlenmyer ٢٠٠ مل ، يحتوى كل واحد منها على ٥٠ مل من الوسط المسبق استنباته ، مع ٥ مل من ذلك المعلق . يكون تركيب الوسط المسبق استباته كما يلى:-

جلوكوز	٧ جم
نشا (مذاب)	١٠ جم
خلاصه خميرة Yeast extract (Gistex)	٤,٥ جم
خلاصة مالت(سائل) Malt extract (liquid ,Wander)	١٠ جم
ببتـــــون Pepton (N-Z-Amine Typ A,Sheffield)	٢,٥ جم
CaCO3	١ جم
محلول استشفافى (Trace solution Nr 235)	١ جم
ماء غير معدنى حتى ١ لتر	

يتم جعل الأس الهيدروجينى (P^H) متعادل إلى ٧ بواسطة $NaOH/H_2SO_4$ ، والتعقيم :١٢٠درجة مئوية /٢٠ دقيقة .

محلول الاستشفاف ٢٣٥Nr Trace solution Nr 235 :

H_3BO_3	٠,١ جم
$FeSO_4. 7H_2O$	٥,٠ جم
KI	٠,٠٥ جم
$CoCl_2. 6H_2O$	٢,٠ جم
$CuSO_4. 5H_2O$	٠,٢ جم
$MnCl_2. 4H_2O$	٢,٠ جم
$ZnSO_4. 7H_2O$	٤,٠ جم
ماء غير معدنى حتى ٩٩٩ مل	
H_2SO_4 (٩٧ %)	١ مل لتر

تُخمر المستنبتات المسبقة لمدة٤أيام عند٢٧درجةمئويةفى هزاز دوار rotary shaker عند ٢٠٠ لفة/ دقيقة مع شذوذ مركزى eccentricty ٥٠ مللى متر.

٣-المزرعة الوسيطة (المستنبت الوسيط) Intermediate culture :-

تلقح سلسلة من دوارق إرلين ماير ٢٠٠ مل يحتوى كل واحد منها على ٥٠ مل من وسط مسبق استنباته preculture medium بواسطة ٥ مل من المستنبت المسبق . يخمر المستنبت الوسيط لمدة ٣ أيام عند ٢٧ درجة مئوية فى هزاز دوار عند ٢٠٠ لفة / دقيقة مع شذوذ مركزى ٥٠ مللى متر.

٤)المزرعة الرئيسية(المستنبت الرئيسى) Main culture :-

تلقح سلسلة من دوارق إرلين ماير ٥٠٠ مل ، حيث تحتوى كل واحدة منها على ٥٠ مل من الوسط الرئيسى (المجموع ١٢ لتر) ، بواسطة ٥ مل من المستنبت الوسيط . تخمر هذه المستنبتات لمدة ٣ أيام عند ٢٧ درجة مئوية فى هزاز دوار عند ٢٠٠ لفة/ دقيقة مع شذوذ مركزى ٥٠ مم . بعد ٢٤ ساعة يضاف السبورين الحلقى A (cycloporin A) مذابا فى الكحول المثيلى methanol إلى كل مستنبت رئيسى (١٥٠مجم/ لتر).

يكون تركيب وسط الاستنبات Main culture medium كما يلى:-

سيريللوز	Cerelose	١٠ جم
ديكسترين	Dextrine	١٠ جم
نشا (مذاب)	Starch (soluble)	١٠ جم
خلاصه خميرة	Yeast extract (Gistex)	٢,٥ جم
طحين فول صويا	Soyabean flour (Nurupan, Edelsoya)	١٢,٥ جم
K_2HPO_4		٠,٢٥ جم
KH_2PO_4		٠,١٢ جم
$MgSO_4 .6H_2O$		٠,١ جم

$CaCl_2 .6H_2O$		٠,٠٥ جم
محلول عنصر استشفافي	Trace element solutionAC-l	١ مل
ماء غير معدنى حتى ١ لتر		

تضبط P^H عند ٧,٢-٧,٥ (KOH/H_2SO_4) ، التعقيم : ١٢٠ درجة مئوية /٢٠ دقيقة.

محلول العنصر استشفافى AC-1 (Trace element AC-1): يحتوى هذا المحلول على نفس التركيب لمحلول Nr 235 مع إضافة :٠,٢ جم من $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$

٥) العزل Isolation :

يفصل الميسليوم mycelium من وسط المستنبت ويستخلص راشح المستنبت الناتج(١٣ لتر)٣ مرات بـــ1,2-dichloroethane باستعمال ١,٥ لتر عند كل استخلاص. تبخر محاليل 1,2-dichloroethane المتحدة تحت ضغط evaporated under vacuum عند درجة حرارة ٤٠ درجة مئوية . يعرض المتبقى الخام crude residue إلى الترشيح بهلام سيفاديكس Sephadex LH-20 gel باستعمال الكحول الميثيلى methanol كمادة شطف eluent . تجمع تلك الأجزاء المحتوية على مركبات السبورين الحلقى (٥٢٥ ملجم) وتعامل كروماتوجرافياً على هلام السليكا (٥٠ جم ، حجم الحبيبة ٠,٠٤-٠,٠٦٣ ملم "Merck") باستعمال كلوروفورم /كحول مثيلى كمذيب الشطف . تكرار الكروماتوجرافيا باستعمال نفس النظام يعطى [γ-hydroxy-MeLleu]^4-Ciclosporin نقى كمسحوق أبيض غير متبلور ، درجة الإنصهار ١٥٠-١٥٣ درجة مئوية ، الدوران النوعى يساوى -٢٢٥ درجة (c = ٠,٥٣ فى $CHCl_3$)،- ١٧١درجة (c= ٠,٤٤ فى CH_3OH) .

مثال (٣) :- [γ-hydroxy-MeLeu)^4-(γ-hydroxy-MeLeu)^6- Ciclosporin (compound g)

تفصل الأجزاء الجانبيةالأكثر قطبيةpolar المولدة من تنقية [γ-hydroxy-MeLeu]4-Ciclosporin بشكل أكثر عن طريق تكرار كروماتوجرافيا هلام السليكا(حجم الحبيبة ٠,٠٤-٠,٠٦٣ ملم) باستعمال ١:٢ استون /هكسان (acetone/hexane) كمذيب الشطف ، ويتبع ذلك الفصل كروماتوغرافيا على هلام السيلكا باستخدام methyl-t-butylethr/ methanol/ water 90:9:1 كمذيب الشطف. تنقى الأجزاء الأولى المحتوية على [γ-hydroxy- Leu)4- Cicloporin ثانية بإزالة اللون بواسطة فحم نباتى charcoal منتجا المركب النقى كمسحوق أبيض غير متبلور ،درجة الإنصهار: =١٦٢-١٦٤ درجة مئوية ، الدوران النوعى $[\alpha]_D^{20}$ يساوى -٢١١ درجة(c=٠,٥٠فى $CHCl_3$)، -١٥٧ درجة (c = ٠,٥٢ في CH_3OH) .

تحتوى الأجزاء الاخيرة من كروماتوجرافيا عمود هلام السليكا السابقة على [γ-hydroxy-MeLeu]^6-Ciclosporin ، وتجرى تنقية إضافية لإزالة اللون بواسطة الفحم النباتى منتجا مركب العنوان title compound النقى كمسحوق أبيض غير متبلور، درجه الإنصهار ١٥٧-١٦٠ درجة مئوية، الدوران النوعي $[\alpha]_D^{20}$يساوي ٢١٧ درجة(c=٠,٥٤ فى $CHCl_3$) ، -١٧٦ درجة (c=٠,٤٢ فى CH_3OH) .

مثال ٤: [Nva]^2-[γ-hydroxy-MeLeu]^4-Ciclosporin(compound f)

يحضر هذا المركب بواسطة طريقة مشابهة لتحضير مركب (e) ([γ-hydroxy-MeLeu]4- Ciclosporin) ولكن باستعمال السبورين الحلقى cyclosporin G ([Nva]2-Ciclosporin) كمادة أوليةstarting materinl . بعد التنقية بواسطة كروماتوجرافيا متكررة فى عمود هلام السليكا بإستعمال خلات اثيل ethyl acetate المشبعة بالماء وأستيون/هكسان (acetone/ hexane) نسبة ١:٢ كمادة شطف ، على التوالى، يحصل على مركب العنوان title compound كمسحوق أبيض غير متبلور ،درجة الإنصهار

١٣٨درجة مئوية –١٤١درجة مئوية،الدوران النوعى $[\alpha]_D^{20}$ =–٢١٣ درجة (c = ٠,٦٩ فى ($CHCl_3$) ، –١٦٨ درجة (c = ٠,٧٠ فى CH_3OH) .

مثال:– (٥) [MeVal]^5 –Ciclosprin (compound h)

يحضنincubate سبورين حلقى Cyclosporin A(٠,٦جم = ٠,٥ ملى مول) مذاب فى ٢٠ مل تتراهيدروفيوران tetrahydrofuran مع ٠,٦٣ مل من محلول ١,٦ مولار (M) من بيوتيل الليثيوم butyllithium (١,٠ ملى مول) فى الهكسان hexane . يتم مفاعلة المحلول الناتج مع ثنائى ميثيل سلفات dimethyl sulphate (٠,١ مل،١,٥ ملى مول) عند –٧٨ درجة مئوية . يسخن مخلوط التفاعل reaction mixture ببطء حتى يصل إلى درجة حرارة الغرفة ويقلب لمدة ليلة.

العزل بواسطة كروماتوجرافيا الوميض flash chromatography (SiO_2 ، ٥% كحول ميثيلى/ايثر،متبوعا بـــHPLC(وضع منعكسreverse phase)أعطى منتج أو مستحضر العنوان title product . يُميز المركب بواسطة طيف بروتون الرنين النووى المغناطيسى (^{1}H NMR spectrum) لجهاز 300 MHz فى $CDCl_3$ الموضح فى شكل ٣ .

مثال(٦): [MeOThr]^2 –[(D)MeAla]^3-[MeVal]^5 –Ciclosporin (Compound i):

يبرد مخلوط من ٤٨٠ مل THF(مطلق absolute) ، ٦,٩٦ جم (٤٩,٢ ملى مول) ثنائى أيزوبروبيل أمينdiisopropyl amine إلى –٨٠ درجة مئوية ، ويضاف ٣٣,٥ مل من محلول ١,٣٣ مولار من بيوتيل الليثيوم فى الهكسان (٤٤,٥ ملى مول) ببطء خلال محقنة syringe . يقلب المخلوط لمدة ٣٠ دقيقة عند– ٨٠ درجة مئوية ثم يضاف محلول من ٨ جم (٦,٦ ملى مول) سبورين حلقى cyclosporin C ([Thr]^2 –Ciclosporin) فى ١٢٠ مل THF مطلق خلال محقنة لمدة ٣:٢ دقيقة ، يقلب المحلول الصافى لساعة أخرى عند –٨٠ درجة مئوية ، ثم يضاف ببطء ٢,٠٦ مل من أيوديد الميثيل methyl

iodide . يسمح للمخلوط بأن يدفأ إلى درجة حرارة الغرفة خلال مدة تزيد عن ساعتين ، ثم يضاف ٤٠ مل ماء وتبخر المذيبات solvents فى مبخر دوار (rotary evaporator) عند ٣٠ درجة مئوية /١٥ ملم زئبق (Hg) . يقسم المتبقى بين الماء والايثر ether ، وتغسل طبقة الاثير ether layer ٤ مرات بواسطة محلول ملحى نصف مشبع semi-saturated brine ، وتجفف بواسطة MgSO4 وتبخر لكى تعطى ٨,١ جم متبقى residue . يعامل المتبقى كروكاتوجرافياً على ١٢٠٠ جم هلام كيزل Kieselgel مع ماء مشبع بخلات اثيل،لكى يعطى المنتج الخام crude product الذى بعد إجراء كروماتوجرافيا أخرى على ٢٠٠ جم هلام كيزل مع٥% $MeOH/CH_2Cl_2$ يعطى منتج أومستحضر العنوان title product النقى ، الدوران النوعى $[\alpha]_D^{20}$= -١٩٥ درجة (c =١,٠ فى $CHCl_3$).

مثال (٧) [dihydro- MeBmt]^1- [γ-hydroxy-MeLeu]^4-Ciclosporin (compound a)

إلى معلق من ٢٠٠ ملجم مسبق هدرجته pre-hydrogenated فى ١٠% بالاديوم/ فحم نباتى palladium/ charcoal فى ٤ مل كحول إيثيلى ethanol ، يضاف ١,٢ جم من مركب (γ-hydroxy-MeLeu)4- Ciclosporin) (e) فى ١٠ مل كحول إثيلى ethanol ، وتتم الهدرجة عند درجة حرارة الغرفة حتى يستهلك كل الهيدروجين . بعد إزالة المادة الحفازة بالترشيح فإن المحلول يبخر ، منتجا مركب العنوان title product كمسحوق أبيض غير متبلور،درجة الإنصهار ١٥٤-١٥٦درجة مئوية،الدوران النوعى $[\alpha]_D^{20}$= -٢٢٥ درجة (c=٠,٨٧ فى $CHCl_3$، -١٦٩ درجة (c =٠,٠٧ CH_3OH) .

مثال(٨) (8'-hydroxy-MeBmt)1-Ciclosporin(compound i)

(١ (O-acetyl- ω-bromo- MeBmt]^1- Ciclosporin

مخلوط من ٢٥,٠ جم (٢٠ ملى مول) من [O-acetyl-MeBmt]^1- Ciclosporin (ترابر وآخرين Helv.Chim.Acta ١٩٨٢، ٦٥، ١٦٥٣)،٤,٤جم(٢٥ملى مول) من N-بروموسكسينيميد N-bromo succinimide ،و٤٠٠ملجم من آزوبيس أيزوبيوتيرونايتريل azobisisobutyronitrile فى ٢٥٠ مل رباعى كلوريد الكربون carbon tetrachloride يتم تسخينه حتى الارتداد reflux لمدة ٢,٥ ساعة . يبخر المذيب ويستبدل بالاثير ether ، ويرشح من المواد الصلبة ويغسل بالماء ، ويجفف فوق كبريتات ماغنسيوم magnesium sulfate ويبخر حتى الجفاف . يعامل المتبقى كروماتوجرافياً فوق هلام السليكا chromatographed over silica gel مع ايثيل ايثر / خلات ايثل (١:٤) لكى يعطى ١٠,٧ جم (٤٠%) من المنتج أو المستحضر الغير متبلور amorphous product حيث يتبلور مع ايثر/هكسان لكى ينتج ٨,٤ جم من المادة النقية pure substance ، درجة الإنصهار ٢٠٧-٢٠٩ درجة مئوية . تتضمن الأجزاء النهائية من جهاز الكروماتوجرافيا chromatogram على ١١,٣ جم إضافية من منتج نوعا ما أقل فى النوعية .

٢- [O- acetyl-ω-acetoxy-MeBmt)^1- Ciclosporin

يسخن مخلوط من ٤,٣١ جم (٣,٣ ملى مول) من ناتج الخطوة (١) (يشوبه ١٥-٢٠% من المادة الأولية)، ٢,١ جم(٨ ملى مول) من رباعى ايثيل خلات الأمونيوم رباعية الماء tetraethylammonium acetate tetrahydrate فى ٣٠ مل ميثيل اثيل كيتون methyl ethyl ketone ، متضمنا كمية حفازة catalytic amount من يوديد الصوديوم sodium iodide فى حمام زيتى oil bath عند ١٠٥ درجة مئوية لمدة ٣ ساعات ويحفظ عند درجة حرارة الغرفة لمدة عطلة نهاية الأسبوع . يخفف المذيب بمثيل t- بيوتيل اثير methyl-t-butyl ether ويغسل بالماء ومحلول ملحى . تجفف الطبقة العضوية فوق $MgSO_4$ وتُبخر لكى تترك ٤,٠٠ جم من المنتج الخام الذى ينقى على عمود منعكس

الوضع RP-18 reverse phase column (٢٤٠جم) لكى تنتج ٣,٠٧ جم من مستحضر أو منتج العنوان title product ، درجة الإنصهار ١٩١-١٩٢ درجة مئوية .

٣- (ω-hydroxy- MeBmt)[1]- Ciclosporin

يُخلط محلول من ١,٧٢ جم ،(١,٣ ملى مول) من ناتج الخطوة (٢) فى ٧٥ مل كحول ميثيلى methanol ومحلول من ١,٢ جم صوديوم فى ٥٠ مل كحول ميثيلى methanol وتحفظ عند درجة حرارة الغرفة لمدة ٢,٥ ساعة ، ثم يحمض acidified المحلول بحمض الخل acetic acid . يبخر المذيب تحت ضغط منخفض ويذوب المتبقى فى ميثيل- t- بيوتيل ايثر methyl t- butyl ، ويغسل بالتعاقب بالماء وبمحلول ملحى وبمحلول بيكربونات الصوديوم sodium bicarbonate ، ويجفف فوق MgSO4 ويبخر . يشطف eluted المنتج الخام (١,٦ جم) من عمود RP-18 column (٢٤٠ جم) بالكحول الميثيلى /ماء ١٥:٧٥ لكى يعطى ١,٥ جم من المنتج النقى . تُبلور عينة من ايثر /هكسان لكى تعطى منتج بلورى crystaline product ذى درجة انصهار ١٨١-١٨٣ درجة مئوية .

مثال ٩: [MeThr]4- Ciclosporin (compound d)

يُنفذ التشييد التام total synthesis للسيكلوسبورين Ciclosporin كما هو موصوف فى البراءة الأمريكية رقم: ٤,٣٩٦,٥٤٢ ورقم ٤,٧٩٨,٨٢٣ باستعمال MeThr في الموقع ٤ بدلا من MeLeu . المنتج له دوران نوعى $[\alpha]_D^{20}$ =-٢٤٩,٦ درجة (c= ١,٠ فى $CHCl_3$) .

مثال ١٠ : [MeVal]4-Ciclosporin (compound b)

يُنفذ التشييد التام total synthesis للسيكلوسبورين Ciclosporin كما هو موصوف فى البراءة الأمريكية رقم: ٤,٣٩٦,٥٤٢ ورقم ٤,٧٩٨,٨٢٣ باستعمال MeVal في الموقع

٤ بدلا من MeLeu . المنتج له دوران نوعى $[\alpha]_D^{20}$ =-٢٢٦ درجة (c= ٠,٣٥٨ فى $CHCl_3$) .

مثال ١١ :كبت المناعةوالإرتباط بفيلن حلقى للمركبات الفعالة المتعلقة بالسيكلوسبورين

Immunosuppression and cyclophilin-binding of Active Compounds relative to Ciclosporin

يعطى الجداول ١ أمثله لـــــ:-

(أ) نسبة ارتباط الفيلن الحلقي (BR)cyclophilin Binding Ratio للمركبات الفعالة كما هو مقاس فى معايرة ELISA assay .

(ب)فعالية كبت المناعة Immunosuppressive activity للمركبات الفعالة المتعلقة بالسيكلوسبورين كما هو مقاس فىمعايرة MLR assay ويعبر عنها كنسبة مئوية percentage للفعالية المتعلقة بالسيكلوسبورين(نسبة كبت المناعة Immunosuppressive Ratio أوIR) .

التوضيح الأكثر لأهمية هذه القيم وطرق إجراء هذه الإختبارات ، كلاهما موضحة بالأسفل .

جدول رقم ١

المركب		BR(log10)	IR (%)
a)	[dihydro-MeBmt]^1-[γ-hydroxy-MeLeu]^4-Ciclosporin	٠,١	١ >
b)	[MeVal]^4-Ciclosporin	٠,١	١ >
c)	[MeIle]^4-Ciclosporin	٠,٢-	١ >
e)	[γ-hydroxy-MeLeu]^4-Ciclosporin	٠,٣-	١ >
f)	[Nva]^2-[γ-hydroxy-MeLeu]^4-Ciclosporin	٠,٤	١ >
h)	[MeVal]^5-Ciclosporin	٠,٤	٥,٣
j)	[8'-hydroxy-MeBmt]^1-Ciclosporin	٠,٣٥	١,٨
k)	[MeAla]^6-Ciclosporin	٠,٤-	٣,٢
l)	[γ-hydroxy-MeLeu]^9-Ciclosporin	٠,١٥	٢,٩

مثال ١٢ : الفعالية المضادة ل HIV و السمية الخلوية للمركبات الفعالة

Anti-HIV activity and cytotoxicity of Active Compounds

أمثلة لفعالية activity المركبات الفعالة Active Compounds والسيكلوسبورين كمواد مثبطة inhibitors لنسخ replication فيروس نقص المناعة البشرية النوع ١ (HIV-1) في خلايا MT4-cells والسمية الخلوية cytotoxicity للمركبات الفعالة و السيكلوسبورين في خلايا MT4 موضحة في الجدول ٢ .

تناقش أهمية (مدلول) هذه الأرقام و الطرق المناسبة في الأسفل .

جدول رقم ٢

المركب		السمية الخلوية (cytotoxicity) (ug/ml)	Anti-HIV (IC_{50})
a)	[dihydro-MeBmt]^1-[γ-hydroxy-MeLeu]^4-Ciclosporin	١٦,٣	٠,١٢
b)	[MeVal]^4-Ciclosporin	٥,٤	٠,٠٦٤
c)	[MeIle]^4-Ciclosporin	٤,٥	٠,٠٥٦
e)	[γ-hydroxy-MeLeu]^4-Ciclosporin	١٥,٥	٠,٣٤
f)	[Nva]^2-[γ-hydroxy-MeLeu]^4-Ciclosporin	١٤	٠,٨٥
h)	[MeVal]^5-Ciclosporin	٤,٤	٠,٤٥
i)	[MeOThr]^2-[(D)MeAla]^3-[MeVal]^5-Ciclosporin	< ١٠	٠,٤٥
j)	[8'-hydroxy-MeBmt]^1-Ciclosporin	١٠,٦	٠,٥٦
k)	[MeAla]^6-Ciclosporin	٥,٢	١,٣٤
l)	[γ-hydroxy-MeLeu]^9-Ciclosporin	< ١٠	٠,٣١
	Ciclosporin	٨,٤٥	٠,٥٣

تُوصف المركبات الفعالة لكل من منع الايدز prevention of AIDS فى المرضى الإيجابيين لفيروس نقص المناعة البشرية HIV- positive patients والغير ملحوظ عليهم

أية أعراض مرضية asymptomatic ولمعالجة treatment المرضى الذين يعانون من الإيدز AIDS . بالنسبة للمرضى الذين ظهر الإيدز AIDS فيهم ،فإن تناول المركب الفعال يجب أن يعكس reverse استنزاف depletion خلية T4 المترافقة مع الإيدز ، وأن يُحدث تقهقر للاعتلالات المتعلقة بالإيدز regression of AIDS-related disorders مثل الورم السرطانى اللحمى كابوسى Kaposi's sarcoma ويقلل احتمالية إصابات إنتهازية جديدة new opportunistic infections .

لذلك يزود الاختراع بعملية لعلاج ومنع متلازمة نقص المناعة المكتسبة acquired immunodeficiency syndrome والاعتلالات الأخرى المسببة بواسطة فيروس HIV-1 فى مريض مصاب بالفيروس المذكور ، تشتمل على إعطاء المريض المذكور كمية فعالة من مركب فعال من مركبات الاختراع .

يمكن ان يتناول المركب الفعال بواسطة أى طريقة مألوفة وبصفة خاصة معوياً enterally ، مثلا عن طريق الفم orally ، فى صيغة محاليل solutions شراب أو أقراص tablets أو كبسولات capsules ، أو حقنا parenterally ، على سبيل المثال في صيغة محاليل solutions أو معلقات suspensions قابلة للحقن . عن طريق الحقن الوريدى intravenous route ، يمكن أن تكون الجرعة اليومية الموصوفة من ١- ٢٠ ملجم / كجم ، يفضل من ٣-١٠ ملجم/ كجم ، وعن طريق الفم oral route تكون من ١-٥٠ ملجم /كجم ، ويفضل من ٧-٢٠ ملجم/ كجم.

ويعتقد أن سمية المركبات الفعالة تكون مماثلة إلى تلك التى للسيكلوسبورين Ciclosporin . حيث أن المركبات الفعالة غير كابتة للمناعة non- immunosuppressive ، فإن بعض التأثيرات الجانبية side effects للسيكلوسبورين المتعلقة بكبت المناعة يمكن تجنبها . التأثيرات الجانبية الأخرى المترافقة مع السيكلويبورين ، على أية

حال،وبصفة خاصة سميه الكلى nephrotoxicity عند الاستعمال طويل المدى ، من الممكن أيضا أن تكون مترافقة مع المركبات الفعالة .

تشمل الصياغات الجالينوسية galenic formulations المفضلة للمركبات الفعالة على تلك المعتمدة على المستحلبات الدقيقة microemulsions كما هى موصوفة فى طلب البراءة الإنجليزية رقم : ٢,٢٢٢,٧٧٠أ ، حيث تتضمن الأشكال الموضوعية topical وكذلك الفمية oral ، أيضا الصياغات الفمية والقابلة للحقن injectable المحصلة من محاليل صلبة solid solutions مشتملة على مركب سكرى وأحادى الاستر به حمض دهنى fatty acid saccaride monoester ،مثلا سكروز أحادى اليوريت saccharose monolaurate ، كما هو موصوف فى طلب البراءة الإنجليزية رقم : ٢,٢٠٩,٦٧١ أ 2 209 67la . تحوى أشكال وحدة الجرعة unit dosage المناسبة للتناول الفمى على سبيل المثال من ٢٥ إلى ٢٠٠ ملجم من المادة الفعالة لكل جرعة .

مثال صياغة A (Formulation Example A)

منتج مثال ١	Product of Ex.1	٥٠,٠ ملجم
جليكو فيورول ٧٥	Glycofurol 75	١٨٠,٠ ملجم
ميجليول٨١٢	Miglyol 812	٩٠,٠ ملجم
كريموفور	Cremophor RH40	١٨٠,٠ ملجم
الفا –توكوفيوول	alpha- Tocopherol	٠,٥ ملجم

مثال صياغة B: B (Formulation Example B:)

منتج مثال١		١٠٠,٠ ملجم
تتراجليكول	Tetraglycol	٢٠,٠ ملجم
كابتكس ٨٠٠	Captex 800	٢٠,٠ ملجم
نيكول	Nikkol HCO -40	٨٦٠,٠ ملجم
بيوتيل هيدروكسى تولوين (BHT) Butylhydroxyanisole		١,٠ ملجم

مثال صياغة C (Formulation Example C)

منتج مثال ١		٢٥,٠ ملجم
جليكول فيورول ٧٥	Glycofurol 75	١٠٠,٠ ملجم
ميجليول ٨١٢	Miglyol 812	٣٥,٠ ملجم
كرموفور RH-40	Cremophor RH-40	٩٠,٠ ملجم
بيوتيل هيدروكسى أنيسول	Butylhydroxyanisole (BHA)	٠,٢ ملجم

مثال صياغة D (Formulation Example D)

منتج مثال ١		١٠,٠ ملجم
تترا جليكول	Tetraglycol	١٠,٠ ملجم
ميريتول	Myritol	٥,٠ ملجم
كريموفور RH-40	Cremophor RH-40	٧٥,٠ ملجم
ألفا- توكو فيرول	alpha-Tocopherol	٠,١ ملجم

يوجد وصف تام للمكونات المفردة لتلك الصياغات ،وكذلك طرق تحضيرها فى طلب البراءة البريطانية رقم :٢,٢٢٢,٧٧٠، تدمج محتويات ذلك الطلب هنا بموجب هذه الإشارة إليه كمرجع .

عناصر الحماية

١ ١- استعمال سبورين حلقى(سايكلوسبورين) cyclosporin فى تصنيع دواء medicament

٢ لعلاج ومنع preventing مرض نقص المناعةالمكتسبة (الايدز)AIDS والاعتلالات

٣ المتعلقة بالايدز AIDS-related disorders ، يتميز بأن السبورين الحلقى cyclosporin :

٤ ١)يرتبط بالفيلين الحلقي (السايكوفيلين)البشرىhuman cyclophilin بنسبة ارتباط

٥ binding ratio(BR) تقل عن٠,٧ ، حيث BR تمثل اللوغاريتم للأساس ١٠ لمعدل

٦ IC_{50} للسبورين الحلقى cyclosporin مقارنة بالIC_{50} للسيكلوسبورين Ciclosporin

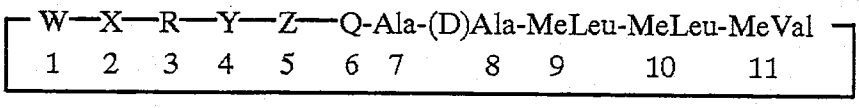
٧ وفقا لما تم قياسه فى اختبار أليسا التنافسى competitive ELISA test ،

٨ ٢)له نشاط activity فى تفاعل خليط الخلايا اللمفاوية Mixed Lymphocyte

٩ Reaction لا يزيد عن ٥% عن ذلك الذى للسيكلوسبورين Ciclosporin .

١ ٢-مركب ذو الصيغه (I):

٢



I

٣ حيث W تكون MeBmt أوdihydro-MeBmt أو 8'-hydroxy-MeBmt ؛

٤ X تكون αAbu أو Val أوThr أو Nva أو MeOThr ،

٥ R تكون Sar أو (D)- MeAla ،

٦ Y تكون MeLeu ، أو γ-hydroxy-MeLeu أوMeIle أو MeVal أو MeThr أو MeAla أو

٧ MeaThr أوMeaIle ؛

٨ Z تكون Val ، أو Leu أو MeVal أو MeLeu ؛

٩ Q تكون MeLeu أو γ-hydroxy-MeLeu أو MeAla .

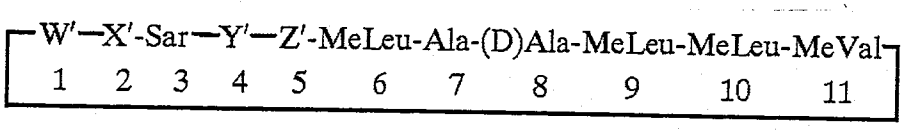
بشرط أنه عندما تكون Y هى MeLeu فإنه إما أن تكون Z هى إما MeVal أوMeLeu،

أو

W هى 8' – hydroxy – MeBmt ؛

للاستعمال كعقار صيدلى pharmaceutical .

٣- مركب وفقاً لعنصر الحماية رقم ٢ له الصيغة (I') :



I'

وفيها

W' هى MeBmt أو dihydro – MeBmt ،

X' هى αAbu أو Nva ،

Y' هى γ- hydroxy-MeLeu أو MeVal ، أو MeThr ، أو MeIle ؛ و

Z' هى Val أو MeVal ؛

للاستعمال كعقار صيدلى pharmaceutical .

٤- مركب يتم اختياره من المجموعة التى تتضمن :

[dihydro-MeBmt]^{1} –[γ-hydroxy-MeLeu]^{4}-Ciclosporin

[MeVal]^{4}-Ciclosporin

[MeIle]^{4} –Ciclosporin

[MeThr]^{4}-Ciclosporin

[γ-hydroxy-MeLeu]^{4}-Ciclosporin

[Nva]2-[γ-hydroxy-MeLeu]^{4}-Ciclosporin

[γ-hydroxy-MeLeu]4-[γ-hydroxy-MeLeu]^{6}-Ciclosporin

[MeVal]^{5}-Ciclosporin

[MeOThr]^{2}-[(D)MeAla]^{3}-[MeVal]^{5}-Ciclosporin

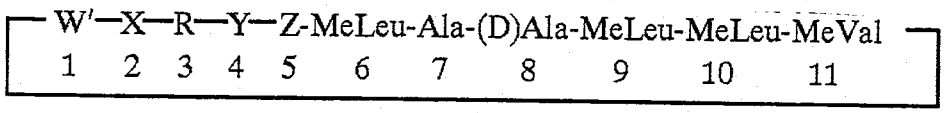
[8'-hydroxy-MeBmt]^{1}-Ciclosporin

[γ-hydroxy-MeLeu]^{9}-Ciclosporin

للاستعمال كعقار صيدلى pharmaceutical .

٥-استعمال مركب كما فى عناصر الحماية رقم ٢ ، أو٣ ، أو٤ فى تصنيع دواء لمعالجة preventing treating ومنع مرض نقص المناعة المكتسبة(الأيدز) AIDS ،والإعتلالات المتعلقة بالإيدز AIDS – related disorlers .

٦- مركب له الصيغه (II)



II

حيث

W' هى MeBmt أو dihydro – MeBmt ،

X هى αAbu ، أوVal ، أو Thr ، أو Nva ، أو MeOThr ،

R هى Sar أو (D)-MeAla ،

Y هى MeLeu أو γ-hydroxy-MeLeu ، أوMeIle ،أو MeVal ،أوMeThr ، أو MeAla

أوMeaIle أو MeaThr ؛

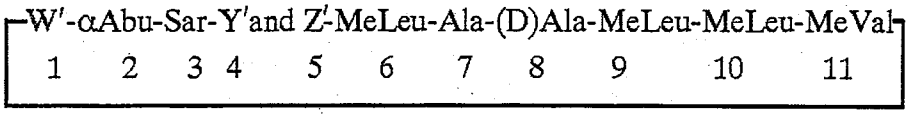
Z هى Val ، أو Leu ، أو MeVal ، أو MeLeu ؛

بشرط أنه :

١) عندما تكونY هى MeLeu أو MeAla فإن Z تكون MeVal أو MeLeu ؛

٢) وعندما تكون W' هي MeBmt ، و R هي Sar و Y هي γ-hydroxy-MeLeu فإن Z تكون غير Val .

٧-مركب وفقاً لعنصر الحماية ٦ يكون من الصيغة (II')



II'

والتي فيها :

W' هي MeBmt أو dihydro- MeBmt ،

Y' هي γ-hydroxy-MeLeu أو MeVal أو MeThr أو MeIle ؛ و

Z' هي Val أو MeVal ؛

بشرط أنه عندما تكون W' هي MeBmt ، فإن Y' تكون غير γ-hydroxy-MeLeu .

٨-مركب يتم اختياره من المجموعة التالية :

[dihydro-MeBmt]^{1} –[γ-hydroxy-MeLeu]^{4}-Ciclosporin

[MeVal]^{4}-Ciclosporin

[MeIle]^{4} –Ciclosporin

[MeThr]^{4}-Ciclosporin

[Nva]^{2}-[γ-hydroxy-MeLeu]^{4}-Ciclosporin

[γ-hydroxy-MeLeu]^{4}-[γ-hydroxy-MeLeu]^{6}-Ciclosporin

[MeVal]^{5}-Ciclosporin

[MeOThr]^{2}-[(D)MeAla]^{3}-[MeVal]^{5}-Ciclosporin

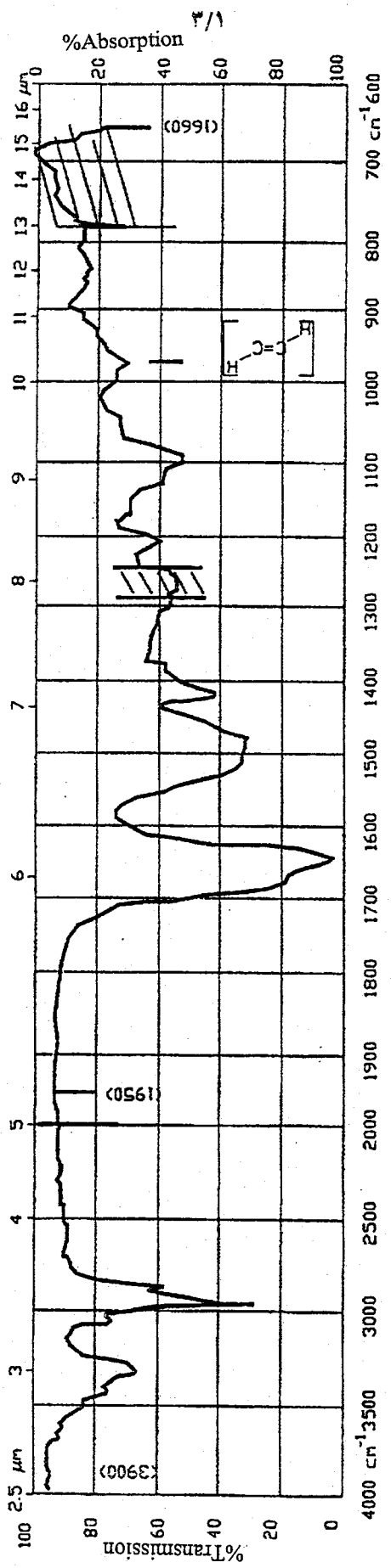
٩- [MeIle]4-Ciclosporin .

١٠-عملية لتحضير [MeIle]4-Ciclosporin تشتمل على خطوة زراعة الخيوط الطحلبية culturing the fungal strain دي إس إم ٦٦٢٧(DSM6627)في وسط غذائي nutrient medium و عزل الناتج product من حساء التخمير fermentation broth .

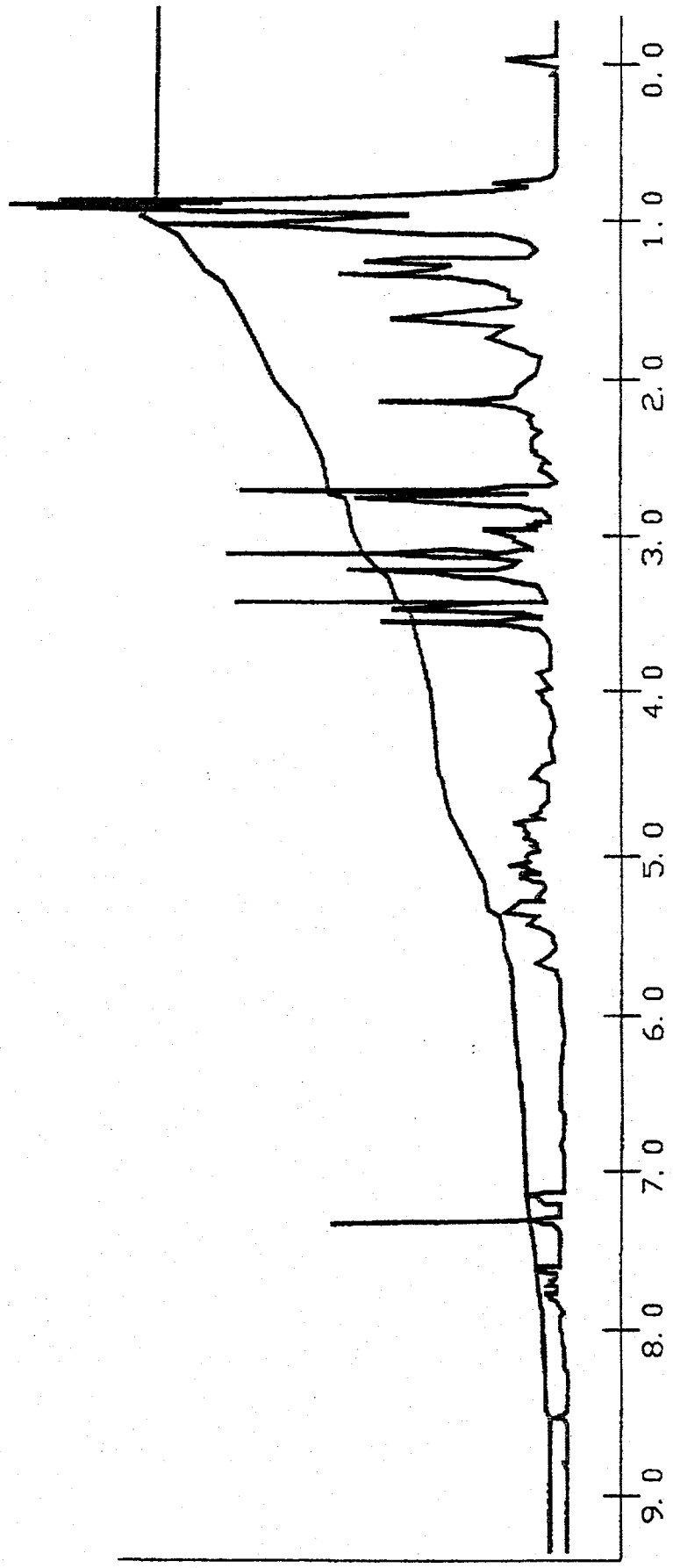
١١-مزرعة نقية pure culture للخيوط الطحلبية fungal strain DSM 6627 .

١٢-عملية لتحضير السبورينات الحلقية Cyclosporins والتى تحتوى على واحد أو أكثر من متبقياتresidues من γ-hydroxy-MeLeu ، تشتمل على خطوات زراعة الخيوط الطحلبية culturing the fungal strain DSM6182 فى وسط غذائى nutrient medium ، وإضافة سبورين حلقى Cyclosporin الذى يحوى واحد أو أكثر من متبقيات MeLeu residues،وعزل الناتج من حساء التخمر fermentation broth .

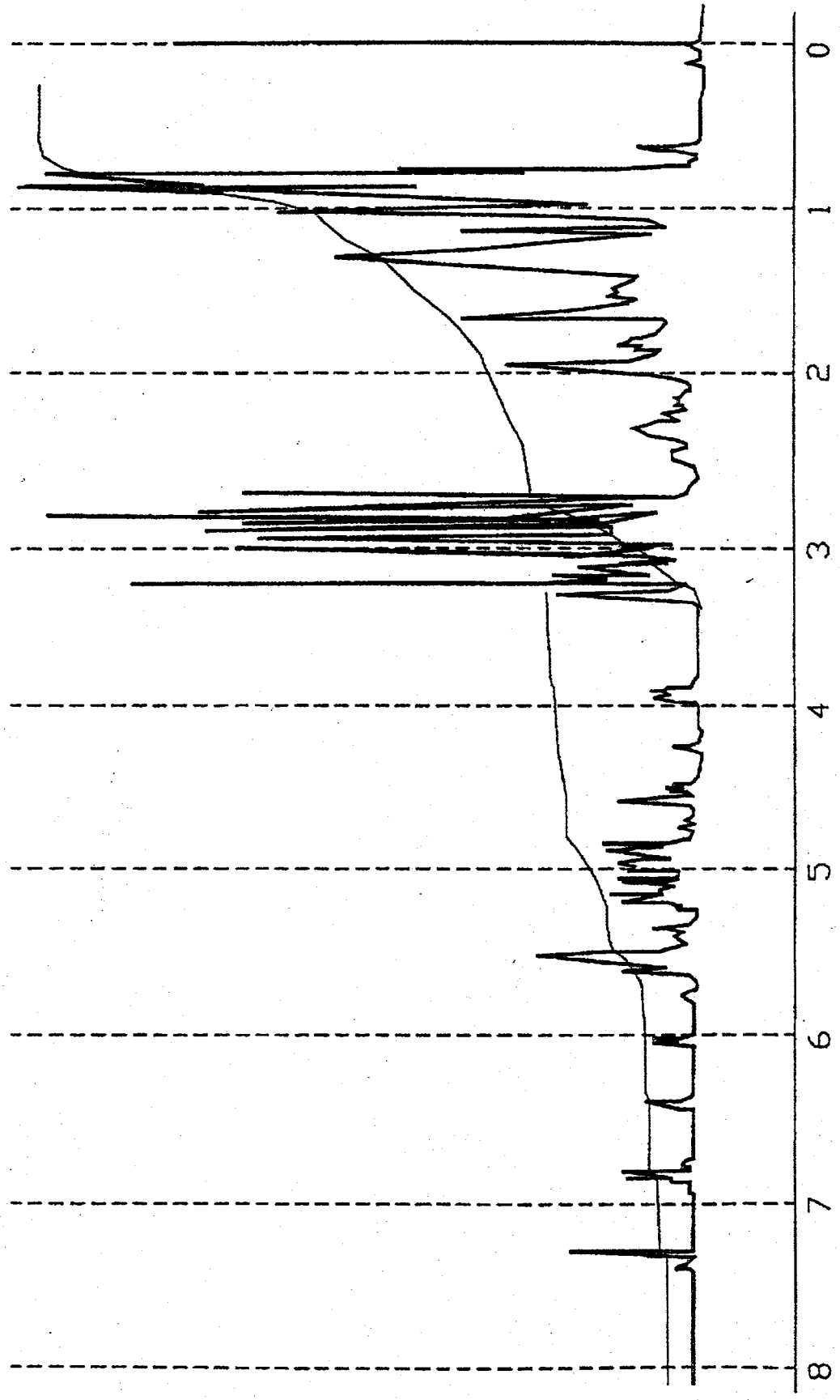
١٣- مزرعة نقية pure culture للخيوط الطحلبية fungal strain DSM6182 .



شكل -١-



شكل -٢-



شکل ـ٣ـ