



(19) INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
PORTUGAL

(11) Número de Publicação: PT 99410 B

(51) Classificação Internacional: (Ed. 7)

C07K007/64 A A61K038/12 B  
C12P021/04 B C12N001/14 -  
C12P021/04 C C12R001:045 C

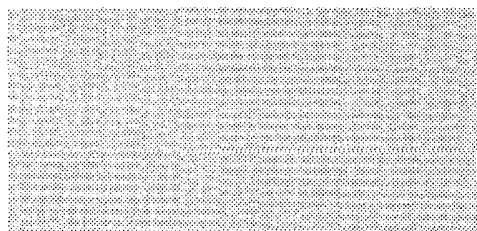
(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

<p>(22) Data de depósito: 1991.10.31</p> <p>(30) Prioridade: 1990.11.02 GB 9023859 1990.11.05 GB 9023970 1990.11.05 GB 9023971</p> <p>(43) Data de publicação do pedido: 1992.09.30</p> <p>(45) Data e BPI da concessão: Jan-99 1999.01.14</p>	<p>(73) Titular(es): NOVARTIS AG SCHWARZWALDALLEE 215 4058 BASILEIA CH</p> <p>(72) Inventor(es): SOO YOUNG KO GB HANS KOBE CH BRIGITTE ROSENWIRTH AT DIETER SEEBACH CH RENE P. TRABER CH</p> <p>(74) Mandatário(s): AMÉRICO DA SILVA CARVALHO RUA CASTILHO 201 3º AND. ESQ. 1070 LISBOA PT</p>
--	--

(54) Epígrafe: PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE CICLOSPORINAS E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE AS CONTÊM

(57) Resumo:

CICLOSPORINAS; CEFALOSPORINA; ANTIVÍRUS; HIV-1



DESCRIÇÃO  
DA  
PATENTE DE INVENÇÃO.

N.º 99 410

REQUERENTE: SANDOZ, S.A., suíça, industrial, com sede em  
Basileia, Suíça

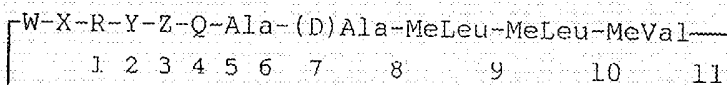
EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE CICLOSPORINAS E  
DE COMPOSIÇÕES FARMACÉUTICAS QUE AS CONTEM"

INVENTORES: SOO YOUNG KO, Dr. HANS KOBEL, Prof. Dr. BRIGITTE  
ROSENWIRTH, Prof. Dr. DIETER SEEBACH, Dr. RENÉ P.  
TRABER, Dr. ROLAND WENGER e Dr. PIETRO BOLLINGER

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris  
de 20 de Março de 1883.  
na Inglaterra em 2 de Novembro de 1990 sob o Nº 9023859, em 5 de  
Novembro de 1990 sob os Nºs 9023972, 9023970, 9023971 e em 5 de  
Agosto de 1991 sob o Nº 9116836.

## RESUMO

A invenção refere-se ao processo para a preparação de ciclosporinas de fórmula geral I



na qual

W, X, R, Y, Z e Q têm as significações mencionadas nas reivindicações, que compreende cultivar a estirpe de fungos DSM 6627 num meio nutritivo ou cultivar a estirpe de fungos DSM 6182 num meio nutritivo a que se adiciona uma cefalosporina que tem um ou mais resíduos MeLeu e se isolar o produto do caldo de fermentação.

As referidas ciclosporinas possuem uma excelente actividade antivírus incluindo HIV-1.

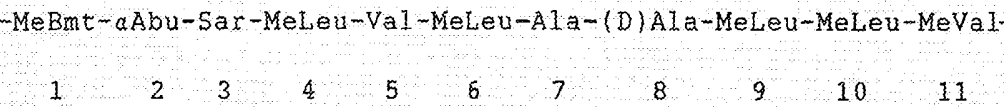
*Wifama*

3

A presente invenção refere-se a um processo para a preparação de novas ciclosporinas, ao seu uso como fármacos e de composições farmacêuticas que as contêm.

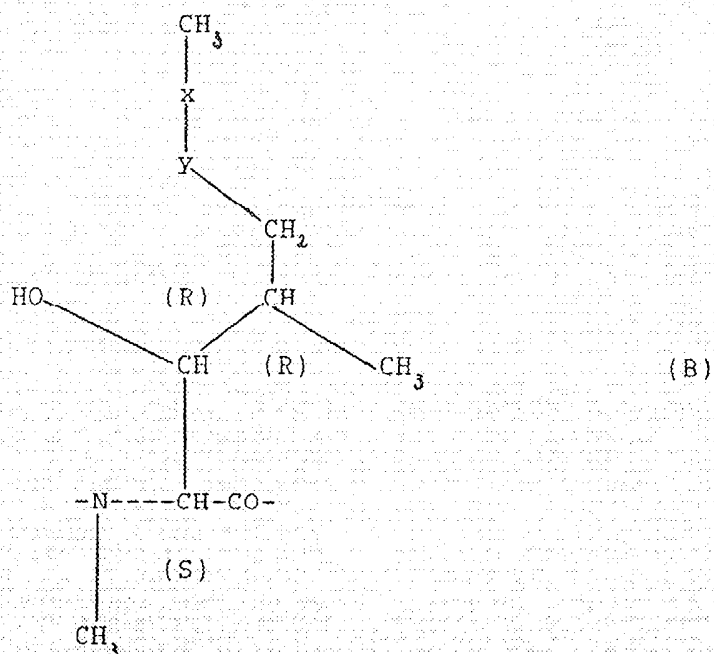
As ciclosporinas compreendem uma classe de undeca-péptidos poli-N-metilados cíclicos, estruturalmente distintos, que possuem normalmente actividade farmacológica, em particular, actividade immunossupressora, anti-inflamatória e/ou anti-parasítica. A primeira das ciclosporinas a ser isolada foi a Ciclosporin ou Ciclosporina metabolito que ocorre naturalmente nos fungos, também conhecida como ciclosporina A e à disposição no comércio sob a Marca Registada SANDIMMUN<sup>®</sup> ou SANDIMMUNE<sup>®</sup>. A Ciclosporina é a ciclosporina da fórmula A.

(A)



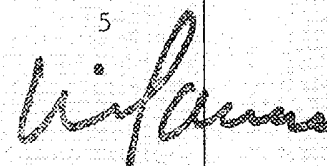
em que MeBmt representa o resíduo N-metil-(4R)-4-but-2E-en-1-il-4-metil-(L)treonilo da fórmula B.

4  
Vigilância



em que -x-y- é -CH=CH- (trans).

Desde a descoberta original da Ciclosporina, foram isoladas e identificadas uma larga variedade de ciclosporinas que ocorrem naturalmente, tendo sido preparadas muitas outras ciclosporinas não-naturais, por meios totalmente sintéticos ou semi-sintéticos ou pela aplicação de técnicas de cultura modificadas. A classe compreendida pelas ciclosporinas é assim, neste momento, substancial e inclui, por exemplo, as ciclosporinas de A a Z que ocorrem naturalmente [cf. Traber et al; 1, Helv. Chim. Acta, 60, 1247-1255 (1977); Traber et



al; 2, *Helv. Chim. Acta*, 65, 1655-1667 (1982); Kobel et al, *Europ. J. Applied Microbiology e Biotechnology*, 14, 273-240 (1982); e von Wartburg et al, *Progress in Allergy*, 38, 28-45, (1986)], bem como vários derivados de ciclosporina não-naturais e ciclosporinas artificiais ou sintéticas que incluem di-hidro-ciclosporinas [em que a parte -x-y- do resíduo MeBmt (fórmula B acima) é saturado para dar -x-y- = -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-]; as ciclosporinas derivatizadas (e.g. em que o átomo-3'-O do resíduo MeBmt é acilado ou um outro substituinte é introduzido no átomo de carbono  $\alpha$  do resíduo sarcosílo na posição 3); as ciclosporinas em que o resíduo MeBmt está presente na forma isomérica (e.g. em que a configuração ao longo das posições 6' e 7' do resíduo MeBmt é mais cis do que trans); e as ciclosporinas em que são incorporados variantes de aminoácidos em posições específicas dentro da sequência do peptido, e.g. empregando o método sintético total para a produção de ciclosporinas desenvolvido por R. Wenger veja-se e.g. Traber et al. 1, Traber et al, 2 e Kobel et al., loc. cit.; Patentes Americanas N<sup>o</sup>s 4.108.985, 4.220.641, 4.288.431, 4.554.351, 4.396.542 e 4.798.823; as Patentes Europeias Publicadas N<sup>o</sup>s 34.567A, 56.782A, 300.784A, 300.785A e 414.632A; a Publicação da Patente Internacional N<sup>o</sup> WO 86/02080 e as Publicações das

6  
Wifano

Patentes Britânicas N<sup>o</sup>s 2.206.119 e 2.207.678; Wenger 1, Transpl. Proc., 15 Suppl. 1:2230 (1983); Wenger 2., Angew. Chem. Int. Ed. 24 77 (1985) e Wenger 3., Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, 50, 123 (1986).

A classe compreendida pelas ciclosporinas é deste modo, neste momento, muito grande de facto e inclui, por exemplo, a [Thr]<sup>1</sup>-Ciclosporina, [Val]<sup>2</sup>-Ciclosporina, [Nva]<sup>3</sup>-Ciclosporina e [Nva]<sup>3</sup>-[Nva]-Ciclosporina (também conhecidas por ciclosporinas C, D, G, e M respectivamente), [3-O-acetil-[MeBmt]<sup>4</sup>-Ciclosporina (também conhecida por acetato de ciclosporina A), [Dihidro-MeBmt]<sup>4</sup>-[Val]<sup>2</sup>-Ciclosporina (também conhecida por dihidro-ciclosporina D), [(D)Ser]<sup>8</sup>-Ciclosporina, [MeIle]<sup>11</sup>-Ciclosporina, [(D)MeVal]<sup>11</sup>-Ciclosporina (também conhecida por ciclosporina H), [MeAla]<sup>6</sup>-Ciclosporina, [(D)Pro]<sup>3</sup>-Ciclosporina e assim por diante.

De acordo com a nomenclatura convencional para as ciclosporinas, estas são definidas ao longo da presente memória descritiva e reivindicações, por referência à estrutura da Ciclosporina (i.e. Ciclosporina A). Faz-se isto indicando primeiro aqueles resíduos na molécula que diferem dos que se encontram presentes na Ciclosporina e depois aplicando o

7  
*Wifan*

termo "Ciclosporina" para caracterizar os resíduos restantes que são idênticos aos que se encontram presentes na Ciclosporina. Ao mesmo tempo, o prefixo "dihidro" é empregue para designar as ciclosporinas em que o resíduo MeBmt é hidrogenado (dihidro-MeBmt), i.e., em que -x-y- na fórmula B é  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ . Assim, [Thr]<sup>1</sup>-Ciclosporina é a ciclosporina que tem a sequência mostrada na Fórmula A, mas em que αAbu na posição 2 é substituída por Thr, e [Dihidro-MeBmt]<sup>1</sup>-[Val]<sup>2</sup>-Ciclosporina é a ciclosporina que tem a sequência mostrada na Fórmula A mas em que o resíduo MeBmt na posição 1 é hidrogenado e αAbu na posição 2 é substituído por Val.

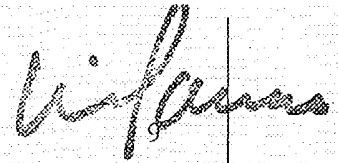
Adicionalmente, os resíduos de aminoácidos referidos pela abreviatura, e.g. Ala, MeVal, αAbu, etc. devem entender-se, de acordo com a prática convencional, como tendo a configuração (L), a não ser que se indique de outro modo, e.g. tal como no caso de "(D)Ala". As abreviaturas dos resíduos precedidos por "Me", tal como no caso de "MeLeu", representa resíduos α-N-metilados. Os resíduos individuais da molécula de ciclosporina são numerados, tal como na técnica, no sentido dos ponteiros do relógio e partindo com o resíduo MeBmt ou dihidro-MeBmt na posição 1. A mesma sequência numérica é

*W. J. J. J.*  
8

empregue ao longo da presente memória descritiva e reivindicações.

Fica assim bem estabelecido que a Ciclosporina actua interferindo com o processo da activação das células T, bloqueando a iniciação de transcrição do IL-2, embora o mecanismo preciso ainda não tenha sido elucidado. A Ciclosporina tem sido mostrada como formando um complexo com uma proteína citosólica 17kD (ciclofilina) que ocorre em muitos tipos de células e tem-se revelado como sendo idêntica ao peptidil-prolil cis trans isomerase, uma enzima envolvida na dobra da proteína. Até agora, contudo, não tem ficado claro se a ligação à ciclofilina está directamente correlacionada com a actividade immunossupressora nas ciclosporinas, se de facto a ligação da ciclofilina é ela própria um critério suficiente para a actividade immunossupressora.

Descobriu-se agora que existem ciclosporinas que se ligam fortemente à ciclofilina, mas não são nada immunossupressoras. Daqui segue que a ligação à ciclofilina é um critério necessário, mas não suficiente para a actividade immunossupressora.



A presente invenção proporciona ciclosporinas que são activas contra a replicação do HIV-1.

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) infecta, de preferência, os linfócitos T-auxiliadores (T4), embora replique também em vários outros tipos de células, em especial as da espécie monocítica. Causa uma doença que progride lentamente no sistema imunológico, caracterizado por uma destruição gradual das células T4, denominada SIDA. Outras características anormais imunológicas da SIDA são o aumento dos linfócitos citotóxicos/supressores (T8), um defeito no processo de apresentação/reconhecimento do antígeno e uma activação policlonal das células B. O mecanismo de destruição das células T4 ainda não é claro. Relativamente poucas células T4 parecem ser infectadas, pelo que, um efeito citopático directo causado pelo vírus pode não ser a única razão para a depleção das células T4. Tem-se colocado a hipótese de que a destruição das células T4 pode ser amplificada por um processo auto-imune controlado por células T4 produtoras de HIV ou células T4 revestidas com proteína HIV. Esta estimulação antigénica contínua pode levar a um estado de activação permanente das células T4, o que aumentaria a replicação HIV nestas células

*W. A. ...*  
10

e expandiria clones T-citotóxicos. As células T4 não infectadas podem tornar-se antigénicas ligando o gp120 viral exógeno às suas moléculas CD4, sendo assim um alvo de uma resposta T-citotóxica..

A Patente Americana Nº 4.814.323 revela que a Ciclosporina possui uma actividade contra a SIDA e que, em geral, as "ciclosporinas conhecidas como imunossupressoras" podem ser úteis nesta indicação. Não existe qualquer sugestão de que se possa esperar que as ciclosporinas não-imunossupressoras tenham esta propriedade.

Surpreendentemente, descobriu-se agora que as ciclosporinas que se ligam à ciclofilina, mas que não são imunossupressoras, exibem um efeito inibitório na replicação do HIV-1.

Considera-se que uma ciclosporina se liga à ciclofilina se ela se ligar à ciclofilina recombinante humana, em pelo menos um quinto, tal como faz a Ciclosporina no teste competitivo ELISA, descrito por Quesniaux in Eur. J. Immunol. 1987 17 1359-1365. Neste teste, a ciclosporina a ser testada é adicionada durante a incubação da ciclofilina com BSA-Ciclosporina

11  
*W. J. ...*

revestida sendo calculada a concentração necessária para dar uma inibição de 50% da reacção de controlo sem competidor ( $CI_{50}$ ). Os resultados são expressos como a Proporção de Ligação (PL), que é o logaritmo para a base 10 da proporção da  $CI_{50}$  do composto do teste e a  $CI_{50}$  num teste simultâneo da própria Ciclosporina. Assim, um PL de 1,0 indica que o composto do teste liga a ciclofilina de um factor dez menos do que a Ciclosporina e um valor negativo indica uma ligação mais forte do que a da Ciclosporina.

As ciclosporinas activas contra o HIV têm um PL inferior a 0,7 (uma vez que o  $\log_{10} 5 = 0,7$  aproximadamente), de preferência, igual ou inferior a zero.

Considera-se que uma ciclosporina é não-imunossupressora quando tem uma actividade na Reacção do Linfócito Misto (RLM) de não mais do que 5%, de preferência não mais do que 2%, do que a da Ciclosporina. A Reacção do Linfócito Misto é descrita por T. Meo in "Immunological Methods", L. Lefkovits e B. Peris, Eds., Academic Press, N.Y., pag. 227-239 (1979). Células do baço ( $0,5 \times 10^6$ ) do ratinho Balb/c (fêmea, 8-10 semanas) são co-incubadas durante 5 dias com células do rato

*W. F. ...* 12

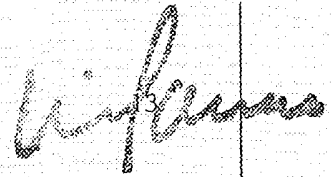
CBA (fêmea, 8-10 semanas)  $0.5 \times 10^6$  irradiadas (2000 rad) ou células do baço do rato CBA (fêmea, 8-10 semanas, tratadas com mitomicina C. As células alogénicas irradiadas induzem uma resposta proliferativa nas células do baço Balb c que pode ser medida pela incorporação de um precursor marcado no DNA. Uma vez que as células estimuladoras são irradiadas (ou tratadas com mitomicina C), não respondem às células Balb/c com proliferação mas retêm a sua antigenicidade.

A  $CI_{50}$  descoberta para o composto do teste na RLM é comparada com a descoberta para Ciclosporina numa experiência paralela.

A actividade das ciclosporinas como inibidoras da replicação do HIV-1 pode ser demonstrada nos sistemas de teste seguintes:

1. Inibição do efeito citopático nas células MT4 induzido pelo HIV-1

É usado com pequenas modificações o processo de ensaio descrito por Pauwels et al., J. Virol. Meth. 20/309 (1988). É usada como célula alvo a linha de células T4, transformadas



com HTLV-I, MT4, que se revelou previamente como sendo altamente permissiva à infecção do HIV. A inibição do HIV-1, efeito citopático induzido pela estirpe HTLV-III<sub>B</sub>, é determinada medindo a viabilidade de ambas as células infectadas com o HIV e das células infectadas a fingir. A viabilidade é determinada espectrofotometricamente através da redução in situ de brometo de 3-(4,5-dimetil- -tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium (MTT). São incluídas, como controlos, culturas sem composto infectadas com o vírus e não infectadas, tal com são incluídas células não infectadas, tratadas com composto. A concentração de células é escolhida de forma a que o número de células por mililitro aumente num factor de 10 durante os 4 dias de incubação, nas culturas infectadas a fingir. O inóculo do vírus é ajustado de forma a causar a destruição das células em 90% das células alvo, depois de 4 dias de incubação. O vírus é adsorvido para dentro de uma suspensão de células 10 vezes concentrada, a 37° C, durante 1 hora. Em seguida, as células infectadas são diluídas para uma proporção de 1:10 e adicionadas a placas de microtitulação contendo o composto do teste.

15  
*W. J. ...*

após a infecção, são removidas aliquotas das culturas infectadas. As células são centrifugadas e os sobrenadantes são recolhidos. A concentração de antigene p24 viral é determinada nos sobrenadantes por meio de um estojo comercial ELISA e serve como parâmetro para a produção do vírus. Depois de cada remoção de aliquotas, contam-se as células e ajustam-se para uma proporção de  $2 \times 10^5$  células/ml, adicionando meio fresco contendo o composto do teste na concentração particular.

Dos compostos de acordo com a invenção, i.e. ciclosporinas de ligação a ciclofilina, não-imunossupressoras activas contra o HIV-1 (Compostos Activos), alguns são novos e outros são conhecidos; contudo, a actividade anti-HIV dos Compostos Activos conhecidos não foi revelada anteriormente e, em muitos casos, os Compostos Activos conhecidos não foram descritos como tendo qualquer actividade farmacêutica de qualquer espécie.

Descobriu-se que muitos dos Compostos Activos têm estruturas que diferem da da Ciclosporina, especificamente nas posições 4 e/ou 5.

Um grupo de Compostos Activos são as ciclosporinas em que o grupo MeLeu na posição 4 é substituído por um aminoácido N-me-tilado diferente, por exemplo  $\beta$  hidroxí-MeLeu, MeIle, MeVal, MeThr ou MeAla. Em adição ao MeIle e MeThr, as formas allo MeIle e MeaThr podem também ser usadas. Na forma allo, a estereoquímica na posição  $\beta$  tem a configuração oposta à do aminoácido natural, de forma a que a forma normal e a forma allo constituem um par de diastereoisómeros.

Um outro grupo de Compostos Activos é aquele em que Val na posição 5 é substituído por um N-alquil-aminoácido, de preferência N-metil-aminoácido. De preferência, o aminoácido que é N-alquilado é Val ou Leu. De preferência, o hidrogénio do grupo imino de [Val]<sup>5</sup> é substituído por um grupo alquilo em C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> não ramificado, de preferência metilo, etilo ou n-propilo, em particular metilo. O último grupo preferido de Compostos Activos são todos novos.

Adicionalmente ou alternativamente, certos Compostos Activos podem diferir da Ciclosporina nas posições 1, 2, 3 e/ou 6. Um grupo preferido de Compostos Activos é constituído pelos compostos de Fórmula I:

*Wilson* 1'

W	X	R	Y	Z	Q	Ala	(D)Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	I

em que W é MeBmt, dihidro-MeBmt ou 8'-hidroxi-MeBmt;

X é  $\alpha$ Abu, Val, Thr, Nva ou O-metil treonina  
(MeOThr);

R é Sar ou (D)-MeAla;

Y é MeLeu,  $\gamma$ -hidroxi-MeLeu, MeIle, MeVal,  
MeThr, MeAla, MeIle ou MeThr;

Z é Val, Leu, MeVal ou MeLeu; e

Q é MeLeu,  $\gamma$ -hidroxi-MeLeu ou MeAla;

com a condição de que, quando Y é MeLeu, então ou Z é MeVal ou MeLeu, ou W é 8'-hidroxi-MeBmt.

Os grupos W, X, Y, Z, Q e R têm, independentemente, as significações preferidas seguintes:

W é, de preferência, W', em que W' é MeBmt ou dihidro-MeBmt;

X é, de preferência, X', em que X' é  $\alpha$ Abu ou Nva, mais preferencialmente, X'', em que X'' é  $\alpha$ Abu;

R é, de preferência, R', em que R' é Sar;

Y é, de preferência, Y', em que Y' é  $\gamma$ -hidroxi-MeLeu, MeVal, MeThr ou MeIle;

Z é, de preferência, Z', em que Z' é Val ou MeVal; e

Q é, de preferência, Q', em que Q' é MeLeu;

Um grupo especialmente preferido de Compostos Activos, são os compostos de Fórmula I, em que W é W', X é X', Y é Y', Z é Z', Q é Q' e R é R'.

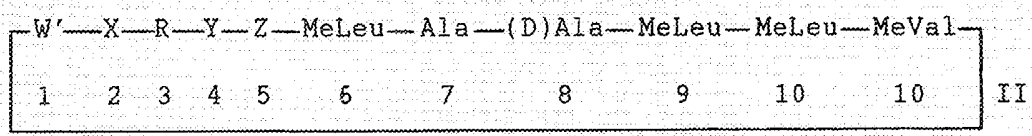
Os compostos particularmente preferidos da Fórmula I, são os seguintes:

- a) [dihidro-MeBmt]<sup>1</sup> - [ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>4</sup> - Ciclosporina
- b) [MeVal]<sup>4</sup> - Ciclosporina
- c) [MeIle]<sup>4</sup> - Ciclosporina
- d) [MeThr]<sup>4</sup> - Ciclosporina
- e) [ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>4</sup> - Ciclosporina
- f) [Nva]<sup>1</sup> - [ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>4</sup> - Ciclosporina
- g) [ $\gamma$ -hidroxi MeLeu]<sup>4</sup> [ $\gamma$  hidroxi MeLeu]<sup>6</sup> Ciclosporina
- h) [MeVal]<sup>5</sup> - Ciclosporina
- i) [MeOThr]<sup>1</sup> - [(D)MeAla]<sup>3</sup> - [MeVal]<sup>5</sup> - Ciclosporina
- j) [8'-hidroxi-MeBmt]<sup>1</sup> - Ciclosporina

*Wifama* 19

Em adição, certos compostos que não estão dentro do âmbito da Fórmula I, são Compostos Activos, por exemplo k) [MeAla]<sup>6</sup>-Ciclosporina, e l) [ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>9</sup>-Ciclosporina.

A invenção proporciona também novos Compostos Activos, que são os compostos da Fórmula II:



em que W', X, R, Y e Z são tal como se definiu acima, com a condição de 1), quando Y é MeLeu ou MeAla, então Z é MeVal ou MeLeu e 2), quando W' é MeBmt, R é Sar e Y é  $\gamma$ -hidroxi-MeLeu, então Z é diferente de Val.

Um grupo preferido de Compostos Activos novos consiste nos compostos de Fórmula II, em que X é X'', Y é Y' e Z é Z', com a condição de que quando W' é MeBmt, Y' é diferente de  $\gamma$ -hidroxi-MeLeu.

Os novos Compostos Activos particularmente preferidos, são os compostos a), b), c), d), f), e h) acima. Descobriu-se

*W. Zofan*

que alguns destes compostos, por exemplo, os compostos b) e c), bloqueiam a acção immunossupressora da Ciclosporina, bloqueando a sua ligação à ciclofilina e, deste modo, actuam como antagonistas da Ciclosporina.

Os Compostos Activos podem ser obtidos de várias maneiras, que podem ser classificadas da seguinte forma:

- 1) Fermentação
- 2) Biotransformação
- 3) Derivatização
- 4) Síntese Parcial
- 5) Síntese Total

1) Alguns dos Compostos Activos são produzidos como sub-produtos da fermentação das estirpes originais ou modificadas de organismos que produzem a Ciclosporina, tais como o Tolyposcladium inflatum Gams, tal como é exemplificado pela produção do composto c), descrito no Exemplo 1 abaixo.

2) Outros Compostos Activos, incluindo os compostos j) e l) conhecidos, são metabolitos de Ciclosporina e podem ser

isolados por métodos cromatográficos a partir da urina das pessoas ou animais, doseada com Ciclosporina. Além disso, estas e outras transformações metabólicas são possíveis usando microrganismos, por exemplo, a produção dos compostos e) e g) pela biotransformação de ciclosporina A, tal como se descreve nos Exemplos 2 e 3, ou a do composto f) pela biotransformação de ciclosporina G (Exemplo 4). Estes exemplos demonstram um novo processo para a preparação de ciclosporinas que têm um ou mais resíduos  $\gamma$ -hidroxi-MeLeu, compreendendo as fases de cultivo de uma nova estirpe modificada de Sebekia benihana, adicionando uma ciclosporina tendo um ou mais resíduos MeLeu e isolando o produto do caldo de fermentação.

3) Por derivatização entende-se que as ciclosporinas naturais ou sintéticas podem ser convertidas em Compostos Activos por uma ou mais reacções químicas, em que um ou mais dos aminoácidos são modificados sem abrir e reformar as ligações do peptido. Por exemplo, a classe de Compostos Activos em que o Val na posição 5 é N-alquilado, pode ser obtida fazendo reagir a ciclosporina correspondente, tendo Val na posição 5, com butil-lítio, seguido pela reacção com um agente de alquilação, tal como exemplificado para o composto h), no

*W. J. ...*

Exemplo 5, e para o composto i) no Exemplo 6.

Tal como outros exemplos, o composto a) pode ser preparado por hidrogenação do composto e) (Exemplo 7) e o composto j), que é também um metabólito importante de Ciclosporina, pode ser preparado a partir do acetato do composto de Ciclosporina conhecido, tal como se descreve no Exemplo 8.

4) O termo síntese parcial, é usado para significar uma série de reacções químicas em que é aberto o anel de uma ciclosporina natural, são removidos um ou mais aminoácidos, são adicionados diferentes aminoácidos e o anel é novamente fechado.

5) A síntese total de ciclosporinas pode ser levada a cabo construindo um undecapéptido linear e ciclizando, tal como descrito por Wenger (loc. cit.), veja-se também as Patentes Americanas 4.396.542 e 4.798.823. Em princípio, qualquer ciclosporina pode ser preparada pela via de síntese total, embora quando um dos outros métodos está disponível, este possa de facto ser mais conveniente do que a síntese total. A síntese total pode ser usada para a preparação do

*W. J. ...*

composto d) (Exemplo 9) e para o metabolito conhecido composto 1).

O composto k) é uma substância conhecida, cujas propriedades foram descritas por Quesniaux *et al* (*Mol. Immunol.* 24:1159-1987) e que pode também ser preparado pela síntese total. Por exemplo, uma síntese total deste composto é descrita na Patente Americana 4.914.188.

#### Exemplo 1 [Meile]<sup>4</sup>-Ciclosporina (Composto c)

##### Estirpe de Produção

O composto c) é obtido pela fermentação da estirpe de fungo Tolipocladium inflatum Cy E 4556, depositada na Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, de acordo com as cláusulas do tratado de Budapeste de 24 de Julho de 1991, sob o número de acesso DSM 6627. Esta estirpe é uma mutante da estirpe NRRL 8044 da espécie Tolypocladium inflatum Gams, e é taxonomicamente idêntica à estirpe da família, que foi completamente descrita, e.g. na Patente Britânica 1.491.509.

*W. f. f. f.*

Cultura 1. Cultura em ágar de partida: Cultivam-se em plano inclinado de ágar da estirpe DSM 6627, durante 14 dias, a 27°C, no meio de ágar seguinte:

Extracto de levedura (Gistex)	4 g
Extracto de malte (Wander)	20 g
Ágar	20 g
Água desmineralizada até	1000 ml.

O meio tem um pH de 5,4-5,6 e é esterilizado durante 20 min. a 120° C.

2. Pré-cultura: Esporos do micélio de 4 culturas de partida, são suspensos em 40 ml de uma solução de sal a 0,9%. São inoculados com 20 ml desta suspensão uma série de recipientes de Erlenmeyer de 500 ml, contendo cada um 100 ml de meio de pré-cultura. A composição do meio de pré-cultura é a seguinte:

Caseína (Amber EHC)	25 g
Maltose	75 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
KCl	2,5 g
Água desmineralizada até	1000 ml

O meio é ajustado a um pH de 5,2-5,5 com HCl, depois é esterilizado durante 20 min. a 120° C. As pré-culturas são

*W. J. ...*

fermentadas durante 24 hr. a 27° C, num agitador rotativo, a 200 rpm, com uma descentragem de 50 mm.

3. Cultura intermediária: Um fermentador de aço de 25 litros contendo 20 litros de meio de pré-cultura, é inoculado com 200 ml de pré-cultura. A cultura intermediária é fermentada durante 5 dias a 27° C, com uma taxa de agitação de 150 rpm e uma velocidade de corrente de ar de 0,5 l/min. por litro de meio, a uma pressão de 0,5 bares.

4. Cultura principal: 100 litros de meio de pré-cultura são inoculados com 10 l de cultura intermediária e fermentados num fermentador de aço de 120 litros. A este meio são adicionados 4 g/l de D-Treonina, esterilizada por filtração. A fermentação é levada a cabo a 27° C durante 14 dias, com uma taxa de agitação de 70 rpm e uma velocidade de corrente de ar de 0,4 l/min por litro de meio, sendo usada uma pressão de 0,5 bares, durante os 5 primeiros dias, aumentando-se depois a velocidade de agitação para 100 rpm e a velocidade de corrente de ar de 0,5 l/min por o resto do período de fermentação.

*Wifan*

Isolamento: O micélio é separado do meio de cultura e extraído num aparelho Turraz, esmagando e agitando 3 vezes com 10 litros de metanol/água (9:1 em vol.). O micélio esmagado é separado do dissolvente por filtração por sucção e os filtrados combinados são concentrados por evaporação, sob vácuo, a uma temperatura de 40° C até o vapor consistir principalmente em água apenas. A mistura obtida é extraída quatro vezes, usando 2 litros de 1,2-dicloroetano em cada extração e as soluções de 1,2-dicloroetano combinadas são concentradas por evaporação, sob vácuo, a uma temperatura de 40° C.

O resíduo é submetido a cromatografia em coluna de gel de sílica (10 kg de gel de sílica, granulometria de 0.02-0,045 mm, "Grace") usando acetato de etilo/água, como eluente (fracções de 2,5 litros). As fracções 20 - 23, contendo [MeIle]<sup>4</sup>-Ciclosporina são ligadas e depois novamente separadas por cromatografia em coluna de gel de sílica (600 g de gel de sílica, granulometria 0,04 - 0,063 mm, "Merck") usando clorofórmio/metanol (98:2 em vol.) como eluente (tamanho da fracção 300 ml). Consegue-se outra purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica (400 g de gel de sílica, granulometria de 0,04 - 0,063 mm, "Merck") usando cloreto de meti-

*W. J. ...*

27

leno/metanol (98:2 em vol.) como eluente (tamanho da fracção 200 ml), originando [MeIle]<sup>4</sup>-Ciclosporina pura, sob a forma de um pó branco amorfo: p.f. 155-158° C;  $[\alpha]_{20/D} = -235'$  (c=0,68 em CHCl<sub>3</sub>) e -193' (c=0,74 em CH<sub>3</sub>OH).

O espectro de IV em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> é tal como se mostra na Fig. 1 e o espectro de RMN protónica em CDCl<sub>3</sub> é tal como se mostra na Fig. 2..

Exemplo 2 [ $\gamma$ -hidroxi-Meleu]<sup>4</sup>-Ciclosporina (Composto e)

O composto e) é obtido a partir da biotransformação da Ciclosporina pelo microrganismo Sebekia benihana. A estirpe original usada é denominada NRLL 11111 e pertence à espécie Sebekia benihana (Dietz and Li: Sebekia, um novo género da família Actinoplanaceae. Abstrs. 82nd Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol., 163, Atlanta, 1982). Esta estirpe é capaz de hidroxilar a novobiocina. A estirpe sub-cultivada usada para a preparação do composto e) e dos compostos relacionados, foi depositada no German Collection of Microorganisms (D-3300 Braunschweig) sob o número DSM 6182.

28  
*Wilson*

1. Cultura de ágar de partida: As culturas de ágar em plano inclinado, da estirpe DSM 6182 são cultivadas durante 10 dias, a 27° C, no meio de ágar seguinte:

Glucose	10 g
Amido (solúvel)	20 g
Extracto de levedura (Gistex)	5 g
Peptona (N-Z-Amina Tipo A, Sheffield)	5 g
CaCO <sub>3</sub>	1 g
Ágar (Bacto)	18 g
Água desmineralizada até 1 Litro.	

pH: neutralizado a 7 com NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Esterilização: 120° C/20 min.

2. Pré-cultura: Os esporos e o micélio de uma cultura de partida são suspensos em 10 ml de uma solução de sal a 0,9%. Uma série de recipientes de Erlenmyer de 200 ml, contendo cada um 50 ml de meio de pré-cultura, são inoculados, cada um deles, com 5 ml desta suspensão. A composição do meio de pré-cultura é a seguinte:

*W. J. ...*

Glucose	7 g
Amido (solúvel)	10 g
Extracto de Levedura (Gistex)	4,5 g
Extracto de malte (líquido, Wander)	10 g
Peptona (N-Z-Amina Tipo A, Sheffield)	2,5 g
CaCO <sub>3</sub>	1 g
Solução de oligoelementos Nr 235	1 ml
Água desmineralizada até 1 Litro	

pH neutralizado a 7 com NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Esterilização: 120° C/20 min.

Solução de oligoelementos de Nr 235:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5 g
KI	0,05 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,2 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	2 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4 g
Água desmineralizada até 999 ml	
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (97%)	1 ml

*Handwritten signature*

As pré-culturas são fermentadas durante 4 dias, a 27° C, num agitador rotativo a 200 rpm com uma descentragem de 50 mm.

3. Cultura intermediária: Uma série de recipientes de Erlenmeyer de 200 ml, contendo cada um 50 ml do meio de pré-cultura, são inoculados, cada um deles, com 5 ml de pré-cultura. A cultura intermediária é fermentada durante 3 dias, a 27° C, num agitador rotativo, a 200 rpm, com uma descentragem de 50 mm.

4. Cultura principal: Uma série de recipientes de Erlenmeyer de 500 ml, contendo cada um 50 ml do meio principal (total de 12 litros), são inoculados cada um com 5 ml da cultura intermediária. Estas culturas são fermentadas durante 3 dias, a 27° C, num agitador rotativo, a 200 rpm, com uma descentragem de 50 mm. Depois de 24 horas, adiciona-se a cada uma das culturas principais, ciclosporina A (7,5 mg), solubilizada em metanol (=150 mg/L).

A composição do meio de cultura principal é a seguinte:

Cerelose	10 g
Dextrina	10 g

*Wifana*

Amido (solúvel)	10 g
Extracto de levedura (Gistex)	2,5 g
Farinha de soja (Nurupan, Edelsoya)	12,5 g
$K_2HPO_4$	0,25 g
$KH_2PO_4$	0,12 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,10 g
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0,05 g
Solução de oligo-elementos AC-1	1 ml

Água desmineralizada até 1 Litro.

pH: ajustado a 7,2 - 7,5 (KOH/ $H_2SO_4$ )

Esterilização: 120° C/20 min.

Solução de oligo elementos AC 1: Esta solução tem a mesma composição que a solução Nr 235, com a adição de:  $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$  0.2g.

5. Isolamento: O micélio é separado do meio de cultura e o filtrado da cultura resultante (13 L) é extraído três vezes com 1,2-dicloroetano, usando 1,5 L em cada uma das extracções. As soluções de 1,2-dicloroetano combinadas são evaporadas sob vácuo, a uma temperatura de 40° C. O residuo impuro é submeti-

*W. J. ...* 32

do a filtração com gel Sephadex LH-20 usando metanol como eluente. Essas fracções contendo os compostos de ciclosporina (525 mg) são ligadas e cromatografadas em gel de sílica (50g, granulometria de 0,04-0,063 mm, 'Merck') usando cloroformio/metanol como eluente. A cromatografia repetida usando o mesmo sistema produz uma [ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>4</sup>-Ciclosporina pura, sob a forma de um pó branco amorfo, p.f. 150-153°, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> -225° (c=0,53 em CHCl<sub>3</sub>), -171° (c=0,44 em CH<sub>3</sub>OH).

Exemplo 3 [ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>4</sup>-[ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>6</sup>-Ciclosporina (composto g)

As fracções secundárias mais polares originárias da purificação da [ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>4</sup>-Ciclosporina são novamente separadas por cromatografia em coluna de gel de sílica repetida (granulometria de 0,04-0,063 mm) usando acetona/hexano 2:1 como eluente, seguido de cromatografia em gel de sílica usando éter metil t.butilico/metanol/água 90:9:1 como eluente. As primeiras fracções contêm [ $\gamma$ -hidroxi-Leu]<sup>4</sup>-Ciclosporina que é novamente purificada por descoloração com carvão, originando o composto puro, sob a forma de um pó branco amorfo, p.f. 162-164°, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> -211° (c=0,50 em CHCl<sub>3</sub>), -157° (c=0,52 em CH<sub>3</sub>OH).

As últimas fracções originadas da cromatografia em coluna de gel de sílica acima contêm [ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>4</sup> - [ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>6</sup> -Ciclosporina e são novamente purificadas por descoloração com carvão, originando o composto do título puro, sob a forma de um pó branco amorfo, p.f. 157-160°. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> -217° (c=0,54 em CHCl<sub>3</sub>), -176° (c=0,42 em CH<sub>3</sub>OH).

Exemplo 4 [Nva]<sup>2</sup>-[ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>4</sup>-Ciclosporina (composto f)

Este composto é preparado por um processo análogo à preparação do composto e ([ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>4</sup>-Ciclosporina), mas usando ciclosporina G ([Nva]2-Ciclosporina) como material de partida. Depois da purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica repetida usando acetato de etilo saturado com água e acetona/hexano 2:1 como eluente, respectivamente, obtem-se o composto do título sob a forma de um pó branco amorfo, p.f. 138-141°. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> -213° (c=0,69 em CHCl<sub>3</sub>), -168° (c=0,70 em CH<sub>3</sub>OH).

Exemplo 5 [MeVal]<sup>5</sup>-ciclosporina (composto h)

A ciclosporina A (0,60 g = 0,5 mmoles) dissolvida em tetra-

*Wifana*

hidrofurano (20 ml) é incubada com 0,63 ml de uma solução 1,6 M de butil-lítio (1,0 mmoles) em hexano. Faz-se reagir a solução resultante com sulfato de dimetilo (0,1 ml; 1,5 mmoles) a  $-78^{\circ}$  C. Aquece-se lentamente a mistura reaccional até à temperatura ambiente e agita-se durante a noite.

O isolamento por cromatografia rápida ( $\text{SiO}_2$ , metanol a 5%/éter), seguida de HPLC (fase inversa) deu o produto do título. O composto é caracterizado por um espectro de 300 MHz e um espectro de RMN  $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$ , que é mostrado na Fig. 3.

Exemplo 6 [MeOThr]<sup>2</sup> - [(D)MeAla]<sup>3</sup> [MeVal]<sup>5</sup> Ciclosporina (Composto i)

Arrefece-se para  $-80^{\circ}$  C uma mistura de 480 ml de THF (absoluto) e 6,96 g (49,2 mmoles) de diisopropilamina e adiciona-se lentamente, através de uma seringa, 33,5 ml de uma solução 1,33 M de butil-lítio em hexano (= 44,5 mmoles). Agita-se a mistura durante 30 min. a  $-80^{\circ}$  C, depois adiciona-se através de uma seringa, durante 2 - 3 minutos, uma solução de 8 g (6,6 mmoles) de ciclosporina C ([Thr]<sup>2</sup>-Ciclosporina) em 120 ml de THF absoluto. Agita-se a solução clara durante mais uma hora a  $-80^{\circ}$  C, depois adiciona-se lentamente 2,06 ml de iodeto de

*Wiferna*

35

metilo.

Deixa-se aquecer a mistura para a temperatura ambiente, durante 2 horas, depois adicionam-se 40 ml de água e evaporam-se os dissolventes num evaporador rotativo a 30° C / 15 mm Hg. Divide-se o resíduo entre água e éter e lava-se a camada de éter quatro vezes com salmoura semi-saturada, seca-se sobre MgSO<sub>4</sub> e evapora-se para dar um resíduo de 8,1 g.

Cromatografa-se o resíduo em 1200 g de Kieselgel com acetato de etilo saturado com água, para dar um produto impuro que depois de uma outra cromatografia em 200 g de Kieselgel com MeOH a 5%/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dá o produto do título puro,  $[\alpha]_D^{20} = -195^\circ$  (C= 1,0 em CHCl<sub>3</sub>).

Exemplo 7 [dihidro-MeBmt]<sup>1</sup>-[ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>4</sup>-Ciclosporina  
(composto a)

A uma suspensão de 200 mg de paládio a 10% pré-hidrogenado/carvão, em 40 ml de etanol, adicionam-se 1,2 g de [ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>4</sup>-Ciclosporina (composto e) em 10 ml de etanol e realiza-se a hidrogenação à temperatura ambiente até já não sair mais hidrogénio. Depois da remoção do catalisador por filtração, evapora-se a solução originando o composto do

titulo sob a forma de um pó branco amorfo, p.f. 154-156',  
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> -225' (c=0,87 em CHCl<sub>3</sub>), -169' (c=0,70 em CH<sub>3</sub>OH).

Exemplo 8 [8'-hidroxi-MeBmt]<sup>4</sup>-Ciclosporina (composto j)

1. [0-acetil- $\omega$ -bromo-MeBmt]<sup>4</sup>-Ciclosporina: Aquece-se a refluxo durante 2,5 hrs, uma mistura de 25,0 g (20 mmoles) de [0-acetil-MeBmt]<sup>4</sup>-Ciclosporina (Traber *et al.*, Helv. Chim. Acta 1982, 65, 1653), 4,4g (25 mmoles) de N-bromo succinimida e 400 mg de azo-bis-isobutironitrilo em 250 ml de tetracloreto de carbono. Evapora-se o dissolvente e substitui-se por éter, filtra-se dos sólidos, lava-se com água, seca-se sobre sulfato de magnésio e evapora-se até à secura. Cromatografa-se o resíduo sobre gel de sílica com éter etílico/acetato de etilo (4:1), para dar 10,7 g (40%) do produto amorfo que é cristalizado a partir de éter/hexano, para originar 8,4 g de substância pura; p.f. 207-209' C. As últimas fracções do produto cromatografado continham um adicional de 11,2 g de produto com uma qualidade ligeiramente inferior.

2. [0-acetil- $\omega$ -acetoxi-MeBmt]<sup>4</sup>-Ciclosporina: Aquece-se num banho de óleo a 105' C, durante 3 horas e mantem-se a

*Vigilância*

37

temperatura ambiente durante o fim-de-semana, uma mistura de 4,31 g (3,3 mmoles) do produto da fase 1 (contaminado com cerca de 15-20% de material de partida) e 2,1 g (8 mmoles) de acetato de tetraetilamônio tetra-hidratado em 30 ml de metil etil cetona, contendo uma quantidade catalítica de iodeto de sódio. Dilui-se o dissolvente com éter metil t-butílico e lava-se com água e salmoura. Seca-se a camada orgânica sobre  $MgSO_4$  e evapora-se para deixar 4,0 g de produto impuro, que é purificado numa coluna de fase inversa RP-18 (240 g), para originar 3,07 g do produto do título; p.f. 191-192° C.

3. [ $\omega$ -hidroxi-MeBmt]<sup>1</sup>-Ciclosporina: Misturam-se e mantêm-se à t.a. durante 2,5 horas, uma solução de 1,72 g (1,3 mmoles) do produto da fase 2 em 75 ml de metanol e uma solução de 1,2 g de sódio em 50 ml de metanol. Em seguida, acidifica-se a solução com ácido acético. Evapora-se o dissolvente sob pressão reduzida e dissolve-se o resíduo em éter metil t-butílico, lava-se sequencialmente com água, salmoura e uma solução de bicarbonato de sódio, seca se sobre  $MgSO_4$  e evapora-se. O produto impuro (1,6 g) é eluído a partir de uma coluna RP-18 (240 g) com metanol/água 75:15, para dar 1,5 g de produto puro. Cristaliza-se uma amostra a partir de

*W. J. P. J. J.*

éter/hexano para dar um produto cristalino com um p.f. de 181-  
-183° C.

Exemplo 9 [MeThr]<sup>4</sup>-Ciclosporina (composto d)

A síntese total de Ciclosporina conforme descrito nas Patentes Americanas 4.396.542 e 4.798.823 é levada a cabo usando MeThr na posição 4 em vez de MeLeu. O produto tem  $[\alpha]_D^{20} = -249,6'$  (c=1,0 em CHCl<sub>3</sub>).

Exemplo 10 [MeVal]<sup>4</sup>-Ciclosporina (composto b)

A síntese total de Ciclosporina conforme descrita nas Patentes Americanas 4.396.542 e 4.798.823 é levada a cabo usando MeVal na posição 4 em vez de MeLeu. O produto tem  $[\alpha]_D^{20} = -226'$  (c=0,358 em CHCl<sub>3</sub>).

Exemplo 11 Imunossupressão e ligação à ciclofilina de Compostos Activos relativos à Ciclosporina

A Tabela I dá exemplos de (1) Proporção da Ligação à ciclofilina (PL) dos Compostos Activos conforme medida no

*Wilson*

ensaio ELISA e (2) actividade immunossupressora dos Compostos Activos relativa à Ciclosporina, conforme medida no ensaio MLR e expressa como percentagem de actividade relativa à Ciclosporina (Proporção Immunossupressora ou PI). Outra explicação do significado destes valores e dos métodos para levar a cabo estes testes são referidos acima.

Tabela I

<u>Composto</u>	<u>PL(log)</u>	<u>PI(%)</u>
a) [dihidro-MeBmt] <sup>1</sup> -[γ-hidroxi-MeLeu] <sup>4</sup> -Ciclosporina	0,1	<1
b) [MeVal] <sup>4</sup> -Ciclosporina	0,1	<1
c) [MeIle] <sup>4</sup> -Ciclosporina	-0,2	<1
e) [γ-hidroxi-MeLeu] <sup>4</sup> -Ciclosporina	-0,3	<1
f) [Nva] <sup>2</sup> -[γ-hidroxi-MeLeu] <sup>4</sup> -Ciclosporina	0,4	<1
h) [MeVal] <sup>5</sup> -Ciclosporina	0,4	5,3
j) [8'-hidroxi-MeBmt] <sup>1</sup> -Ciclosporina	0,35	1,8
k) [MeAla] <sup>6</sup> -Ciclosporina	-0,4	3,2
l) [γ hidroxi-MeLeu] <sup>3</sup> -Ciclosporina	0,15	2,9

*Wilson*

Exemplo 12 Actividade anti-HIV e citotoxicidade dos Compostos

Activos

Exemplos da actividade dos Compostos Activos e da Ciclosporina como inibidores da replicação do HIV-1 nas células MT4 e a citotoxicidade dos Compostos Activos e da Ciclosporina em células MT4 são referidos na Tabela II. O significado destes números e os métodos apropriados são discutidos acima.

Tabela II

<u>Composto</u>	<u>Citotoxicidade Anti-HIV</u>	
	<u>(<math>\mu</math>g/ml)</u>	<u>(IC )</u>
a) [dihidro-MeBmt] <sup>1</sup> -[ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu] <sup>4</sup> - -Ciclosporina	16,3	0,12
b) [MeVal] <sup>4</sup> -Ciclosporina	5,4	0,064
c) [MeIle] <sup>4</sup> -Ciclosporina	4,5	0,056
e) [ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu] <sup>4</sup> -Ciclosporina	15,5	0,34
f) [Nva] <sup>2</sup> -[ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu] <sup>4</sup> -Ciclosporina	14,0	0,85
h) [MeVal] <sup>5</sup> -Ciclosporina	4,4	0,45
i) [MeOThr] <sup>2</sup> -[(D)MeAla] <sup>3</sup> -[MeVal] <sup>5</sup> -Ciclosporina	>10	0,45
j) [8'-hidroxi-MeBmt] <sup>4</sup> -Ciclosporina	10,6	0,56

*Wifano* 41

k) [MeAla] <sup>6</sup> -Ciclosporina	5,2	1,34
l) [ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu] <sup>9</sup> -Ciclosporina	>10	0,31
Ciclosporina	8,45	0,53

Os Compostos Activos são indicados para a prevenção da SIDA em pacientes assintomáticos HIV-positivos e no tratamento de pacientes que sofrem de SIDA. Nos pacientes em que a SIDA já apareceu, a administração do Composto Activo deveria inverter a depleção das células T4 associadas com a SIDA, induzir a regressão de perturbações relacionadas com a SIDA, tais como o sarcoma de Kaposi e reduzir as novas infecções oportunistas.

Deste modo, a invenção proporciona um processo para o tratamento e prevenção do síndrome da imunodeficiência adquirida e outras perturbações provocadas pelo vírus HIV-1 num paciente infectado com o referido vírus, que compreende a administração ao referido paciente de uma quantidade efectiva de um Composto Activo da invenção.

O Composto Activo pode ser administrado por qualquer via convencional, em particular por via entérica, e.g. por via

*W. J. J. J.*

oral, por exemplo na forma de soluções para beber, comprimidos ou cápsulas ou por via parentérica, por exemplo na forma de soluções injectáveis ou suspensões. Pela via intravenosa, uma dosagem diária indicada pode situar-se entre 1 a 20 mg/kg, de preferência entre 3 a 10 mg/kg e pela via oral de 1 a 50 mg/kg, de preferência 7 a 20 mg/kg.

A toxicidade dos Compostos Activos crê-se que é semelhante à da Ciclosporina. Como os Compostos Activos não são imunossuppressores, evitam-se certos efeitos secundários da Ciclosporina relacionados com a imunossupressão. Contudo, outros efeitos secundários associados com a Ciclosporina, em particular a nefrotoxicidade com uso por largo período, pode também ser associada aos Compostos Activos.

As formulações galénicas preferidas para os Compostos Activos incluem as que se baseiam em microemulsões, conforme descritas no Pedido de Patente Britânica 2 222 770A, que inclui formas tópicas e orais; também formas orais e injectáveis obtidas das soluções sólidas que compreendem um monoéster de sacárido de ácido gordo, e.g. monolaurato de sacarose, conforme descritas no Pedido de Patente Britânica 2 209 671A. As formas de unidade de dosagem apropriadas para

*Handwritten signature*

administração oral compreendem e.g. de 25 a 200 mg de Compos-  
to Activo por dosagem.

Exemplo de formulação A:

Produto do Ex. 1	50,0 mg
Glicofurol 75	180,0 mg
Migliol 812	90,0 mg
Cremonor RH40	180,0 mg
Alfa-tocoferol	0,5 mg

Exemplo de formulação B:

Produto do Ex. 1	100,0 mg
Tetraglicol	20,0 mg
Captex 800	20,0 mg
Nikkol HCO-40	860,0 mg
Butil-hidroxi-tolueno (BHT)	1,0 mg

Exemplo de formulação C:

Produto do Ex. 1	25,0 mg
Glicofurol 75	100,0 mg
Migliol 812	35,0 mg
Cremonor RH 40	90,0 mg

*44*  
*W. J. ...*

Butil-hidroxi-anisol (BHA) 0,2 mg

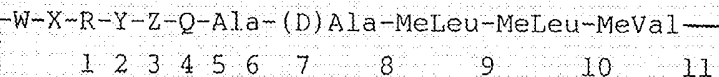
Exemplo de formulação D:

Produto do Ex. 1	10,0 mg
Tetraglicol	10,0 mg
Miritol	5,0 mg
Cremonor RH 40	75,0 mg
Alfa-tocoferol	0,1 mg

Os componentes individuais destas formulações, bem com os métodos para a sua preparação, estão completamente descritos no Pedido de Patente Britânica 2 222 770, cujo conteúdo aqui se incorpora por referência.

## REIVINDICAÇÕES:

1a.- Processo para a preparação de ciclosporinas de fórmula geral I



na qual

W significa MeBmt, di-hidro-MeBmt ou 8'-hidroxi-MeBmt;

X significa  $\alpha$ Abu, Val, Thr, Nva ou MeOThr;

R significa Sar ou (D)-MeAla;

Y significa MeLeu,  $\gamma$ -hidroxi-MeLeu, MeIle, MeVal, MeThr, MeAla, Mealle ou MeaThr;

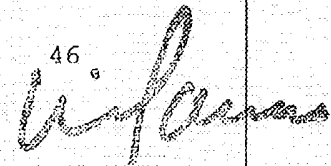
Z significa Val, Leu, MeVal ou MeLeu; e

Q significa MeLeu,  $\gamma$ -hidroxi-MeLeu ou MeAla;

contanto que, quando Y significar MeLeu, então ou Z significa MeVal ou MeLeu ou W significa 8'-hidroxi-MeBmt; caracterizado pelo facto de compreender as operações que consistem em cultivar a estirpe do fungo DSM 6627 num meio nutritivo e isolar o produto do caldo de fermentação.

2a. Processo para a preparação de ciclosporinas que possuem um ou mais resíduos de  $\gamma$ -hidroxi-MeLeu, caracterizado pelo facto de compreender as operações que consistem em cultivar a estirpe do fungo DSM 6182 num meio nutritivo, adicionar uma ciclosporina que possui um ou mais resíduos MeLeu e isolar o produto do caldo de fermentação.

3a. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de, como produto final, se obter um composto de fórmula I`



W`	X`	Sar	Y`	Z`	MeLeu	Ala	(D)Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

na qual

W` significa MeBmt ou di-hidro MeBmt;

X` significa  $\alpha$ Abu ou Nva;

Y` significa  $\beta$ -hidroxi-MeLeu, MeVal, MeThr ou MeIle; e

Z` significa Val ou MeVal.

4a. Processo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de, como produto final, se obter um composto de fórmula geral II

W`	X	R	Y	Z	MeLeu	Ala	(D)Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

na qual

W` significa MeBmt ou di-hidro-MeBmt;

X` significa  $\alpha$ Abu, Val Thr, Nva ou MeOThr;

R` significa Sar ou (D)-MeAla;

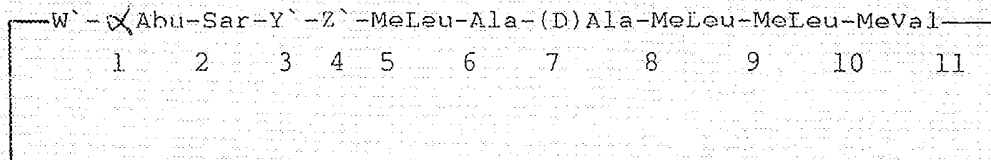
Y` significa MeLeu,  $\beta$ -hidroxi-MeLeu, MeIle, MeVal, MeThr, MeAla, MeIle ou MeaThr; e

Z` significa Val, Leu, MeVal ou MeLeu; com a condição de que:

1) quando Y significa MeLeu ou MeAla, Z significa MeVal ou MeLeu; e

2) quando W` significa MeBmt, R significa Sar e Y significa  $\beta$ -hidroxi-MeLeu, então Z é diferente de Val.

5a. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo facto de, como produto final, se obter um composto de fórmula II`



na qual

W` significa MeBmt ou di-hidro-MeBmt;

Y` significa  $\gamma$ -hidroxi-MeLeu, MeVal, MeThr ou MeIle; e

Z` significa Val ou MeVal;

contanto que, quando W` significa MeBmt, Y` é diferente de  $\gamma$ -hidroxi-MeLeu.

6a. Processo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de, como produto final, se obter um dos seguintes compostos:

[di-hidro-MeBmt]<sup>1</sup>-[ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>4</sup>-ciclosporina,  
 [MeVal]<sup>4</sup>-ciclosporina,  
 [MeIle]<sup>4</sup>-ciclosporina,  
 [MeThr]<sup>4</sup>-ciclosporina,  
 [ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>4</sup>-ciclosporina,  
 [Mva]<sup>2</sup>-[ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>4</sup>-ciclosporina,  
 [ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>4</sup>-[ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>6</sup>-ciclosporina  
 [MeVal]<sup>5</sup>-ciclosporina,  
 MeOThr]<sup>2</sup>-[(D)MeAla]<sup>3</sup>-[MeVal]<sup>5</sup>-ciclosporina,  
 [8`-hidroxi-MeBmt]<sup>1</sup>-ciclosporina e  
 [ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>9</sup>-ciclosporina.

7a. Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo facto de, se preparar um composto do grupo formado por:

[di-hidro-MeBmt]<sup>1</sup>-[ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>4</sup>-ciclosporina,  
 [MeVal]<sup>4</sup>-ciclosporina,  
 [MeIle]<sup>4</sup>-ciclosporina,  
 [MeThr]<sup>4</sup>-ciclosporina,

[Nva]<sup>2</sup>-[ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>4</sup>-ciclosporina,  
 [ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>4</sup>-[ $\gamma$ -hidroxi-MeLeu]<sup>6</sup>-ciclosporina  
 [MeVal]<sup>5</sup>-ciclosporina e  
 MeOThr]<sup>2</sup>-[(D)MeAla]<sup>3</sup>-[MeVal]<sup>5</sup>-ciclosporina.

8a. Cultura pura da estirpe do fungo com o número de acesso da Colecção Alemã de Microrganismos DSM 6182.

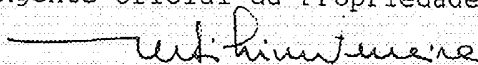
9a. Cultura da estirpe do fungo com o número de acesso da Colecção Alemã de Microrganismos DSM 6627.

10a. Processo para a preparação de composições farmacêuticas para o tratamento e a prevenção de perturbações provocadas por vírus em seres humanos, incluindo o vírus HIV-1, caracterizado pelo facto de se misturar pelo menos uma ciclosporina preparada de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 7, como ingrediente activo, com as substâncias veiculares apropriadas.

11a. Processo para o tratamento terapêutico ou profilático de perturbações provocadas por vírus, incluindo o HIV-1, em seres humanos, caracterizado pelo facto de se administrar aos pacientes que precisam esse tratamento uma dosagem diária duma ciclosporina de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8 de preferência compreendida entre cerca de 1 e 20mg/Kg de peso corporal, no caso de a administração se fazer por via intravenosa e entre cerca de 1mg e 50mg/Kg de peso corporal no caso de a administração se fazer por via oral.

Lisboa, 31 de Outubro de 1991

10 Agente Oficial da Propriedade Industrial



MARIA SILVANA VIEIRA PEREIRA FERREIRA  
 Adjunto

**Américo da Silva Carvalho**  
 Agente Oficial de Propriedade Industrial  
 Rua Marquês de Fronteira, N.º 127 - 2.º  
 1800 LISBOA Tels. 3877373-3877453

SENHOS 3-11-91

Wiflunas

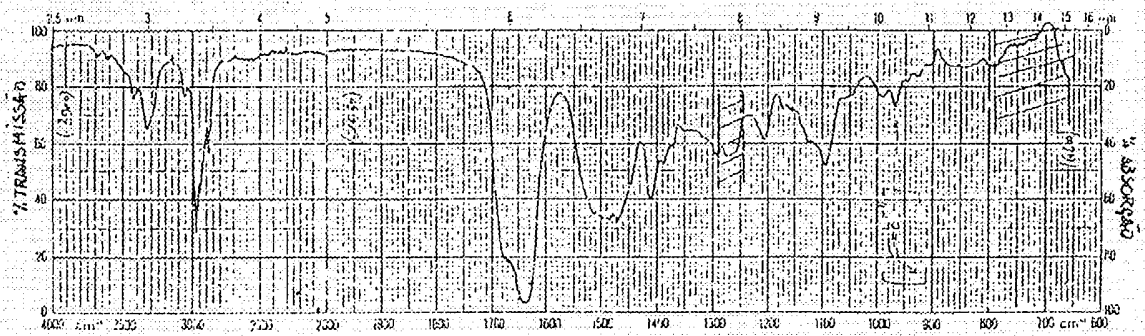


Fig. 1

Indoz S.A.

сентябрь 3-№2

Вифлорин

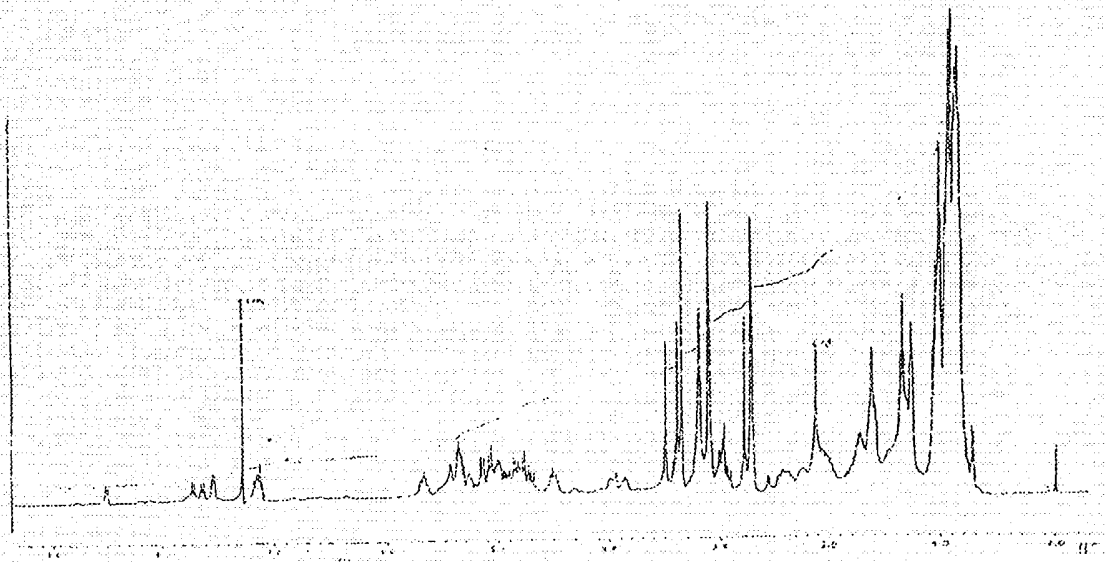


Fig. 2

индос S.A.

SENHOS 3 - N° 3

*Wifama*

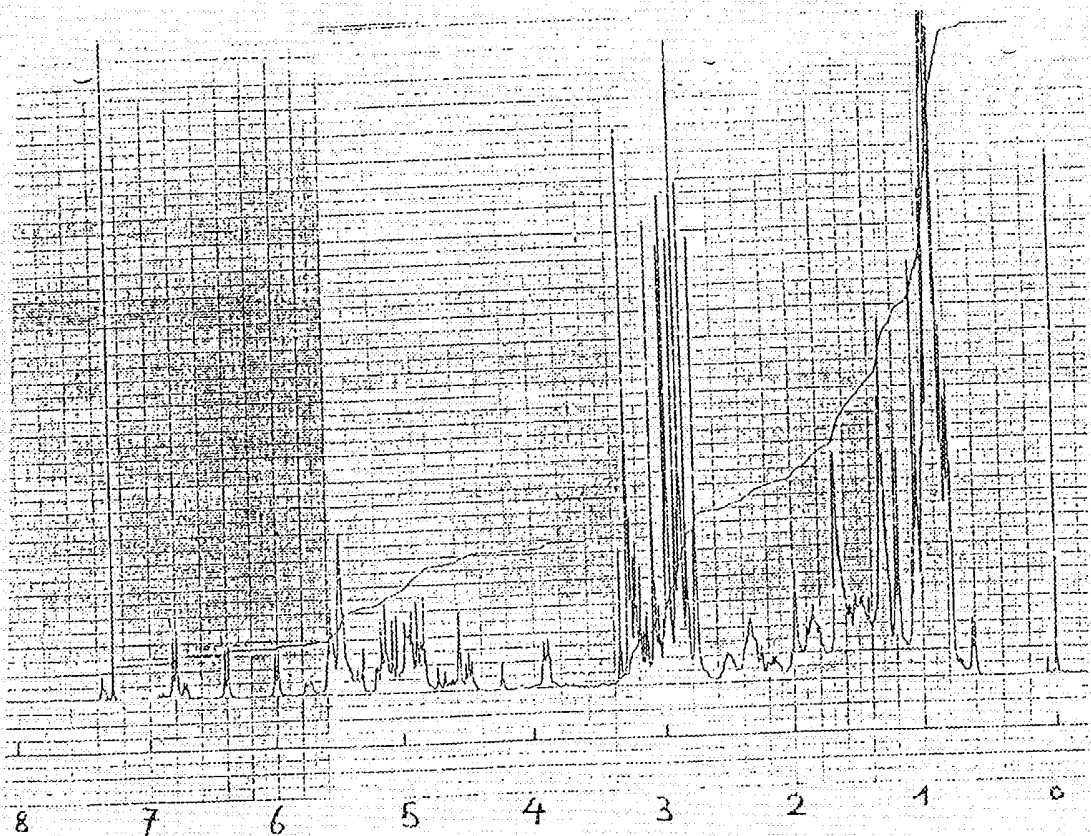


Fig. 3

Indoz S.A.