



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **324042**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 7/64 (2006.01)

A61K 38/13 (2006.01)

C12P 21/04 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20001020	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.10.08 PCT/IB98/01693
(22)	Inng.dag	2000.02.29	(85)	Videreføringsdag	2000.02.29
(24)	Løpedag	1998.10.08	(30)	Prioritet	1997.10.08, US, 61360
(41)	Alm.tilgj	2000.02.29			
(45)	Meddelt	2007.07.30			
(73)	Innehaver	Isotechnika Inc, 2100 Collage Plaza, 8215 112th Street, ABT5SIE8 EDMONTON, CA			
(72)	Oppfinner	Selvaraj Naicker, 3304-117th Street, ABT6J3J4 EDMONTON, CA Randall W Yatscoff, 1596 Hector Roas, ABT6R225 EDMONTON, CA Robert T Foster, 34 Westbrook Drive, ABT6J2C9 EDMONTON, CA			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO			

(54)	Benevnelse	Cyklosporin A derivat, farmasøytisk sammensetning innebefattende samme, anvendelse av samme for fremstilling av medikament og fremgangsmåte for fremstilling av samme			
(56)	Anførte publikasjoner	EP 283801 EP 577544			
(57)	Sammendrag				

Cyklosporinderivater er fremlagt som fremviser økt effektivitet og redusert toksisitet i forhold til naturlig forekommende og andre per i dag kjente cyklosporiner og cyklosporinderivater. Cyklosporinderivatene ifølge oppfinnelsen fremstilles ved kjemisk og isotopisk substitusjon av cyklosporin A (CsA) molekylet ved: (1) kjemisk substitusjon og valgfri deuterium-substitusjon av aminosyre 1, og (2) deuterium-substitusjon av nøkkelsetene for metabolisme av cyklosporin A molekylet slik som aminosyrer 1, 4, 9. De mest aktive derivatene ifølge oppfinnelsen var de som hadde både kjemisk og deuterium substitusjon. Også fremlagt er fremgangsmåter for fremstilling av cyklosporinderivater og fremgangsmåter for å fremkalle immunosuppresjon med redusert toksisitet med de fremlagte cyklosporinderivatene.

Foreliggende oppfinnelse angår cyklosporin A derivat, farmasøytisk sammensetning innbefattende samme, anvendelse av samme for fremstilling av medikament og fremgangsmåte for fremstilling av samme. Cyklosporinderivater ifølge oppfinnelsen fremstilles ved kjemisk og isotopisk substitusjon av cyklosporin A (CsA) molekylet ved:

1. Kjemisk substitusjon og valgfri deuterium-substitusjon av aminosyre 1; og
2. Deuterium-substitusjon av nøkkelsetene av metabolisme av cyklosporin A molekylet slik som aminosyrene 1, 4, 9.

De mest aktive derivatene ifølge oppfinnelsen var de som hadde både kjemisk og deuterium-substitusjon.

- 15 Cyklosporiner er en familie av naturlige, hydrofobe cycliske undekapeptider, som inneholder en ny ni-karbon aminosyre (MeBmt) i posisjon 1 i ringen som fremviser potente immunosuppressive, antiparasittiske, fungicidale og kroniske anti-inflammasjonsegenskaper. De naturlig forekommende medlemmene av denne familien av strukturelt beslektede forbindelser fremstilles av forskjellige fungi imperfekter.
- 20 Cyklosporiner A og C er hovedkomponentene. Cyklosporin A, som er videre diskutert nedenfor, er et særlig viktig medlem av cyklosporinfamilien av forbindelser. 24 mindre metabolitter, også oligopeptider, er blitt identifisert: Lawen et al, J- Antibiotics 42, 1283 (1989); Traber et al, Helv. Chim. Acta 70, 13 (1987); Von Wartburg and Traber Prog. Med. Chem., 25, 1 (1988).

- 25 Isolering av cyklosporinene A og C, så vel som strukturen av A, er beskrevet av A. Ruegger et al., Helv. Chim. Acta 59, 1075 (1976); M. Dreyfuss et al., J. Appl. Microbiol. 3, 125 (1976). Krystall- og molekylstrukturene av jododerivatet av A er blitt beskrevet av T. J. Petcher et al., Helv. Chim. Acta 59, 1480 (1976). Strukturen av C ble rapportert av R. Traber et al., *ibid.* 60, 1247 (1977). Fremstilling av A og C er blitt beskrevet av E. Harri et al., US patent nr. 4.117.118 (1978 til Sandoz). Isolering, karakterisering og antifungal aktivitet av B, D, E, så vel som strukturene av A til og med D er blitt rapportert av R. Traber et al., Helv. Chim. Acta 60, 1568 (1977). Isolering og strukturene av E, F, G, H, I: eidem, *ibid.* 65, 1655 (1982). Fremstilling av
- 35 [2-deutero-3-fluoro-D-Ala]⁸-CsA er beskrevet av Patchett et al. i GB 2.206.199A som ble publisert 29. desember 1988.

Cyklosporin ble funnet å være immunosuppressiv når den ble funnet å undertrykke antistoffproduksjon hos mus i løpet av screening av fungale ekstrakter. Særlig fant de suppressive effektene å være relatert til inhiberingen av T-cellereseptorformidlede aktiveringshendelser. Den utførte dette ved å forstyrre kalsiumavhengig
5 signaltransduksjon i løpet av T-celle aktivering ved inaktivering av kalmodulin og cyklofilin, en peptidylpropylisomerase. Den inhiberte også lymfokinproduksjon med T-hjelperceller in vitro og stoppet utviklingen av modne CD8 og CD4 celler i thymus. Andre in vitro egenskaper omfatter inhibering av IL-2-produserende T-lymfocytter og cytotoxiske T-lymfocytter, inhibering av IL-2 frigitt ved aktiverte T-celler, inhibering
10 av hvilende T-lymfocytter som respons på alloantigen og eksogen lymfokin, inhibering av IL-1-produksjon og inhibering av mitogenaktivering av IL-2 som produserer T-lymfocytter. Videre bevis indikerte at effektene ovenfor omfatter T-lymfocytter ved aktiverings- og modningstrinnene.

15 Stimulering av TCR (T-cellereseptor) med fremmed antigen på et hovedhistokompatibilitets (MHC)-molekyl på overflaten av T-cellen resulterer i aktivering av en TCR signal transmisjonsvei (eksakt metode for transmisjon ikke kjent) gjennom cytoplasma som forårsaker signalet som resulterer i aktiveringen av nukleære transkripsjonsfaktorer, dvs. nukleære faktorer av aktiverte T-celler (NF-AT) som
20 regulerer transkripsjonen av T-celleaktiveringsgenene. Disse genene inkluderer lymfokin-interleukin-2 (IL-2). Oversettelsen av beskjeden følges av sekresjon av IL-2. T-celleaktivering omfatter også at lymfokinreseptor IL-2R kommer til syne på celleoverflaten. Etter at IL-2 binder seg til IL-2R, blir en lymfokinreseptor (LKR) signal transmisjonsvei aktivert. Det immunosuppressive legemidlet, rapamycin, inhiberer
25 denne veien.

CsA er en potent inhibitor av TCR-formidlet signal transduksjonsvei. Den inhiberer binding av NF-AT til IL-2 forsterkeren, og således inhiberer transkripsjonell aktivering. CsA bindes til cyklofilin, som binder seg til kalsineurin, som er et nøkkelenzym i T-
30 celle signal transduksjonskaskaden.

Cyklofilin finnes i prokaryote og eukarote organismer og er overalt og i store mengder. Cyklofilin er en enkel polypeptidkjede med 165 aminosyreresiduer. Den har en molekylmasse på 17,8 kD. Et nesten sfærisk molekyl med en radius på 17 ångstrøm, har
35 cyklofilin en åtte-tannet antiparallell betatønne. Inne i tønne inneholder den tett pakke kjernen for det meste hydrofobe sidekjedene. CsA har flere hydrofobe sidekjedene som gjør at den passer inn i cyklofilin-betatønne. Cyklofilin katalyserer

interkonversjonen av cis- og trans-rotamerene av peGIFdyl-prolyl amidbindingen av peptid- og proteinsubstratene. Cyklofilin er identisk i struktur med peptidylprolyl cis-trans isomerase og har strukturelle likheter med superfamilien av proteiner som transporterer ligander slik som retinolbindingsprotein (RBP). Disse proteinene bærer liganden i tønnekjernen. Men cyklofilin bærer i virkeligheten ligandbindingssetet på utsiden av tønne. Tetrapeptidliganden bindes i en lang dyp fordypning på proteinoverflaten mellom en side av betatønne og Thr116-Gly130 loop'en.

Videre egenskaper er også blitt beskrevet i studier av den biologiske aktiviteten av CsA:

10 J. F. Borel et al., *Agents Actions* 6, 468 (1976). *Farmakologi*: Eidem. *Immunology* 32, 1017 (1977); R. Y. Calne, *Clin. Exp. Immunol.* 35, 1 (1979). *Humane studier*: R. Y. Calne et al., *Lancet* 2, 1323 (1978); R. L. Powles et al., *ibid.* 1327; R. L. Powles et al., *ibid.* 1, 327 (1980). *In vitro aktivitet (svine T-celler)*: D. J. White et al., *Transplantation* 27, 55 (1979). *Effekter på humane lymfoid- og myeloidceller*: M. Y. Gordon, J. W. Singer, *Nature* 279, 433 (1979). *Clinical study of CsA in graft-versus-host disease*: P. J. Tutschka et al., *Blood* 61, 318 (1983).

CsA, som diskutert ovenfor, bindes til cyklofilin betatønne. Tretten CyP A residuer definerer CsA bindingssetet. Disse residuene er Arg 55, Phe 60, Met 61, Gln 63, Gly 72, Ala 101, Asn 102, Ala 103, Gln 111, Phe 113, Trp 121, Leu 122, His 126. De største sidekjedebevegelsene er 1,3 Å for Arg 55 og opp til 0,7 Å for Phe 60, Gln 63 og Trp 121. Det er fire direkte hydrogenbindinger mellom CyP A og CsA. Residuer 4, 5, 6, 7, 8 av CsA stikker frem inn i løsemidlet og antas å være involvert i binding av effektorproteinet, kalsineurin (Pflugl, G., Kallen, J., Schirmer, T., Jansonius, J. N., Zurini, M. G. M., & Walkinshaw, M. D. (1993) *Nature* 361, 91-94).

CsA-CyP A komplekset inhiberer fosfataseaktiviteten til det heterodimeriske proteinet serin/treonin fosfatase eller kalsineurin (Liu, J., Farmer, J. D., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I. & Schreiber, S. L. (1991) *Cell* 66, 807-15; Swanson, S. K., Born, T., Zydowsky, C. D., Cho, H., Chang, H. Y. & Walsh, C. T. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3686-90). CyP A binder CsA med en affinitet på ca. 10 nM. Komplekset blir deretter presentert overfor kalsineurin (Liu, J., Farmer, J. D., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I. & Schreiber, S. L. (1991) *Cell* 66, 807-15).

35 Kalsineurin defosforylerer transkripsjonsfaktoren NFAT som finnes i cytoplasmaen av T-celler. Defosforylering gjør det mulig for NFAT å translokalisere til kjernen, kombinere med jun/fos gener og aktivere transkripsjonen av IL-2 gen et ansvarlig for

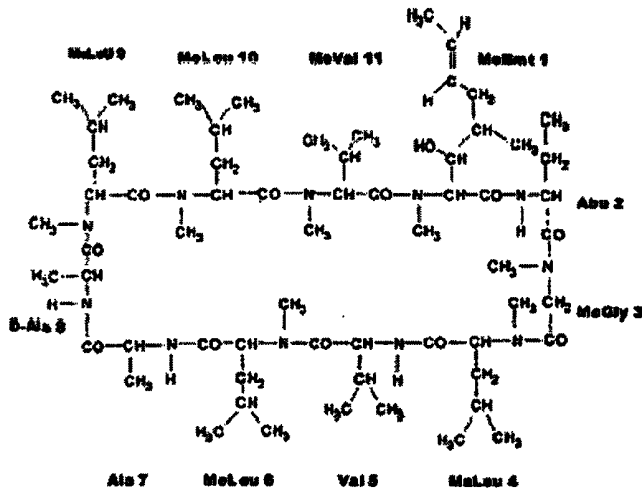
cellesyklusprogresjon, som fører til immunrespon. CsA-CyP A kompleks inhiberer fosfataseaktiviteten av kalsineurin og til slutt immunosuppresjon (Etzkorn, F. A., Chang, Z., Stolz, L. A. & Walsh, C. T. (1994) *Biochemistry* 33, 2380-2388). Verken CsA eller CyP A alene er viktige immunologisk. Bare deres kompleks er viktig (Liu, J., Farmer, J. D., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I. & Schreiber, S. L. (1991) *Cell* 66, 807-15).

Cyklosporin metaboliseres i leveren, tynntarmen og nyren til mer enn 30 metabolitter. Strukturen av 13 metabolitter og 2 fase II metabolitter er blitt identifisert og minst 23 ytterligere metabolitter er blitt isolert med HPLC og deres strukturer karakterisert med massespektrometri. Reaksjonene som omfattes av fase I metabolisme av cyklosporin er hydroksylering, demetylering så vel som oksidering og cyclisering ved aminosyre 1. Flere kliniske studier og rapporter viser en forbindelse mellom blodkonsentrasjoner av cyklosporinmetabolitter og neuro- eller nefrotoksisitet. In vitro eksperimenter indikerer at metabolitter er betydelig mindre immunosuppressive og mer toksiske enn CsA.

Som eksemplifisert ved den til enhver tid ekspanderende listen av indikasjoner for hvilke CsA er blitt funnet anvendelig, finner cyklosporinfamilien av forbindelser anvendelse ved forebygging av organavvisning og benmargstransplantasjon; og ved behandling av psoriasis, og et antall autoimmune forstyrrelser slik som type I diabetes mellitus, multipel sklerose, autoimmun uveitis og reumatoid artritt. Ytterligere indikasjoner er diskutert nedenfor.

Som det er generelt aksept for blant fagfolk, er inhibering av sekresjon av interleukin-2 (IL-2) og andre lymfokiner fra lymfocytene en anvendelig indikator for egen-immunosuppressiv aktivitet til en cyklosporinanalogue. For en nylig gjennomgang av cyklosporinanvendelser og virkningsmekanismer, se Wenger et al. *Cyclosporine: "Chemistry, Structure-Activity Relationships and Mode of Action, Progress in Clinical Biochemistry and Medicine"*, vol. 2, 176 (1986).

Cyklosporin A er et cyklisk peptid som inneholder flere N-metylaminosyrer og, i posisjon 8, inneholder et D-alanin. Strukturen av cyklosporin A^a er gitt nedenfor:



^aMed mindre annet er angitt, er hver av aminosyrene av den fremlagte cyclosporinen av L-konfigurasjon.

5

Som det er vanlig innenfor feltet, kan en bestemt cyclosporin analog navngis ved anvendelse av en forkortet notasjon som identifiserer hvordan analogen er forskjellig fra cyclosporin A. Således kan cyclosporin C som er forskjellig fra cyclosporin A ved treoninet i posisjon 2 identifiseres som [Thr]²-cyclosporin eller [Thr]²-CsA. På samme måte er cyclosporin B [Ala]²-CsA; cyclosporin D er [Val]²-CsA; cyclosporin E er [Val]¹¹-CsA; cyclosporin F er [3-desoksyMeBmt]¹-CsA; cyclosporin G er [NVa]²-CsA og cyclosporin H er [D-MeVal]¹¹-CsA.

D-serin og D-treonin er blitt introdusert i 8-posisjonen av cyclosporin A ved biosyntese som resulterer i aktive forbindelser. Se R. Traber et al., *J. Antibiotics* 42, 591 (1989). D-kloralanin er også blitt introdusert i posisjon 8 av cyclosporin A ved biosyntese. Se A. Lawen et al., *J. Antibiotics* 52, 1283 (1989).

Immunoregulerende abnormaliteter har vist seg å eksistere i et antall varianter av autoimmune og kroniske inflammasjonssykdommer, som inkluderer systemisk lupus erytematose, kronisk reumatoid artritt, type I diabetes mellitus, inflammasjonstarmsykdom, biliær cirrhose, uveitis, multipel sklerose og andre forstyrrelser slik som Crohns sykdom, ulcerativ kolit, bulløs pemfigoid, sarkoidose, psoriasis, iktyose og Graves oftalmopati. Selv om de underliggende patogenesene av hver av disse tilstandene kan være forskjellige, har de til felles at et antall autoantistoffer og

25

selvreaktive lymfocytter kommer til syne. Slik selvreaktivitet kan være delvis på grunn av tap av homeostatiske kontroller hvorved det normale immunsystemet opererer.

På samme måte, etterfølgende en benmargs- eller organtransplantasjon, oppdager
5 vertslymfocytene de fremmede vevsantigenene og begynner å produsere antistoffer som fører til transplantatreksjon.

Et sluttresultat av en autoimmun eller en reaksjonsprosess er vevsdestruksjon forårsaket av inflammasjonsceller og mediatorene de frigir. Anti-inflammasjonsmidler, slike som
10 NSAID'er (ikke-steroidale anti-inflammasjonslegemidler), og kortikosteroider tjener i prinsippet til å blokkere effekten av, eller sekresjon av, disse mediatorene, men gjør ingenting for å modifisere den immunologiske basisen til sykdommen. På den annen side tjener cytotoksiske midler, slik som cyklofosfamid, på en slik ikke-spesifikk måte til at både de normale og autoimmune responsene slås av. Videre er det like trolig at
15 pasienter behandlet med slike ikke-spesifikke immunosuppressive midler bukker under for infeksjon som for deres autoimmune sykdom.

Generelt er et cyklosporin, slik som cyklosporin A, ikke cytotoksisk eller myelotoksisk. Det inhiberer ikke migrering av monocytter og heller ikke inhiberer det granulocytter og
20 makrofagvirkning. Dets virkning er spesifikk og beholder de fleste etablerte immunresponsene intakt. Imidlertid er det nefrotoksisk og er kjent å forårsake følgende uønskede bivirkninger:

- (1) abnormal leverfunksjon,
- 25 (2) hirsutisme,
- (3) gummi hypertrofi,
- (4) tremor,
- (5) neurotoksisitet,
- (6) hyperaesthesia, og
- 30 (7) gastrointestinalt ubehag.

Et antall cyklosporiner og analoger er blitt beskrevet i patentlitteraturen:

US patent nr. 4.108.985 gitt til Ruedger et al. 22. august 1978 med tittel
35 "Dihydrocyclosporin C", fremlegger dihydrocyclosporin C, som kan fremstilles ved hydrogenering av cyklosporin C.

US patent nr. 4.117.118 gitt til Harri et al. 26. september 1978 med tittel "Organic Compounds", fremlegger cyklosporiner A og B og fremstilling derav ved fermentering.

5 US patent nr. 4.210.581 gitt til Ruegger et al. 1. juli 1980 med tittel "Organic Compounds", fremlegger cyklosporin C og dihydrocyklosporin C som kan fremstilles ved hydrogenering av cyklosporin C.

10 US patent nr. 4.220.641 gitt til Traber et al. 2. september 1980 med tittel "Organic Compounds", fremlegger cyklosporin d, dihydrocyklosporin D og isocyklosporin D.

US patent nr. 4.288.431 gitt til Traber et al. 8. septembmer 1981 med tittel "Cyclosporin Derivatives, Their Production and Pharmaceutical Compositions Containing Them", fremlegger cyklosporin G, dihydrocyklosporin G og isocyklosporin G.

15 US patent nr. 4.289.851, gitt til Traber et al. 15. september 1981 med tittel "Process for Producing Cyclosporin Derivatives", fremlegger cyklosporin D, dihydrocyklosporin D og isocyklosporin D og en fremgangsmåte for fremstilling av samme.

20 US patent nr. 4.384.996, gitt til Bollinger et al. 24. mai 1983 med tittel "Novel Cyclosporins", fremlegger cyklosporiner som har en β -vinylen- α -aminosyrerest i 2-posisjonen og/eller en β -hydroksy- α -aminosyrerest i 8-posisjonen. Cyklosporinene fremlagt omfatter enten MeBmt eller dihydro-MeBmt i 1-posisjonen.

25 US patent nr. 4.396.542, gitt til Wenger 2. august 1983 med tittel "Method for the Total Synthesis of Cyclosporins, Novel Cyclosporins and Novel Intermediates and Methods for their Production", fremlegger syntesen av cyklosporiner, hvori resten i 1-posisjonen er enten MeBmt, dihydro-MeBmt og beskyttede intermediater.

30 US patent nr. 4.639.434, gitt til Wenger et al. 27. januar 1987, med tittel "Novel Cyclosporins", fremlegger cyklosporiner med substituerte rester i posisjonene 1, 2, 5 og 8.

35 US patent nr. 4.681.754, gitt til Siegel 21. juli 1987, med tittel "Counteracting Cyclosporin Organ Toxicity", fremlegger fremgangsmåter for anvendelse av cyklosporiner som innbefatter ko-dergokrin.

US patent nr. 4.703.033, gitt til Seebach 27. oktober 1987, med tittel "Novel Cyclosporins", fremlegger cyklosporiner med substituerte residuer i posisjonene 1, 2 og 3. Substituentene i posisjon 3 omfatter halogen.

- 5 H. Kobel og R. Traber, *Directed Biosynthesis of Cyclosporins*, European J. Appl. Microbiol Biotechnol., 14, 237B240 (1982), fremlegger biosyntesen av cyklosporinene A, B, C, D & G ved fermentering.

10 Ytterligere cyklosporinanaloger er fremlagt i US patent nr. 4.798.823, gitt til Witzel, med tittel New Cyclosporin Analogs with Modified "C-9 amino acids", som fremlegger cyklosporinanaloger med svovelinneholdende aminosyrer i posisjon 1.

EP 283801 beskriver cyklosporin A derivater som kan brukes til å danne immunogener for å produsere antistoffer spesifikke mot cyklosporin A og metabolitter derav.

15

EP 577544 angir cyklosporin A derivater som har likhetstrekk med de som er beskrevet i foreliggende søknad, men beskriver ikke deuteriumsubstitusjoner i posisjon 1, 3 og 9.

20 Den foreliggende oppfinnelsen angår kjemisk substituerte og deutererte analoger av cyklosporin A og beslektede cyklosporiner.

Et formål ved den foreliggende oppfinnelsen er å tilveiebringe nye cyklosporinanaloger som har økt effektivitet og skiftende farmakokinetiske og farmakodynamiske parametere.

25

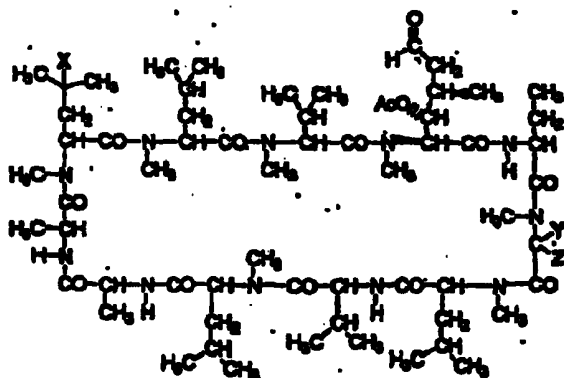
Et ytterligere formål ved den foreliggende oppfinnelsen er er å tilveiebringe en farmasøytiske sammensetning, kjennetegnet ved at den innbefatter cyklosporinderivatet ifølge oppfinnelsen, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, og en farmasøytisk akseptabel bærer.

30

Et ytterligere formål ved oppfinnelsen er å tilveiebringe anvendelse av cyklosporinderivatet ifølge oppfinnelsen, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for fremstilling av et medikament for å tilveiebringe immunosuppresjon hos et subjekt.

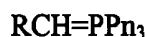
35 Et ytterligere trekk ved foreliggende oppfinnelse angår anvendelse av cyklosporinderivat ifølge oppfinnelsen, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for fremstilling av et medikament for å hindre eller lindre immunosykdom hos et subjekt.

Til slutt er det et formål med foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en fremgangsmåte for fremstilling av en forbindelse ifølge oppfinnelsen, hvori R' er en OH-gruppe, kjennetegnet ved at den innbefatter kondensering av et aldehyd med formel (2):



5

hvori X, Y og Z er som definert i krav 1, med et Wittig-reagens med formel (3):

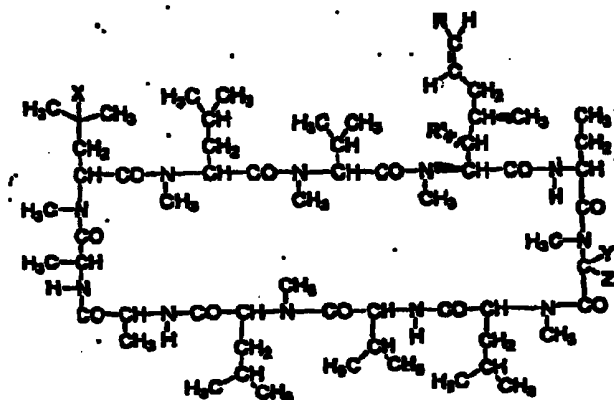


10

hvori R er som definert i krav 1, fulgt av hydrolyse i en alkalisk løsning.

Substituering og deuterering av cyclosporinmolekylet resulterer i forandrede fysiokjemiske og farmakokinetiske egenskaper som øker dets anvendelighet ved
 15 behandling av transplantasjonavvisning, vert vs. graft sykdom, graft vs. vert sykdom, aplastisk anemi, fokal og segmental glomerulosklerose, myasthenia gravis, psoriatisk artritt, tilbakefallende polykondritt og ulcerativ kolit.

Utførelsesformer av oppfinnelsen omfatter cyclosporin A derivat, kjennetegnet ved
 20 formel:



hvor

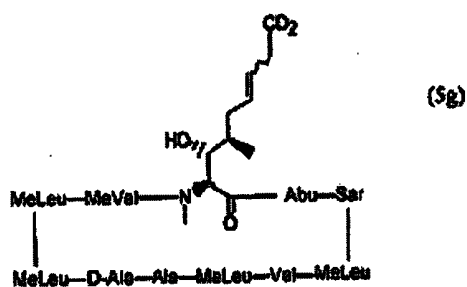
X, Y og Z er uafhængig hydrogen eller deuterium;

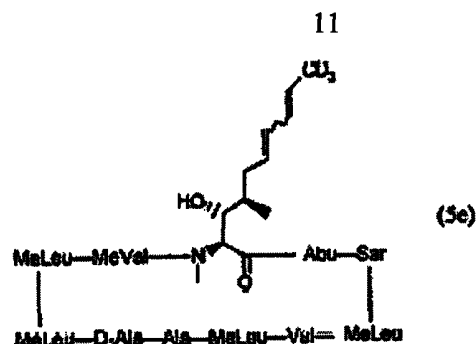
- 5 R er en mettet eller umettet, rett eller forgrenet alifatisk karbonkæde hvor 2 eller 3 karbonatomer indeholder et eller flere deuteriumatomer i stedet for hydrogen; eller, når $\text{X}=\text{Y}=\text{Z}=\text{H}$, kan R også være valgt fra $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}-\text{CD}-\text{CD}_3$, $-\text{CD}=\text{CH}-\text{CD}=\text{CD}-\text{CD}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CD}_2$, $-\text{CD}-\text{CH}-\text{CD}=\text{CD}_2$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$ og $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$;

og

- 10 R' er en OH eller acetoksygruppe;
eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

Videre specifikke utførelsesformer omfatter de med formel 5g og 5e nedenfor:





Figur 1 er strukturen av cyclosporin A som viser et sete med deuterering i aminosyre 3 posisjon.

5

Figur 2 er strukturen av cyclosporin A som viser et sete med deuterering i aminosyre 9 posisjon.

Figur 3 er skjema I av syntesen av cyclosporinderivater.

10

Figur 4 er skjema II av syntesen av cyclosporinderivater.

Figur 5 er en graf av resultatene av kalsineurin-undersøkelsen i Eksempel 9.

15 Figur 6 er en graf av resultatene av en blandet lymfocytreaksjon-undersøkelse i Eksempel 10.

Substitusjon av deuterium for vanlig hydrogen og deutererte substrater for "protio" metabolitter kan forårsake dyptgående forandringer i biosystemene. Isotopisk forandrede legemidler har vist stor divergens i farmakologiske effekter. Pettersen et al. fant økt anti-cancereffekt med deuterert 5,6-benzyliden-dl-L-askorbinsyre (Zilasorb) [Anticancer Res. 12, 33 (1992)].

Substitusjon av deuterium i metylgrupper av cyclosporin vil resultere i en senere hastighet ved oksidasjon av C-D bindingen relativt til hastigheten for oksidasjon av en ikke-deuterium substituert C-H binding. Den isotopiske effekten tjener til å redusere dannelsen av demetylte metabolitter og forandrer derved de farmakokinetiske parametrene til legemidlet. Reduserte hastigheter for oksidasjon, metabolisme og klaring resulterer i større og mer vedvarende biologisk aktivitet. Deuterering blir målrettet til forskjellige seter av cyclosporinmolekylet for å øke potensen til legemidlet,

30

redusere toksisiteten til legemidlet, redusere klaringen av den farmakologisk aktive delen og forbedre stabiliteten til molekylet.

5 Stabile isotoper (f. eks. deuterium, ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O) er ikke-radioaktive isotoper som inneholder et ytterligere neutron i forhold til den vanlig forekommende isotopen av det respektive atomet. Deutererte forbindelser er blitt anvendt i farmakologisk forskning for å undersøke *in vivo* metabolsk skjebne for forbindelser ved evaluering av virkningsmekanisme og metabolsk vei for den ikke-deutererte morforbindelsen. (Blake et al., J. Pharm. Sci. 64, 3, 367-391, 1975). Slike metabolske studier er viktige for design av trygge, effektive terapeutiske legemidler, enten fordi den *in vivo* aktive forbindelse administrert til pasienten eller fordi metabolittene produsert fra mormolekylet viser seg å være toksisk eller karsinogen (Foster et al., Advances in Drug Research vol. 14, s. 2-36, Academic Press, London, 1985).

15 Inkorporering av et tungatom, særlig substitusjon av deuterium for hydrogen, kan gi opphav til en isotopeffekt som kan forandre farmakokinetikken til legemidlet. Denne effekten er vanligvis ikke-signifikant hvis merket plasseres på en metabolsk inert posisjon av molekylet.

20 Stabil isotopmerking av et legemiddel kan forandre dets fysiokjemiske egenskaper slik som pKa og fettløselighet. Disse forandringene kan influere på skjebnen til legemidlet i forskjellige trinn på dets vei gjennom kroppen. Absorpsjon, fordeling, metabolisme eller ekskresjon kan forandres. Absorpsjon og fordeling er prosesser som avhenger primært av molekylstørrelsen og lipofilisiteten av substansen. Disse effektene og forandringene kan påvirke den farmakodynamiske responsen til legemiddelmolekylet hvis den isotopiske substitusjonen påvirker en region involvert i en ligand-reseptor interaksjon.

Legemiddelmetabolisme kan gi opphav til en sterk isotopisk effekt hvis brytning av en kjemisk binding til et deuteriumatom er det hastighetsbegrensende trinnet i prosessen.

30 Mens noen av de fysiske egenskapene til et stabilt isotopmerket molekyl er forskjellig fra de til det umerkede molekylet, er de kjemiske og biologiske egenskapene de samme, med et viktig unntak: På grunn av den økede massen til den tunge isotopen, vil eventuelle bindinger som omfatter den tunge isotopen og et annet atom være sterkere enn den samme bindingen mellom den lette isotopen og atomet. I en eventuell reaksjon hvori brytningen av denne bindingen er det hastighetsbegrensende trinnet vil reaksjonen foregå langsommere for molekylet med den tunge isotopen på grunn av "kinetisk isotopeffekt". En reaksjon som omfatter brytning av en C-D binding kan være opp til

700 prosent langsommere enn en tilsvarende reaksjon som omfatter brytning av en C-H binding. Hvis C-D bindingen ikke er omfattet av noen av trinnene som fører til metabolitten, kan det ikke være noen effekt å forandre oppførselen til legemidlet. Hvis et deuterium plasseres på et sete som omfattes i metabolismen av et legemiddel, vil en isotopeffekt observeres bare hvis brytningen av C-D bindingen er det

5 hastighetsbegrensende trinnet. Det er opplagt å anta at når spaltingen av en alifatisk C-H binding finner sted, vanligvis ved oksidasjon katalysert av en oksidase med flere funksjoner, vil erstatning av hydrogen med deuterium føre til observerbar isotopeffekt. Det er også viktig å forstå at inkorporeringen av deuterium på metabolismesetet

10 reduserer hastigheten til punktet hvor en annen metabolitt, produsert ved angrep på et karbonatom som ikke er substituert med deuterium, blir hovedveien en såkalt "metabolsk svitsjing". Det er også observert at en av de viktigste metabolske veiene til forbindelser som inneholder aromatiske systemer er hydroksylering som fører til en fenolisk gruppe i 3- eller 4-posisjon til karbonsubstituentene. Selv om denne veien

15 omfatter brytning av C-H bindingen, blir den ofte ikke ledsaget av en isotopeffekt på grunn av at brytningen av denne bindingen vanligvis ikke er involvert i det hastighetsbegrensende trinnet. Substitueringen av hydrogen med deuterium ved stereosenteret vil indusere en større effekt på aktiviteten av legemidlet.

20 Utgangsstoffene for fremstilling av forbindelsene ifølge oppfinnelsen er cyklosporin A. Fremgangsmåten for fremstilling av forbindelsen ifølge oppfinnelsen er illustrert som vist i Skjema I i Figur 3. Det vil gå klart frem for fagfolk ved studie av synteseveien angitt nedenfor at andre forbindelser med formel I kan syntetiseres ved substitusjon av passende reaktanter og stoffer i syntesen vist nedenfor.

25 Det første trinnet i fremgangsmåten for fremstilling av deutererte cyklosporinanaloger er fremstillingen av nøkkelintermediatene 3 og 6. Dette kan oppnås ved oksideringen av dobbelbindingen i aminosyren 1. Behandling av cyklosporin med eddiksyreanhydrid og overskudd dimetylaminopyridin gir det hydroksylbeskyttede acetylcyklosporinet 2. Selv om brytningen av dobbelbindingen deretter kan utføres ved behandling av 2 med ozon,

30 eller $\text{KMnO}_4/\text{NaIO}_4$, ble det funnet at $\text{OsO}_4/\text{NaIO}_4$ var reagenset som ble valgt for omdannelsen til aldehydproduktet 3. Denne reaksjonen ble generelt funnet å være klarere, som produserte det ønskede materialet og foregikk i høyt utbytte. Ulempen ved denne reaksjonen er at OsO_4 er kostbart og svært toksisk, slik at anvendelsen er

35 begrenset. Men resultatene kan oppnås mer økonomisk ved anvendelse av H_2O_2 med OsO_4 til stede i katalytiske mengder. t-butylhydroksid i alkalisk løsning og N-metylmorfolin-N-oksid kan komme istedenfor H_2O i denne fremgangsmåten.

Aldehydforbindelsen **3** ble videre behandlet med forskjellige deutererte alkyl- eller aryl-trifenylfosfoniumderivater (Wittig-reagens) og hydrolyse med alkalisk løsning ga de endelige derivatene (**5 a-h**). Vi utviklet også en generell fremgangsmåte for å oppnå forskjellige forbindelser som vist i Skjema II i Figur 4.

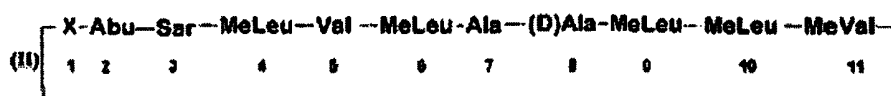
5

I denne tilnærmingen ble aldehydderivatet **3** behandlet med Wittig-reagens fremstilt ved anvendelse av standard fremgangsmåte. Produktet som resultat av mild sur hydrolyse ga nøkkelintermediataldehydproduktet **6**. Dette ble videre behandlet med andre deutererte alkyl- eller aryl-trifenylfosfoniumhalidreagenser og ved mild sur hydrolyse ga det de ønskede produktene. Denne fremgangsmåten tilveiebringer kontroll over omfanget av diensystemet. Ved anvendelse av denne tilnærmingen kan olefindobbelbindinger introduseres trinn for trinn.

En tredje tilnærming for å fremstille deutererte forbindelser **5a-h** er ved å varme opp ikke-deutererte cyklosporinanaloger som beskrevet tidligere, i et deuterert løsemiddel slik som deuterert vann, deuterert eddiksyre under nærvær av sur eller basisk katalysator.

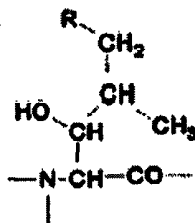
Foretrukne cyklosporiner ifølge oppfinnelsen er de hvori begge inneholder et deuterium og en kjemisk substitusjon på aminosyre 1 slik som de med formel II:

20



hvor X er

25



og R= --CHO, -CDO, -CH=CD-CD₃, -CD=CD-CD₃, -CH=CH-CH=CD-CD₃,

-CD=CH-CD=CD.CD₃, -CH=CH-CH=CD₂, -CD=CH-CD=CD₂, -CH=CD₂, -CH=CH₂

30 og -CD=CD₂.

Eksempler:**Eksempel 1**

5

Til en rørt løsning av cyklosporin 1 (1,01 g, 0,84 mmol) i eddiksyreanhydrid (20 ml) ble det ved romtemperatur tilsatt DMAP (150 mg, 1,23 mmol, 1,5 ekv.). Etter røring over natten, ble reaksjonsblandingen fordelt mellom EtOAc (50 ml) og vann (25 ml). Det separerte EtOAc-sjiktet ble deretter vasket med vann (50 ml) og saltvann (50 ml), tørket (MgSO₄) og løsemidlet fjernet i vakuum som ga det urene produktet som et glassaktig fast stoff. Rensning med flash-kromatografi gjennom en kort kolonne med silika (2% MeOH/DCM) og lyofilisasjon fra benzen ga 2 (1,044 g, 0,84 mmol, kvantitativt) som et fluffy, farveløst fast stoff; $[\alpha]_D^{25}$ -305,7 (c. 0,3, CHCl₃); ν_{\max} (CHCl₃ kast)/cm⁻¹ 3328m, 2963m, 1746m, 1627s, 1528m, 1472m, 1233m; δ_H (600 MHz, C₆D₆) 8,73 (1H, d, J=9,5 Hz, NH), 8,30 (1H, d, J=7,0 Hz, NH), 7,92 (1H, d, J=7,5 Hz, NH), 7,49 (1H, d, J=7,5 Hz, NH), 6,05 (1H, d, J=11,5 Hz) 5,88 (1H, dd, J=3,5, 11,5 Hz), 5,82 (1H, d, J=11,5 Hz), 5,65 (1H, dd, J=4,0, 12,0 Hz), 5,60 (1H, dd, J=3,5 Hz, 12,5 Hz), 5,63-5,57 (1H, m), 5,51-5,45 (1H, m), 5,37 (1H, dd, J=5,5, 8,5 Hz), 5,05-5,01 (2H, kompleks), 4,99 (1H, d, J=11,0 Hz), 4,76 (1H, p, J=7,0 Hz), 4,58 (1H, p, J=7,0 Hz), 4,02 (1H, d, J=13,5 Hz), 3,47 (3H, s), 3,30 (3H, s), 3,17 (3H, s), 3,11 (3H, s), 2,98 (3H, s), 2,68-2,62 (1H, m), 2,63 (3H, s), 2,51-2,39 (2H, kompleks), 2,34-2,25 (8H, kompleks), 2,03 (3H, s), 1,97-1,85 (2H, kompleks), 1,83 (3H, dd, J=1,0, 6,5 Hz), 1,82-1,77 (2H, kompleks), 1,68-1,61 (3H, kompleks), 1,55 (3H, d, J=7,0 Hz), 1,55-1,51 (1H, m), 1,44-1,38 (1H, m), 1,32-1,20 (5H, kompleks), 1,29 (3H, d, J=7,0 Hz), 1,21 (3H, d, J=6,5 Hz), 1,17 (3H, d, J=6,5 Hz), 1,14 (3H, d, J=6,5 Hz), 1,08 (3H, d, J=6,5 Hz), 1,04 (3H, d, J=6,0 Hz), 1,03 (3H, d, J=7,0 Hz), 1,00 (3H, d, J=7,0 Hz), 0,93 (3H, d, J=6,0 Hz), 0,92 (3H, d, J=6,5 Hz), 0,88-0,84 (9H, kompleks), 0,76 (3H, d, J=6,5 Hz), 0,57 (3H, d, J=6,5 Hz); δ_C (75 MHz, C₆D₆) 173,6, 173,2, 172,8, 172,6, 171,3, 171,1, 170,71, 170,67, 170,4, 170,2, 169,8, 167,9 (C=O), 129,0, 126,2 (C=C), 73,1 (COAc), 58,1, 57,1, 56,0, 55,0, 54,6, 54,2, 50,3, 49,9, 48,6, 48,1, 47,8, 44,5, 40,8, 39,1, 35,7, 33,6, 32,9, 32,1, 31,5, 31,2, 30,0, 29,7, 29,5, 29,3, 24,9, 24,6, 24,4, 24,0, 23,6, 23,4, 23,3, 21,7, 21,1, 21,0, 20,6, 20,3, 19,5, 18,5, 18,0, 17,7, 17,5, 17,4, 14,9, 9,7; m/z (elektrospray)

35

Eksempel 2

Til en løsning av forbindelse 2 (289 mg, 0,23 mmol) i en 1:1 blanding av dioksan og vann (5 ml) ble det først tilsatt natrium-metaperiodat (100 mg, 0,47 mmol, 2 ekv.) og

deretter en løsning av osmiumtetraoksid (5 ml; 0,5 g OsO₄ i 250 ml løsemiddel). To-fase opparbeiding, rensning ved flash-kolonnekromatografi (40% aceton i petroleumeter) og lyofilisasjon fra benzen ga forbindelse **3**, (226 mg, 0,18 mmol, 80%) som et fluffy, farveløst fast stoff; $[\alpha]_D^{25}$ -260,0 (c. 0,1, CHCl₃); ν_{\max} (CHCl₃ kast)/cm⁻¹

5 3325m, 2962m, 1748w, 1724w, 1677m, 1626s, 1228m, 755m; δ_H (300 MHz, C₆D₆) 8,63 (1H, d, J=9,5 Hz, NH), 8,16 (1H, d, J=7,0 Hz, NH), 7,95 (1H, d, J=7,5 Hz, NH), 7,48 (1H, d, J=9,0 Hz, NH), 5,93 (1H, d, J=7,5 Hz), 5,84 (1H, dd, J=4,0, 11,5 Hz), 5,70 (1H, d, J=11,5 Hz), 5,56-5,54 (1H, m), 5,32 (1H, dd, J=5,5, 8,0 Hz), 5,07-4,88 (3H, kompleks), 4,72 (1H, p, J=7,0 Hz), 4,49 (1H, p, J=7,0 Hz), 3,98 (1H, d, J=14,0 Hz),

10 3,42 (3H, s, CH₃N), 3,27 (3H, s, CH₃N), 3,12 (3H, s, CH₃N), 3,07 (3H, s, CH₃N), 2,91 (3H, s, CH₃N), 2,79 (3H, s, CH₃N), 2,59 (3H, s, CH₃N), 2,42-2,08 (10H, kompleks), 1,94 (3H, s, CH₃N), 1,47 (3H, d, J=7,0 Hz), 1,24 (3H, 7,0 Hz), 1,14-1,09 (9H, kompleks), 1,04 (3H, d, J=6,5 Hz), 1,01 (3H, d, j=7,0 Hz), 0,96 (3H, d, J=6,5 Hz), 0,92 (3H, d, J=6,5 Hz), 0,91 (3H, d, J=6,5 Hz), 0,89 (3H, d, J=6,0 Hz), 0,83 (6H, d, J=6,5

15 Hz), 0,74 (3H, d, J=6,5 Hz), 0,59 (3H, d, J=6,5 Hz); δ_C (75 MHz, C₆D₆) 202,5 (CHO), 174,4, 174,0, 173,7, 172,8, 171,6, 171,5, 171,2, 171,1, 170,6, 170,2, 170,2, 168,1, 73,0, 58,7, 57,6, 56,7, 55,5, 55,0, 54,5, 49,4, 48,9, 48,5, 48,1, 45,0, 44,6, 41,3, 39,8, 38,8, 37,7, 36,2, 32,5, 32,0, 31,6, 30,9, 30,3, 30,0, 29,8, 29,6, 25,6, 25,3, 25,0, 24,8, 24,5, 24,0, 23,8, 23,4, 22,0, 21,7, 21,2, 20,5, 20,0, 19,8, 18,8, 18,5, 18,2, 17,4, 15,2, 10,0; m/z

20 (elektrospray) 1232,8 (MH⁺, 100%).

Eksempel 3

Fremgangsmåte A: Til en løsning av forbindelse **3** (315 mg, 0,26 mmol) i THF (5 ml) ble det ved 0°C tilsatt en løsning av deuterio-fosforylidet (2,67 mmol, ~10 ekv.), fremstilt fra *d*₅-etyltrifenylfosfoniumjodid. Etter opparbeiding, rensning ved flash-kolonnekromatografi (30% til 60% aceton i PE) og HPLC (60% til 65% MeCN i vann) og deretter lyofilisasjon fra benzen ga dette forbindelse **4** (153 mg, 0,12 mmol, 47%) som et fluffy, farveløst fast stoff.

30

Fremgangsmåte B: Til en rørt løsning av forbindelse **3** (287 mg, 0,23 mmol) i THF (5 ml) ble det under Ar ved -78°C forsiktig tilsatt en løsning av fosforylid (dannet ved tilsetning av natriumheksametyldisilylamid (1,0 M, 2,25 ml, 2,25 mmol, ~10 ekv.) til en suspensjon av *d*₅-etyltrifenylfosfoniumjodid (480 mg, 1,13 mmol, ~5 ekv.) i THF (10 ml) under Ar ved romtemperatur). Etter røring i 2 timer med gradvis oppvarming til romtemperatur, ble reaksjonsblandingen avkjølt til 0°C og stoppet ved tilsetning av 10% AcOH/THF (10 ml). Reaksjonsblandingen ble konsentrert i vakuum og fordelt mellom

35

vann (20 ml) og EtOAc (20 ml). Det vandige sjiktet ble ytterligere ekstrahert med EtOAc (20 ml) og de kombinerte organiske ekstraktene ble vasket med 1N HCl (20 ml) og vann (20 ml), tørket (MgSO₄) og løsemidlet fjernet i vakuum, som ga det urene produktet. Rensning med flash-kolonnekromatografi (40% aceton i petroleumer) og lyofilisasjon fra benzen ga forbindelse 4d (84 mg, 67 µmol, 29%) som et fluffy.

5 farveløst fast stoff; $[\alpha]_D^{25}$ -283,0 (c. 0,1, CHCl₃); ν_{\max} (CHCl₃ kast)/cm⁻¹ 3320m, 3010m, 2959s, 2924s, 2871m, 2853m, 1743m, 1626s, 756s; δ_H (600 MHz, C₆D₆) 8,78 (1H, d, J=9,5 Hz), 8,33 (1H, d, J=7,0 Hz), 7,99 (1H, d, J=7,5 Hz), 7,59 (1H, d, J=9,0 Hz), 6,09 (1H, d, J=11,5 Hz), 5,92 (1H, dd, J=4,0, 11,0 Hz), 5,86 (1H, d, J=11,5 Hz),

10 5,72-5,64 (2H, kompleks), 5,62 (1H, dd, J=3,5, 12,5 Hz), 5,40 (1H, dd, J=5,5, 8,5 Hz), 5,10-5,02 (3H, kompleks), 4,80 (1H, q, J=7,0 Hz) 4,60 (1H, q, J=7,0 Hz) 4,05 (1H, d, J=14,0 Hz), 3,51 (3H, s), 3,31 (3H, s), 3,20 (3H, s), 3,13 (3H, s), 3,01 (3H, s), 2,87 (3H, s), 2,64 (3H, s), 2,45 (1H, dt, J=4,0, 12,5 Hz), 2,36-2,20 (10H, kompleks), 2,06 (3H, s), 1,93-1,79 (3H, kompleks); δ_D (84 MHz, C₆H₆)

15 δ_C (125 MHz, C₆D₆) 174,5, 173,7, 173,6, 173,1, 171,7, 171,4, 170,9, 170,7, 170,6, 170,3, 170,0, 168,4, 130,2 (C=C), 123,8 (C=C), 73,8 (MeBmt C-3), 58,7, 58,1, 57,6, 57,1, 55,5, 55,0, 54,5, 49,4, 49,0, 48,6, 48,2, 45,0, 41,4, 39,9, 39,0, 37,8, 34,2, 33,9, 32,6, 32,3, 32,0, 31,4, 30,9, 30,8, 30,2, 30,1, 30,0, 29,9, 29,8, 29,6, 28,5, 25,6, 25,3, 25,0, 24,9, 24,8, 24,1, 23,9, 23,8, 23,6, 23,1, 22,1, 21,7, 21,4, 20,7, 20,0, 19,9, 19,8,

20 18,9, 18,7, 18,6, 18,3, 17,4, 15,3, 14,3, 10,2; m/z (elektrospray) 1270 ([M+Na]⁺, 100%), 1286 ([M+K]⁺, 20).

Eksempel 4

25 Til en rørt løsning av 4d (84 mg, 67 µmol) i MeOH (5 ml) og vann (2,5 ml) ble det ved romtemperatur tilsatt kaliumkarbonat (99 mg, 0,72 mmol, ~10 ekv.). Etter røring over natten, ble MeOH fjernet i vakuum og det vandige residuet fordelt mellom EtOAc (10 ml) og 5% citronsyløseløsning (10 ml). EtOAc-sjiktet ble deretter vasket med vann (10 ml) og saltvann (10 ml), tørket (MgSO₄) og løsemidlet ble fjernet i vakuum som ga det urene produktet. HPLC-rensnings (60% til 65% MeCN i vann) og lyofilisasjon fra

30 benzen ga forbindelse 5d (59 mg, 49 µmol, 70%) som et fluffy, farveløst fast stoff; $[\alpha]_D^{25}$ -262,0 (c. 0,05, CHCl₃); ν_{\max} (CHCl₃ kast)/cm⁻¹ 3318m, 3008m, 2960s, 2872m, 1627s, 1519m, 1470m, 1411m, 1295m, 1095m, 754m; δ_H (600 MHz, C₆H₆) 8,27 (1H, d, J=9,5 Hz), 7,96 (1H, d, J=7,5 Hz), 7,63 (1H, d, J=8,0 Hz), 7,45 (1H, d, J=9,0 Hz)

35 5,87 (1H, dd, J=3,5, 11,0 Hz), 5,74 (1H, d, J=7,5 Hz), 5,73-5,69 (1H, m), 5,66-5,64 (1H, br, d, J=11,0 Hz), 5,79 (1H, dd, J=4,0, 11,5 Hz), 3,39 (1H, dd, J=5,5, 10,5 Hz), 5,33 (1H, dd, J=5,5, 8,5 Hz), 5,24 (1H, d, J=11,0 Hz), 5,12 (1H, dt, J=7,5, 10,0 Hz), 4,88-

4,79 (3H, kompleks), 4,22 (1H, dd, J=5,5, 7,5 Hz), 4,00 (1H, d, J=13,5 Hz), 3,72 (3H, s), 3,22 (3H, s), 3,06 (3H, s), 2,97 (3H, s), 2,92 (3H, s), 2,85 (3H, s), 2,67-2,60 (1H, m), 2,58 (3H, s), 2,56-2,50 (1H, br, m), 2,33-2,23 (4H, kompleks), 2,20-2,07 (4H, kompleks), 1,80-1,74 (3H, kompleks), 1,67 (3H, d, J=7,0 Hz), 1,56-1,50 (2H, kompleks), 1,46-1,23 (9H, kompleks), 1,17-1,13 (16H, kompleks), 1,06 (3H, d, J=6,5 Hz), 1,02 (3H, d, J=7,0 Hz), 0,98 (3H, d, J=6,5 Hz), 0,96 (3H, d, J=7,0 Hz), 0,92-0,89 (9H, kompleks) 0,86 (3H, t, J=7,5 Hz), 0,83 (3H, d, J=6,0 Hz), 0,64 (3H, d, J=6,5 Hz); δ_D (84 MHz, C₆H₆) 1,64 (CD₃); δ_C (75 MHz, C₆H₆) 174,2, 174,1, 174,0, 173,7, 171,8, 171,4, 171,2, 170,5, 170,4, 170,3, 169,8, 130,2, 124,1, (99,2,) 74,3, (67,1,) 66,3, 66,1, 61,0, 59,5, 58,3, 57,8, 55,7, 55,5, 55,4, 49,4, 49,0, 48,4, 45,3, 41,4, 39,6, 39,0, 37,8, 36,5, 36,1, 35,8, 33,7, 31,6, 30,8, 30,4, 30,1, 29,9, 29,5, 29,4, 25,5, 25,2, 25,0, 24,9, 24,5, 24,2, 23,8, 23,7, 23,6, 22,0, 21,4, 20,0, 18,8, 18,5, 17,8, 16,0, 10,1; m/z (elektrospray) 1206 ([M+H]⁺, 30%), 1228 ([M+Na]⁺, 100), 1244 ([M+K]⁺, 25).

15 Eksempel 5

Til en kraftig rørt blanding av forbindelse **3** (49 mg, 39,8 μ mol) og deuterert d₃-allyltrifenylfosfoniumbromid (311 mg, 812 μ mol, ~20 ekv.) i benzen (3 ml) ble det ved romtemperatur tilsatt 1N NaOH (3 ml). Røringen fortsatte ved romtemperatur i 5 dager, hvorefter de to sjiktene ble separert og benzensjiktet ble vasket med vann (5 ml), tørket (MgSO₄) og løsemidlet ble fjernet i vakuum som ga det urene produktet. Rensning ved HPLC (20% til 60% MeCN i vann) og lyofilisasjon fra benzen ga forbindelse **4g** (23 mg, 18,3 μ mol, 47%) som et fluffy, farveløst fast stoff; $[\alpha]_D^{25}$ -264,2 (c. 0,24, CHCl₃); ν_{max} (CHCl₃ kast)/cm⁻¹ 3322m, 2959m, 1744m, 1626s, 1231m, 754m; δ_H (300 MHz, C₆D₆) kompleks på grunn av 1:1 forhold av geometriske isomerer 8,73 (d, J=9,5 Hz, NH), 8,72 (d, J=9,5 Hz, NH), 8,29 (d, J=6,5 Hz, NH), 8,26 (d, J=6,5 Hz, NH), 7,92 (d, J=7,5 Hz, NH), 7,86 (d, J=7,5 Hz, NH), 7,53 (d, J=9,0 Hz, NH), 7,49 (d, J=9,0 Hz, NH), 7,10-6,70 (kompleks), 6,33 (br, t, J=11,0 Hz), 6,18 (d, J=10,5 Hz), 6,12 (d, J=10,5 Hz), 6,05 (d, J=11,0 Hz), 6,03 (d, J=11,0 Hz), 5,90-5,53 (kompleks), 5,37 (dd, J=6,0, 8,0 Hz), 5,20 (d, J=12,0 Hz), 5,14 (d, J=12,0 Hz), 5,07-4,97 (kompleks), 4,80-4,70 (kompleks), 4,57 (p, J=7,0 Hz), 4,02 (d, J=14,0 Hz), 4,01 (d, J=14,0 Hz), 3,47 (s), 3,46 (s), 3,28 (s), 3,26 (s), 3,16 (s), 3,15 (s), 3,09 (s), 2,97 (s), 2,96 (s), 2,84 (s), 2,62 (s), 2,48-2,23 (kompleks), 2,05 (s), 2,03 (s), 1,95-1,59 (kompleks), 1,54 (d, J=7,0 Hz), 1,53-0,80 (kompleks), 0,77 (d, J=6,5 Hz), 0,58 (d, J=6,5 Hz), 0,57 (d, J=6,5); δ_C (75 MHz, C₆D₆) 174,5, 174,0, 173,9, 173,6, 173,5, 173,1, 171,7, 171,6, 171,4, 170,9, 170,8, 170,6, 170,3, 169,8, 169,7, 168,4, 137,9, 133,9, 133,5, 132,8, 132,3, 131,6, 130,1, 116,9, 115,0, 73,6, 58,6, 57,6, 57,0, 56,8, 55,7, 55,5, 55,0, 54,9, 54,7, 54,5, 49,4, 48,9, 48,5,

48,2, 48,1, 44,9, 41,5, 39,9, 39,0, 38,9, 37,8, 37,6, 36,6, 36,3, 34,1, 33,7, 32,7, 32,1, 32,0, 31,5, 30,9, 30,7, 30,0, 29,8, 29,6, 25,6, 25,5, 25,3, 25,2, 25,0, 24,9, 24,1, 23,9, 23,7, 23,6, 22,1, 21,7, 21,6, 21,4, 21,3, 20,7, 20,0, 19,9, 18,9, 18,6, 18,3, 17,6, 15,3, 10,2; m/z (elektrospray) 1258,8 (MH⁺, 100%).

5

Eksempel 6

Til en kraftig rørt blanding av forbindelse 3 (56 mg, 45,5 µmol) og deuterert d₄-krotyltrifenylfosfoniumbromid (360 mg, 907 µmol, ~20 ekv.) i benzen (3 ml) ble det ved romtemperatur tilsatt 1N NaOH (3 ml). Røringen ble fortsatt ved romtemperatur i 5 dager, hvorefter de to sjiktene ble separert og benzensjiktet vasket med vann (5 ml), tørket (MgSO₄) og løsemidlet fjernet i vakuum som ga det urene produktet. Rensning med HPLC (20% til 60% MeCN i vann) og lyofilisasjon fra benzen ga forbindelse 4e (23 mg, 18,1 µmol, 40%) som et fluffy, farveløst fast stoff; [α]_D²⁵ -236,0 (c. 0,25, CHCl₃);

v_{max} (CHCl₃ kast)/cm⁻¹ 3324m, 2959m, 2871m, 1745w, 1626s, 1231m; δ_H (300 MHz, C₆D₆) kompleks på grunn av nærvær av 4 isomerer 8,76 (d, J=6,0 Hz), 8,73 (d, J=6,0 Hz), 8,29 (d, J=7,0 Hz), 7,93 (d, J=7,5 Hz), 7,88 (d, J=7,5 Hz), 7,53 (d, J=9,5 Hz), 7,62-7,31 (1H, kompleks), 7,16-6,88 (2H, kompleks), 6,59-6,39 (kompleks), 6,28 (t, J=11,0 Hz), 6,15 (d, J=10,5 Hz), 6,09 (d, J=10,5 Hz), 6,05 (d, J=11,5 Hz), 6,03 (d, J=11,5 Hz), 5,90-5,82 (kompleks), 5,68-5,35 (kompleks), 5,08-4,97 (kompleks), 4,81-4,72 (kompleks), 4,63-4,53 (kompleks), 4,03 (d, J=14,0 Hz), 3,47 (s), 3,46 (s), 3,28 (s), 3,26 (s), 3,17 (s), 3,15 (s), 3,09 (s), 2,98 (s), 2,97 (s), 2,83 (s), 2,63 (s), 2,62 (s), 2,71-2,56 (kompleks), 2,47-2,23 (kompleks), 2,05 (s), 2,04 (s), 2,03 (s), 2,02 (s), 1,98-0,82 (kompleks), 0,77 (d, J=6,5 Hz), 0,58 (d, J=6,5 Hz), 0,58 (d, J=6,5 Hz); m/z (elektrospray) 1273,8 (MH⁺, 100%).

15

20

25

Eksempel 7

Til en rørt løsning av forbindelse 4g (20 mg, 15,9 µmol) i metanol (5 ml) og vann (1 ml) ble det ved romtemperatur tilsatt kaliumkarbonat (30 mg, 217 µmol). Etter røring over natten, ble reaksjonsblandingen fordelt mellom EtOAc (10 ml) og 5% vandig citronsyre (10 ml). Det vandige sjiktet ble ytterligere ekstrahert med EtOAc (5 ml) og de kombinerte organiske sjiktene ble deretter vasket med 5% citronsyre (10 ml) og saltvann (10 ml), tørket (MgSO₄) og løsemidlet fjernet i vakuum som ga det urene produktet. Rensning ved HPLC (65% MeCN) og lyofilisasjon fra benzen ga forbindelse 5g (10 mg, 8,2 µmol, 52%) som et fluffy, farveløst fast stoff; [α]_D²⁵ -285,2 (c. 0,29,

35

CHCl₃); ν_{\max} (CHCl₃ kast)/cm⁻¹ 3500-3200br, 3319m, 2958m, 2927m, 1626s, 1520m, 1468m, 754m; δ_{H} (300 MHz, C₆D₆) kompleks på grunn av nærvær av 2 isomerer 8,25 (d, J=10,0 Hz, NH), 8,13 (d, J=10,0 Hz, NH), 7,93 (d, J=7,0 Hz, NH), 7,84 (d, J=7,0 Hz, NH), 7,67 (d, J=8,0 Hz, NH), 7,61 (d, J=8,0 Hz, NH), 7,55 (d, J=8,5 Hz, NH), 7,54 (d, J=8,5 Hz, NH), 6,84 (t, J=10,5 Hz), 6,79 (t, J=10,5 Hz), 6,58 (t, J=10,5 Hz), 6,52 (t, J=10,5 Hz), 6,30-6,14 (kompleks), 5,88-5,78 (kompleks), 5,75-5,66 (kompleks), 5,44-4,74 (kompleks), 4,22-4,15 (kompleks), 3,95 (d, J=14,0 Hz), 3,93 (d, J=14,0 Hz), 3,72 (s), 3,68 (s), 3,19 (s), 3,17 (s), 3,05 (s), 3,03 (s), 2,94 (s), 2,93 (s), 2,89 (s), 2,86 (s), 2,82 (s), 2,81 (s), 2,72-2,53 (kompleks), 2,55 (s), 2,54 (s), 2,49-2,36 (kompleks), 2,32-2,03 (kompleks), 1,81-0,81 (kompleks), 0,65 (d, J=6,5 Hz), m/z (elektrospray) 1216,8 (MH⁺, 100%), 607,9 ([M+2H]²⁺, 15).

Eksempel 8

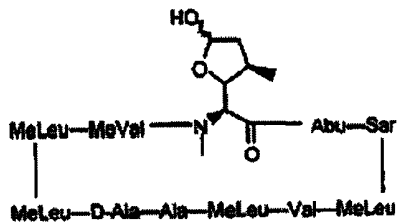
Til en rørt løsning av forbindelse **4e** (18 mg, 14,2 μ mol) i metanol (5 ml) og vann (1 ml) ble det ved romtemperatur tilsatt kaliumkarbonat (35 mg, 254 μ mol). Etter røring over natten, ble reaksjonsblandingen fordelt mellom EtOAc (10 ml) og 5% vandig citronsyre (10 ml). Det vandige sjiktet ble ytterligere ekstrahert med EtOAc (5 ml), de kombinerte organiske sjiktene ble deretter vasket med 5% citronsyre (10 ml) og saltvann (10 ml), tørket (MgSO₄) og løsemidlet fjernet i vakuum som ga det urene produktet. Rensning med HPLC (65% MeCN) og lyofilisasjon fra benzen ga forbindelse **5e** (10 mg, 8,1 μ mol, 57%) som et fluffy, fargeløst fast stoff; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -285,5 (c. 0,11, CHCl₃); δ_{H} (300 MHz, C₆D₆) kompleks på grunn av tilstedeværelsen av 4 isomerer 8,31 (d, J=9,5 Hz), 8,28 (d, J=9,5 Hz), 8,16 (d, J=9,5 Hz), 8,14 (d, J=9,5 Hz), 7,96 (d, J=7,5 Hz), 7,95 (d, J=7,5 Hz), 7,86 (d, J=7,5 Hz), 7,85 (d, J=7,5 Hz), 7,63 (d, J=7,5 Hz), 7,59 (d, J=7,5 Hz), 7,50-7,44 (kompleks), 6,60-6,49 (kompleks), 6,32-6,11 (kompleks), 5,88-5,83 (kompleks), 5,76-5,71 (kompleks), 5,64-5,22 (kompleks), 5,17-5,08 (kompleks), 4,91-4,77 (kompleks), 4,26-4,18 (kompleks), 3,99 (d, J=14,0 Hz), 3,97 (d, J=14,0 Hz), 3,74 (s), 3,73 (s), 3,71 (s), 3,69 (s), 3,22 (s), 3,21 (s), 3,20 (s), 3,19 (s), 3,07 (s), 3,06 (s), 3,05 (s), 2,97 (s), 2,96 (s), 2,95 (s), 2,92 (s), 2,91 (s), 2,89 (s), 2,84 (s), 2,83 (s), 2,69-2,07 (kompleks), 2,58 (s), 2,57 (s), 1,84-0,81 (kompleks), 0,64 (d, J=6,5 Hz); m/z (elektrospray) 1269,8 ([M+K]⁺, 5%), 1253,8 ([M+Na]⁺, 30), 1231,8 (MH⁺)

Eksempel 9

35

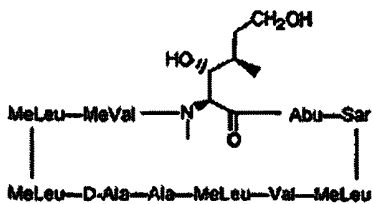
Den immunosuppressive aktiviteten ble testet for deutererte cyklosporinanaloger som beskrevet nedenfor. Forbindelse **5e** og forbindelse **5g** er mere potente enn

morcyklosporinet. Kalsineurinaktiviteten ble undersøkt ved anvendelse av en modifikasjon av fremgangsmåten tidligere beskrevet av Fruman et al. (A Proc Natl Acad Sci USA, 1992). Hele blodlysater ble evaluert for deres evne til å defosforylere et ^{32}P -merket 19 aminosyre peptidsubstrat under nærvær av okadasyre, en fosfatase type 1 og 2 inhibitor. Bakgrunnsfosfatase 2C aktivitet (CsA og okadasyreresistent aktivitet) ble bestemt og subtrahert fra hver prøve, hvor undersøkelsen ble utført under nærvær og fravær av overskudd tilsatt Csa. Den gjenværende fosfataseaktiviteten ble ansett for å være kalsineurinaktivitet. Resultatene av kalsineurin-undersøkelsen er fremstilt i Figur 5. Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt \pm standardfeil av middelverdien. Resultatene er plottet som CsA-derivatkonsentrasjon i $\mu\text{g/L}$ versus prosent kalsineurininhibering. Strukturene av forbindelsene som undersøkes inkluderer:



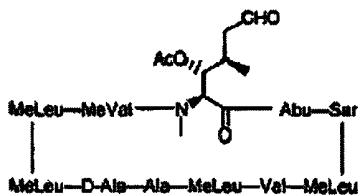
(Forbindelse 2)

15



(Forbindelse 3)

20



(Forbindelse 6)

Eksempel 10

En blandet lymfocytreaksjon (MLR) undersøkelse ble utført med cyklosporin og forbindelse 5e og 5g. Resultatene er presentert i Figur 6 og er plottet som middelverdi
5 av fire eksperimenter som viser konsentrasjon av cyklosporin eller derivat versus prosent inhibering.

MLR-undersøkelsen er anvendelig for identifisering av CsA-derivatene med biologisk (immunosuppressiv) aktivitet og å kvantifisere denne aktiviteten relativt til den
10 immunosuppressive aktiviteten til mor-CsA-molekylet.

Et eksempel på en lymfocytproliferasjon-undersøkelsesprosedyre anvendelig for dette formålet er som følger:

- 15 1. Samle opp blod fra to individer (20 ml hver) og isoler lymfocytene ved anvendelse av Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech).
2. Tell lymfocytene ved 1:10 fortynnelse i 2% eddiksyre (v/v).
- 20 3. Fremstill 10 ml av hver lymfocyttopulasjon (A + B) ved 1×10^6 celler/ml i DMEM/20% FCS (v/v).
4. Sett opp en 96 brønns steril vevskulturplate, flatbunnet (Sarstedt, kat. # 83.1835). Til hver brønn tilsett:
- 25 5. Aliquot 100 μ l per brønn lymfocyttopulasjon A
6. Aliquot 100 μ l per brønn lymfocyttopulasjon B
- 30 7. Aliquot 20 μ l per brønn av legemiddel (CSA og CSA-derivater) ved 0, 2,5, 5, 10, 25, 50 og 100 μ g/L i triplikat i DMEM uten supplement.
8. For å måle effekten av legemidlet på proliferasjon, inkuber platen i 5 dager ved 37°C i 5% CO₂-atmosfære.

9. På dag 6 fremstill 3,2 ml av 1:50 fortykning av metyl-³H-thymidin (Amersham Life Science, kat. # TRK 120) i DMEM uten supplementer. Tilsett 30 µl per brønn og inkuber i 18 timer ved 37°C i 5% CO₂-atmosfære.
- 5 10. På dag 7 blir celler høstet på glassmikrofiberfiltere GF/A (Whatman, kat. # 1820024) ved anvendelse av en Cell-Harvestor (Skatron, kat. # 11019. Vask celler 3 ganger med 1,0 ml sterilt destillert vann.

10 Bemerk: Alle fremgangsmåter gjøres ved anvendelse av sterile teknikker i en biologisk strømningshette.

11. Plasser filteret i scintillasjons-medisinglass og tilsett 1,5 ml SciniSafe Plus 50% scintillasjonsvæske (Fisher, kat. # SX-25-5).
- 15 12. Mål mengden av radioaktivitet inkorporert i lymfocytene ved anvendelse av en beta-teller (Micromedic System Inc., TAURUS Automatic Liquid Scintillation Counter) i 1,0 minutt.
- 20 13. Beregn gjennomsnitt og standard avvik for hvert legemiddel og uttrykk resultatene som:

$$\% \text{ inhibering} = \frac{[1 - \text{Gjennomsnittlig CPM av testlegemiddel}]}{\text{Gjennomsnittlig CPM av null legemiddel}} \times 100$$

25 $\% \text{ proliferasjon} = 100 - \% \text{ inhibering}$

MLR-undersøkelsen kan anvendes for å velge antistoffer for oppfinnelsen som binder biologisk aktive CSA-metabolitter og mor-CSA-molekylet. Antistoffer kan også velges ut for reaktivitet overfor biologisk inaktive metabolitter.

30 Fra resultatene av kalsineurin-undersøkelsen og den blandede lymfocytreaksjonsundersøkelsen ble det funnet at cyklosporiner som har blitt kjemisk substituert og deuterert i aminosyre 1 posisjonen kan fremvise signifikant immunosuppressiv aktivitet. I tilfelle derivatene 5e og 5g, blir det oppnådd immunosuppressiv aktivitet som er
35 signifikant større enn CsA.

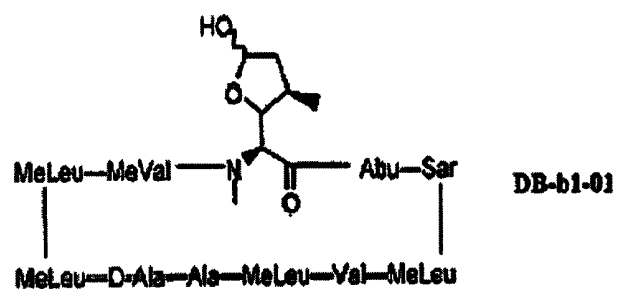
Eksempel 11

Andre cyklosporinderivater ifølge oppfinnelsen som er blitt fremstilt omfatter følgende:

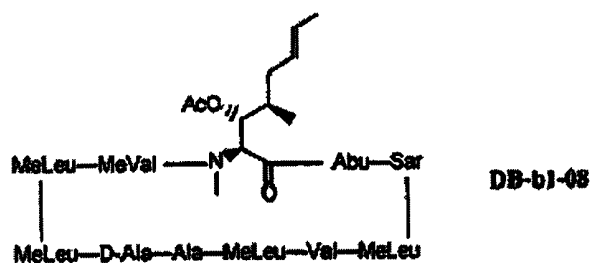
5

STRUKTUR

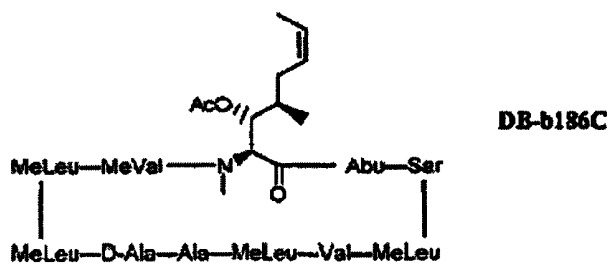
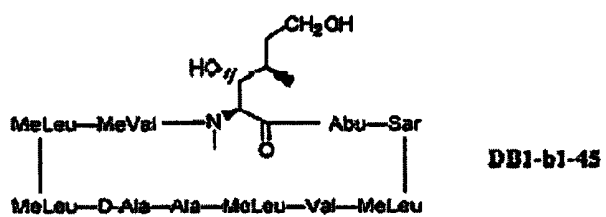
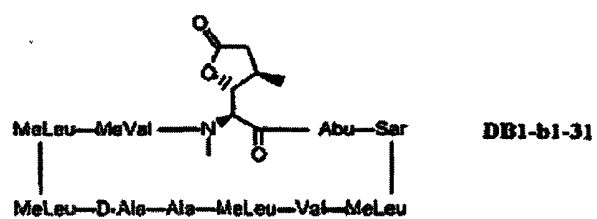
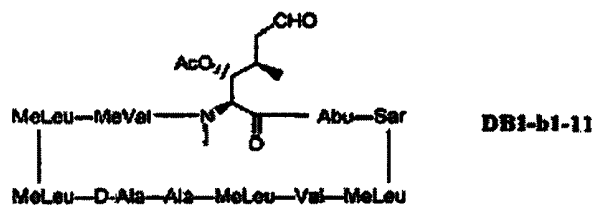
KODE #

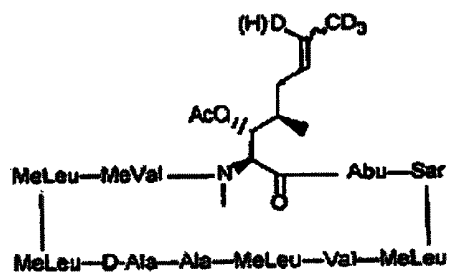


10

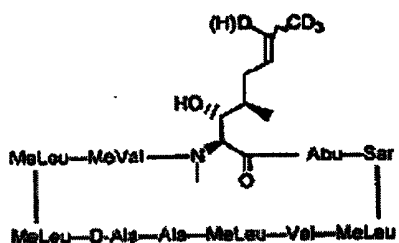


15

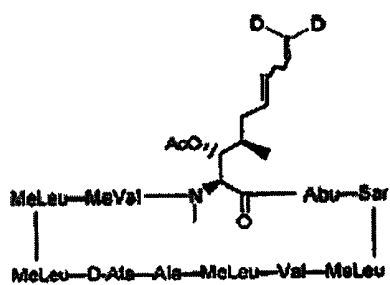




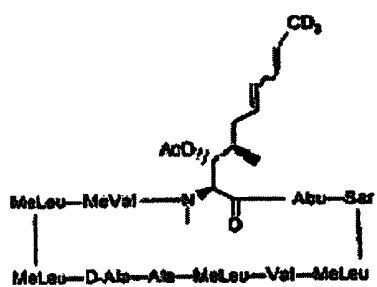
DB-b1-92b



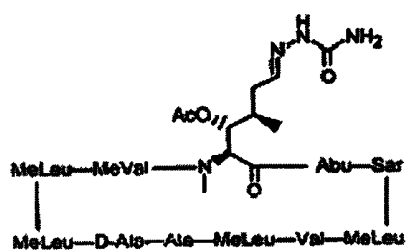
DB-b1-93C



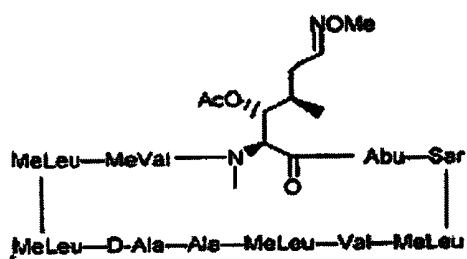
DB-b1-145D



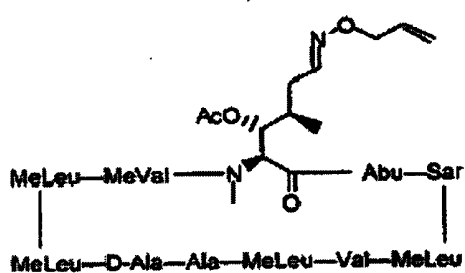
DB-b1-147D



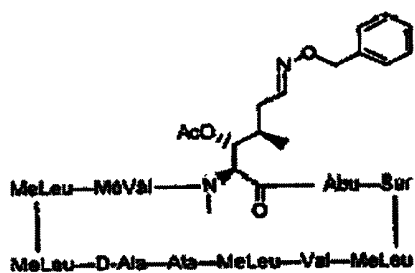
DB-b1-179



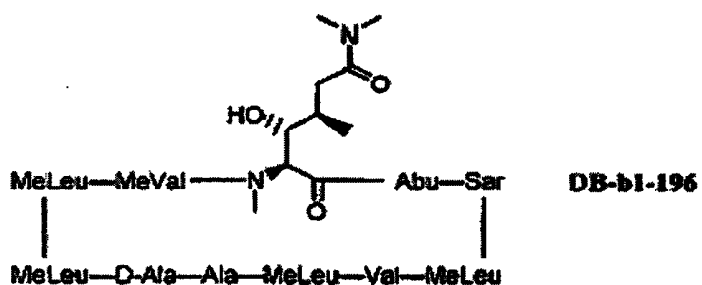
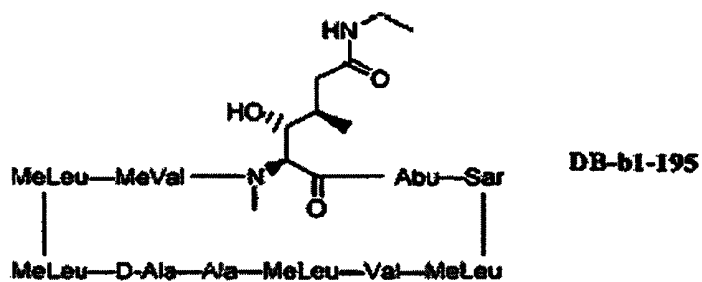
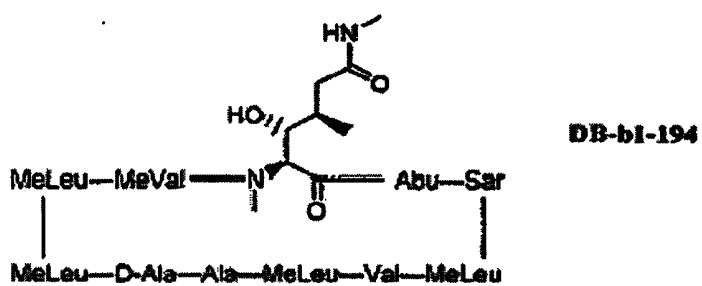
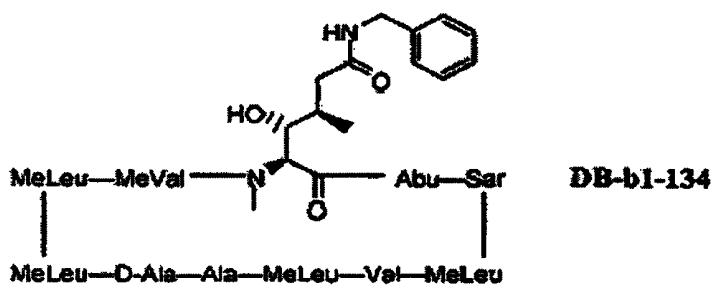
DB-b1-180

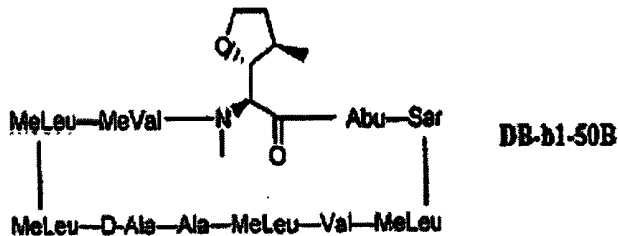


DB-b1-192



DB-b1-193





Bestemmelse av de fysiokjemiske, farmakodynamiske, toksikologiske og farmakokinetiske egenskapene til cyclosporinderivatene fremlagt kan gjøres ved
 5 anvendelse av standard kjemiske og biologiske undersøkelser og ved anvendelse av matematiske modelleringsteknikker som er kjente i den kjemiske og farmakologiske/toksikologiske litteraturen. Den terapeutiske anvendelsen og doseringsregimet kan ekstrapoleres fra resultaltene av slike teknikker og ved anvendelse av hensiktsmessige farmakokinetiske og/eller farmakodynamiske modeller.

10

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan administreres alene eller med en farmasøytisk bærer til et varmblodig dyr som trenger dem. Den farmasøytiske bæreren kan være fast eller flytende.

15 Oppfinnelsen angår også en fremgangsmåte for behandling av pasienter som lider av immunoregulatoriske abnormaliteter som omfatter administrasjon av de fremlagte cyclosporinene som den aktive bestanddelen.

For behandling av disse tilstandene og sykdommene forårsaket av immunoirregularitet
 20 kan et deuterert cyclosporin administreres oralt, topisk, parenteralt, ved inhalerings-spray eller rektalt i doseringsenhetsformuleringer som inneholder vanlige ikke-toksiske farmasøytisk akseptable bærere, adjuvanser og vehikler. Begrepet parenteralt, slik det anvendes heri, inkluderer subkutane injeksjoner, intravenøse, intramuskulære, intrasternale injeksjons- eller infusjonsteknikker.

25

De farmasøytiske sammensetningene som inneholder den aktive ingrediensen kan være i en form egnet for oral anvendelse, for eksempel som tabletter, trokéer, pastiller, vandige eller oljeaktige suspensjoner, dispergerbare pulvere eller granuler, emulsjoner, harde eller myke kapsler, eller siruper eller eliksirer. Sammensetningene ment for oral
 30 anvendelse kan fremstilles ifølge en hvilken som helst kjent fremgangsmåte i

litteraturen for fremstilling av farmasøytiske sammensetninger, og slike sammensetninger kan inneholde ett eller flere midler utvalgt fra gruppen som består av søtningemidler, smaksstoffer, farvestoffer og konserveringsstoffer for å tilveiebringe et farmasøytisk elegant og tiltalende preparat. Tabletter som inneholder den aktive ingrediensen sammenblandet med ikke-toksiske farmasøytisk akseptable eksipienter kan også fremstilles ved kjente fremgangsmåter. Eksipientene som anvendes kan for eksempel være (1) inerte fortynningsmidler slike som kalsiumkarbonat, laktose, kalsiumfosfat eller natriumfosfat; (2) granulerte eller desintegrerte midler slike som maisstivelse eller alginsyre; (3) bindemidler slike som stivelse, gelatin eller akasia, og (4) smøremidler slike som magnesiumstearat, stearinsyre eller talkum. Tablettene kan være ikke-belagte eller de kan være belagte ifølge kjente teknikker for å forsinke desintegrasjon eller absorpsjon i gastrointestinaltrakten og derved tilveiebringe en vedvarende virkning over en lengre periode. For eksempel kan et tidsforsinkingsmateriale slik som glycerolmonostearat eller glyceryldistearat anvendes. De kan også belegges ifølge teknikker beskrevet i US patent- numrene 4.256.108, 4.160.452 og 4.265.874 for å danne osmotiske terapeutiske tabletter for kontrollert frigivelse.

I noen tilfeller kan formuleringer for oral anvendelse være i form av harde gelatinkapsler hvori den aktive ingrediensen er blandet med et inert fast fortynningsmiddel, som for eksempel kalsiumkarbonat, kalsiumfosfat eller kaolin. De kan også være i form av myke gelatinkapsler hvori den aktive ingrediensen er blandet med vann eller et oljemedium, for eksempel peanøttolje, flytende parafin eller olivenolje.

Vandige suspensjoner inneholder normalt det aktive materialet blandet med eksipienter egnet for produksjon av vandige suspensjoner. Slike eksipienter kan være

(1) suspensjonsmidler slike som natriumkarboksymetylcellulose, metylcellulose, hydroksypropylmetylcellulose, natriumalginat, polyvinylpyrrolidon, gummi tragakant og gummi akasia;

(2) dispergerings- eller fuktemidler som kan være
(a) et naturlig forekommende fosfatid slik som lecitin,
(b) et kondensasjonsprodukt av et alkyleneoksid med en fettsyre, for eksempel polyoksyetylenstearat,

(c) et kondensasjonsprodukt av etylenoksid med en langkjedet alifatisk alkohol, for eksempel heptadekaetylenoksyetanol,

(d) et kondensasjonsprodukt av etylenoksid med en partiell ester avledet fra en fettsyre og en heksitol slik som polyoksyetylensorbitolmonooleat, eller

5 (e) et kondensasjonsprodukt av et etylenoksid med en partiell ester avledet fra en fettsyre og et heksitolanhydrid, for eksempel polyoksyetylensorbitanmonooleat.

De vandige suspensjonene kan også inneholde et eller flere konserveringsmidler, for eksempel etyl eller n-propyl p-hydroksybenzoat; et eller flere aromastoffer; og et eller
10 flere søtningstoffer slike som sukrose, aspartam eller sakkarin.

Oljeaktige suspensjoner kan formuleres ved suspensjon av den aktive ingrediensen i en vegetabilsk olje, for eksempel arakisolje, olivenolje, sesamolje eller kokosnøttolje, eller i en mineralisk olje slik som flytende parafin. De oljeaktige suspensjonene kan
15 inneholde et tykningsmiddel, for eksempel bivoks, hard parafin eller cetylalkohol. Søtningstoffer og aromastoffer kan tilsettes for å tilveiebringe et tiltalende oralt preparat. Disse bestanddelene kan konserveres ved tilsetning av en antioksidant slik som askorbinsyre.

20 Dispergerbare pulvere og granuler er egnet for fremstilling av en vandig suspensjon. De tilveiebringer den aktive ingrediensen sammen med et dispergerings- eller fuktemiddel, et suspensjonsmiddel og et eller flere konserveringsmidler. Egnede dispergerings- eller fuktemidler og suspensjonsmidler er for eksempel de som er nevnt ovenfor. Ytterligere eksipienter, for eksempel de søtningstoffene, aromastoffene og fargestoffene
25 som er beskrevet ovenfor, kan også være til stede.

De farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan også være i form av olje-i-vann emulsjoner. Oljefasen kan være en vegetabilsk olje slik som olivenolje eller arakisolje, eller en mineralolje slik som flytende parafin eller en blanding derav. Egnede
30 emulgeringsmidler kan være (1) naturlig forekommende gummier slik som gummi akasia og gummi tragakant, (2) naturlig forekommende fosfatider slike som soyabønne og lecitin, (3) estere eller partielle estere avledet fra fettsyrer og heksitolanhydrid, for eksempel sorbitanmonooleat, (4) kondensasjonsprodukter av nevnte partielle estere med etylenoksid, for eksempel polyoksyetylensorbitanmonooleat. Emulsjonene kan også
35 inneholde søtningstoffer og aromastoffer.

Siruper og eliksirer kan formuleres med søtningsstoffer, for eksempel glycerol, propylenglykol, sorbitol, aspartam eller sukrose. Slike formuleringer kan også inneholde et beroligende middel, et konserveringsmiddel og aroma- og fargestoffer.

- 5 De farmasøytiske sammensetningene kan være i form av en steril injiserbar vandig eller oljeaktig suspensjon. Denne suspensjonen kan formuleres ifølge kjente fremgangsmåter ved anvendelse av de egnede dispergerings- eller fuktemidlene og suspenderingsmidlene som er nevnt ovenfor. Det sterile injiserbare preparatet kan også være en steril injiserbar løsning eller suspensjon i et ikke-toksisk parenteralt
- 10 aksepterbart fortynningsmiddel eller løsemiddel, for eksempel som en løsning i 1,3-butandiol. Blant de akseptable vehiklene og løsemidlene som kan anvendes er vann, Ringers løsning og isoton natriumkloridløsning. I tillegg blir sterile, fikserte oljer vanligvis anvendt som et løsemiddel eller suspensjonsmedium. For dette formålet kan en hvilken som helst mild fiksert olje anvendes som omfatter syntetiske mono- eller
- 15 diglycerider. I tillegg kan fettsyrer slike som oleinsyre finne anvendelse ved fremstilling av injiserbare løsninger.

De fremlagte cyklosporinene kan også administreres i form av stikkpiller for rektal administrasjon av legemidlet. Disse sammensetningene kan fremstilles ved å blande

20 legemidlet med en egnet ikke-irriterende eksipient som er fast ved ordinære temperaturer, men flytende ved rektal temperatur, og vil derfor smelte i rektum og frigi legemidlet. Slike materialer er kakaosmør og polyetylglykoler.

For topisk anvendelse blir kremer, salver, geler, løsninger eller suspensjoner, etc. som

25 inneholder de fremlagte cyklosporinene anvendt.

Doseringsnivåer i størrelsesorden fra ca. 0,05 mg til ca. 50 mg per kilogram kroppsvekt per dag er anvendelige ved behandling av de ovenfor angitte tilstandene (fra ca. 2,5 mg til ca. 2,5 g per pasient per dag).

30

Mengden av aktiv ingrediens som kan kombineres med bærermaterialene for å gi en enkel doseringsform vil variere avhengig av verten som behandles og den bestemte administrasjonsmåten. For eksempel kan en formulering med en for oral administrasjon inneholde fra 2,5 mg til 2,5 g aktiv forbindelse sammen med en egnet og vanlig mengde

35 av bærer materiale som kan variere fra ca. 5 til ca. 95 prosent av den totale sammensetningen. Enhetsdoseringsformer vil vanligvis inneholde mellom fra ca. 5 mg til ca. 500 mg aktiv ingrediens.

Det vil imidlertid forstås at det bestemte dosenivået for en hvilken som helst bestemt pasient vil avhenge av et antall faktorer som omfatter aktiviteten til den spesifikke forbindelsen som anvendes, alderen, kroppsvekten, generell helse, kjønn, diett, 5 administrasjonstid, administrasjonsmåte, ekskresjonshastighet, legemiddelkombinasjon og alvorligheten av den bestemte sykdommen som skal gjennomgå terapi.

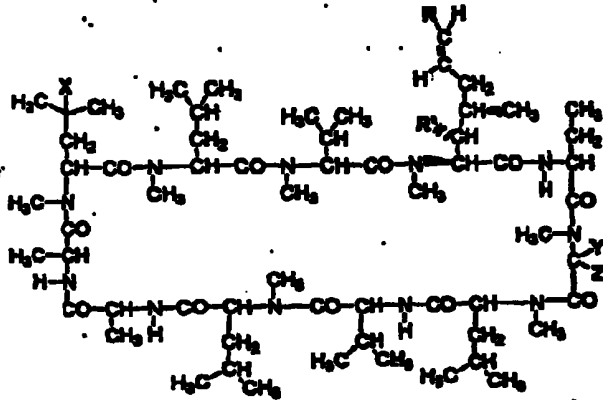
Alle referanser listet heri er omfattet med referanse. I tilfelle konflikt, er søknadsteksten den kontrollerende. Modifikasjoner og forandringer av de fremlagte forbindelsene og 10 fremgangsmåtene vil klart fremgå for fagfolk. Slike modifikasjoner og forandringer er ment å være omfattet ved denne fremleggelsen og de vedlagte kravene

P a t e n t k r a v

1.

Cyklosporin A derivat, k a r a k t e r i s e r t v e d f o r m e l:

5



hvor

X, Y og Z er uafhængig hydrogen eller deuterium;

- 10 R er en mettet eller umettet, rett eller forgrenet alifatisk karbonkæde hvor 2 eller 3 karbonatomer indeholder et eller flere deuteriumatomer i stedet for hydrogen; eller, når $X=Y=Z=H$, kan R også være valgt fra $-CH=CH-CH-CD-CD_3$, $-CD=CH-CD=CD-CD_3$, $-CH=CH-CH=CD_2$, $-CD-CH-CD=CD_2$, $-CH=CH-CH=CH-CH_3$ og $-CH=CH-CH=CH_2$;

og

- 15 R' er en OH eller acetoksygruppe;
eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

2.

Cyklosporinderivat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

- 20 R er en mettet eller umettet, rett eller forgrenet alifatisk karbonkæde hvor 2 eller 3 karbonatomer indeholder et eller flere deuteriumatomer i stedet for hydrogen.

3.

Cyklosporinderivat ifølge krav 1 eller krav 2, k a r a k t e r i s e r t

- 25 v e d a t $X=Y=Z=H$.

4.

Cyklosporinderivat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
 X=Y=Z=H, og R er valgt fra: -CH=CD-CD₃, -CD=CD-CD₃, -CH=CH-CH=CD-CD₃,
 -CD=CH-CD=CD=CD₃, -CH=CH-CH=CD₂; -CD=CH-CD=CD₂, -CH=CD₂, -CD=CD₂,
 5 -CH=CH₂, -CH=CD-CD₃, -CH=CH-CH₃, -CH=CH-CH=CH-CH₃ og
 -CH=CH-CH=CH₂.

5.

Cyklosporinderivat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
 10 X=Y=Z=H, R er -CH=CH₂ og R' er -OH.

6.

Cyklosporinderivat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
 15 X=Y=Z=H, R er -CH=CH-CH₂ og R' er -OH.

7.

Cyklosporinderivat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
 X=Y=Z=H, R er -CD=CD₂ og R' er -OH.

20 8.

Cyklosporinderivat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
 X=Y=Z=H, R er -CH=CH-CD₃ og R' er -OH.

9.

25 Cyklosporinderivat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
 X=Y=Z=H, R er -CH=CD₂ og R' er -OH.

10.

30 Cyklosporinderivat ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, eller et farmasøytisk
 akseptabelt salt derav, k a r a k t e r i s e r t v e d a t det
 anvendes som et medikament.

11.

35 Cyklosporinderivat ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, eller et farmasøytisk
 akseptabelt salt derav, k a r a k t e r i s e r t v e d a t det
 anvendes for å tilveiebringe immunosuppresjon hos et subjekt.

12.

Cyklosporinderivat ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes for å hindre eller lindre autoimmun sykdom hos et subjekt.

5

13.

Anvendelse av cyklosporinderivatet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for fremstilling av et medikament for å tilveiebringe immunosuppresjon hos et subjekt.

10

14.

Anvendelse av cyklosporinderivatet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for fremstilling av et medikament for å hindre eller lindre immunosykdom hos et subjekt.

15

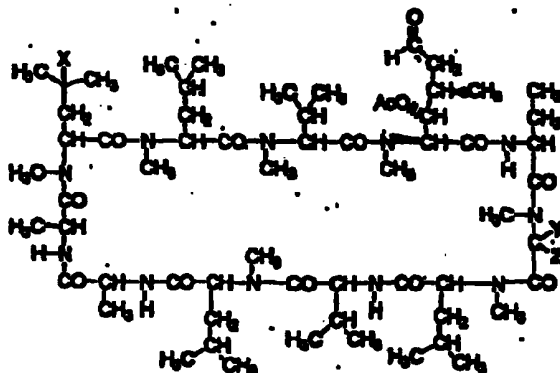
15.

Farmasøytisk sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den innbefatter cyklosporinderivatet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, og en farmasøytisk akseptabel bærer.

20

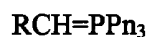
16.

Fremgangsmåte for fremstilling av en forbindelse ifølge krav 1, hvori R' er en -OH-gruppe, k a r a k t e r i s e r t v e d at den innbefatter kondensering av et aldehyd med formel (2):



25

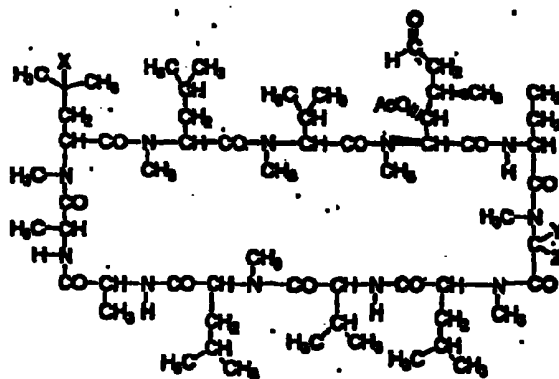
hvori X, Y og Z er som definert i krav 1, med et Wittig-reagens med formel (3):



hvori R er som definert i krav 1, fulgt av hydrolyse i en alkalisk løsning.

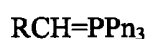
5 17.

Fremgangsmåte for fremstilling av en forbindelse ifølge krav 1, hvori R' er en acetoksygruppe, karakterisert ved at den innbefatter kondensering av et aldehyd med formel (2):



10

hvori X, Y og Z er som definert i krav 1, med et Wittig-reagens med formel (3):



15 hvori R er som definert i krav 1.

18.

Fremgangsmåte ifølge krav 16 eller krav 17, karakterisert ved at forbindelsen som skal og gruppene X, Y, Z og R er som definert i et hvilket

20 som helst av kravene 2 til 9.

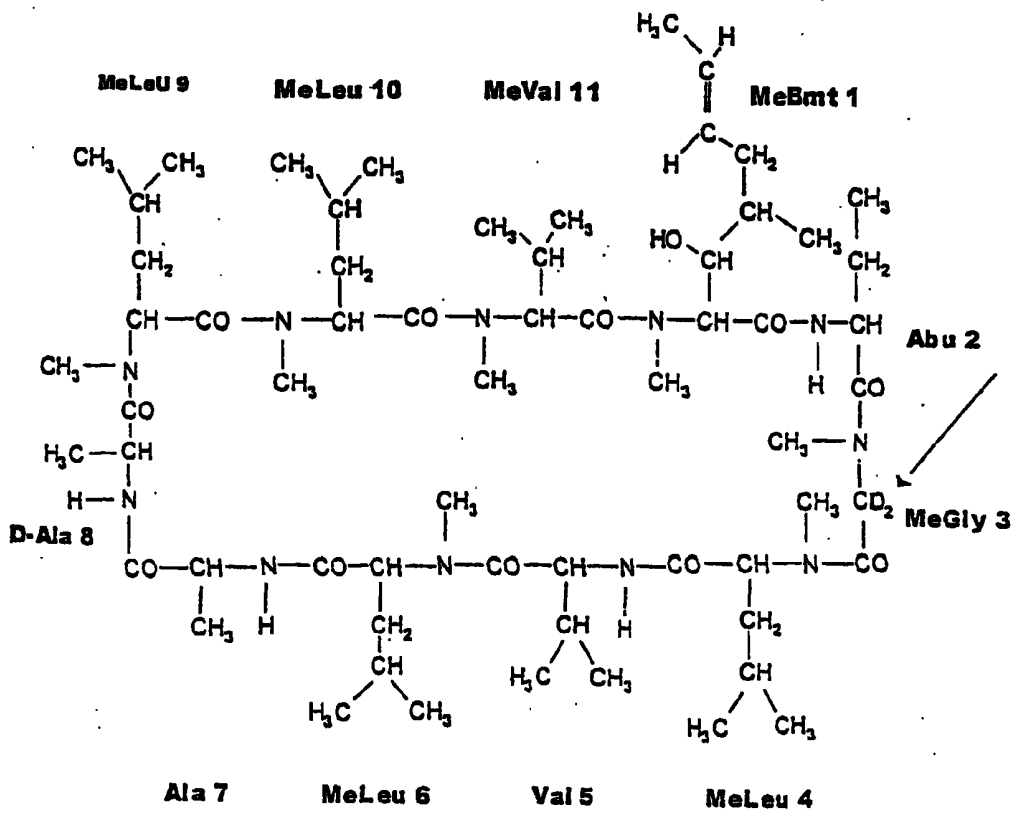


Fig. 1

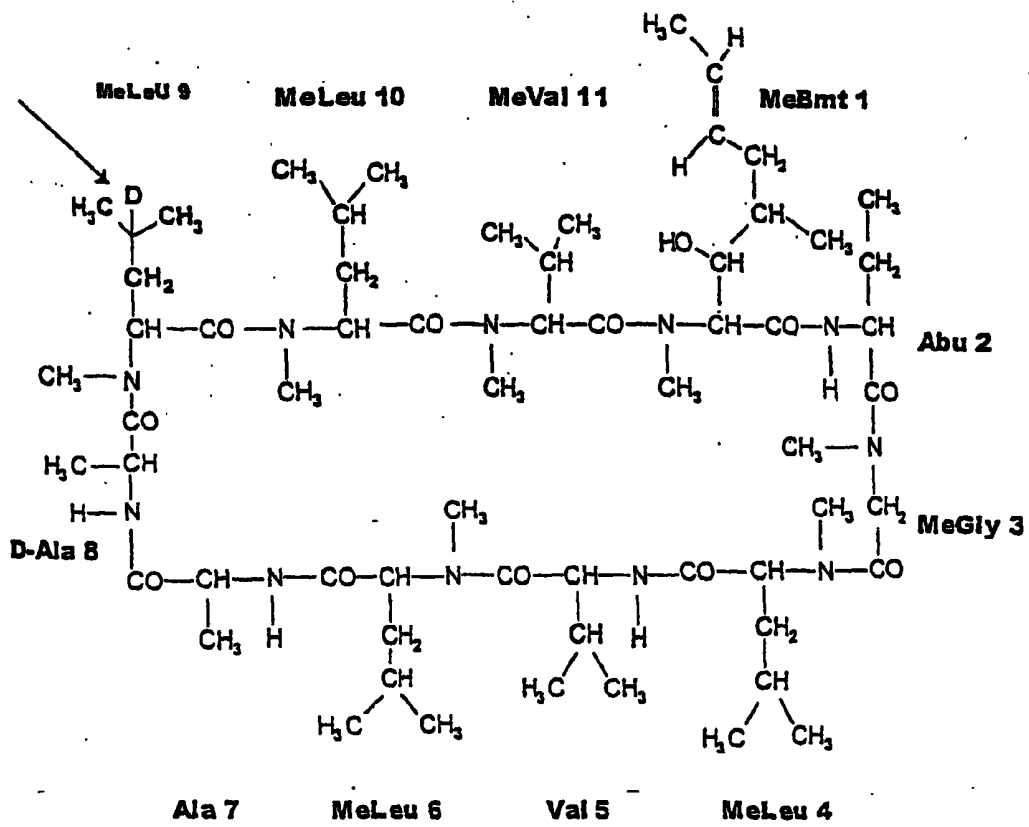


Fig. 2

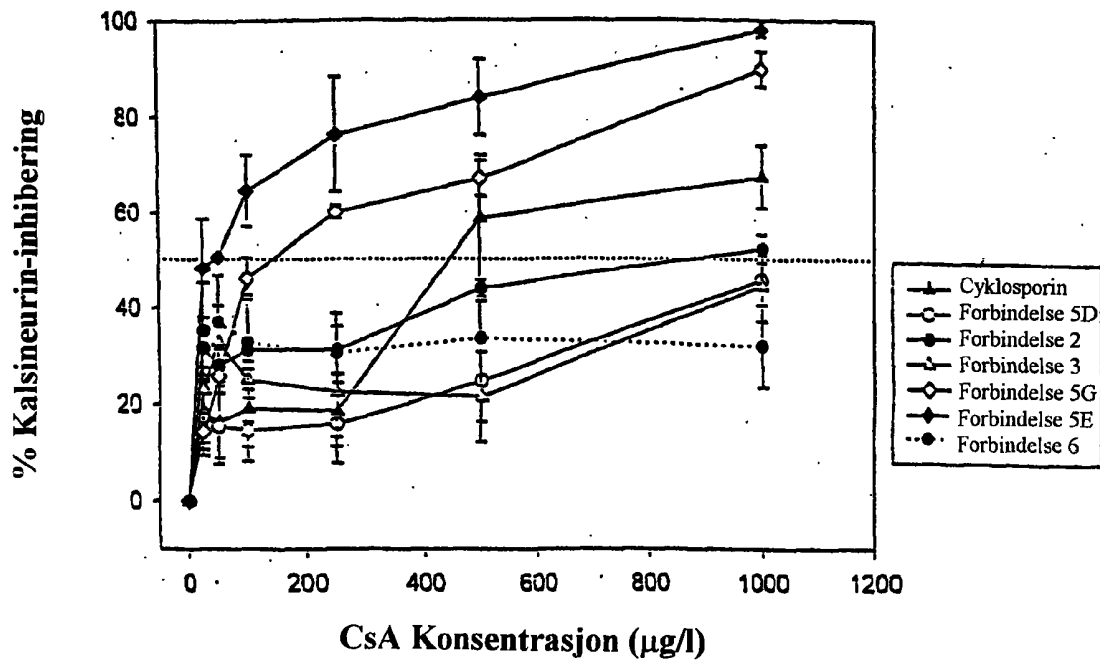


Fig. 5

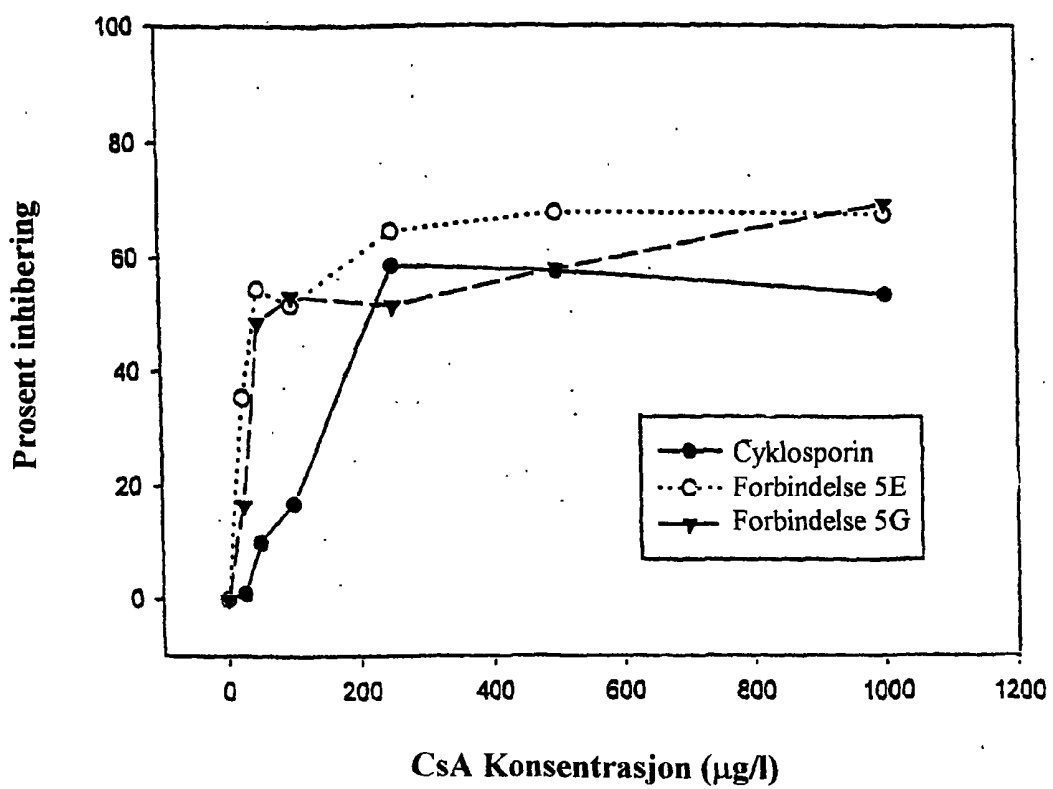


Fig. 6