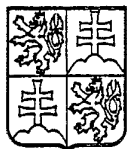


ČESKÁ
A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ
ÚŘAD PRO
VYNÁLEZY

(21) Číslo přihlášky: **6498-89**
(22) Přihlášeno: 16. 11. 89
(40) Zveřejněno: 16. 09. 92
(47) Uděleno: 28. 12. 92
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17. 02. 93

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. ⁵:
C 07 K 7/54

(73) Majitel patentu:

Jegorov Alexandr RNDr. CSc., České
Budějovice, CS;
Mattha Vladimír ing. CSc., České Budějovice,
CS;
Landa Vladimír RNDr. DrSc., České
Budějovice, CS;
Sedmera Petr ing., Praha, CS;

(72) Původce vynálezu:

Jegorov Alexandr RNDr. CSc., České
Budějovice, CS;
Mattha Vladimír ing. CSc., České Budějovice,
CS;
Landa Vladimír RNDr. DrSc., České
Budějovice, CS;
Sedmera Petr ing., Praha, CS;

(54) Název vynálezu:

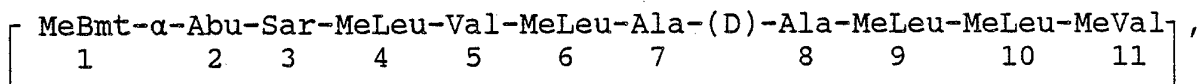
Deriváty cyklosporinu A

(57) Anotace:

Řešení se týká nových derivátů cyklosporinu A s účinkem imunosupresním, které mají funkční skupinu, kterou je možno vázat cyklosporinový skelet na nosič. Jedná se o deriváty vzorce: Q-~~4~~Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-(D)-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal], kde Q znamená buď (2S,3R,4R)-3-hydroxy-4,7-dimethyl-2-methylamino-8-oxo-oktanová kyselina, nebo (2S,3R,4R)-3-hydroxy-4-methyl-2-methylamin o-9-oxo-nonanová kyselina.

Vynález se týká derivátů cyklosporinu A s účinkem imunosupresním, v jejichž struktuře je na prvou aminokyselinu cyklického skeletu cyklosporinu zavedena funkční skupina aldehydická.

Cyklosporin A je cyklický undeka-peptid, jehož struktura je popsána vzorcem:



kde MeBmt je $\text{HOOC}-\underset{1}{\text{CH}}(\underset{2}{\text{NHCH}_3})-\underset{3}{\text{CH}}(\text{OH})-\underset{4}{\text{CH}}(\text{CH}_3)-\underset{5}{\text{CH}_2}-\underset{6}{\text{CH}}=\underset{7}{\text{CH}}-\underset{8}{\text{CH}_3}$,

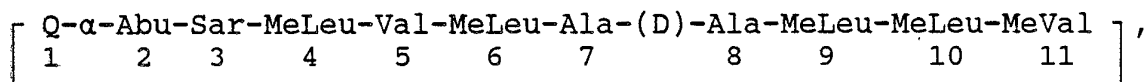
tj. (2S,3R,4R,6E)-3-hydroxy-4-methyl-2-methylamino-6-oktenová kyselina.

Vedle cyklosporinu A byla izolována řada B až Z cyklosporinů, které jsou odvozeny od cyklosporinu A substitucí jednotlivých aminokyselin v cyklu (Helvetica Chimica Acta 70, 13, 1987). Tyto cyklosporiny jsou přirozeným metabolitem některých druhů deuteromycet a jsou průmyslově produkovány kultivací vysokoprodukčních kmenů, například Tolypocladium inflatum NRRL 8044 (Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 14, 237, 1982), Tolypocladium terricola CCEB 2-201 M, (čs. autorské osvědčení č. 2624 a 2625), nebo Cylindrocarpum lucidum NRRL 5760 (U.S. Patent č. 4117118). Alternativním, avšak náročnějším, způsobem přípravy je totální syntéza, pomocí níž byly připraveny i některé další deriváty cyklosporinů (Evropský patent č. 34567 a 194972).

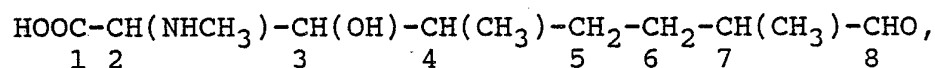
Cyklosporin A je v humánní medicíně používán jako imunosupresivum při transplantacích, mimoto cyklosporiny vykazují účinky antiarytmické, antiparasitické a napomáhají při léčbě autoimunitních onemocnění. Vedle léčebného působení vykazují cyklosporiny i nepříznivé vedlejší účinky, zejména nefrotoxicitu (například Kidney Dis. 1986, 383, 423), které by bylo možno odstranit cíleným směřováním léčiv sestávajících ze selektivního makromolekulárního nosiče a navázaného cyklosporinu. Nevýhodou cyklosporinů A až Z však je, že nemají aktivní skupinu, která by mohla být použita k takovéto vazbě na nosič, vyjma -OH skupiny, jejíž chemická vazba však vede ke ztrátě aktivity derivátů.

Odstranění této nevýhody a umožnění navázání cyklosporinu na nosič je dosahováno strukturní modifikací spočívající v zavedení aldehydické skupiny do struktury cyklosporinu.

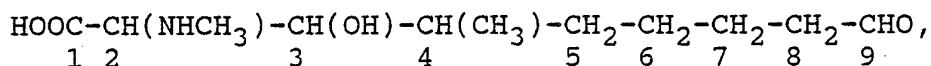
Předmětem vynálezu jsou deriváty cyklosporinu A obecného vzorce:



kde Q znamená buď



tj. (2S,3R,4R)-3-hydroxy-4,7-dimethyl-2-methylamino-
-8-oxo-oktanová kyselina (dále jen Q₁), nebo



tj. (2S,3R,4R)-3-hydroxy-4-methyl-2-methylamino-
-9-oxo-nonanová kyselina (dále jen Q₂).

Uvedené deriváty mají sumární vzorec C₆₃H₁₁₃O₁₃, jedná se o polohové isomery.

Výhoda těchto derivátů spočívá v tom, že aldehydická skupina je reaktivním centrem vzniklého derivátu cyklosporinu A, které umožňuje navázání cyklosporinu na nosič na základě obecně známých selektivních reakcí této skupiny, jako jsou například kondenzace s aminy, hydraziny nebo semikarbazidy.

Identita látek podle vynálezu je doložena spektry nukleární magnetické rezonance. Přítomnost aldehydické skupiny na cyklickém skeletu cyklosporinu jednoznačně vyplývá z přítomnosti signálů $\delta(\text{H})$ 9,60 ppm (doublet 1,8 Hz), 9,61 ppm (doublet 1,8 Hz) - R a S konformace uhlíku C7, $\delta(\text{C})$ 205 ppm (CDCl₃) pro derivát cyklosporinu A, kde první aminokyselina je Q₁, a z přítomnosti signálů $\delta(\text{H})$ 9,74 ppm (triplet 1,8 Hz), $\delta(\text{C})$ 203 ppm (CDCl₃) pro derivát cyklosporinu A, kde první aminokyselina je Q₂. Obrázek 1 znázorňuje ¹H NMR spektrum derivátu výše uvedeného vzorce, kde první aminokyselina je Q₁. Obrázek 2 znázorňuje ¹H NMR spektrum derivátu výše uvedeného vzorce, kde první aminokyselina je Q₂. Obrázek 3 znázorňuje ¹³C NMR spektrum derivátu výše uvedeného vzorce, kde první aminokyselina je Q₂. Srovnání účinku cyklosporinu A a derivátů cyklosporinu A, kde první aminokyselina je Q₁ nebo Q₂.

Účinek cyklosporinu A a jeho aldehydo-derivátů byl testován na krátkodobých kulturách myších lymfocytů. Ze slezin Balb myší byla připravena suspenze buněk a buňky byly v množství 2 x 10⁵ přeneseny do 96 jamkových panelů s 10 µg/ml média konkanavalinu A. Suspenze byla 72 hodin inkubována ve 37 °C v atmosféře směsi 5 % obj. CO₂ a 95 % obj. vzduchu. Po této době bylo naráz přidáno 1 µCi ³H-thymidinu a po dalších 8 hodinách kultivace byla stanovena inkorporace do DNA. Pro srovnání účinku cyklosporinu A s jeho deriváty výše uvedeného vzorce, kde první aminokyselina je Q₁ nebo Q₂, byla do měrných jamek přidána koncentrace od 1 µg do 20 ng cyklosporinu na milimetr kultivačního média. Oba isomerní deriváty cyklosporinu A poskytly shodné výsledky, jenž jsou shrnuty v Tab. 1.

Tab. 1: Účinek cyklosporinu A a derivátů cyklosporinu A na proliferaci myších lymfocytů.

Koncentrace		% inhibice proliferace
	cyklosporin A	derivát cyk-A (Q ₁ nebo Q ₂)
1 000 ng	95	93
800 ng	89	87
600 ng	71	68
400 ng	23	21
200 ng	10	7
20 ng	-	-

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Deriváty cyklosporinu A obecného vzorce:

Q- α -Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-(D)-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal],

kde Q znamená buď

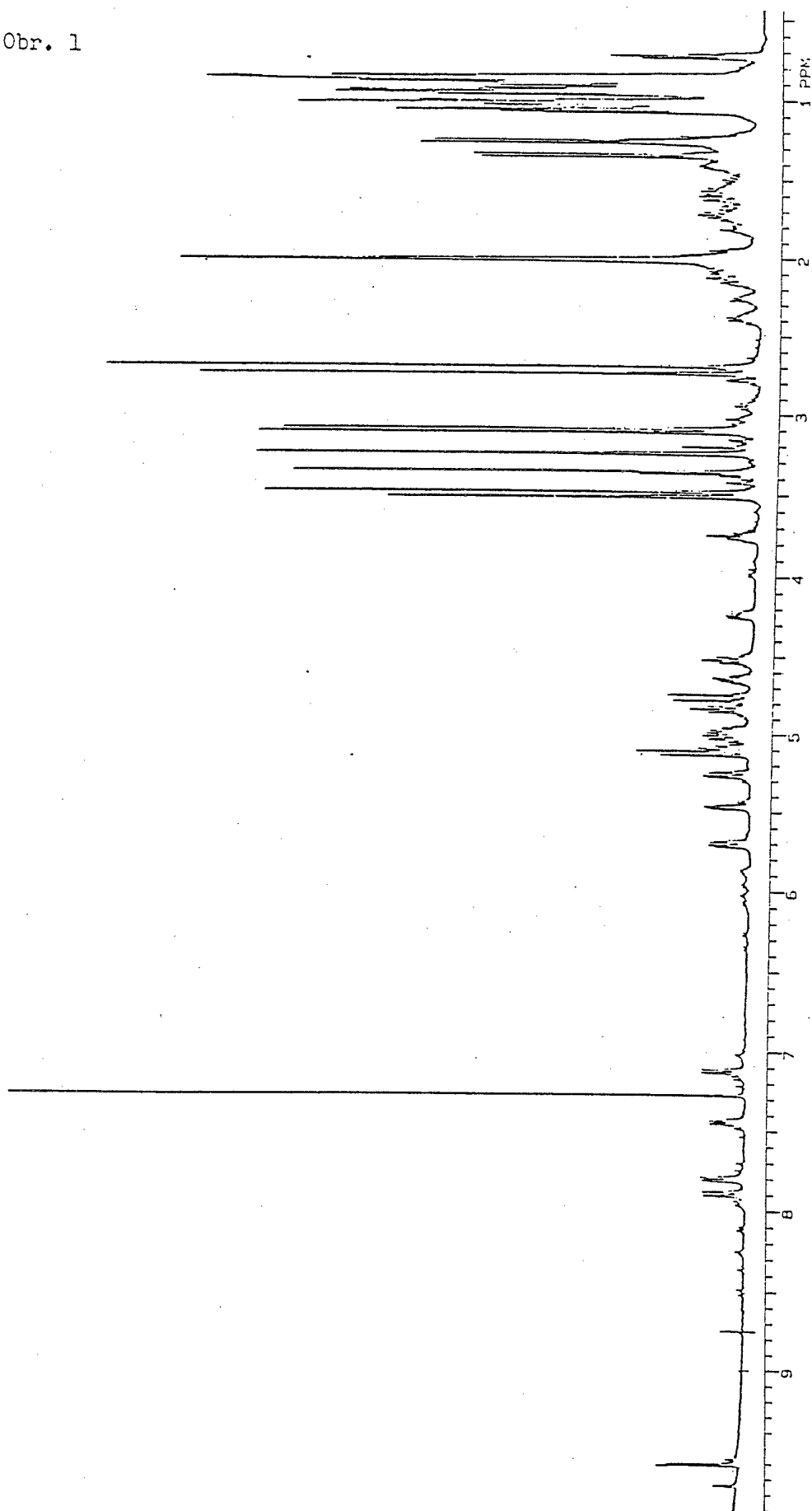
(2S,3R,4R)-3-hydroxy-4,7-dimethyl-2-methylamino-
-8-oxo-oktanová kyselina,

nebo

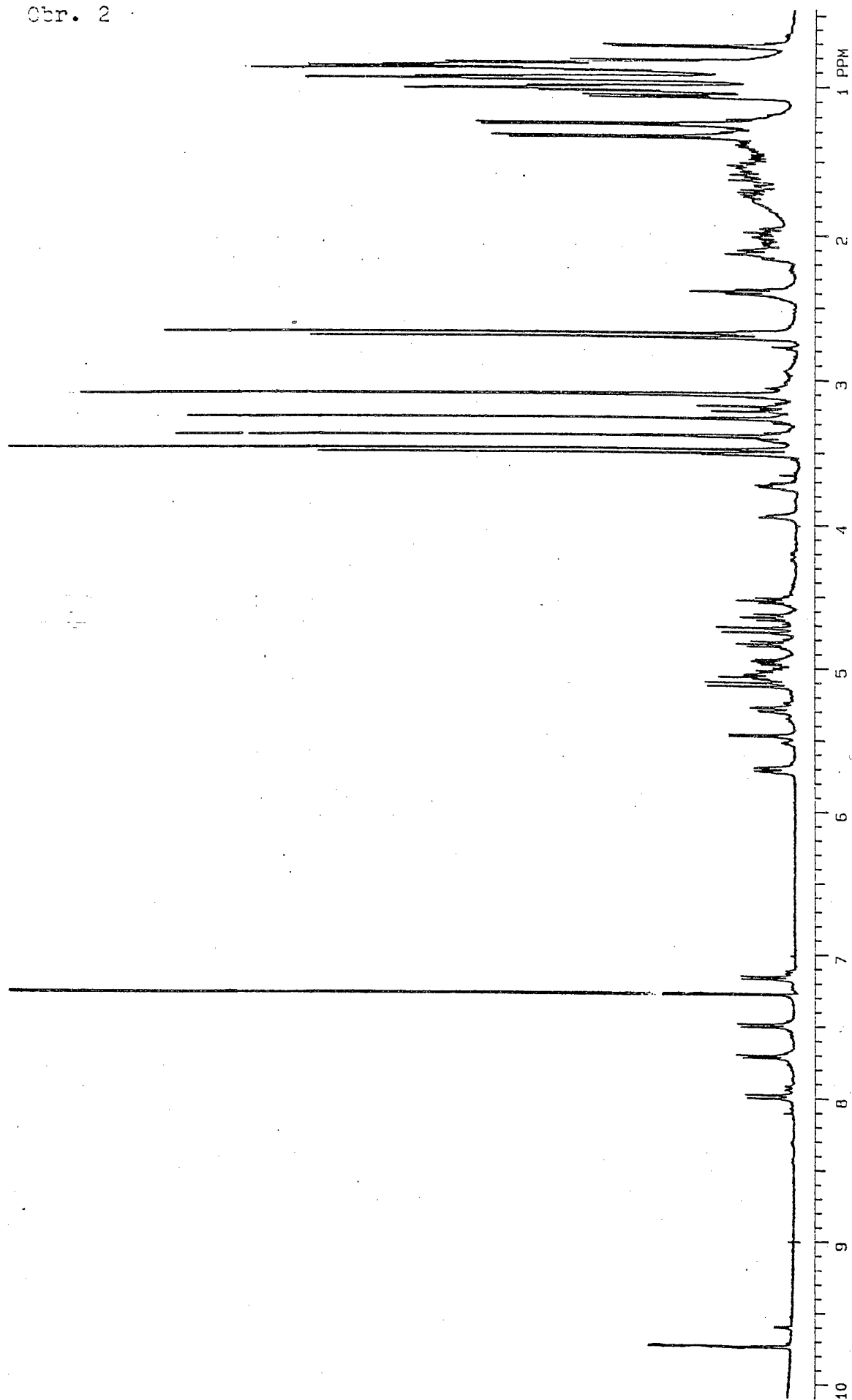
(2S,3R,4R)-3-hydroxy-4-methyl-2-methylamino-
-9-oxo-nonanová kyselina.

3 výkresy

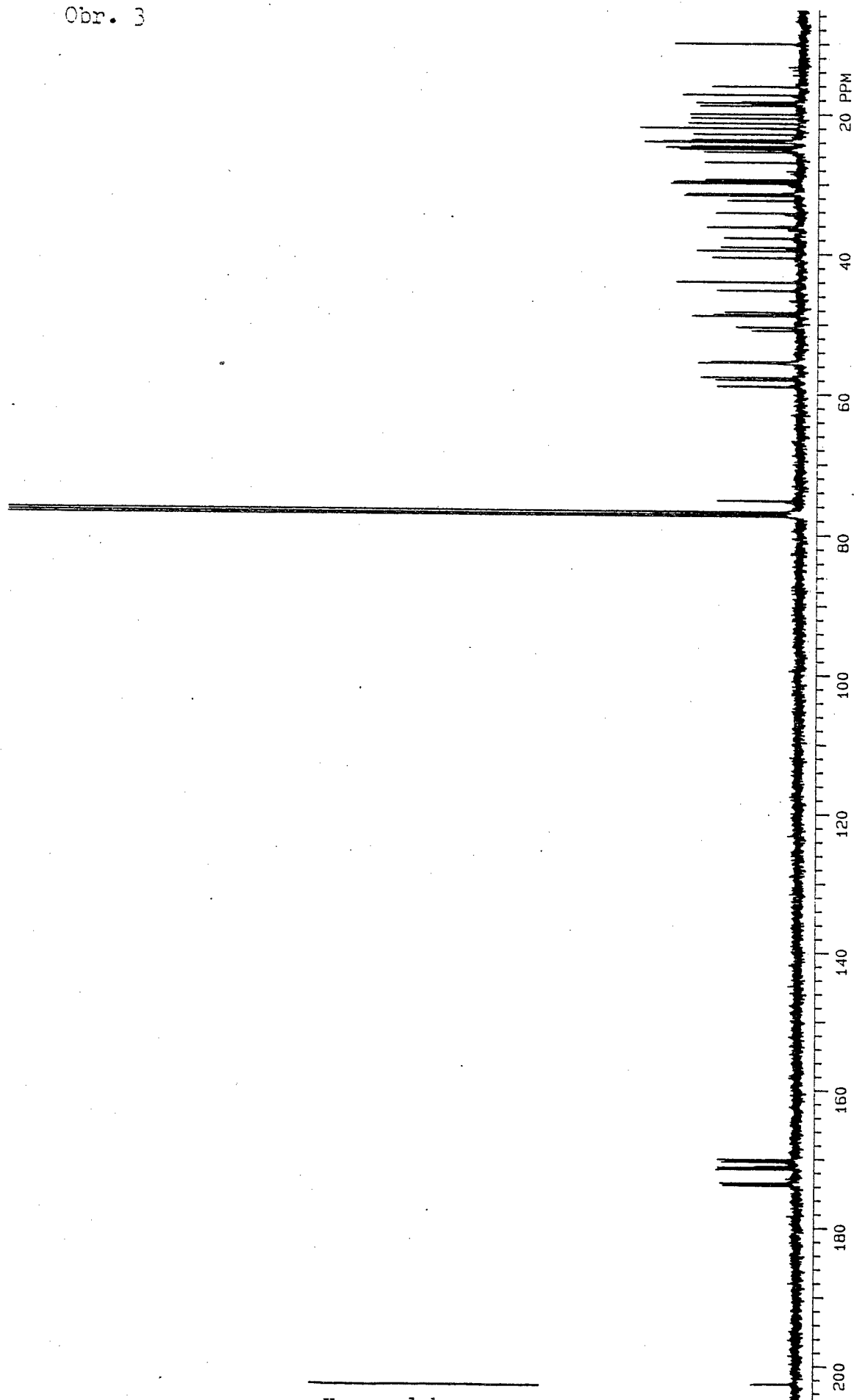
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3

Konec dokumentu