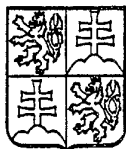


ČESKÁ
A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ
ÚŘAD PRO
VYNÁLEZY

(21) Číslo přihlášky: **6499-89**
(22) Přihlášeno: 16. 11. 89
(40) Zveřejněno: 12. 08. 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;
Mařha Vladimír ing. CSc., České Budějovice,
CS;
Landa Vladimír RNDr. DrSc., České
Budějovice, CS;
Polievka Milan ing. CSc., Prievidza, CS;
Stuchlík Josef ing., Hrabyně, CS;
Malinka Zdeněk RNDr., Opava, CS;
Harazim Pavel ing., Koberžice, CS;

(72) Původce vynálezu:

Jegorov Alexandr RNDr. CSc., České
Budějovice, CS;
Mařha Vladimír ing. CSc., České Budějovice,
CS;
Landa Vladimír RNDr. DrSc., České
Budějovice, CS;
Polievka Milan ing. CSc., Prievidza, CS;
Stuchlík Josef ing., Hrabyně, CS;
Malinka Zdeněk RNDr., Opava, CS;
Harazim Pavel ing., Koberžice, CS;

(54) Název vynálezu:

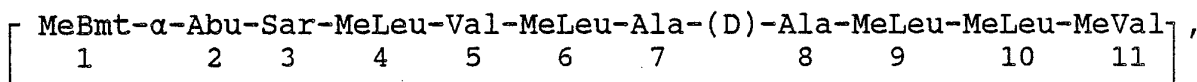
Způsob výroby derivátů cyklosporinu A

(57) Anotace:

Řeší se způsob výroby látek vhodných pro cílené
směrování imunosupresních léčiv. Způsob výro-
by derivátů cyklosporinu A spočívá v tom, že se
na roztok cyklosporinu A v organickém roz-
pouštědle s výhodou toluenu, za přídavku ka-
talyzátoru na bázi sloučenin kobaltu nebo rho-
dia působí směsí oxidu uhelnatého a vodíku o
objemovém poměru s výhodou 1:1, za celkové-
ho tlaku 0,1 až 30 MPa a teploty 25 až 200 °C
po dobu 10 min až 4 hodin.

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

Cyklosporin A je cyklický undekapeptid, 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.

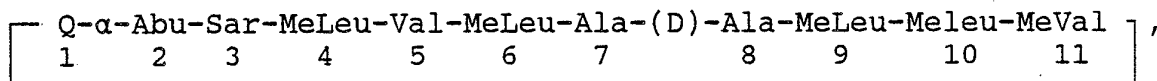
Vedle cyklosporinu A byla izolována řada B až Z cyklosporinů, které jsou odvozeny od cyklosporinu A substitucí jednotlivých aminokyselin v cyklu (Helvetica Chimica Acta 70, 13, 1987). Tyto cyklosporiny jsou přirozeným metabolitem některých druhů deuteromycet a jsou průmyslově produkovány kultivací vysokoprodukčních 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.

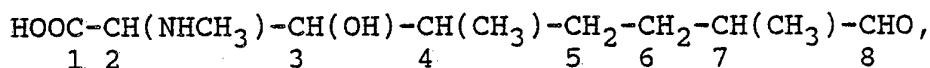
Odstranění této nevýhody je dosahováno způsobem podle vynálezu, jehož podstatou je, že se na roztok cyklosporinu A v organickém rozpouštědle a za přídavku katalyzátoru na bázi sloučenin kobaltu nebo rhodia působí směsí oxidu uhelnatého a vodíku o objemovém poměru s výhodou 1:1, za celkového tlaku 0,1 až 30 MPa a teploty 25 až 200 °C po dobu 10 min až 4 h, přičemž vznikají deriváty cyklosporinu A v jejichž struktuře je zavedena aldehydická skupina.

Výhoda uvedeného způsobu je zejména, že pro přípravu derivátů je využíváno semisyntetického postupu vycházejícího z přírodního cyklosporinu A, jenž je uvedeným způsobem modifikován na deriváty nesoucí reaktivní aldehydickou skupinu.

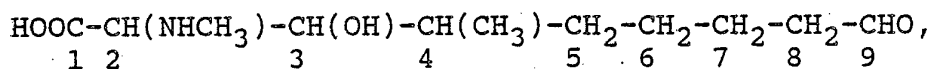
Příprava derivátů se provádí hydroformylací cyklosporinu A za katalýzy sloučeninami kovů VIII. vedlejší skupiny. Uvedenou reakcí je z celého skeletu cyklosporinu A modifikována pouze dvojná vazba první aminokyseliny cyklického skeletu cyklosporinu A, přičemž vznikají deriváty obecného vzorce:



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.

Hydroformylace se provádí rozpuštěním cyklosporinu A v organickém rozpouštědle, například v benzenu, toluenu, xylenu, tetrahydrofuranu, acetonu, propanolu, methanolu, s výhodou v toluenu, přidáním katalyzátoru na bázi kovů VIII. vedlejší skupiny, s výhodou na bázi sloučenin rhodia nebo kobaltu, a působením směsi oxidu uhelnatého a vodíku o objemovém poměru s výhodou 1:1, za celkového tlaku 0,1 až 30 MPa a teploty 25 až 200 °C po dobu obvykle 10 min až 4 h. Způsobem podle vynálezu je dosahováno konverze 70 až 90 % selektivity 60 až 80 %.

Při použití sloučenin rhodia jako katalyzátoru, jimiž mohou být například RhCl₃ · 3 H₂O, Rh₂(SO₄)₃, RhCl(CO)(PPh₃)₂, RhH(CO)(PPh₃)₃, RhCl₃ imobilizovaný na silikagelu nebo s výhodou komplexy rhodia neobsahující fosfiny, například Rh(CO)₂Cl/2 nebo Rh₄(CO)₁₂, je výchozí 3-hydroxy-4-methyl-2-methylamino-6-oktenová kyselina v cyklosporinu A modifikována v převážné míře v poloze 7, přičemž vzniká derivát cyklosporinu A v němž je namísto této kyseliny Q₁.

Při použití sloučenin kobaltu jako katalyzátoru, jimiž mohou být například chlorid kobaltnatý, síran kobaltnatý, octan kobaltnatý, naftenát kobaltnatý nebo s výhodou Co₂(CO)₈, podléhá výchozí 3-hydroxy-4-methyl-2-methylamino-6-oktenová kyselina v cyklosporinu A nejprve izomeraci in situ na 3-hydroxy-4-methyl-2-methylamino-7-oktenovou kyselinu, která je hydroformylována v převážné míře v poloze 8, přičemž vzniká derivát cyklosporinu A, v němž je namísto výchozí kyseliny Q₂.

Po ukončení reakce se katalyzátor odděluje od produktů reakce a nezreagovaného cyklosporinu A buď mechanicky, tj. filtrací nerozpustného katalyzátoru ve formě například $\text{Rh}_6(\text{CO})_{16}$, nebo heterogenního katalyzátoru, extrakcí do vodné fáze nebo chromatograficky. Extrakce katalyzátoru do vodné fáze se provádí například zředěnými kyselinami, které převádějí kovy do vodné fáze ve formě anorganických solí nebo se extrakce provádí ligandy, které převádějí kovy do vodné fáze ve formě koordinačních sloučenin, jimiž mohou být například ve vodě rozpustné fosfiny, jejichž použití je popsáno v čs. autorském osvědčení č. 246734. Karbonyly kobaltu se s výhodou oddělují chromatografií na silikagelu, kde jsou eluovány v čisté formě jako první frakce například chloroformem, zatímco deriváty cyklosporinů jsou eluovány jako další frakce například směsí chloroform/methanol 95:5 % obj.

Po oddělení katalyzátoru se organická fáze obsahující cyklosporiny zahustí odpařením a deriváty cyklosporinu A se od nezreagovaného cyklosporinu A a vedlejších produktů oddělují chromatograficky. Chromatografická separace se provádí s výhodou na reversní fázi, protože žádané deriváty jsou na reversní fázi eluovány dříve než nezreagovaný cyklosporin A a vedlejší produkty reakce.

Separace na reversní fázi se s výhodou provádí na silikagelu modifikovaném oktadecyltrichlorsilanem (C-18 fáze), přičemž se používá obvykle směs methanol/voda 78:22 % obj. jako eluční činidlo. Z chromatografických frakcí se odpaří methanol, přičemž se deriváty cyklosporinu A vylučují jako bílé krystalické sraženiny nerozpustné ve vodě. Sraženina se mechanicky oddělí od vodné fáze například filtrací nebo centrifugací a čisté deriváty se získávají vysušením sraženiny na vzduchu nebo s pomocí vakua.

Na připojeném chromatografu je znázorněn konkrétní příklad chromatografické separace produktů hydroformylace cyklosporinu A, katalyzované komplexy rhodia. Tento příklad ovšem nevyčerpává všechny možnosti provedení chromatografické separace ani nijak neomezuje způsob podle vynálezu ve smyslu dosažené specifity a výtěžku derivátů cyklosporinu A. Chromatogram představuje chromatografickou analýzu katalytické směsi po ukončení hydroformylace, jenž je používána ke kontrole výtěžku uvedené reakce. Chromatografická analýza se provádí na koloně 250 x 4 mm plněné silikagelem C-18, 7 μm , Separon SGX C-18 (výrobce Tessek Československo), s použitím eluční směsi 78:22 % obj. methanol/voda při průtoku 1 ml/min a při teplotě 50 °C, detekce 214 nm. Z kolony jsou postupně eluovány benzen 1, katalyzátor 2, derivát cyklosporinu A, kde prvá aminokyselina je Q₁ 3, vedlejší produkty reakce 4 a 6 a nezreagovaný cyklosporin A 5.

Vynález je dále objasněn na příkladech provedení, jimiž ovšem není jeho rozsah omezen ani vyčerpán.

Příklad 1

Do 50 ml nerezového autoklávu se skleněnou vložnou nádobou bylo naváženo 240 mg cyklosporinu A, 12,3 mg $\text{Rh}_4(\text{CO})_{12}$ a rozpuštěno ve 2 ml benzenu. Autokláv byl natlakován na 5,5 MPa směsí oxidu uhelnatého a vodíku o objemovém poměru 1:1 a vložen do ole-

jové lázně o teplotě 60 °C. Hydroformylace byla prováděna 60 min za míchání magnetickým míchadlem. Autokláv byl ochlazen a odtlakován a výsledná směs byla odpařena dosucha. Chromatografie byla prováděna na koloně 250 x 25 mm naplněné silikagelem C-18, 7 µm, eluce byla prováděna směsí 78:22 % obj. methanol/voda. Derivát cyklosporinu A výše uvedeného vzorce, kde prvá aminokyselina je Q₁, byl jímán jako první cyklosporinová frakce, zatímco nezreagovaný cyklosporin A byl spolu s vedlejšími produkty eluován v dalších frakcích. Odpařením methanolu se uvedený derivát vyloučil v podobě bílé sraženiny, která byla odfiltrována a vysušena ve vakuu. Kapalinovou chromatografií byla analyticky stanovena konverze 70 %, selektivita 60 % a preparativní chromatografií bylo získáno 82 mg čistého derivátu, tj. 78 % z množství nalezeného analyticky. Identifikace derivátu byla provedena spektry nukleární magnetické rezonance, v nichž je přítomnost aldehydické skupiny jednoznačně charakterizována signálem dvou doubletů při 9,6 ppm, náležejících R a S konfiguracím aldehydické skupiny na uhlíku C7 aminokyseliny Q₁.

Příklad 2

Do 750 ml nerezového autoklávu s teflonovou vložnou nádobou bylo naváženo 12 g cyklosporinu A, 542 mg Rh(acac)(CO)₂, acacH = acetylaceton, a rozpuštěno ve 150 ml toluenu. Autokláv byl natlakován na 7 MPa směsí oxidu uhelnatého a vodíku o objemovém poměru 1:1 a vložen do vyhřívaného pouzdra o teplotě 50 °C. Hydroformylace byla prováděna 3 hodiny za míchání magnetickým míchadlem. Autokláv byl ochlazen a odtlakován a filtrací bylo odděleno 106 mg Rh₆(CO)₁₆, který se vyloučil po ochlazení o odtlakování autoklávu. Za účelem separace katalyzátoru bylo k filtrátu přidáno 1,8 g PhP(CH₂COOH)₂ ve 20 ml ethanolu a vzniklá směs byla zahřáta na 60 °C, 15 minut. Rhodium, které bylo tímto způsobem převedeno do formy komplexů s fenylfosfindioctovou kyselinou bylo extrahováno 150 ml roztoku uhličitanu sodného o koncentraci 0,1 molu na litr vodné fáze. Organická fáze byla oddělena a zahuštěna odpařením na vakuové odparce a dále byla po částech přibližně 200 mg chromatografována na koloně 250 x 25 mm naplněné silikagelem C-18, 7 µm, eluce byla prováděna směsí 78:22 % obj. methanol/voda. Derivát cyklosporinu A výše uvedeného vzorce, kde prvá aminokyselina je Q₁, byl jímán jako první cyklosporinová frakce, zatímco nezreagovaný cyklosporin A byl spolu s vedlejšími produkty eluován v dalších frakcích. Odpařením methanolu se uvedený derivát vyloučil v podobě bílé sraženiny, která byla odfiltrována a vysušena ve vakuu. Kapalinovou chromatografií byla analyticky stanovena konverze 88 %, selektivita 63 % a preparativní chromatografií bylo získáno 4,3 g čistého derivátu, tj. 64 % z množství nalezeného analyticky. Identifikace produktu byla provedena jako v Příkladu 1.

Příklad 3

Do 100 ml nerezového autoklávu byl navážen 1 g cyklosporinu A, 0,1 g Co₂(CO)₈ a 2 g p-xyleny. Autokláv byl natlakován na 5 MPa směsí oxidu uhelnatého a vodíku 1:1 objemově a vložen do ole-

jové lázně o teplotě 100 °C směsí CO/H_2 zvýšen na 15 hodiny bez míchání. Autoklav roztok byl chromatograficky katalyzátoru. Chromatografická plněná silikagelem o zrnění jako první frakce chloroform 95:5 % obj. chloroform/methanol prováděna rechromatografií s blížně 200 mg na koloně 250 μm , eluce byla prováděna derivát cyklosporinu A výše uveden je Q_2 , byl jímán jako první zreagovaný cyklosporin A byl v dalších frakcích. Odpaření čil v podobě bílé sraženiny ve vakuu. Kapalinovou chromatografii konverze 82 %, selektivita bylo získáno 420 mg čistého derivátu analyticky. Identifikace nukleární magnetické rezonancí aldehydicke skupiny jednozrn 9,74 ppm, triplet 1,8 Hz (CDCl_3).

Vynález je určen zejména vhodných pro cílené směrování k přípravě derivátů, které například pro imunizace a zisk A nebo k izolaci cyklosporinů.

temperování autoklávu byl tlak křivoformylace byla prováděna 4 plazen a odtlakován a výsledný silikagelu za účelem oddělení prováděna na koloně 300 x 30 mm 100 μm , $\text{CO}_2(\text{CO})_8$ byl eluován klosporiny byly eluovány směsí izolace čistého derivátu byla frakce po částech přímým naplněné silikagelem C-18, 8:22 obj. methanol/voda. Derivát zorce, kde prvá aminokyselina sporinová frakce, zatímco ne s vedlejšími produkty eluován kolu se uvedený derivát vyloučena byla odfiltrována a vysušena byla analyticky stanovena separativní chromatografií bylo tj. 64 % z množství nalezené derivátu byla provedena spektra, jejichž je přítomnost terminální charakterizována signálem $\delta(\text{H})$.

travě derivátů cyklosporinů supresních léčiv a dále vázání na nosič upotřebit stabilátek proti cyklosporinu a proteinů.

P A T E N T

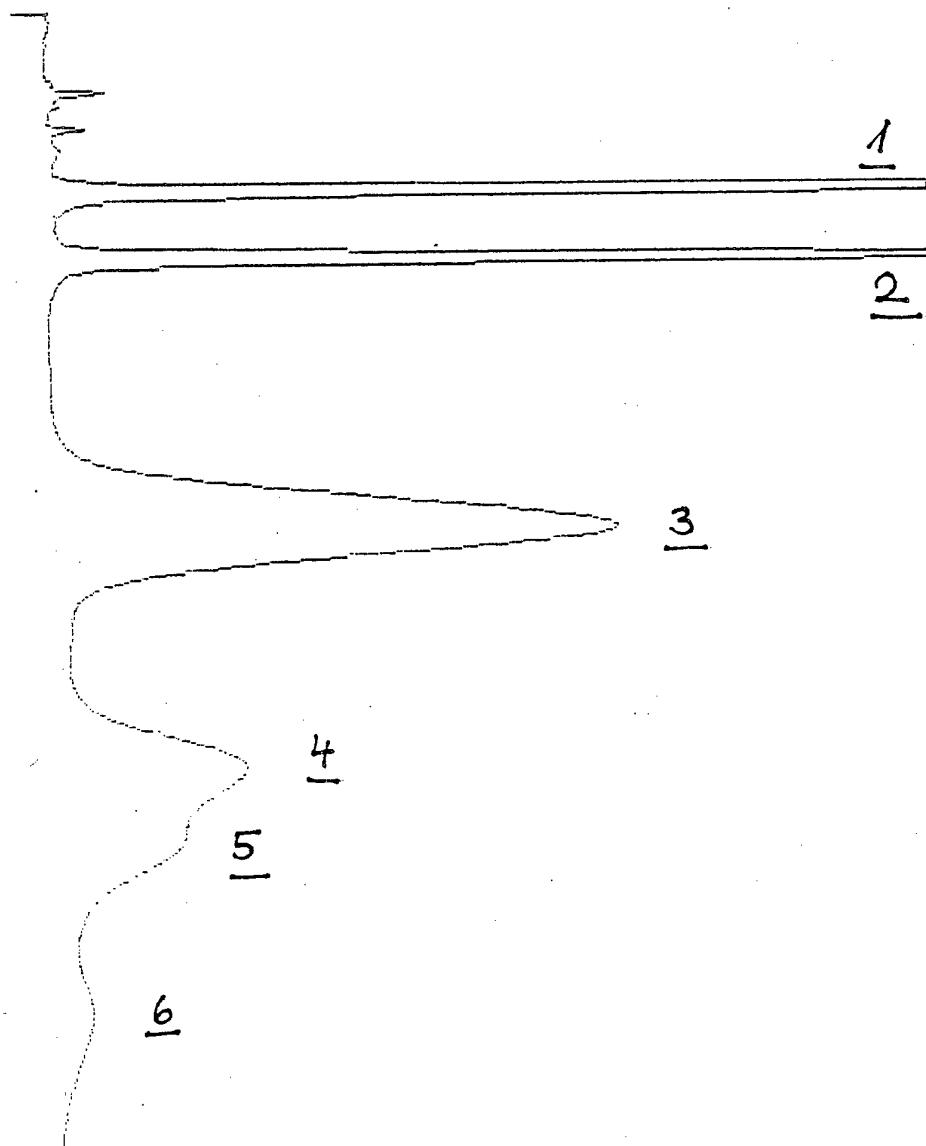
N Á R O K Y

1. Způsob výroby derivátů cyklosporinu A, se na roztok cyklosporinu A přidá toluenu, za přítomnosti tetrahydrofuranu nebo rhodia působí s cyklosporinem v poměru s výhodou 1:1 až 1:10 a teploty 25 až 200 °C.
2. Způsob výroby derivátů cyklosporinu A, cí se tím, že jako katalyzátor se použije tetrahydrofuran, oktahydrofuran, dodekakarbonský nebo acetylacetonát.

cyklosporinu A, vyznačující se tím, že derivát cyklosporinu A se rozpouští v organickém rozpouštědle s výhodou na bázi sloučenin kobaltu, niklu, železa, mědi, uhlíkatého a vodíku o objemovém tlaku 0,1 až 30 MPa a dobu 0,1 až 4 h.

cyklosporinu A podle bodu 1, vyznačující se tím, že se použije dodekakarbonský nebo acetylacetonát.

Obr. 1



Konec dokumentu