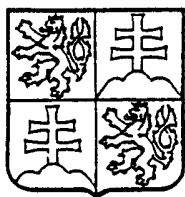


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 00594-92

(13) A3

5(51) C 12 N 1/20

(22) 28.02.92

(32) 01.03.91

(31) 91/91101127

(33) CN

(40) 16.09.92

(71) Nippon Kayaku Kabushiki Kaisha, Tokyo, JP

(72) Nanjin Wang, Beijing City, CN
Xianshu Yang, Beijing City, CN

(54) Kanglemycin C, způsob jeho přípravy, jeho použití, farmaceutický prostředek a kmen pro přípravu kanglemycinu C

(57) Nová fyziologicky účinná látka, kanglemycin C, má hodnotu relativní molekulové hmotnosti 326 a je izolována z fermentační živné pudy *Nocardia mediterranei* var. *kanglensis* 1747-64, náležející do rodu *Nocardia*. Kanglemycin C má imunosupresivní účinnost a inhibuje bujení nádorových buněk.

594-92

Kanglemycin C, způsob jeho přípravy, jeho použití, farmaceutický prostředek a kmen pro přípravu kanglemycinu C

URAD PRO VYNÁLEZY OBJEVY	30 III 92	17336
--------------------------------	-----------	-------

Oblast techniky

Vynález se týká kanglemycinu C, který je fyziologicky účinnou látkou, způsobu jeho přípravy a jeho využití jako farmaceutického prostředku. Podrobněji se vynález týká kanglemycinu C, který se používá jako nový imunosupresant pro léčení autoimunitní hemolytické anémie, zánětu ledvin i při rejekci pojivové tkáně, dále se vynález týká způsobu přípravy kangemycinu C a jeho farmaceutického využití.

Dosavadní stav techniky

Nedávno vyvinuté imunosupresanty jsou vysoce selektivně účinné ve smyslu specificky regulovat podskupinu určitých imunních buněk. Cyclosporin A, který zastupuje takové imunosupresanty, selektivně inhibuje proliferaci pomocníku T buněčného klonu a proto dosahuje pozoruhodných výsledků na poli transplantace orgánů. S úspěchem se cyclosporin A (Agents and Actions, 1976, Vol. 6, 468-475) rozsáhle používá v klinikách. Cyclosporin je však doprovázen vedlejšími vlivy jako je akutní (nebo chronická) renální intoxikace, mírný třes, neurální léze, onemocnění dásní, vypadávání vlasů atd.

FK-506 (Journal of Antibiotics, Vol. 40, 1249 (1987)) který byl nedávno objeven je antibiotický makrolid ($C_{44}H_{69}NO_{22}$) a má velmi slibné výsledky na experimentální úrovni. Avšak vzhledem ke komplikovanému způsobu jeho procesu je pravděpodobné, že klinická aplikace tohoto léku může být omezená.

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je poskytnutí lépe vyhovujícího imunosupresantu, který může překonat nedostatky konvenčních imunosupresantů.

Druhým předmětem vynálezu je poskytnutí způsobu přípravy imunosupresantu, který je výhodný z hlediska průmyslové výroby.

Dalším předmětem vynálezu je poskytnutí mikroorganismu, použitému k přípravě nového imunosupresantu.

Dalším předmětem vynálezu je poskytnutí farmaceutického použití nového imunosupresantu.

Autoři vynálezu intenzívně pracovali na studiích, zaměřených na získání nového imunosupresantu, u něhož jsou eliminovány nevýhody, které mají známé imunosupresanty. Výsledkem prací je kanglemycin C, mající extrémně malou relativní molekulovou hmotnost, který je novým imunosupresantem. Kanglemycin C byl získán fermentací živné půdy kmene náležejícího do rodu Nocardia, který byl změněn na Amycolatopsis (International Journal of Systematic Bacteriology, Jan. 1986, p. 29-37) a bylo zjištěno, že tento nový imunosupresant má lepší vlastnosti a že může být imunosupresantem nové nadcházející generace. Toho se dosahuje v tomto vynálezu.

Vynález především poskytuje fyziologicky účinný kanglemycin C, který je charakterizován následujícími fyzikálně chemickými vlastnostmi, a jeho soli.

1. relativní molekulová hmotnost (EI-MS): m/z 326 (M^+)

2. molekulový vzorec: $C_{19}H_{18}O_5$

3. teplota tání: 170 °C (s rozkladem)

4. optická rotace: $[\alpha]_D^{25} + 150^\circ$ (C 0,57, MeOH)

5. ultrafialové absorpční spektrum (MeOH):

λ_{max}^{nm} (log ϵ) 232 (4,61), 356 (3,93)

6. infračervené absorpční spektrum (KBr) (cm^{-1}):

3400, 1690, 1650, 1640

7. ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6):

204,02 (s), 160,58 (s), 70,92 (s),

20,47 (t), 195,0 (s), 159,50 (s),

136,66 (d), 134,58 (s), 43,62 (d),

23,75 (q), 123,95 (d), 46,52 (t), 31,47 (t),

44,89 (d), 117,69 (s), 122,68 (d),

118,21 (d), 196,90 (s), 54,93 (d)

8. 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6)

5,78 (1H, brs), 1,98 (3H, s), 2,79 (1H, d, $J = 18,54$),

2,35 (1H, d, $J = 18,54$), 1,47 (2H, m), 1,98 (1H, m),

1,79 (1H, m), 1,98 (1H, t), 7,30 (1H, d), 7,75 (1H, t),

7,55 (1H, d), 2,91 (1H, d), 3,37 (1H, d)

Druhým aspektem vynález je poskytnutí způsobu přípravy fyziologicky účinného kanglemycinu C a jeho solí, zahrnující kultivování mikroorganismu, náležejícího do rodu Nocardia, který produkuje kanglemycin C a získávání fyziologicky účinného kanglemycinu C fermentací živné půdy.

Třetím aspektem vynálezu je poskytnutí mikroorganismu, náležejícího do rodu Nocardia, produkujícího kanglemycin C.

Čtvrtým aspektem vynálezu je poskytnutí farmaceutického prostředku pro imunosupresi, zahrnujícího jako účinnou složku fyziologicky účinný kanglemycin C nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli.

Vynález ilustrují obrázky, z nichž obr. 1 ukazuje ultrafialové absorpční spektrum kanglemycinu C, na obr. 2 je ukázáno infračervené absorpční spektrum (KBr) kanglemycinu C, na obr. 3 je ukázáno ^{13}C -NMR spektrum (100 MHz, DMSO-d_6) kanglemycinu C a na obr. 4 je ukázáno ^1H -NMR spektrum (400 MHz, DMSO-d_6) kanglemycinu C.

Kanglemycin C podle vynálezu má relativní molekulovou hmotnost 326 jak je uvedeno ve fyzikálně chemických vlastnostech na předcházející straně, což je neobyčejně malá hodnota v porovnání s relativními molekulovými hmotnostmi známých imunosupresantů.

Optická rotace kanglemycinu C je:

$$[\alpha]_D^{25} + 150^\circ \text{ (C 0,57, MeOH)}$$

Kanglemycin C prokazuje v methanolu maximum absorpce při 232 nm a 356 nm v ultrafialovém absorpčním spektru; v infračerveném absorpčním spektru prokazuje absorpci při 3400 cm^{-1} , 1690 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 750 cm^{-1} atd. Molekulový vzorec ($\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_5$) byl určen pomocí elementární analýzy. Tato sloučenina je rozpustná v polárním organickém rozpouštědle, ale není rozpustná ve vodě a v nepolárním organickém rozpouštědle. Čistý kanglemycin C tvoří žlutavé jehličky.

Fyziologicky účinný kanglemycin C podle tohoto vynálezu lze získat kultivováním mikroorganismu, náležejícího do rodu Nocardia, produkujícího kanglemycin C, produkováním a shromažďováním kanglemycinu C a získáváním kanglemycinu C z takto získané fermentační živné půdy.

Reprezentativním příkladem mikroorganismu, schopného produkovat kanglemycin C je Nocardia mediterranei var. kanglensis

1747-64, náležející do rodu Nocardia a získávaný (sklizený) v Čínské lidové republice. Bakteriologické vlastnosti, fyziologické vlastnosti a další, týkající se tohoto kmene, jsou uvedeny dále.

1. Morfologické vlastnosti

Kmen byl pozorován po inkubaci při teplotě 28 °C po dva týdny. Hyfy byly jednoduché s okrajovou částí zvlněnou nebo smyčkovitou. Byla pozorována fragmentace spodní vrstvy substrátu mycelia. Netvoří se žádné sporangium ani vír. Povrch spory je hladký nebo drsný a někdy trnitý. Spory jsou válcovité a mají velikost 0,6 μ m - 0,8 μ m x 0,8 μ m - 1,3 μ m. Sporu tvoří asi deset řetězců.

2. Růst v různých prostředích

Stadium růstu při teplotě 28 °C pozorované v různých prostředích po dvou týdnech uvádí Tabulka 1

Tabulka 1

Prostředí	Růst	Aeriální mycelium	Substrátové mycelium	Rozpustný pigment
Sacharosa-dusičnanový agar	dobrý	mírný, bílé až světle žlutooranžové	světle žluté až světle oranžové	nahnědlý
Glukosa-asparagino-vý agar	mírný	mírný, bílé až světle žlutooranžové	světle žluté až světle oranžové	nažloutlý
Glycerin-asparagino-vý agar	dobrý	mírný, bílé až světle žlutooranžové	světle žluté až světle oranžové	hnědý
Škrob-anorganické soli agar	mírný	mírný, bílé	světle žluté až světle žlutohnědé	nahnědlý
Tyrosinový agar	mírný	mírný, bílé	světle žluté až světle žlutohnědé	nahnědlý
Živný agar	mírný	mírný, bílé až světle žlutooranžové	světle žluté až žlutooranžové	žádný
Kvasnico-sladový agar	mírný	mírný, bílé	světle hnědé	nažloutlý
Agar z ovesné mouky	mírný	mírný, bledě oranžové až světle žlutohnědé	bledě oranžové	nažloutlý
Pepton-kvasnico železitý agar	mírný	-	světle žluté	žádný

3. Fyziologické vlastnosti

Optimální teplota při růstu: 27 °C až 37 °C

Redukce dusičnanu: negativní

Zkapalňování želatiny (prostředí glukóza-pepton-želatina, 20 °C): negativní

Hydrolyza škrobu (škrob-anorganická sůl agarové prostředí): negativní

Koagulace sbíraného mléka: pozitivní

Peptonizace sbíraného mléka: pozitivní

Tvorba melanoidového pigmentu: negativní

4. Použité zdroje uhlíku (Pridham-Gottlieb agarové prostředí)

L-Arabinosa	+
D-Xylosa	+
D-Glukosa	+
D-Fruktosa	+
Sacharosa	+
Inositol	+
L-Rhamnosa	+
Rafinosa	-
D-Mannitol	+

5. Kyselina diaminopimelová v buněčné stěně

kyselina meso-diaminopimelová

Krátce lze shrnout, že buněčná stěna tohoto kmene je kyselina meso-diaminopimelová. Podle způsobu International Streptomyces Project (zkráceno na ISP) náleží hyfy tvořící spory do sekce (oddílu):

Rectiflexibles nebo Reticulaperti; povrch spory je hladký nebo drsný; barva dospělé hyfy je ze série bílých barev; kmen netvoří melanoidové pigmenty nebo jiný pigment v prostředí; barva substrátového mycelia je světle hnědá nebo světle žlutá; pozoruje se dělení, kterým se vyznačuje; řetězec roste za použití zdrojů uhlíku jako je L-arabinosa, D-glukosa, D-fruktosa, sacharosa, inositol, L-rhamnosa, D-xylosa a D-mannitol, avšak neroste při použití rafinosy.

Na základě předcházejících vlastností se vedlo bakteriologické šetření podle Bergey's Manual of Determinate Bacteriology, 8th edition (1974); výsledky ukázaly, že tento kmen náleží do rodu Nocardia. Proto dostal kmen název Nocardia mediterranei var. kanglensis 1747-64 (zde uváděný jako kmen 1747-64).

Tento kmen byl uložen v Committee of Preservation and Control of Chinese Microorganism v Čínské lidové republice 20. února 1991 a je přístupný pod označením No. CGMCC No. 0163. Tento kmen je také uložen v Fermentation Research Institute of the Agency of Industrial Science & Technology of Japan dne 28. ledna 1992 pod Budapest Treaty a je přístupný pod označením No. FERM BP-3718.

Kanglemycin C podle tohoto vynálezu lze připravit kultivováním mikroorganismu, produkujícího kanglemycin C, náležejícího do rodu Nocardia a získáváním fyziologicky účinného kanglemycinu C fermentací živné půdy.

Jako prostředí pro kultivaci bakterií, produkujících kanglemycin C, lze použít jakékoliv prostředí, pokud obsahuje přiměřené zdroje živin jež mohou bakterie produkující kanglemycin C, asimilovat. Jako zdroj uhlíku, který lze použít je například glycerin, glukosa, maltosa, sacharosa, dextrin, škrob, oleje a tuky atd. Jako zdroje dusíku, které lze použít, jsou organické látky jako sojová suspenze, očkovaná suspenze ze semen bavlny, masový extrakt, pepton, sušené droždí, suspenze z droždových kvasinek, droždový extrakt, roztok z máčené kukuřice atd.; anorganické látky jako dusičnan amonný, síran amonný, dusičnan sodný, uhličitan vápenatý, chlorid amonný atd.

Pokud je to nezbytné a potřebné, mohou být přidány anorganické soli, jako chlorid sodný, chlorid draselný, malaty (jablčnany), soli těžkých kovů atd., aminokyseliny a vitaminy.

Aby se předešlo pění během fermentace, je vhodné také přidávat konvenčním způsobem přiměřené odpěňovací prostředky, například silikon, sojový olej atd.

Pro kultivaci je nejvýhodnější způsob hlubokého vzdušného odstřeďování, které se konvenčně používá při výrobě antibiotik.

Teplota při kultivaci není zvláště omezována pokud jde o kanglemycin, může být produkován například při teplotě v rozmezí od 25 °C do 37 °C, aniž by docházelo k zabraňování růstu bakterií, produkujících kanglemycin C. Zvláště výhodné je teplotní rozmezí od 27 °C do 32 °C.

Kultivace obecně trvá, dokud se dostatečně akumuluje kanglemycin C. Doba kultivace kolísá v závislosti na složení kultivačního prostředí a na teplotě inkubace. Obvykle se žádaný kanglemycin C získává kultivováním po dobu 20 hodin až 60 hodin.

Kultivace se může provádět tak, jak je podrobněji uvedeno dále v Příkladu 1. Kmen 1747-64 je podroben šikmému kultivování v šikmé kultivační půdě, složené ze škrobu, chloridu sodného, dusičnanu draselného, agaru atd. Pak se sebere z šikmé kultivační půdy koláč (vrstva) mycelia a inokuluje se na očkovanou kultivační půdu. Očkovaná kultivační půda se skládá z glukosy, droždového extraktu, sójového extraktu, hydrogenfosforečnanu draselného, síranu amonného atd. Inkubace trvá na očkované kultivační půdě při teplotě 25 °C až 32 °C od 24 hodin do 55 hodin. Takto získaná očkovaná fermentační živná půda se převede do fermentačního prostředí, kde následuje kultivování při teplotě od 25 °C do 32 °C po dobu 68 hodin až 96 hodin. Fermentační prostředí je složeno z glukosy, droždového extraktu, sójové suspenze, peptonu, uhličitanu vápenatého atd. Z takto získané fermentační živné půdy se sklízí kanglemycin C.

K izolování kanglemycinu C z takto získané fermentační živné půdy se používá vhodný přiměřený způsob izolace.

Fermentační živná půda se například filtruje a mycelium se izoluje známými způsoby pro izolování, například odstřeďováním. Z kapaliny nad sedimentem se může kanglemycin C izolovat, čistit a získávat extrakcí rozpouštědlem za použití vhodného rozpouštědla, chromatograficky s použitím adsorpce nebo schopnosti iontové výměny, jednoduše nebo v kombinaci.

Kanglemycin C podle tohoto vynálezu má účinek silně inhibovat imunní buňky, zvláště konverzi buněk sleziny. Podle tohoto vynálezu se připravuje imunosupresant, obsahující jako účinnou složku kanglemycin C nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli. Imunosupresant podle tohoto vynálezu může být aplikován teplokrevným živočichům, včetně lidí, v účinné dávce kanglemycinu C. Tento imunosupresant může být dáván injekcemi parenterálně; alternativně může být tento imunosupresant také podáván perorálně nebo jiným parenterálním způsobem než injekcemi. Dávka kanglemycinu C může velmi záviset na subjektu, jemuž je podáván nebo na způsobu, jímž je podáván, avšak všeobecně se dávka pohybuje v rozmezí od 0,1 mg/kg/den do 100 mg/kg/den, s výhodou od 0,5 mg/kg/den do 50 mg/kg/den.

Farmaceutické přípravky nejsou nijak zvláště omezeny. Kanglemycin C se připravuje ve formě kapalného nebo pevného preparátu, obsahujícího od 0,01 hmotn. % do 50 hmotn. % kanglemy-

cinu C, vztaženo na celkovou hmotnost preparátu, spolu s běžně používanými farmaceutickými aditivy, například nosiči, pomocnými prostředky atd. Tento preparát se podává perorálně nebo parenterálně.

Jak je uvedeno v předcházejícím popisu, kanglemycin, který je nová fyziologicky účinná látka, je možné získat z fermentační živné půdy kmene 1747-64, náležejícího do rodu Nocardia. Kanglemycin C silně inhibuje přeměnu imunních buněk, zvláště buněk sleziny a silně inhibuje bujení nádorových buněk. Kromě toho může být kanglemycin C výhodně připravován z průmyslového hlediska, protože má neobyčejně malou relativní molekulovou hmotnost v porovnání se známými imunopresanty.

Lze předpokládat, že kanglemycin C je slibným imunopresantem příští generace, neboť kanglemycin C eliminuje různé nevýhody, které jsou spojeny se známými imunopresanty.

Dále je vynález podrobněji popsán v následujících Příkladech a v Testovacím příkladu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Produkce kanglemycinu C

Kmen 1747-64 se kultivuje a fermentuje. Takto získaná fermentační živná půda se extrahuje organickým rozpouštědlem. Kanglemycin C se izoluje a čistí z extraktu pomocí kolonové chromatografie. Podmínky jsou podrobně uvedeny:

1. Šikmá kultivační půda(%): KNO_3 0,1; NaCl 0,5; K_2HPO_4 0,05; FeSO_4 0,01; škrob 2; agar 1,7; chladná převařená voda, pH 7,0; inkubace při teplotě 28°C po dobu 5 až 7 dní;
2. Očkovaná kultivační půda (%): glukosa 2,5; práškové droždí 0,5; KCl 0,25; sójová suspenze 0,5; K_2HPO_4 0,02; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5; MgSO_4 0,02; CaCO_3 0,5; pitná voda 100 ml; (pH se neupravovalo);
3. Složení fermentačního prostředí (%): glukosa 3; práškový droždíový extrakt 1, sójová suspenze 0,5; pepton 0,2; CaCO_3 0,1; pitná voda 100 ml (pH se neupravovalo).

Výše popsaná prostředí se všechna sterilizují při teplotě 121°C po dobu 30 minut v autoklávu a uchovají se pro použití.

Smyčka kultury kmene 1747-64 se inokuluje do třepací láhve o objemu 250 ml, naplněné 50 ml očkované kultivační půdy a pak se kultivuje při teplotě 28 °C po dobu 48 hodin v rotační třepačce (při 180 až 200 otáčkách za minutu). Takto získaná očkovaná kultivační živná půda se převede do třepací láhve o objemu 500 ml, která obsahuje 50 ml fermentačního prostředí v poměru k 10 % (objemově). Po kultivaci při teplotě 28 °C po dobu 72 hodin v rotační třepačce (při 180 až 200 otáčkách za minutu) se získá fermentační živná půda.

Takto získaná fermentační živná půda se filtruje a hodnota pH filtrátu se upraví na 4 přidavkem anorganické kyseliny. Filtrát se extrahuje butylacetatem. Extrakt se koncentruje a získaný koncentrát se podrobí chromatografii se silikagelem. Po eluování směsí chloroformu a methanolu (30:1) se aktivní frakce v eluátu spojí a zkoncentrují. Takto získaný koncentrát se dále čistí na SephadexTM LH-20 koloně s ethanolem. Aktivní frakce eluátu s ethanolem se spojí a koncentrují. Rekrystalizací z ethanolu se získá čištěný kanglemycin C. Kanglemycin C tvoří nažloutlé jehličky a rozkládá se při teplotě 170 °C. Relativní molekulová hmotnost této látky je 326 a její optická aktivita je:

$$[\alpha]_D^{25} + 150^{\circ} \text{ (c 0,57, MeOH);}$$

maximum absorpčního spektra v ultrafialové oblasti v methanolu je při vlnové délce 232 nm a 256 nm (viz obr. 1); v infračerveném absorpčním spektru při 3400 cm⁻¹, 1690 cm⁻¹, 1650 cm⁻¹, 1640 cm⁻¹, 750 cm⁻¹ (viz obr. 2). Tato sloučenina je rozpustná v polárním organickém rozpouštědle avšak nerozpustná ve vodě a v nepolárních organických rozpouštědlech.

Příklad 2

Izolace a čištění kanglemycinu C

K 33 l fermentační živné půdy, získané podobným způsobem jako v Příkladu 1, se přidá 20 l butylacetatu. Hodnota pH této směsi se upraví na 4,0 přidavkem 3N-HCl a extrahuje se. Organická fáze se vysuší do sucha za sníženého tlaku a získá se 3,12 g zbytku. Tento zbytek se rozpustí v methanolu a k roztoku se přidá 30 g silikagelu (vyrobeného v Chingtao Kako Factory) - methanolu, v němž se rozpustí zbytek, se dává 30 ml.

Směs se odpaří do sucha za sníženého tlaku. Zbytek se umístí do kolony o objemu 800 ml se silikagelem a s chloroformem. Kolona se vyvíjí směsí chloroform:methanol(30:1) a shromažďují se žádané frakce. Takto se získá 25,3 mg nahnědlého prášku. Tento prášek se rozpustí v ethanolu. Roztok pak prochází kolonou se 300 ml Sephadexu LH-20 (chráněná značka; vyrábí se ve Pharmacia Fine Chemicals Inc.) a vyvíjí se za pomoci ethanolu. Žádané frakce se shromažďují a odpařují do sucha za sníženého tlaku. Zbytek se rekrystalizuje z malého množství ethanolu a takto se získá 9,5 mg kanglemycinu C ve formě nažloutlých jehliček.

Teplota tání: 170 °C (rozklad)

EI-MS m/z: 326 (M^+)

Elementární analýza: ($C_{19}H_{18}O_5$)

Vypočteno: C 69,93; H 5,55

Nalezeno: C 69,58; H 5,60

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) (viz obr. 3):

204,02 (s); 160,58 (s), 70,92 (s); 20,47 (t);
195,0 (s); 159,50 (s); 136,66 (d), 134,58 (s);
43,62 (d); 23,75 (q), 123,95 (d), 46,52 (t);
31,47 (t); 44,89 (d); 117,69 (s); 122,68 (d);
118,21 (d); 196,90 (s); 54,93 (d)

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6)

5,78 (1H, brs); 1,98 (3H, s); 2,79 (1H, d,
J = 18,54); 2,35 (1H, d, J = 18,54); 1,57 (2H, m);
1,98 (1H, m); 1,79 (1H, m); 1,98 (1H, t);
7,30 (1H, d), 7,75 (1H, t); 7,55 (1H, d), 2,91
(1H, d); 3,37 (1H, d)

HPLC: Kolona: Senshu Pak ODS-2151-A 66 x 150 mm

Teplota: 35 °C

Detekce: UV (232 nm)

Mobilní fáze: CH_3CN : 0,1M-fosforečnanový tlumivý roztok
(pH 6,0) = 4:6

Retenční čas: 7,41 minut (kanglemycin C)

Testovací příklad

Imunosupresivní účinnost a inhibiční účinnost na růst nádorových buněk , kterou má kanglemycin C a toxicita

Při podávání kanglemycinu C v dávce 0,5 $\mu\text{g/ml}$ dosáhla inhibiční rychlost přeměny lymfocytů sleziny u myši hodnoty 96,9 %. Když se slezinové buňky myši kultivovaly, neprokazoval kanglemycin C toxicitu do hodnoty dávky 40 $\mu\text{g/ml}$, což indikuje, že se neprojevuje žádná toxicita vůči spermatogenním buňkám v koncentraci do 1 mg/ml.

Při intravenózní aplikaci kanglemycinu C myším v dávce 2 mg/kg nebylo pozorováno žádné úmrtí. Tím se potvrzuje, že toxicita je velmi nízká.

Kanglemycin C inhibuje bujení K562 leukémických buněk při koncentraci 0,1 $\mu\text{g/ml}$ nebo menší a inhibuje bujení HeLa S₃ buněk při koncentraci 0,1 $\mu\text{g/ml}$.

Příklad 3

Příprava tablet

Směs 30 hmotnostních dílů kanglemycinu C, 120 hmotnostních dílů krystalické laktózy, 147 hmotnostních dílů krystalické celulózy a 3 hmotnostní díly stearátu hořečnatého se tabletují za použití mísiče ve tvaru V a získají se tak tablety o hmotnosti 300 mg.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Kanglemycin C, který je fyziologicky účinnou látkou, mající následující fyzikálně chemické vlastnosti a jeho farmaceuticky přijatelné soli.

1. Relativní molekulová hmotnost (EI-MS): m/z 326 (M^+)

2. Molekulový vzorec: $C_{19}H_{18}O_5$

3. Teplota tání: 170 °C (rozklad)

4. Optická aktivita:

$$[\alpha]_D^{25} + 150^\circ \text{ (c 0,57, MeOH)}$$

5. Ultrafialové absorpční spektrum (MeOH):

$$\lambda_{\max}^{nm} \text{ (log } \epsilon \text{) } 232 \text{ (4,61), } 356 \text{ (3,93)}$$

6. Infračervené absorpční spektrum (KBr) (cm^{-1}):
3400, 1690, 1650, 1640

7. ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6):

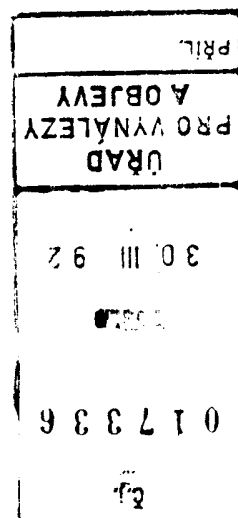
204,02 (s); 160,58 (s); 70,92 (s);
20,47 (t); 195,0 (s); 159,50 (s);
136,66 (d); 134,58 (s); 43,62 (d);
23,75 (q); 123,95 (d); 46,52 (t); 31,47 (t);
44,89 (d); 117,69 (s); 122,68 (d);
118,21 (d); 196,90 (s); 54,93 (d).

8. 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6)

5,78 (1H, brs); 1,98 (3H, s); 2,79 (1H, d, $J = 18,54$);
2,35 (1H, d, $J = 18,54$); 1,47 (2H, m); 1,98 (1H, m);
1,79 (1H, m); 1,98 (1H, t); 7,30 (1H, d); 7,75 (1H, t);
7,55 (1H, d); 2,91 (1H, d); 3,37 (1H, d).

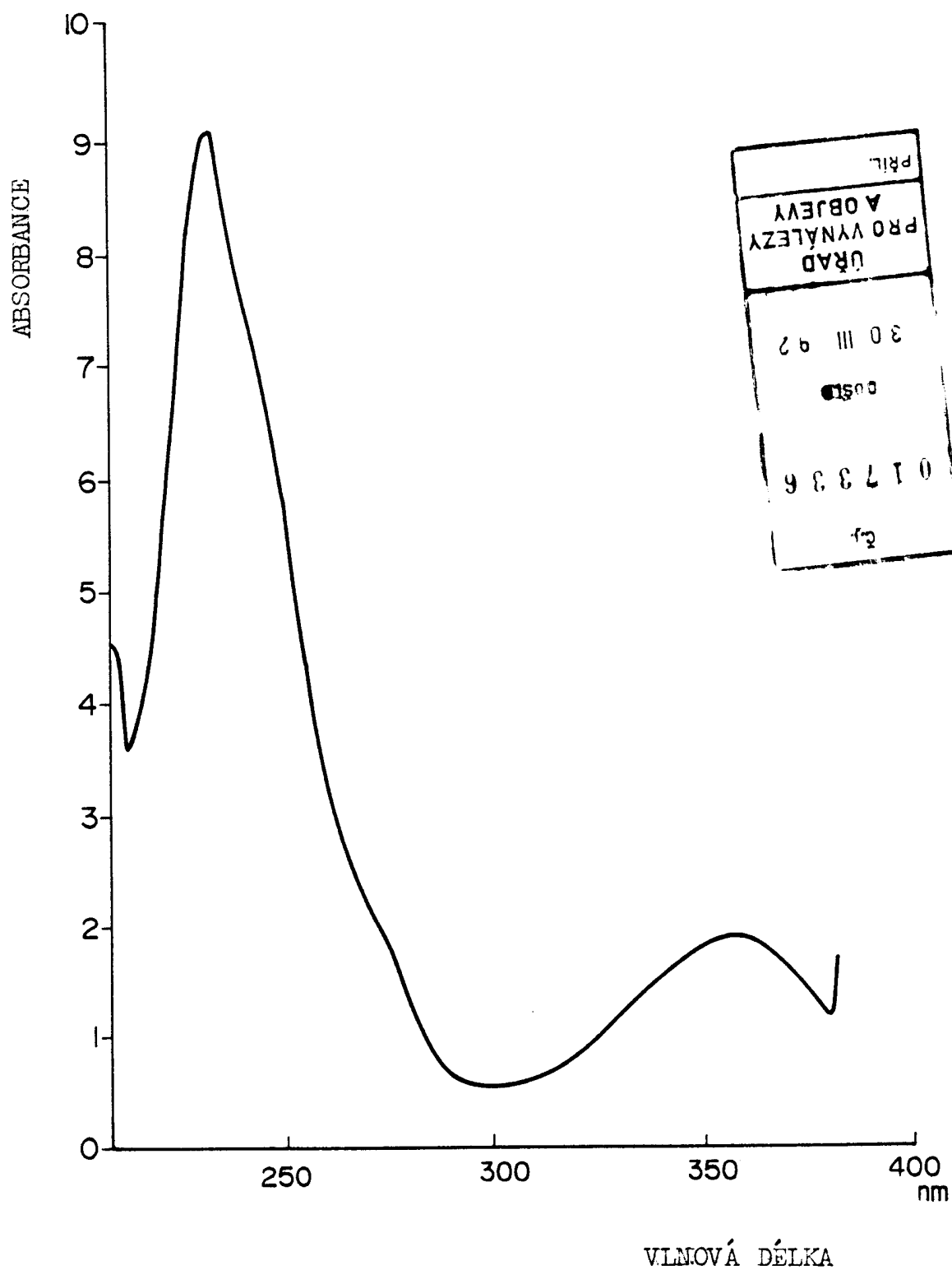
2. Způsob přípravy kanglemycinu C podle bodu 1, který je fyziologicky účinnou látkou a jeho solí, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se kultivuje kanglemycin C produkující mikroorganismus, náležející do rodu Nocardia a z fermentační živné půdy se získává kanglemycin C.

3. Farmaceutický prostředek podle bodu 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jako účinnou složku kanglemycin C který je fyziologicky účinnou látkou, nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl.



4. Farmaceutický prostředek podle bodu 3, který je vhodný pro imunosupresi.
5. Kmen, náležející do rodu Nocardia a schopný produkovat kanglemycin C, který je fyziologicky účinnou látkou.
6. Kmen, schopný produkovat kanglemycin C podle bodu 3, který je Nocardia mediterranei var. kanglensis 1747-64 (FERM BP-3718).
7. Způsob pro imunopresi, v y z ň a č u j í c í s e t í m, že se savcům podává kanglemycin C podle bodu 1, který je fyziologicky účinnou látkou, nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl, a to ve farmakologicky účinném množství.
8. Použití kanglemycinu C, který je fyziologicky účinnou látkou, nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, jako farmaceuticky účinné ingredience.
9. Použití kanglemycinu C, který je fyziologicky účinnou látkou, nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, pro přípravu farmaceutického prostředku pro imunosupresi.

594-92



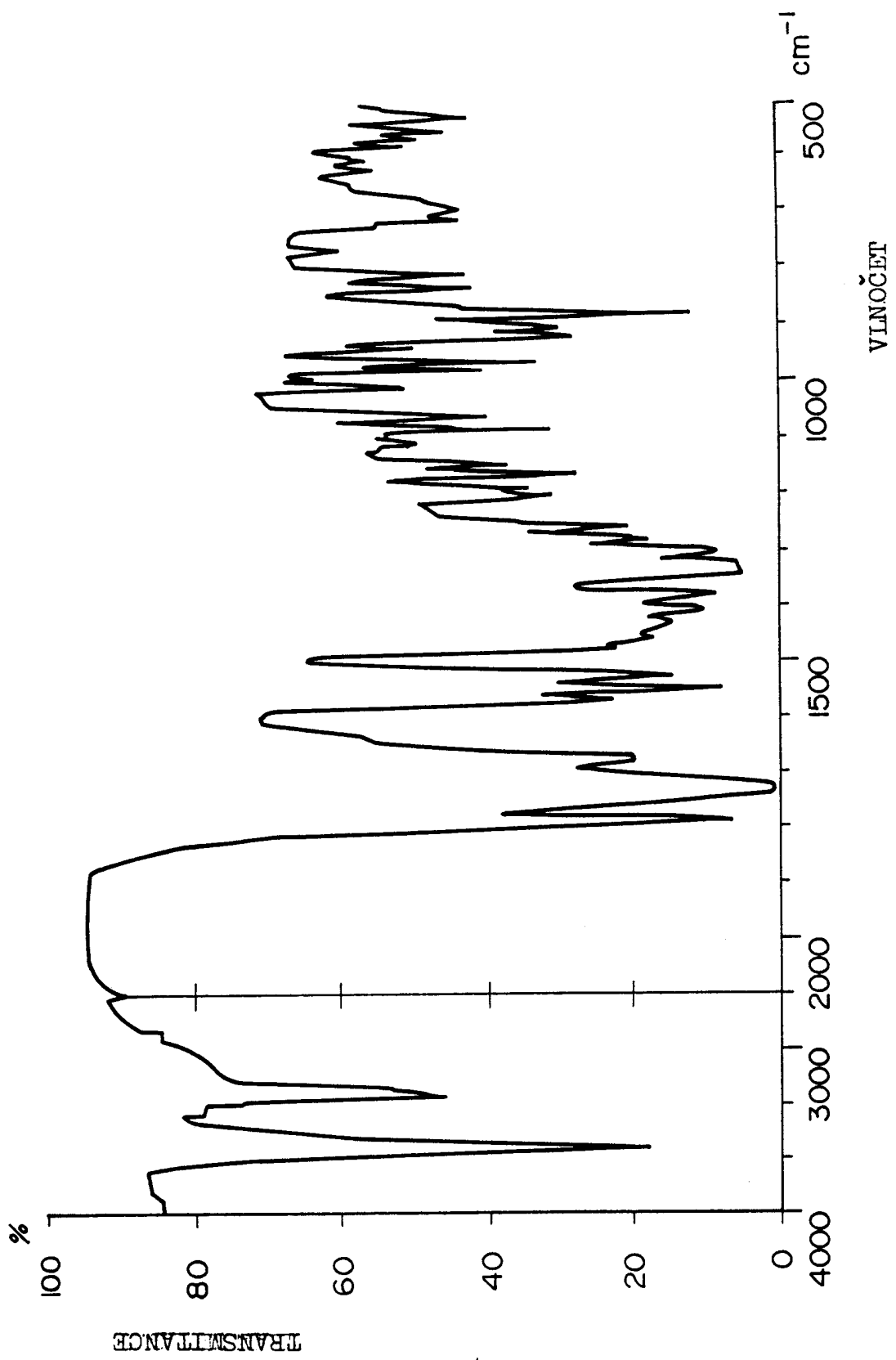
594-92 30.2

URAD
PRO VYNALEZY
A OBJEVY
PRIL.

30 III 92

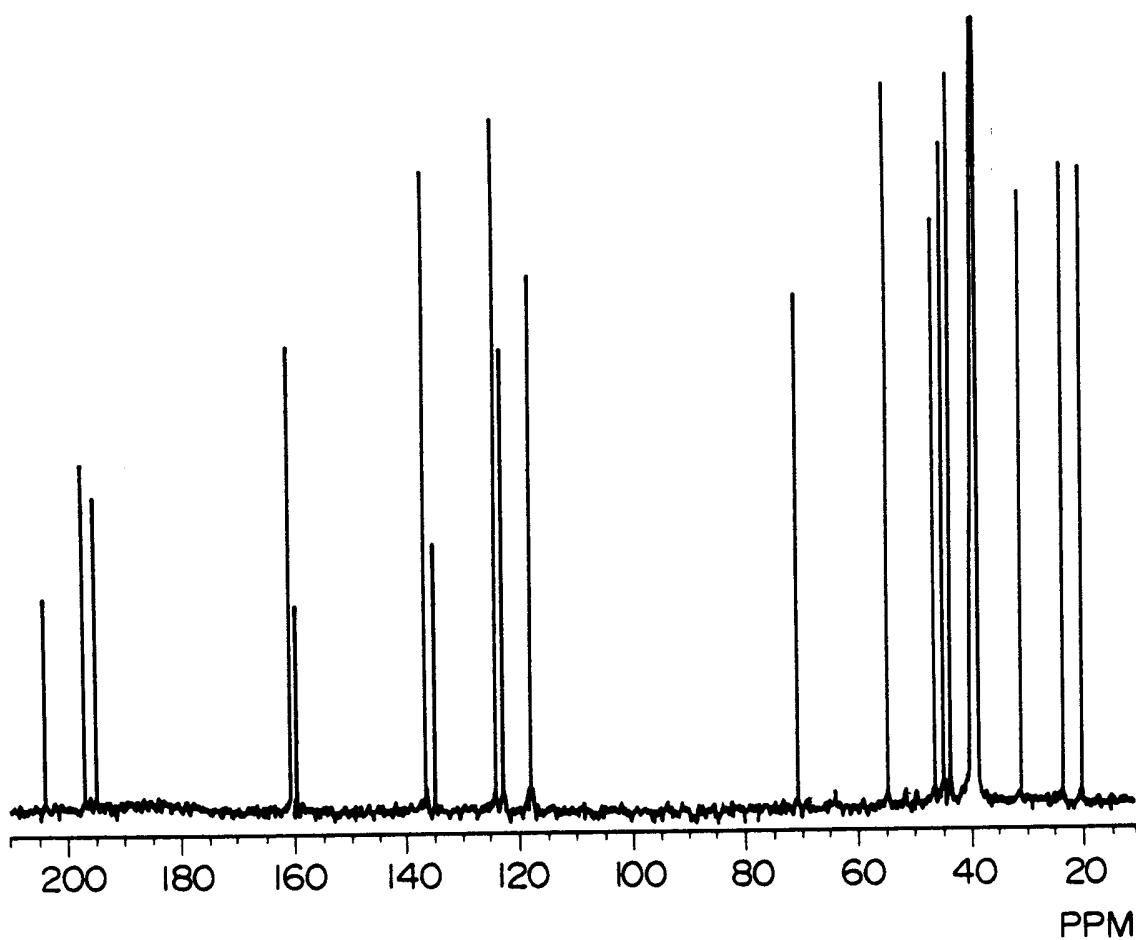
98821

12



594-92

PRIL
PROVYNALEZY
A OBJEVY
URAD
017336
30 III 92
0.510
2.2



OBR. 3

594-92

017336	0.510	30 III 92	ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	PŘÍL.
--------	-------	-----------	----------------------------------	-------

