

# KONFORMAČNÍ FLEXIBILITA CYKLOSPORINŮ<sup>†</sup>

**BOHUMIL KRATOCHVÍL<sup>a</sup>, MICHAL HUŠÁK<sup>a</sup>  
a ALEXANDR JEGOROV<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Ústav chemie pevných látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, e-mail: bohumil.kratochvil@vscht.cz, michal.husak@vscht.cz, <sup>b</sup>Galena a.s., výzkumná jednotka, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, e-mail: alexandr\_jegorov@galena.cz

Došlo dne 16.XI.2000

Klíčová slova: cyklosporin, konformace, klatráty

## Obsah

1. Úvod
2. Přehled cyklosporinových struktur
3. Konformace cyklosporinového skeletu
  - 3.1. Konformace cyklosporinů ve volné formě v roztoku a v krystalech
  - 3.2. Cyklosporinové klatráty
  - 3.3. Konformace cyklosporinů v komplexu s cyklofilinem
  - 3.4. Konformace cyklosporinu A vázaného na FAB fragment monoklonální protilátky
4. Závěr

## 1. Úvod

Přírodní cyklosporiny jsou cyklické undekapeptidy produkované biotechnologicky, např. submerzní fermentací hub rodu *Tolypocladium*<sup>†</sup>. Největší význam má tzv. cyklosporin A (CsA = cyklo(-MeBmt<sup>1</sup>-Abu<sup>2</sup>-Sar<sup>3</sup>-MeLeu<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup>-MeLeu<sup>6</sup>-Ala<sup>7</sup>-D-Ala<sup>8</sup>-MeLeu<sup>9</sup>-MeLeu<sup>10</sup>-MeVal<sup>11</sup>-)). Aminokyselinové zbytky CsA, kromě achirálního Sar<sup>3</sup> a D-Ala<sup>8</sup>, mají L-konfiguraci. Ve srovnání s ostatními peptidy, CsA obsahuje především neobvyklou aminokyselinu, MeBmt<sup>1</sup> = (2S,3R,4R,6E)-3-hydroxy-4-methyl-2-(methylamino)-okt-6-enová kyselina<sup>2</sup> (obr. 1).

Od roku 1978 se roztok CsA používá v klinické praxi jako revoluční imunosupresivum pro potlačení reakce hostitele na tkáňové transplány a pro léčbu autoimunitních chorob (lékové formy Neoral<sup>®</sup>, Novartis a Consupren<sup>®</sup>, Galena). Podle současné představy<sup>3</sup> prochází CsA buněčnou membránou do cytoplasmy, kde se váže přes rezidua 1, 2, 3, 9, 10 a 11 na cytosolický protein cyklofilin A (CypA), peptidylprolin-*cis-trans*-isomerasu (EC 5.2.1.8). Ve vzniklém komplexu, CypA/CsA (obr. 2) je k dispozici tzv. efektorová smyčka (effector loop), tvořená zbylými rezidui (4–8), pro interakci s dalším cytosolickým proteinem – kalcineurinem (Cn), fosfoprotein fosfohydrolasou (EC 3.1.3.16). Imunosupresivní účinek této

interakce se projeví tlumením tvorby interleukinu-2, růstového faktoru T lymfocytů, které jsou, jak známo, odpovědné za imunitní odezvu v lidském organismu. Všechny detaily popsánoho mechanismu nejsou však dosud vysvětleny.

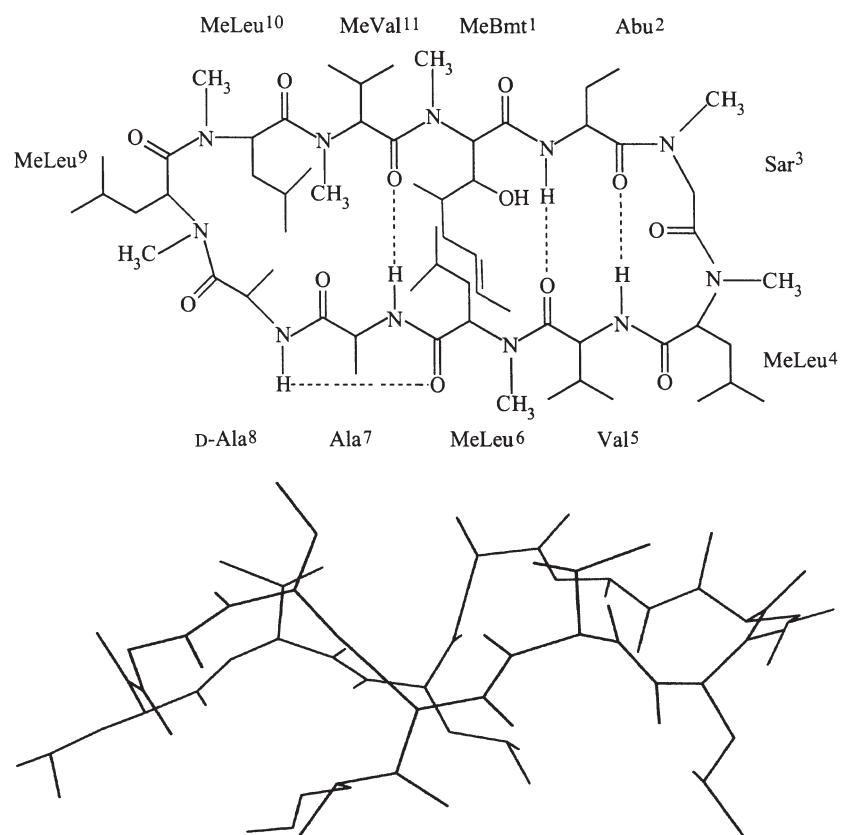
Ostatní přírodní cyklosporiny, které se od CsA liší substitucí jedné až dvou aminokyselin (v literatuře se označují např. písmeny B až Z nebo označením substituce vůči CsA, tab. I), a různé semisyntetické deriváty, vykazují nižší imunosupresivní účinek než původní CsA. Dosud se však nepodařilo nalézt ani připravit derivát, který by měl lepší imunosupresivní vlastnosti při nižších vedlejších účincích. Efekt snížení, resp. ztráta imunosupresivity je ze strukturního hlediska pozoruhodná, protože cyklosporiny jsou poměrně velké molekuly ( $M_r \approx 1200$ ), ale přesto i nepatrná chemická a tudíž i strukturní změna na jedné aminokyselině (např. demethylace) může vyvolat zásadní změnu biologické aktivity. Podle předběžných výzkumů je možné, že některé neimunosupresivní cyklosporiny by mohly být naopak aktivní při léčbě MDR (multidrug resistance)<sup>4</sup>.

Vzhledem k tomu, že změna biologické aktivity jednoznačně souvisí s konformační flexibilitou, lze získané výsledky použít při korelacích typu struktura/aktivita a drug designu. Tento článek mapuje současný stav znalostí o konformační flexibilitě cyklosporinů, především v krystalickém stavu, a je jedním z mnoha podobných, které přispívají k řešení rozsáhlého a nesnadného úkolu vysvětlit biologické děje na molekulární úrovni.

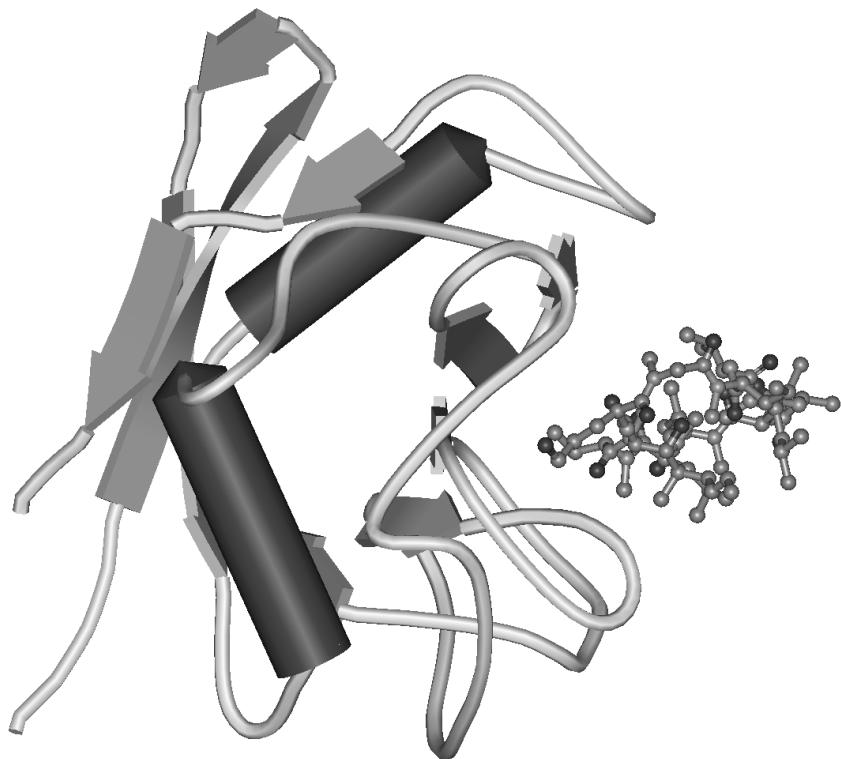
## 2. Přehled cyklosporinových struktur

Přírodních cyklosporinů a jejich metabolitů je dnes popsáno okolo 100. Cyklosporiny mohou navíc vystupovat jako ligandy v komplexech, např. s Li (viz<sup>5a,c</sup>), Na (viz<sup>5b</sup>), Mg (viz<sup>5b</sup>), Ca (viz<sup>5b,c,d</sup>), Zn (viz<sup>5d</sup>), Cu (viz<sup>5d</sup>). Na rozdíl od lineárních peptidů nemá cyklický skelet cyklosporinů k dispozici volnou karboxy nebo aminoskupinu a přítomné aminokyselinové zbytky jsou neutrální (Abu, Ala, Thr, MeVal, Val, Nva, Sar, MeLeu, Leu, Ile a MeBmt). V důsledku tohoto faktu a těsně uspořádané sekundární struktury jsou cyklosporiny lipofilní a hydrofobní. CsA má sedm N-methylovaných aminokyselinových zbytků (1, 3, 4, 6, 9, 10, 11) a tyto methylace umožňují vznik *cis/trans* izomerů peptidových vazeb (vzájemné postavení methylové skupiny a atomu kyslíku).

Nejvíce prostudovanou strukturu je samozřejmě molekula CsA, vzhledem ke svému terapeutickému používání. Cyklosporin A se původně podařilo vykristalovat ve formě dihydrátu (tetragonální prostorová grupa  $P4_1$ )<sup>2</sup>, který vzniká i ve výrobním procesu krystalizací CsA z acetonu. Vysušením dihydrátu lze připravit amorfní CsA. Později se podařilo připravit i bezvodý orthorombický cyklosporin (prostorová grupa  $P2_12_12_1$ )<sup>6</sup>. U tak významného léčiva, jakým CsA bezprochyby je, byla jeho nová modifikace ihned patentována<sup>7</sup> a to i přesto, že potenciální lékové formy, v nichž by se krystalický CsA mohl uplatnit, např. topické masti (masti užívané lokál-



Obr. 1. Struktura cyklosporinu v CsA dihydrátu, systém intramolekulárních H-vazeb (nahore), antiparalelní  $\beta$ -list (dole)



Obr. 2. Komplex cyklofilinu A (vlevo) s cyklosporinem A (vpravo), efektivní smyčka na CsA zřetelně vystupuje z povrchu proteinu

Tabulka I  
Přírodní cyklosporiny, kromě CsA, formulované jako jeho substituční deriváty<sup>27,28</sup>

Název	Složení	Název	Složení
CsB	[Ala <sup>2</sup> ] CsA	CsP	[Bmt <sup>1</sup> ,Thr <sup>2</sup> ] CsA
CsC	[Thr <sup>2</sup> ] CsA	CsQ	[Val <sup>4</sup> ] CsA
CsD	[Val <sup>2</sup> ] CsA	CsR	[Leu <sup>6,10</sup> ] CsA
CsE	[Val <sup>11</sup> ] CsA	CsS	[Thr <sup>2</sup> ,Val <sup>4</sup> ] CsA
CsF	[3'-desoxy-MeBmt <sup>1</sup> ] CsA	CsT	[Leu <sup>10</sup> ] CsA
CsG	[Nva <sup>2</sup> ] CsA	CsU	[Leu <sup>6</sup> ] CsA
CsH	[D-MeVal <sup>11</sup> ] CsA	CsV	[Abu <sup>7</sup> ] CsA
CsI	[Val <sup>2</sup> ,Leu <sup>10</sup> ] CsA	CsW	[Thr <sup>2</sup> ,Val <sup>11</sup> ] CsA
CsJ	[MeLeu <sup>1</sup> ] CsA	CsX	[Nva <sup>2</sup> ,Leu <sup>9</sup> ] CsA
CsK	[3'-desoxy-MeBmt <sup>1</sup> ,Val <sup>2</sup> ] CsA	CsY	[Nva <sup>2</sup> ,Leu <sup>6</sup> ] CsA
CsL	[Bmt <sup>1</sup> ] CsA	CsZ	[N-methyl-2-aminooctanová kys. <sup>1</sup> ] CsA
CsM	[Nva <sup>2,5</sup> ] CsA		-[Leu <sup>5</sup> ] CsA
CsN	[Nva <sup>2</sup> ,Leu <sup>10</sup> ] CsA		-[Leu <sup>4</sup> ] CsA
CsO	[MeLeu <sup>1</sup> , Nva <sup>2</sup> ] CsA		-[Ile <sup>4</sup> ] CsA

Tabulka II  
Přehled cyklosporinových struktur v krystalech stanovených difrakčními metodami

Název	Kód CSD <sup>13</sup>	Prostorová grupa	Systém intramolekulárních H-vazeb
CsA dihydrát	DEKSAN	P 4 <sub>1</sub>	typ CsA dihydrát
CsA monohydrát	KEPNAU	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	typ CsA dihydrát
CsA dimethylisosorbid solvát	TECRIC	P 2 <sub>1</sub>	typ CsA DMI <sup>a</sup>
CsA di-n-butylether solvát	není zatím přidělen	P 2 <sub>1</sub>	typ CsA dihydrát
CsA tetrahydrofuran solvát	není zatím přidělen	P 2 <sub>1</sub>	typ CsA dihydrát
SulphydrylCsA	ZAJDUJ	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	typ CsA dihydrát
ThioCsA diethylether solvát	JOKMAX	P 2 <sub>1</sub>	typ CsA DMI
IodoCsA	ICSSPA	P 2 <sub>1</sub>	typ CsA dihydrát
[O-acetyl-MeBmt <sup>1</sup> ] CsA	není zatím přidělen	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	typ CsA dihydrát
[O-acetyl- $\omega$ -bromo-MeBmt <sup>1</sup> ] CsA	není zatím přidělen	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	typ CsA dihydrát
[3,O-Didehydro-MeBmt <sup>1</sup> , Val <sup>2</sup> ] CsA	ZADREB	P 3 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	typ CsA dihydrát
diisopropylether solvát hemihydrát			
[3,O-Didehydro-MeBmt <sup>1</sup> , Val <sup>2</sup> ] CsA	ZADRIF	P 3 <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub>	typ CsA dihydrát
CsE aceton solvát monohydrát	SUQNUM	P 2 <sub>1</sub>	typ CsE
CsE bis(2-butanol) monohydrát	není zatím přidělen	P 2 <sub>1</sub>	typ CsE
CsH diethylether hemisolvát monohydrát	CCDC 139242 (předběžný kód)	I 2	typ CsH
Dihydro-CsA bis( <i>tert</i> -butylmethylether) solvát	CCDC 153170 (předběžný kód)	P 2 <sub>1</sub>	typ CsA DMI
CsV bis( <i>tert</i> -butylmethylether) solvát	CCDC 153171 (předběžný kód)	P 2 <sub>1</sub>	typ CsA DMI

<sup>a</sup> Dimethylisosorbid

ně), představují pouhý zlomek trhu. Není bez zajímavosti uvést, že třetí dosud známá krystalická forma CsA byla popsána v Čechách a jedná se o monoklinický CsA s různými solventy (prostorová grupa P 2<sub>1</sub>)<sup>8,9</sup>.

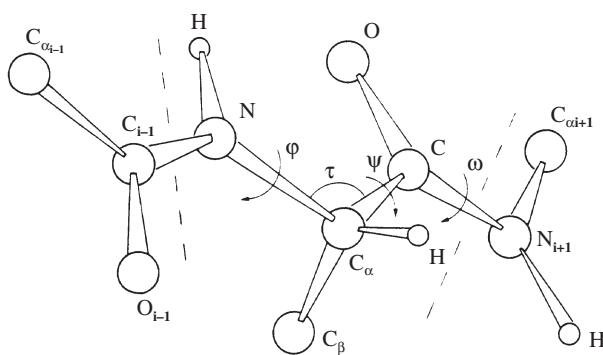
Kromě struktur CsA, krystalovaných z různých rozpouštědel, byly vyřešeny i struktury cílových proteinových receptorů s cyklosporinou. Komplex CsA s cyclofilinem A je znám v několika formách, např. monomeru<sup>10</sup> nebo dekameru<sup>11</sup>. Jak konformace cyklosporinového skeletu, tak vazebné místo na cyclofilin je však ve všech těchto formách stejně. Komplex

cyclofilin/cyklosporin A/kalcineurin (CypA/CsA/Cn) se zatím nepodařilo vykristalovat, takže jeho RTG-struktura není známa. Je však známa konformace CsA vázaného na FAB fragment monoklonální protilátky<sup>12</sup>.

Přehled všech známých cyklosporinových struktur je uveden v tabulce II a III. Uvedený přehled není a zřejmě ani nemůže být kompletní. V pozadí lze hledat i dosud neúspěšnou snahu syntetizovat modifikovanou cyklosporinovou molekulu s ještě vyšším a specifitějším imunosupresivním účinkem a nižší toxicitou (cyklosporin A je totiž nezanebatelně nefro-

Tabulka III  
Přehled cyklosporinových struktur v komplexech s proteiny a s FAB fragmentem

Experimentální technika	Ligand	Kód PDB <sup>14</sup>	Prostorová grupa
RTG-difrakce	FAB fragment (imunoglobulin Ig1-κ)	1IKF	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
RTG-difrakce	Cyklofilin A	1CWH	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
RTG-difrakce	Cyklofilin B	1CSN	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
RTG-difrakce	Cyklofilin A	2RMA, 2RMB	P 2 <sub>1</sub>
RTG-difrakce	Cyklofilin A	1MIK, 1BCK, 1CWA, 1CWB, 1CWC, 1CWF, 1CWI, 1CWJ, 1CWM, 1CWO	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
NMR	Cyklofilin A	1CSA, 3CSS, 1CSA, 1CSB	–



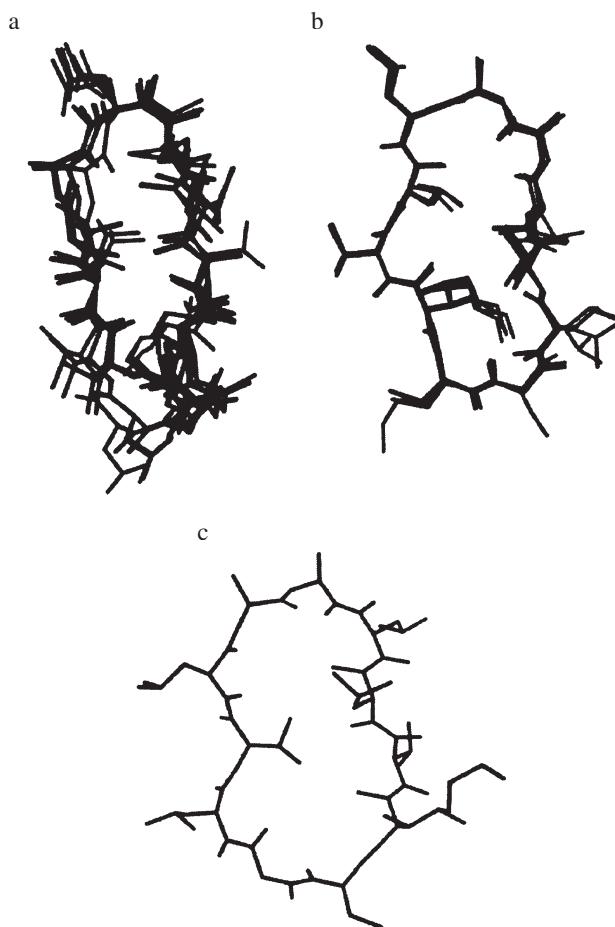
Obr. 3. Konvence značení torzních úhlů peptidových vazeb podle doporučení IUPAC-IUB komise pro biochemickou nomenklaturu (J. Mol. Biol. 52, 1 (1970)). Převzato z knihy: *Fundamentals of Crystallography* (Giacovazzo C. ed.). IUCr and Oxford University Press, New York 1992

toxický). Lze proto předpokládat, že některé struktury nebyly dosud zveřejněny. V této práci byl proto jako srovnávací materiál zvolen soubor cyklosporinových struktur obsažených především v databázích CSD (Cambridge Structural Database)<sup>13</sup> a PDB (Protein Data Bank)<sup>14</sup> a v našich nejnovějších pracích, kde kód CSD není ještě přidělen.

### 3. Konformace cyklosporinového skeletu

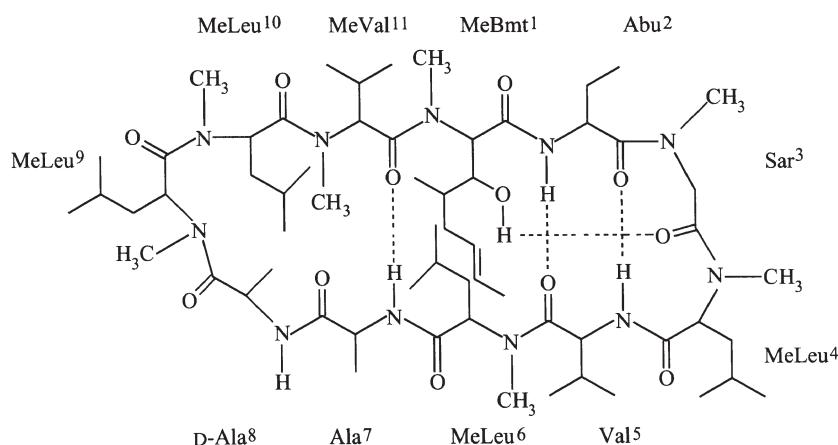
Konformace neboli prostorové uspořádání cyklosporinového skeletu je primárně dáné energetickou výhodností systému. V tomto systému se vytváří intramolekulární vodíkové vazby, které jsou dány jednak počtem donorů a akceptorů protonů, které má skelet k dispozici, a dále jejich prostorovou orientaci. Např. sekundární struktura CsA v krystalickém stavu<sup>2</sup> má tvar antiparalelního složeného β-listu se čtyřmi intramolekulárními vodíkovými vazbami: D-Ala<sup>8</sup>NH...COMeLeu<sup>6</sup>, Ala<sup>7</sup>NH...COMeVal<sup>11</sup>, Abu<sup>2</sup>NH...COVal<sup>5</sup>, Val<sup>5</sup>NH...COAbu<sup>2</sup>, (viz obr. 1). Kvalitativní informaci o určité konformaci poskytuje obrázek tvaru molekuly, kvantitativním vyjádřením jsou hodnoty konvenčních torzních úhlů (značených φ, ψ, ω) peptidových vazeb, obr. 3, tab. IV.

U CsA lze rozlišit tři zásadní konformace cyklosporinového skeletu (obr. 4):

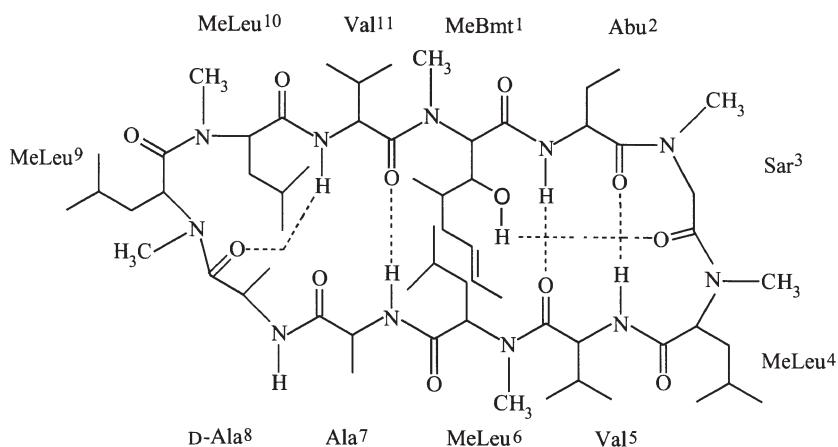


Obr. 4. Tři zásadní konformace cyklosporinového skeletu; a – ve volné formě v krystalech (pro ilustraci nakreslen překryv Cs-skeletů v DEKSAN, JOKMAX, KEPNAU, TECRIC, SUQNUM, ZAJDUJ – viz tab. II), b – v komplexech s cyklofilinem A (překryv Cs-skeletů v 2RMA, 2RMB – viz tab. III), c – s FAB fragmentem

- Konformace ve volné formě v roztoku a v krystalech
- Konformace v komplexech s cyklofilinem
- Konformace při navázání na FAB fragment monoklonální protištítky



Obr. 5. Systém intramolekulárních H-vazeb ve struktuře CsA dimethylisosorbid klatrátu



Obr. 6. Systém intramolekulárních H-vazeb ve struktuře CsE

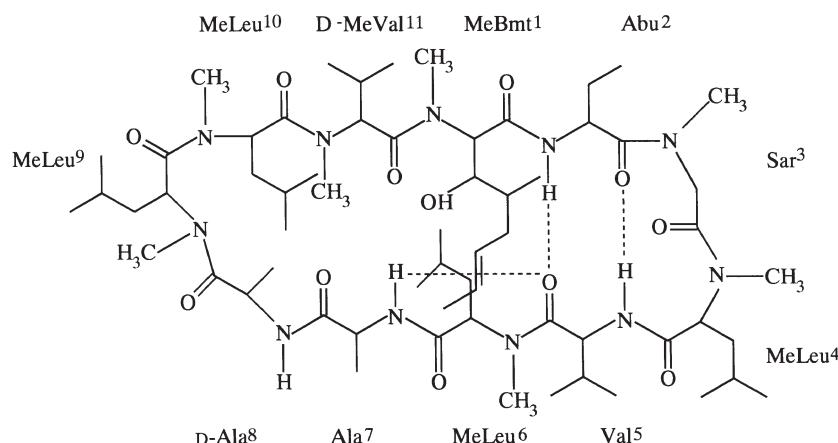
### 3.1. Konformace cyklosporinů ve volné formě v roztoku a v krystalech

Konformace CsA v nepolárních rozpouštědlech (benzen, chloroform) je velmi podobná jeho konformaci v krystalových formách (viz tab. II). V polárních rozpouštědlech však existuje několik konformací. Podobně se chová i většina ostatních přírodních cyklosporinů. Tři různé konformace CsA byly nalezeny i v pevném stavu a čkoli jsou velmi podobné, lze i zde nalézt zajímavé rozdíly. Např. struktura CsA dihydrátu<sup>2</sup> (viz typ CsA dihydrát, tab. II) obsahuje čtyři intramolekulární vodíkové vazby (viz obr. 1), přičemž atom kyslíku a methylová skupina peptidové vazby mezi MeLeu<sup>9</sup> a MeLeu<sup>10</sup> jsou vůči sobě v uspořádání *cis*. Struktura CsA dimethylisosorbid klatrátu<sup>8</sup> (viz typ CsA DMI, tab. II) obsahuje rovněž čtyři intramolekulární vazby, ale ve srovnání s CsA dihydrátem tři stejné a jednu odlišnou (obr. 5): MeBmt<sup>1</sup>OH...COSar<sup>3</sup>, Ala<sup>7</sup>NH...COMeVal<sup>11</sup>, Abu<sup>2</sup>NH...COVal<sup>5</sup>, Val<sup>5</sup>NH...COAbu<sup>2</sup>. Stejnou síť intramolekulárních H-vazeb má i CsV (Ala<sup>7</sup> je zde substituováno za Abu<sup>7</sup>) a dihydro-CsA (oba viz<sup>15</sup>).

V cyklosporinu E, obsahujícím Val<sup>11</sup> (místo MeVal<sup>11</sup> v CsA) je k dispozici skupina NH valinu, což dává vzniknout

nové intramolekulární vodíkové vazbě Val<sup>11</sup>NH...D-Ala<sup>8</sup>CO. Struktura CsE aceton solvátu monohydrátu<sup>16</sup> (viz typ CsE, tab. II) obsahuje celkem pět intramolekulárních H-vazeb (obr. 6). Srovnání tvarů molekul CsA, CsE ukazuje, že smyčka reziduů 8–11 je u CsE vlivem přítomnosti nové H-vazby (Val<sup>11</sup>NH...D-Ala<sup>8</sup>CO) podstatně více „zaškrčena“ (zhruba ze 4 Å u CsA na 3 Å u CsE). Pátá vodíková vazba podstatně přispívá ke stabilitě konformace a CsE má pouze jednu identickou konformaci v nepolárních i polárních rozpouštědlech.

CsH poskytuje v roztoku celou řadu konformerů, jejichž strukturu se dosud nepodařilo úspěšně rozšifrovat<sup>17</sup>. U CsH v pevném stavu H-vazby D-Ala<sup>8</sup>NH...COMeLeu<sup>6</sup> a Ala<sup>7</sup>NH...COMeVal<sup>11</sup> zanikají a místo nich se vytváří nová Ala<sup>7</sup>NH...COVal<sup>5</sup> (obr. 7). Diference mezi torzními úhly v CsA dihydrátu a v CsH (tab. IV) jsou výsledkem opačných prostorových orientací smyčky D-Ala<sup>8</sup>-MeLeu<sup>9</sup>-MeLeu<sup>10</sup>-MeVal<sup>11</sup>(D-MeVal<sup>11</sup>) v cyklosporinovém skeletu a jemných rozdílů mezi rezidui MeBmt<sup>1</sup> Val<sup>5</sup> a MeLeu<sup>6</sup> (obr. 8). Z tohoto důvodu může CsH být považován za samostatný konformační typ (tab. II). Přesto, že je molekula CsH velmi flexibilní nevykazuje žádnou imunosupresivní aktivitu, neboť není schopna vytvořit konformaci umožňující vazbu na cyklofilin. CsH však vyka-



Obr. 7. Systém intramolekulárních H-vazeb ve struktuře krystalického CsH

Tabulka IV

Srovnání torzních úhlů peptidových vazeb aminokyselinových zbytků u vybraných cyklosporinů

Torzní úhel [°]	CsA dihydrát				CsH.DEM <sup>a</sup>				CsA.DMI <sup>b</sup>				CsE.AM <sup>c</sup>				CsA/CypA			
$\phi_1 \psi_1 \omega_1$	-84	122	-175	-103	105	-177	-93	156	167	-103	159	167	-109	171	-178					
$\phi_2 \psi_2 \omega_2$	-120	90	-177	-105	107	-173	-118	99	-167	-118	97	-167	-116	93	-179					
$\phi_3 \psi_3 \omega_3$	71	-128	173	61	-132	176	68	-133	172	68	-130	170	128	-72	173					
$\phi_4 \psi_4 \omega_4$	-99	22	-180	-105	23	-176	-98	9	-177	-100	9	-179	-108	103	-177					
$\phi_5 \psi_5 \omega_5$	-113	125	167	-121	155	174	-85	134	176	-78	134	174	-76	122	-176					
$\phi_6 \psi_6 \omega_6$	-90	100	-165	-99	85	-173	-79	128	-174	-74	122	-175	-96	168	179					
$\phi_7 \psi_7 \omega_7$	-83	52	178	-157	142	164	-98	-5	180	-104	-13	179	-63	156	173					
$\phi_8 \psi_8 \omega_8$	88	-125	-167	67	-128	-175	150	-133	-173	163	-162	-166	100	-141	178					
$\phi_9 \psi_9 \omega_9$	-119	100	-6	-102	120	-7	-120	99	-1	-109	110	-8	-123	72	-178					
$\phi_{10} \psi_{10} \omega_{10}$	-139	65	-167	-146	70	178	-139	64	-178	-119	87	-167	-108	170	174					
$\phi_{11} \psi_{11} \omega_{11}$	-103	125	173	127	-86	170	-95	142	166	-123	137	171	-123	83	-179					

<sup>a</sup> Diethylether hemisolvát monohydrát, <sup>b</sup> dimethylisosorbid, <sup>c</sup> aceton solvát monohydrát

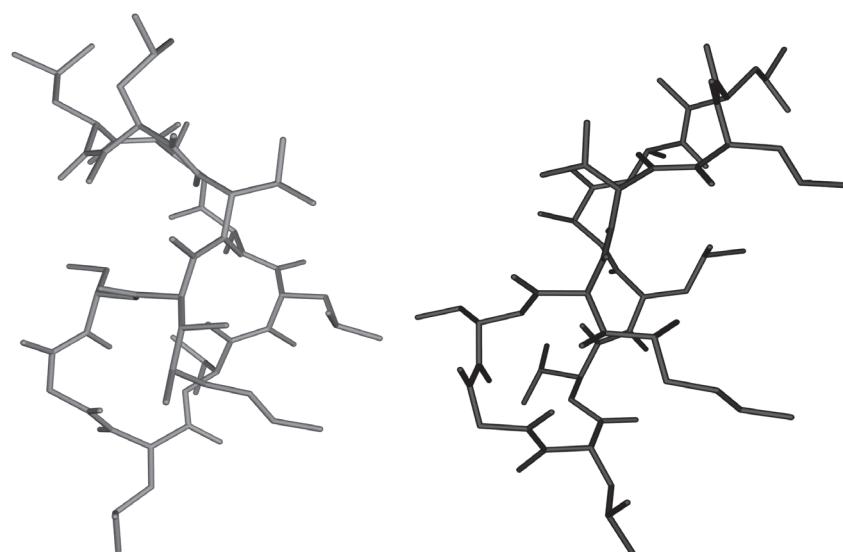
zuje některé zajímavé biologické aktivity<sup>17</sup>, které však neprobíhají přes jeho vazbu na cyklofilin, ale pravděpodobně na jiné, nám dosud neznámé, vazebné struktury.

### 3.2. Cyklosporinové klatráty

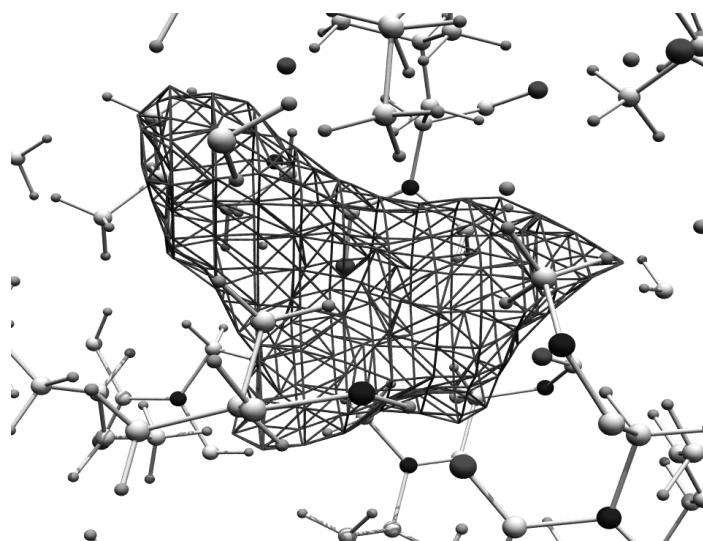
Pojem *cyklosporinové klatráty* byl poprvé použit Jegorovem a spol.<sup>9</sup> a pravděpodobně se jedná o první popis klatrát tvořených peptidy. Molekuly cyklosporinů jsou v krystalech uspořádány tak, že se mezi nimi vytváří různě velké a různě orientované dutiny neboli kavy. Zatím však nebyl pozorován případ, že by molekula solventu vstoupila dovnitř cyklosporinového skeletu, jako např. u cyklodextrinů při separaci enantiomeru<sup>18</sup>. Tvar a objem kavít lze vypočítat a graficky modelovat, obr. 9 (např. programem PLATON<sup>19</sup> nebo programem MarchingCubeELD<sup>20</sup>). Tak lze pro různé cyklosporinové klatráty stanovit maximální počet nevodíkových atomů, které lze do kavít směstnat. Cyklosporinový klatrát však zdánlivě krysaluje i molekulou rozpouštědla, která obsahuje i polovinu maximálního počtu nevodíkových atomů teoreticky umístitelných do kavít.

Chiralita samotného cyklosporinového skeletu, disymetrie kavit a možnost vytváření vodíkových vazeb s hostující molekulou solventu nabízí i možnost využití preferenční krystallizace k separaci různých enantiomerů. Hušák a spol.<sup>21</sup> testovali inkorporaci celkem tří typů chirálních molekul. Byly syntetizovány nesymetrické chirální ethery, avšak nepodařilo se nalézt vhodný analytický systém pro separaci enantiomerů. Inkorporace (R,S)-2-butanolu do CsE prokázala, že tato molekula je příliš malá a v kavítě byly nalezeny oba enantiomery. Každý z těchto enantiomerů však zaujímá specifickou pozici, což podporuje potenciální možnost diskriminace větších chirálních molekul. Jako další byl testován (R,S)-butyl-laktát, avšak i zde bylo u klatrátu CsE nalezeno zastoupení obou enantiomerů v poměru 1:1. I tato molekula s 10 nevodíkovými atomy je zjevně příliš malá vzhledem k velikosti kavity. Bylo prokázáno, že diverzita cyklosporinů potenciálně umožňuje modifikaci nejen velikost kavity, ale i symetrii inkorporace hostující molekuly. Např. v klatrátech dihydro-CsA a CsV s *tert*-butylmethyletherem má jedna z molekul *tert*-butylmethyletheru zcela odlišnou orientaci v kavítě.

Dále bylo zjištěno, že relativně velká konformační stabilita



Obr. 8. CsH (vlevo), CsA dihydrát (vpravo)



Obr. 9. Modelovaní kavity v CsA dimethylisosorbid klatrátu pro lokalizaci dimethylisosorbidu

cyklosporinových molekul v krystalickém stavu způsobuje preferenci určitého symetrického uspořádání. Z tohoto hlediska byla identifikována dvě výrazně preferovaná uspořádání a sice symetrie monoklinické prostorové grupy  $P2_1$  a symetrie orthorombické prostorové grupy  $P2_12_12_1$ . Pro typ  $P2_1$  a počet vzorcových jednotek v elementární buňce  $Z = 2$  je charakteristická právě přítomnost velkých kavit (až  $562 \text{ \AA}^3$ ), pro typ  $P2_12_12_1$  přítomnost malých kavit (okolo  $20 \text{ \AA}^3$ ), které nejsou obsazeny buď žádným solventem (např. acetyl-CsA nebo acetyl-bromo-CsA (oba viz<sup>22</sup>) nebo pouze molekulou vody (např. CsA dihydrát).

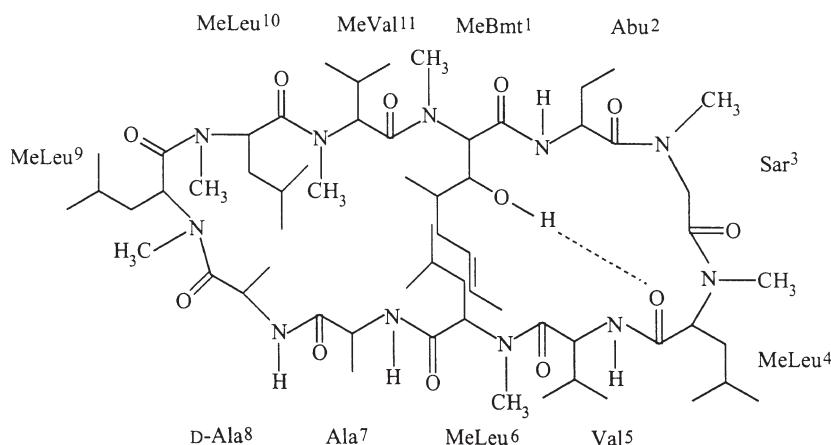
Konformace cyklosporinů v klatrátech se liší od konformace cyklosporinu A v dihydrátu v zásadě pouze orientací postranního řetězce rezidua MeBmt<sup>1</sup>, přičemž samotná rezidua 1–5 jsou, podobně jako u CsA dihydrátu, v uspořádání nesouhlasně orientovaného  $\beta$ -skládaného listu a rezidua 7–11 tvoří

otevřenou smyčku s peptidovou *cis*-vazbou mezi rezidui 9–10.

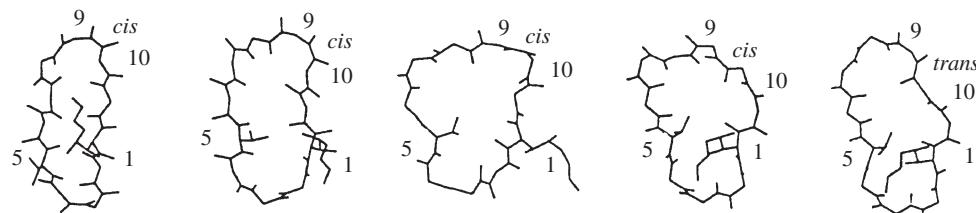
Vzhledem ke snadné tvorbě, tvaru i kvalitě krystálů představuje postup krystalizace cyklosporinů ve formě izostrukturálních klatrátů i výbornou metodu jak přímět ke krystalizaci neznámé cyklosporiny. Tato metoda byla např. úspěšně použita pro primární identifikaci CsV. Postup byl testován i pro různé metabolity cyklosporinu a podařilo se takto vyřešit strukturu dihydro-CsA (dihydro-metabolity vznikají pravděpodobně zpětnou resorpčí ze střeva v důsledku působení střevní mikroflory).

### 3.3. Konformace cyklosporinů v komplexech s cyklofilinem

Vazba cyklosporinů na cyklofilin přímo koreluje s jejich immunosupresní aktivitou<sup>23</sup>. Při interakci volného cyklo-



Obr. 10. Systém intramolekulárních H-vazeb CsA v komplexu CsA/CypA

Obr. 11. Trajektorie konformační změny: volný CsA (vlevo) → receptorově-vázany CsA (vpravo) (převzato a upraveno z cit.<sup>24</sup>)

sporinu A s cyklofilinem A se razantně mění konformace cyklosporinového skeletu. Původní čtyři intramolekulární H-vazby ve volném CsA (viz obr. 1) se redukují na jednu (MeBmt<sup>1</sup>OH...COMeLeu<sup>4</sup>) v CsA vázaném v komplexu s CypA (obr. 10). Dále je podstatné, že při této interakci se mění i vzájemné postavení atomu kyslíku a methylové skupiny peptidové vazby mezi MeLeu<sup>9</sup> a MeLeu<sup>10</sup> z konfigurace *cis* (volný CsA) na *trans* (vázany CsA). Köck a spol.<sup>24</sup> modelovali molekulární mechaniku konformační přechod: volný CsA (v chloroformu, resp. v tetrahydrofuranu) → vázany CsA (v komplexu s receptorem). Zjistili, že ke konverzi dojde během několika desítek ps. Trajektorie této konverze zahrnuje protocení postranních řetězců MeBmt<sup>1</sup> a Val<sup>5</sup> a již zmíněnou změnu izomerie *cis/trans* (obr. 11).

Kallen a spol.<sup>3</sup> porovnali RTG-struktury desíti komplexů různých cyklosporinů s cyklofilinem A. Zjistili, že všechny komplexy jsou izomorfní, krystalizující v prostorové grupě  $P2_1\bar{2}_1\bar{2}_1$  s velmi blízkými mřížkovými parametry, s jedinou výjimkou CypA/[D-MeSer<sup>3</sup>] CsA, který krystaluje v grupě  $P2_12_12$ . Měření imunosupresivní aktivity těchto analogů (produkce interleukinu-2) potvrdilo, že žádny nevykazuje větší aktivitu než CypA/CsA. Vazebnou doménu CsA pro interakci s cyklofilinem tvoří vždy řetězec MeLeu<sup>9</sup>-MeLeu<sup>10</sup>-MeVal<sup>11</sup>-MeBmt<sup>1</sup>-Abu<sup>2</sup>-Sar<sup>3</sup>.

### 3.4. Konformace cyklosporinu A vázанého na FAB fragment monoklonální protilátky

Zatímco mechanismus imunosupresivního účinku cyklosporinů je zprostředkován jejich vazbou na cyklofilin, není to

zdaleka jediný protein, který je schopen cyklosporiny vázat. Kromě struktur s cyklofilinem byla RTG difrací studována konformace CsA navázaného na FAB fragment monoklonální protilátky, zejména pro lepší pochopení mechanismu rozpoznání antigenu (cyklosporinu) protilátkou. Nalezená konformace CsA je velmi otevřená a neobsahuje ani jednu intramolekulární H-vazbu, čímž se výrazně liší od struktur volného CsA i jeho komplexu s cyklofilinem. Představuje tudíž třetí, výrazně odlišný typ konformace CsA (viz obr. 4c). Dalším proteinem schopným vázat cyklosporiny je např. P-glykoprotein podílející se na transmembránovém transportu cyklosporinu (a mnoha dalších látek) a vzniku MDR, kdy molekuly léčiv jsou exportovány ven z buněk a tak není možné dosáhnout jejich účinné koncentrace. Vazba cyklosporinů nijak nekontrahuje s jejich imunosupresivní aktivitou a P-glykoprotein se váže na doménu CsA tvořenou řetězcem aminokyselin MeLeu<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup>-MeLeu<sup>6</sup>-Ala<sup>7</sup>-D-Ala<sup>8</sup>, tj. část rozpoznávanou rovněž kalcineurinem<sup>25</sup>. Nejúčinnějšími modulátory jsou např. [3,O-didehydro-MeBmt<sup>1</sup>, Val<sup>2</sup>] CsA a acetylcyklosporin A, jejichž struktura byla rovněž vyřešena RTG difrací<sup>22,26</sup>.

## 4. Závěr

Cyklosporiny jsou překvapivě rigidní molekuly preferující ve volné formě v krystalech symetrické uspořádání prostorové grupy  $P2_1$  a ve vazbě na cyklofilinový receptor prostorovou symetrii  $P2_1\bar{2}_1\bar{2}_1$ . Konformace cyklosporinů v kapalinách odpovídají konformacím nalezeným v krystalech. Předpokladem biologické aktivity cyklosporinů je konformační flexibilita jejich cyklického skeletu. Ve volné formě v krystalech cyklo-

sporiny zaujímají těsnou konformaci antiparalelního  $\beta$ -listu, při vazbě na proteinový receptor se cyklosporinový skelet otvírá. Tato konformační změna je charakterizována snížením počtu intramolekulárních vodíkových vazeb ze čtyř na jednu a změnou konfigurace peptidové vazby mezi MeLeu<sup>9</sup> a MeLeu<sup>10</sup> z *cis* (volný CsA) na *trans* (vázany CsA). Tím jsou splněny sterické nároky při vazbě CsA (přes jeho rezidua 1, 2, 3, 9, 10 a 11) na proteinový receptor cyklofilin A. Energetické nároky konformační změny CsA (volný)  $\rightarrow$  CsA(vázany) jsou uhraneny z konformačních změn receptoru.

#### Seznam nekódovaných aminokyselin

MeBmt	(4R)-4-((E)-but-2en-1-yl)-4,N-dimethyl-L-threonin
Bmt	(4R)-4-((E)-but-2en-1-yl)-4-methyl-L-threonin
Abu	2-aminobutanová kyselina
Sar	sarkosin, N-methylglycin
MeLeu	N-methyleucin
MeVal	N-methy-valin
Nva	norvalin

Tato práce byla podpořena Ministerstvem mládeže, školství a tělovýchovy (výzkumný záměr č. CEZ: MSM 223100002). Vyhledávání v databázi CSD bylo umožněno na základě grantu GA ČR 203/99/0067.

#### LITERATURA

- Mařha V.: *Cyklosporin A*. Grada Publishing, Praha 1994.
- Loosli H.-R., Kessler H., Oschkinat H., Weber H.-P., Petcher T. J., Widmer A.: *Helv. Chim. Acta* 68, 682 (1985).
- Kallen J., Mikol V., Taylor P., Walkinshaw D.: *J. Mol. Biol.* 283, 435 (1998).
- Twentyman P. R.: *Biochem. Pharmacol.* 43, 109 (1992).
- a) Köck M., Kessler H., Seebach D., Thaler A.: *J. Am. Chem. Soc.* 114, 2676 (1992). b) Carver J. A., Rees N. H., Turner D. L., Senior S. J., Chowdhry B. Z.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1992, 1682. c) Bürger M. H., Seebach D.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 442 (1994). d) Dancer R. J., Jones A., Fairlie D. P.: *Aust. J. Chem.* 48, 1835 (1995).
- Knott R. B., Schefer L., Schoenborn B. P.: *Acta Crystallogr. C*46, 1528 (1990).
- Giron D., List M., Richter F., Uike Y., Weber H.-P.: *CS* 279, 654 (1995).
- Hušák M., Kratochvíl B., Jegorov A., Mařha V., Stuchlík M., Andrýsek T.: *Z. Kristallogr.* 211, 313 (1996).
- Jegorov A., Pakhomova S., Hušák M., Kratochvíl B., Žák Z., Cvak L., Buchta M.: *J. Inclusion Phenom.* 37, 137 (2000).
- Mikol V., Kallen J., Pflügl G., Walkinshaw M. D.: *J. Mol. Biol.* 234, 1119 (1993).
- Pfugl G., Kallen J., Schirmer T., Jansonius J. N., Zurini M. G. M., Walkinshaw M. D.: *Nature* 361, 91 (1993).
- Vix O., Rees B., Thierry J. C., Altschuh D.: *Proteins* 15, 339 (1993).
- Allen F. H., Kennard O.: *3D Search and Research Using the Cambridge Structural Database*. Chem. Design Automation News 8 (1), 1, 31 (1993).
- Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E.: *Nucleic Acids Res.* 28, 235 (2000).
- Hušák M., Kratochvíl B., Jegorov A., Císařová I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, přijato do tisku.
- Hušák M., Kratochvíl B., Buchta M., Cvak L., Jegorov A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 63, 115 (1998).
- Jegorov A., Cvak L., Husek A., Šimek P., Heydová A., Ondráček J., Pakhomova S., Hušák M., Kratochvíl B., Sedmera P., Havlíček V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 65, 1317 (2000).
- Špánik I., Krupčík J.: *Chem. Listy* 94, 10 (2000).
- Spek A. L.: *PLATON, A Multipurpose Crystallographic Tool*. Utrecht University, Utrecht 2000.
- Hušák M., Čejka J., ve sborníku: *European Crystallographic Meeting, ECM-19, Nancy, 25.–31. srpen 2000* (Mulliert G., Torlay L., ed.), poster s3.m1.p1.
- Hušák M., Pakhomova S., Kratochvíl B., Císařová I., Jegorov M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, připravováno do tisku.
- Kratochvíl B., Jegorov A., Pakhomova S., Hušák M., Bulej P., Cvak L., Sedmera P., Havlíček V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 64, 89 (1999).
- Braun W., Kallen J., Mikol V., Walkinshaw M. D., Wüthrich K.: *FASEB J.* 9, 63 (1995).
- Köck M., Müller G., Kessler H.: *Helv. Chim. Acta* 77, 171 (1994).
- Demeule M., Wenger R., Bélineau R.: *J. Biol. Chem.* 272, 6647 (1997).
- Pohl E., Herbst-Irmer R., Sheldrik G. M., Dauter Z., Wilson K. S., Bölsterli J. J., Bollinger P., Kallen J., Walkinshaw M. D.: *Helv. Chim. Acta* 78, 355 (1995).
- Traber R., Hofman H., Loosli H.-R., Ponelle M., von Wartburg A.: *Helv. Chim. Acta* 70, 13, 1987.
- Havlíček V., Jegorov A., Sedmera P., v knize: *Mass Spectrometry of Cyclosporins* (Atta-ur-Rahman ed.), str. 339. Gordon and Breach Publishers, Amsterdam 2000.

**B. Kratochvíl<sup>a</sup>, M. Hušák<sup>a</sup>, and A. Jegorov<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>Department of Solid State Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague, <sup>b</sup>Galena Co., Research Unit, České Budějovice): **Conformational Flexibility of Cyclosporins**

This review summarizes the present knowledge of conformations of cyclosporins mainly in the solid state. A very small chemical change of the cyclosporin backbone causes a significant change in biological properties. The mechanism of immunosuppressive activity of cyclosporin A is explained on the basis of conformational flexibility of the cyclosporin skeleton. Cyclosporin A adopts three main conformations: the tightly folded one of free cyclosporin in crystals and solution, the open one in the receptor-bound state in cyclosporin complexes with cyclophilin A and the very open one in the cyclosporinFAB (fragment of antibody) complex. A conformational comparison of variously solvated cyclosporin A with its non-immunosuppressive derivatives (cyclosporins E and H) shows some small differences in the system of intramolecular H-bonds of cyclosporin skeletons. The inclusion effect of packed cyclosporin molecules in crystalline cyclosporin clathrates enables preferential crystallization of cyclosporins with various chiral molecules of organic solvents.