

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

296 164

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

- (21) Číslo přihlášky: **1999-1750**
(22) Přihlášeno: **18.11.1997**
(30) Právo přednosti: **18.11.1996 DE 1996/19647580**
25.02.1997 DE 1997/19707506
18.11.1997 WO 1997/9706442
(40) Zveřejněno: **15.09.1999**
(Věstník č. 9/1999)
(47) Uděleno: **22.11.2005**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **11.01.2006**
(Věstník č. 1/2006)
(86) PCT číslo: **PCT/EP1997/006442**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1998/022461**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07D 417/06 (1974.07)
C07D 493/04 (1974.07)
C12P 17/08 (1980.01)
A01N 43/78 (1980.01)

(73) Majitel patentu:

GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE
FORSCHUNG MBH (GBF), Braunschweig, DE

(72) Původce:

Reichenbach Hans, Braunschweig, DE
Hoefle Gerhard, Braunschweig, DE
Gerth Klaus, Braunschweig, DE
Steinmetz Heinrich, Braunschweig, DE

(74) Zástupce:

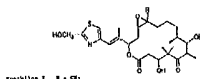
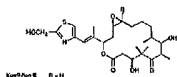
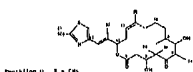
Ing. Ivana Jirotková, Nad Štolou 12, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu:

Epothilony D, E a F, způsob jejich výroby a jejich použití jako cytostatik a prostředků pro ochranu rostlin

(57) Anotace:

Předložené řešení se týká epothilonů D, E a F obecných vzorců, jejich výroby, jakož i jejich použití k přípravě terapeutických prostředků pro použití jako cytostatikum a prostředků pro ochranu rostlin.



CZ 296164 B6

Epothilony D, E a F, způsob jejich výroby a jejich použití jako cytostatik a prostředků pro ochranu rostlin

Oblast techniky

5

Předložený vynález se týká epothilonů D, E a F, jejich výroby, jakož i jejich použití ke zhotovení terapeutických prostředků a prostředků k ochraně rostlin.

Dosavadní stav techniky

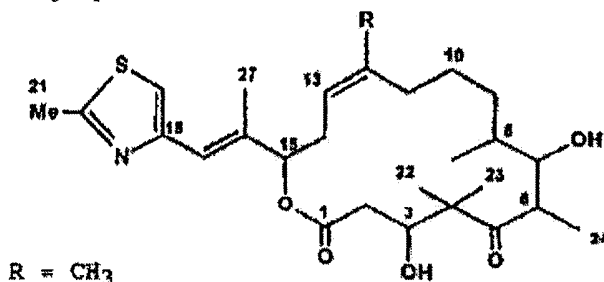
10

Dosud byla vyvinuta řada epothilonů, viz například Nicolaou et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., (1996) 35(20), 2399–2401. V mezi národní patentové přihlášce WO–A–93 10121 jsou popsány epothilony A a B, od nichž se epothilon D liší chybějícím epoxidovým kruhem a epothilony E a F hydroxymethylskupinou na thiazolovém zbytku. Jak bylo zjištěno, tyto odlišnosti vedou k překvapivě lepším vlastnostem uvedených sloučenin.

15

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je epothilon D vzorce



20

kde M je methyl.

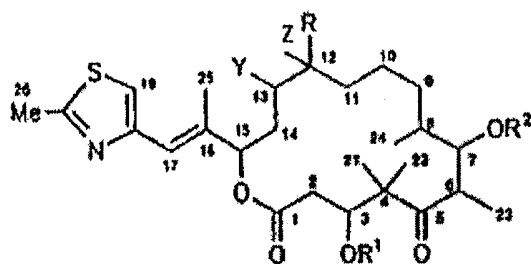
Tuto sloučeninu lze získat tím, že se

- (a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 o sobě známým způsobem kultivuje v přítomnosti adsorpční pryskyřice,
- 25 (b) adsorpční pryskyřice se oddělí od kultury a promyje směsí voda/methanol,
- (c) promytá adsorpční pryskyřice se eluuje methanolem a eluát se zahustí na surový extrakt,
- (d) získaný koncentrát se extrahuje ethylacetátem, extrakt se zahustí a rozdělí mezi methanol a hexan,
- (e) methanolická fáze zahustí na rafinát a tento koncentrát se frakcionuje na sloupci Sephadexu,
- 30 (f) získá se frakce s produkty metabolismu použitého mikroorganismu,
- (g) získaná frakce chromatografuje se směsí methanol/voda na C18–reverzní fázi a v časovém pořadí postupně
 - po první frakci s epothilonem A a
 - druhé frakci s epothilonem B se získá
 - 35 – třetí frakce s prvním dalším epothilonem a
 - čtvrtá frakce s druhým dalším epothilonem a izoluje se
- (h1) epothilon z první další frakce a/nebo
- (h2) epothilon z druhé další frakce.

40

Předmětem vynálezu je dále epothilon D sumárního vzorce C₂₇H₄₁NO₅S, charakterizovaný ¹H– a ¹³C–NMR spektrem podle tabulky 1.

Epothilon D může být použit pro přípravu sloučenin následujícího vzorce 1, přičemž pro jeho derivatizace se může odkazovat na derivatizační metody, které jsou popsány v WO-A-97/19 086.



(1)

5

v uvedeném vzorci 1 značí:

R = H, C₁₋₄-alkyl;

R¹, R², R³, R⁴, R⁵ = H, C₁₋₆-alkyl, C₁₋₆-acyl-benzoyl, C₁₋₄-trialkylsilyl, benzyl, fenyl, C₁₋₆-alkoxy-, C₆-alkyl, hydroxy- halogenem substituovaný benzyl resp. fenyl;

10 přičemž také dva ze zbytků R¹ až R⁵ mohou být spojeny se seskupením -(CH₂)_n-, kde n = 1 až 6, a u zbytků obsažených alkyl- nebo acylskupin se jedná o zbytky s přímým nebo rozvětveným řetězcem;

Y a Z jsou buď stejné nebo rozdílné a představují vodík, halogen jako F, Cl, Br nebo I, pseudo-halogen jako -NCO, -NCS, nebo N₃, OH, O-(C₁₋₆)-acyl, O-(C₁₋₆)-alkyl, O-benzoyl. Y a Z mohou být také kyslíkovým atomem epoxidu, přičemž to neplatí u epothilonu A nebo B, nebo jedna z C-C vazeb tvoří dvojnou vazbu C=C.

15

Takto je možné 12,13-dvojnou vazbu selektivně

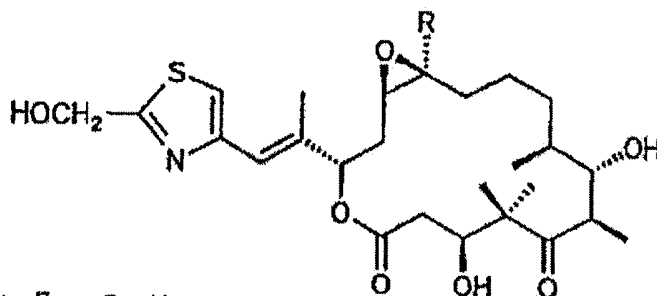
20 - hydrogenovat, například katalyticky nebo diiminem, přičemž se získá sloučenina vzorce 1, kde Y=Z=H; nebo

- epoxidovat, například dimethyldioxiranem nebo peroxykyselinou, přičemž se získá sloučenina vzorce 1, kde Y se Z = O; nebo

- převést na dihalogenidy, dipseudohalogenidy nebo diazidy, přičemž se získá sloučenina vzorce 1, kde Y a Z = halogen, pseudohalogen nebo N₃.

25

Předmětem vynálezu je rovněž epothilon E vzorce



Epothilon E R = H

30 Předmětem vynálezu je dále epothilon E sumárního vzorce C₂₆H₃₉NO₇S, mající následující ¹H-NMR spektrum (300 MHz, CDCl₃): delta = 2,38 (2-H_a), 2,51 (2-H_b), 4,17 (3-H), 3,19 (6-H), 3,74 (7-H), 1,30-1,70 (8-H, 9-H₂, 10-H₂, 11-H₂), 2,89 (12-H), 3,00 (13-H), 1,88 (14-H_a), 2,07 (14-H_b), 5,40 (15-H), 6,57 (17-H), 7,08 (19-H), 4,85 (21-H₂), 1,05 (22-H₃), 1,32 (23-H₃), 1,17 (24-H₃), 0,97 (25-H₃) 2,04 (27-H₃).

Epothilon E je biotransformantem epothilonu A, který lze získat tak, že se

(a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 o sobě známým způsobem kultivuje v přítomnosti adsorpční pryskyřice, oddělí od adsorpční pryskyřice a případně celé množství nebo část oddělené kultury se smísí s methanolickým roztokem epothilu A,

5 (b) kultura smíšená s epothilonem A se inkubuje a potom smísí s adsorpční pryskyřicí,

(c) adsorpční pryskyřice se oddělí od kultury, eluuje methanolem a eluát se zahustí na surový extrakt,

(d) surový extrakt se rozdělí mezi ethylacetát a vodu, ethylacetátová fáze se oddělí a zahustí na olej,

10 (e) olej se chromatografuje na reverzní fázi za následujících podmínek:

Materiál sloupce: Nucleosil 100 C-18 7 μm

Rozměry sloupce: 250 x 4 mm

Eluent: methanol/voda = 60:40

Průtok: 1,2 ml/min

15

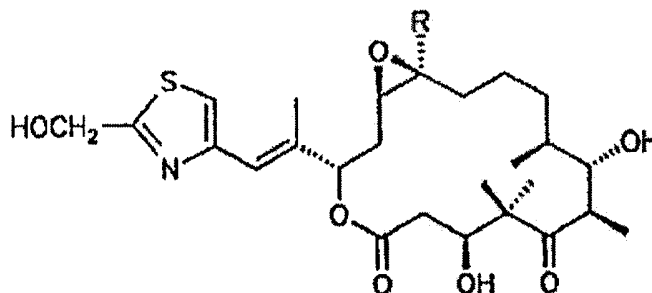
a frakce obsahující biotransformant, které se dají detegovat UV-zhášáním při 254 nm, s R_t - dobou 5,0 min, se oddělí a izoluje se biotransformant.

Výhodné je, jestliže se v kroku (a) oddělí kultura, která se stará tři nebo čtyři anebo více dní.

20

Výhodné je rovněž, jestliže se v kroku (b) inkubuje jeden nebo dva anebo více dní.

Předmětem vynálezu je rovněž epothiolon F vzorce



Epothiolon F R = CH₃

25 Předmětem vynálezu je dále epothiolon F sumárního vzorce C₂₇H₄₁NO₇S, charakterizované následujícím ¹H-NMR spektrem (300 MHz, CDCl₃): delta = 2,37 (2-H_a), 2,52 (2-H_b), 4,20 (3-H), 3,27 (6-H), 3,74 (7-H), 1,30 - 1,70 (8-H, 9-H₂, 10-H₂, 11-H₂), 2,78 (13-H), 1,91 (14-H), 2,06 (14-H_b), 5,42 (15-H), 6,58 (17-H), 7,10 (19-H), 4,89 (21-H₂), 1,05 (22-H₃), 1,26 (23-H₃), 1,14 (24-H₃), 0,98 (25-H₃), 1,35 (26-H₃), 2,06 (27-H₃).

30

Epothiolon F je biotransformantem epothilonu B, který lze získat tak, že se

(a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 o sobě známým způsobem kultivuje v přítomnosti adsorpční pryskyřice, oddělí od adsorpční pryskyřice a případně celé množství nebo část oddělené kultury se smísí s methanolickým roztokem epothilonu B,

35

(b) kultura smíšená s epothilonem B se inkubuje a potom smísí s adsorpční pryskyřicí,

(c) adsorpční pryskyřice se oddělí od kultury, eluuje methanolem a eluát se zahustí na surový extrakt,

(d) surový extrakt se rozdělí mezi ethylacetát a vodu, ethylacetátová fáze se oddělí a zahustí na olej,

40

(e) olej na chromatografuje na reverzní fázi za následujících podmínek:

Materiál sloupce: Nucleosil 100 C–18 7 µm
 Rozměry sloupce: 250 x 4 mm
 Mobilní fáze: methanol/voda = 60:40
 Průtok: 1,2 ml/min

5

a frakce obsahující biotransformant, které se dají detegovat UV–zářením při 254 nm, s R_t – dobou 5,4 min, se oddělí a izoluje se biotransformant.

10

Výhodné je, jestliže se v kroku (a) oddělí kultura, která je stará tři nebo čtyři anebo více dní.

Výhodné je rovněž, jestliže se v kroku (b) inkubuje jeden nebo dva anebo více dní.

Výroba a prostředky

15

Sloučeniny podle vynálezu, resp. epothilony lze získat ze shora uvedených opatření.

20

Vynález se dále týká prostředků pro ochranu rostlin v zemědělství, lesnictví a/nebo zahradnictví, sestávajících z jednoho nebo více shora uvedených epothilonů D, E a F, respektive sestávající z jednoho nebo více shora uvedených epothilonů vedle jednoho nebo více obvyklých nosičů a/nebo ředidel.

25

Konečně se vynález týká terapeutických prostředků, sestávajících z jedné nebo více shora uvedených sloučenin nebo jedné nebo více shora uvedených sloučenin vedle jednoho nebo více obvyklých nosičů a/nebo ředidel. Tyto prostředky mohou vykazovat zejména cytotoxické aktivity a/nebo imunosupresi a/nebo mohou být nasazovány k potírání maligních tumorů, přičemž je zvláště preferováno jejich používání jako cytostatika.

Vynález je v následujícím popisu několika vybraných příkladů provedení blíže objasněn a popsán.

30

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1: HPLC analýza XAD eluátu na konci fermentace.

Obrázek 2: Obohacení epothilonu E a F ve fermentační směsi po doplnění směsi epothilonu A a B, analyzováno po inkubaci 48 hodin.

35

Obrázek 3: Kinetika biotransformace epothilonu A na epothilon E pomocí *Sorangium cellulosum* SO ce90.

Obrázek 4: Biotransformace epothilonu A na epothilon E.

Obrázek 5: Biotransformace epothilonu B na epothilon F.

40

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Epothilon D spolu s epothilonem C

45

A. Produkční kmen a podmínky kultury odpovídající základnímu patentu epothilonu DE–B–41 38 042

B. Produkce s DSM 6773

50

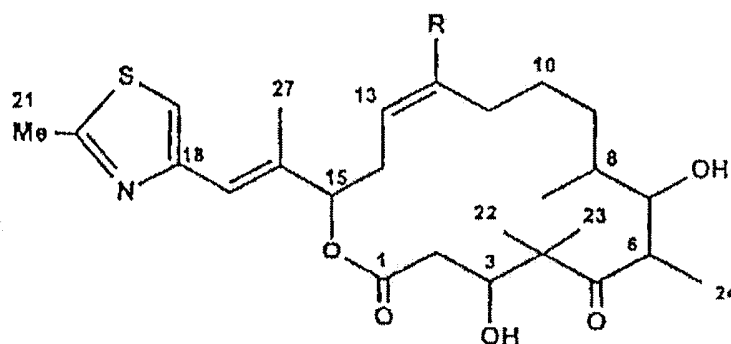
Bylo vzato 75 l kultury jak je popsáno v základním patentu a použito k naočkování produkčního fermentoru se 700 l produkčního média z 0,8 % škrobu, 0,2 % glukózy, 0,2 % sojové moučky, 0,2 % extraktu kvasnic, 0,1 % CaCl₂ · 2H₂O, 0,1 % MgSO₄ · 7H₂O, 8 mg/l Fe–EDTA, pH = 7,4 a

případně 15 l absorpční pryskyřice Amberlite XAD-16. Fermentace trvala 7–10 dní při 30 °C, provzdušňování s 0,1 N l/m³. Regulací počtu otáček byl pO₂ udržován na 30 %.

C. Izolace

- 5 Adsorpční pryskyřice byla od kultury oddělena pomocí 0,7 m², mesh procesního filtru a promytím 3 objemy směsi voda/methanol 2:1 byla zbavena polárních příměsí. Eluováním se 4 objemy methanolu se získal surový extrakt, který byl ve vakuu až po výstupu vodní fáze odpařen. Tato byla třikrát extrahována stejným objemem ethylacetátu. Zhuštění organické fáze poskytlo 240 g surového extraktu, který byl rozdělen mezi methanol a heptan, aby se oddělily lipofilní příměsí.
- 10 Zahuštěním methanolicke fáze ve vakuu bylo získáno 180 g rafinátu, který byl ve třech podílech frakcionován na Sephadexu LH-20 (slopec 20 x 100 cm, 20 ml/min methanolu). Epothilony jsou v množství 72 g obsaženy ve frakci eluované s retenční dobou 240–300 min. K oddělení Epothilonů bylo ve třech podílech chromatografováno na Lichrosorbu RP-18 (15 μm, sloupec 10 x 40 cm, mobilní fáze 180 ml/min směsi methanol/voda 65:35). Po Epothilonu A a B byl
- 15 eluován Epothilon C s R_t = 90 – 95 min a Epothilon D s R_t = 100 – 110 a po odpaření ve vakuu byly nakonec získány jako bezbarvé oleje ve výtěžku 0,3 g.

D. Fyzikální vlastnosti



Epothilon C, R = H

Epothilon D, R = CH₃

20 Epothilon C

C₂₆H₂₉NO₅S [477]

ESI-MS: (pozitivní ionty): 478,5 pro [M+H]⁺

¹H- a ¹³C-NMR viz Tabulka 1

DC: R_f = 0,82

25 DC-Alufolie 60 F 254 Merck, mobilní fáze: dichlormethan/methanol = 9:1

Detekce: UV-zhášení při 254 nm. Postřik činidlem vanilin-kyselina sírová, modrošedé zbarvení při zahřátí na 120 °C.

HPLC: R_t 11,5 min

Sloupec: Nucleosil 100 C-18 7 μm, 125 x 4 mm

30 Mobilní fáze: methanol/voda 65:35

Průtok: 1 ml/min

Detekce: diodový systém

Epothilon D

35 C₂₇H₄₁NO₅S [491]

ESI-MS: (pozitivní ionty): 492,5 pro $[M+H]^+$ ^1H - a ^{13}C -NMR viz Tabulka 1DC: $R_f = 0,82$

DC-Alufolie 60 F 254 Merck, mobilní fáze: dichlormethan/methanol = 9:1

- 5 Detekce: UV-zhášení při 254 nm. Postřik činidlem vanilin-kyselina sírová, modrošedé zbarvení při zahřátí na 120 °C.

HPLC: $R_t = 15,3$ minSloupec: Nucleosil 100 C-18 7 μm , 125 x 4 mm

Mobilní fáze: methanol/voda 65:35

- 10 Průtok: 1 ml/min

Detekce: diodový systém

Tabulka 1

 ^1H - a ^{13}C -NMR data Epothilonu C a Epothilonu D v $[\text{D}_6]$ DMSO při 300 MHz

Epothilon C				Epothilon D		
H-atom	δ (ppm)	C-atom	δ (ppm)	δ (ppm)	C-atom	δ (ppm)
		1	170,3		1	170,1
2-H _a	2,38	2	38,4	2,35	2	39,0
2-H _b	2,50	3	71,2	2,38	3	70,8
3-H	3,97	4	53,1	4,10	4	53,2
3-OH	5,12	5	217,1	5,08	5	217,4
6-H	3,07	6	45,4	3,11	6	44,4
7-H	3,49	7	75,9	3,48	7	75,5
7-OH	4,46	8	35,4	4,46	8	36,3
8-H	1,34	9	27,6	1,29	9	29,9
9-H _a	1,15	10	30,0	1,14	10	25,9
9-H _b	1,40	11	27,6	1,38	11	31,8
10-H _a	1,15	12	124,6	1,14	12	138,3
10-H _b	1,35	13	133,1	1,35	13	120,3
11-H _a	1,90	14	31,3	1,75	14	31,6
11-H _b	2,18	15	76,3	2,10	15	76,6
12-H	5,38	16	137,3		16	137,2
13-H	5,44	17	119,1	5,08	17	119,2
14-H _a	2,35	18	152,1	2,30	18	152,1
14-H _b	2,70	19	117,7	2,65	19	117,7
15-H	5,27	20	164,2	5,29	20	164,3
17-H	6,50	21	18,8	6,51	21	18,9
19-H	7,35	22	20,8	7,35	22	19,7
21-H ₃	2,65	23	22,6	2,65	23	22,5
22-H ₃	0,94	24	16,7	0,90	24	16,4
23-H ₃	1,21	25	18,4	1,19	25	18,4
24-H ₃	1,06	27	14,2	1,07	26	22,9
25-H ₃	0,90			0,91	27	14,1
26-H ₃				1,63		
27-H ₃	2,10			2,11		

* ** zaměnitelné přiřazení

Příklad 2

Epothilon A a 12,13-Bisepi-epothilon A z Epothilonu C

- 50 mg epothilonu A bylo rozpuštěno v 1,5 ml acetonu a smíšeno s 1,5 ml 0,07 molárního roztoku dimethyldioxaranu v acetonu. Po 6 hodinách stání při teplotě místnosti bylo odpařeno ve vakuu a produkty byly odděleny pomocí preparativní HLPC (mobilní fáze: methyl-*tert*-butylether/petrolether/methanol 33:66:1).

Výtěžek:

- 25 mg Epothilon A,

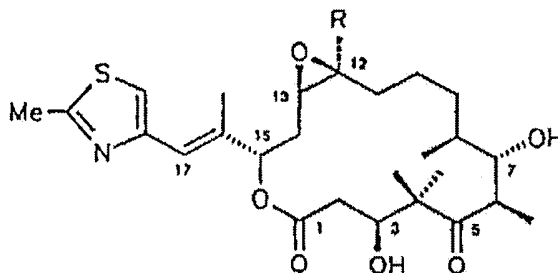
$R_t = 3,5$ min (analytická HPLC, 7 μ m, sloupec 4 x 250 mm, mobilní fáze viz nahoře, průtok 1,5 ml/min)

a

20 mg 12,13-Bisepi-epothilonu A,

- $R_t = 3,7$ min, ESI-MS (pozitivní ionty) $m/z = 494$ $[M+H]^+$,

1H -NMR v $[D_4]$ methanolu, vybrané signály: delta = 4,32 (3-H), 3,79 (7-H), 3,06 (12-H), 3,16 (13-H), 5,54 (15-H), 6,69 (17-H), 1,20 (22-H), 1,45 (23-H).



12,13-Bisepi-epothilon A, R = H

20 Příklad 3

Epothilon E a F, nové produkty biotransformace Epothilonů A a B

Produkční kmen:

- Produkční kmen *Sorangium cellulosum* So ce90 byl izolován v červenci 1985 na GBF ze vzorku půdy z břehů Zambezi a 28. 10. 1991 uložen v Německé sbírce pro mikroorganismy (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen) pod číslem DSM 6773.

- Charakterizace producenta jakož i podmínky kultury jsou popsány v: Höfle, G.; N. Bedord, K. Gerth & H. Reichenbach. Epothilone, deren Herstellungsverfahren sowie sie ethaltende Mittel. DE 41 38 042 A1, zveřejněno 27. května 1993.

Tvorba Epothilonu E a F během fermentace:

- Typická fermentace probíhá následovně: 100 l bioreaktor se naplní 60 l média (0,8 % škrobu, 0,2 % glukózy, 0,2 % sojové moučky, 0,2 % extraktu kvasnic, 0,1 % $CaCl_2$, $2H_2O$, 0,1 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 8 mg/l Fe-EDTA, pH = 7,4). Dodatečně se přidají 2 % absorpční pryskyřice (XAD-16, Rohm & Haas). Autoklávováním se médium sterilizuje (2 hod., 120 °C). Naočkuje se 10 l ve stejném médiu (dodatečně 50 mM HEPES-pufri pH 7,4) v třepačce upravené předkultury (160 otáček/min, 30 °C). Fermentuje se při 32 °C s rychlostí míchadla 500 otáček/min a

provzdušňováním 0,2 N l na m³ a hodinu, pH se udržuje na 7,4 přidavkem KOH. Fermentace trvá 7 až 10 dní. Vytvořené Epothilony se během fermentace kontinuálně vážou na adsorpční pryskyřici. Po oddělení kultivačního roztoku (např. prosátím na procesní filtru) se pryskyřice promyje 3 objemy vody a eluuje se 4 objemy methanolu. Eluát se zahustí do sucha a rozpustí v 700 ml methanolu.

HLPC–Analýzy XAD–eluátu:

Proti výchozímu objemu v reaktoru (70 l) byl eluát zkoncentrován 100 : 1. Analýza byla provedena na HPLC zařízení 1090 firmy Hewlett Packard. K dělení obsažených látek byl použit nukleosilový sloupec (125/2 Nucleosil 125–5 C₁₈) firmy Machery–Nagel (Düren). Eluováno bylo směsí voda/acetonitril s gradientem od počátečních 75:25 až do 50:50 po 5,5 minutách. Tento poměr byl dodržován až do 7.minuty, aby pak až k 10.minutě stoupl na 100% acetonitrilu.

Měřeno bylo při vlnové délce 250 nm a šíři pásu 4 nm. Spektra při diodovém uspořádání byla měřena ve vlnovém rozsahu 200 nm až 400 nm. V XAD–eluátu jsou nápadné dvě nové substance s R_t 5,29 a R_t 5,91, jejichž adsorpční spektra jsou identická se spektry Epothilonů A respektive B (Obrázek 1; E odpovídá A, F odpovídá B). Za udaných fermentačních podmínek se tyto substance tvoří jen ve stopách.

Biotransformace Epothilonu A a B na Epothilon E a F:

Pro cílenou biotransformaci bylo použito 500 ml kultury So ce90 staré 4 dny a uchovávané s adsorpční pryskyřicí. Z té bylo do sterilní 1l Erlenmeyerovy baňky přeneseno 250 ml za ponechání XAD. Potom byla k methanolickému roztoku přidána směs celkem 36 mg Epothilonu a 14 mg Epothilonu B a baňka byla na třepací stoličce dva dny při 30 °C a 200 ot/min inkubována. Tvoření Epothilonu E a F bylo analyzováno přímo z 10 µl centrifugovaného vzorku kultury (Obrázek 2). Přeměna probíhá pouze za přítomnosti buněk a je závislá na hustotě vložených buněk a čase. Kinetika přeměny je pro Epothilon A znázorněna na obrázku 3.

Izolace Epothilon E a F:

Pro izolaci Epothilonu E a F byly spojeny tři násady z třepacích baněk z biotransformace (viz shora) a byly 1 h třepány s XAD–16. XAD bylo získáno odsátím a bylo eluováno 200 ml methanolu. Eluát byl ve vakuu odpařen na 1,7 g surového extraktu. Tento byl rozdělen mezi 30 ml ethylacetátu a 100 ml vody. Z ethylacetátové fáze bylo po odpaření ve vakuu získáno 330 mg olejovitého zbytku a ty byly v pěti cyklech chromatografovány přes 250 x 20 mm RP–18 sloupec (mobilní fáze: methanol/voda 58:42, detekce 254 nm).

Výtěžek: Epothilon E 50 mg
Epothilon F 10 mg

Biologické působení Epothilonu E:

V buněčných kulturách byla stanovena koncentrace, která redukuje růst o 50 % (IC₅₀) a byla porovnána s hodnotami pro Epothilon A.

Buněčná řada	IC ₅₀ (ng/ml)	
	Epothilon E	Epothilon A
HeLa. KB–3.1 (lidský)	5	1
Myší fibroblasty, L929	20	4

Epothilon E

C₂₆H₃₉NO₇S [509]

ESI–MS: (pozitivní ionty): 510,3 pro [M+H]⁺

DC: $R_f = 0,58$

DC–Alufolie 60 F 254 Merck, mobilní fáze: dichlormethan/methanol = 9:1

Detekce: UV–zhášení při 254 nm. Postřik činidlem vanilin–kyselina sírová, modrošedé zbarvení při zahřátí na 120 °C.

5 HPLC: $R_t = 5,0$ min

Sloupec: Nucleosil 100 C–18 7 μm , 250 x 4 mm

Mobilní fáze: methanol/voda 60:40

Průtok: 1,2 ml/min

Detekce: diodový systém

10 ^1H –NMR (30 MHz, CDCl_3): delta = 2,38 (2– H_a), 2,51 (2– H_b), 4,17 (3–H), 3,19 (6–H), 3,74 (7–H), 1,30–1,70 (8–H, 9– H_2 , 10– H_2 , 11– H_2), 2,89 (12–H), 3,00 (13–H), 1,88 (14– H_a), 2,07 (14– H_b), 5,40 (15–H), 6,57 (17–H), 7,08 (19–H), 4,85 (21– H_2), 1,05 (22– H_3), 1,32 (23– H_3), 1,17 (24– H_3), 0,97 (25– H_3), 2,04 (27– H_3).

15 Epothilon F

$\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{NO}_7\text{S}$ [523]

ESI–MS: (pozitivní ionty): 524,5 pro $[\text{M}+\text{H}]^+$

DC: $R_f = 0,58$

20 DC–Alufolie 60 F 254 Merck, mobilní fáze: dichlormethan/methanol = 9:1

Detekce: UV–zhášení při 254 nm. Postřik činidlem vanilin–kyselina sírová, modrošedé zbarvení při zahřátí na 120 ;C.

HPLC: $R_t = 5,4$ min

Sloupec: Nucleosil 100 C–18 7 μm , 250 x 4 mm

25 Mobilní fáze: methanol/voda 60:40

Průtok: 1,2 ml/min

Detekce: diodový systém

30 ^1H –NMR (300 MHz, CDCl_3): delta = 2,37 (2– H_a), 2,52 (2– H_b), 4,20 (3–H), 3,27 (6–H), 3,74 (7–H), 1,30–1,70 (8–H, 9– H_2 , 10– H_2 , 11– H_2), 2,78 (13–H), 1,91 (14–H), 2,06 (14– H_b), 5,42 (15–H), 6,58 (17–H), 7,10 (19–H), 4,89 (21– H_2), 1,05 (22– H_3), 1,26 (23– H_3), 1,14 (24– H_3), 0,98 (25– H_3), 1,35 (26– H_3), 2,06 (27– H_3).

Příklad 4

35 Příprava Epothilonu E a F biotransformací pomocí *Sorangium cellulosum* SO ce90

1) Provedení biotransformace

Pro biotransformaci byla použita kultura *Sorangium cellulosum* So ce 90, která byla v přítomnosti 2% adsorpční pryskyřice 16 XAD (Rohm a Haas, Frankfurt/M.) čtyři dny při 30 °C a
40 160 ot./min třepána. Kultivační médium mělo v g/litr destilované vody následující složení: bramborový škrob (Maizena), 8; glukóza (Maizena), 8; tuku zbavená sojová moučka, 2; kvasnicový výtěžek (Marcor), 2; železito–sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové, 0,008; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 1; HEPES, 11,5. Před autoklávováním bylo pomocí KOH nastaveno pH na 7,4.
45 XAD byla od kultury odsáta na sítu z ušlechtilé oceli (200 μm šířka ok). Bakterie byly sedimentovány centrifugováním 10 min při 10 000 ot./min. a sbalek byl znovu suspendován v 1/5 přesahu kultury. Ke koncentrované suspenzi bakterií byl nyní přidán Epothilon A respektive

Epothilon B v methanolickeém roztoku o koncentraci 0,5 g/litr. Kultura byla dále kultivována jak je shora popsáno. Pro analýzu biotransformace bylo v požadovaných časových intervalech odebráno 1 ml vzorku, přidáno 0,1 ml XAD a vzorek byl 30 min třepán při 30 °C. Eluát byl zahuštěn do sucha a znovu rozpuštěn v methanolu. Tento vzorek byl podroben HPLC analýze.

5 Obrázek 4: Kinetika biotransformace Epothilonu A na Epothilon E.

Obrázek 5: Kinetika biotransformace Epothilonu B na Epothilon F.

2) Příprava Epothilonu E biotransformací 1 g Epothilonu A.

10 Kmen *Sorangium cellulosum* So ce90 byl v 8,5 l nahoře uvedeného média (avšak bez přidavku XAD) na čtyři dny nanesen do 10 litrového bioreaktoru při 30 °C, s počtem otáček 150 ot./min a provzdušňováním 0,1 N l/m³.

Na to byla kultura pomocí „cros flow“ filtrace zahuštěna na 3 l. K tomu bylo použito 0,6 m² membrány s velikostí pórů 0,3 μm.

15

Koncentrovaná kultura byla převedena do čtyřlitrového bioreaktoru a byl přidán methanolickeý roztok 1 g Epothilonu A v 10 ml methanolu. Potom byla kultura po dobu 21,5 h dále kultivována. Teplota obnášela 32 °C, počet otáček míchadla byl 455 ot./min a provzdušňováno bylo 6 l/min. Ke konci kultivace bylo přidáno 100 ml XAD a znovu inkubováno 1 hodinu. XAD byla od buněk oddělena odsátím a důkladně eluována methanolem. Eluát byl analyzován pomocí HPLC.

20

Bilance Biotransformace:

25	Epothilon A nasazeno:	100 mg = 100 %
	Epothilon A po 21,5 h znovu nalezeno:	53,7 mg = 5,4 %
	Epothilon E vytvořený po 21,5 h	661,4 mg = 66,1 %
	Epothilon A úplně odbouraný	= 28,5 %

30 Příklad 5

Epothilonu podle vynálezu byly testovány buněčnými kulturami (Tabulka 2) a na podporu polymerizace (Tabulka 3)

Tabulka 2

Testy Epothilonů s buněčnými kulturami

Epothilon	A 493	B 507	C 477	D 491	E 509	F 523
	IC-50 [ng/ml]					
Myší fibroblasty L 929	4	1	100	20	20	1,5
<u>Řady buněk lidských tumorů:</u>						
HL-60 (leukemie)	0,2	0,2	10	3	1	0,3
K-562 (leukemie)	0,3	0,3	20	10	2	0,5
U-937 (lymfom)	0,2	0,2	10	3	1	0,2
KB-3,1 (cervixkarcinom)	1	0,6	20	12	5	0,5
KB-V1 (cervixkarcinom multires)	0,3	0,3	15	3	5	0,6
A-498 (karcinom ledvin)	-	1,5	150	20	20	3
A-498 (karcinom plic)	0,7	0,1	30	10	3	0,1

Tabulka 3

Polymerizační test s Epothilony

Parametr: čas až do poloviny maximální polymerizace kontroly

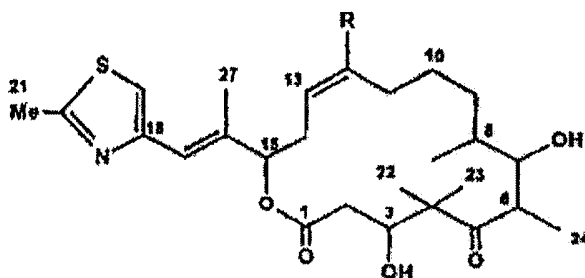
Měření:	w	x	y	z	střed [s]	střed [%]
Kontrola	200	170	180	210	190	100
Epothilon A	95	60	70	70	74	39
Epothilon B		23	25	30	26	14
Epothilon C	125	76	95	80	94	49
Epothilon D	125	73	120		106	56
Epothilon E	80	60	50	45	59	31
Epothilon F	80	40	30	50	50	26

Standardní test s 0,9 mg Tubulin/ml a koncentrací vzorku 1 μ M

Polymerizační test je *in vitro* test s čistěným Tubulinem z prasečího mozku. Vyhodnocení probíhá fotometricky. Polymerizaci podporující substance jako Epothilony zkracují čas, až dojde z poloviny maximální polymerizaci, tj. čím je kratší čas, tím je sloučenina účinnější, w, x, y a z jsou čtyři nezávislé pokusy, relativní účinnost je v posledním sloupci vyjádřena v % kontroly; nejlepší účinnost opět vykazují nejnižší hodnoty. Pořadí v seznamu odpovídá téměř přesně zjištěnému při buněčných kulturách.

PATENTOVÉ NÁROKY

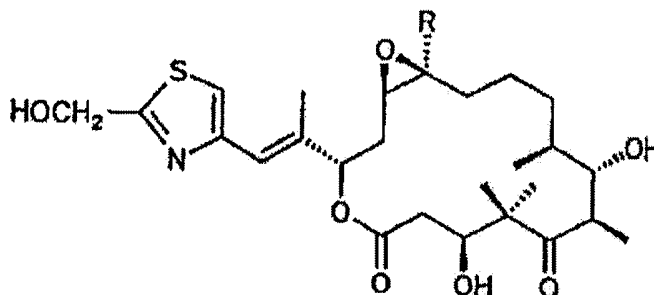
1. Epothilon D vzorce

kde Me je methyl, R = CH₃,2. Epothilon D podle nároku 1 sumárního vzorce C₂₇H₄₁NO₅S, mající následující ¹H- a ¹³C-NMR spektrum:

H-atom	δ (ppm)	C-atom	δ (ppm)
		1	170,1
2-H _a	2,35	2	39,0
2-H _b	2,38	3	70,8
3-H	4,10	4	53,2
3-OH	5,08	5	217,4
6-H	3,11	6	44,4
7-H	3,48	7	75,5

7-OH	4,46	8	36,3
8-H	1,29	9	29,9
9-H _a	1,14	10	25,9
9-H _b	1,38	11	31,8
10-H _a	1,14	12	138,3
10-H _b	1,35	13	120,3
11-H _a	1,75	14	31,6
11-H _b	2,10	15	76,6
12-H		16	137,2
13-H	5,08	17	119,2
14-H _a	2,30	18	152,1
14-H _b	2,65	19	117,7
15-H	5,29	20	164,3
17-H	6,51	21	18,9
19-H	7,35	22	19,7
21-H ₃	2,65	23	22,5
22-H ₃	0,90	24	16,4
23-H ₃	1,19	25	18,4
24-H ₃	1,07	26	22,9
25-H ₃	0,91	27	14,1
26-H ₃	1,63		
27-H ₃	2,11		

3. Epothilon E vzorce



kde R=H.

5

4. Epothilon E podle nároku 3 sumárního vzorce $C_{26}H_{39}NO_7S$, mající následující 1H -NMR spektrum (300 MHz, $CDCl_3$): delta = 2,38 (2-H_a), 2,51 (2-H_b), 4,17 (3-H), 3,19 (6-H), 3,74 (7-H), 1,30–1,70 (8-H, 9-H₂, 10-H₂, 11-H₂), 2,89 (12-H), 3,00 (13-H), 1,88 (14-H_a), 2,07 (14-H_b), 5,40 (15-H), 6,57 (17-H), 7,08 (19-H), 4,85 (21-H₂), 1,05 (22-H₃), 1,32 (23-H₃), 1,17 (24-H₃), 0,97 (25-H₃) 2,04 (27-H₃).

10

5. Způsob přípravy epothilonu E, **vyznačující se tím**, že se

(a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 o sobě známým způsobem kultivuje v přítomnosti adsorpční pryskyřice, oddělí od adsorpční pryskyřice a případně celé množství nebo část oddělené kultury se smísí s methanolickým roztokem epothilu A,

15

(b) s epothilonem A smíšená kultura inkubuje a potom smísí s adsorpční pryskyřicí,

(c) adsorpční pryskyřice oddělí od kultury, eluuje methanolem a eluát se zahustí na surový extrakt,

(d) surový extrakt rozdělí mezi ethylacetát a vodu, ethylacetátová fáze se oddělí a zahustí na olej,

20

(e) olej se chromatografuje na reverzní fázi za následujících podmínek:

Materiál sloupce: Nucleosil 100 C-18 7 μm

Rozměry sloupce: 250 x 4 mm

Eluent: methanol/voda = 60:40

Průtok: 1,2 ml/min

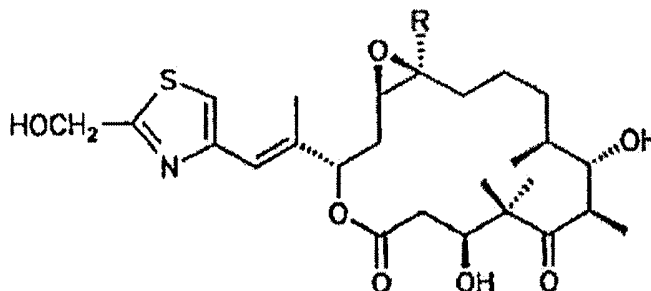
5 a frakce obsahující biotransformant, které se dají detegovat UV-zhášáním při 254 nm, s R_t – dobou 5,0 min, se oddělí a izoluje se biotransformant.

6. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že se v kroku (a) oddělí kultura, která je stará alespoň tři dny.

10

7. Způsob podle nároku 5 nebo 6, **vyznačující se tím**, že se inkubace v kroku (b) provádí alespoň po dobu jednoho dne.

8. Epothilon F vzorce



15

kde $R = \text{CH}_3$.

9. Epothilon F podle nároku 8 sumárního vzorce $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{NO}_7\text{S}$, mající následujícím $^1\text{H-NMR}$ spektrem (300 MHz, CDCl_3): delta = 2,37 (2- H_a), 2,52 (2- H_b), 4,20 (3- H), 3,27 (6- H), 3,74 (7- H), 1,30 – 1,70 (8- H , 9- H_2 , 10- H_2 , 11- H_2), 2,78 (13- H), 1,91 (14- H), 2,06 (14- H_b), 5,42 (15- H), 6,58 (17- H), 7,10 (19- H), 4,89 (21- H_2), 1,05 (22- H_3), 1,26 (23- H_3), 1,14 (24- H_3), 0,98 (25- H_3), 1,35 (26- H_3), 2,06 (27- H_3).

20

10. Způsob přípravy epothilonu F, **vyznačující se tím**, že se

25 (a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 o sobě známým způsobem kultivuje v přítomnosti adsorpční pryskyřice, oddělí od adsorpční pryskyřice a případně celé množství nebo část oddělené kultury se smísí s methanolickým roztokem epothilonu B,

(b) inkubuje s epothilonem B smíšená kultura a potom smísí s adsorpční pryskyřicí,

30 (c) adsorpční pryskyřice oddělí od kultury, eluuje methanolem a eluát se zahustí na surový extrakt,

(d) surový extrakt rozdělí mezi ethylacetát a vodu, ethylacetátová fáze se oddělí a zahustí na olej,

(e) olej chromatografuje na reverzní fázi za následujících podmínek:

35 Materiál sloupce: Nucleosil 100 C-18 7 μm

Rozměry sloupce: 250 x 4 mm

Mobilní fáze: methanol/voda = 60:40

Průtok: 1,2 ml/min

a frakce obsahující biotransformant, které se dají detegovat UV-zhášáním při 254 nm, s R_t – dobou 5,4 min, se oddělí a izoluje se biotransformant.

40

11. Způsob podle nároku 9, **vyznačující se tím**, že se v kroku (a) oddělí kultura, která je stará alespoň tři dny.

12. Způsob podle nároku 9 nebo 10, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se inkubace v kroku (b) provádí alespoň po dobu jednoho dne.

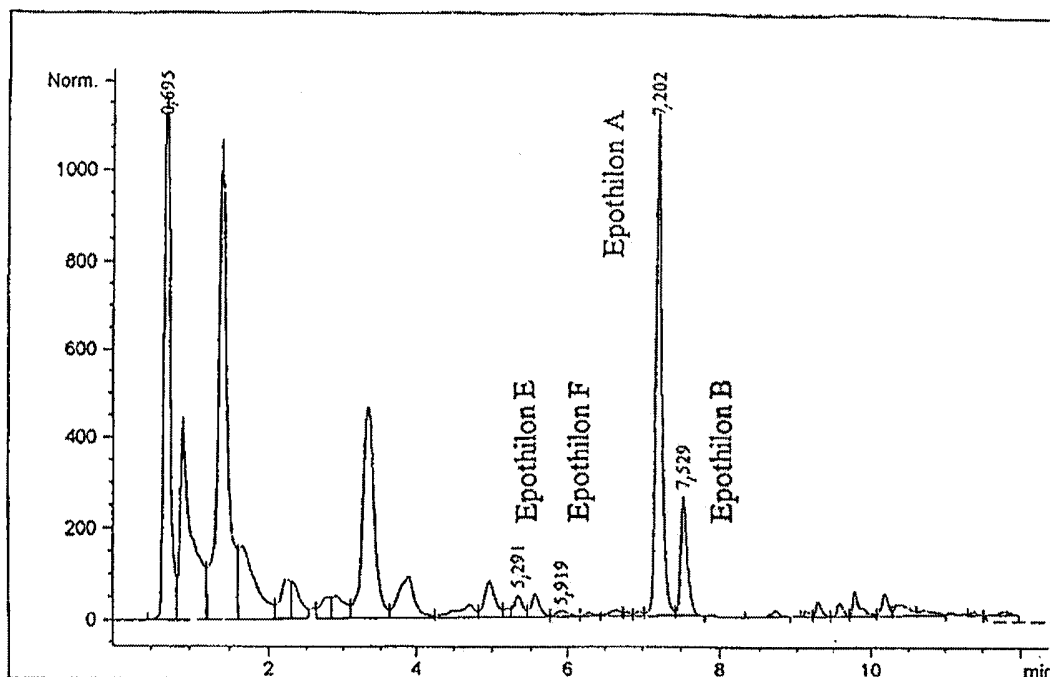
5 13. Prostředek pro ochranu rostlin v zemědělství a lesnictví a/nebo zahradnictví, **v y z n a č e - n ý t í m**, že se sestává z alespoň jedné sloučeniny podle kteréhokoli z nároků 1 až 4, 8 nebo 9 a popřípadě alespoň jednoho nosiče a/nebo rozpouštědla.

10 14. Terapeutický prostředek, zvláště pro použití jako cytostatikum, **v y z n a č e n ý t í m**, že sestává z alespoň jedné sloučeniny podle kteréhokoli z nároků 1 až 4, 8 nebo 9 a popřípadě alespoň jednoho nosiče a/nebo rozpouštědla.

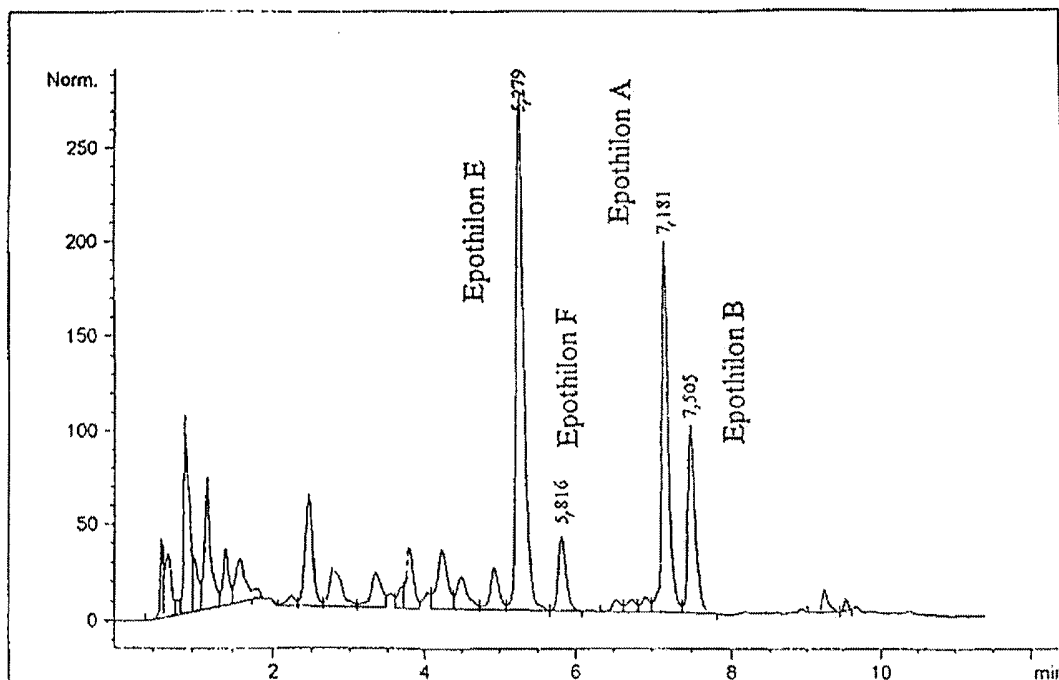
4 výkresy

15

OBRÁZEK 1
HPLC analýza XAD eluátu na konci fermentace.



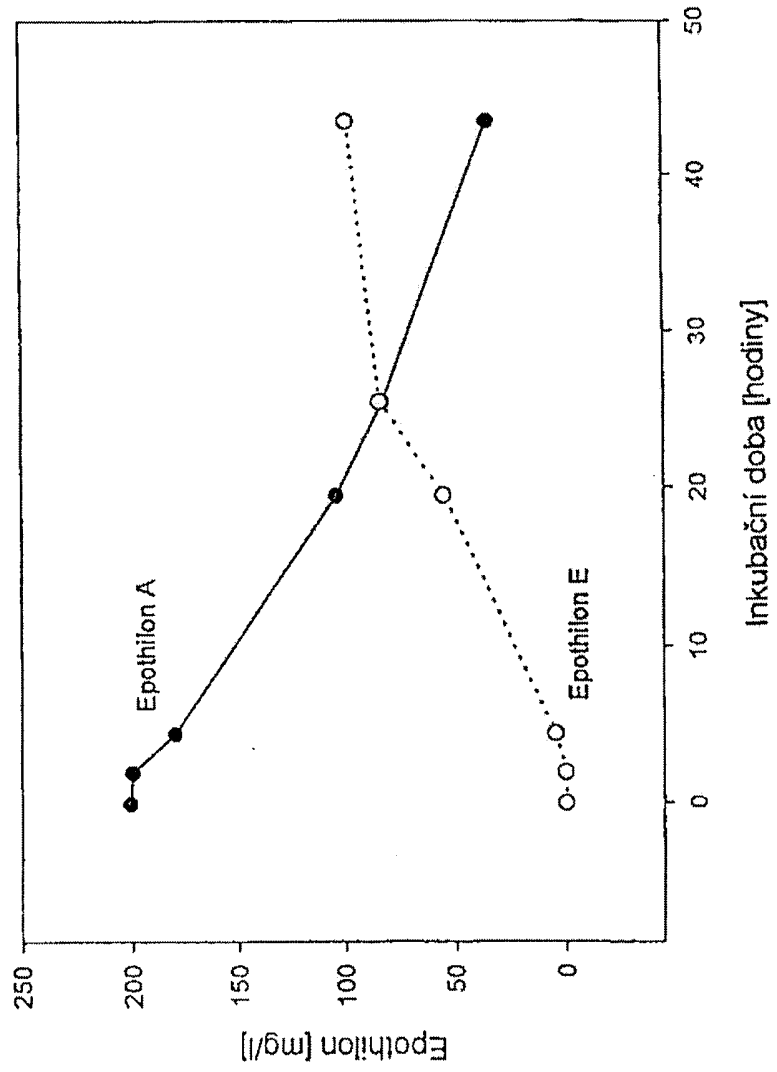
OBRÁZEK 2
Obhacení Epothilonu E a F ve fermentační směsi po doplnění směsí Epothilonu A a B, analyzováno po inkubaci 48 hodin.



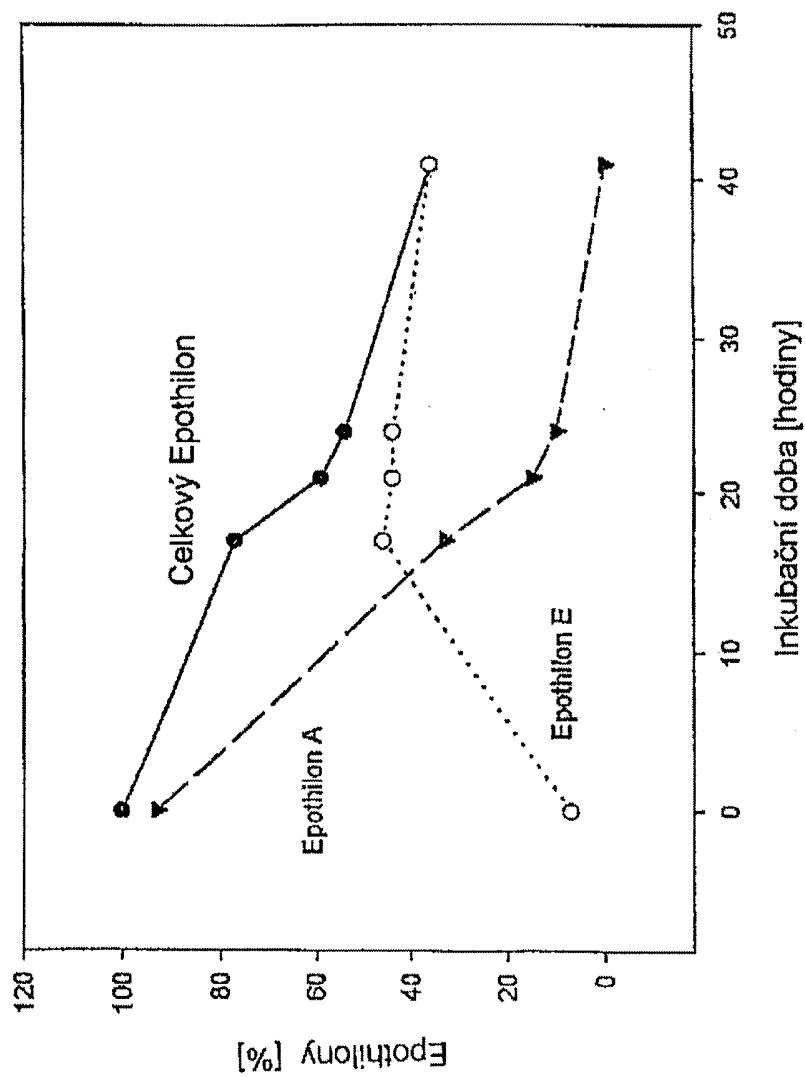
OBRÁZEK 3

Kinetika biotransformace Epothilonu A na Epothilon E pomocí *Sorangium cellulosum* So ce90.

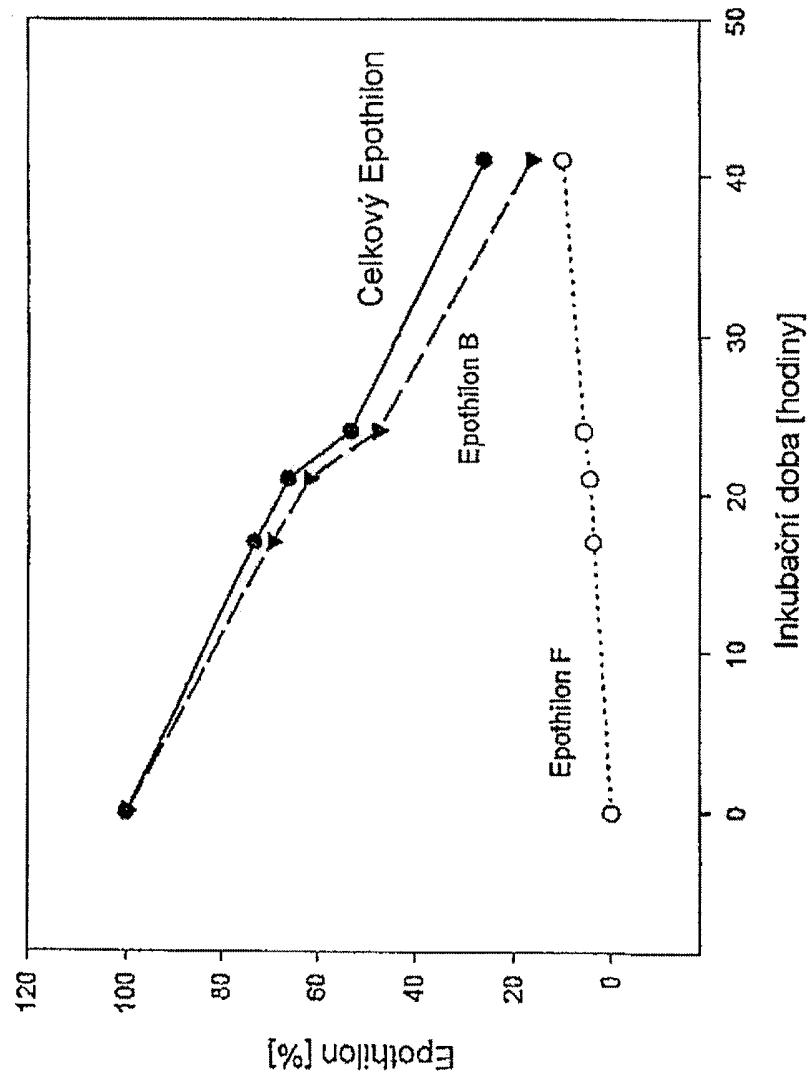
Biotransformace Epothilonu A



OBRÁZEK 4
 Biotransformace Epothilonu A na Epothilon E.



OBRÁZEK 5
Biotransformace Epothilonu B na Epothilon F.



Konec dokumentu