

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
C07D 417/06

(11) 공개번호 특2000-0053308
(43) 공개일자 2000년08월25일

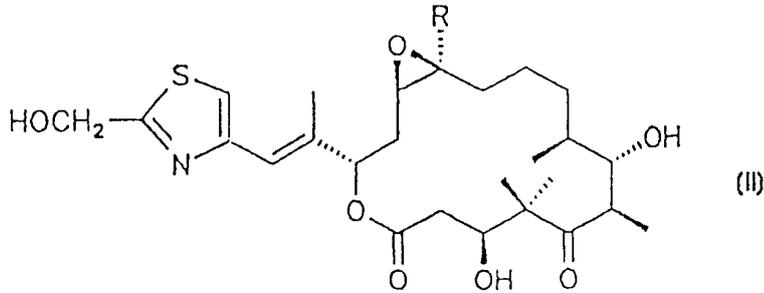
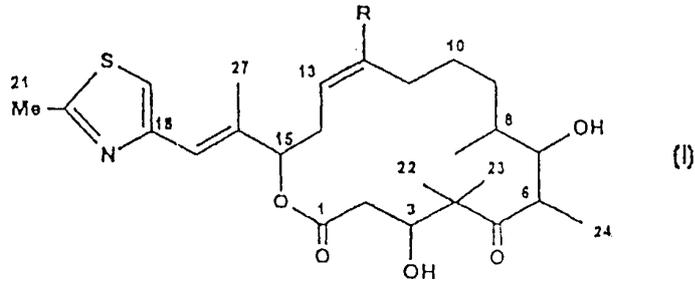
(21) 출원번호	10-1999-7004302		
(22) 출원일자	1999년05월14일		
번역문제출일자	1999년05월14일		
(86) 국제출원번호	PCT/EP 97/06442	(87) 국제공개번호	WO 98/22461
(86) 국제출원출원일자	1997년11월18일	(87) 국제공개일자	1998년05월28일
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 짐바브웨 가나 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 핀란드 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부와르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 스위스 리히텐슈타인 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀란드 영국 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아 타지키스탄 투르크메니스탄 터어키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 미국 우즈베키스탄 베트남 폴란드 포르투갈 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르		
(30) 우선권주장	19647580.5 1996년11월18일 독일(DE) 19707506.1 1997년02월25일 독일(DE)		
(71) 출원인	게젤샤프트 쾰러 비오테크놀로지체 포르슝 엠베하(게베에프) 독일연방공화국 디-38124 브라운슈바이그 마셴로더 베그 1		
(72) 발명자	라이헨바하한스 독일연방디-38124브라운슈바이그마셴로더베그1 회플레게르하르트 독일연방디-38124브라운슈바이그마셴로더베그1 게르드클라우스 독일연방디-38124브라운슈바이그마셴로더베그1 슈타인메츠하인리히 독일연방디-38124브라운슈바이그마셴로더베그1		
(74) 대리인	최재철, 권동용, 서장찬		

심사청구 : 없음

(54) 에포틸론 씨, 디, 이 및 에프, 그 제조방법 및 세포증식 억제제와 식물 위생제로서의 이들의 용도

요약

본 발명은 에포틸론 (epothilone), 특히 아래 구조식 (I)의 에포틸론 C (R=수소) 및 에포틸론 D (R=메틸)와, 아래 구조식 (II)의 에포틸론 E (R=수소) 및 에포틸론 F (R=메틸)과, 이들의 제조방법 및 세포증식 억제제, 식물 위생제를 비롯한 치료제 제조를 위한 이들의 용도에 관한 것이다.



대표도

도1

명세서

기술분야

본 발명은 에포틸론 (epothilone) C, D, E 및 F, 그 제조방법 및 식물보호용 조성물 및 치료 조성물에 관한 것이다.

배경기술

에포틸론의 회수 및 특성과 관련된 선행기술로서는 W0 93/10 121 및 Angewandte Chemie, Int. Ed. Engl., (1966) 35 (20) 2399~2401이 있다.

발명의 상세한 설명

에포틸론 C 및 D

본 발명의 한가지 실시형태에 의하면 본 발명은 다음과 같은 방법으로 얻게 되는 에포틸론 [C 및 D]에 관한 것이다.

가) 소란지움 셀룰로숨 (Sorangium cellulosum) DSM 6773을 흡착성 수지 존재하에 자체 공지의 방법으로 배양하고,

(나) 배양물로부터 흡착성 수지를 제거하고 물/메탄올 혼합물로써 세정하며,

(다) 세정된 흡착성 수지를 메탄올로 용출하고, 용출액을 농축하여 조(粗)추출물 (crude extract)을 얻고,

(라) 수득한 농축물을 에틸 아세테이트로 추출하고, 그 추출물을 농축하여 메탄올과 헥산 사이에서 분배하고,

(마) 메탄올상을 농축하여 잔류물을 얻고, 농축물을 세파덱스 칼럼 (Sephadex column)에서 분획하고,

(바) 사용된 미생물의 대사 산물을 함유한 획분을 얻어,

(아) 수득한 획분을 메탄올/물의 혼합물로 C18 역상 크로마토그래피 처리하여, 순차로

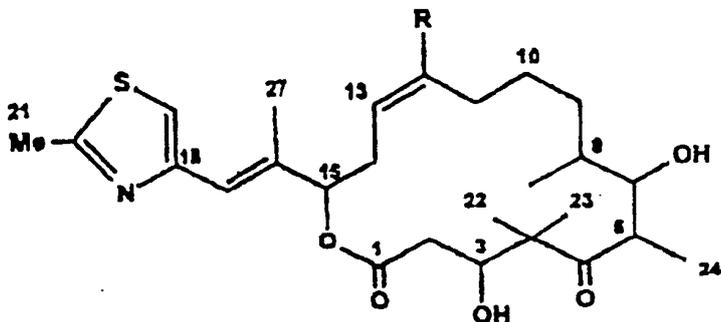
- 에포틸론 A를 함유한 제1획분을 얻은 다음,
- 에포틸론 B를 함유한 제2획분을 얻고,
- 제1획분의 추가적인 에포틸론을 함유한 제3획분을 얻고,
- 제2획분의 추가적인 에포틸론을 함유한 제4획분을 얻으며,

(자) 제1의 추가적인 핵분의 에포틸론 및/또는

(차) 제2의 추가적인 핵분의 에포틸론을 분리한다.

또한, 본 발명은 표 1에 나온 바와 같은 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼을 특징으로 하는 실험식 $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{NO}_5\text{S}$ 의 에포틸론 [C]에 관한 것이다.

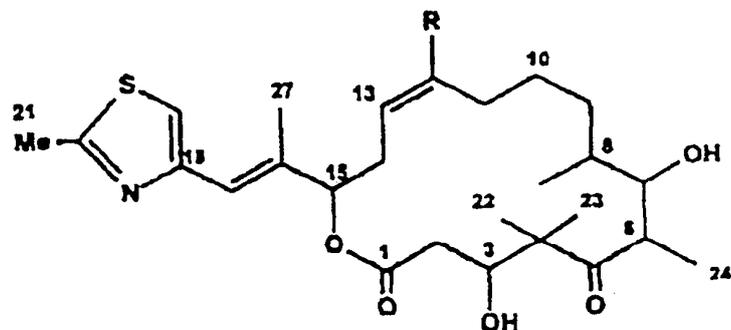
더욱이 본 발명은 아래 구조식의 에포틸론 C에 관한 것이다.



위의 식에서 $\text{R}=\text{H}$.

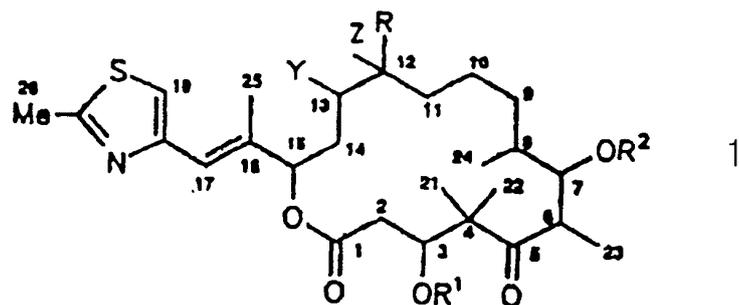
또한, 본 발명은 표 1에 나온 바와 같은 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼을 특징으로 하는 실험식 $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{NO}_5\text{S}$ 의 에포틸론 [D]에 관한 것이다.

더욱이 본 발명은 아래 구조식의 에포틸론 D에 관한 것이다.



위의 식에서 $\text{R}=\text{CH}_3$.

에포틸론 C 및 D는 아래의 구조식 1의 화합물의 제조에 사용되는데, 이들의 유도에 관한 참고문헌으로서 WO-A-97/19 086에 기재된 유도방법을 들 수 있다.



위의 식 1에서,

$\text{R}=\text{H}$, C_{1-4} -알킬이고;

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , $\text{R}^5=\text{H}$, C_{1-6} -알킬, C_{1-6} -아실벤조일, C_{1-4} -트리알킬실릴, 벤질, 페닐, C_{1-6} -알콕시-, C_6 -알킬-, 히드록시- 및 할로겐 치환된 벤질 또는 페닐이며;

라디칼 R^1 내지 R^5 중의 두개는 결합하여 $-(\text{CH}_2)_n-$ (여기서 $n=1$ 내지 6)의 기를 형성하기도 하고, 이들 라디칼에 포함된 알킬기 또는 아실기는 직쇄상 또는 분지쇄상 라디칼이고;

Y 및 Z는 동일하거나 상이하며 각각 수소, 할로겐 (예: F, Cl, Br 또는 I), 의사(擬似) 할로겐 (pseudohalogen) [예: $-\text{NCO}$, $-\text{NCS}$, 또는 $-\text{N}_3$], OH, $\text{O}-(\text{C}_{1-6})$ -아실, $\text{O}-(\text{C}_{1-6})$ -알킬, O -벤조일이고, 또한 Y 및 Z는 특허청구의 범위서 청구되지 아니한 에포틸론 A 및 B에서의 에폭시드의 O 원자일 수도 있고, 또는 C=C 이중결합의 C-C 결합의 하나를 형성하기도 한다.

따라서 12,13-이중결합을, 선택적으로

- 예컨대, 촉매를 사용하거나 또는 구조식 1에서 Y=Z=H의 화합물인 디이민 (di-imine)으로 수소첨가하거나,
- 예컨대, 디메틸디옥시란, 또는 구조식 1에서 Y, Z=-O-의 화합물인 과산 (peracid)으로 에폭시화하거나, 또는
- 구조식 1에서 Y 및 Z=할로겐, 의사 할로겐 또는 N₃의 화합물인 디할라이드, 디의사할라이드 (dipseudohalide) 또는 디아지드로 전환시킬 수 있다.

에포틸론 E 및 F

본 발명의 다른 실시형태에 의하면 본 발명은 다음과 같은 방법으로 얻게 되는 에포틸론 A의 생물변환체에 관한 것이다.

가) 소란지움 셀룰로솜 (Sorangium cellulosum) DSM 6773을 흡착성 수지 존재하에 자체 공지의 방법으로 배양하여 흡착성 수지로부터 제거하고, 적절하다면 분리된 배양물의 전체량 또는 일부를 에포틸론 A의 메탄올성 용액으로 처리하고,

나) 에포틸론 A로 처리된 배양물을 인큐베이트한 다음 흡착성 수지로 처리하고,

다) 흡착성 수지를 배양물로부터 분리하여 메탄올로 용출시키고, 이 용출액을 농축하여 조(粗)추출물을 얻고,

라) 이 조추출물을 에틸 아세테이트와 물 사이에 분배하고, 에틸 아세테이트상을 분리하여 농축함으로써 오일을 얻고,

마) 이 오일을 아래의 조건하에서 역상 크로마토그래피 처리한다.

칼럼재료: Nucleosil 100 C-18 7 μ m

칼럼치수: 250 \times 16mm

용출제: 메탄올/물=60:40

유속: 10ml/min

이어서 생물변환체를 함유하며, 254nm에서의 UV 감쇠에 의해 검출되고 20분의 R_f값을 가진 획분들을 분리하여 생물변환체를 분리하였다.

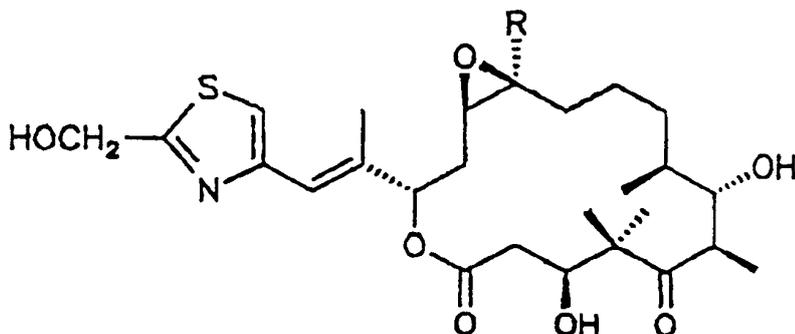
더욱이 본 발명은 상기 가) 단계에서 3일 내지 4일 또는 그 이상되는 배양물을 분리하여 얻게 되는 타입의 에포틸론 A의 생물변환체에 관한 것이다.

더욱이 본 발명은 상기 나) 단계에서 1일 내지 2일 또는 그 이상 동안 인큐베이트를 하여 얻게 되는 타입의 에포틸론 A의 생물변환체에 관한 것이다.

더욱이 본 발명은 아래와 같은 ¹H-NMR 스펙트럼을 특징으로 하는 실험식 C₂₆H₃₉NO₇S의 화합물에 관한 것이다.

¹H-NMR 스펙트럼 (300 MHz, CDCl₃): δ = 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-H₂), 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)

더욱이 본 발명은 아래의 구조식의 화합물 (에포틸론 E)에 관한 것이다.



위의 식에서 R=H.

본 발명의 또 다른 실시형태에 의하면 본 발명은 다음과 같은 방법으로 얻게 되는 에포틸론 B의 생물변환

체에 관한 것이다.

가) 소란지움 셀룰로솜 (Sorangium cellulosum) DSM 6773을 흡착성 수지 존재하에 자체 공지의 방법으로 배양하여 흡착성 수지로부터 분리하고, 적절하다면 분리된 배양물의 전체량 또는 일부를 에포틸론 B의 메탄올성 용액으로 처리하고,

나) 에포틸론 B로 처리된 배양물을 인큐베이트한 다음 흡착성 수지로 처리하고,

다) 흡착성 수지를 배양물로부터 분리하여 메탄올로 용출시키고, 이 용출액을 농축하여 조(粗)추출물을 얻고,

라) 이 조추출물을 에틸 아세테이트와 물 사이에 분배하고, 에틸 아세테이트상을 분리하여 농축함으로써 오일을 얻고,

마) 이 오일을 아래의 조건하에서 역상 크로마토그래피 처리한다.

칼럼재료: Nucleosil 100 C-18 7 μ m

칼럼치수: 250×16mm

용출제: 메탄올/물=60:40

유속: 10ml/min

이어서 생물변환체를 함유하며, 254nm에서의 UV 감쇠에 의해 검출되고 24.5분의 R_f값을 가진 핵분들을 분리하여 생물변환체를 분리하였다.

더욱이 본 발명은 상기 가) 단계에서 3일 내지 4일 또는 그 이상되는 배양물을 분리하여 얻게 되는 타입의 에포틸론 B의 생물변환체에 관한 것이다.

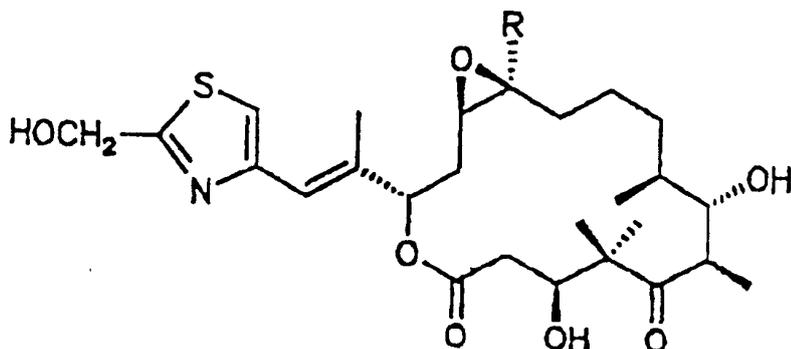
더욱이 본 발명은 상기 나) 단계에서 1일 내지 2일 또는 그 이상 동안 인큐베이트를 하여 얻게 되는 타입의 에포틸론 B의 생물변환체에 관한 것이다.

더욱이 본 발명은 아래와 같은 ¹H-NMR 스펙트럼을 특징으로 하는 실험식 C₂₇H₄₁N₀S의 화합물에 관한 것이다.

¹H-NMR 스펙트럼 (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).

더욱이 본 발명은 아래의 구조식의 화합물 (에포틸론 F)에 관한 것이다.



위의 식에서 R=CH₃.

제조방법 및 조성물

본 발명의 화합물들을 상기한 방법에 의하여 얻게 된다.

더욱이 본 발명은 상기한 에포틸론 C, D, E 및 F종의 1종 이상과 통상적인 담체 및/또는 희석제 1종 이상을 함유시킨, 농업, 임업 및/또는 원예농업에 있어서의 식물보호를 위한 조성물에 관한 것이다.

마지막으로 본 발명은 상기한 화합물들중의 1종 이상 또는 상기한 화합물들중의 1종 이상과 통상적인 담체 및/또는 희석제 1종 이상을 함유시킨 치료용 조성물에 관한 것이다. 특히, 이들 조성물은 세포 독작용을 나타내거나 혹은 면역억제를 하거나 혹은 악성종양 억제에 사용할 수 있는데, 특히 바람직하게는 세포 증식 억제제로서 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 발효종료시의 XAD 용출액의 HPLC 분석결과를 나타내는 도면.

도 2는 에포틸론 A 및 B의 혼합물의 첨가후 48 시간 인큐베이트한 발효액중의 에포틸론 E 및 F의 증가량에 대한 분석결과를 나타내는 도면.

도 3은 에포틸론 A 및 E의 농도 (mg/l)와 에포틸론 A의 생물변환을 위한 인큐베이션 시간과의 관계를 나타내는 도면.

도 4는 에포틸론 A 및 G의 농도 (mg/l) 및 에포틸론 총 농도와 에포틸론 A의 에포틸론 E로의 생물변환을 위한 인큐베이션 시간과의 관계를 나타내는 도면.

도 5는 에포틸론 B 및 F의 농도 및 총 에포틸론 농도 (%)와 에포틸론 B의 에포틸론 F로의 생물변환을 위한 인큐베이션 시간과의 관계를 나타내는 도면.

아래의 실시예에서 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

실시에

실시에 1: 에포틸론 C 및 D

A. 에포틸론에 관한 기본특허 DE-B-41 38 042에 의한 산생 균주 및 배양조건

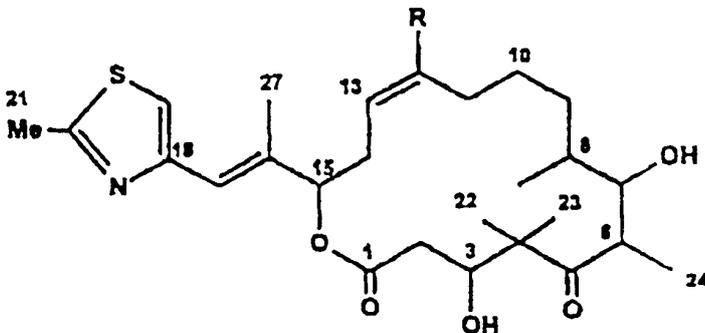
B. DSM 6773에 의한 산생

상기 기본특허에 기재된 바에 따라 배양물 75 리터를 생장시키고, 이것을 사용하여 전분 0.8%, 글루코오스 0.2%, 대두분말 0.2%, 효모 엑스 0.2%, CaCl₂×2H₂O 0.1%, MgSO₄×7H₂O 0.1%, Fe-EDTA 8mg/l, pH=7.4 및 필요에 따라 15 리터의 Amberlite XAD-16 흡착성 수지로 된 산생배지 700 리터를 함유한 산생 발효조(fermenter)에 접종한다. 0.1NL/m³로써 통기하면서 30℃에서 7일 내지 10일 동안 발효를 계속한다. 회전속도를 조절함으로써 pO₂를 30%로 유지한다.

C. 분리

0.7m², 100mesh의 프로세스 필터를 사용하여 배양물로부터 흡착성 수지를 분리하고, 흡착성 수지 충전체적 (bed volume)의 3배의 물/메탄올 2:1을 사용하여 세정함으로써 극성의 공존물을 제거한다. 4배의 충전체적의 메탄올로써 용출함으로써 조추출물을 얻어 이것을 물상이 없어질 때까지 감압하에 증발시킨다. 이것을 동일한 체적의 에틸 아세테이트로 3회 추출한다. 유기상을 증발시켜 조추출물 240g을 얻고, 이것을 메탄올과 헵탄 사이에서 분배하여 친유성의 공존물을 분리한다. 감압하에 증발시켜 메탄올로부터 증발 잔류물 180g을 얻고 Sephadex LH-20 (칼럼 20×100cm, 메탄올 20ml/min)에서 세가지 부분으로 분획한다. 240~300분의 체류시간에서 용출한 총 72g의 획분중에는 에포틸론이 함유되어 있다. 이 에포틸론을 분리하기 위하여 세가지 부분에서의 획분을 Lichrosorb RP-18 (15μm, 칼럼 10×40cm, 용출제 메탄올/물 65:35 180ml/min)에서 크로마토그래피 처리한다. 에포틸론 A 및 B의 다음에 R_f=90~95분의 에포틸론 C 및 100~110분의 에포틸론 D를 용출시키고, 감압하에 증발시켜 무색기름으로서 각각 0.3g의 수율로 얻었다..

D. 물리적 성질



에포틸론 C R=H

에포틸론 D R=CH₃

에포틸론 C

C₂₆H₃₉NO₅S [477]

ESI-MS: [양(陽) 이온]: 478.5 [M+H]⁺

¹H- 및 ¹³C-NMR은 표 참조

TLC: R_f=0.82

TLC 알루미늄 포일 60 F 254 Merck, 용출제 디클로로메탄/메탄올=9:1

검출: 254nm에서의 UV 감쇠. 바닐린-황산 시약을 분무하고 120℃로 가열시 청회색으로 변색.

HPLC: $R_t=11.5$ 분

칼럼: Nucleosil 100 C-18 $7\mu\text{m}$, $125 \times 4\text{mm}$

용출제: 메탄올/물=65:35

유속: 1ml/min

검출: 다이오우드 어레이 (diode array)

에포틸론 D

$\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{NO}_5\text{S}$ [491]

ESI-MS: [양(陽) 이온]: 492.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H - 및 ^{13}C -NMR은 표 참조

TLC: $R_f=0.82$

TLC 알루미늄 포일 60 F 254 Merck, 용출제: 디클로로메탄/메탄올=9:1

검출: 254nm에서의 UV 감쇠. 바닐린-황산 시약을 분무하고 120°C 로 가열시 청회색으로 변색.

HPLC: $R_t=15.3$ 분

칼럼: Nucleosil 100 C-18 $7\mu\text{m}$, $125 \times 4\text{mm}$

용출제: 메탄올/물=65:35

유속: 1ml/min

검출: 다이오우드 어레이

표 1: 300MHz에서 $[\text{D}_6]$ DMSO중에서의 에포틸론 C 및 에포틸론 D의 ^1H - 및 ^{13}C -NMR 데이터

H 원자	에포틸론 C			에포틸론 D		
	δ (ppm)	C 원자	δ (ppm)	δ (ppm)	C 원자	δ (ppm)
		1	170.3		1	170.1
2-Ha	2.38	2	38.4	2.35	2	39.0
2-Hb	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-Ha	1.15	10	30.0	1.14	10	25.9
9-Hb	1.40	11	27.6	1.38	11	31.8*
10-Ha	1.15*	12	124.6	1.14*	12	138.3
10-Hb	1.35*	13	133.1	1.35*	13	120.3
11-Ha	1.90	14	31.1	1.75	14	31.6*
11-Hb	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-Ha	2.35	18	152.1	2.30	18	152.1
14-Hb	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		

*, ** 호환성 지정

실시에 2: 에포틸론 A 및 에포틸론 C로부터 12,13-비스에피-에포틸론 A

50mg의 에포틸론 A 를 1.5ml의 아세톤에 용해하고, 아세톤중의 디메틸디옥시란의 0.07 몰 용액 1.5ml로 처리한 다음, 실온에서 6시간 방치한 후에 이 혼합물을 감압하에 증발시켰다. 잔류물을 예비 HPLC에 의하여 실리카 겔에서 분리 (용출제: 메틸 tert-부틸 에테르/석유 에테르/메탄올 33:66:1)한다.

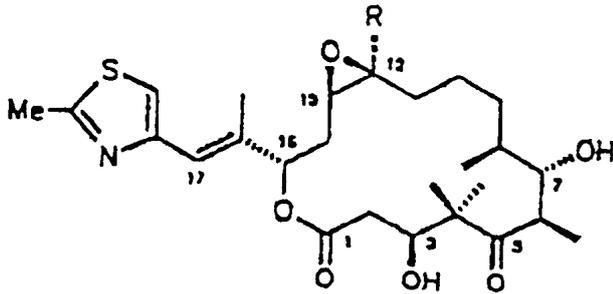
수율:

에포틸론 A 25mg, R_t = 3.5분 (분석급 HPLC, 7 μ m, 칼럼 4 \times 250mm, 용출제는 앞서 나온 것 참조, 유속 1.5ml/min), 및

12,13-비스에피-에포틸론 A 20mg, $R_t=3.7$ 분, ESI-MS [양(陽) 이온]

$m/e=494$ $[M+H]^+$

[D4] 메탄올중에서의 1H -NMR, 선택된 시그널: $\delta=4.32$ (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-비스에피-에포틸론 A $R=H$

실시예 3: 에포틸론 E 및 F (에포틸론 A 및 B의 신규의 생물변환 생성물)

산생 균주:

산생 균주 소란지움 싨물로숨 So ce90을 Zambesi강 기슭에서 채취한 토양으로부터 GBF에서 1985년 7월 분리하여 1991년 10월 28일자로 독일의 미생물 기탁기관 (the German Collection for Microorganisms)에 제 DSM 6773호로 기탁되었다.

산생 균주와 배양조건의 특징에 대해서는 1993년 5월 27일자로 공개된 DE 41 38 042 A1에서의

'Höfle, G.; N. Bedorf, K. Gerth & H. Reichenbach: 에포틸론류, 그 제조방법 및 이들을 함유한 조성물'에 기재되어 있다.

발효도중의 에포틸론 E 및 F의 생성:

대표적인 발효방법을 다음과 같이 실시한다. 즉, 100 리터 용량의 바이오리액터에 60 리터의 배지 (전분 0.8%, 글루코오스 0.2%, 대두분말 0.2%, 효모 엑스 0.2%, $CaCl_2 \times 2H_2O$ 0.1%, $MgSO_4 \times 7H_2O$ 0.1%, Fe-EDTA 8mg/l, pH=7.4)를 채우고, 여기에 흡착성 수지 (XAD-16, Rohm & Haas)를 2% 추가한다. 이 배지를 오토클레이브에서 처리 (2시간, 120°C)하여 멸균하고, 진탕 플라스크 (160rpm, 30°C)중에서 동일 배지 (추가로 50mM HEPES 완충액 pH 7.4)에서 성장시킨 예비 배양물 10 리터를 사용하여 접종한다. 교반기 속도 500rpm 및 공기 도입량 $0.2Nl/m^3$ /시간으로 하여 32°C에서 발효를 시키는데, 이 때 KOH를 첨가하여 pH를 7.4로 유지한다. 7일 내지 10일 동안 발효시킨다. 발효도중 생성된 에포틸론을 계속하여 흡착성 수지에 결합시킨다. 배양액을 분리 (예컨대 프로세스 필터에서의 스크리닝에 의한) 후, 수지를 3배 충전체적의 물로 세정하고 4배 충전체적의 메탄올로 용출한다. 이 용출액을 농축건고하고 700ml의 메탄올중에 취한다.

XAD 용출액의 HPLC 분석:

반응기의 출발 체적 (70 리터)에 대하여 용출액을 100:1로 농축한다. Hewlett Packard사의 1090 HPLC 장치를 사용하여 분석을 한다. 각 성분을 분석하기 위하여 Machery-Nagel (Düren)사의 마이크로보어 칼럼 (microbore column) (125/2 Nucleosil 120-5 C_{18})을 사용한다. 용출조작은 물/아세트니트릴의 농도 기울기를 이용하여 초기에는 75:25에서 시작하여 5.5분후에는 50:50 까지로 하여 실시한다. 이 비를 제7번째 분 (minute)까지 유지한 다음, 제10번째 분까지는 100% 아세트니트릴의 농도로 증가시킨다.

파장 250nm 및 띠틈폭 (bandwidth) 4nm에서 측정을 한다. 다이오우드 어레이 스펙트럼을 200~400nm의 파장 영역에서 측정한다. XAD 용출액에 있어서 R_t 5.29 및 R_t 5.91의 두가지 신규물질이 생성되어 있는데, 이들의 흡수 스펙트럼은 에포틸론 A 및 B의 것들과 동일하다 (도 1에서 E는 A에 대응하고, F는 B에 대응함). 이들 물질은 주어진 발효조건하에서 미량으로 생성될 뿐이다.

에포틸론 A 및 B의 에포틸론 E 및 F로의 생물변환:

흡착성 수지에서 4일간 유지된 So ce90의 배양물 500ml을 특정한 생물변환에 사용한다. 이중 250ml을 XAD에 잔존하는 멸균된 1 리터들이 삼각 플라스크에 넣고, 여기에 에포틸론 A 36mg과 에포틸론 B 14mg의 혼합물의 메탄올성 용액을 가하고, 이 플라스크를 30°C 및 200rpm에서 2일 동안 진탕하면서 인큐베이트한다. 원심분리된 배양 상청액 $10\mu l$ 로부터 직접 에포틸론 E 및 F의 생성을 분석한다(도 2). 세포 존재하에서만 변환이 일어나는데 이 변환은 사용된 세포밀도 및 시간에 의존한다. 에포틸론 A에 있어서의 변환에 대한 동역학은 도 3에 나와 있다.

에포틸론 E 및 F의 분리:

에포틸론 E 및 F를 분리하기 위하여 생물변환시의 3개의 진탕 플라스크 배치 (batch)(앞서나온 것 참조)를 합하여 20ml의 XAD-16과 더불어 1시간 진탕한다. XAD를 스크리닝에 의해 회수한 다음 메탄올 200ml로써 용출한다. 이 용출액을 감압하에 증발시켜 조추출물 1.7g을 얻는다. 이것을 에틸 아세테이트 30ml와 물 100ml 사이에서 분배한다. 에틸 아세테이트상을 감압하에 증발시켜 기름상 잔류물 330mg을 얻은 다음, 250×20 mm RP-18 칼럼에서 5회 크로마토그래피 처리한다 (용출제: 메탄올/물 58:42, 검출 254nm).

수율: 에포틸론 E 50mg

에포틸론 F 10mg

에포틸론 E의 생리작용:

세포 배양물에 있어서 성장을 50% 감소시키는 농도 (IC₅₀)를 측정하고, 에포틸론 A에 대한 값과 비교하였다.

세포계	IC ₅₀ (ng/ml)	
	에포틸론 E	에포틸론 A

HeLa. KB-3.1 (인간)	5	1
마우스 섬유아세포, L929	20	4

에포틸론 E

C₂₆H₃₉O₇S [509]

ESI-MS: [양이온]: 510.3 [M+H]⁺

TLC: R_f=0.58

TLC 알루미늄 포일 60 F 254 Merck, 용출제: 디클로로메탄/메탄올=9:1

검출: 254nm에서의 UV 감쇠. 바닐린-황산 시약을 분무하고 120℃로 가열시에 청회색으로 변색.

HPLC: R_t=5.0 분

칼럼: Nucleosil 100 C-18 7μm, 250×4mm

용출제: 메탄올/물=60:40

유속: 1.2ml/분

검출: 다이오우드 어레이

¹H-NMR (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)

에포틸론 F

C₂₇H₄₁NO₇S [523]

ESI-MS: [양(陽)이온]: [M+H]⁺ 524.5

TLC: R_f=0.58

TLC 알루미늄 포일 60 F 254 Merck, 용출제: 디클로로메탄/메탄올=9:1

검출: 254nm에서의 UV 감쇠. 바닐린-황산 시약을 분무하고 120℃로 가열시에 청회색으로 변색.

HPLC: R_t=5.4 분

칼럼: Nucleosil 100 C-18 7μm, 250×4mm

용출제: 메탄올/물=60:40

유속: 1.2ml/분

검출: 다이오우드 어레이

¹H-NMR (300 MHz, [sic], 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).

실시에 4: 소란지움 셀룰로솜 So ce90을 사용하는 생물변환에 의한 에포틸론 E 및 F의 제조

1) 생물변환의 실시:

생물변환을 위하여, 2% XAD-16 흡착성 수지(Rohm & Haas, 프랑크푸르트/M) 존재하에 30℃ 및 160rpm에서 4일간 진탕시킨 소란지움 셀룰로솜 So ce90의 배양물을 사용한다. 배양배지는 증류수중에 감자전분(Maizena) 8g/리터, 글루코오스(Maizena) 8g/리터, 탈지 대두분말 2g/리터, 효모엑스(Marcor) 2g/리터, 에틸렌디아민테트라아세트산, 철(III) 나트륨염 0.008g/리터, MgSO₄×7H₂O 1g/리터, CaCl₂×2H₂O 1g/리터, HEPES 11.5g/리터를 가하여 된 것이다. 오토클레이브 처리하기전에 KOH를 가하여 pH 7.4로 조정한다. XAD를 스테인레스강제의 체(sieve)(200 μ m 메쉬)를 통과시킴으로써 배양물로부터 분리한다. 10,000rpm에서 10분간 원심분리하여 박테리아를 침강시키고, 수득한 펠릿(pellet)을 배양 상청액의 1/5중에 재현탁시킨다. 이어서 메탄올성 용액중의 에포틸론 A 및 에포틸론 B를 농축된 박테리아 현탁액에 0.5g/리터의 농도로 가한다. 이 배양물을 상기한 바와 같이 다시 배양한다. 생물변환을 분석하기 위하여, 소량의 시간마다 시료 1ml을 취하고, 여기에 XAD 0.1ml을 가한 다음, 이 시료를 30℃에서 30분간 진탕한다. XAD를 메탄올로 용출하고, 용출액을 농축 건조한 후, 메탄올 0.2ml중에 다시 가한다. 이 시료를 HPLC로 분석한다.

도 4는 에포틸론 A의 에포틸론 E로의 생물변환의 동역학적 관계를 나타낸 것이다.

도 5는 에포틸론 B의 에포틸론 F로의 생물변환의 동역학적 관계를 나타낸 것이다.

2) 1g의 에포틸론 A의 생물변환에 의한 에포틸론 E의 제조

균주 소란지움 셀룰로솜 So ce90을 10 리터 용량의 바이오리액터 중의 상기한 배지 (단, XAD 첨가 없음) 8.5 리터중에서 30℃, 회전속도 150rpm 및 공기도입 0.1vvm의 조건하에서 4일동안 성장시킨다.

이어서 배양물을 직교류 여과(crossflow filtration)에 의해 농축한다. 이 목적으로 기공크기가 0.3 μ m인 0.6 μ m 멤브레인을 사용한다.

농축된 배양물을 4 리터 용량의 바이오리액터로 옮기고, 여기에 메탄올 10ml중의 에포틸론 A 1g의 메탄올성 용액을 가한다. 이어서 이 배양물을 다시 21.5 시간 동안 배양한다. 온도는 32℃이고, 교반기 속도는 455rpm이며, 공기를 6 리터/분으로 도입한다. 회수시에 XAD 100ml을 가하고, 이 혼합물을 다시 1시간 동안 인큐베이트 한다. XAD를 스크리닝법으로 세포로부터 분리하고 메탄올로 끝까지 용출시킨다. 농축된 용출액을 HPLC로 분석한다.

생체내 형질전환의 물질수지:

에포틸론 A 사용량	1000mg=100%
21.5 시간후의 에포틸론 A의 회수량	53.7mg=5.4%
21.5 시간후의 에포틸론 E의 생성량	661.4mg=66.1%
에포틸론 A의 완전 분해량	=28.5%

실험 5 :

본 발명에 의한 에포틸론류를 세포 배양물에 대해 시험하고 (표 2), 종합 촉진에 대해 시험하였다 (표 3).

표 2: 세포 배양물에 대한 에포틸론 시험

에포틸론	A	B	C	D	E	F
	493	507 IC-50	477 [ng/ml]	491	509	523
마우스 섬유 아세포 L 929	4	1	100	20	20	1.5
<u>인간 종양 세포계:</u>						
HL-60 (백혈병)	0.2	0.2	10	3	1	0.3
K-562 (백혈병)	0.3	0.3	20	10	2	0.5
U-937 (임파종)	0.2	0.2	10	3	1	0.2
KB-3.1 (경부 암종)	1	0.6	20	12	5	0.5
KB-V1 (복합 경부 암종)	0.3	0.3	15	3	5	0.6
A-498 (신장 암종)	-	1.5	150	20	20	3
A-549 (폐암종)	0.7	0.1	30	10	3	0.1

표 3: 에포틸론에 대한 종합시험

파라미터 : 대조의 반최대 (half-maximal) 중합까지의 시간

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

1ml당 튜블린 0.9mg 및 1 μ M 시료농도에서의 표준시험.

중합시험은 돼지뇌 유래의 정제 튜블린을 사용한 생체외 시험이다. 평가는 광도계법으로 한다. 에포틸론 등의 중합 촉진 물질은 반최대 중합이 일어나기 까지의 시간을 단축하는데, 즉 시간이 짧을 수록 화합물의 활성은 더욱 강해진다. w, x, y 및 z는 각각 독립된 4가지 실험이고, 상대활성을 대조에 대한 %로 하여 마지막 란에 나타내었다. 즉 값이 가장 낮은 것이 가장 양호한 활성을 나타내는 것이 된다. 비교 등급 리스트는 세포 배양물에서 실측된 것과 합리적으로 정확하게 상응하고 있다.

산업상이용가능성

본 발명에 의한 에포틸론 및 이들의 회수방법은 치료용 조성물, 특히 세포증식 억제용 조성물에 유용하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

가) 소란지움 셀룰로솜 (Sorangium cellulosum) DSM 6773을 흡착성 수지 존재하에 자체 공지의 방법으로 배양하고,

(나) 배양물로부터 흡착성 수지를 제거하고 물/메탄올 혼합물로서 세정하며,

(다) 세정된 흡착성 수지를 메탄올로 용출하고, 용출액을 농축하여 조(粗)추출물 (crude extract)을 얻고,

(라) 수득한 농축물을 에틸 아세테이트로 추출하고, 그 추출물을 농축하여 메탄올과 헥산 사이에서 분배하고,

(마) 메탄올상을 농축하여 잔류물을 얻고, 농축물을 세파덱스 칼럼 (Sephadex column)에서 분획하고,

(바) 사용된 미생물의 대사 산물을 함유한 획분을 얻어,

(야) 수득한 획분을 메탄올/물의 혼합물로 C18 역상 크로마토그래피 처리하여, 순차로

- 에포틸론 A를 함유한 제1획분을 얻은 다음,

- 에포틸론 B를 함유한 제2획분을 얻고,

- 제1획분의 추가적인 에포틸론을 함유한 제3획분을 얻고,

- 제2획분의 추가적인 에포틸론을 함유한 제4획분을 얻으며,

(자) 제1의 추가적인 획분의 에포틸론 및/또는

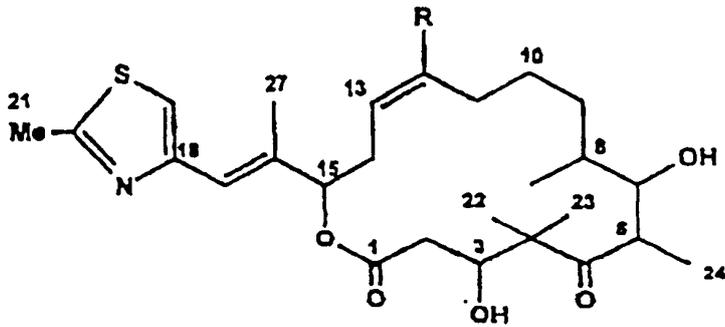
(차) 제2의 추가적인 획분의 에포틸론을 분리하여 수득되는 에포틸론.

청구항 2

표 1에 나온 바와 같은 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼을 특징으로 하는 실험식 $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{NO}_5\text{S}$ 의 에포틸론.

청구항 3

아래 구조식의 에포틸론 C:



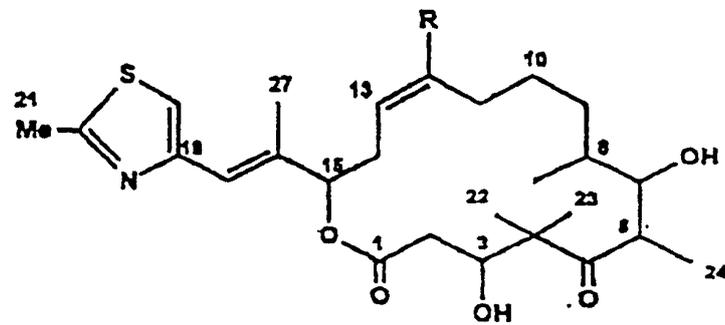
위의 식에서 R=H.

청구항 4

표 1에 나온 바와 같은 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼을 특징으로 하는 실험식 $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{NO}_5\text{S}$ 의 에포틸론.

청구항 5

아래 구조식의 에포틸론 D:



위의 식에서 R=CH₃.

청구항 6

가) 소란지움 셀룰로솜 (Sorangium cellulosum) DSM 6773을 흡착성 수지 존재하에 자체 공지의 방법으로 배양여 흡착성 수지로부터 제거하고, 적절하다면 분리된 배양물의 전체량 또는 일부를 에포틸론 A의 메탄올성 용액으로 처리하고,

나) 에포틸론 A로 처리된 배양물을 인큐베이트한 다음 흡착성 수지로 처리하고,

다) 흡착성 수지를 배양물로부터 분리하여 메탄올로 용출시키고, 이 용출액을 농축하여 조(粗)추출물을 얻고,

라) 이 조추출물을 에틸 아세테이트와 물 사이에 분배하고, 에틸 아세테이트상을 분리하여 농축함으로써 오일을 얻고,

마) 이 오일을 아래의 조건하에서 역상 크로마토그래피 처리한다.

칼럼재료: Nucleosil 100 C-18 7 μm

칼럼치수: 250 \times 16mm

용출제: 메탄올/물=60:40

유속: 10ml/min

이어서 생물변환체를 함유하며, 254nm에서의 UV 감쇠에 의해 검출되고 20분의 R_f값을 가진 획분들을 분리하고 생물변환체를 분리하여 수득되는 에포틸론 A의 생물변환체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 가) 단계에서 3일 내지 4일 또는 그 이상되는 배양물을 분리하는 것을 특징으로 하는 에포틸론 A의 생물변환체.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 나) 단계에서 1일 내지 2일 또는 그 이상 동안 인큐베이트를 하여 수득되는 에포틸론 A의 생물변환체.

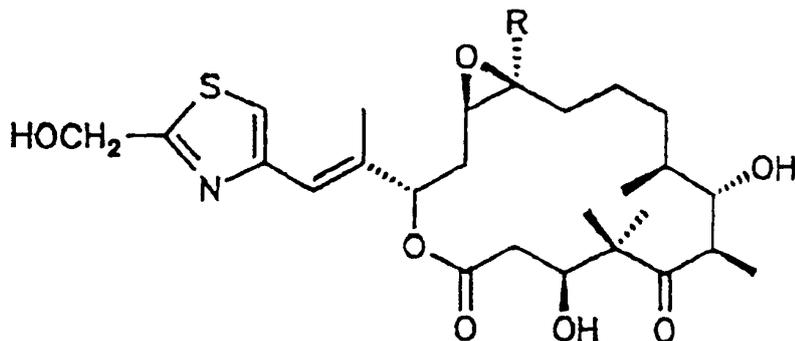
청구항 9

아래의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 특징으로 하는 실험식 $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{NO}_7\text{S}$ 의 화합물:

$^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 (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-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)

청구항 10

아래의 구조식의 화합물 (에포틸론 E):



위의식에서 $\text{R}=\text{H}$.

청구항 11

가) 소란지음 셀룰로솜 (*Sorganium cellulosum*) DSM 6773을 흡착성 수지 존재하에 자체 공지의 방법으로 배양여 흡착성 수지로부터 분리하고, 적절하다면 분리된 배양물의 전체량 또는 일부를 에포틸론 B의 메탄올성 용액으로 처리하고,

나) 에포틸론 B로 처리된 배양물을 인큐베이트한 다음 흡착성 수지로 처리하고,

다) 흡착성 수지를 배양물로부터 분리하여 메탄올로 용출시키고, 이 용출액을 농축하여 조(粗)추출물을 얻고,

라) 이 조추출물을 에틸 아세테이트와 물 사이에 분배하고, 에틸 아세테이트상을 분리하여 농축함으로써 오일을 얻고,

마) 이 오일을 아래의 조건하에서 역상 크로마토그래피 처리한다.

칼럼재료: Nucleosil 100 C-18 $7\mu\text{m}$

칼럼치수: $250 \times 16\text{mm}$

용출제: 메탄올/물=60:40

유속: 10ml/min

이어서 생물변환체를 함유하며, 254nm에서의 UV 감쇠에 의해 검출되고 24.5분의 R_t 값을 가진 핵분들을 분리하여 생물변환체를 분리하여 수득되는 에포틸론 B의 생물변환체.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 가) 단계에서 3일 내지 4일 또는 그 이상되는 배양물을 분리하여 수득되는 생물변환체.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 나) 단계에서 1일 내지 2일 또는 그 이상 동안 인큐베이트를 하여 수득되는 생물변환체.

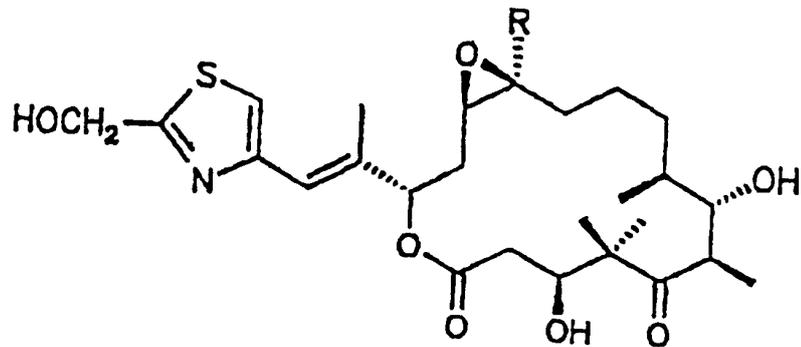
청구항 14

아래의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 특징으로 하는 실험식 $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{NO}_7\text{S}$ 의 화합물:

$^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 (300 MHz [sic], 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)

청구항 15

아래의 구조식의 화합물 (에포틸론 F):



위의식에서 $\text{R}=\text{CH}_3$.

청구항 16

제1항 내지 제15항중의 어느 한 항에 의한 화합물들중의 1종 이상 또는 이들 화합물들중의 1종 이상과 통상적인 담체 및/또는 희석제 1종 이상으로 된, 농업, 임업 및/또는 원예농업에 있어서의 식물보호를 위한 조성물.

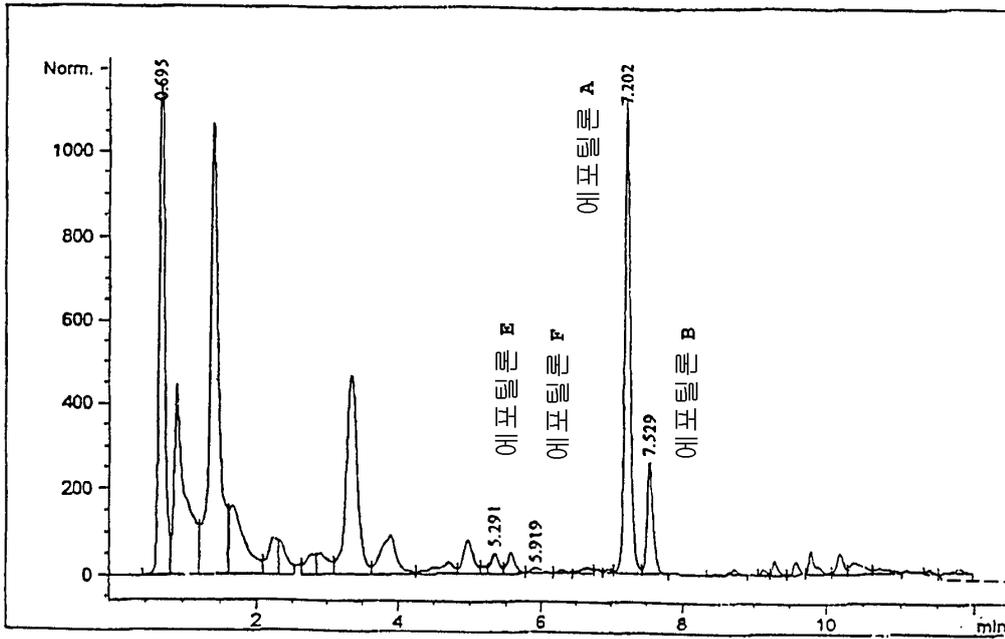
청구항 17

제1항 내지 제16항중의 어느 한 항 이상에 의한 화합물들중의 1종 이상 또는 제1항 내지 제16항중의 한 항 이상의 항에 의한 화합물들중의 1종 이상과 1종 이상과 통상적인 담체 및/또는 희석제 1종 이상으로 된, 특히, 세포증식 억제제로서 사용하기 위한 치료용 조성물.

도면

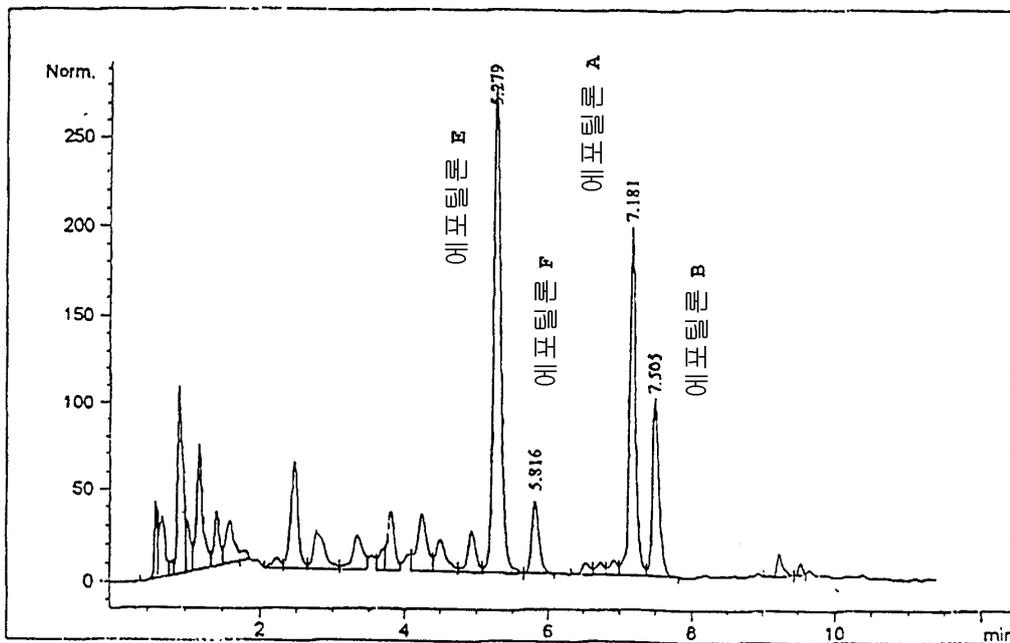
도면1

발효종료시의 XAD 용출액의 HPLC 분석



도면2

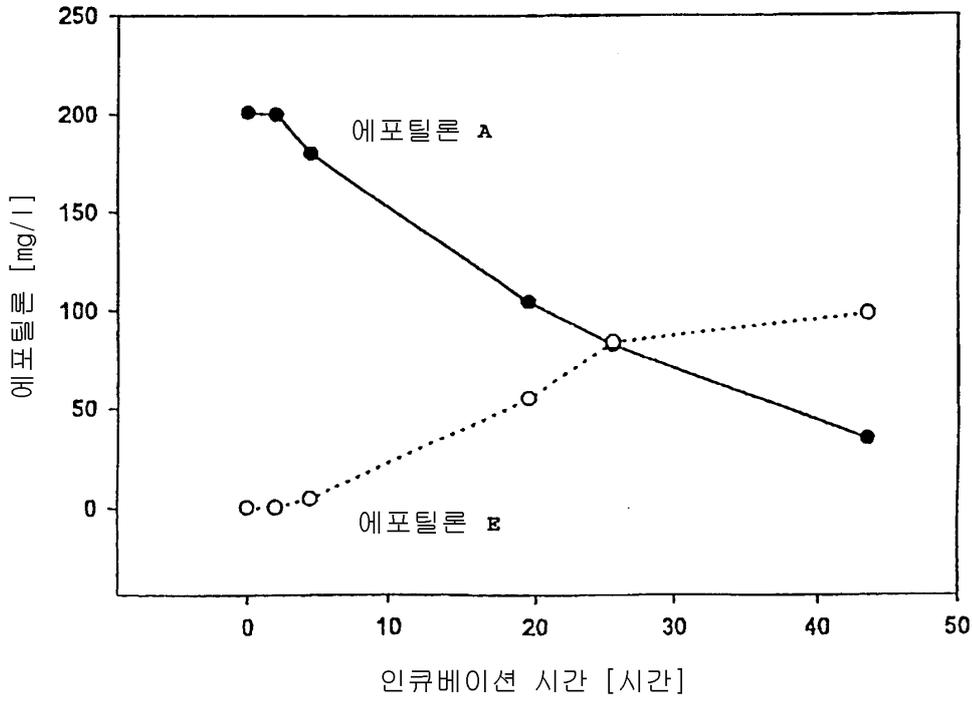
에포틸론 A 및 B 혼합물의 투입 후 48시간 인큐베이션한 후에
발효액중의 에포틸론 E 및 F의 증가량의 분석



도면3

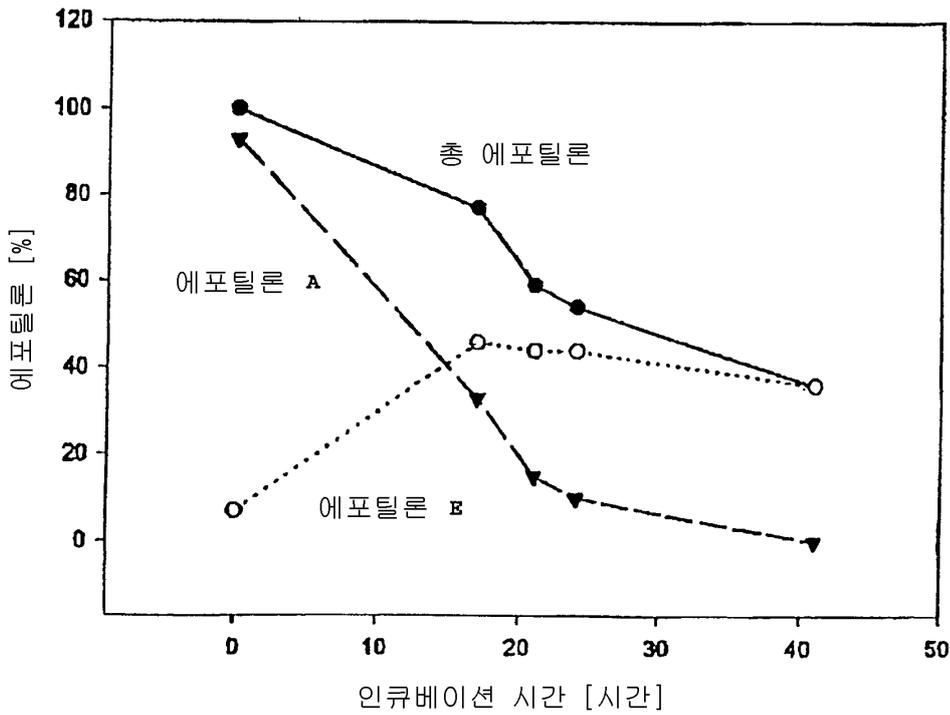
ce90에 의한 에포틸론 A로부터
에포틸론 E로의 생체내 변환의 동역학

에포틸론 A의 생체내 변환



도면4

에포틸론 A로부터 에포틸론 E로의 생체내 변환



도면5

에포틸론 B로부터 에포틸론 E로의 생체내 변환

