

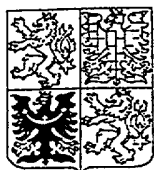
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 4183

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 11.05.1999

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 11.05.1998

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1998/085024

(33) Země priority: US

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 13.06.2001
(Věstník č. 6/2001)

(86) PCT číslo: PCT/US99/10233

(87) PCT číslo zveřejnění: WO99/58125

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 D 497/22

C 07 D 411/14

C 07 D 327/02

A 61 K 31/47

A 61 K 31/39

A 61 P 35/00

(71) Přihlašovatel:

PHARMA MAR, S. A., Madrid, ES;

(72) Původce:

Rinehart Kenneth Lloyd, Urbana, IL, US;

Morales Jose J., Urbana, IL, US;

Reid Joel, Rochester, MN, US;

Reymundo Cuesta Isabel, Madrid, ES;

Florian Pablo, Madrid, ES;

Garcia Gravalos Lola, Madrid, ES;

(74) Zástupce:

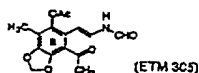
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

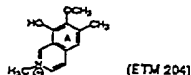
Metabolity ecteinascidinu 743

(57) Anotace:

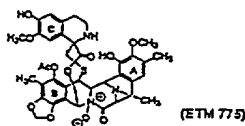
Objasnění struktury několika produktů metabolismu ecteinascidinu 743 působením lidského cytochromu CYP3A4. Sloučeniny zkracované jako "ETM" a následující číselnou hodnotou reprezentující přibližnou molekulovou hmotnost, které byly dosud identifikovány, jsou označeny jako ETM 305, ETM 775 a ETM 204. Popisují se struktury těchto metabolitů, jejich použití v lékařství a farmaceutický prostředek s jejich obsahem.



(ETM 305)



(ETM 204)



(ETM 775)

Metabolity ecteinascidinu 743

Oblast techniky

Ecteinascidiny (zde zkracované jako Et) jsou výjimečně silné antitumorové prostředky izolované z mořského pláštěnce *Ecteinascidia*
5 *turbinata*. Zvláště látky ze skupiny Et 729, 743 a 722 ukázaly slibné vlastnosti z hlediska účinnosti *in vivo*, včetně účinnosti proti myší leukemii P388, melanomu B16, Lewisovu karcinomu plic a několika xenograftových modelů lidských tumorů u myši.

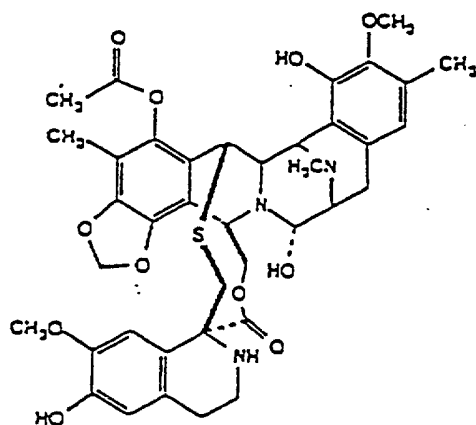
10 Dosavadní stav techniky

Izolace a charakterizace přírodní látky Et 743 se popisuje v US patentu No. 5,089,273, který se tímto zařazuje odkazem. Výroba syntetického Et 743 se popisuje v US patentu No. 5,721,362, který je rovněž tímto zařazen odkazem.

15 Antitumorové vlastnosti sloučenin typu ecteinascidinů, zvláště Et 729 a Et 743 jsou ve vědecké literatuře dobře doloženy, viz například Goldwasser a další, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 39: 598 (1998); Kuffel a další, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 38: 596 (1997); Moore a
20 další, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 38: 314 (1997); Mirsalis a další, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 38: 309 (1997); Reid a další, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 38: 329 - 334 (1996); Faircloth a
další, *European Journal of Cancer*, 32A, dod. 1, str. S5 (1996);
25 García-Rocha a další, *British Journal of Cancer*, 73: 875 - 883 (1996); Eckhardt a další, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 37: 409 (1996); Hendriks a další, *Proceedings of the*

American Association for Cancer Research, 37: 389 (1996); jejichž obsahy se tímto zařazují odkazem.

Ecteinascidin 743 (Et 743) má následující strukturu:



Et 743

Z hlediska výrazných antitumorových účinků této třídy sloučenin pokračuje výzkum látek s příbuznou strukturou, které mohou mít stejné nebo vyšší antitumorové účinky. Výsledkem těchto pokračujících studií je předkládaný vynález, který se zaměřuje na izolaci a charakterizaci přirozených metabolitů Et 743.

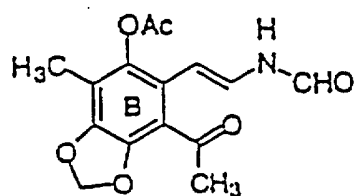
Podstata vynálezu

Bylo provedeno čištění a objasnění struktury několika metabolických produktů Et 743, které vznikají působením lidského cytochromu CYP3A4. Tyto sloučeniny se zde zkracují jako „ETM“ s následující číselnou hodnotou, která reprezentuje přibližnou molekulovou hmotnost.

Například sloučeniny ETM 305 a ETM 775 byly izolovány ze směsi metabolitů získané z biochemické studie prováděné oddělením analytické chemie v PharmaMar, Španělsko. Podobná metabolická

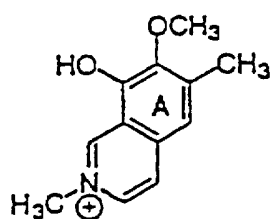
studie provedená na klinice Mayo Clinic vedla k identifikaci sloučeniny
ETM 204. Struktury těchto metabolitů ecteinascidinu jsou následující:

5

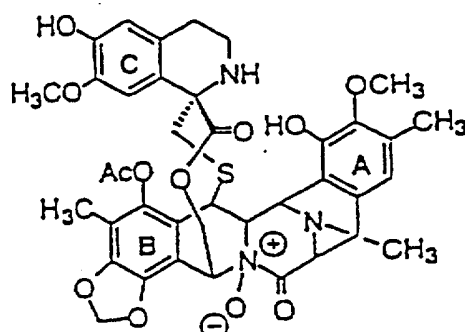


ETM 305

10



ETM 204



ETM 775

Přehled obrázků na výkresech

15

Předkládanému vynálezu je možno lépe porozumět s pomocí
výkresů přiložených k přihlášce, kde:

Obr. 1 je spektrum ¹H NMR (500 MHz) ETM-SiOH-1 (nepolární
nečistota) v CDCl₃;

Obr. 2 je chromatogram HPLC ETM-SiOH-4 (ETM 775);

20

Obr. 3 je chromatogram HPLC ETM-SiOH-3 (ETM 305);

Obr. 4 je chromatogram HPLC ETM-SiOH-2 (stopové
metabolity);

Obr. 5 je hmotnostní spektrum LRFAB ETM 305 v M.B. (magic
bullet⁴);

25

Obr. 6 je hmotnostní spektrum ESI ETM 304;

- Obr. 7 je ^1H NMR spektrum (750 MHz) ETM 305 v CD_3OD ;
- Obr. 8 je FAB/MS/MS spektrum ETM 305;
- Obr. 9 je UV spektrum ETM 305;
- Obr. 10 je UV spektrum ETM;
- 5 Obr. 11 je hmotnostní spektrum LRFAB ETM 775 v M.B.;
- Obr. 12 je hmotnostní spektrum ESI ETM 775 (pozitivní mod);
- Obr. 13 je ESI hmotnostní spektrum ETM 775 (negativní mod);
- Obr. 14 je FAB/MS/MS spektrum ETM 775 (m/z 138 - 302);
- Obr. 15 je FAB/MS/MS spektrum ETM 775 (m/z 440 - 620);
- 10 Obr. 16 je ^1H NMR spektrum (750 MHz) ETM 775 v CD_3OD ;
- Obr. 17 je UV spektrum ETM 775;
- Obr. 18 je HPLC chromatogram ETM 305;
- Obr. 19 je UV spektrum ETM 305;
- Obr. 20 je hmotnostní spektrum ESI ETM 305;
- 15 Obr. 21 je hmotnostní spektrum ESI ETM 204;
- Obr. 22 je ^1H NMR spektrum (500 MHz) ETM 204 v CD_3OD ; a
- Obr. 23 je spektrum ESI/MS/MS ETM 204.

Příklady provedení vynálezu

20 I. Metabolická studie Et 743

A Příprava metabolické směsi - ETM:

Sloučenina Et 743 (50 μM) byla inkubována s 0,4 mg/ml isoformy CYP3A4 exprimované lidským lymfoblastem (Gentest Corporation, Woburn, MA) v pufru 0,1 M Tris-HCl (pH 7,4) s obsahem

25 systému generujícího NADPH (0,4 mM NADP^+ , 25 mM glukózo-6-fosfát, 0,5 U/ml glukózo-6-fosfát-dehydrogenáza a 3,3 mM chlorid

hořečnatý. Po 4 hod při 37 °C byla reakce zastavena ledovým acetonitrilem a pevné látky byly odděleny centrifugací (12 000 g, 4 min). Supernatanty byly analyzovány HPLC.

5 B Purifikace ETM 305 a ETM 775

2,6 mg ETM (vytvořeného postupem popsáním v odstavci A výše) bylo rozpuštěno v malém množství CHCl_3 a nanášeno na kolonu silikagelu (skleněná kolona 8 x 100 mm plněná kaší silikagel/ CHCl_3). Kolona byla nejprve eluována CHCl_3 a potom směsí $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10 (98, 96, 94, 92 a 90 %). Bylo jímáno celkem deset zkumavek (vždy 3 ml) a na základě výsledku TLC byly zkumavky spojeny za získání čtyř frakcí (tabulka 1). Méně polární a necytotoxická frakce (ETM-SiOH-1, 2 mg) se skládala z lipidů, který neměl podle analýzy ^1H NMR příbuznou strukturu s Et 743 (obr. 1).

15 Zbývající cytotoxické frakce byly dále čištěny HPLC (Phenomenex-Ultracarb ODS, 10 μm , 10 x 150 mm, $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 3 : 1, 0,02 M NaCl, 1 ml/min, detekce DA: 210, 220, 254 a 280 nm). Nejpolárnější frakce (ETM-SiOH-4, 0,2 mg) poskytne 0,1 mg ETM 775 (obr. 2). ETM-SiOH-3 poskytne 0,3 mg ETM 305 (obr. 3) a ETM-SiOH-20 2 se skládala z komplexní směsi stopových metabolitů (obr. 4).

Tabulka 1: Frakce ETM-SiOH: R_f , hmotnost a cytotoxická aktivita

ID	Zkumavka č.	R_f^a	Hmotnost (mg)	Inhibice růstu L1210 (%) při 500 ng/ml
ETM-SiOH 1	1	0,9	2,0	0
ETM-SiOH 2	2	0,5, 0,7	0,3	80 ^b
ETM-SiOH 3	4 - 5	0,5	0,4	30
ETM-SiOH 4	6	0,3	0,2	3

- ^a TLC na silikagelu s použitím směsi $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9 : 1 jako mobilní fáze
- ^b 30% inhibice při 250 ng

5 C Struktura ETM 305

ETM 305 (IC_{50} 0,2 $\mu\text{g/ml}$ pro buňky L1210) ukázala při analýze HRFAB/MS molekulární iont při hodnotě m/z 306,0977 (obr. 5). Tento údaj je v souladu s molekulárním vzorcem $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{NO}_6$ (Δ 0,1 mmu). Analýza ESI/MS potvrdila molekulovou hmotnost sloučeniny ETM 305 (obr. 6); byl pozorován molekulární iont při hodnotě m/z 306 spolu s jeho sodíkovým adduktem (m/z 328). Spektrum ^1H NMR sloučeniny ETM 305 (obr. 7) bylo pro určení struktury velmi důležité. Rezonance při hodnotách δ 2,04, 2,28 a 6,09 byly téměř identické s hodnotami pro Me-6 (δ 2,03), $-\text{OCOCH}_3$ (δ 2,29) a dioxymethylenové protony (δ 6,11 a 15 6,01) ve sloučenině Et 743 ¹(Rinehart a další, *J. Org. Chem.* 1990, 55, 4512, Rinehart a další, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 9017).

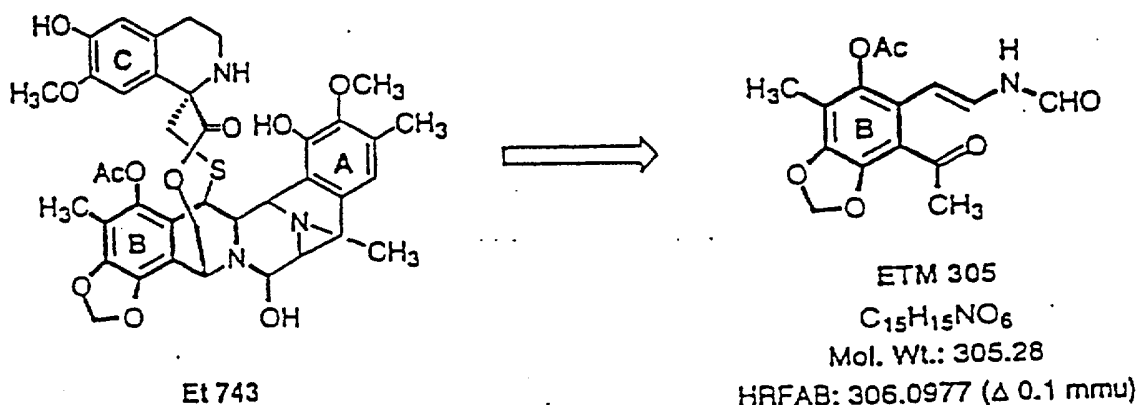
Navíc byly pozorovány rezonance odpovídající jednotce $-\text{CH}=\text{CH}-\text{NHCHO}$ (δ 7,09, d, 1H, $J=15$ Hz; δ 6,19, d, 1H, $J=15$ Hz; δ 8,04, s, 1H) ²(Herbert a další, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, I, 1987, 1593), a další methylové skupině (δ 2,52, s, 3H). Chemický posun této methylové skupiny dobře souhlasí s posunem methylové skupiny acetofenonu ³(Pretsch a další, *Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds*; Springer-Verlag, Berlín, 1989, str. H125) (δ 2,55). Je zajímavé, že ^1H NMR spektrum sloučeniny ETM 20 305 se skládalo z dvou souborů rezonancí (poměr 4 : 1), což bylo způsobeno rotačními konformery kolem vazby $-\text{NH}-\text{CHO}$. Z údajů ^1H NMR spolu s údaji MS vyplývá, že sloučenina ETM 305 měla B-jednotku aromatického kruhového systému látky Et 743 navázanou na vinylformamidovou jednotku a na methylketon, jak je ukázáno ve

schématu 1. FAB/MS/MS na m/z 306 navrhouanou strukturu podporuje (obr. 8).

Schéma 1

5

10



D Struktura ETM 775

15

20

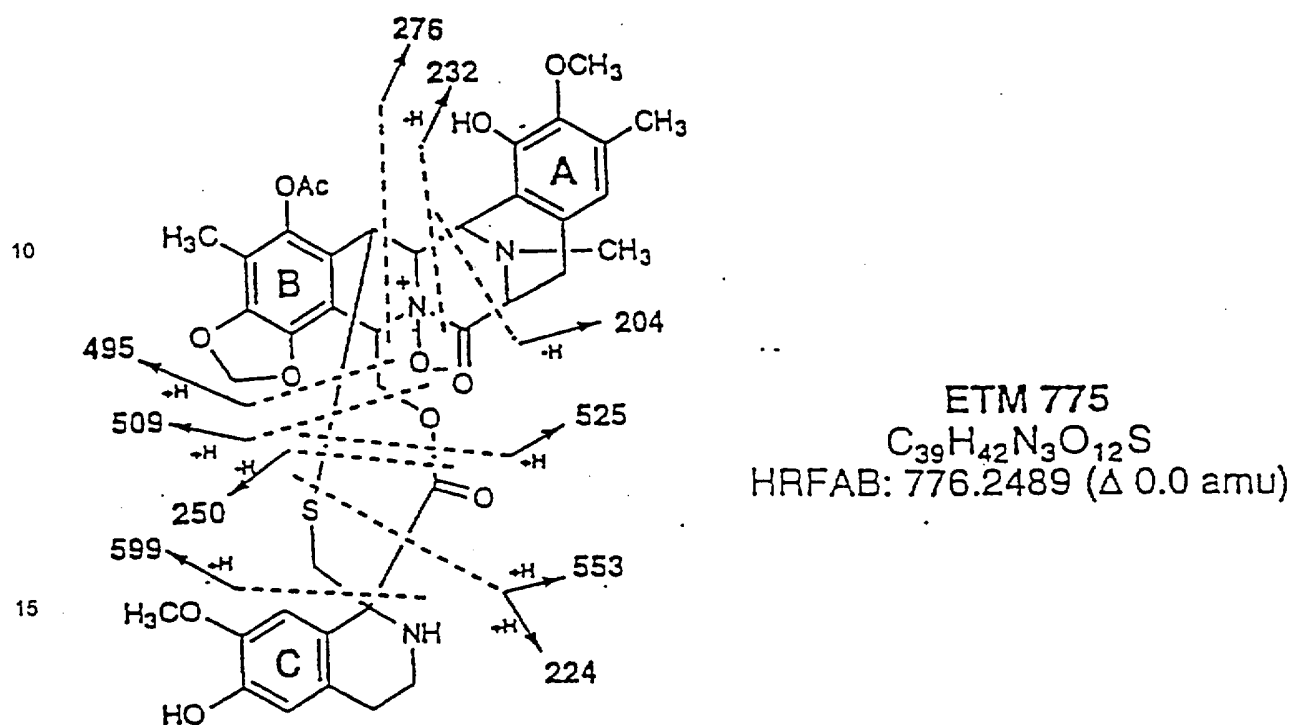
25

ETM 775 (IC_{50} pro buňky L1210 0,2 $\mu g/ml$) ukázala metodou HRFAB/MS molekulový iont při hodnotě m/z 776,2489 (obr. 11). Tento údaj je v souladu s molekulárním vzorcem $C_{39}H_{42}N_3O_{12}S$ (Δ 0,0 mmu), což ukazuje na to, že ETM 775 je oxidačním produktem sloučeniny Et 743. Spektra ESI/MS jak v pozitivním, tak i v negativním modu potvrdila molekulovou hmotnost látky ETM 775 (obr. 12 a 13). Pro omezené množství ETM 775 bylo zjišťování struktury prováděno hlavně interpretací údajů hmotnostních spekter. Vrchol FABMS/MS u sloučeniny 775 na $M + H$ (m/z 776) byl kritický při zjištění umístění dalšího atomu kyslíku, který byl lokalizován v poloze N-2 ve formě N-oxidu, jak ukazují vrcholy při hodnotách m/z 276 a 260 (276 odpovídá kyslíku). Fragment iontu na m/z 232, který nebyl u sloučeniny Et 743 pozorován, ukazuje na to, že kyslík karbinolaminu se oxidoval na amid (schéma 3). Struktury jednotek A a C ve sloučenině ETM 775 zůstaly

intaktní, jak ukazuje přítomnost charakteristických vrcholů hmotnostních spekter při hodnotách m/z 204 (jednotka A) a m/z 224 a 250 (jednotka C)¹. Jak spektra ¹H NMR při 750 MHz (obr. 16), tak i spektra UV (obr. 17) byla podobná spektrům sloučeniny Et 734¹.

5

Schéma 2



II. Metabolická studie Et 743 - klinika Mayo

A Metabolit M1 (ETM 305)

20 Vzorek ETM byl filtrován přes C18 sep-pack a eluent (MeOH/H₂O 3 : 1) byl zakoncentrován v proudu dusíku. Čištění získaného zbytku HPLC (za stejných podmínek jak bylo popsáno výše) odhalilo přítomnost sloučeniny s retenčním časem identickým se sloučeninou ETM 305 (obr. 18). Jak spektrum UV (obr. 19), tak

25 i spektrum ESI/MS (obr. 20) metabolitu M1 byla identická se spektry sloučeniny ETM 305. Byl tedy vysloven závěr, že metabolit M1 má stejnou chemickou strukturu jako ETM 305.

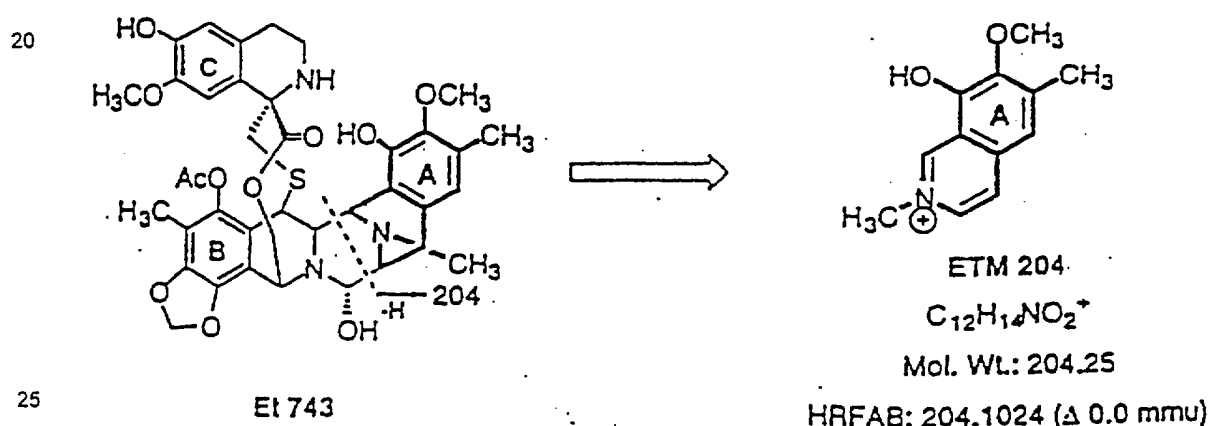
B Metabolit M2 (ETM 204)

Poskytnutí vzorek byl filtrován přes C18 sep-pack a eluent (MeOH/H₂O 3 : 1) byl zakoncentrován v proudu dusíku a získaný zbytek byl analyzován FAB/MS, ESI/MS a ¹H NMR.

C Struktura sloučeniny ETM 204 (M2)

ETM 204 ukázala molekulární iont metodou HRFAB/MS 204,1024. Tento údaj je v souladu s molekulárním vzorcem C₁₂H₁₄NO₂ (Δ 0,0 mmu). Analýza ESI/MS potvrdila molekulovou hmotnost 204 (obr. 21). Molekulový vzorec souhlasil s molekulovým vzorcem jednotky A Et 743. Bylo tedy navrženo, že chemická struktura ETM 204 odpovídá derivátu aromatické amoniové soli ukázanému na schématu 3. Tato jednoduchá sloučenina (stejně jako další metabolity) může být snadno monitorována pro zjišťování rozpadu látky Et 743 *in vivo*.

Schéma 3



Spektrum ^1H NMR (obr. 22) sloučeniny ETM 204 ukázala rezonance, které podporovaly navrženou strukturu. Čtyři aromatické signály (δ 9,2, s; δ 7,8, d, $J=5$ Hz, a δ 6,8, s) a tři methylové singlety (δ 4,2, δ 3,9 a δ 2,4). Spektrum ESI/MS/MS sloučeniny ETM 204 (obr. 23) ukázalo nejvýznamnější vrchol iontu při 189, což odpovídá ztrátě N-methylové skupiny ($204 - \text{CH}_3$).

Biologické studie sloučenin ETM 305 a ETM 775

Sloučeniny ETM 305 a ETM 775 byly testovány použitím standardních protokolů pro následující linie tumorových buněk: P-388 (myší leukemie); A-549 (lidský karcinom plic); HT-29 (lidský adenokarcinom tlustého střeva); a MEL-28 (lidský maligní melanom), viz například Bergeron a další, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1984, 121 (3) 848 - 854 a Schroeder a další, *J. Med. Chem.*, 1981, 24, 1078 - 1083. Tyto výsledky jsou uvedeny níže v tabulce 2:

Tabulka 2

Buněčná linie a aktivita IC ₅₀ (μg/ml)				
Sloučenina	P-388	A-549	HT-29	MEL-28
ETM-305	0,5	0,5	0,5	0,25
ETM-775	0,01	0,01	0,01	0,01

Použití pro léčbu

Předkládaný vynález zahrnuje biologicky účinné sloučeniny a je tedy zaměřen na jejich použití pro léčení. Jak se popisuje výše, sloučeniny podle předkládaného vynálezu vykazovaly *in vitro*

cytotoxicitu vůči tumorovým buněčným liniím. Předpokládá se, že tyto účinky *in vitro* se podobně přenesou pro využití *in vivo*.

Předkládané sloučeniny byly izolovány v podstatě v čisté formě, tj. v čistotě, která umožňuje jejich fyzikální a biologickou charakterizaci. Bylo zjištěno, že tyto sloučeniny mají specifické antitumorové účinky a jako takové budou použitelné jako léčiva u savců, zvláště u lidí, a další provedení předkládaného vynálezu se tedy týká farmaceutických prostředků s obsahem uvedených účinných látek a způsobů léčebného použití těchto farmaceutických prostředků.

Jak se popisuje výše, aktivní sloučeniny podle předkládaného vynálezu mají antitumorové účinky. Předkládaný vynález tedy také poskytuje způsob léčení savce postiženého maligním tumorem citlivým na tyto sloučeniny, který zahrnuje podávání terapeuticky účinného množství sloučeniny nebo směsi sloučenin podle vynálezu nebo farmaceutických prostředků s jejich obsahem postiženému pacientovi. Předkládaný vynález se také týká farmaceutických prostředků, které obsahují jako účinnou složku jednu nebo více sloučenin podle vynálezu stejně jako způsobů jejich výroby.

Mezi příklady farmaceutických prostředků patří jakékoli pevné látky (tablety, pilulky, kapsle, granule atd.) nebo kapaliny (roztoky, suspenze nebo emulze) vhodného složení pro orální, místní nebo parenterální podávání, přičemž tyto prostředky mohou obsahovat čistou sloučeninu nebo sloučeninu v kombinaci s některým nosičem nebo jinými farmakologicky účinnými sloučeninami. Tyto prostředky je možno pro parenterální podávání popřípadě sterilizovat.

Termín „jednotková dávka“ ve smyslu předkládaného vynálezu se týká fyzikálně diskrétních jednotek vhodných jako jednotlivé dávky pro živočichy, přičemž každá dávka obsahuje předem určené množství účinné látky, vypočtené pro získání požadovaného antitumorového účinku ve spojení s požadovaným diluentem; tj. nosičem nebo vehikulem. Specifikace pro novou jednotkovou dávku podle

předkládaného vynálezu jsou určovány a jsou přímo závislé na (a) vlastnostech účinné látky a konkrétním antitumorovém účinku, kterého má být dosaženo, a (b) omezeních daných specifickými požadavky sestavování farmaceutických prostředků s obsahem těchto
5 účinných látek pro antitumorové použití u živočichů.

Jednotkové dávkové formy se typicky připravují ze zmrazené nebo sušené účinné látky (nebo jejích solí) dispergací ve fyziologicky tolerovatelném (tj. přijatelném) ředivu nebo vehikulu jako je voda, fyziologický roztok nebo fyziologický roztok s fosfátovým pufrem, za
10 vytvoření vodného prostředku. Tato řediva jsou v oboru známa a jsou diskutována například v publikaci Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. vydání, Mack Publishing Company, Easton, PA (1980), na str. 1465 až 1467.

Dávkové formy mohou také obsahovat jako část řediva
15 adjuvans. Adjuvans jako je kompletní Freundovo adjuvans (CFA), nekompletní Freundovo adjuvans (IFA) a alum jsou materiály známé v oboru, které jsou komerčně dostupné z různých zdrojů.

Množství účinné sloučeniny, které má být podáno, závisí mj. na druhu léčeného živočicha, jeho velikosti, velikosti tumoru (pokud je
20 známa), typu tumoru (například pevný) a schopnosti subjektu využívat účinnou sloučeninu. Přesná množství účinné látky pro podávání závisejí na úsudku ošetřujícího lékaře u každého pacienta, zvláště jestliže je léčeným živočichem člověk. Rozmezí dávkování však může být charakterizováno terapeuticky účinnou koncentrací v krvi a může
25 se pohybovat v rozmezí koncentrací od přibližně 0,01 μM do přibližně 100 μM , s výhodou přibližně 0,1 μM až 10 μM .

Vhodné režimy pro počáteční podání a další injekce jsou také různé, ale typicky jde o zahajovací podání následované opakovanými dávkami v intervalu jedné nebo více hodin injekcí nebo jiným
30 způsobem podávání. Alternativně je možno použít kontinuální

intravenózní infuze dostatečné pro udržení terapeuticky účinné koncentrace v krvi.

Odkazy na literaturu

- 5 Následující odkazy se poskytují pro usnadnění porozumění vynálezu. V nezbytné míře je jejich obsah zařazen odkazy.
- 1 A) Rinehart a další, *J. Org. Chem.* 1990, 55, 4512, B) Rinehart a další, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 9017.
- 2 Herbert a další, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, I, 1987, 1593.
- 10 3 Pretsche a další, *Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds*; Springer-Verlag, Berlín, 1989, str. H125.
- 4 Rinehart a další, *Biochem. Res. Commun.*, 1984, 124, 350.

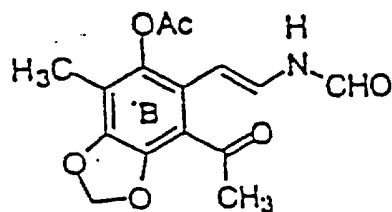
15 Předkládaný vynález byl podrobně popsán včetně jeho výhodných provedení. Je však zřejmé, že odborník v oboru může na základě předkládaného popisu provést modifikace a/nebo zlepšení předkládaného vynálezu, aniž by se odchýlil od rozsahu a myšlenky vynálezu.

20

Zastupuje:

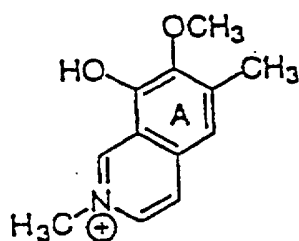
PATENTOVÉ NÁROKY

1. V podstatě čistý ETM-305 s následující strukturou:



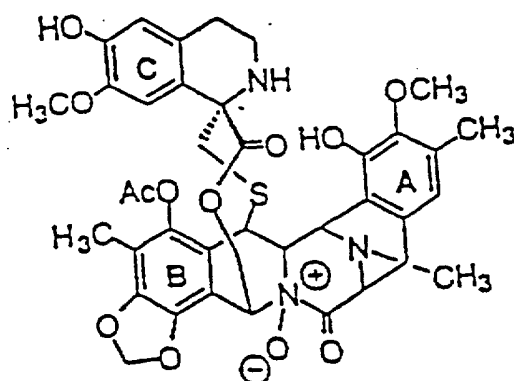
ETM 305

2. V podstatě čistý ETM-204 s následující strukturou:



ETM 204

3. V podstatě čistý ETM-775 s následující strukturou:



ETM 775

10. Způsob léčení maligního melanomu savce u pacienta v případě potřeby, přičemž tento způsob zahrnuje podávání účinného množství ETM-305 uvedenému pacientovi v jednotkové dávkové formě.

5

11. Způsob léčení maligního melanomu savce u pacienta v případě potřeby, přičemž tento způsob zahrnuje podávání účinného množství ETM-775 uvedenému pacientovi v jednotkové dávkové formě.

10

12. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e obsahuje ETM-305 a farmaceuticky přijatelný nosič,
ředivo nebo pomocnou látku.

15

13. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e obsahuje ETM-775 a farmaceuticky přijatelný nosič,
ředivo nebo pomocnou látku.

20

14. Způsob testování metabolického působení lidského cytochromu CYP3A4 na ecteinascidin 743, v y z n a č u j í c í s e
t í m , ž e se testovaný vzorek monitoruje na přítomnost
jednoho nebo více metabolitů zvolených ze skupiny ETM-204,
ETM-305 a ETM-775.

25

Zastupuje:

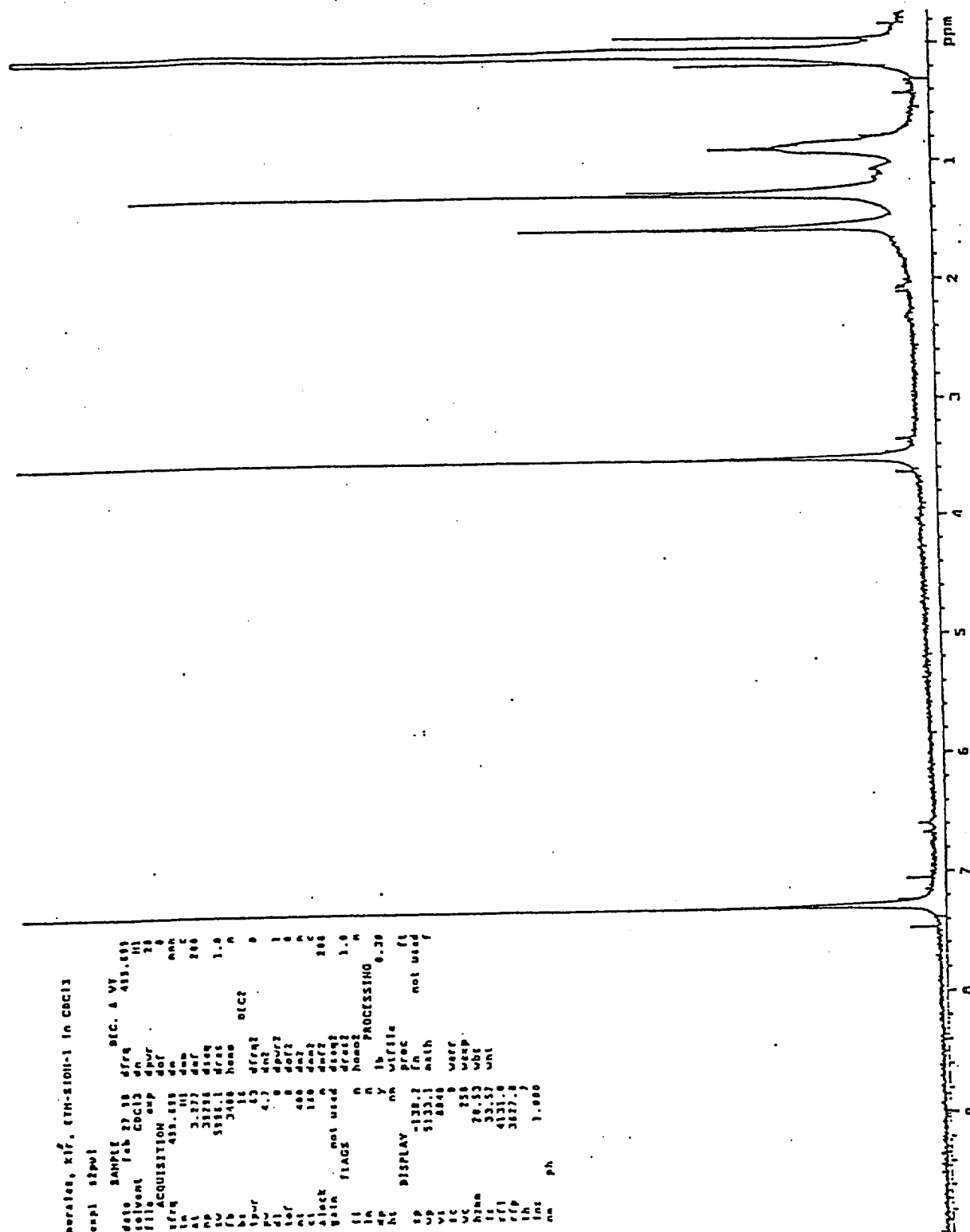
1000-4183

1 / 23

Obr. 1

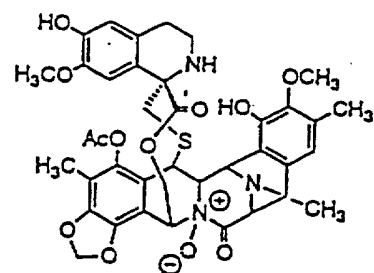
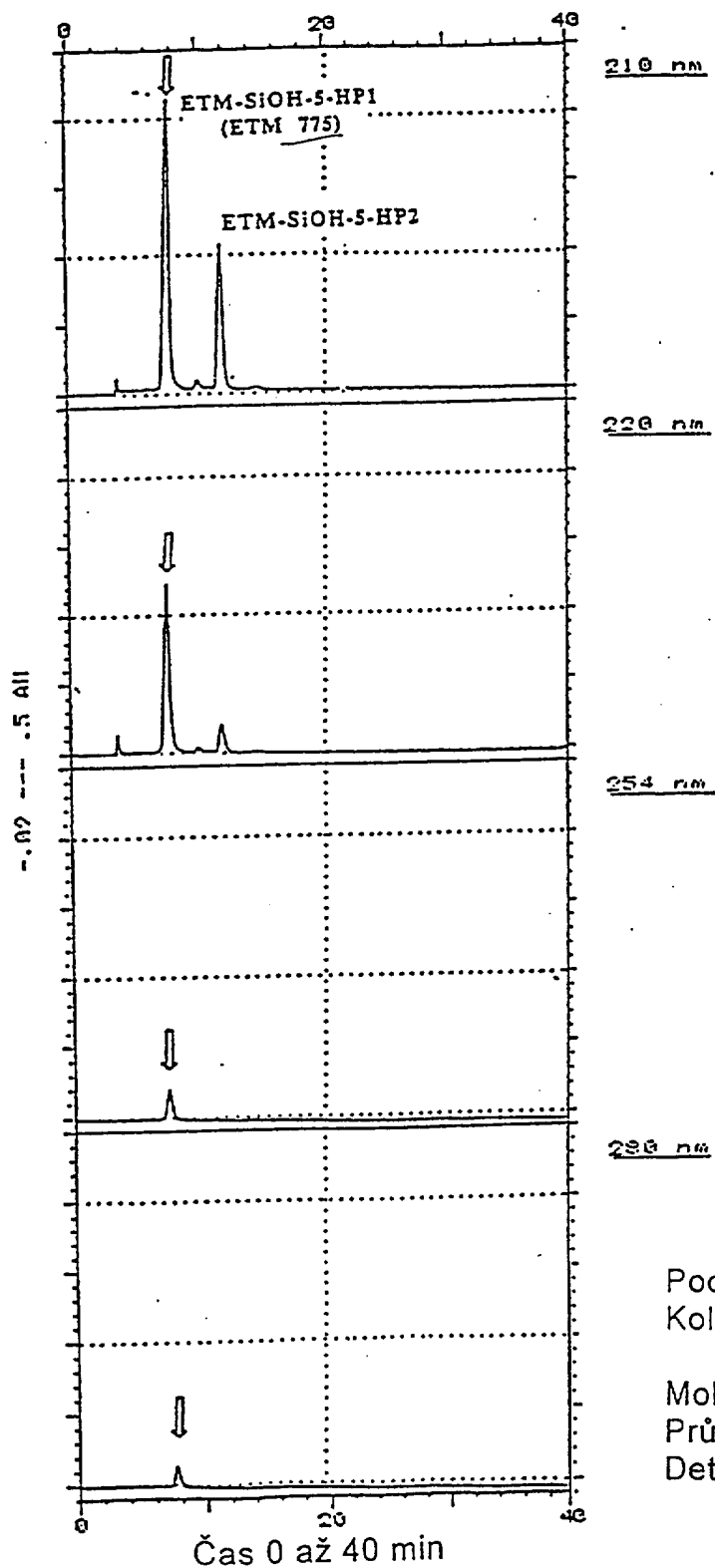
Spektrum ^1H NMR (500 MHz) ETM-SiOH-1 (nepolární nečistota)

v CDCl_3



Obr. 2

Chromatogram HPLC ETM-SiOH-4 (ETM 775)

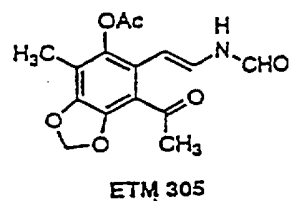
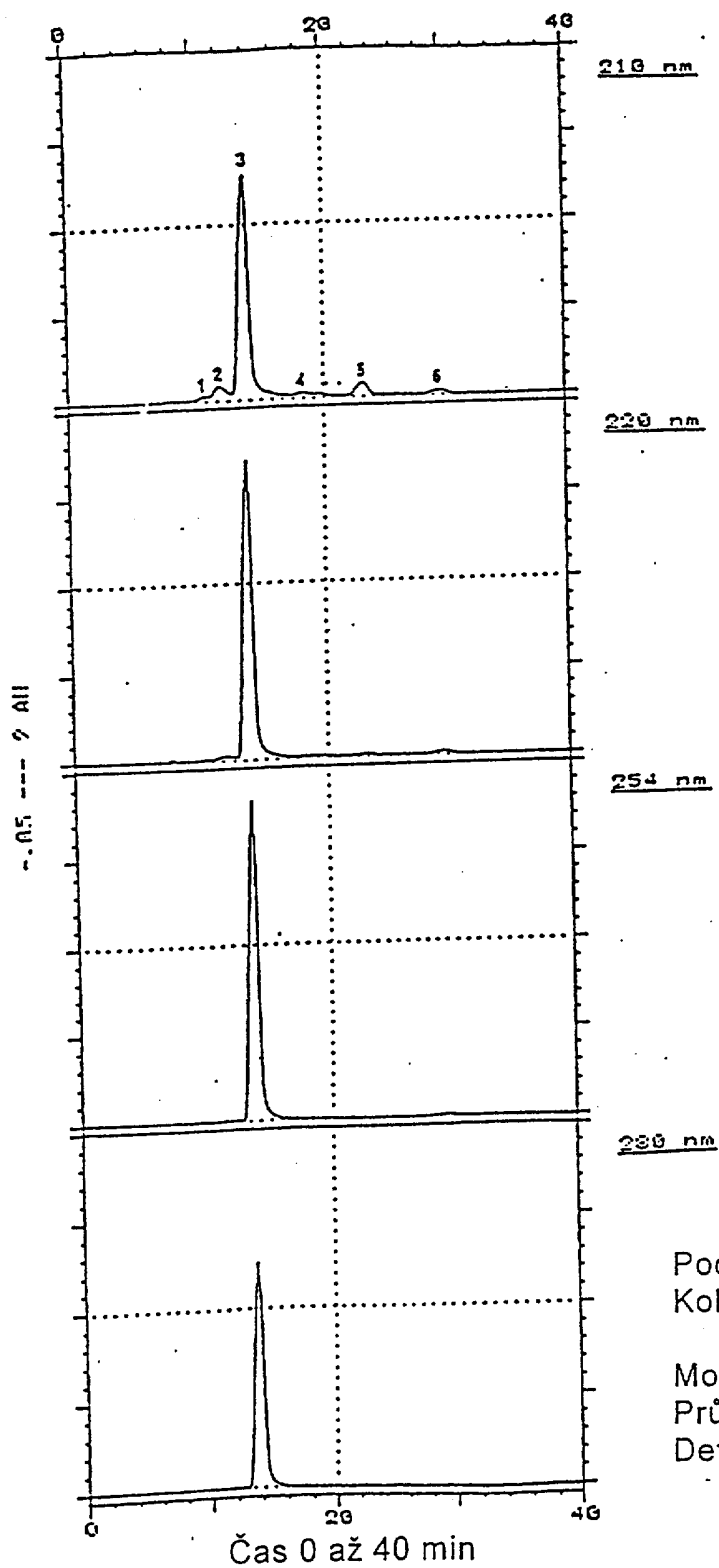


Podmínky HPLC

Kolona: Phenomenex/Ultracarb 5 ODS
 Rozměry 150 x 10 mm
 Mobil.fáze: MeOH/H₂O 3:1, 0,02 M NaCl
 Průtok: 2 ml/min
 Detektor: DAD

Obr. 3

Chromatogram HPLC ETM-SiOH-3 (ETM 305)



Podmínky HPLC

Kolona: Phenomenex/Ultracarb 5 ODS

Rozměry 150 x 10 mm

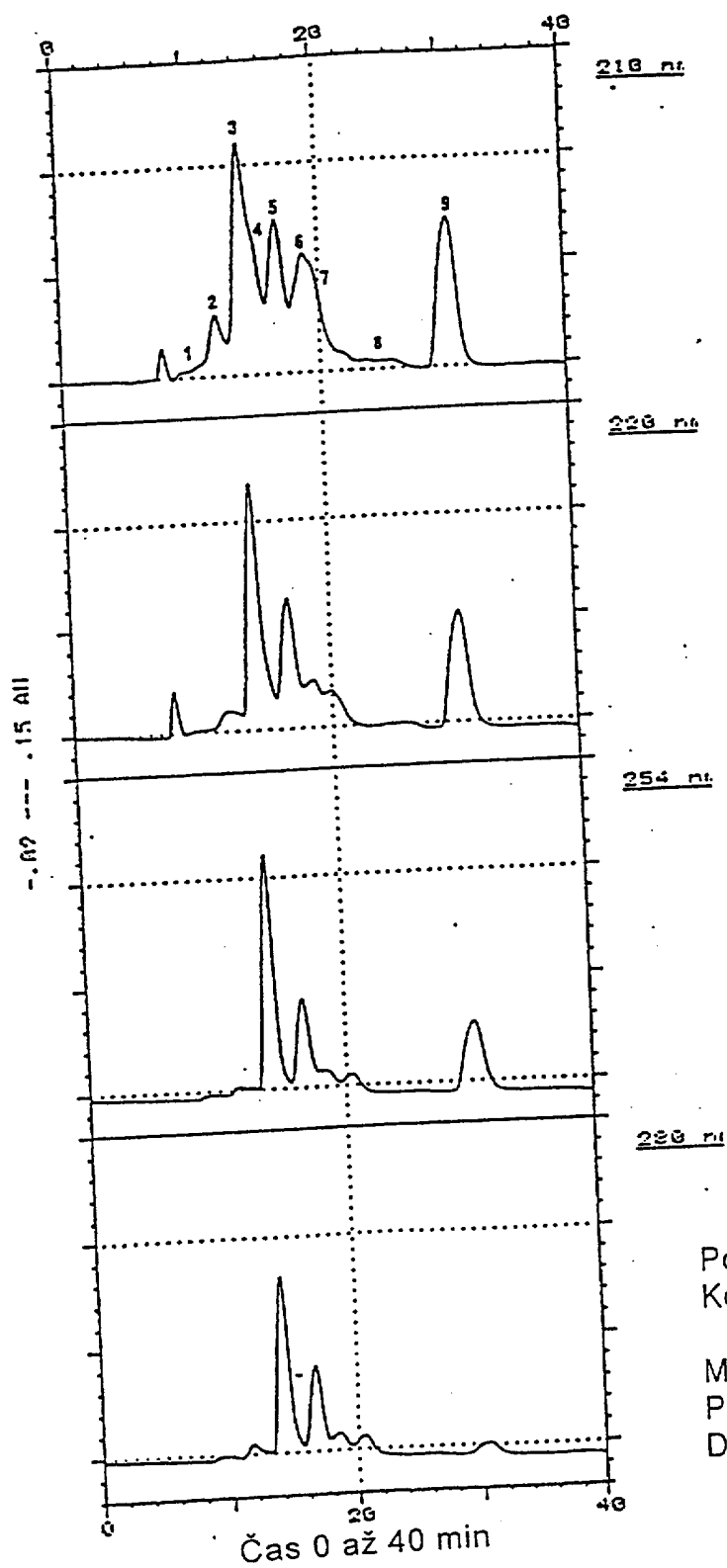
Mobil.fáze: MeOH/H₂O 3:1, 0,02 M NaCl

Průtok: 1 ml/min

Detektor: DAD

Obr. 4

Chromatogram HPLC ETM-SiOH-2 (stopové metabolity)



Podmínky HPLC

Kolona: Phenomenex/Ultracarb 5 ODS

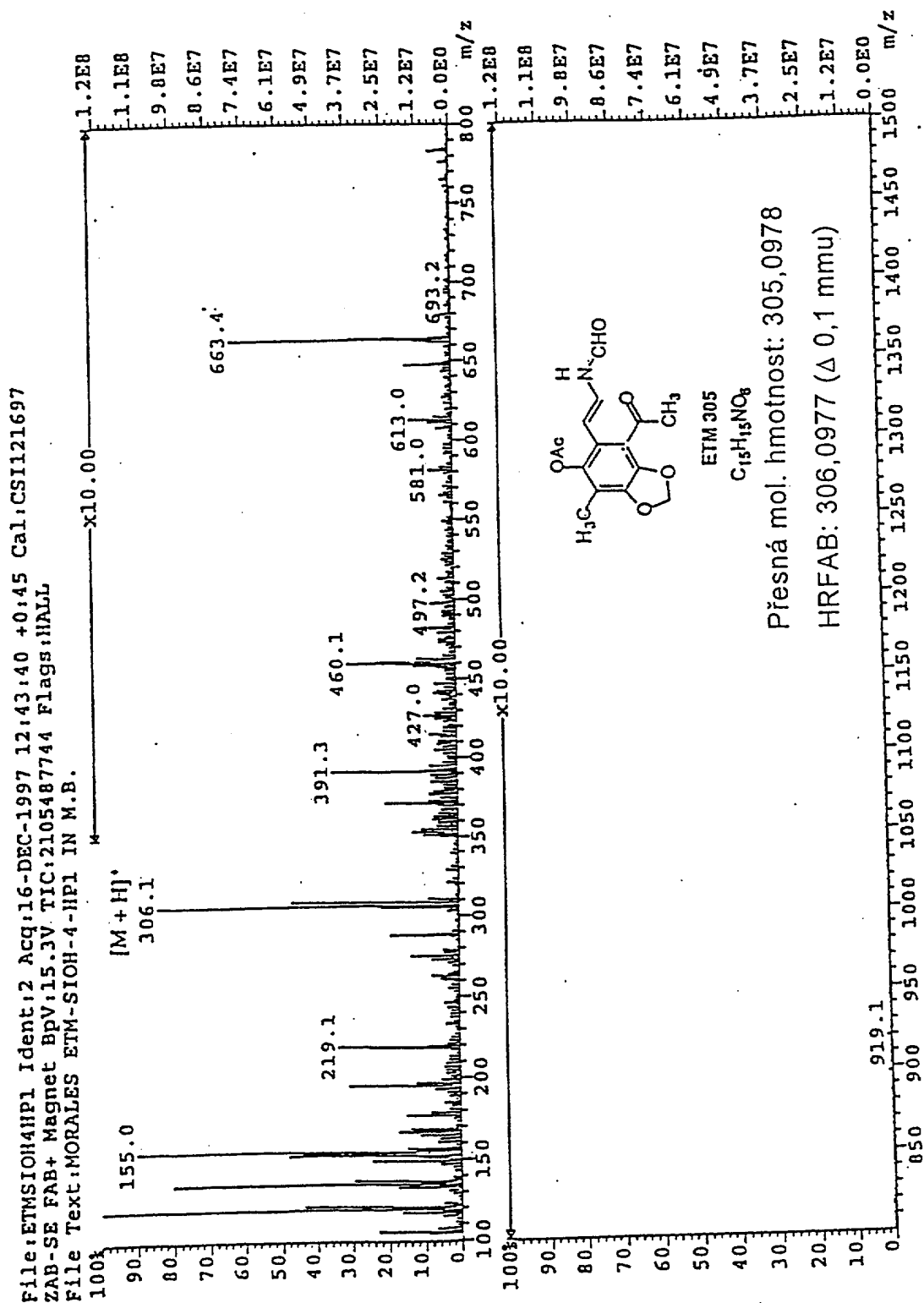
Rozměry 150 x 10 mm

Mobil.fáze: MeOH/H₂O 3:1, 0,02 M NaCl

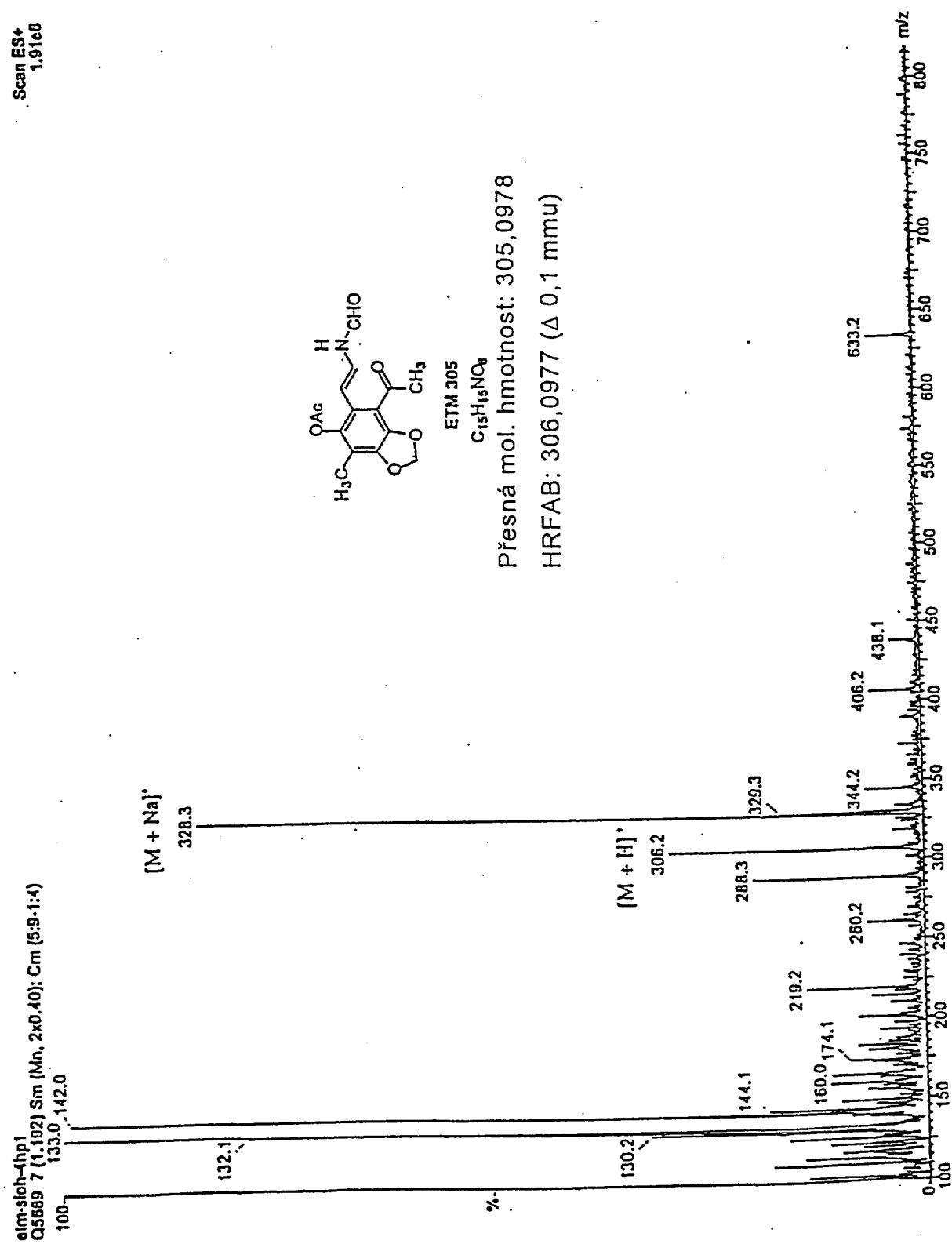
Průtok: 1 ml/min

Detektor: DAD

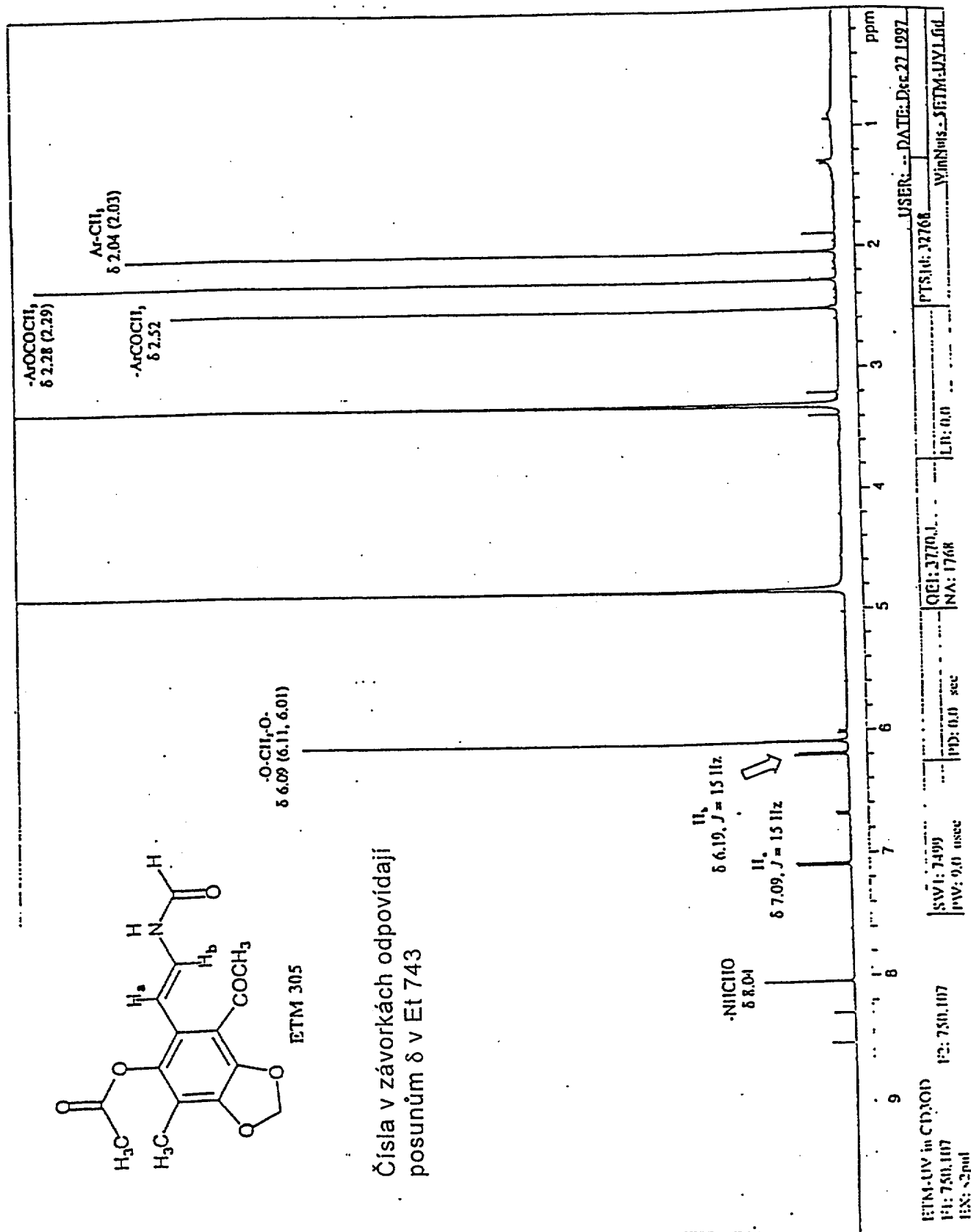
Obr. 5

Hmotnostní spektrum LRFAB ETM 305 v M.B. (magic bullet⁴)

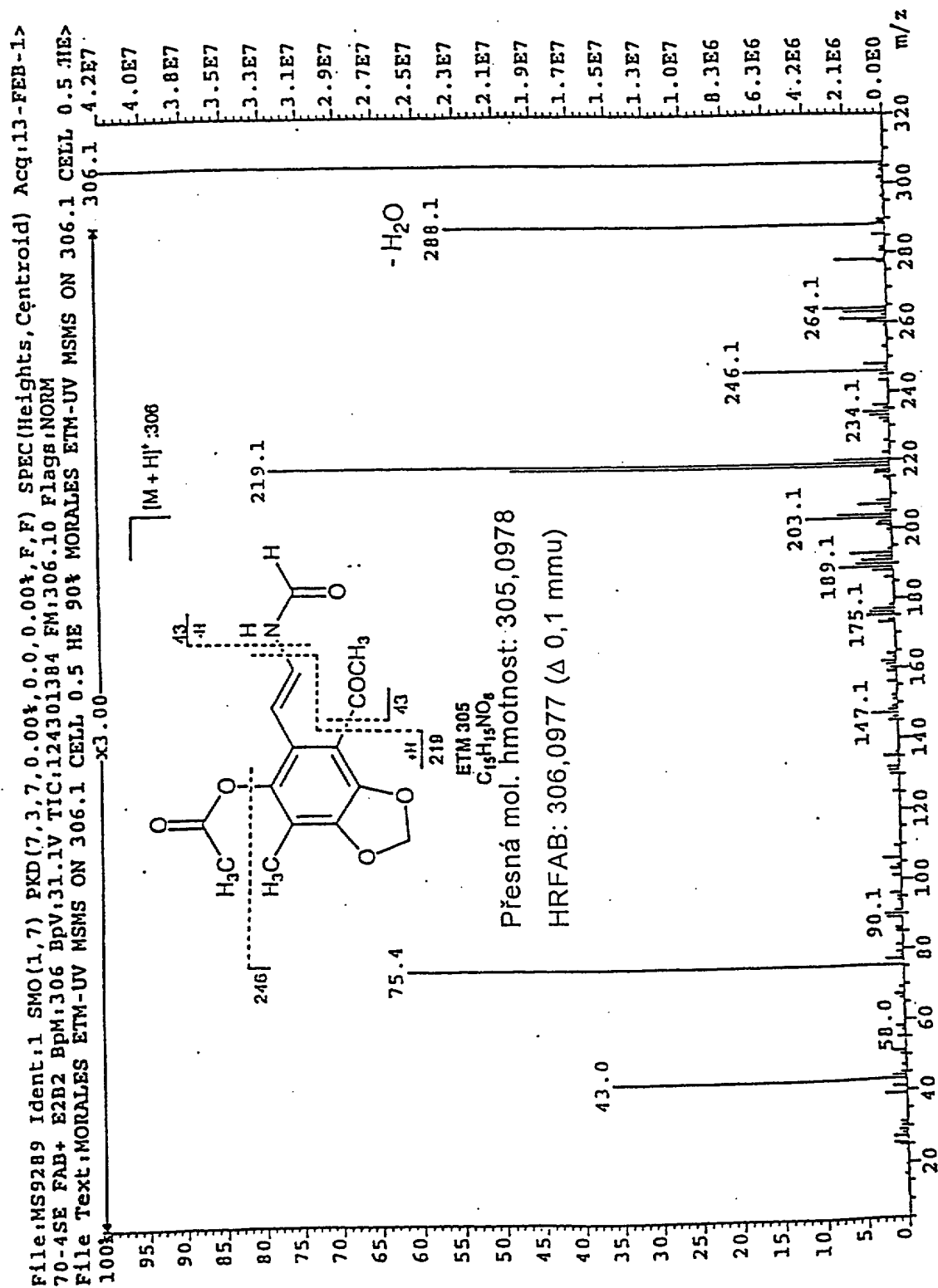
Hmotnostní spektrum ESI ETM 304



Obr. 7

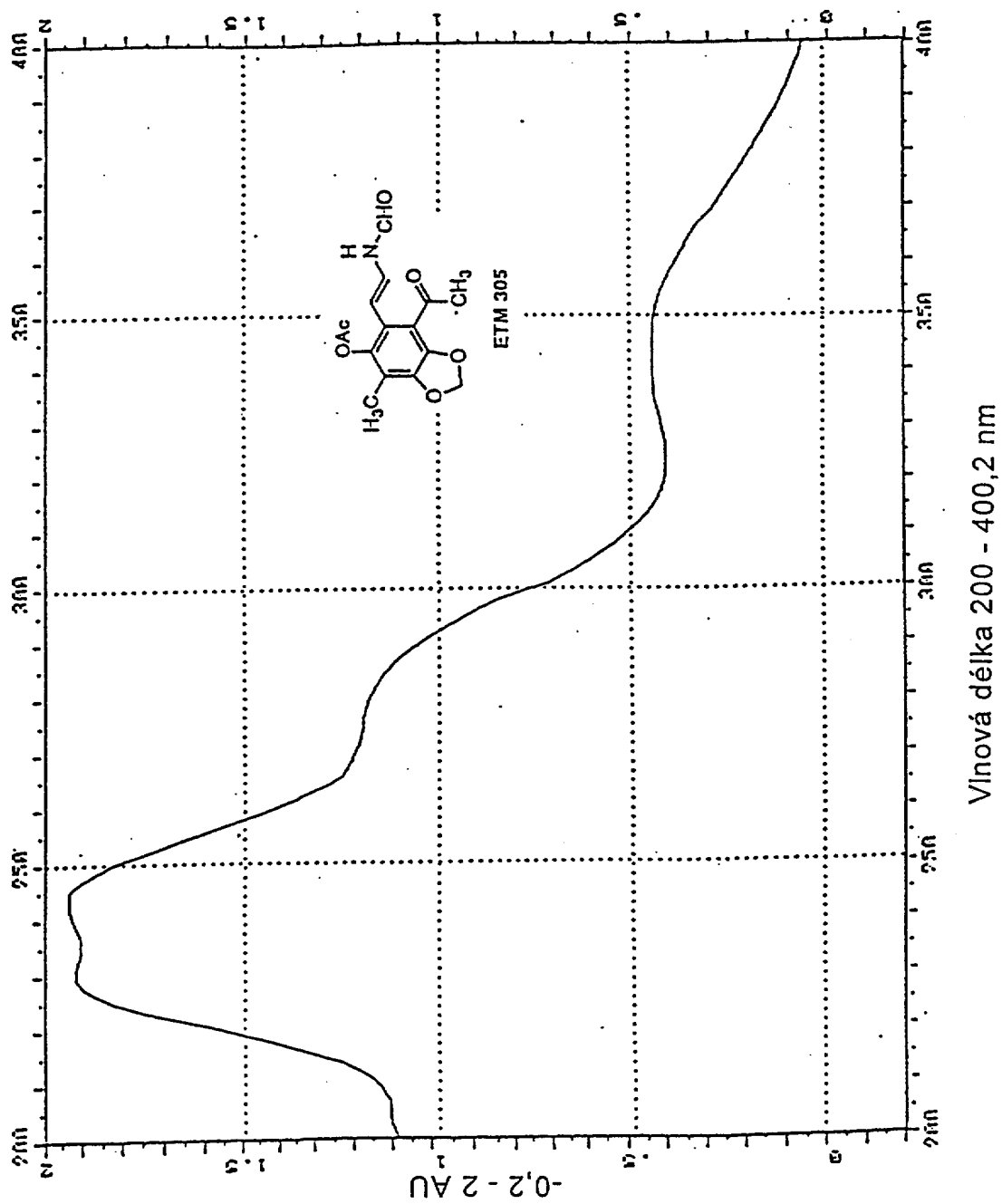
 ^1H NMR spektrum (750 MHz) ETM 305 v CD_3OD 

FAB/MS/MS spektrum ETM 305



Obr. 9

UV spektrum ETM 305



Vlnová délka 200 - 400,2 nm

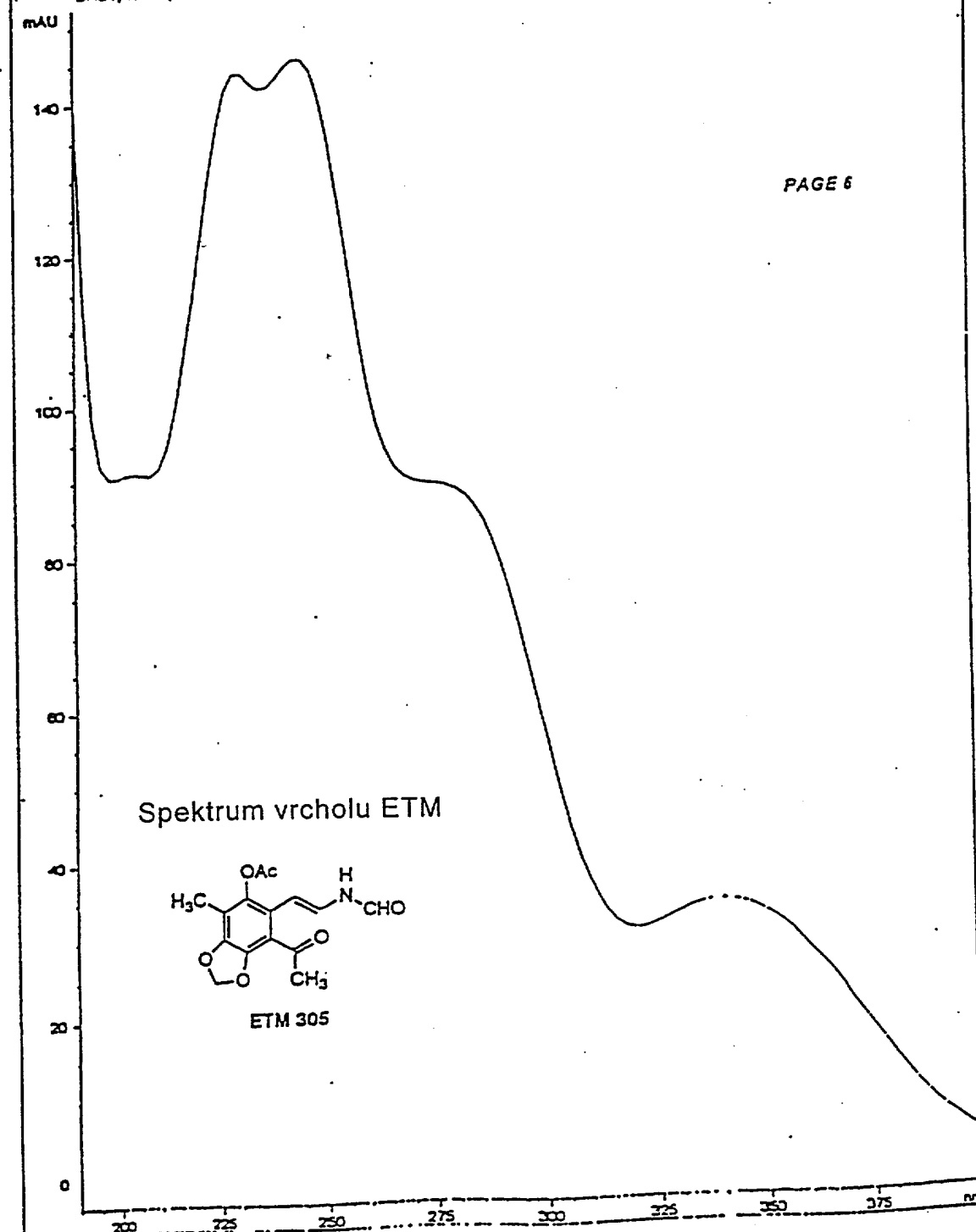
Obr. 10

UV spektrum ETM (PharmaMar)

Print of window 39: UV Apex spectrum of Peak 7.82 of PICO-M2.D

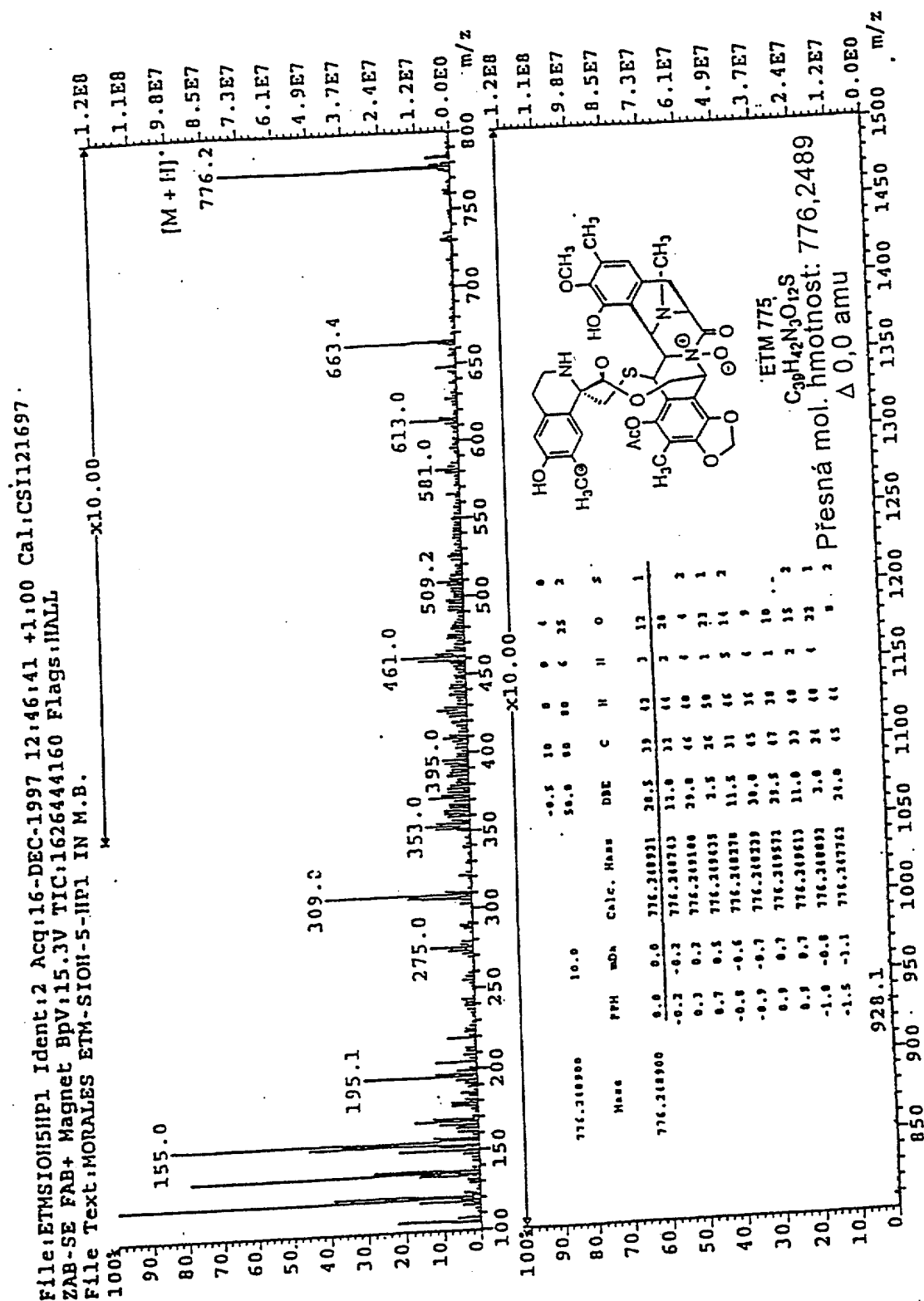
UV Apex spectrum of Peak 7.82 of PICO-M2.D

DAO1, 7.822 (142 mAU, -) of PICO-M2.D



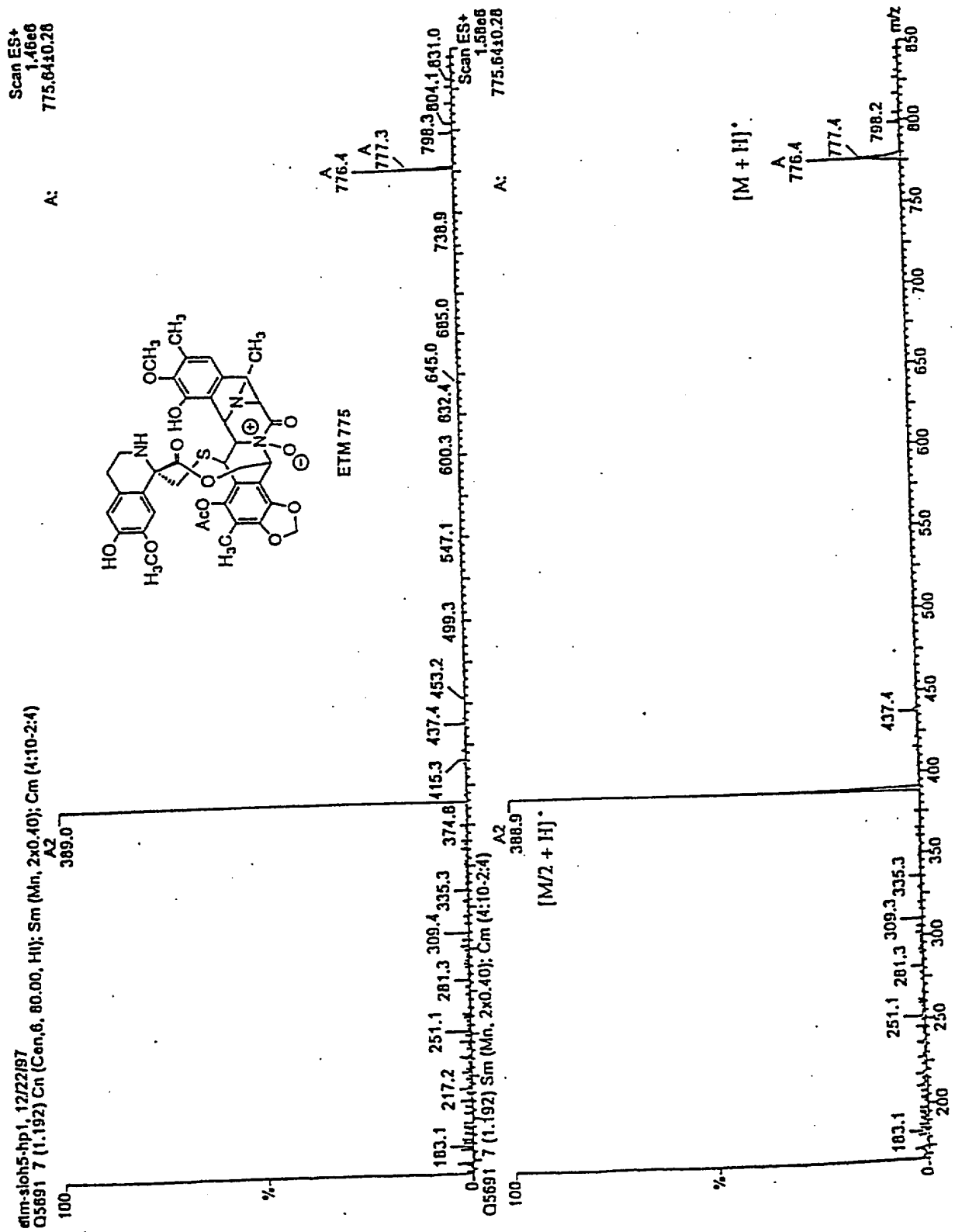
Obr. 11

Hmotnostní spektrum LRFAB ETM 775 v M.B.



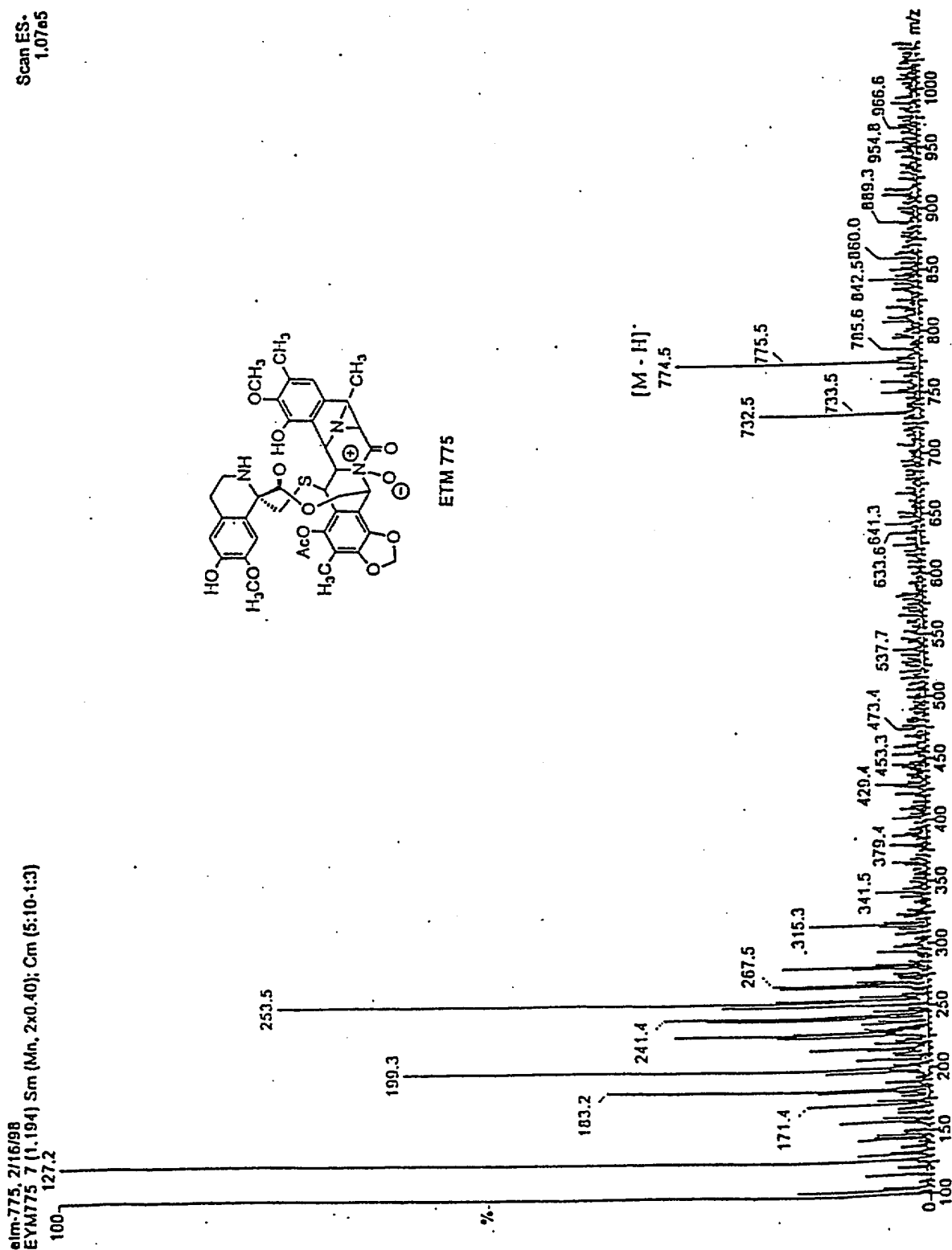
Obr. 12

Hmotnostní spektrum ESI ETM 775 (pozitivní mod)



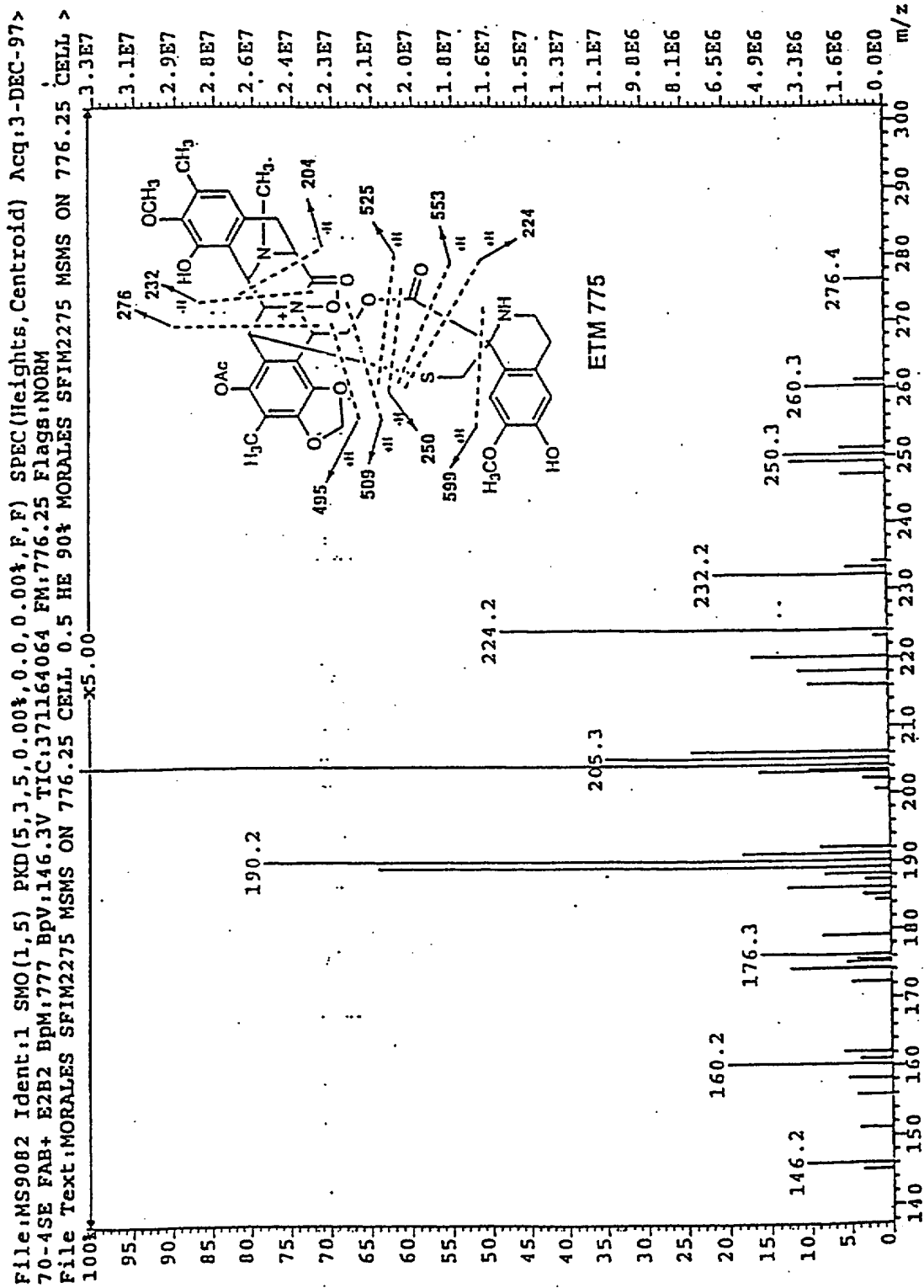
Obr. 13

ESI hmotnostní spektrum ETM 775 (negativní mod)



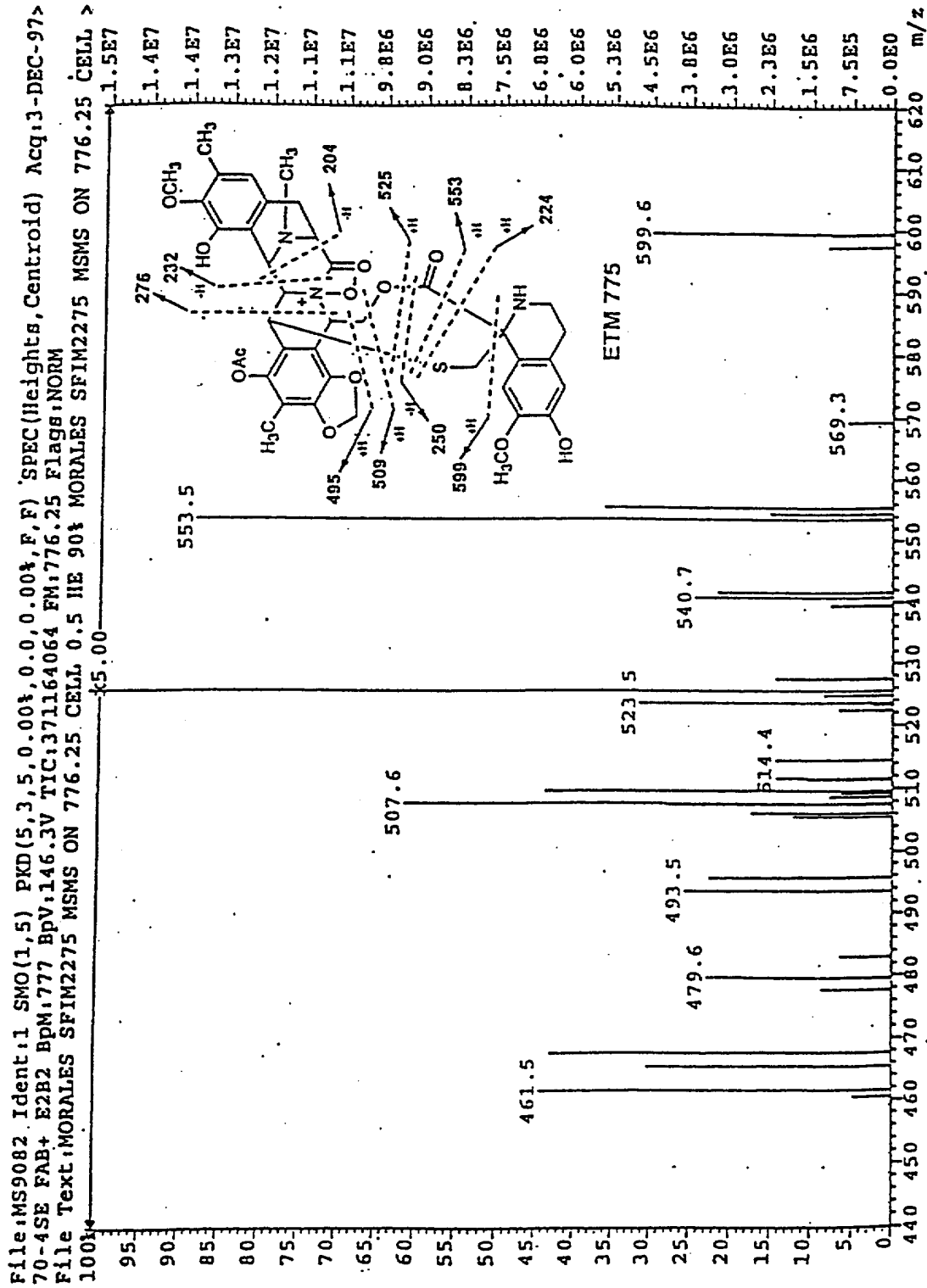
Obr. 14

FAB/MS/MS spektrum ETM 775 (m/z 138 - 302)

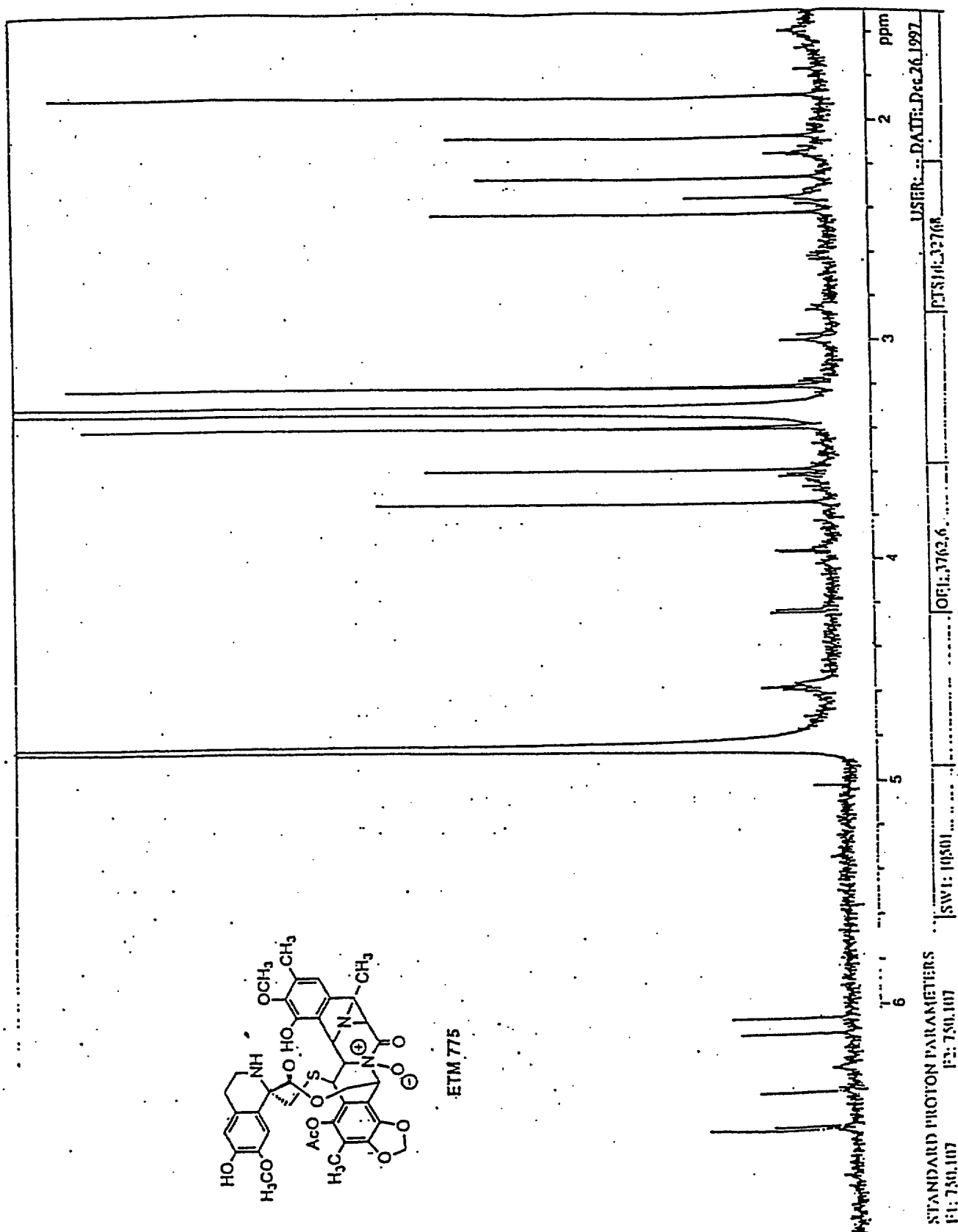


Obr. 15

FAB/MS/MS spektrum ETM 775 (m/z 440 - 620)

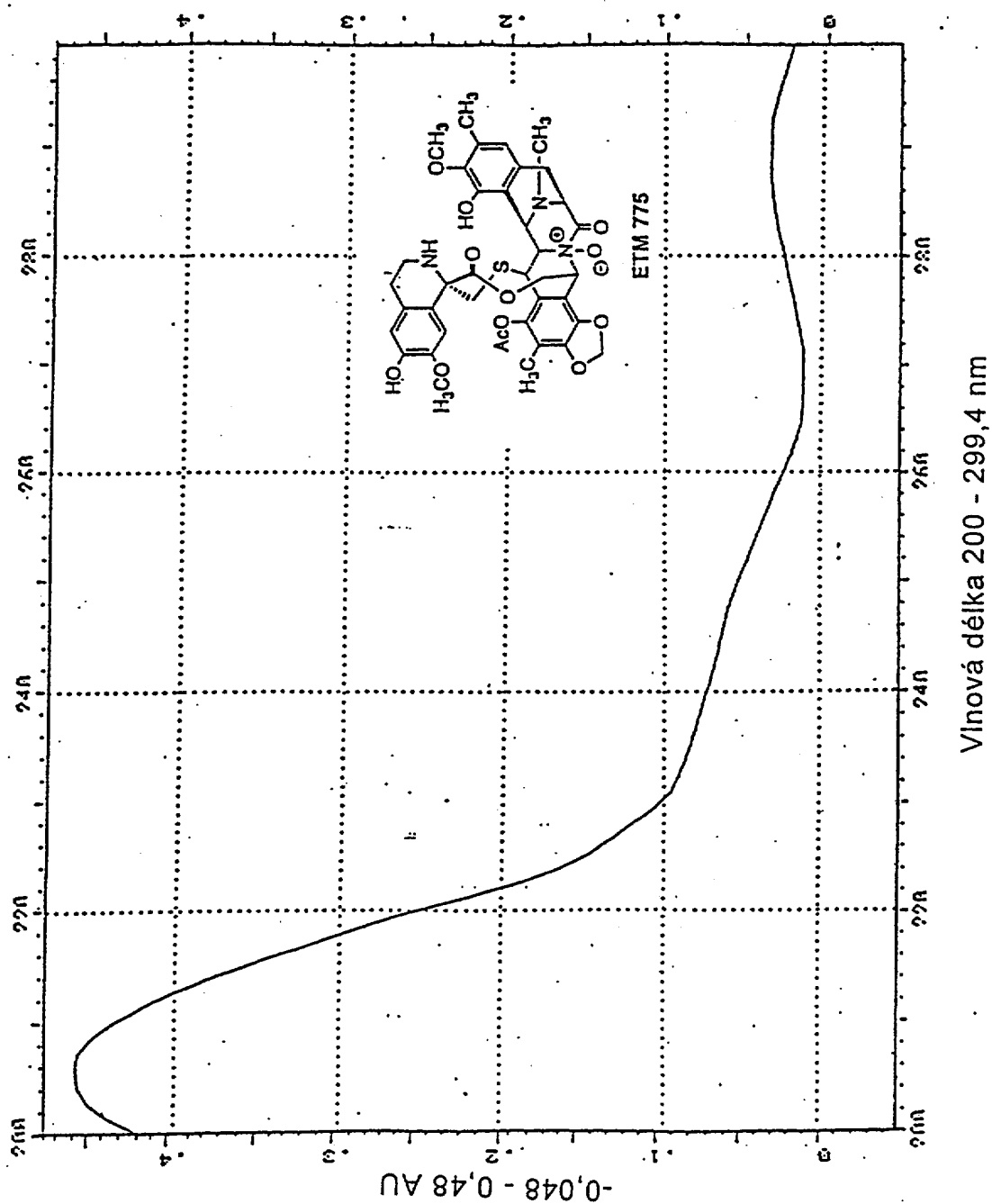


Obr. 16

 ^1H NMR spektrum (750 MHz) ETM 775 v CD_3OD 

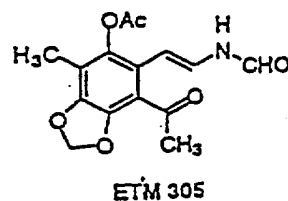
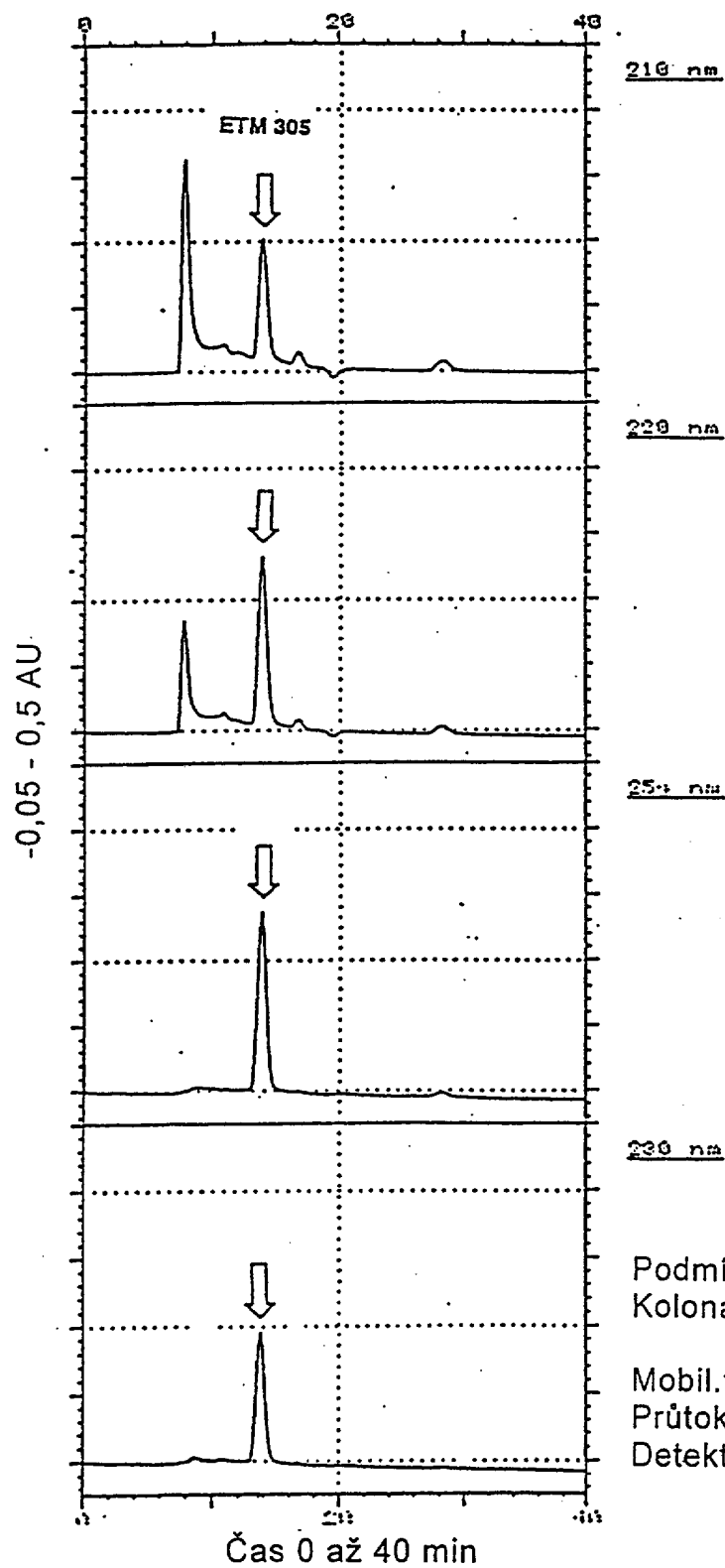
Obr. 17

UV spektrum ETM 775



Obr. 18

HPLC chromatogram metabolitu M1 (ETM 305)



Podmínky HPLC

Kolona: Phenomenex/Ultracarb 5 ODS

Rozměry 150 x 10 mm

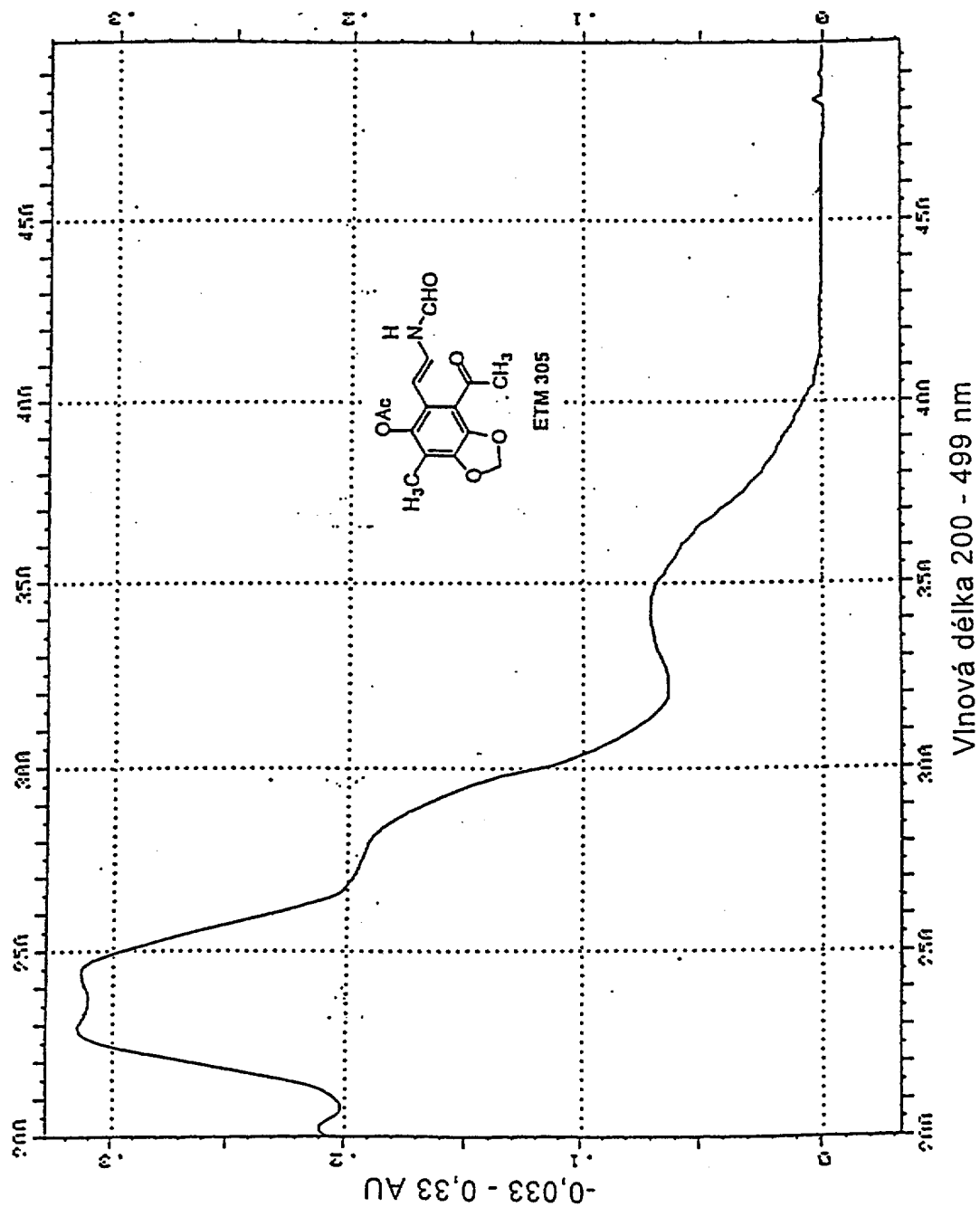
Mobil.fáze: MeOH/H₂O 3:1, 0,02 M NaCl

Průtok: 1 ml/min

Detektor: DAD

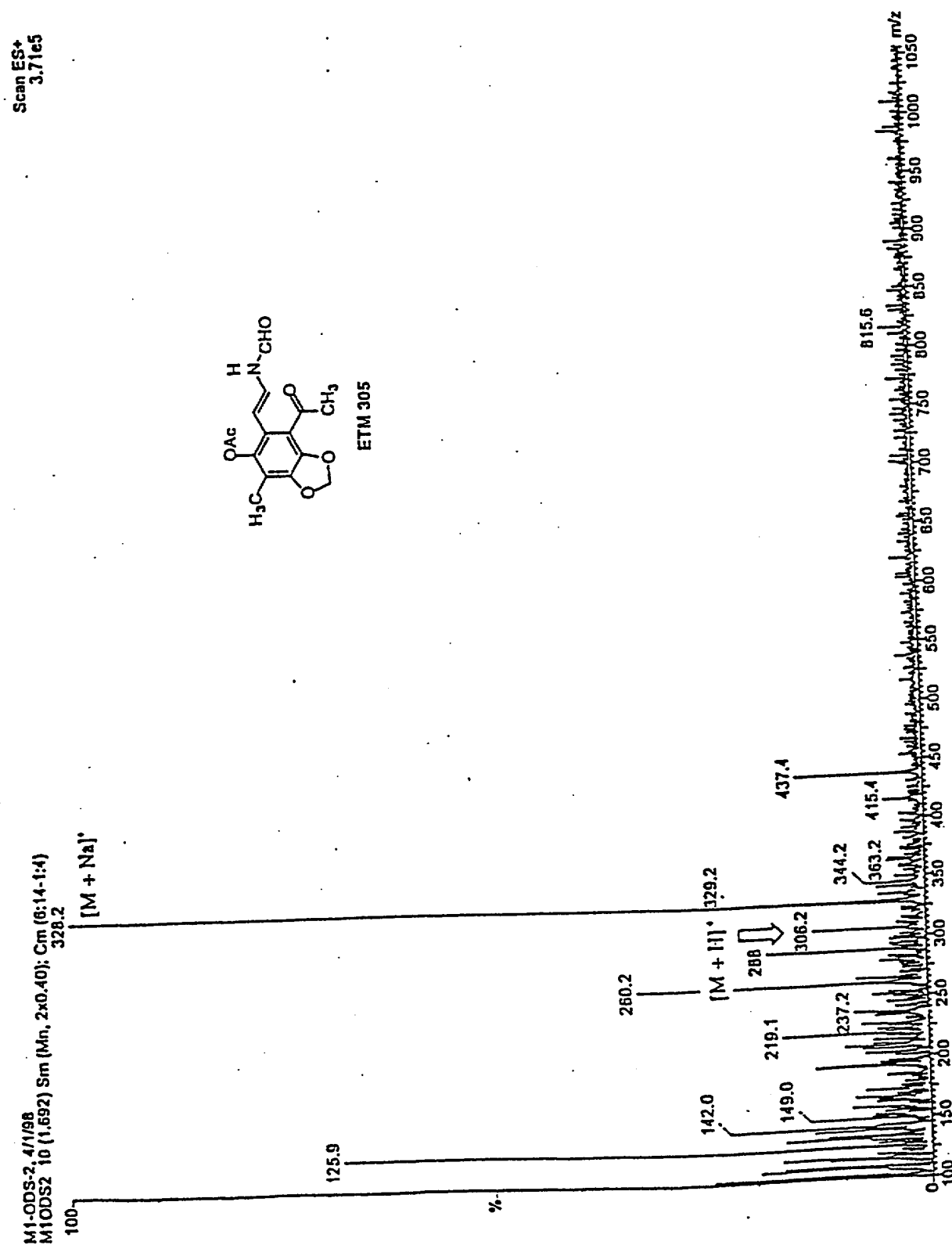
Obr. 19

UV spektrum metabolitu M1 (ETM 305)



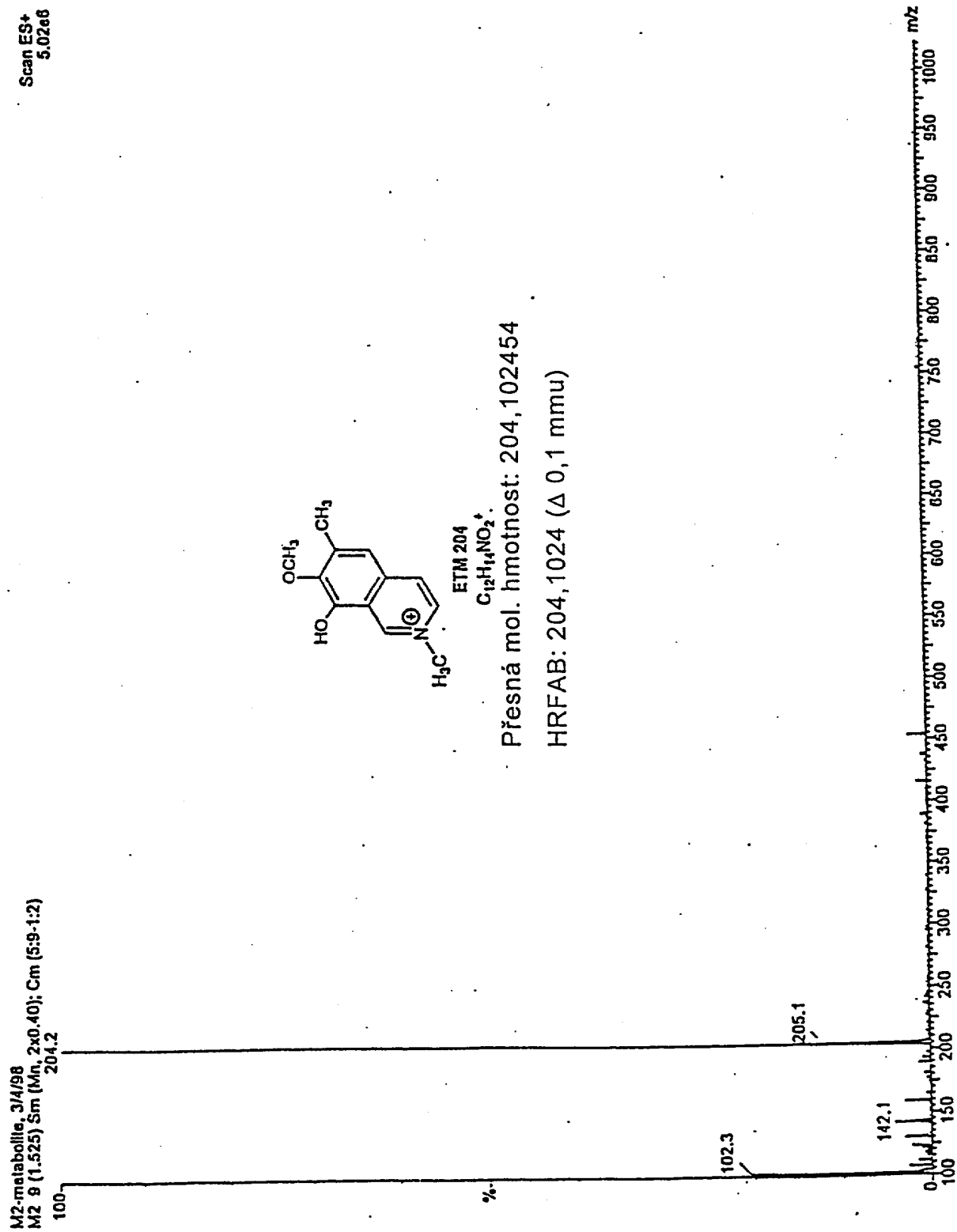
Obr. 20

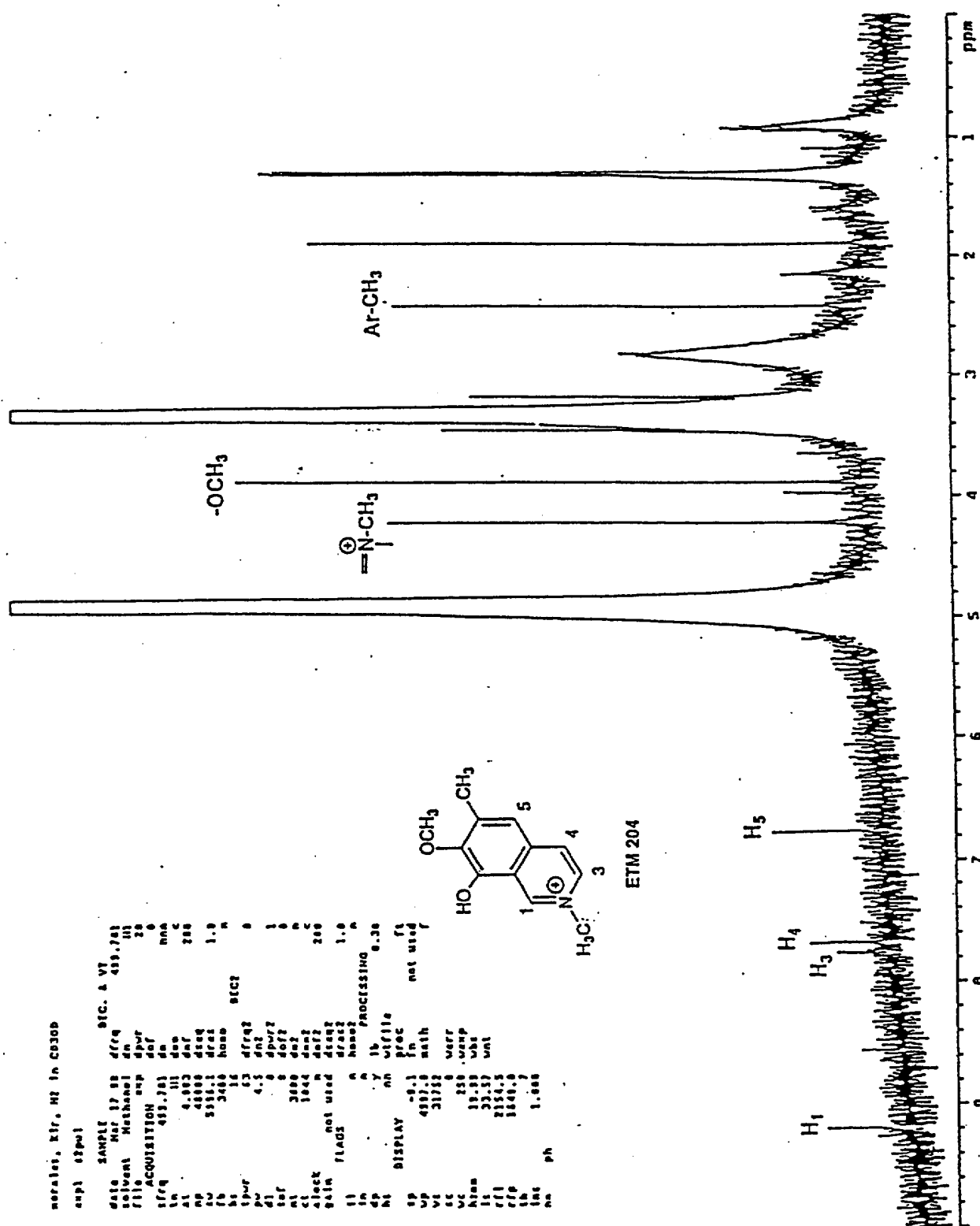
Hmotnostní spektrum ESI metabolitu M1 (ETM 305)



Obr. 21

Hmotnostní spektrum ESI metabolitu M1 (ETM 204)



¹H NMR spektrum (500 MHz) metabolitu M2 (ETM 204) v CD₃OD

Obr. 23

Spektrum ESI/MS/MS metabolitu M2 (ETM 204)

