

(19)



REPUBLIKA SLOVENIJA
Urad RS za intelektualno lastnino

(10) **SI 20274 A**

(12)

PATENT

(21) Številka prijave: **200000126**

(22) Datum prijave: **19.05.2000**

(51) MPK⁶: **C12P 15/00**, C12P 7/42,
C12N 15/09, C12N 15/63,
C12R 1:59, A61K 31/192

(45) Datum objave: **31.12.2000**

(30) Prednostna pravica:
20.05.1999 HR P990153

(72) Izumitelji: **PERIĆ Nataša, 21000 Split, HR;**
BOROVČKA Branko, 31000 Osijek, HR;
BAGO-JOKSOVIĆ Anita, 10000 Zagreb, HR;
GOMERČIĆ Krešimir, 10000 Zagreb, HR;
HRANUELI Daslav, 10000 Zagreb, HR;
WATERMAN Peter G., Glasgow G1 1XW, GB;
HUNTER Iain S., Glasgow G1 1XW, GB

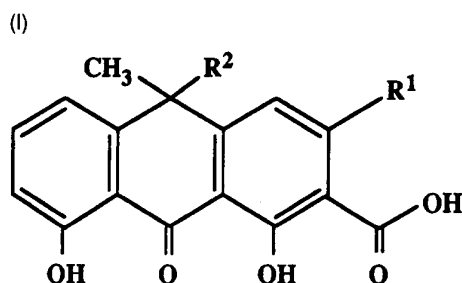
(73) Nosilec: **PLIVA, farmaceutska industrija, dioničko društvo,**
Ulica grada Vukovara 49, 10000 Zagreb, HR

(74) Zastopnik: **Patentna pisarna d.o.o., Čopova 14 p.p. 1725, 1001 Ljubljana, SI**

(54) **NOVI POLIKETIDI, DERIVATI ANTRONA**

(57) Izum se nanaša na nove poliketide, derivate antrona, s splošno formulo (I) v kateri R¹ predstavlja -CH₂-CONH₂ ali -CH₃, R² predstavlja -OH ali -OCH₃,

in na postopek za njihovo pripravo kot tudi na uporabo pri pripravi novih biološko aktivnih spojin s potencialnim terapevtskim učinkom.



PLIVA, farmaceutska industrija, d.d.

Novi poliketidi, derivati antrona

Področje tehnike, v katero spada izum

MPK: C 07

Področje izuma

Predloženi izum se nanaša na poliketide, derivate antrona, in na postopek za njihovo pripravo, ki vključuje tehnike rekombinantne DNA in biosinteze na ta način dobljenih rekombinantov. Nove poliketide lahko uporabljamo same ali kot intermediate pri pripravi novih biološko aktivnih spojin, ki imajo potencialno terapevtsko učinkovitost.

Stanje tehnike

Znano je, da so poliketidi velika, strukturno različna družina naravnih spojin s številnimi biološkimi in farmakološkimi lastnostmi. Nekateri pomembni primeri vključujejo antibiotike, kot oksitettraciklin in eritromicin, protiglivična sredstva, kot amfotericin in nistatin, zdravila za zdravljenje raka, kot tetracenomicin in doksorubicin, imunosupresive, kot rapamicin in snov FK506, zdravila za zmanjševanje nivoja holesterola, kot mevinolin in lovastatin, antiparazitska sredstva avermektin in doramektin, pospeševalca živalske rasti monenzin in salinomicin, naravni insekticid daptomicin in mnoge druge. Poliketidi so sekundarni metaboliti aktinomicet, ki vključujejo rodove *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Saccharopolyspora* in *Nocardia*. Ocenjuje se, da je bilo do leta 1985 okarakteriziranih okoli 4600 antibiotikov aktinomicetnega izvora, od katerih jih je 74 v klinični uporabi (npr. glej reference v: Hranueli, Prehrambeno-tehnol. biotehnol. rev., 27:163, 1989).

V obdobju od leta 1988 do 1992 so opisali dodatnih 1100 metabolitov, od katerih je približno 40% s poliketidno strukturo (Barr et al., WO prijava 98/27203, 1998).

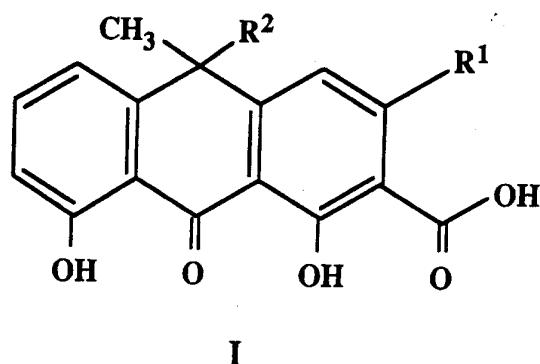
Poliketide pripravijo s pomočjo encimskih kompleksov poliketid sintetaz (PKS) na biosintetski način, ki je podoben načinu maščobnih kislin, ki jih pripravijo s pomočjo encimskih kompleksov sintetaz maščobnih kislin (FAS). PKS sistemi katalizirajo kondenzacijo enostavnih karboksilnih kislin, aktiviranih s koencimom A, z dekarboksilacijsko kondenzacijo. Velika raznolikost struktur naravnih poliketidov je posledica razlike v dolžini verige, izbiri začetnih in podaljšanih enot in različnih redukcijskih ciklusov, kar vse pogojuje njihovo končno strukturo. Podobnosti v zaporedju skupin amino kislin (izvedenih iz sekvenc DNA) in mehanizmu delovanja med produkti gena PKS so privedle do njihove razdelitve na PKS sisteme tipa I in tipa II po klasifikacijskem sistemu, uporabljenem za FAS (Hopwood in Sherman, Annu. Rev. Genet. 24:37, 1990). PKS modularnega tipa I, odgovorne za biosintezo kompleksnih poliketidov, kot so eritromicin, avermektin in rapamicin, so multifunkcionalni encimi, ki vsebujejo številna enkratna aktivna mesta, organizirana v obliki modula. Za razliko od njih PKS tipa II, odgovorne za biosintezo aromatskih poliketidov, kot so aktinorodin, tetracenomicin, frenolicin, griseusin in pigment spor (produkt skupka *whi* gena, katerega strukturo je treba šele določiti) obstoji iz 4 do 6 mono- ali bifunkcionalnih proteinov, katerih aktivna mesta se uporabljajo zaporedno za zgodnjo sintezo in modifikacijo poliketidne verige. V kompleksnih poliketidih sta popolna skladnja aktivnih mest in struktura biosinteznih produktov modularnih PKS spodbudila racionalni model novih kompleksnih poliketidov s spreminjanjem genov PKS z genetskimi manipulacijami (npr. Kao et al., J. Am. Chem. Soc. 117:9105, 1995, in Pacey et al, J. Antibiot. 11:1029, 1998). Pristop k racionalnemu modelu novih enostavnih aromatskih poliketidov pa ne more biti tako direkten. Razlog za to je osnovna razlika v načinu, na katerega geni PKS, odgovorni za biosintezo aromatskih in kompleksnih poliketidov, kontrolirajo strukturo produkta. Za razliko od popolne skladnje med aktivnimi mesti in strukturo produktov genov PKS tipa I so geni PKS tipa II vsi strukturno zelo podobni. Zato na osnovi primarne strukture genov PKS tipa II ni mogoče predpostaviti poliketidne strukture njihovih produktov. Zaradi tega so skonstruirali poseben sistem vektor-gostitelj za ekspresijo genetsko spremenjenih genov

PKS tipa II. Obstoja iz plazmida pRM5 in seva *Streptomyces coelicolor* CH999, iz katerega so odstranili celoten skupek genov za biosintezo aktinorodina (geni *act*). Pri poskusih "kombiniranja" genov PKS, proizvajalcev različnih aromatskih poliketidov, so ta sistem uporabili za sintezo mnogih novih aromatskih poliketidnih snovi in za razvoj strategije za njihov racionalni model. Ti poskusi so pokazali, da je za dolžino ogljikove verige v aromatskih poliketidih odgovoren produkt gena *clf* (npr. glej reference v: Khosla et al., WO prij. 96/40968; US 5,935,340, 1996; Hopwood, Chem.Rev. 97:2465, 1997, in Barr et al., WO prij. 98/27203, 1998).

Vrsta *S. rimosus*, proizvajalec antibiotika oksitettraciklina (OTC), je ena od genetsko najboljše opisanih bakterij izmed industrijsko važnih streptomicet. Izčrpno so preiskovali dva seva: M4018, ki so ga proučevali v Veliki Britaniji, in R6, ki so ga proučevali v Zagrebu. Skupek genov za biosintezo OTC (geni *otc*) so klonirali iz seva M15883, derivata seva M4018, in izdelali so njeno restrikcijsko mapo [Hunter in Hill, v *Biotechnology of Antibiotics* (2. izdaja), W.R. Strohl (ured.) Marcel Decker, New York, str. 21, 1997]. Sekvenciranje DNA celega skupka je razkrilo funkcijo mnogih genov, za nekatere pa je treba funkcijo še določiti. Skupek genov *otc* seva R6 je bil prav tako kloniran. Njegova restrikcijska mapa se ne razlikuje od mape seva M15883 (Hranueli et al., Food Technol. Biotechnol. 37 (2): 1999, v tisku). Zaradi tega lahko podatke, dobljene za sev M15883 in sev R6, popolnoma primerjamo. Inaktivacija kromosomske kopije gena *otcD1* (katerega produkt sodeluje v gubanju, ciklizaciji in aromatizaciji hipotetičnega nonaketidnega intermediata biosinteze OTC) seva *S. rimosus* R6, je pripeljala do izuma, v katerem so opisani novi poliketidi, derivati piranona (Petković et al., hrvaška patentna prijava P960131 A, 1998). V nasprotju s tem produkt gena *otcC* hidroksilira nonaketidni intermedat biosinteze OTC mnogo stopenj po tem, ko so pripravili in nagubali poliketidno verigo [Hunter in Hill, v *Biotechnology of Antibiotics* (2. izdaja), W.R. Strohl (ured.) Marcel Decker, New York, str. 21, 1997].

Bistvo izuma

Predloženi izum se nanaša na nove poliketide, derivate antrona s splošno formulo (I):



v kateri

R^1 predstavlja $-\text{CH}_2\text{-CONH}_2$ ali $-\text{CH}_3$,

R^2 predstavlja $-\text{OH}$ ali $-\text{OCH}_3$,

ter na postopek za njihovo pripravo kot tudi na uporabo v pripravi novih biološko aktivnih spojin s potencialnim terapevtskim delovanjem.

Podroben opis izuma

Iz genetsko konstruiranega seva *S. rimosus* R6-ZGL1 (deponiran kot *Streptomyces rimosus* R6-ZGL1 (*otcC::gmr*) v zbirki NCAIM pod pristopno številko NCAIM(P) B 001282) (z inaktiviranim genom *otcC*) izoliramo nove poliketide, derivate antrona, s splošno formulo I, kjer R^1 predstavlja $-\text{CH}_2\text{-CONH}_2$ ali $-\text{CH}_3$, R^2 pa predstavlja $-\text{OH}$ ali $-\text{OCH}_3$, ki jih dobimo s fermentacijo, ekstrakcijo, zgoščevanjem, čiščenjem na silikagelu in na koncu z gelno filtracijo na koloni Sephadex LH-20.

Po dostopnih podatkih dobljene spojine do sedaj niso bile opisane. Novi derivati antrona so okarakterizirani s tem, da vsi v strukturi vsebujejo karboksilno skupino in različne dolžine ogljikovih verig, čeprav v genetsko konstruiranem sevu (R6-ZGL1) gen *clf*, odgovoren za dolžino ogljikove verige, ni spremenjen (glej reference v: Khosla et al., WO prijava 96/40968; US 5,935,340, 1996).

Bakterijski sevi, plazmidi in pogoji gojenja

Sev *S. rimosus* R6 (Hranueli et al., *J. Gen. Microbiol.* 114:295, 1979) uporabimo za inaktivacijo gena *otcC*. Genetska konstrukcija seva *S. rimosus* R6-ZGL1 (*otcC::gmr*) je opisana v nadaljevanju. Vsa kloniranja smo izvedli v celicah bakterije *Escherichia coli* TG1 (Gibson, doktorska disertacija, Univerza v Cambridgeu, Velika Britanija, 1984). Plazmidno DNA dvojnega vektorja pGLW75 smo uvedli v celice seva *E. coli* NM544 (*dcm*), iz katerega smo izolirali nemetilirano DNA tega plazmida pred transformacijo "celic" vrste *S. rimosus* (Marinus in Palmer, *Gene* 143:1, 1994).

Kot vir gena *otcC* in sosednjih delov *otc* DNA smo uporabili plazmid pPFZ46 (Butler et al., *Mol. Gen. Genet.* 215:231, 1989). Položaj gena v skupku *otc* gena smo določili s t.i. "povratnim genetskim" pristopom, z uporabo degeneriranega oligonukleotida, ki je bil modeliran na osnovi amino-terminalne peptidne sekvence očiščenega encima ATC-oksigenaze (Binnie et al., *J. Bacteriol.* 171:887, 1989). Za inaktivacijo gena *otcC* z insercijo gena *gmr* v njegovo strukturo smo uporabili plazmid pIBI24 bakterije *E. coli* (Dente et al., *Nucl. Acids Res.* 11:1645, 1983). Gen *gmr*, ki je produkt, odgovoren za odpornost proti antibiotiku gentamicinu (Skeggs et al., *J. Gen. Microbiol.* 133:915, 1987), smo dobili iz plazmida p504 bakterije *E. coli* (Garven, doktorska disertacija, Univerza v Glasgowu, Velika Britanija, 1995). (Slika 1). Plazmid vrste rodu *Streptomyces*, pIJ486 (Ward et al., *Mol. Gen. Genet.* 203:468, 1986), ki vsebuje genetski marker *tsr*, ki je produkt, odgovoren za odpornost proti antibiotiku tiostreptonu, smo uporabili za konstrukcijo dvojnega vektorja, ki se lahko razmnožuje v celicah bakterije *E. coli* kot tudi v "celicah" vrste rodu *Streptomyces*. Konstrukcija vseh plazmidov je opisana v nadaljevanju.

Seve vrste *E. coli* smo vzgajali in vzdrževali ob standardnih pogojih (Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Kompletni tekoči (LM) in trden (CM) hranilni medij za vzgajanje in vzdrževanje "celic" vrste *S. rimosus* in fermentacijski medij (FM) za biosintezo poliketidov so že bili opisani (Hranueli et al., *J. Gen. Microbiol.* 114:295, 1979, in Vešligaj et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 41:986, 1981).

Rokovanje z DNA in z mikroorganizmi

Metode za izolacijo in čiščenje kromosomskih in plazmidnih DNA, digeriranje DNA z restrikcijskimi endonukleazami, elektroforezo v gelu agaroze, prenos DNA na membrano, markiranje DNA z digoksinom ter hibridizacija in detekcija so opisali Sambrook et al. (*Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

Celice bakterije *E. coli* smo transformirali s pomočjo DNA plazmida z uporabo aparature za elektroporacijo (Bio-Rad Pulsing aparat) v skladu z navodili proizvajalca, medtem ko smo "celice" seva *S. rimosus* R6 transformirali z uporabo istega aparata po metodi, opisani v Pigac in Schrempf (*Appl. Environ. Microbiol.* 61:352, 1995).

Konstrukcija plazmidov pGLW75, ki vsebujejo inaktivirani gen *otcC*

Plazmid p508x smo dobili iz plazmida p508 (Garven, doktorska disertacija, Univerza v Glasgowu, Velika Britanija, 1995). Ta plazmid (ki temelji na vektorju pIBI24, ki je v celicah bakterije *E. coli* prisoten v velikem številu kopij) vsebuje del skupka gena *otc* od restrikcijskega mesta *Pst*I₁₇ do restrikcijskega mesta *Sac*I₂₁. Segment DNA med restrikcijskima mestoma *Kpn*I₁₈ in *Kpn*I₁₉ smo zamenjali z DNA linkerjem, ki vsebuje enkratno restrikcijsko mesto encima *Xba*I (spajanje topih koncev). Iz plazmida p504 smo klonirali del DNA, ki vsebuje gen *gmr*, v enkratno restrikcijsko mesto *Xba*I plazmida p508x, da dobimo plazmid pGLW72. V paralelni konstrukciji smo fragment skupka gena *otc* z 2,3 kb (od restrikcijskega mesta *Sph*I₁₄ do restrikcijskega mesta *Pst*I₁₇) klonirali iz plazmida pPFZ46 (Butler et al., *Mol. Gen. Genet.* 215:231, 1989) v plazmid pIBI24, da dobimo plazmid pGLW73. V ta plazmid smo nato subklonirali *Pst*I-*Sac*I fragment DNA s 3,9 kb iz plazmida pGLW72, ki je vseboval *gmr* marker. To insercijo smo izvedli z delnim digeriranjem DNA plazmida pGLW72. Delno digeriran fragment DNA smo nato očistili iz gela agaroze, digerirali z endonukleazo *Sac*I in povezali s plazmidnim vektorjem pGLW73. Dobljeni plazmid smo imenovali pGLW74 (sl. 1). Plazmid pGLW74 vsebuje genetični marker *gmr* kloniran znotraj

gena *otcC* in omejen s fragmenti DNA iz seva *S. rimosus* R6, to je 2,7 kb navzdol in 1,8 kb navzgor od gena *otcC*. Vse do sedaj opisane plazmide smo konstruirali z uporabo vektorjev, ki vsebujejo izvor za replikacijo DNA v bakteriji *E. coli*.

Končni del DNA v konstrukciji dvojnega vektorja je bil nestabilen plazmid pIJ486, ki vsebuje izvor za replikacijo DNA v vrsto rodu *Streptomyces*. Plazmid pGLW74 vsebuje enkratno restrikcijsko mesto za encim *SacI*, uporabljeno za njegovo linearizacijo. Linearizirani plazmid smo nato ligirali s plazmidom pIJ486, digiriranim znotraj njegovega enkratnega restrikcijskega mesta za encim *SacI*. Dobljen dvojni vektor smo poimenovali pGLW75, ki vsebuje inaktivirani gen *otcC* (sl. 1).

Konstrukcija seva *S. rimosus* R6-ZGL1

Inaktivirano kopijo gena (*otcC::gmr*, prisotna na plazmidu pGLW75) smo uvedli v "celice" seva *S. rimosus* R6 z elektroporacijo. Plazmid pGLW75 je vseboval genetska markerja *gmr* in *tsr*. Dobljene transformante smo selekcionirali na odpornost proti antibiotiku tiostreptonu. Odpornost proti antibiotiku tiostreptonu smo uporabili za primarno selekcijo transformantov, medtem ko smo lahko odpornost proti antibiotiku gentamicinu v vrste *S. rimosus* uporabili samo za sekundarno selekcijo. Naknadna nasaditev transformantov na medij CM, ki vsebuje gentamicin, je potrdila prisotnost celovitega genetskega markerja *gmr* v njihovih "celicah". Po rasti "celic" transformantov seva *S. rimosus* R6 v mediju LM v neselektivnih pogojih (v odsotnosti antibiotikov) v času, za katerega predpostavljamo, da je prišlo do rekombinacije med DNA plazmidom in DNA kromosomom bakterije *S. rimosus*, smo "celice" transformantov nasadili na medij CM, ki prav tako ne vsebuje antibiotikov. V takem sistemu se plazmid pogosto izgubi med deljenjem "celic" [segregacijska nestabilnost plazmida pIJ486 v odsotnosti selekcije je dobro opisana (Ward et al., *Mol. Gen. Genet.* 203:468, 1986)]. Inaktivacijo gena za hidroksilazo (gena *otcC*) izvedemo znotraj kromosoma seva *S. rimosus* R6. Do inaktivacije gena v kromosomu pride, kadar kopija gena *otcC::gmr* zamenja izvirni gen *otcC* v kromosomu ob izgubi vektorja pIJ486 in pridruženih delov DNA. Da bi potrdili verodostojnost inaktivacije,

smo kromosomsko DNA izolirali iz izbranih kolonij transformantov (ki so odporne proti gentamicinu, občutljive pa proti tiostreptonu), digerirali z restrikcijskimi endonukleazami *EcoRI* in *SacI*, prenesli na membrano (Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989) in hibridizirali s sondo, ki je vsebovala gen *otcC* (ali del DNA od *KpnI*₁₉ do *SphI*₂₀). Na ta način smo konstruirali sev *S. rimosus* R6-ZGL1.

Biosinteza novih poliketidov

Sev *S. rimosus* R6-ZGL1 (*otcC::gmr*), shranjen v 40% glicerolu pri temperaturi -70 °C, smo presadili na trden medij CM v petrijevke z vsebnostjo gentamicina (500 µg/mL) [CM medij vsebuje: 10,0 g ekstrakta slada, 4,0 g kvasnega ekstrakta, 4,0 g glukoze, 2% agarja (m/v), destilirana voda do 1,0 l; pH naravnamo na 7,2 z 10%-nim NaOH; sterilizacija 40 minut pri 110 °C]. Petrijevke smo inkubirali v termostatu 5 do 7 dni (pri 25 - 30 °C), nakar so zrasle posamezne kolonije streptomicet. Z eno kolonijo streptomicet smo nasadili 50 ml tekočega medija LM, ki vsebuje gentamicin (500 µg/ml) [LM medij vsebuje: 40,0 g dekstrina, 16,0 g CSL (corn steep liquor; približno 50% trdne snovi), 7,0 g CaCO₃, 2,0 g (NH₄)₂SO₄, destilirana voda do 1,0 l; pH smo naravnali na 7,2 z 10%-nim NaOH; sterilizacija 30 minut pri 120 °C] in dobljeno suspenzijo smo inkubirali na rotacijskem stresalniku (150 - 300 obr/min) 48 do 72 ur pri temperaturi od 25 do 30 °C. Medij FM za biosintezo poliketidov, ki vsebuje gentamicin (500 µg/ml), [FM medij vsebuje: 55 g koruznega škroba, 7,5 g CSS (corn steep solid), 7,0 g CaCO₃, 8,5 g (NH₄)₂SO₄, 2,0 g NH₄Cl, 0,14 g COCl₂ x 6H₂O, 10,0 g sojinega olja, vodovodna voda do 1,0 l; naravni pH; sterilizacija 40 minut pri 120 °C], smo nasadili z 10% biomase streptomicet iz medija LM. Biosintezo (fermentacijo) smo izvedli na rotacijskem stresalniku (150 - 300 obr/min) v času 5 do 7 dni pri temperaturi od 25 do 30 °C.

Ekstrakcija, zgoščevanje in čiščenje novih poliketidnih snovi

Fermentacijsko lužnico (2,0 l) seva *S. rimosus* R6-ZGL1 smo nasitili z dodatkom anorganske soli, npr. z natrijevim dihidrogenfosfatom, in ekstrahirali z organskim topilom, ki se slabo meša z vodo, npr. z n-butanolom, n-oktanolom, kloroformom, etil-acetatom, metil-izo-butilketonom, itd., prednostno pa z etil-acetatom. Topilo smo uparili pri znižanem tlaku in temperaturi od 35 do 50 °C. Različne snovi, prisotne v dobljeni trdni snovi, smo razdelili v frakcije s kromatografijo na koloni silikagela z eluiranjem z dvema sistemoma topil (A: kloroform-metanol, B: n-heksan-etil-acetat). Frakcije, eluirane s sistemom A (8-16% metanola) smo združili in topilo uparili pod zmanjšanim tlakom. Z razdelitvijo smo nadaljevali s filtracijo na koloni Sephadex LH-20 in s ponovnim eluiranjem s sistemom topil A. Frakcije, eluirane s sistemom A (6% metanola), so vsebovale snov 1 (35 mg). Frakcije, eluirane s sistemom B (30-45% etil-acetata), smo združili in topilo uparili pod zmanjšanim tlakom. Dobljeno trdno snov smo raztopili v 2 ml metanola in ohladili na + 4 °C. Po 20 urah se je oborila snov 3 (7 mg) kot rumena oborina. Frakcije, eluirane s sistemom B (65-80% etil acetata), smo prav tako združili in topilo uparili pod zmanjšanim tlakom. Dobljeno trdno snov smo raztopili v 2 ml metanola in ohladili na + 4 °C. Snov 2 (11 mg) se je oborila kot svetlo rumena oborina po 24 urah.

Ekstrakcijo, zgoščevanje in čiščenje poliketidov od 1 do 3 smo spremljali s tenkoslojno kromatografijo (TLC) na silikagelnih ploščah (Merck, kat. št. 15684) z uporabo zmesi topil kloroform - metanol - voda (9 : 4 : 0,1) kot mobilne faze.

Kemijska karakterizacija novih poliketidov

Kemijsko strukturo dobljenih poliketidov smo določili na osnovi 2D homonuklearnih in heteronuklearnih študij ob uporabi COSY-45 tehnike za neposredno določevanje H-H pripajanja (Williams in Fleming, *Methods in Organic Chemistry*, 5. izdaja, McGraw-Hill Publishing Co, London, Velika Britanija, 1997), HC-COBI tehnike za določevanje H-C interakcije preko ene vezi (1J) (Sanders in Hunter, *Modern NMR Spectroscopy: A Guide for Chemists*, Oxford University Press, Velika Britanija, 1987) in HMBC tehnike za določevanje H-C interakcije preko dveh (2J) in treh vezi

(³J) (Williams in Fleming, *Methods in Organic Chemistry*, 5. izdaja, McGraw-Hill Publishing Co, London, Velika Britanija, 1997).

IR spekter je odkril številne absorpcijske trakove med 1675 in 1615 cm⁻¹, kar kaže na prisotnost karbonilov, lastnih poliketidom.

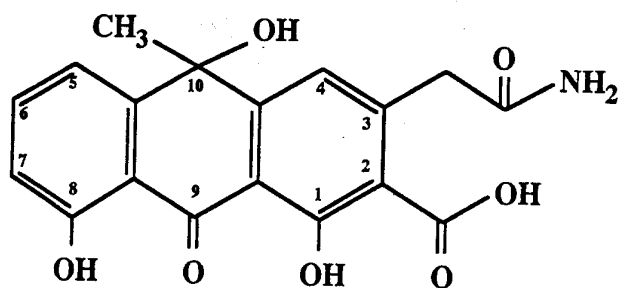
Priprava novih derivatov antrona je prikazana s sledečimi primeri, ki v nobenem primeru niso omejevalni dejavnik za izum.

Primer 1

3-karbamoilmetil-1,8,10-trihidroksi-10-metil-9-okso-9,10-dihidroantracen-2-karboksilna kislina (1)

ali

3-karbamoilmetil-1,8,10-trihidroksi-10-metil-antron-2-karboksilna kislina (1)



1

Z eno kolonijo seva *S. rimosus* R6-ZGL1 (*otcC::gmr*) nasadimo 50 ml medija LM, ki vsebuje gentamicin (500 µg/ml). Dobljeno mikrobo suspenzijo gojimo na rotacijskem stresalniku (200 obr/min) 72 ur pri 28 °C. Medij za biosintezo poliketidov (FM), ki vsebuje gentamicin (500 µg/ml), nasadimo z 10% mikrobne biomase iz medija LM. Biosintezo (fermentacijo) izvedemo na rotacijskem stresalniku (200 obr/min) v času 7 dni pri temperaturi 28 °C. Fermentacijsko juho (2,0 l) nasitimo z dodatkom natrijevega dihidrogenfosfata (1,2 kg) in jo trikrat ekstrahiramo z enakim volumnom (2,0 l) etil acetata. Organske sloje združimo in uparimo pod zmanjšanim tlakom pri 40 °C do

suhega ostanka. Suhi ostanek (2,0 g) razdelimo s kromatografijo na stolpcu silikagela z eluiranjem s sistemom topil A (kloroform-metanol). Frakcije, eluirane s sistemom A (8-16% metanola), združimo in koncentriramo z uparjenjem pod zmanjšanim tlakom. Z nadaljnjo razdelitvijo nadaljujemo na koloni Sephadex LH-20 s ponovnim eluiranjem s kloroformom-metanolom (6% metanola).

Frakcije, za katere je TLC pokazala, da vsebujejo spojino 1, zberemo in koncentriramo z uparjenjem pod zmanjšanim tlakom, pri čemer dobimo 35 mg spojine I v obliki rumenega prahu.

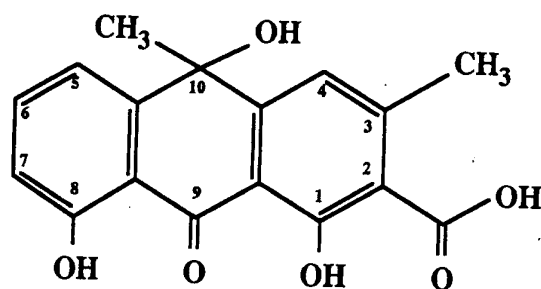
^1H NMR: (400MHz, DMSO- d_6): 12,41 (2H, br. s, NH_2), 11,97 (1H, s, 2-COOH), 7,77 (1H, s, 8-OH), 7,64 (1H, s, 1-OH), 7,69 (1H, t, $J = 8,0$ Hz, H-6), 7,42 (1H, dd, $J = 7,6$ Hz, H-5), 7,40 (1H, s, H-4), 6,95 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-7), 6,29 (1H, s, 10-OH), 3,72 (2H, ABq, $J = 16$ Hz, 3- CH_2 -), 1,51 (3H, s, 10- CH_3).

^{13}C NMR: (100MHz, DMSO- d_6): 191,5 (C-9), 171,1 (3- CH_2 -CO- NH_2), 166,9 (2-COOH), 161,5 (C-8), 158,3 (C-1), 152,0 (C-10a), 151,5 (C-4a), 141,8 (C-3), 137,4 (C-6), 126,2 (C-2), 119,1 (C-4), 117,1 (C-5), 116,0 (C-7), 113,0 (C-8a), 111,6 (C-9a), 69,4 (3-CH $_2$ -CO- NH_2), 38,7 (10- CH_3).

Primer 2

1,8,10-trihidroksi-3,10-dimetil-9-okso-9,10-dihidroantracen-2-karboksilna kislina (2)
ali

1,8,10-trihidroksi-3,10-dimetil-antron-2-karboksilna kislina (2)



2

Po fermentaciji in izolaciji, opisani v primeru 1, izvedemo ločenje suhega ostanka s kromatografijo na koloni silikagela z eluiranjem s sistemom topil B (n-heksan-etil acetat). Frakcije, eluirane s sistemom B (65-80% etil acetata), združimo in koncentriramo z uparjenjem pod zmanjšanim tlakom. Dobljeno trdno snov raztopimo v 2 ml metanola in ohladimo na + 4 °C. Po 24 urah se obori snov 2 (11 mg) kot svetlo rumena oborina.

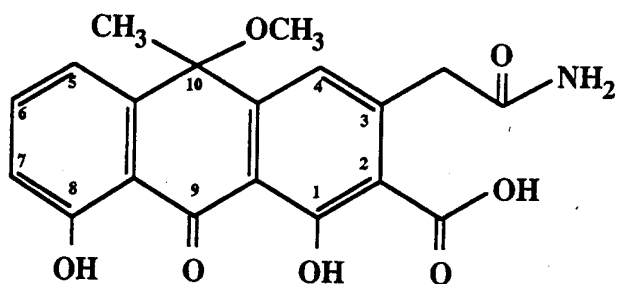
^1H NMR: (400MHz, DMSO- d_6): 12,00 (1H, br. s, 2-COOH), 7,81 (1H, s, 8-OH), 7,53 (1H, s, 1-OH), 7,68 (1H, t, $J = 8,0$ Hz, H-6), 7,42 (1H, dd, $J = 7,6$ Hz, H-5), 7,28 (1H, s, H-4), 6,93 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H-7), 6,23 (1H, s, 10-OH), 2,37 (3H, s, 3- CH_3), 1,50 (3H, s, 10- CH_3).

^{13}C NMR: (100MHz, DMSO- d_6): 191,4 (C-9), 167,4 (2-COOH), 161,5 (C-8 in C-1), 152,0 (C-10a), 151,3 (C-4a), 144,8 (C-3), 137,3 (C-6), 126,5 (C-2), 118,4 (C-4), 117,5, 116,0 (C-5 in C-7), 113,0 (C-8a), 110,9 (C-9a), 38,7 (10- CH_3), 20,0 (3- CH_3).

Primer 3

3-karbamoilmetil-1,8-dihidroksi-10-metoksi-10-metil-9-okso-
9,10-dihidroantracen-2-karboksilna kislina (3)
ali

3-karbamoilmetil-1,8-dihidroksi-10-metoksi-10-metil-
antron-2-karboksilna kislina (3)



3

Po fermentaciji in izolaciji, opisani v primeru 1, dobimo snov 3 (7 mg) z ločenjem suhega ostanka s kromatografijo na koloni silikagela z eluiranjem s sistemom topil B (30-45% n-heksan-etil acetat). Kot v primeru 2 frakcije, ki vsebujejo snov 3, združimo in koncentriramo z uparjenjem pod zmanjšanim tlakom in prav tako raztopimo v 2 ml metanola. Raztopino ohladimo na +4 °C. Po 20 urah se obori snov 3 kot rumena oborina.

¹H NMR: (400MHz, DMSO-d₆): 12,41 (2H, br. s, NH₂), 11,94 (1H, s, 2-COOH), 7,76 (1H, s, 8-OH), 7,60 (1H, s, 1-OH), 7,69 (1H, t, J = 8,0 Hz, H-6), 7,42 (1H, dd, J = 7,6 Hz, H-5), 7,39 (1H, s, H-4), 6,95 (1H, d, J = 8,4 Hz, H-7), 3,81 (2H, ABq, J = 16 Hz, 3-CH₂-), 3,61 (3H, s, 10-OCH₃), 1,51 (3H, s, 10-CH₃).

¹³C NMR: (100MHz, DMSO-d₆): 191,5 (C-9), 170,2 (3-CH₂-CO-NH₂), 166,8 (2-COOH), 161,6 (C-8), 158,3 (C-1), 152,0 (C-10a), 151,7 (C-4a), 141,1 (C-3), 137,6 (C-6), 126,2 (C-2), 119,2 (C-4), 117,2 (C-5), 116,1 (C-7), 113,0 (C-8a), 111,9 (C-9a), 69,4 (3-CH₂-CO-NH₂), 51,8 (10-O-CH₃), 38,7 (10-CH₃).

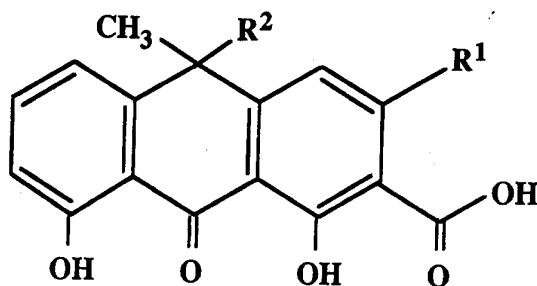
Za

PLIVA, farmaceutska industrija, d.d.:

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
LJUBLJANA / COPOVA 14

Patentni zahtevki

1. Novi poliketidi, derivati antrona, s splošno formulo I



I

v kateri

R^1 predstavlja $-\text{CH}_2\text{-CONH}_2$ ali $-\text{CH}_3$,

R^2 predstavlja $-\text{OH}$ ali $-\text{OCH}_3$.

2. Nova spojina po zahtevku 1, označena s tem, da R^1 predstavlja $-\text{CH}_2\text{-CONH}_2$,
 R^2 predstavlja $-\text{OH}$.

3. Nova spojina po zahtevku 1, označena s tem, da R^1 predstavlja $-\text{CH}_3$, R^2 pa
predstavlja $-\text{OH}$.

4. Nova spojina po zahtevku 1, označena s tem, da R^1 predstavlja $-\text{CH}_2\text{-CONH}_2$, R^2 pa
predstavlja $-\text{OCH}_3$.

5. Postopek za pripravo novih poliketidov, derivatov antrona, po zahtevku 1, označen
s tem, da konstruiramo sev *S. rimosus* R6-ZGL1 s pomočjo plazmidov pPFZ46,
pIBI24, p504, p508x in pIJ486, nakar izvajamo fermentacijo 5 do 7 dni pri temperaturi
25 do 30 °C na rotacijskem stresalniku, nato izolacijo z ekstrakcijo z organskim
topilom, ki se slabo meša z vodo, in z njihovim ločenjem s pomočjo kromatografije na
koloni silikagela ob uporabi dveh običajnih sistemov topil, kot kloroforma-metanola
ali n-heksana-etil acetata, čemur sledi ločenje na koloni Sephadex LH-20 z eluiranjem
z zmesjo preje omenjenih topil ali z obarjanjem v metanolu.

6. Novi poliketidi, derivati antrona, za uporabo kot biološko aktivne spojine ali kot intermediati pri pripravi novih biološko aktivnih spojin, ki imajo potencialno terapevtsko učinkovitost.

Za

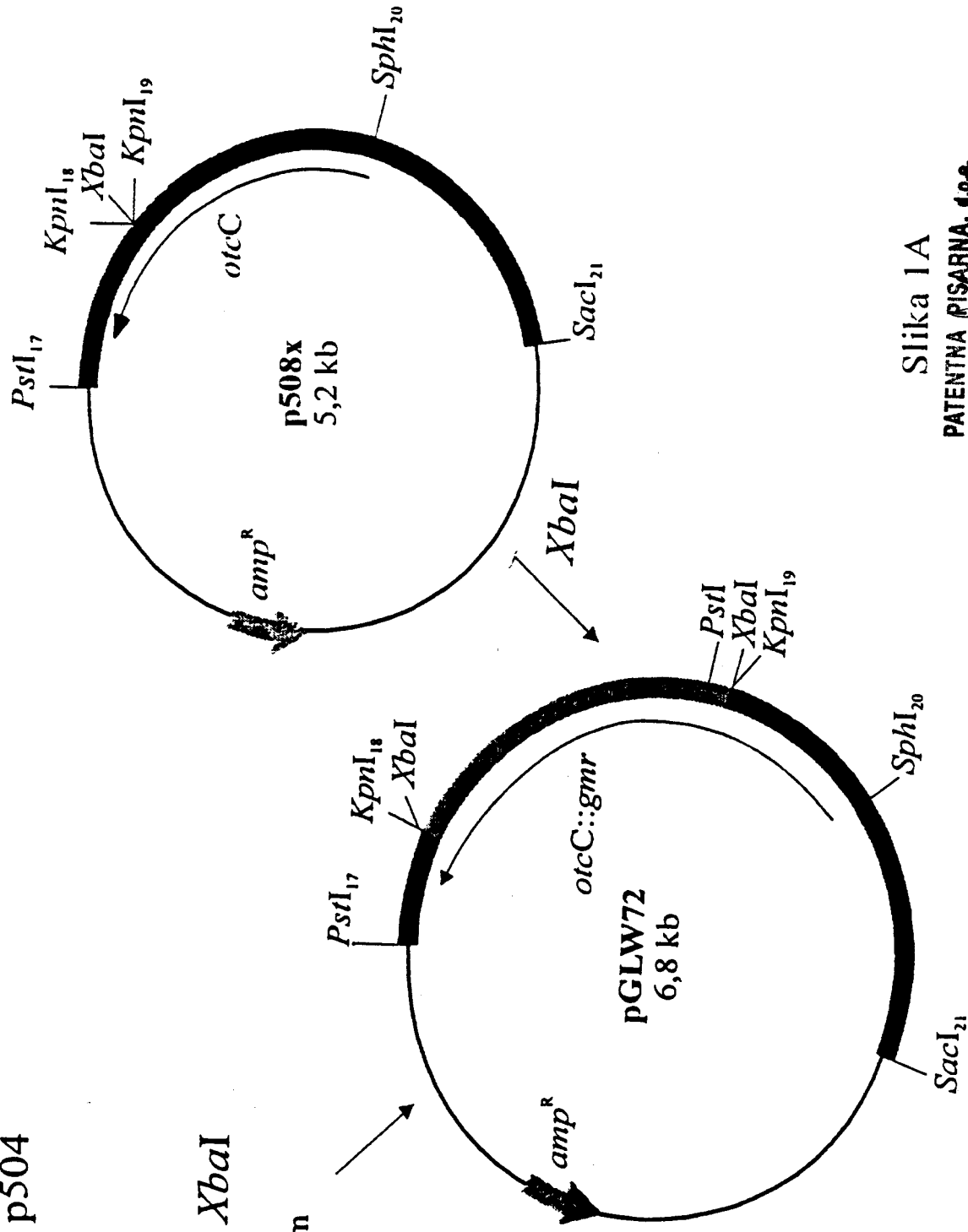
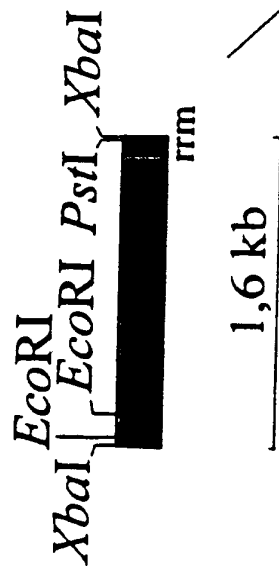
PLIVA, farmaceutska industrija, d.d.:

PATENTNA PISARNA, d.o.o.
LJUBLJANA, ČOPOVA 14



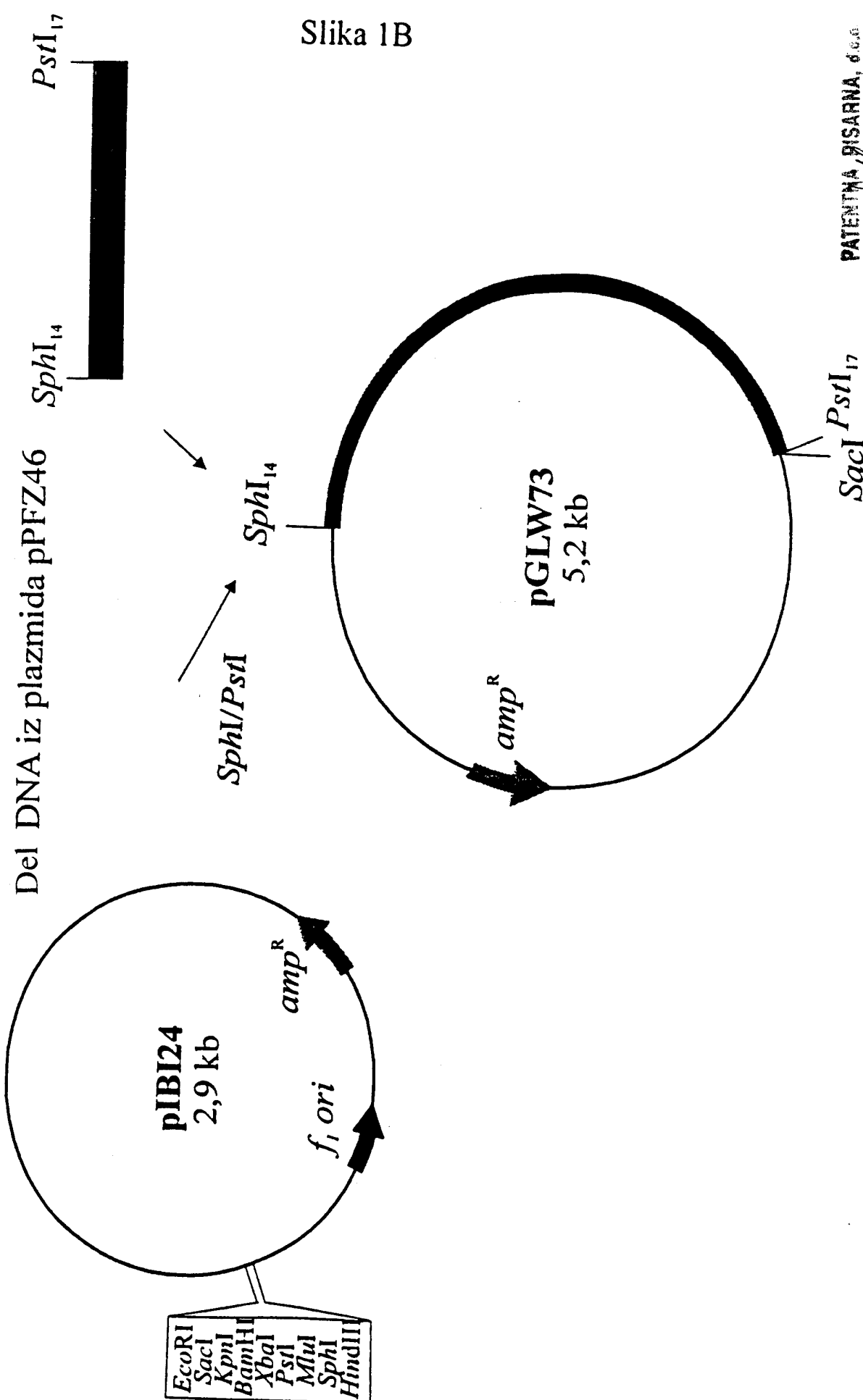
27527-iv-00-mn

Gen *gmr* iz plazmida p504



Slika 1A

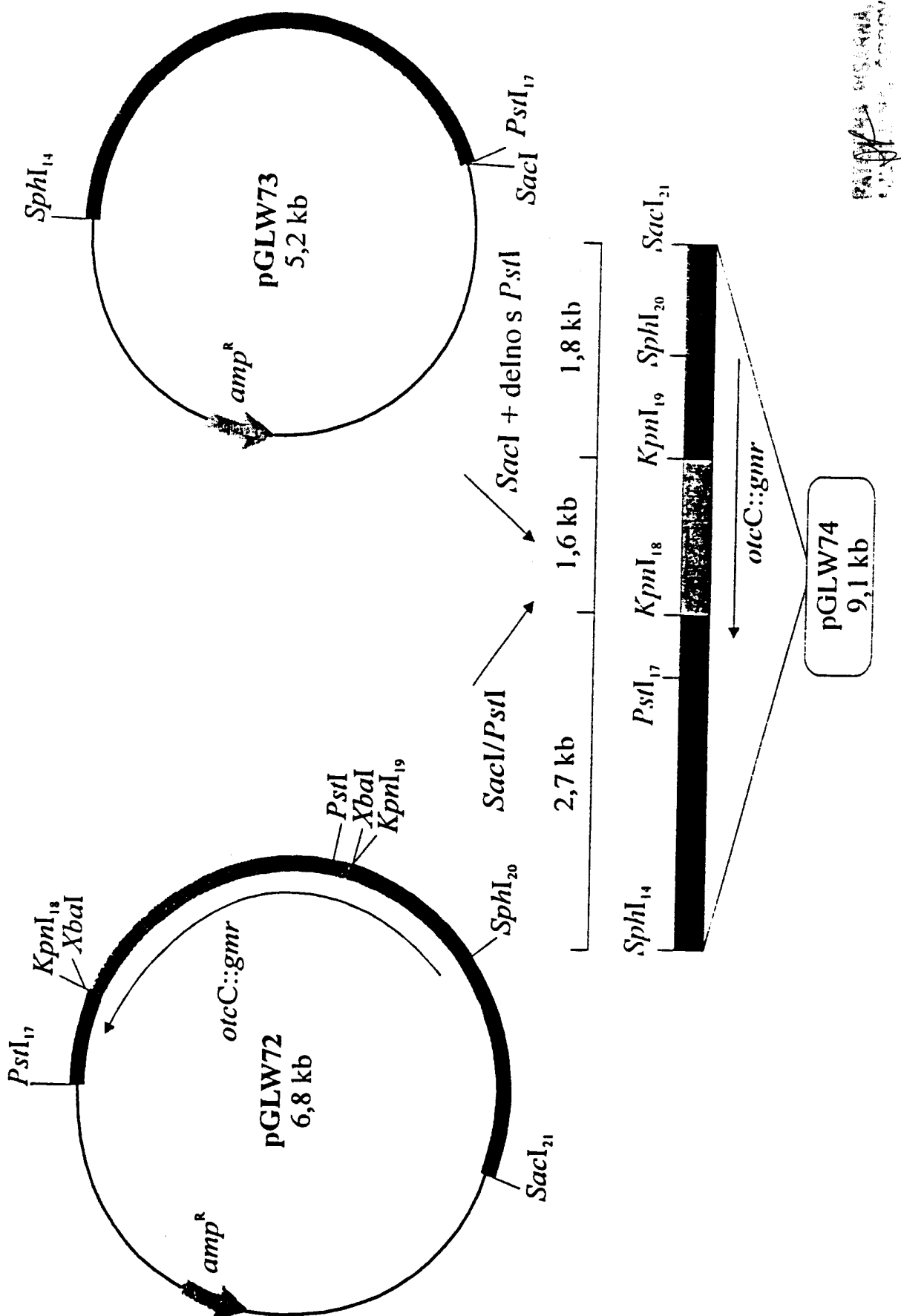
PATENTNA PISARNA, d.o.o.
LJUBLJANA, ČOPOVA 14



Slika 1B

PATENTNA BISARNA, d.d.
Ljubljana, Slovenija

Slika 1C



Slika 1D

