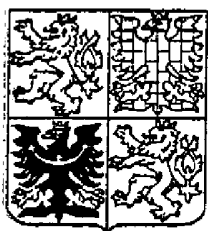


ČESKÁ
REPUBLIKA

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) 28.12.92

(32) 06.01.92

(31) 92/817235

(33) US

(40) 11.08.93

(12)

(21) 3905-92.

(13) A3

5(51)

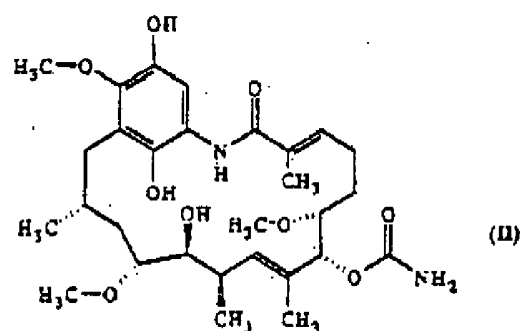
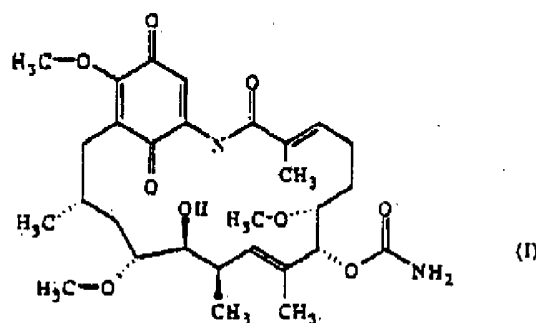
C 07 D 225/06

C 12 P 17/10

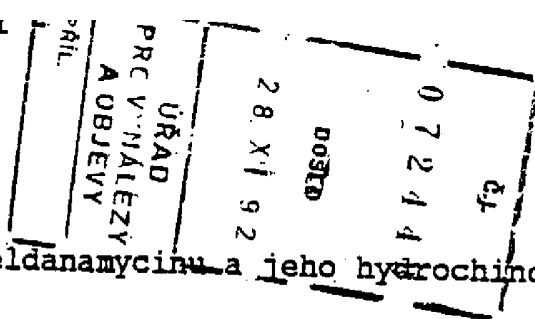
// (C 12 P 17/10, C 12 R 1:55)

- (71) PFIZER INC., New York, New York, US;
(72) Cullen Walter P., East Lyme, Connecticut, US;
Jefferson Mark T., Waterford, Connecticut, US;
Moyer Mikel P., Clinton, Connecticut, US;
(54) Způsob přípravy 4,5-dihydrogeldanamycinu a
jeho hydrochinonu a použití těchto látek

- (57) Způsob fermentace a izolování sloučenin vzorce I a II,
které patří do skupiny ansamycinbenzochinonových anti-
biotik, propagací mikroorganismu *Streptomyces hygroscopicus*
ATCC 55256 ve vodném živném prostředí obsahující
zdroj uhlíkatých látek, zdroj organického dusku, růstovou
látku a minerální soli obsahující stopové prvky. Do rozsahu
rovněž náleží chemická syntéza sloučeniny vzorce II ze
sloučeniny I. Uvedené sloučeniny jsou vhodné pro léčení
proliferčních poruch včetně rakoviny u savců, zejména u
lidí, což ovšem neznamená omezení jejich použití. U těchto
sloučenin se rovněž předpokládá jejich použitelnost proti
určitým mikroorganismům a dále jsou použitelné jako im-
unosupresivní látky proti autoimunitním onemocněním.



Způsob přípravy 4,5-dihydrogeldanamycinu a jeho hydrochinonu
a použití těchto látek



Oblast techniky

Vynález se týká nového způsobu přípravy 4,5-dihydrogeldanamycinu a jeho hydrochinonu fermentací mikroorganismu *Streptomyces hygroscopicus*, který je uložen ve sbírce kultur Pfizer pod označením FD 29068, což je derivát subkultury NRRL 3602, nyní uložený jako ATCC 55256, za použití standardních fermentačních metod a podmínek, přičemž potom následuje izolování sloučenin podle vynálezu za použití běžných oddělovacích metod. Hydrochinon je možno rovněž připravit chemickou syntézou ze 4,5-dihydrogeldanamycinu.

Dosavadní stav techniky

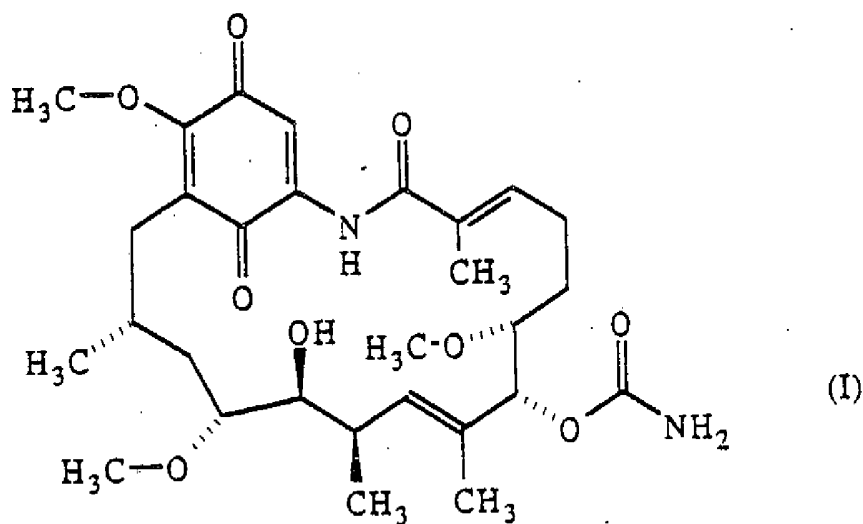
Jak uvedený 4,5-dihydrogeldanamycin tak i jeho hydrochinon představují chemické sloučeniny, které náleží ke skupině ansamycinbenzochinonových antibiotik. Tento 4,5-dihydrogeldanamycin a jeho hydrochinon se považují za deriváty geldanamycinu, což je všeobecně velice dobře známá látka z této skupiny ansamycinbenzochinonových látek. Geldanamycin jako takový se získá fermentací mikroorganismu *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 3602 a oddělením této látky z fermentačního prostředí. Geldanamycin představuje známou látku, která se používá proti určitým druhům mikroorganismů, zejména proti kvasinkám a plísním. Postupy přípravy těchto geldanamycinů a použití těchto látek je uvedeno v patentu Spojených států amerických č. 3 595 955. 4,5-Dihydrogeldanamycin byl rovněž předtím připraven syntetickým

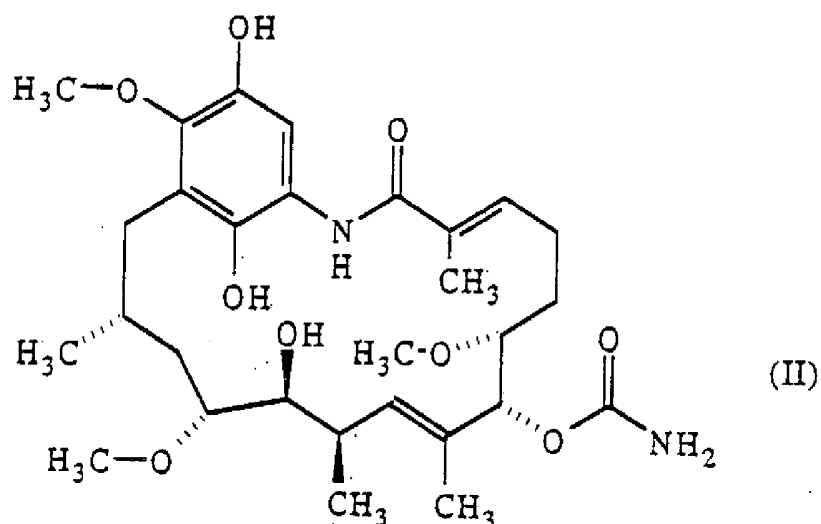
způsobem katalytickou hydrogenací geldanamycinu. Odkaz na semisyntézu 4,5-dihydrogeldanamycinu je možno nalézt v Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Chemistry of the Ansamycin Antibiotics, 33, 1976, str. 278. Až dosud nebylo uváděno v publikacích podle dosavadního stavu. techniky žádné použití tohoto 4,5-dihydrogeldanamycinu.

Semisyntetické deriváty geldanamycinu a jejich použití jako protinádorových látek je popisováno v Derwent abstracts 82-98300E, 81-70796D, 80-72388C a 80-62760C.

Podstata vynálezu

Vynález se týká postupu přípravy 4,5-dihydrogeldanamycinu, který má dále uvedený vzorec I, a hydrochinonu tohoto 4,5-dihydrogeldanamycinu, který má dále uvedený vzorec II :





Tento postup podle vynálezu zahrnuje submerzní aerobní propagaci mikroorganismu *Streptomyces hygroscopicus*, ATCC 55256, ve vodném živném prostředí, přičemž potom následuje izolování sloučenin výše uvedeného vzorce I a II. Podle uvedeného vynálezu bylo zjištěno, že 4,5-dihydrogeldanamycin a jeho hydrochinon je možno získat fermentací *Streptomyces hygroscopicus*, ATCC 55256, což je mikroorganismus, o kterém předtím nebylo známo, že produkuje sloučeniny podle uvedeného vynálezu. U tohoto 4,5-dihydrogeldanamycinu bylo rovněž prokázáno, že představuje velice vhodnou látku pro léčení proliferčních poruch, zejména rakoviny, u savců a zejména u lidí. U tohoto 4,5-dihydrogeldanamycinu se rovněž předpokládá, že představuje vhodnou látku pro léčení určitých gram-positivních a gram-negativních bakteriálních infekcí, a dále že představuje vhodný viricidní prostředek a rovněž herbicidní prostředek projevující antifungální a antiprotozoální vlastnosti. Vzhledem k tomu, že tato sloučenina rovněž projevuje imunosupresivní vlastnosti, je

možno předpokládat, že je vhodná pro léčení různých autoimunitních onemocnění, včetně revmatické artritidy a onemocnění z reakce štěpu proti hostiteli, přičemž ovšem použití výše uvedené látky není omezeno těmito příkladnými aplikacemi.

Uvedený hydrochinon 4,5-dihydrogeldanamycinu představuje novou sloučeninu, kterou je možno izolovat z přírodních zdrojů nebo je možno ji připravit chemickým syntetickým postupem. Uvedený hydrochinon je možno izolovat z fermentačního prostředí *Streptomyces hygroscopicus* v podstatě stejným způsobem jako je izolován geldanamycin a 4,5-dihydrogeldanamycin. Tento hydrochinon je možno rovněž chemicky připravit syntetickým způsobem redukcí 4,5-dihydrogeldanamycinu chemickým redukčním činidlem. Předpokládá se, že tento hydrochinon 4,5-dihydrogeldanamycinu představuje vhodnou látku použitelnou proti stejným všem uvedeným onemocněním uvedeným výše v souvislosti se 4,5-dihydrogeldanamycinem. Uvedený vynález se týká nového postupu přípravy 4,5-dihydrogeldanamycinu a 4,5-dihydrogeldanamycinhydrochinonu z přírodního zdroje, zejména za použití *Streptomyces hygroscopicus*, ATCC 55256, přičemž do rozsahu uvedeného vynálezu rovněž náleží nová možnost použití těchto sloučenin podle vynálezu. Do rozsahu uvedeného vynálezu rovněž náleží nový chemický syntetický způsob přípravy uvedeného hydrochinonu ze 4,5-dihydrogeldanamycinu.

Streptomyces hygroscopicus, NRRL 3602, který je rovněž označován číslem FD 29068 ve sbírce kultur Pfizer, byl uložen podle Budapeštské dohody ve sbírce American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, což je mezinárodně uznaná sbírka pro permanentní ukládání kultur a jejich

přístup pro veřejnost, v případě, že je na přihlášku vynálezu udělen patent. Tento mikroorganismus zde byl uložen pod označením ATCC 55256. Tento uložený mikroorganismus je zde přístupný veřejnosti během řízení o této přihlášce vynálezu tomu, kdo je k tomu oprávněn zmocněncem patentového úřadu Spojených států amerických (Commissioner of the United States Patent and Trademark Office) podle 37 CFR 1.14 a 35 USC 122 a podle ustanovení zahraničních patentových zákonů v zemích, ve kterých byly podány analogické patentové přihlášky nebo jejich následné patentové přihlášky. Veškeré překážky týkající se přístupnosti tohoto uloženého mikroorganismu veřejnosti budou neodvolatelně odstraněny 2. června 1993 nebo po udělení patentu, jestliže nastane dříve.

Sloučeniny vzorce I a II představují přírodní produkty, které je možno izolovat z fermentačního prostředí *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 55256. Způsob propagace *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 55256 za účelem získání 4,5-dihydrogeldanamycinu a jeho hydrochinonu je stejný jako způsob propagace tohoto mikroorganismu při získávání geldanamycinu. Tato metoda propagace představuje standardní metodu, která je popisována například v patentu Spojených států amerických č. 3 595 955, který je zde uváděn pouze jako odkazový materiál. Tento mikroorganismus *Streptomyces hygroscopicus*, ATCC 55256, představuje kulturu, kterou je možno pěstovat při teplotě v rozmezí od 24 do 36 °C a za submerzních podmínek za míchání a aerace v prostředí obsahujícím zdroje uhlikatých látek, jako jsou například cukry, škroby a glycerol, dále zdroje organického dusíku, jako je například sojová moučka, kasaminové kyseliny a kvasnicový extrakt, dále růstové látky, jako je například obilní extrakt, rybí moučka, moučka z bavlníkových semen,

a dále minerální soli obsahující stopové prvky, jako jsou například železo, kobalt, zinek, atd. Inokulum se připraví stíráním vegetativních buněk ze šikmého agarů inokulovaného kulturou ATCC 55256. Vhodným pevným médiem pro počáteční růst na šikmém agaru je ATCC č. 172, jehož komponenty jsou uvedeny dále :

ATCC # 172	gramy/litr
glukóza	10
rozpustný škrob	20
kvasnicový extrakt	5
*NZ Amine A	5
uhličitan vápenatý	1
agar	20

* přídavek destilované vody do 1000 mililitrů a úprava pH na 7,0 za pomoci hydroxidu draselného KOH;

*NZ Amine A představuje chráněnou značku výrobku firmy Kraft, Inc. Product of Quest International (Sheffield Products).

Kultivace *Streptomyces hygroscopicus*, ATCC 55256, a izolování sloučenin vzorce I a II se provádí podobným způsobem jako je postup používán u předchozích fermentací podle dosavadního stavu techniky, při kterých se připravuje geldanamycin. V tomto směru je možno poukázat na patent Spojených států amerických č. 3 595 955. Kultivace ve výhodném provedení probíhá ve vodném živném prostředí za submerzních aerobních podmínek a za míchání při teplotě 24 °C až 36 °C. Vhodné živné médium pro kultivaci obsahuje zdroj asimilovatelného uhlíku, jako jsou například cukry, škroby a glycerol, dále zdroj organického dusíku, jako je například sojová moučka, kasaminové kyseliny a kvasnicový extrakt, a dále zdroj růstových látek, jako je například obilní extrakt, rybí moučka a moučka z bavlníkových semen,

a rovněž tak i minerální soli, jako je například chlorid sodný a stopové prvky, jako je například železo, kobalt, měď a zinek. Rovněž se používají pro tyto účely pufrы, jako je uhličitan vápenatý a fosfáty. V případě, že během fermentace dochází k nadměrnému pění, je možno do fermentačního prostředí přidávat protipěníci přísady a rovněž tak i rostlinné oleje nebo silikony. Aerace tohoto média v submerzních fermentorech se ve výhodném provedení podle vynálezu provádí za podmínek zahrnujících asi 1/2 objemu až 2 objemy sterilního volného vzduchu na jeden objem fermentačního média za minutu, který je vřáněn do tohoto prostředí pomocí rozptylovacího zařízení. Míchání je možno provádět za pomoci běžných míchadel, které jsou obecně známy pracovníkům zběhlým v oboru fermentační techniky. Rychlost míchání závisí na typu použitého míchadla. Při použití třepaček se obvykle používá 150 až 200 cyklů za minutu, přičemž v případě fermentorů se obvykle používá 300 až 1700 otáček za minutu. Během přenosu mikroorganismu a při jeho pěstování je nutno samozřejmě udržovat aseptické podmínky.

Inokulum pro přípravu těchto antibiotik podle uvedeného vynálezu je možno získat za použití narostlých buněk ze šikmého agaru této kultury nebo z Rouxových lahví inokulovaných touto kulturou. Pevným médiem, které je vhodné pro počáteční růst tohoto mikroorganismu na šikmém agaru a v Rouxových lahvích je ATCC médium č. 172. Tento nárůst je možno použít k inokulování jak třepaček tak i inokulačních fermentorů nebo je možno tyto inokulační fermentory zaočkovat z uvedených třepaček. Nárůst v těchto třepačkách je možno všeobecně dosáhnout během maximálně 4 až 5 dnů, přičemž nejvýhodnější perioda pro inokulum v submerzních fermentorech je obvykle v rozmezí 2 až 3 dnů.

Ve fermentačním médiu se společně s uvedenými látkami produkuje nigercin a elaiophilin, které jsou aktivní vůči gram-pozitivním a negativním mikroorganismům, přičemž produkce těchto látek je dobrým indikátorem růstu souvisícího s produkcí 4,5-dihydrogeldanamycinu. Vzhledem k výše uvedenému je tedy možno biologickou aktivitu fermentačního prostředí monitorovat biologickým testem média, při kterém se používá sensitivní druh *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P nebo *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Pro tyto účely je možno použít standardní destičkovou testovací metodu, při které je zóna inhibice obklopena kotoučem filtračního papíru nasyceného médiem, které se používá pro měření antibiotické účinnosti. Pro detekci uvedených antibiotik produkovaných ve fermentačním médiu a pro analýzu směsi surových a vyčištěných látek extrahovaných z tohoto fermentačního média je možno rovněž vhodně použít chromatografickou analýzu v tenké vrstvě, při které se použije silikagelu. K vyvolání chromatogramů se použije ethylesteru kyseliny octové, přičemž sloučeniny představující uvedená antibiotika je možno vizuálně prokázat postříkem vanilinovým reakčním činidlem a zahřátím na chromatografické desce v tenké vrstvě při teplotě 80 °C. Vyvolanou desku je možno překrýt agarem naočkovaným buďto *S. aureus* nebo *B. subtilis* a potom inkubovat při teplotě 37 °C po dobu 16 hodin, čímž se vizuálně prokáže přítomnost uvedených antibiotik.

Sloučeniny vzorce I a II vyrobené podle uvedeného vynálezu fermentací *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 55256, je možno oddělit a získat běžnými metodami známými z dosavadního stavu techniky, jako je například extrakce celého pořídu nefiltrovaného fermentačního média organickým rozpouštědlem, jako je například chloroform, ethylester

kyseliny octové, methylisobutylketon nebo butanol při přirozeně se vyskytující hodnotě pH. V alternativním provedení je možno mycelium oddělit po dokončení nárůstu a toto mycelium potom extrahovat organickým rozpouštědlem. Takto získaný rozpouštědlový extrakt je potom možno zkoncentrovat na řídký sirup, přičemž čisté antibiotikum se získá chromatografickým postupem.

Typický postup oddělování a získávání sloučenin vzorce I a II je možno provést následujícím způsobem. Celý podíl živného média z fermentace *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 55256 se extrahuje methylisobutylketonem. Použité rozpouštědlo se odpaří, přičemž se získá řídký sirup. Tento sirup se potom rozpustí v methylenchloridu a potom se nanese na silikagel jako náplň kolony a provede se eluování s gradientem od čistého methylenchloridu k čistému ethylesteru kyseliny octové. Takto získané eluáty se analyzují chromatografickou metodou v tenké vrstvě. Frakce obsahující sloučeninu I se spojí a odpaří do sucha. Rovněž frakce obsahující sloučeninu II se spojí a odpaří do sucha. Takto získané produkty je možno dále přečistit v případě potřeby krystalizací nebo chromatografickým postupem v koloně.

O sloučeninách vzorce I a II je možno předpokládat, že jsou vhodné proti určitému druhu plísňových patogenů na rostlinách, proti gram-positivním a negativním bakteriím a proti určitým druhům parazitických mikroorganismů. 4,5-Dihydrogeldanamycin a jeho hydrochinon je možno testovat pokud se týče použití na účinek vůči výše uvedeným mikroorganismům za použití metody uvedené v patentu Spojených států amerických č. 3 595 955.

- 10 -

Sloučenina vzorce I rovněž inhibuje růst určitých lidských rakovinných buněk. Účinnost in vitro tohoto 4,5-dihydrogeldanamycinu byla provedena metodou podle M.C. Alleye a kol. Cancer Research 48, 589-601, 1.únor 1989, a za použití buněčných linií SKBR3 a MCF7. Z těchto testů vyplývá, že 4,5-dihydrogeldanamycin je částečně vhodný pro léčení rakoviny u lidí, a zejména rakoviny prsu, vaječníku a žaludku. O sloučenině vzorce II se rovněž předpokládá, že je vhodná pro stejné účely.

4,5-Dihydrogeldanamycin má rovněž silný imunosupresivní účinek, což bylo zjištěno a potvrzeno za použití metod běžně známých z dosavadního stavu techniky. Tuto účinnost je možno běžným způsobem stanovit: odhadem inhibice proliferace T-buněk stimulované IL-2 a forbol-12-myristát-13-acetátem (PMA), což se stanoví na základě zmenšení absorpce tritiem zpracovaného thymidinu v porovnání s kontrolními vzorky neošetřenými tímto léčivem. O sloučenině vzorce II se rovněž předpokládá, že má imunosupresivní účinky.

V případě, že se sloučeniny vzorce I nebo II použijí jako antiproliferační činidla, například jako protirakovinová činidla, potom je možno je podávat lidskému jedinci buďto samotná nebo ve výhodném provedení podle vynálezu v kombinaci s farmaceuticky přijatelnými nosičovými látkami nebo ředidly ve formě farmaceutických prostředků, připravených podle standardní farmaceutické praxe. Tyto sloučeniny je možno podávat orálně nebo parenterálně. Do parenterálního podávání náleží intravenózní, intramuskulární, intraperitoneální, subkutánní a místní podávání.

V případě orálního použití je možno sloučeniny vzorce I nebo II podle uvedeného vynálezu podávat ve formě tablet nebo kapslí nebo jako vodné roztoky nebo suspenze. V případě tablet pro orální použití se obvykle používají nosičové materiály, mezi které je možno zařadit laktózu a kukuřičný škrob, a dále maziva, jako je například stearát hořečnatý. V případě orálního podávání těchto látek ve formě kapslí jsou vhodnými ředícími látkami laktóza a sušený kukuřičný škrob. V případě, že se pro orální použití používají suspenze, potom se účinná látka kombinuje s emulgačními a suspenzačními činidly. V případě potřeby je možno přidávat sladidla a/nebo aromatizační přísady. V případě intramuskulárního, intraperitoneálního, subkutánního a intravenózního podávání se obvykle připraví sterilní roztoky účinné látky, přičemž se vhodně upraví hodnota pH tohoto roztoku a dále se provede úprava puřem. V případě intravenózního podávání se celková koncentrace rozpuštěných látek kontroluje v tom smyslu, aby bylo dosaženo isotonického přípravku.

V případě farmaceutického prostředku obsahujícího sloučeninu vzorce I nebo II se hmotnostní poměr nosičové látky k účinné látce obvykle pohybuje v rozmezí od 1 : 10 do 10 : 1. Ovšem v daném konkrétním případě bude zvolený poměr záviset na takových faktorech jako je rozpustnost účinné látky, uvažovaná dávka a přesný způsob podávání.

V případě, že se sloučenina vzorce I nebo II použije u lidí, potom se denní dávka určí obvyklým způsobem lékařem. Tato dávka se mění podle stáří, hmotnosti a reakce na podávané léčivo podle konkrétního pacienta, a kromě toho je třeba brát v úvahu intenzitu symptomů onemocnění projevující se u daného pacienta a účinnost jednotlivé podávané

sloučeniny. V mnoha případech se ovšem účinná dávka bude pohybovat podle potřeby v rozmezí od 0,01 gramu do 0,5 gramu (jako například každé čtyři hodiny až šest hodin). V případě chronického podávání se ve většině případů bude účinná dávka pohybovat v rozmezí od 0,01 do 1,0 gramu za den, a ve výhodném provedení podle vynálezu v rozmezí od 20 do 250 miligramů za den, ve formě jednotlivé dávky nebo ve formě rozdělených dávek. Na druhé straně může být v některých případech nezbytné použít dávek, které leží mimo uvedené rozmezí.

Příklady provedení vynálezu

V následujícím jsou uvedeny konkrétní příklady postupu podle uvedeného vynálezu a použití těchto sloučenin podle vynálezu, přičemž tyto příklady jsou uvedeny pouze z ilustrativních důvodů a nijak neomezuji rozsah uvedeného vynálezu.

P ř í k l a d 1

1. Příprava inokula.

Podle tohoto provedení bylo jako pevného média, vhodného pro počáteční růst na šikmém agaru a v Rouxových lahvích, použito média ATCC č. 172. Do 300 mililitrových třepaček bylo vloženo 100 mililitrů média, přičemž potom byly tyto láhve sterilizovány při teplotě 120 °C a tlaku 103,425 kPa po dobu 30 minut. Po ochlazení bylo toto médium inokulováno suspenzí vegetativních buněk *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 55256, přičemž tato kultura narostla na médiu ATCC agar č. 172. Tyto lahve byly potom protřepávány při teplotě 28 °C na třepačce s posunem 3,81 centimetru až

6,35 centimetru a se 150 až 200 cykly za minutu (CPM) po dobu 3 až 5 dní.

Protřepávací lahve byly připraveny za použití následujícího média :

JDYTT	gramy/litr
cereloza	10
kukuřičný škrob	5
kukuřičný výluh	5
NZ Amine YTT	5
chlorid kobaltnatý	0,002
uhličitan vápenatý	3

úprava pH na 6,9-7,1

C'	gramy/litr
cereloza	10
sojová moučka	10
kukuřičné fermentační produkty	5
kukuřičný škrob	10
chlorid sodný	5
chlorid kobaltnatý	0,002
uhličitan vápenatý	1

úprava pH na 7,0-7,2

2. Fermentace a izolování 4,5-dihydrogeldanamycinu.

K inokulování pětilitrové fermentační nádoby obsahující tři litry jednoho z dále uvedených médií byla použita jedna protřepávací nádoba.

HERB-F

gramy/litr

cereloza	25
síran amonný	5
sojová moučka	10
kvasničný extrakt	2,5
chlorid draselný	4
masný extrakt	1
chlorid kobaltnatý	0,002
uhličitan vápenatý	3

úprava pH na 7,1-7,3

HERB-F2

gramy/litr

cereloza	10
kukuřičný škrob	40
moučka z bavlněných semen	4
chlorid kobaltnatý	0,002
uhličitan vápenatý	6
pivovarské kvasnice	2
chlorid sodný	2
síran hořečnatý . 7H ₂ O	0,5
dušičnan amonný	2

MACB-M

gramy/litr

glycerol	10
kvasničný extrakt	10
dusičnan sodný	2
chlorid kobaltnatý	0,002
síran hořečnatý · 7H ₂ O	0,50
dihydrogenfosforečnan draselný	1
chlorid draselný	0,5
síran železnatý	0,01

úprava pH na 6,9-7,2

Do každé nádoby bylo potom přidán 1 mililitr P2000 (silikon), což je protipěnicí přísada, přičemž potom byly nádoby utěsněny a sterilizovány při teplotě 120 °C a tlaku 103,425 kPa po dobu jedné hodiny. Potom byly nádoby inokulovány jednou lahví (asi 3 % inokula), přičemž fermentování bylo prováděno po dobu 72-120 hodin při teplotě 28 °C a potom bylo prováděno promíchávání při 1700 otáčkách za minutu a za použití přívodu vhaněného vzduchu odpovídajícímu množství jeden objem vzduchu na jeden objem kapaliny za minutu.

Bioaktivita média a následných získaných podílů byla stanovena za použití senzitivního kmene *Bacillus subtilis* ATCC 6633 nebo *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. Složky média a oddělených podílů byly vizuálně vyhodnoceny za použití silikagelových destiček a následujícího systému : čistý ethylester kyseliny octové. Vyvolané destičky byly postříkány vanilinovým reakčním činidlem (3 gramy vanilinu rozpuštěné v 75 mililitrech ethanolu, náčež bylo provedeno zředění na 100 mililitrů pomocí 85 %-ní kyseliny fosforečné) a potom byly zahráty na teplotu 80 °C. Stanovovaná

antibiotika se projevila svým tmavě modrým až purpurovým zbarvením. Vyvolané chromatografické destičky s tenkou vrstvou (TLC-destičky) byly rovněž vizuálně vyhodnoceny pozorováním v tmavém boxu pod světlem o vlnové délce 254 μm . Po dokončení fermentace byly fermentory zastaveny. Celý podíl média byl potom extrahován 1/3 objemu methylišobutylketonu při dané hodnotě pH média, potom bylo provedeno oddělení na DeLavalově separátoru a rozpouštědlová fáze byla zkoncentrována za použití vakua za vzniku oleje. Tento olej byl potom podroben protiproudému zpracování ve třech trubicích za použití hexanu a acetonitrilu v poměru 10 : 1. Spodní fáze (CH_3CN) obsahující 4,5-dihydrogeldanamycin a jeho hydrochinon byla oddělena, spojena a zkoncentrována za použití vakua. Takto získaný zbytek byl potom opětně rozpuštěn v methylenchloridu, zpracován za použití látky Darco G50 (což je aktivní uhlík), zfiltrován a zkoncentrován. Takto získaný koncentrát v methylenchloridu byl potom nanesen do kolony Waters Prep 500 na náplň silikagelu, načež potom bylo provedeno zpracovávání gradientovou elucí od čistého methylenchloridu k čistému ethylesteru kyseliny octové. Frakce obohacené 4,5-dihydrogeldanamycinem, $R_f=2,5-3$ při poměru $\text{CHCl}_3/\text{aceton}$ 9 : 1, byly spojeny a podrobeny opakovanému chromatografickému zpracování dokud nebyl izolován čistý 4,5-dihydrogeldanamycin. Takto získaný 4,5-dihydrogeldanamycin byl potom krystalován z horkého isopropyléteru a potom byl sušen ve vakuové peci při teplotě 50 °C po dobu přes noc. Teplota tání tohoto produktu byla v rozmezí od 221 do 222 °C.

Frakce obohacené na hydrochinon, $R_f=1-1,5$ při poměru $\text{CHCl}_3/\text{aceton}$ 9 : 1, to znamená sloučeninu vzorce II, byly spojeny a podrobeny opakovanému chromatografickému

zpracování dokud nebyl získán čistý hydrochinon.

P ř í k l a d 2

Chemická syntéza 4,5-dihydrogeldanamycinhydrochinonu.

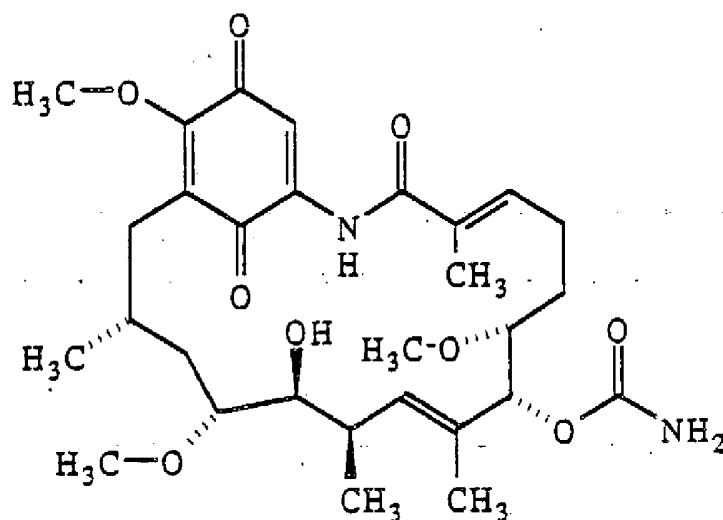
Podle tohoto provedení byl reakční postup proveden tak, že bylo smícháno 10 gramů hydrosiřičitanu sodného, rozpuštěného ve 100 mililitrech vody se 100 mililitry ethylesteru kyseliny octové, přičemž k takto získanému roztoku bylo přidáno 200 gramů 4,5-dihydrogeldanamycinu. Získaná reakční směs byla chromatograficky zpracována v tenké vrstvě na použití silikagelových destiček Analtech a jako elučního systému bylo použito čistého ethylesteru kyseliny octové. Reakce byla potom pozorována pod ultrafialovým světlem (254 μ l) a produkt byl postříkán vanilinem. Reakce byla téměř kompletní v intervalu 20 minut.

Vodná vrstva byla potom extrahována dvakrát ethylesterem kyseliny octové. Potom byla rozpouštědlová vrstva zpětně extrahována fosfátovým pufrem o hodnotě pH 7,0. Použitá rozpouštědlová fáze byla potom usušena za použití bezvodého síranu sodného Na_2SO_4 a potom bylo provedeno zkoncentrování na pryskyřicovitý materiál.

Získaný zbytek byl potom vložen do isopropyléteru (IPE), roztok byl zahřát k varu a potom bylo prováděno míchání po dobu 3 hodin. Isopropyléterový roztok byl zfiltrován a pevná látka byla usušena na filtru. Usušený 4,5-dihydrogeldanamycin byl udržován v pouzdru pod vakuem při teplotě 50 °C.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob přípravy sloučeniny vzorce I :



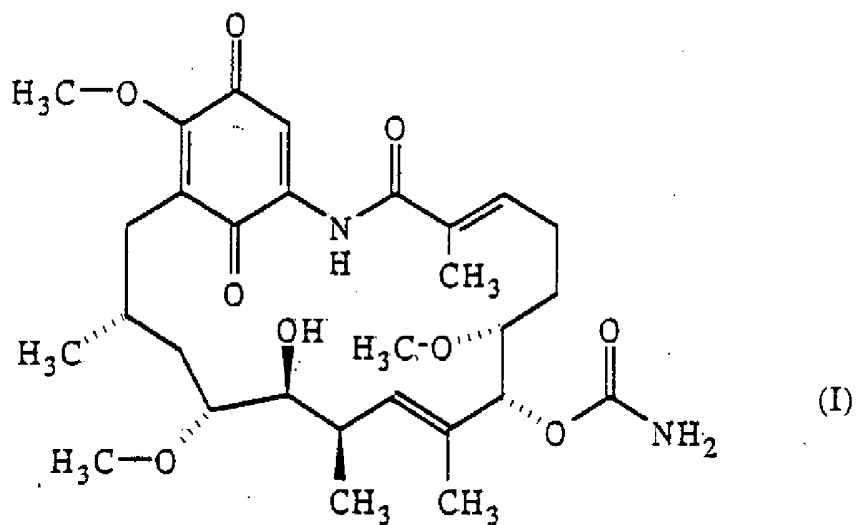
PRIL
PROVNÁLEZY A OBJEVY
ÚŘAD
28 XII 92
doslo
072443
27

(I)

vyznačující se tím, že zahrnuje stupně :

- (a) propagace mikroorganismu *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 55256 ve vodném živném médiu za submerzních aerobních podmínek, přičemž toto živné médium obsahuje zdroj uhlikatých látek, zdroj organického dusíku, růstové látky a minerální soli obsahující stopové prvky, a
- (b) izolování sloučeniny vzorce I.

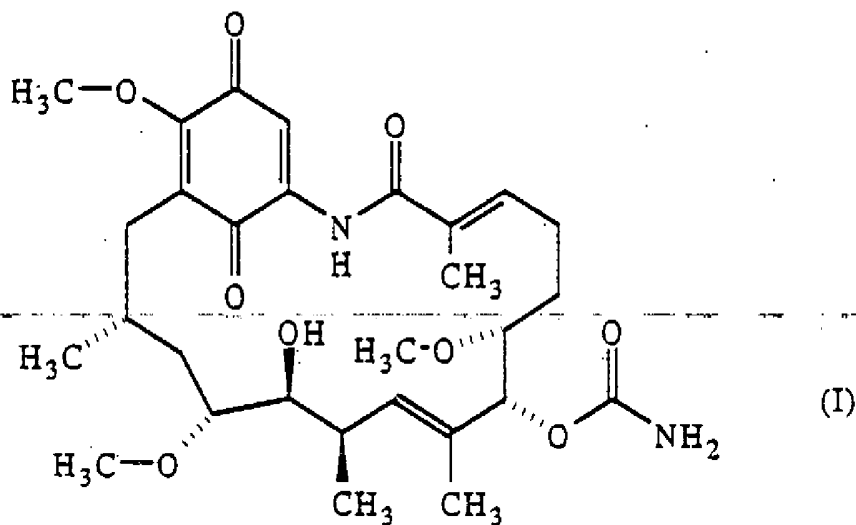
2. Farmaceutický prostředek vhodný pro léčení proliferčních poruch u savců, vyznačující se tím, že obsahuje farmaceuticky přijatelnou nosičovou látku nebo ředidlo a jako účinnou složku sloučeninu obecného vzorce I



v množství k léčení této proliferační poruchy.

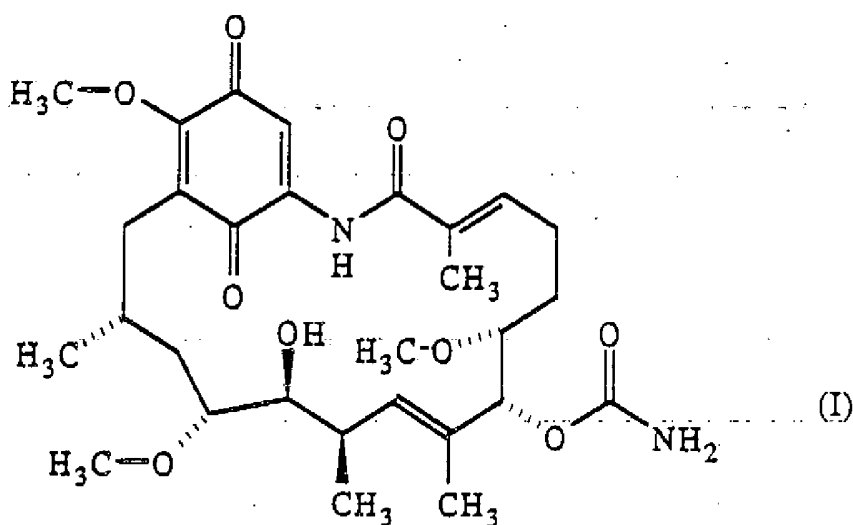
3. Farmaceutický prostředek podle nároku 2, vyznačující se tím, že uvedenou proliferační poruchou je rakovina prsu, vaječníku nebo žaludku u lidí.

4. Farmaceutický prostředek vhodný pro léčení autoimunitních onemocnění u savců, vyznačující se tím, že obsahuje farmaceuticky přijatelnou nosičovou látku nebo ředidlo a jako účinnou složku sloučeninu vzorce I



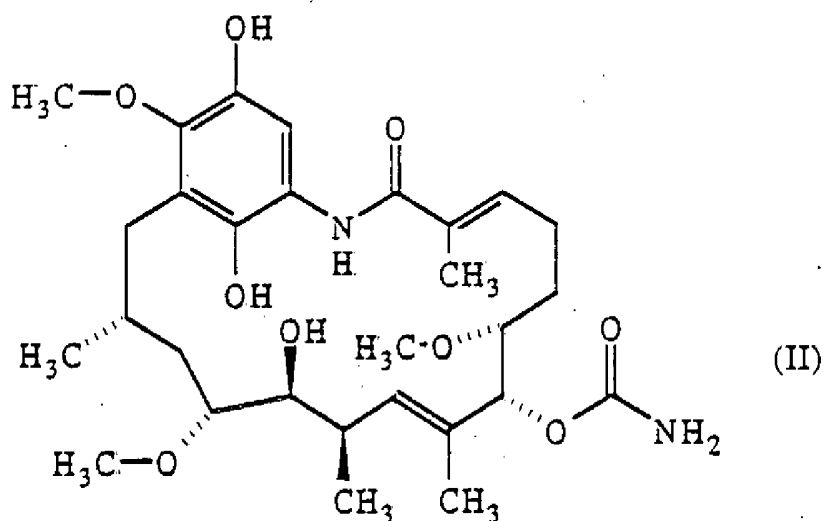
v množství k léčení tohoto autoimunitního onemocnění.

5. Farmaceutický prostředek vhodný pro léčení bakteriálních, virových, fungálních nebo protozoálních infekcí u lidí, vyznačující se tím, že obsahuje farmaceuticky přijatelnou nosičovou látku nebo ředidlo a jako účinnou látku sloučeninu vzorce I



v množství k léčení této bakteriální, virové, fungální nebo protozoální infekce.

6. Sloučenina vzorce II



7. Způsob přípravy sloučeniny vzorce II podle nároku 6, vyznačující se tím, že zahrnuje stupně :

- (a) propagace mikroorganismu *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 55256 ve vodném živném médiu za submerzních aerobních podmínek, přičemž toto živné médium obsahuje zdroj uhlikatých látek, zdroj organického dusíku, růstové látky a minerální soli obsahující stopové prvky, a
- (b) izolování sloučeniny vzorce II.

8. Farmaceutický prostředek vhodný pro léčení proliferčních poruch u savců, vyznačující se tím, že obsahuje farmaceuticky přijatelnou nosičovou látku nebo ředidlo a sloučeninu podle nároku 6 v množství k léčení této proliferční poruchy.

9. Farmaceutický prostředek vhodný pro léčení autoimunitních onemocnění u savců, vyznačující se tím, že obsahuje farmaceuticky přijatelnou nosičovou látku nebo ředidlo a sloučeninu podle nároku 6 v množství k léčení

tohoto autoimunitního onemocnění.

10. Farmaceutický prostředek vhodný pro léčení bakteriálních, virových, fungálních nebo protozoálních infekcí v savců, vyznačující se tím, že obsahuje farmaceuticky přijatelnou nosičovou látku nebo ředidlo a sloučeninu podle nároku 6 v množství k léčení této bakteriální, virové, fungální nebo protozoální infekce.

Zastupuje:-

Dr. Pavel Zelený