PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:
2002 - 2826

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
C 07 H 17/04
A 61 K 31/7048
A 61 P 35/00
A 61 P 35/02
A 61 P 31/10
A 61 P 31/04

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **15.02.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **18.02.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/00103540**

(33) Země priority: **EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.11.2002**
(Věstník č. 11/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/EP01/01660**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/060832**

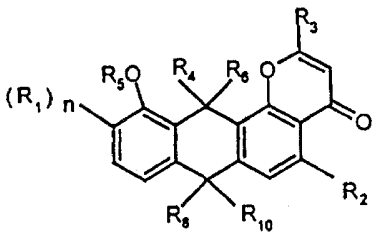
(71) Přihlašovatel:
AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH, Frankfurt, DE;

(72) Původce:
Vertesy Laszlo, Eppstein-Vockenhausen, DE;
Ehrlich Klaus, Rüsselsheim, DE;
Knauf Martin, Frankfurt, DE;
Wink Joachim, Rödermark, DE;
Barbone Francis P., Annandale, NJ, US;
Powers Elaine A., High Bridge, NJ, US;
Cashman Elizabeth A., Bridgewater, NJ, US;

(74) Zástupce:
Kubát Jan Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Pluraflaviny a jejich deriváty, způsob jejich přípravy a jejich použití



(57) Anotace:

Sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém R_1 je zbytek cukru, R_2 je karboxylová skupina nebo skupina $-CH_2-O-(R_7)_m$, ve které R_7 je zbytek cukru, R_3 je ze skupiny zahrnující epoxidový zbytek, alkylové nebo alkenylové skupiny s až 6 atomy uhlíku, kde tyto skupiny jsou případně substituovány, R_5 zahrnuje atom vodíku, alkylovou, alkenylovou a alkynylovou skupinu s až 6 atomy uhlíku, R_4, R_6, R_8 a R_{10} jsou atom vodíku, alkylová, alkenylová, alkynylová skupina s až 6 atomy uhlíku, skupina $-X_2H$, a skupina $-X_2R_{12}$, nebo R_4 a R_6 dohromady a/nebo R_8 a R_{10} dohromady tvoří substituent $=X_2$, X_2 je atom kyselíku, skupiny NH, N-alkyl, N-alkenyl, N-alkynyl s až 6 atomy uhlíku nebo atom síry, R_{12} je alkylová, alkenylová, alkynylová skupina s až 6 atomy uhlíku, arylová skupina nebo acylová skupina a m a n, jsou na sobě nezávisle 1 nebo 2 a jejich fyziologicky použitelné sole. Sloučeniny se připraví fermentací kultury mikroorganismu Actinomycetales druhu HAG 003959, DSM 12931. Je popsán též způsob přípravy a použití sloučenin jako protinádorových léčiv.

CZ 2002 - 2826 A3

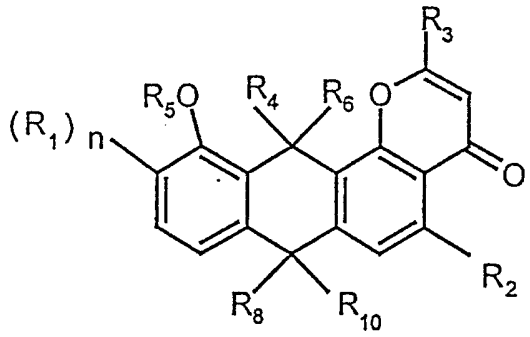
PV2002-2826
19.08.02

180 809/KB

Pluraflaviny a jejich deriváty, způsob jejich přípravy a jejich použití

Oblast techniky

Vynález se týká nových sloučenin obecného vzorce I



(I)

ve kterém R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_8, R_{10} a n mají význam uvedený níže. Sloučeniny obecného vzorce I inhibují trankriptázu, mají cytostatické účinky a jsou zejména vhodné pro léčení nádorů. Sloučeniny obecného vzorce I se mohou získat růstem Actinomycetales druhů HAG 003959, DSM 12931, v živném mediu. Vynález se tedy také týká způsobu přípravy sloučenin obecného vzorce I, použití sloučenin pro přípravu farmaceutických prostředků pro léčení maligních poruch a onemocnění, které se mohou léčit inhibicí transkriptázy a farmaceutických prostředků, které obsahují alespoň jednu sloučeninu obecného vzorce I.

Dosavadní stav techniky

19.08.02

Rakovina je onemocnění lidí a zvířat, které je v převážné části smrtelné a které je obecně způsobené nekontrolovatelným růstem endogenních buněk. Rakovina je výraz používaný pro tvorbu maligních nádorů (zhoubné nádory), novotvarů (nádory nebo zhoubné nádory) nebo pro zhoubnou degeneraci a dysmaturitu bílých krevních buněk (leukemie). Rakovinné nebo nádorové buňky se obecně tvoří transformací endogenních buněk. Zhoubnost nádorových buněk se sama vyjadřuje v autonomním růstu, to je v jejich schopnosti nevázaného růstu a bez integrace do systému orgánů a infiltraci spolu s destrukcí tkání. Jistý znak zhoubného nádoru je tvorba metastází daleko od nádoru po hematogenním nebo lymfogenním rozšíření nádorových buněk. Rakovina je jedna z nejčastějších příčin úmrtí u lidí a proto je stále velká poptávka pro metody a látky pro léčení nebo ošetřování zhoubných nádorových degenerací

Kromě radikálního chirurgického přístupu odstraněním nádoru, jsou dalšími možnostmi pro léčení zhoubných nádorů radioterapie použitím X-paprsků, alpha-, beta-, gamma-záření, imunoterapie a chemoterapie. Až dosud je použití imunoterapie omezené. Pod pojmen chemoterapie se rozumí podávání buněčných toxinů (cytostatik) pro léčení nádorů a zbylých nádorových buněk, obvykle po lokálním chirurgickém zákroku nebo ozařování. Tyto látky intervenují specificky s určitými procesy buněčného dělení tak, že tkáně, které mají vysoký poměr dělících se buněk, jako jsou rychleji rostoucí nádorové tkáně, reagují citlivěji Takovými látkami jsou alkylační sloučeniny, jako jsou, například, cyklofosfamid (The Merck Index, 12th Ed. strana 463), antimetabolity, jako je methotrexát (The Merck Index, 12th Ed. strana 1025), alkaloidy, jako je vinkristin (The Merck Index, 12th Ed.

19.08.02

strana 1704) a antibiotika, jako je daunomycin (The Merck Index, 12th Ed. strana 479), a adriamycin (The Merck Index, 12th Ed. strany 581-582). Avšak vzhledem k tomu, že tyto látky mají značné vedlejší účinky a všechny mají nevýhodu v tom, že úmrtí nemocných je možno v mnoha případech pouze oddálit a není možné mu preventivně bránit. Dále, degenerované (rakovinné) buňky se stávají rezistentními na používané látky; a v tomto případě běžné farmaceutické prostředky nemají dále cytostatický účinek, ale jsou toxické a mají vedlejší účinky. Navíc bylo nalezeno, že kombinované a/nebo postupné používání cytostatik převyšuje aktivity jednotlivých cytostatických látek (monoterapie), a je proto možné, že značné vedlejší účinky při polychemoterapii nejsou additivní. Z těchto všech důvodů jsou nová chemoterapeutika naléhavě potřeba a proto se celosvětově stále hledají.

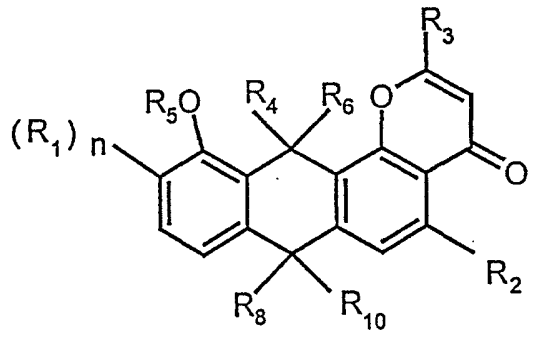
S překvapením bylo nalezeno, ~~že~~ kmen mikroorganismu Actinomycetales druh HAG 003959, DSM 12931, je schopný produkovat vysoce účinné cytostatikum, které inhibuje buněčný růst i ve velmi nízkých koncentracích. Dále zde a níže jsou nové sloučeniny uváděny jako pluraflaviny a tvoří spolu s deriváty pluraflavinu část podstaty vynálezu. Pluraflaviny jsou antibiotika, která obsahují p-chinoidní kruhový skelet a různé cukerné stavební bloky. Inhibují transkripci vložením dvouvláknových řetězců nukleových kyselin a případnou další alkylaci. Kruhový skelet byl poprvé popsán v práci S. Kondo aj. in Journal of Antibiotics, vol. 30, strany 1143-1145, 1977, jako součást pluramycinu. Později byl tento cyklický skelet nalezen v řadě antibotik; navíc k pluramycinu a neopluramycinu, byly ve sloučeninách saptomycinech (N. Abe aj. J. Antibiotics, 46, 1536-1549, 1993), ankinomycinu (Y. Sato aj. J. Antibiotics 42, 149, 1989), kidamycinu (N. Kanda aj. J. Antibiotics, 24, 599, 1971), hedamycinu (U. Sequin aj.

19.08.02

Tetrahedron, 34, 761, 1978) a altromycinech (G. M. Brill aj. J. Antibiotics, 43, 229-237, 1990) nalezeny strukturně příbuzné látky. V předešlém stavu techniky jsou tyto sloučeniny uváděny jako nevýhodné pro jejich nedostatečný účinek, vysokou toxicitu a/nebo pro jejich nežádoucí vedlejší účinky.

Podstata vynálezu

Vynález se týká sloučenin obecného vzorce I



(I)

ve kterém

R_1 je zbytek cukru,

R_2 je karboxylová skupina nebo skupina $-CH_2-O-(R_7)_m$, ve které R_7 je zbytek cukru,

R_3 je substituent vybraný ze skupiny zahrnující skupiny obsahující epoxidový zbytek, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny s 2 až 6 atomy uhlíku, kde tyto alkylové skupiny a alkenylové skupiny jsou případně substituovány alespoň jednou hydroxylovou skupinou,

R_5 je substituent vybraný ze skupiny zahrnující atom vodíku, alkylovou skupinu s 1 až 6 atomy uhlíku, alkenylovou skupinu s 2 až 6 atomy uhlíku a alkynylovou skupinu s 2 až 6 atomy uhlíku,

19.08.02

R_4, R_6, R_8 a R_{10}, jsou substituenty nezávisle na sobě vybrané ze skupiny zahrnující atom vodíku, alkylovou skupinu s 1 až 6 atomy uhlíku, alkenylovou skupinu s 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylovou skupinu s 2 až 6 atomy uhlíku, skupinu $-X_2H$, a skupinu $-X_2R_{12}$, nebo

R_4 a R_6 dohromady a/nebo R_8 a R_{10} dohromady tvoří substituent $=X_2$,

X_2 je atom kyslíku, skupiny NH, N-alkyl s 1 až 6 atomy uhlíku, N-alkenyl s 2 až 6 atomy uhlíku, N-alkynyl s 2 až 6 atomy uhlíku nebo atom síry,

R_{12} je alkylová skupina s 1 až 6 atomy uhlíku, alkenylová skupina s 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylová skupina s 2 až 6 atomy uhlíku, arylová skupina nebo acylová skupina a

m a n, jsou na sobě nezávisle 1 nebo 2,

ve všech jejich stereoisomerních formách a ve směsích těchto forem v libovolných poměrech a jejich fyziologicky použitelných solí.

Ve sloučeninách obecného vzorce I je

alkylová skupina s 1 až 6 atomy uhlíku nerozvětvená nebo rozvětvená alkylová skupina s 1 až 6 atomy uhlíku, například methylová skupina, ethylová skupina, isopropylová skupina, terc-butylová skupina a hexylová skupina,

alkenylová skupina s 12 až 6 atomy uhlíku je nerozvětvená nebo rozvětvená alkenylová skupina s 2 až 6 atomy například allylová skupina, krotylová skupina a pentenylová skupina, a

alkynylová skupina s 1 až 6 atomy uhlíku je nerozvětvená nebo rozvětvená alkynylová skupina s 2 až 6 atomy uhlíku, například, propynylová skupina, butynylová skupina a pentynylová skupina.

19.08.02

Arylová skupina je skupina s aromatickým kruhovým systémem, například fenylová skupina, benzylová skupina nebo 1- nebo 2-naftylová skupina. Arylová skupina může být případně substituována, například atomem halogenu, jako je atom chloru, atom bromu,atom fluoru, alkylovou skupinou s 1 až 4 atomy uhlíku, například methylovou skupinou, hydroxylovou skupinou, alkoxylovou skupinou s 1 až 4 atomy uhlíku a/nebo trifluormethylovou skupinou.

Acylová skupina může být alifatická nebo aromatická acylová skupina. Alifatická acylová skupina má 1 až 7 atomů uhlíku, například 1 až 4 atomy uhlíku, jako je formylová skupina, acetylová skupina, propionylová skupina, butyrylová skupina, hexanoylová skupina, akryloylová skupina, krotonoylová skupina, propioloylová skupina, které mohou být dále substituovány, například, atomem halogenu, jako je atom chloru, atom bromu, atom fluoru, aminoskupinou a/nebo alkylaminoskupinou s 1 až 4 atomy uhlíku, jako je methylaminoskupina nebo ethylaminoskupina. Aromatická acylová skupina může být například benzoylová skupina nebo naftoylová skupina, které mohou být dále substituovány, například atomem halogenu, jako atomem chloru, atomem bromu, atomem fluoru, alkylem s 1 až 4 atomy uhlíku, například methylem, hydroxylovou skupinou aminoskupinou, jako je například ethylaminoskupina nebo alkoxylovou skupinou s 1 až 7 atomy uhlíku, jako s 1 až 4 atomy uhlíku, například methoxyskupinou.

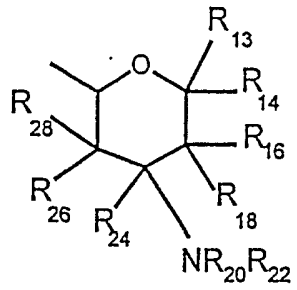
Sacharidem (R_1 / R_7) je monosacharid (n=1) nebo disacharid (n=2), ve kterém dvě monosacharidové jednotky jsou spojeny glykosidickou vazbou. Monosacharidem může být hexosa ($C_6H_{12}O_6$), například aldohexosa, jako je D-(+)-glukosa, D-(+)-mannosa nebo D-(+)-galaktosa. Monosacharidy mohou být mono-, di- nebo tri-substituované, nezávisle na sobě atomem vodíku, hydroxylovou skupinou, aminoskupinou, skupinami NH(alkyl),

19.08.02

$N(alkyl)_2$, alkylovou skupinou a alkoxylovou skupinou, kde atom vodíku a/nebo hydroxylová skupina monosacharidu může být případně nahrazeny substituenty. Pod výrazem „sacharid", jak je zde použit, se také rozumí aminosacharidy. Aminosacharid je monosacharid nebo disacharid, který je případně substituovaný jak je popsáno výše, ve kterém alespoň jedna hydroxylová skupina nebo jeden atom vodíku jsou nahrazeny aminoskupinou, jako je NH_2, NH(alkyl) nebo $N(alkyl)_2$.

V jednom konkretním případě m = 1,

R_7 může být aminosacharid obecného vzorce II



(II)

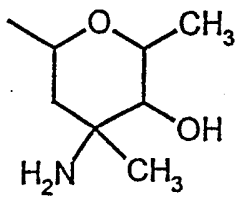
ve kterém

R_{13}, R_{14}, R_{16}, R_{18}, R_{20}, R_{22}, R_{24}, R_{26} a R_{28}, jsou na sobě nezávisle vybrané ze skupiny zahrnující atom vodíku, hydroxylovou skupinu, aminoskupinu, skupiny NH(alkyl), $N(alkyl)_2$ a alkoxylovou skupinu, kde alkylové skupiny a alkoxylové skupiny mají od 1 do 4 atomů uhlíku.

Příklady alkylových skupin s 1 až 4 atomy uhlíku jsou, například, methylová skupina, ethylová skupina, propylová skupina, isobutylová skupina a butylová skupina, zejména methylová skupina a příklady alkoxylových skupin s 1 až 4 atomy uhlíku jsou, například, methoxylová skupina, ethoxylová skupina, isopropoxylová skupina nebo butoxylová skupina zejména methoxylová skupina.

R_7 může být aminosacharid vzorce IIA:

19.08.02

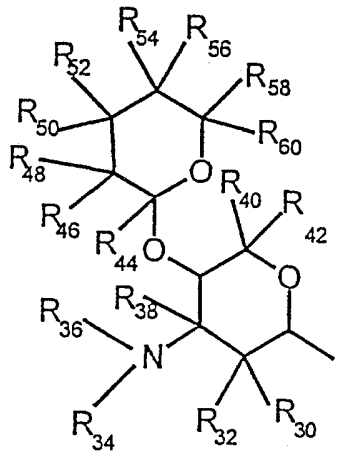


(IIA)

R_1 může také být aminosacharid.

V jednom konkrétním případě n = 2.

R_1 může být skupina obecného vzorce III



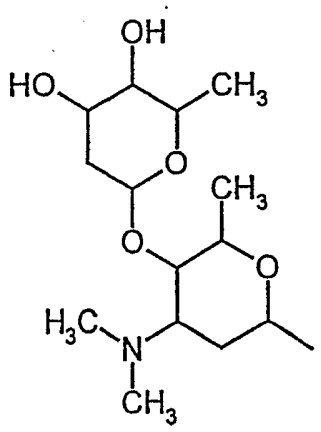
(III)

ve kterém

R_{30} až R_{60}, jsou na sobě nezávisle atomy vodíku, hydroxylové skupiny, aminoskupiny, skupiny NHalkyl, $N(alkyl)_2$, nebo alkoxylové skupiny, kde alkylové skupiny obsahují 1 až 4 atomy uhlíku, jako je methylová skupina, ethylová skupina, propylová skupina, isobutylová skupina a butylová skupina, zejména methylová skupina, a O-alkyl je alkoxylová skupina s 1 až 4 atomy uhlíku, například, methoxylová skupina, ethoxylová skupina, isopropoxylová skupina nebo butoxylová skupina, zejména methoxylová skupina.

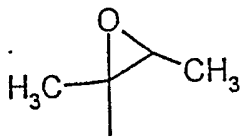
R_1 v jednom konkretním případě má vzorec IIIA

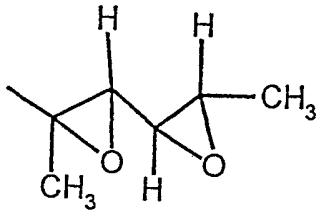
19.08.02



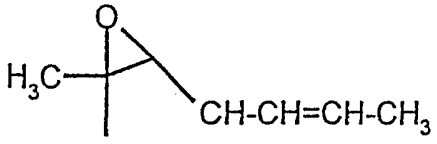
(IIIA)

R_3 může být skupinou obsahující epoxid. Skupina obsahující epoxid může být nerozvětvená nebo rozvětvená alkenylová skupina s 2 až 12 atomy uhlíku, jako je s 2 až 6 atomy uhlíku, která obsahuje jeden až dva epoxidové kruhy (oxirany). Možnými příklady jsou:





a



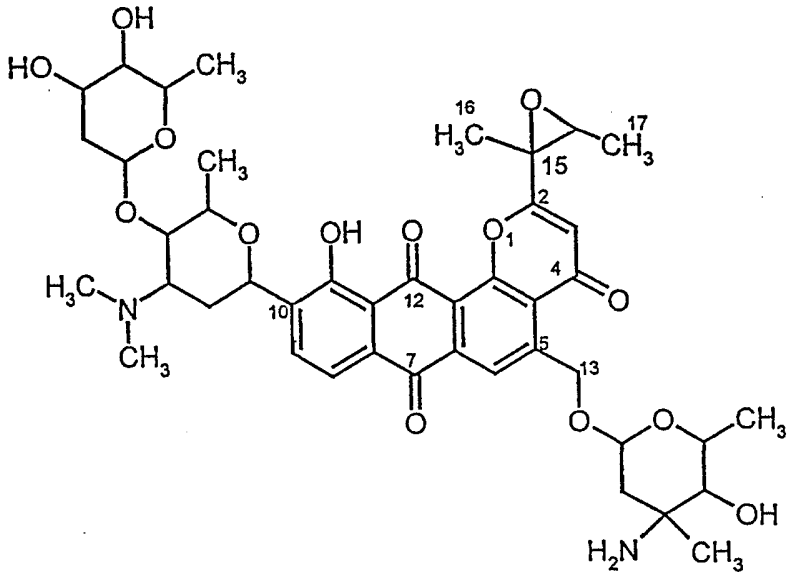
Jiná než epoxydovou skupinu obsahující skupina R_3 může být nerozvětvená nebo rozvětvená alkylová skupina s 1 až 12 atomy uhlíku, jako je alkylová skupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku, například, methylová skupina, ethylová skupina, isopropylová skupina, terc-butylová skupina, hexylová skupina,

19.08.02

a také, například, oktylová skupina, dodecylová skupina, nebo nerozvětvená nebo rozvětvená alkenylová skupina s 2 až 12 atomy uhlíku, jako s 2 až 6 atomy uhlíku, například, allylová skupina, krotylová skupina, pentenylová skupina, a také dodecenylová skupina, kde alkylové skupiny a alkenylové skupiny mohou být také monosubstituovány nebo polysubstituovány, například hydroxylovou skupinou.

Vynález se podle toho týká pluraflavinu A vzorce IA

Hexosa I



(IA)

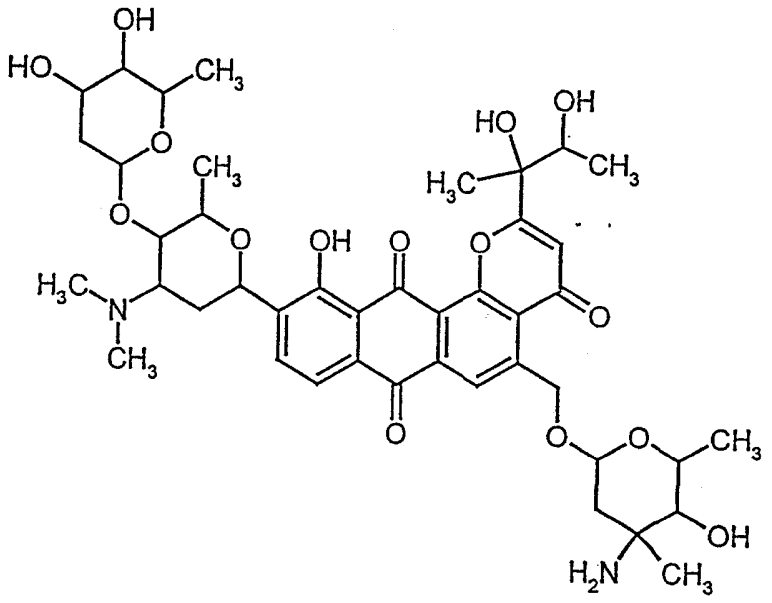
Hexosa II

Hexosa III

19.08.02

pluraflavinu B vzorce IB

Hexosa I



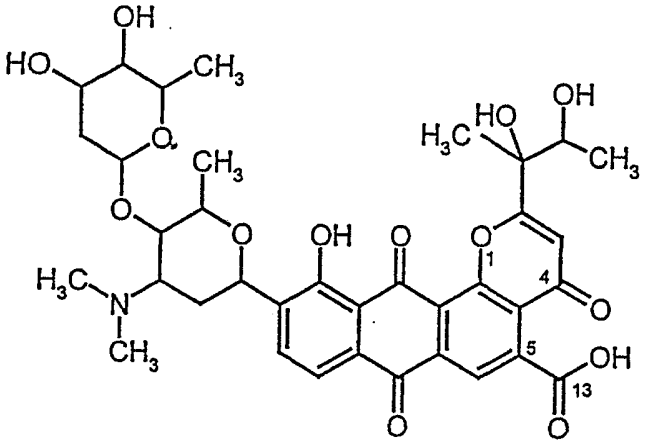
(IB)

Hexosa II

Hexosa III

a pluraflavinu E vzorce IE

Hexosa I



(IE)

Hexosa II

ve kterých

hexosa I je 2,6-dideoxyaldohexosa;

hexosa II je 2,3,6-trideoxy-3-dimethylaminohexosa a

hexosa III je 2,3,6-trideoxy-3-amino-3-methylaldo-hexosa,

19.08.02

ve všech jejich stereochemických formách a ve směsích těchto forem v jakémkoli poměru a jejich fyziologicky použitelných solí

V jedné konkrétní formě jsou sloučeniny vybrané z vzorců IA, IB a ve kterých

hexosa I je oliosa,

hexosa II je rhodosamin a

hexosa III je 3-epi-vankosamin.

Podle tohoto vynálezu jsou sloučeniny vzorce I připravitelné kultivací, například fermentací Actinomycetales druhů HAG 003959, DSM 12931, nebo variant nebo mutantů, za vhodných podmínek v živném mediu až jsou v živném mediu přítomny pluraflaviny vzorců IA, IB a_nebo IE. Pluraflaviny se pak z živného media mohou isolovat popřípadě se převedou na deriváty a/nebo fyziologicky použitelné sole.

Vynález se dále týká způsobu přípravy sloučenin vzorce I, který se vyznačuje tím, že se kultivují, například fermentací, mikroorganismy Actinomycetales druhy HAG 003959, DSM 12931, nebo jejich vaianty nebo mutanty za vhodných podmínek v živném mediu, až je přítomen alespoň jeden z pluraflavinů vzorce IA, IB a/nebo IE, z živného media se izoluje alespoň jeden z pluraflavinů a popřípadě se převede na deriváty a/nebo fyziologicky použitelné sole.

Kmen HAG 003959, DSM 12931, jeho mutanty a/nebo varianty se podle jednoho konkretního provedení kultivují v živném roztoku (také uváděným jako živné medium) který obsahuje alespoň jeden ze zdrojů atomů uhlíku a alespoň jeden ze zdrojů atomů dusíku a případně anorganické sole, až je v živném mediu přítomen alespoň jeden z nových pluraflavinů; pluraflaviny se pak mohou izolovat z živného media a případně rozdělit na jednotlivé individuální složky.

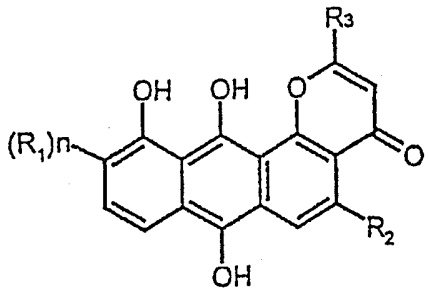
19.08.02

Kultivace se může provádět za aerobních podmínek. Kultivace se provádí při teplotách v rozmezí od 18 do 35° C a při pH v rozmezí od 6 do 8.

V literatuře je popsána řada reakcí pro chemickou derivatizaci chinonů. Podle toho, se derivatizace těchto sloučenin se může provádět použitím chemických reakcí, které jsou známé. Redukce chinonových sloučenin na hydrochinony se může například provádět katalyticky vodíkem, nebo hydridy kovů, jako jsou hydridy hliníku nebo hydridy boru.

Dalším vhodným příkladem je konverze chinonů s hydroxylaminem nebo s jeho deriváty na oximy, které se mohou dále chemicky zpracovávat

Vynález se tedy také týká sloučenin vzorce IV:



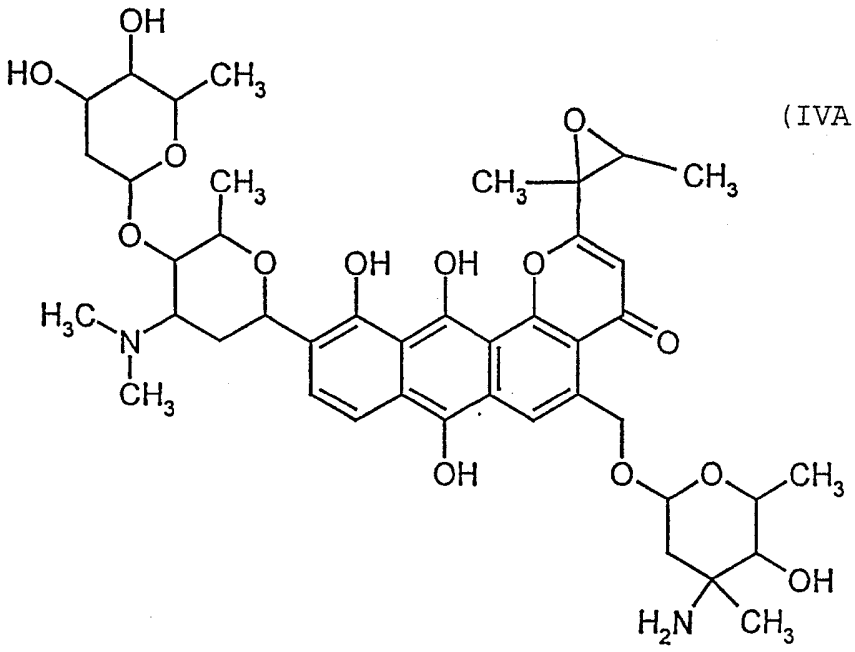
(IV)

ve kterém R_1, R_2, R_3 a n mají význam definovaný výše v jakékoli jejich stereochemické formě a směsí těchto forem v jakémkoli poměru a jejich fyziologicky použitelných solí nebo jejich derivátů

Deriváty pluraflavinu vzorců IVA, IVB a IVE (viz níže) jsou deriváty pluraflavinů vzorců IA, IB a IE repektive a také tvoří část tohoto vynálezu.

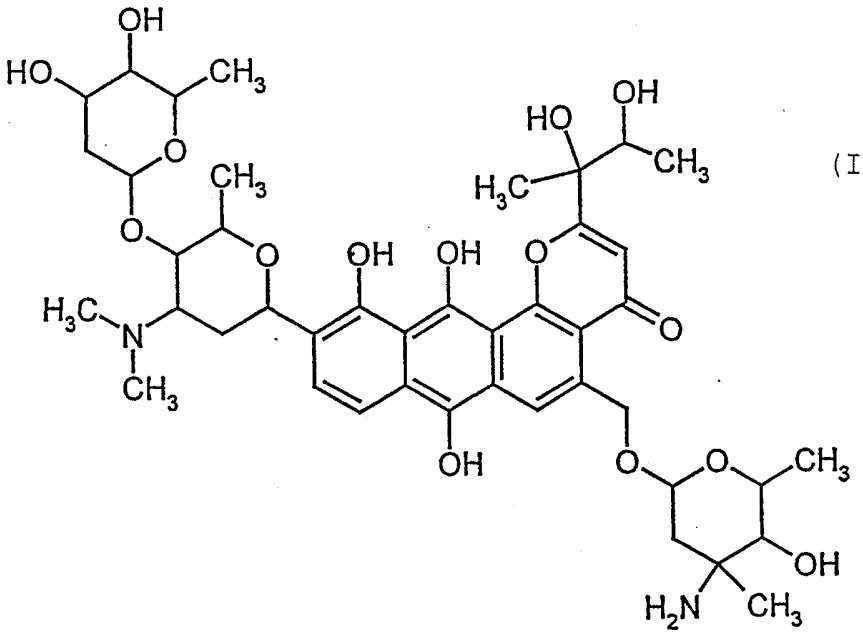
Vynález se dále týká sloučeniny vzorce IVA

19.09.02



(IVA)

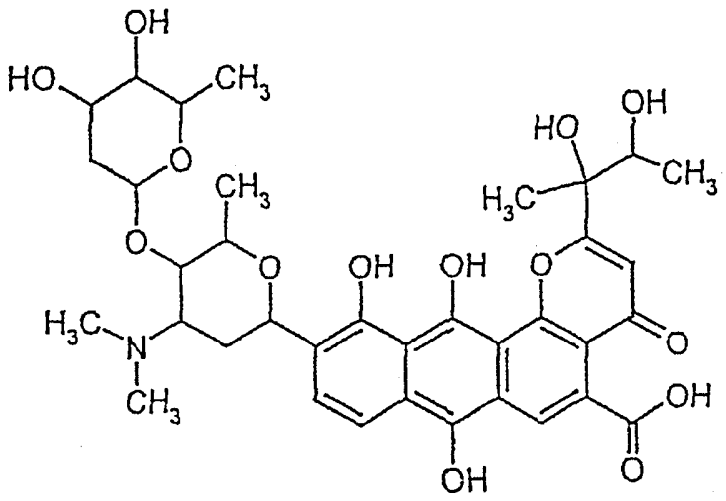
sloučeniny vzorce IVB



(IVB)

19.08.02

a sloučeniny vzorce IVE



(IVE)

ve všech jejich stereochemických formách a směsích těchto forem v jakémkoli poměru a fyziologicky použitelných solí nebo jejich derivátů

Vynález je dále popsán podrobněji, například, v alespoň jednom konkretním provedení.

Pluraflaviny podle tohoto vynálezu jsou produkovány druhy Actinomycetales, v jednom konkretním provedení kmenem Actinomycetales druhem HAG 003959, DSM 12931. The Actinomycetales druh HAG 003959, DSM 12931, má béžově červené mycelium a může být identifikován konidiofory, které jsou typické pro actinomycetes.

Taxonomické studium microorganismu Actinomycetales spec HAG 003959, DSM 12931, poskytlo následující výsledky determinace kmenu: diagnosticky důležitá analýza mastných

19.08.02

kyselin plynovou chromatografií poskytla hlavní poměry:
Anteiso 15:0 mastná kyselina,
Iso 16:0 mastná kyselina (isopalmitová kyselina),
Iso 17:0 mastná kyselina (isomargarová kyselina),
Anteiso 17:0 mastná kyselina (anteisomargarová kyselina) a cis[9] 18:1 mastná kyselina (olejová kyselina), a navíc nízké koncentrace jiných mastných kyselin.

Tento profil složení mastných kyselin umožňuje klasifikovat, že Actinomycetales HAG13 003959 (DSM 12931) patří taxonomicky do rodu Saccharothrix.

Isolát mikroorganismu byl uložen do Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zelikulturen GmbH, MascheroderWeg 1B, D 38124 Braunschweig, Germany, podle pravidel Budapest Convention z července 16, 1999 pod číslem: Actinomycetales species HAG 003959, DSM 12931.

Místo kmenu Actinomycetales druhu HAG 003959, DSM 12931, je také možné použít jeho mutanty a varianty, které syntetizují alespoň jednu ze sloučenin pluraflavinů podle tohoto vynálezu. Tyto mutanty se mohou připravit běžně známými způsoby, například ozařováním, to je ultrafialovými paprsky nebo rentgenovým zářením nebo chemickými mutageny, jako například, ethyl methansulfonátem (EMS), 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonem (MOB) nebo N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidinem (MNNG).

Postup podle vynálezu se může provádět fermentací v laboratorním měřítku (v mililitrovém až litrovém rozsahu) nebo v průmyslovém měřítku (v měřítku krychlového metru). Pokud není uvedeno jinak, veškerá procenta jsou uváděna na podkladě váhovém. V případě kapalin, jsou poměry míšení uváděny na podkladě objemovém, pokud není uvedeno jinak.

Podle jednoho konkrétního provedení se jako zdroje atomů uhlíku pro aerobní fermentaci používají asimilovatelné sacha-

ridy a cukerné alkoholy, jako jsou glukosa, laktosa, sacharosa nebo D-mannitol, a uhlovodíky obsahující přírodní produkty, jako je například sladový extrakt. Vhodnými zdroji atomů dusíku: aminokyseliny, peptidy a proteiny a jejich degradační produkty, jako jsou peptony nebo tryptony, dále extrakty z masa extrakty z kvasnic, rozemletá semena, například, kukuřice, pšenice, fazolí, soji nebo bavlny, destilační zbytky z výroby alkoholů masných pokrmů, extrakty kvasnic, ale také amonné sole a dusičnany. Anorganickými solemi obsaženými v živném roztoku mohou být například, chloridy, uhličitany, sulfáty nebo fosfáty alkalických kovú nebo kovů alkalických zemin, železa, zinku, kobaltu a mangánu.

Tvorba pluraflavinů podle tohoto vynálezu se provádí v živném, které obsahuje asi 0,1 až 5%, jako 0,3 až 2%, glukosy a 0,2 až 5%, jako 0,5 až 3%, sojové mouky a 0,05 až 2%, jako 0,2 to 1,0 g/l smáčené kukuřice a 0,05 až 1,0 g/l, jako 0,1 až 0,5%, uhličitanu vápenatého a 0,05 až 1,0 g/l, jako 0,1 až 1,0 g/l, chloridu sodného. Procenta jsou v každém případě vztažena na hmotnost celého živného media.

V živném mediu Actinomycetales druh HAG 003959, DSM 12931, produkuje směs pluraflavinů. V závislosti na složení živného media, proporce alespoň jednoho z pluraflavinů podle vynálezu se může měnit. Dále složením media je možné kontrolovat syntézu individuálních pluraflavinůs tak, že jeden nebo více z pluraflavinů se není produkován mikroorganismy vůbec, nebo v množství, které je pod detekčním limitem.

Podle jednoho konkrétního provedení, živné medium obsahuje pouze jeden detekovatelný pluraflavin. V dalším konkrétním provedení vznikají pluraflaviny A, B nebo E.

Navíc k pluraflavinům A, B a E (sloučeniny vzorců (IA), (IB) a (IE), respektive), mohou v živném mediu Actinomycetales species HAG 003959, DSM 12931. také vznikat jiné příbuzné sloučeniny, které se liší od sloučenin reprezentovaných vzorci

19.08.02

IA, IB a IE tím, že odlišně glykosylovány. Tak, jako vedlejší produkt může vznikat další pluraflavin (pluraflavin C) s molekulární hmotností 974 Da a byl také detekován degradační produkt pluraflavinu A, molekulární hmotnosti 692,77, $C_{37}H_{44}N_2O_{11}$. V posledně uvedené sloučenině není přítomna hexosa I; za kyselých podmínek se 2,6-dideoxyaldohexosa může hydrolyticky odštěpovat z pluraflavinu A.

Mikroorganismus se kultivuje aerobně, to je, například submerzně za třepání nebo míchání v třepacích baňkách nebo fermentorech, popřípadě za zavádění vzduchu nebo kyslíku. Kultivace se může provádět při teplotách v rozmezí od přibližně 18 do 35° C, jako přibližně od 25 do 32° C, včetně od 27 do 30° C. Hodnota pH je obecně v rozmezí od 6 do 8, jako od 6,5 do 7,5. Za těchto podmínek se mikroorganismus obecně kultivuje po dobu v rozmezí od 24 do 300 hodin, jako od 36 do 140 hodin.

Kultivace se s výhodou provádí v několika stupních, to je připraví se alespoň jedna předkultura v kapalném živném mediu, která se pak očkuje do aktuálního produkčního media, přičemž objemový poměr předkultury k hlavní kultuře se pohybuje například 1 : 10. Předkultura se získá, například, naočkováním mycelia do živného roztoku, a nechá se růst přibližně 36 až 120 hodin, jako 48 až 96 hodin. Mycelium se může získat, například, ponecháním kmenu růst asi 3 až 40 dnů, jako 4 až 10 dnů, na pevném nebo kapalném živném mediu, například na sladovém-kvasnicovém agaru nebo agaru s ovesnou moukou.

Průběh fermentace se může monitorovat měřením pH kultur nebo objemem mycelia a také chromatografickými metodami, jako je například chromatografie na tenké vrstvě nebo vysokotlaká kapalinová chromatografie nebo biologickými testy. Pluraflaviny podle vynálezu se mohou najít jak v myceliu, tak

ve filtrátu kultury. Izolační postup popsaný níže, slouží obecně pro čištění pluraflavinů A, B a E.

Izolace a/nebo čištění pluraflavinů podle vynálezu z živného media se může provádět známými metodami při kterých se berou v úvahu chemické, fyzikální a biologické vlastnosti přírodních produktů. Pro testování koncentrace pluraflavinu v živném mediu nebo při jednotlivých izolačních stupních je možné použít chromatografii na tenké vrstvě, například použitím směsi chloroform/methanol/ledová kyselina octová/voda (například v poměru 8:1:1:0,2) jako mobilní fáze nebo HPLC. Při dělení chromatografií na tenké vrstvě se detekce provádí , například použitím barvicích reakčních činidel, jako je α-naftol/kyselina sírová, při kterém se množství látky vhodně srovnává s kalibračním roztokem.

Podle vynálezu se pluraflaviny mohou izolovat buď z mycelia nebo kultivačního media. Obecně se mycelium nejprve oddělí od kultivačního media běžně známými metodami a pluraflaviny se pak extrahují z buněčného materiálu použitím případně s vodou mísitelným organickým rozpouštědlem. Fáze organického rozpouštědla obsahující pluraflaviny podle vynálezu se případně zahustí za sníženého tlaku a čistí se způsobem popsaným níže.

Popřípadě se kultivační filtrát spojí s koncentrátem z extraktu mycelia a extrahuje se vhodným s vodou nemísitelným rozpouštědlem, například, n-butanolem. Organická fáze se pak oddělí a případně zahustí za sníženého tlaku. Pro odstranění tuků se koncentrát zředí nepolárním rozpouštědlem, ve kterém jsou pluraflaviny podle vynálezu pouze málo rozpustné, jako například, hexanem, petroletherem, diethyletherem. To způsobí vysrážení pluraflavinů a lipofilní nečistoty zůstanou rozpuštěné a odstraní se běžnou separací pevné a kapalné fáze. Sraženina, která obsahuje veškeré pluraflaviny se rozpustí ve směsi 1/30 původního objemu vody a methanolu. Sraženina se

úplně rozpustí a lyofilizuje. Lyofilizát se pak dále uvádí jako surový produkt obsahující 0,5 až 50% pluraflavinu a použije se pro další izolace.

Další čištění jednoho nebo více pluraflavinů podle vynálezu se provádí chromatografií na vhodném materiálu, jako jsou molekulární síta, na normálních fázových nosičích, jako je, například, silikagel, kysličník hlinitý na iontoměničích nebo na adsorbčních pryskyřicích a/nebo na mediích s obrácenými fázemi (RP). Pomocí těchto chromatografií se pluraflaviny rozdělí. Chromatografie pluraflavinů se provádí použitím pufrovaných vodných roztoků nebo směsí vodných a organických roztoků.

Jako směsi vodných nebo organických roztoků se rozumí všechny s vodou mísitelná organická rozpouštědla, jako je methanol, propanol a acetonitril, v koncentracích od 10 do 80% rozpouštědla, například od 40 do 60% rozpouštědla, nebo jiné úplně pufrované vodné roztoky, které jsou mísitelné s organickými rozpouštědly. Pufry se mohou používat stejné jaké byly uvedeny výše.

Separace pluraflavinů, která se zakládá na jejich různé polaritě, se může provádět chromatografií na obrácených fázích, například na MCI® (adsorbční pryskyřici od Mitsubishi, Japan) nebo Amberlit XAD® (TOSOHAAS), nebo jiných hydrofobních materiálech, jako jsou, například, RP-8 nebo RP-18 fáze. Navíc se separace může provádět chromatografií na normálních fázích, například na silikagelu nebo kysličníku hlinitém a podobně.

Chromatografie pluraflavinů se může provádět za použití pufrovaných nebo okyselených vodných roztoků nebo vodných roztoků s alkoholy nebo jinými s vodou mísitelnými alkoholy nebo jinými s vodou mísitelnými organickými rozpouštědly. Jako organická rozpouštědla se mohou použít propanol a acetonitril.

Jako pufrované nebo okyselené vodné roztoku se rozumí například voda, fosfátový pufr, octan amonný, citrátový pufr

v koncentracích od 1 mM do 0,5 M, a také kyselina mravenčí, kyselina octová, kyselina trifluoroctová nebo všechny komerční kyseliny známé odborníkům v oboru., například v koncentracích od 0,01 do 3%, jako od 0,1%.

Chromatografie se může provádět použitím gradientu vycházeje z 100% vodného pufru a konče 100% rozpouštědla, například lineárním gradientem pohybujícím se od 10 do 50% při použití 2-propanolu nebo acetonitrilu.

Alternativně je také možné provádět gelovou chromatografii nebo chromatografii na hydrofilních fázích.

Gelová chromatografie se může provádět na polyakrylamidu nebo smíšených polymerních gelech, jako je, například, Biogel-P 2® (Biorad), Fractogel TSK HW 40® (Merck, Germany nebo Toso Haas, USA) nebo Sephadex® (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

Pořadí chromatografií uvedených výše může být obrácené.

Další vysoce efektivní čistící stupeň pro pluraflaviny je krystalizace. Pluraflaviny krystalizují z roztoků v organických rozpouštědech a ze směsí vody s organickými rozpouštědly. Krystalizace se může provádět známým způsobem, jako například zahuštěním nebo ochlazením nasycených roztoků pluraflavinu.

Pluraflaviny podle vynálezu jsou stabilní v pevném stavu a v roztocích, které mají pH v rozmezí od 3 do 8, například, pH 4 až 6 a mohou se proto být obsaženy v běžných farmaceutických prostředcích.

Pluraflaviny vzorce I od nich odvozené deriváty se metodami známými odborníkům v oboru mohou převést na odpovídající fyziologicky použitelné sole

Jako fyziologicky použitelné sole sloučenin vzorce I se rozumí jak organické, tak anorganické sole, jaké jsou popsány v Remington's Pharmaceutical Sciences (17th vydání, str. 1418

19.08.02

(1985)). Na podkladě fyzikální a chemické stability jsou sodné, draselné, vápenaté a amonné sole možnými součástmi kyselých skupin; sole s kyselinou chlorovodíkovou, kyselinou sírovou, kyselinou fosforečnou nebo s karboxylovými kyselinami nebo sulfonovými kyselinami, jako jsou například kyselina octová, kyselina citronová, kyselina benzoová, kyselina maleinová, kyselina fumarová, kyselina vinná a kyselina p-toluensulfonová, jsou možnými součástmi bazických skupin

Vynález dále zahrnuje chemické ekvivalenty, zde označované také jako "deriváty", sloučenin vzorce I, které mají stejnou nebo v podstatě stejnou aktivitu nebo které se mohou převést na sloučeniny podle vynálezu. Takovými ekvivalenty jsou, například, estery a ethery, komplexy a také produkty redukce sloučenin podle vynálezu.

Estery a etherické deriváty a produkty redukce se mohou připravit postupy popsanými v literatuře, například v "Advanced Organic Synthesis", 4 vydání, J. March, John Wiley & Sons, 1992. Karboxylová skupina (vzorce IE, IVE) a hydroxylové skupiny sloučenin vzorce I se mohou převést na ester, jako je alkylester s 1 až 4 atomy uhlíku nebo na etherickou skupinu. Tyto ethery zahrnují, například acetaly a ketaly hydroxylových skupin

Stabilní komplexy sloučenin vzorce I se mohou vytvořit s fyziologicky použitelnými anorganickými kationty, jako jsou kationty vápníku nebo hořčíku.

Vynález také zahrnuje veškeré stereoisomerní formy sloučenin vzorce I. Centra asymetrie sloučenin vzorců IA, IB a IE jsou na sobě nezávislá a mohou mít S-konfiguraci nebo R-konfiguraci. Oxirany skupin obsahujících epoxid mohou být v kterékoli poloze, například, oxirany, které zahrnují atomy uhlíku 2' a 3'. Vynález také zahrnuje veškeré možné enantiomery a diastereomery a také směsi alespoň dvou

stereoisomerních forem, například směsi enantiomerů a/nebo diastereomerů, v jakémkoli poměru. Vynález tedy poskytuje enantiomery v enantiomerně čisté formě, jak ve formě levotočivých tak pravotočivých antipodů, R a S konfigurací, ve formě racemátů a ve formě směsí dvou enantiomerů v libovolném poměru. Jestliže je ve sloučenině možná cis/trans isomerie, vynález také zahrnuje jak cis formu, tak trans formu a směsi těchto forem v libovolném poměru

Vzhledem k užitečným farmakologickým vlastnostem jsou sloučeniny podle vynálezu vhodné pro použití jako léčiv v lidské a nebo veterinární medicině. Mají antibiotický účinek a navíc antibakteriální účinek, antimykotický účinek, to je inhibiční účinek na plísně, včetně fytopatogenních plísní, a mají antiprotozoální a antiparasitické vlastnosti.

Sloučeniny podle vynálezu se mohou použít na rakovinová onemocnění, například jako chemoterapeutika. Vzhledem k jejich význačným cytostatickým účinkům a antimikrobiálnímu účinku se mohou použít, například, jako cytostatika pro maligní deformace u živočichů a lidí.

V případě nádorových buněk, které mají vyvinutou rezistenci na konvenční látky, pouze nové prostředky mají terapeuticky adekvátní efekt. Tak, pluraflaviny podle vynálezu a jejich deriváty vzorce I mají potenciálně vynikající aktivitu proti těmto problémovým typům buněk

Vynález se také týká farmaceutických prostředků, které obsahují alespoň jednu sloučeninu z pluraflavinů podle vynálezu a/nebo jejich derivátů podle vynálezu. Pluraflaviny se mohou použít ve směsi s alespoň jedním vhodným nosičem nebo inertní látkou. Jako inertní látky se mohou použít pro lidi použitelné přísady a/nebo inertní látky.

Vynález se také týká způsobu přípravy farmaceutických prostředků podle vynálezu, který se vyznačuje tím, že alespoň

jedna sloučenina podle vynálezu převede na vhodnou aplikační formu použitím vhodné a fyziologicky přijatelné inertní přísady, popřípadě spolu s další aktivní látkou, přísadou nebo inertní látkou.

Farmaceutické prostředky podle vynálezu se obecně podávají orálně, topicky nebo parenterálně, je však také možná rektální aplikace. Vhodnými pevnými nebo kapalnými formami farmaceutických prostředků jsou, například, granule, prášky, tablety, povlečené tablety, mikrokapsle, čípky, syrupy, emulze, suspenze, aerosoly, kapky nebo injikovatelné roztoky ve formě ampulí a preparáty, které mají protrahované uvolňování aktivní sloučeniny a ve kterých se při jejich přípravě používají inertní látky a přísady a/nebo pomocné látky, jako jsou desintegrační látky, pojidla, látky pro povlékání, nadouvadla, klouzadla nebo mazadla, chuťové přísady, sladidla nebo solubilizátory.

Často používanými inertními látkami nebo pomocnými látkami, které je možno uvést jsou, například, uhličitan hořečnatý, kysličník titaničitý, laktóza, mannitol a jiné sacharidy, talek, laktoprotein, želatina, škrob, vitaminy, celulóza a její deriváty, živočišné nebo rostlinné oleje, polyethylenglykol a rozpouštědla, jako je například sterilní voda, alkoholy, glycerol a polyhydroxylované alkoholy.

Popřípadě jednotková dávková forma může být mikroenkapsulovaná pro orální aplikace, aby se oddálilo nebo prodloužilo uvolňování účinné látky po delší dobu, jako například přípravou povlečením nebo vložením částeček aktivní sloučeniny do vhodných polymerů, vosků a podobně.

Farmaceutické prostředky se mohou připravovat a aplikovat v jednotkových dávkových formách, které obsahují jako aktivní látku alespoň jednu sloučeninu z pluraflavinů podle vynálezu a/nebo jejich deriváty. V případě pevné

19.08.02

jednotkové dávkové formy, jako jsou tablety, kapsle a čípky, tato dávka může být až do přibližně 200 mg, ale může být asi 0,1 až 100 mg, a v případě roztoků pro injekce v ampulích tato dávka může být až do přibližně 200 mg, ale může být asi 0,1 až 100 mg za den.

Denní dávka se aplikuje v závislosti na tělesné hmotnosti, věku, pohlaví a stavu savčího subjektu. Mohou se však také použít dávky vyšší nebo nižší. Denní dávka se může podávat v jedné dávce nebo nebo v několika menších jednotkových dávkách nebo ve vhodných dobách v předem stanovených intervalech nebo ve formě rozdělených dávek.

Vynález je blíže objasněn následujícími příklady. Uvedená procenta jsou procenty hmotnostními. V případě kapalin, mísící poměry jsou na podkladě objemovém, pokud není uvedeno jinak.

Následující příklady jsou pouze ilustrativní a vynález žádným způsobem neomezují.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava glycerolové kultury Actinomycetales druhu HAG 003959, DSM 12931.

100 ml živného roztoku (extrakt sladu 2,0%, extrakt kvasnic 0,2%, glukóza 1,0%, $(NH_4)_2HPO_4$ 0,05%, pH 6,0) ve sterilní 300 ml Erlenmeyerově baňce se naočkuje kmenem Actinomycetales druhu HAG 003959, DSM 12931, a inkubuje se v rotační třepačce při 28° C a při 180 ot./min po dobu 7 dnů. 1,5 ml této kultury se pak zředí 1,5 ml 99% glycerolu a skladuje se při -20° C.

19.08.02

Příklad 2

Příprava kultury nebo předkultury Actinomycetales druhu HAG 003959, DSM 12931 v Erlenmeyerově baňce

Sterilní 300 ml Erlenmeyer baňka obsahující 100 ml následujícího živného roztoku: 15 g of glukózy 15 g sojové mouky, 5 g kukuřičného výluhu, 2 g $CaCO_3$ a 5 g NaCl na litr se naočkuje kulturou pěstovanou na šikmém mediu ve zkumavce za použití stejného živného roztoku, ale s 2% agaru) nebo 1 ml glycerolové kultury (viz příklad 1) a inkubuje se na třepačce s 180 ot./min při 30° C. Maximální produkce alespoň jedné sloučeniny z pluraflavinů podle vynálezu se dosáhne po 120 hodinách. Pro naočkování 10 a 200 l fermentorů stačí 48 až 96 hodinová submerzní kultura (množství očka 10 %) při použití stejného živného roztoku.

Příklad 3

Příprava pluraflavinů

Fermentor (9 l) pracuje za následujících podmínek:

Živné medium:	15 g glukózy/l;
	15 g sojové mouky/l;
	5 g kukuřičných výluhů pevných/l;
	2 g $CaCO_3$/l;
	5 g NaCl/l;
	pH 7,0 (před sterilizací)
Operační doba:	92 hodin
Teplota inkubace:	28° C.
Rychlost míchání:	300 ot./min.
Provzdušňování:	5 l/min^{-1}

19.08.02

Opakovaným přidáváním ethanolického roztoku polyolu je možné případně potlačit tvorbu pěny. Maximální produkce se dosáhne po asi 70 až 96 hodinách.

Příklad 4

Izolace směsi pluraflavinů z živného roztoku kultury Actinomycetales druhu HAG 003959, DSM 12931.

Po skončení fermentace Actinomycetales druhu HAG 003959, DSM 12931, se živná půda z fermentoru, připravená podle

příkladu 3 (90 l) přefiltruje za přídání 2 % pomocného filtračního prostředku, například Celitu® a buněčný materiál (0,6 litru) se extrahuje 3 litry methanolu. Aktivní sloučeninu obsahující methanolický roztok se od mycelia oddělí filtrací a zahustí za sníženého tlaku. Koncentrát spolu s filtrátem z kultury (7 litrů) se nanese na připravenou 0,4 litrovouer ®MCI GEL, CHP20P kolonu. Eluce se provádí použitím a gradientu 0,1% kyseliny octové ve vodě až 0,1% kyseliny octové v 2-propanolu. Průtok kolonou je (1,2 litru za hodinu) a jímají se frakce po (0,25 l) a frakce obsahující pluraflavin se spojí (20 až 23). Zahuštěním za sníženého tlaku a mrazovou sublimací se 1,4 g hnědého prášku.

Příklad 5

Obohacení pluraflavinových složek gelovou chromatografií.

1,4 g produktu připraveného podle příkladu 4 se nanese na kolonu s kapacitou 3,9 litrů (šířka x výška = 10 cm x 50 cm), naplněnou Fractogel® TSK HW-40 s. Mobilní fáze voda/acetonitril (1:1) se pumpuje kolonou rychlostí 50 ml za

19.08.02

minutu a jímají se frakce (65 ml). Pluraflaviny se hlavně eluují ve frakcích 13 až 16. Spojí se, rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku a získá se 130 mg směsi pluraflavinů.

Příklad 6

Separace pluraflavinových složek na obrácených fázích RP-18.

Preparativní HPLC kolona s kapacitou 122 ml (1,25 cm, vnitřní průměr, x 25 cm, výška) se naplní ®Nucleosil 100-7 C18 HD, a nanese se na ní 130 mg směsi pluraflavinů získaných, podle příkladu 5. Eluce se provádí použitím 10 % acetonitrilu a 0,1 M vodného roztoku octanu amonného. Průtok kolonou je 50 ml/min. a jímají se 50 ml frakce. Frakce 6 obsahovala pluraflavin E, pluraflavin C byl ve frakcích 12 až 17, pluraflavin B byl ve frakcích 25 až 27 a pluraflavin A byl ve frakcích 35 až 37. Po zahuštění za sníženého tlaku a mrazové sublimaci byla získána následující množství

:

pluraflavin A: 22 mg, ESI+MS: 823 Da $(M+H)^+$,

pluraflavin B: 18 mg, ESI+MS: 841 Da $(M+H)^+$,

pluraflavin C: 11 mg, ESI+MS: 974 Da $(M+H)^+$,

pluraflavin E: 5 mg, ESI+MS: 712 Da $(M+H)^+$.

Příklad 7

Konečné čištění pluraflavinu A a převedení na sůl s kyselinou trifluoroctovou

Frakce 35 až 37, připravené podle příkladu 6, se po mrazové sublimaci (22 mg), rozpustí v 10% acetonitrilu ve vodě. Kyselinou trifluoroctovou se upraví pH na 2,8 a nanese na kolonu 250/10 LiChrospher RP-18e (5 µm)®. Eluce se provádí použitím 0,05% vodné kyseliny trifluoroctové v 11 až 22%

19.08.02

acetonitrilu. Zahuštěním za sníženého tlaku a mrazovou sublimací se získá 18 mg pluraflavinu A ve formě soli s kyselinou trifloroctovou.

Příklad 8

Identifikace pluraflavinu A.

Vzhled: sytě žlutá látka, ktrá je rozpustná v polárních organických rozpouštědlech, ale málo rozpustná ve vodě. Adiční sůl s kyselinou je rozpustná ve vodě. Sloučenina je stabilní v neutrálním a mírně kyselém prostředí, ale nestabilní v alkalickém prostředí a silně kyselém prostředí.

UV-Maxima: 214, 243, 270 (inflex), 290 (inflex), 426 nm ve směsi voda/acetonitril (8:2), pH 2 a 214, 243, 270 (inflex), 290 (inflex) a 426 nm ve směsi voda/acetonitril (6:4), pH 7. IČ pásy: 3424, 1680, 1600, 1464, 1427, 1300, 1203, 1131, 1066, 1009, 801, 721 cm^{-1}. Hmotovou spektrometrií s vysokým rozlišením byla nalezena následující molekulární hmotnost (M+H):823,370631 Da, odpovídající empirickému vzorci pro pluraflavin A $C_{43}H_{54}N_2O_{14}$. Elektron sprej ionizace (ESI, positivní) poskytla, použitím MS/MS fragmentace, následující ionty: 823, 693, 680, 550, 480, 390, 320, 144 a 131 Da.
NMR signály: viz Tabulka 1.

Tabulka 1

^1H a ^{13}C chemické posuny pluraflavinu A v methanolu-d_4 a DMSO-d_6 při 300° K.

	Methanol-d_4		DMSO-d_6	
poloha	^{13}C δ(ppm)	^1H δ(ppm)	^{13}C δ(ppm)	^1H δ(ppm)
2	168,39	-	165,62	-
3	111,95	6,37 s	110,39	6,27 s

19.08.02

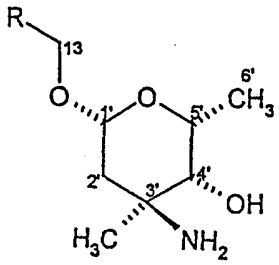
	Methanol-d_4		DMSO-d_6	
poloha	^{13}C δ(ppm)	^{1}H δ(ppm)	^{13}C δ(ppm)	^{1}H δ(ppm)
4	180,25	-	177,56	
5	150,44	-	148,22	-
6	121,34	8,61 s	119,05	8,43 s
6a	138,34	-	136,28	-
7	182,68	-	181,12	-
7a	133,23	-	131,18	-
8	120,05	7,86 d	118,29	7,78 d
9	135,63	7,90 d	134,41	7,87 d
10	137,35	-	135,79	-
11	161,06	-	159,39	-
11-OH	-	-	-	13,38 s, š.
11a	118,14	-	116,43	-
12	189,12	-	187,39	-
12a	122,00	-	120,35	-
12b	157,66	-	155,50	-
13	70,83	5,38 d,5,63 d	68,48	5,30 d,5,51 d
14	61,17	-	59,35	-
15	63,69	3,41 q	61,61	3,48 q
16	20,24	1,92 s	19,32	1,86 s
17	13,69	1,27 d	12,93	1,22 d
1´	98,90	5,04 dd	96,57	5,06 d,š
2´	37,24	2,05, 2,12	35,50	1,87, 1,95
3´	58,32	-	56,33	-
3´Me	24,57	1,50 s		1,35 s
3´NH_2	-	-	-	8,16 s, š
4´	71,15	3,27 s, š	68,65	3,17 d
4´-OH	-	-	-	5,47 d
5´	70,44	4,00 q	68,19	4,01 q
6´	17,21	1,34 d	16,75	1,18 d

19.08.02

	Methanol-d_4		DMSO-d_6	
poloha	^{13}C δ(ppm)	^{1}H δ(ppm)	^{13}C δ(ppm)	^{1}H δ(ppm)
2″	28,00 š	2,48 m, 2,91 m, š		2,35 š, 2,78 š
3″	65,19	3,45 m, š	62,19	3,43 š
3″NMe	43,24 š, 41,65 š	3,05 š,3,05 š	42,14, 39,25	2,89, 2,97
3″NH^+	-	-	-	8,78 š
4″	75,13	4,32 s, š	71,88	4,20 s, š
5″	72,55	3,97 q, š	70,22	3,75 q, š
6″	18,09	1,40 d	17,54	1,28d
1‴	101,39	5,24 m, š	98,89	5,11 š
2‴	33,40	2,05, 2,10	32,07	1,75, 1,92
3‴	66,61	4,12 m	64,17	3,96 m, š
3‴-OH	-	-	-	4,70 s, š
4‴	71,98	3,67	70,13	3,45 š
4‴-OH	-	-	-	4,44 s, š
5‴	69,52	4,16 q. š	67,05	4,10 q, š
6‴	17,51	1,28 d	16,94	1,10d

Pro aldohexózy jsou pozorované účinky NOE v souhlase s relativní SRSS nebo RSRR stereochemií na chirálních centrech 1', 3', 4', 5' (viz H-III). To odpovídá C-3 epimeru vankosaminu.

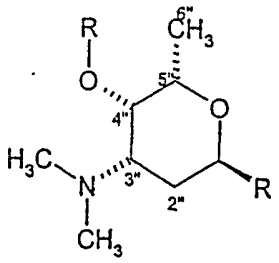
19.08.02



Relativní stereochemie

H-III Relativní stereochemie hexózy III

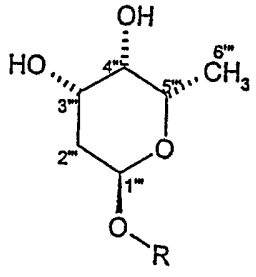
NOE účinky pozorované pro hexózu II upřednostňují relativní stereochemii RSSS nebo SRRR pro chirální centra 1'',3'', 4'', 5'' (viz H-II).



Relativní stereochemie

HII Relativní stereochemie hexózy II

Stejná relativní stereochemie (RSSS, SRRR) pro asymetrické atomy uhlíku 1''', 3''', 4''', 5''' je v souhlase s detekovaným NOE pro hexózu I (viz H-I).



Relativní stereochemie

H-I Relativní stereochemie hexózy I

19.08.02

Příklad 9

Identifikace pluraflavinu B

Vzhled:

Temně žlutá pevná látka, která je rozpustná v polárních organických rozpouštědlech, ale pouze málo rozpustná ve vodě. Adiční sůl s kyselinou je ve vodě rozpustná. Sloučenina je stabilní v neutrálním prostředí a slabě kyselém prostředí, ale je nestabilní v alkalickém rozmezí pH. .

UV maxima: 214, 243, 270 (inflex), 290 (inflex), 426 nm ve směsi voda/acetonitril (8:2), pH 2 a 214, 243, 270 (inflex), 290 (inflex) a 426 nm ve směsi voda/acetonitril (6:4), pH 7.

Pluraflavin B má empirický vzorec $C_{43}H_{56}N_2O_{15}$, molekulární hmotnost 840,9 Da.

NMR signály: viz tabulka 2.

Tabulka 2

^1H a ^{13}C chemické posuny pluraflavinu B v methanolu-d_4 a srovnání s pluraflavinem A při teplotě 300° K.

	pluraflavin B (methanol-d_4)		pluraflavin A (methanol-d_4)	
poloha	^{13}C δ(ppm)	^1H δ(ppm)	^{13}C δ(ppm)	^1H δ(ppm)
2	176,38	-	168,39	-
3	111,10	6,73 s	111,95	6,37 s
4	181,26	-	180,25	-
4a	125,96	-	126,08	-
5	150,43	-	150,44	-
6	121,03	8,52 s	121,34	8,61 s
6a	138,12	-	138,34	-

19.03.02

	pluraflavin B (methanol-d_4)		pluraflavin A (methanol-d_4	
poloha	^{13}C δ(ppm)	^{1}H δ(ppm)	^{13}C δ(ppm)	^{1}H δ(ppm)
7a	133,16	-	133,23	-
8	120,04	7,81 d	120,05	7,86 d
9	135,52	7,83 d	135,63	7,90 d
10	137,44	-	137,35	-
11	161,02	-	161,06	-
11-OH	-	-	-	-
11a	118,01	-	118,14	-
12	189,24	-	189,12	-
12a	121,89	-	122,00	-
12b	157,41	-	157,66	-
13	70,83	5,36d, 5,60d	70,83	5,38d, 5,63d
14	77,67	-	61,17	-
15	72,61	4,40 q	63,69	3,41 q
16	23,90	1,67 s	20,24	1,92
17	17,00	1,35 d	13,69	1,27 d
1´	98,87	5,05 dd	98,90	5,04 dd
2´	37,20	2,09 m	37,24	2,05, 2,12
3´	58,39	-	58,32	-
3´Me	24,45	1,51 s	24,57	1,50 s
3´NH_2	-	-	-	-
4´	71,08	3,29 s, š	71,15	3,27 s, š
4´OH	-	-	-	-
5´	70,42	4,01 q	70,44	4,00 q
6´	17,19	1,33 d	17,21	1,34 d
1″	70,13	5,48 t	70,23	5,51 t
2″	27,74	2,50 m, 2,88 m	28,00 š	1,48 m, 2,91 m, š
3″	65,14	3,46 m	65,19	3,45 m, š

19.08.02

	pluraflavin B (methanol-d_4)		pluraflavin A (methanol-d_4	
poloha	^{13}C δ(ppm)	^{1}H δ(ppm)	^{13}C δ(ppm)	^{1}H δ(ppm)
3″NH^+	-	-	-	
4″	75,02	4,32 s, š	75,13	4,32 s, š
5″	72,61	3,97 q, š	72,55	3,97 q š
6″	18,15	1,39 d	18,09	1,40
1‴	101,38	5,24 m,š	101,39	5,24 m, š
2‴	33,42	2,07	33,40	2,05, 2,10
3‴	66,59	4,13 m	66,61	4,12 m
3‴-OH	-	-	-	-
4‴	71,97	3,67 š	71,98	3,67
4‴-OH	-	-	-	-
5‴	69,52	4,16 q, š	69,52	4,16 q, š
6‴	17,49	1,27 d	17,51	1,28 d

Příklad 10

Konečné čištění pluraflavinu E.

Frakce 6, získaná podle příkladu 6 se po mrazové sublimaci (5 mg) rozpustí v 10% acetonitrilu ve vodě a kyselinou trifluoroctovou se upraví pH na 2,8, načež se naleje na 250/10 LiChrospher RP-18e (5 μm)® kolonu. Eluce se provádí použitím 0,05% vodné kyseliny trifluoroctové v gradientu od 11 do 22% acetonitrilu. Zahuštěním za sníženého tlaku a mrazovou sublimací se získá 2,7 mg soli pluraflavinu E s trifluoroctovou kyselinou.

Příklad 11

Identifikace pluraflavinu E.

19.08.02

Vzhled: temně žlutá pevná látka, která je rozpustná v polárních organických rozpouštědlech a pouze obtížně ve vodě, Adiční sůl s kyselinou je rozpustná ve vodě. Sloučenina je stabilní v neutrálním a slabě kyselém prostředí, ale nestálá v alkalickém prostředí a silně kyselém prostředí.

UV-maxima: 213, 244, 270 (inflex), 290 (inflex), 426 nm ve směsi voda/acetonitril (8:2), pH 2, a 213, 244, 270 (inflex), 290 (inflex) a 426 nm ve směsi voda/acetonitril (6:4), pH 7.

Hmotnostní spektrometrií byla nalezena molekulární hmotnost pro $(M+H)^+$: 712 Da, odpovídající empirickému vzorci $C_{36}H_{41}NO_{14}$ pro pluraflavin E.

NMR signály jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3

^1H a ^{13}C chemické posuny pluraflavinu E v methanolu-d_4 při 300° K.

poloha	^{13}C δ (ppm)	^1H δ(ppm)
2	176,48	-
3	110,30	6,69 s
4	178,39	-
4a	124,69	-
5	149,56	-
6	121,17	7,92 s
6a	138,95	-
7	182,40	-
7a	133,21	-
8	119,82	7,60 d
9	135,61	7,74 d

19.08.02

poloha	^{13}C δ (ppm)	^{1}H δ(ppm)
10	137,04	-
11	161,33	-
11-OH	-	-
11a	118,04	-
12	189,21	-
12a	121,59	-
12b	156,86	-
13	175,28	-
14	77,69	-
15	72,61	4,35 q
16	23,78	1,62 s
17	17,09	1,31 d
1″	70,34	5,46 dd
2″	27,35	2,86 m, 2,44 m
3″	64,88	3,50 m
3″NMe	42,5 š	3,08
3″NH^{+}	-	-
4″	75,22	4,30 s, š
5″	72,29	3,87 q, š
6″	18,25	1,35 d
1‴	101,40	5,23 m
2‴	33,43	2,08 m, 2,06 m
3‴	66,61	4,12 m1‴
3‴-OH	-	-
4‴	72,03	3,67 s, š
4‴-OH	-	-
5‴	69,50	4,17 q, š
6‴	17,52	1,28 d

19.08.02

Příklad 12

(a) Studium cytostatické aktivity

Pro stanovení cytostatické aktivity se použijí buňky hepatomu krys získané z kmene ze sbírky American Type Culture Collection pod číslem ATCC CRL-1548, Jo No. 223 a 228 Kmen byl udržován na mediu "MEM (EAGLE) s Glutamax" [GIBCO BRL No.4109-028] s 10% telecím plodovým sérem [GIBCO BRL No. 10270-106] a 10 µl směsi penicilinu a streptomycinu [GIBCO BRL No. 15140-114]/ml. Byly použity 96-jamkové mikrotitrační desky [Greiner, No. 15140-114]. Každá jamka byla nejprve naplněna 140 µl roztoku živného media a v každém případě se naočkuje 215 000 buňkami. Desky se pak inkubují při 37° C a v atmosféře 5% CO_2 po dobu 20-24 hodin. Předem se připraví série ředění pluraflavinů s koncentracemi 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, 0,7813, 0,3906, 0,195, 0,094, 0,047 a 0 µM, a pipetují se v odpovídajícím pořadí. Po další inkubaci 22 hodin při 37° C. v atmosféře 5% CO_2, a kapalné medium se odsaje. Zbylé buňky se obarví 100 µl RPMI 1640 [GIBCO BRL No. 32404-014]/ na jamku a 20 µl Cell Titer 96 Aqueous [PROMEGA No. G5430]/na jamku. Přímo po přidání se měří absorpce světla při 590 nm a pak 2 hodiny po inkubaci, jaká byla uvedeny výše. Cytostatický účinek byl vypočten ze změny ve světelné absorpci.

IC_{50} pro pluraflavin A = <50 nM;

IC_{50} pro pluraflavin B = <50 nM.

(b) Antiproliferační účinky pluraflavinu A a flavopiridolu na vybrané nádorové buněčné linie.

MTT, ve vodě rozpustná tetrazoliová sůl, se převede na nerozpustný purpulový formazan při rozpuštění štěpením tetrazoliového kruhu enzymy dehydrogenáz v aktivních

19.08.02

mitochondriích. Mrtvé buňky tuto změnu nezpůsobí. Tato methoda se používá pro kvantitativní rozmnožování aby se stanovila aktivita potenciálních chemoterapeutických sloučenin.

Veškeré buňky se udržují v RPMI 1640 (Life Technologies, Gaithersburg, Md) obsahující 10% teplem deaktivovaného plodového hovězího séra penicilin/streptomycin a obohaceného L-glutaminem. Buňky se nanesou do 96-jamkových desek pro tkáňové kultury s následujícími hustotami:

prsa	2500 buněk/jamka
prostata	2600 buněk/jamka
tlusté střevo	1000 buněk/jamka
plíce	1000 buněk/jamka

Buňky se nechají ulpět přes noc při 37° C, 5% CO_2. Pluraflavin A se zředí v živném mediu na následující konečné koncentrace sloučeniny: 50,0, 16,67, 5,56, 1,85, 0,617, 0,206, 0,069, 0,023 μM Flavopiridol se zředí na koncentrace: 2,0, 0,222, 0,074, 0,025, 0,008, 0,003, 0,001 μM. Obě sloučeniny se testují ve třech opakováních ve všech koncentracích. Buňky se promyjí čerstvým mediem a sloučeniny se přidají k buňkám na konečný objem 100 μl. Buňky plus sloučeniny se nechají inkubovat při 37° C, 5% CO_2 přibližně po dobu 72 hodin. V určenou dobu se přidá do každé jamky 25 μl MTT (10 mg/ml v HBSS). Desky se inkubují při 37° C po dobu 2 až 4 hodin. MTT a media se odstraní a přidá se 200 μl DMSO na jamku. Data se snímají při 570 nm a výsledky jsou uvedeny níže:

Buňky	Pluraflavin A IC_{50}	Flavopiridol IC_{50}
prsa	<23 nM	90 nM
prostata	10 nM	80 nM

19.08.02

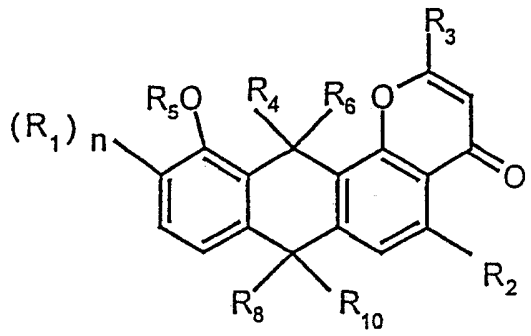
tlusté střevo	0.35 nM	30 nM
plíce	3.0 nM	90 nM

V testu na měkkém agaru pluraflavin A a flavopiridol byly testovány na buňky leukemie.

Hodnoty IC_{50} byly: 60 nM (pluraflavin A) a 0,5, 0,6 μM (flavopiridol).

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Sloučenina obecného vzorce I



(I)

ve kterém

R_1 je zbytek cukru,

R_2 je karboxylová skupina nebo skupina $-CH_2-O-(R_7)_m$, ve které R_7 je zbytek cukru,

R_3 je substituent vybraný ze skupiny zahrnující skupiny obsahující epoxidový zbytek, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny s 2 až 6 atomy uhlíku, kde tyto alkylové skupiny a alkenylové skupiny jsou případně substituovány alespoň jednou hydroxylovou skupinou,

R_5 je substituent vybraný ze skupiny zahrnující atom vodíku, alkylovou skupinu s 1 až 6 atomy uhlíku, alkenylovou skupinu s 2 až 6 atomy uhlíku a alkynylovou skupinu s 2 až 6 atomy uhlíku,

R_4, R_6, R_8 a R_{10}, jsou substituenty nezávisle na sobě vybrané ze skupiny zahrnující atom vodíku, alkylovou skupinu s 1 až 6 atomy uhlíku, alkenylovou skupinu s 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylovou skupinu s 2 až 6 atomy uhlíku, skupinu $-X_2H$, kde atom vodíku je přímo vázán na první atom z X_2, a skupiny $-X_2R_{12}$, kde substituent R_{12} je přímo vázán na první atom z X_2 a případně R_4 a R_6 dohromady tvoří dvojnou vazbou vázaný substituent $-X_2$, případně R_8 a R_{10} dohromady tvoří dvojnou

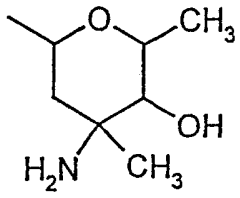
vazbou vázaný substituent $-X_2$, kde každý ze substituentů X_2 je nezávisle na sobě vybraný ze skupiny zahrnující atom kyslíku, skupiny NH, skupiny N-alkyl s 1 až 6 atomy uhlíku, skupiny N-alkenyl s 2 až 6 atomy uhlíku, skupiny N-alkynyl s 2 až 6 atomy uhlíku nebo atomy síry, a kde R_{12} jsou nezávisle na sobě vybrané ze skupiny zahrnující alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkenylové skupiny s 2 až 6 atomy uhlíku, alkynylové skupiny s 2 až 6 atomy uhlíku, arylové skupiny nebo acylové skupiny, a

m a n, jsou na sobě nezávisle 1 nebo 2,

ve všech jejich stereoisomerních formách a ve směsích těchto forem v libovolných poměrech a jejich fyziologicky použitelných solí a derivátů.

2. Sloučenina podle nároku 1, obecného vzorce I, ve kterém R_7 je aminosacharid

3. Sloučenina podle nároku 1 nebo 2, obecného vzorce I, ve kterém R_7 je substituent vzorce

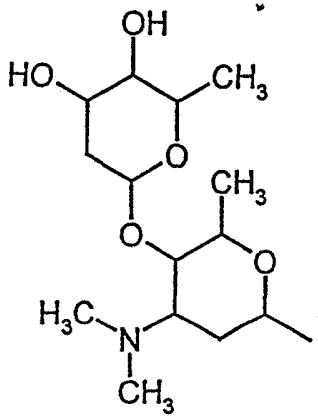


4. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 3, obecného vzorce I, ve kterém n je 2.

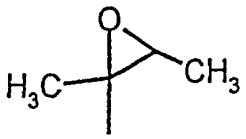
5. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 4, obecného vzorce I, ve kterém R_1 je aminosacharid

6. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 5, obecného vzorce I, ve kterém R_1 je substituent vzorce

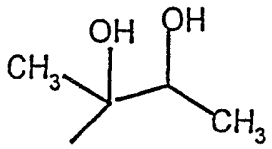
19.08.02



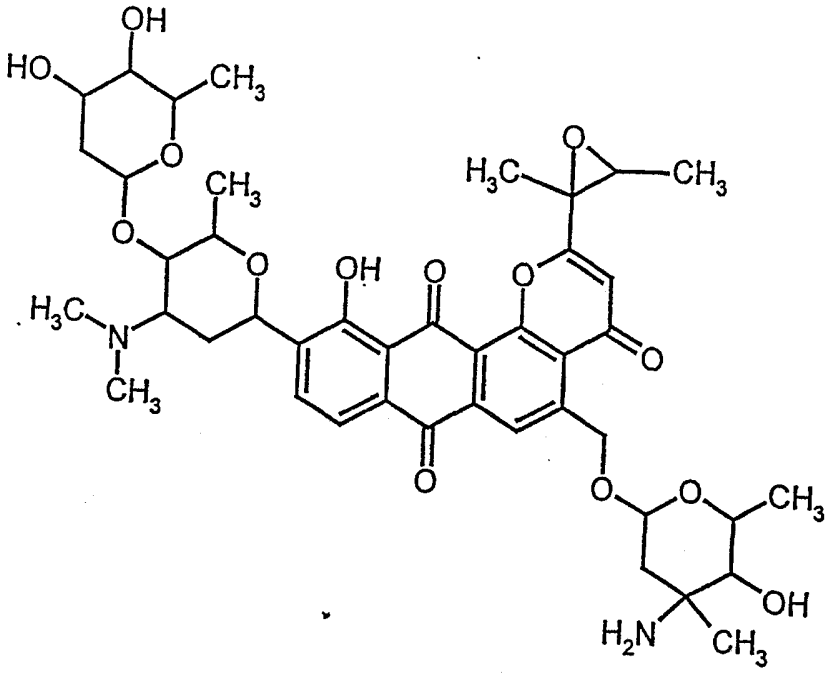
7. Sloučenina podle kteréhokoli z nároků 1 až 6, obecného vzorce I, ve kterém substituent R_3 je vybraný z skupin



a



8. Sloučenina podle nároku 1, vzorce IA

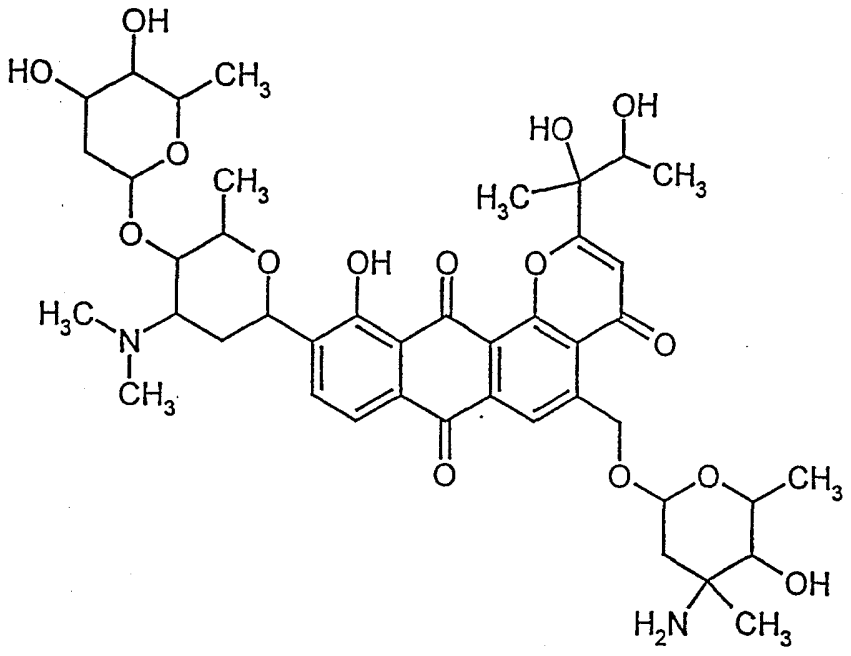


(IA)

19.08.02

ve všech jejích stereoisomerních formách a ve směsích těchto forem v libovolných poměrech a jejích fyziologicky použitelných solí a derivátů.

9. Sloučenina podle nároku 1, vzorce IB

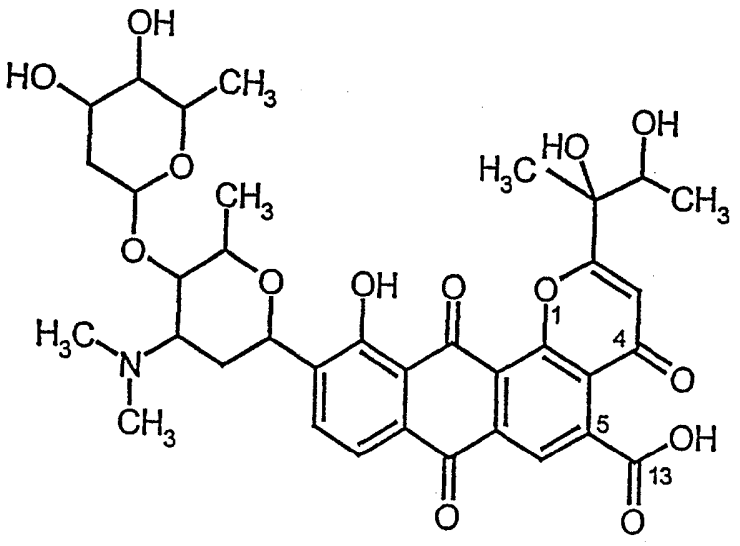


(IB)

ve všech jejích stereoisomerních formách a ve směsích těchto forem v libovolných poměrech a jejích fyziologicky použitelných solí a derivátů.

10. Sloučenina podle nároku 1 vzorce IE

19.08.02



(IE)

ve všech jejích stereoisomerních formách a ve směsích těchto forem v libovolných poměrech a jejích fyziologicky použitelných solí a derivátů.

11. Sloučenina obecného vzorce I podle kteréhokoli z nároků 1 až 10, získatelná kultivací Actinomycetales druhu HAG 003959, DSM 12931, nebo jednoho z jeho variant nebo mutantů za vodných podmínek v živném mediu až je v živném mediu přítomna alespoň jedna sloučenina vzorce I, načež se tato sloučenina izoluje.

12. Sloučenina podle nároku 11, kde tato izolovaná sloučenina se dále převede na alespoň jeden z derivátů a fyziologicky použitelných solí.

13. Prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje alespoň jednu sloučeninu obecného vzorce I podle nároku 1 nebo její fyziologicky použitelnou sůl nebo derivát a přijatelný nosič.

14 Prostředek podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tímto přijatelným nosičem je farmaceuticky použitelný nosič.

15. Způsob přípravy alespoň jedné ze sloučenin obecného vzorce I nebo její fyziologicky použitelné soli podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se kultivuje mikroorganismus Actinomycetales druh HAG 003959, DSM 12931, nebo jedna z jeho variant nebo mutantů, za vhodných podmínek v živném mediu až je v živném mediu přítomna alespoň jedna ze sloučenin obecného vzorce I, načež se sloučenina izoluje.

16. Způsob podle nároku 15 v y z n a č u j í c í s e t í m, že se izolovaná sloučenina dále převede na alespoň jednu sloučeninu vybranou z derivátů a fyziologicky použitelných solí.

17. Způsob podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se kultivace provádí za aerobních podmínek při teplotě mezi 18 a 35° C. a při pH mezi 6 a 8.

18. Způsob podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se sloučenina obecného vzorce I převede na její derivát použitím redukčního činidla.

19. Způsob inhibice transkripce alespoň jedné dvouvláknité nukleové kyseliny, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se uvedená dvouvláknitá nukleová kyselina uvede ve styk s účinným množstvím alespoň jedné sloučeniny obecného vzorce 1 podle nároků 1 až 12 nebo fyziologicky aktivních solí nebo jejich derivátem.

20. Použití alespoň jedné sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 až 12 nebo jejích fyziologicky použitelných solí nebo derivátů pro přípravu cytostatik.

21. Použití alespoň jedné sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 až 12 nebo jejích fyziologicky použitelných solí nebo derivátů pro přípravu léků pro léčení nádorů tlustého střeva.

22. Použití alespoň jedné sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 až 12 nebo jejích fyziologicky použitelných solí nebo derivátů pro přípravu léků pro léčení prsních nádorů.

23. Použití alespoň jedné sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 až 12 nebo jejích fyziologicky použitelných solí nebo derivátů pro přípravu léků pro léčení plicních nádorů.

24. Použití alespoň jedné sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 až 12 nebo jejích fyziologicky použitelných solí nebo derivátů pro přípravu léků pro léčení nádorů prostaty.

25. Použití alespoň jedné sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 až 12 nebo jejích fyziologicky použitelných solí nebo derivátů pro přípravu léků pro léčení leukemie.

26. Použití alespoň jedné sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 až 12 nebo jejích fyziologicky použitelných

solí nebo derivátů pro přípravu léků pro léčení mikrobiálních infekcí.

27. Actinomycetales druh HAG 003959 (DSM 12931).