



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2008 005 097 A1** 2009.07.23

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2008 005 097.0**

(22) Anmeldetag: **18.01.2008**

(43) Offenlegungstag: **23.07.2009**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 11/02** (2006.01)

C07K 4/06 (2006.01)

A61K 38/15 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(71) Anmelder:

**Leibnitz-Institut für Meereswissenschaften, 24148
Kiel, DE**

(74) Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 24105 Kiel

(72) Erfinder:

**Imhoff, Johannes, Prof. Dr., 24211 Preetz, DE; Yu,
Zhinguo, Prof. Dr., Shenyang, CN; Lang, Gerhard,
Dr., Marly, CH; Wiese, Jutta, 23701 Eutin, DE;
Kalthoff, Holger, Prof. Dr., 24106 Kiel, DE; Klose,
Stephanie, 24113 Kiel, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

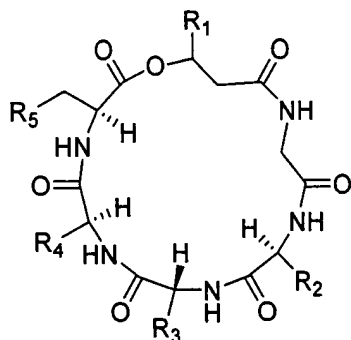
US 52 70 334 A

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Herstellung und Verwendung antitumoraler Cyclodepsipeptide**

(57) Zusammenfassung: Verbindung der allgemeinen
Struktur,



wobei R_1 , R_2 , R_3 und R_4 ausgewählt sind aus der Gruppe,
bestehend aus einem Wasserstoff-Atom (H) und einem
 C_1 - C_{20} -Alkyl, und R_5 ein Phenylrest ist.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft zyklische Peptide, die zur Herstellung von Medikamenten zur Behandlung von Krebserkrankungen geeignet sind. Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur Produktion dieser Verbindungen, sowie deren Verwendung als Arzneimittel.

[0002] Viele Krebserkrankungen sind bislang nicht durch selektiv wirkende biologische Wirkstoffe therapierbar. Nach Angaben der World Health Organization (WHO) wurde weltweit im Jahr 2000 bei ca. 10 Millionen Menschen Krebs diagnostiziert, ca. 6 Millionen verstarben (World Cancer Report 2003. <http://www.iarc.fr/IARCPress/pdfs/wcr/WorldCancerReport.pdf>). Nach Schätzung der WHO wird die Zahl der durch Krebserkrankungen hervorgerufenen Todesfälle bis 2030 auf ca. 11,5 Millionen pro Jahr ansteigen (Worlds Health Statistics – 2007. http://www.who.int/whosis/whostat2007_10highlights.pdf). Ungefähr ab dem Jahr 2010 werden Krebserkrankungen nach Infektionserkrankungen die Hauptursache für Todesfälle darstellen, gefolgt von ischämischen Herzerkrankungen, Apoplexie (Hirnfarkt) und HIV/Aids.

[0003] Peptide, die von Mikroorganismen produziert werden, zählen zu vielversprechenden Kandidaten für die Behandlung von Krebserkrankungen. Beispielsweise Actinomycin D, das von *Streptomyces parvulus* produziert wird, wird bereits als Medikament zur Behandlung von Krebs eingesetzt (BC Cancer Agency Cancer Drug Manual – 1994. http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonly-res/852A1FC3-5BD2-481B-BFAA-45ACBFA77FAC/22684/Dactinomycinmonograph_5APR07.pdf). Thiocoralin, ein Produkt von *Micromonospora marina*, hemmt das Wachstum von Tumorzellen (Romero, F. et al. „Thiocoraline, a New Depsipeptide with Antitumor Activity Produced by a Marine Micromonospora. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation, and Biological Activities.“ *J. Antibiot.* 1997; 50 (9): 734–7). Das marine Pilzisolat *Exserohilum rostratum* produziert die zyklischen Dipeptide Rostratin A-D, die eine zytotoxische Wirkung aufweisen (Tan, R. X. „Isolation and Structure Assignments of Rostratins A-D, Cytotoxic Disulfides Produced by the Marine-Derived Fungus *Exserohilum rostratum*.“ *J. Nat. Prod.* 2004 Aug; 67(8): 1374–82).

[0004] Trotz der weiten Verbreitung der Gattung *Scopulariopsis*, auch im marinen Habitat, gibt es nur begrenzte Kenntnisse über natürliche Produkte aus diesen Organismen. Unseres Wissens ist das einzige bisher bekannte natürliche Produkt aus dieser Gattung ein Pyranol-Derivat, patentiert für seine antimykotische Aktivität (US 5,270,334).

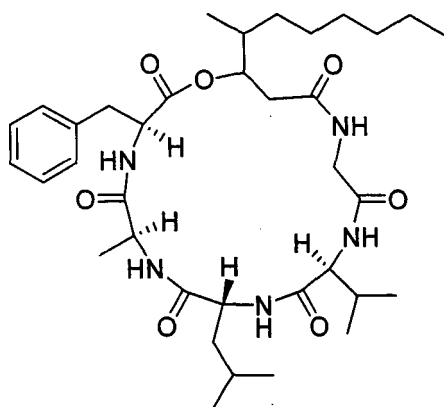
[0005] Im Hinblick auf die große Anzahl von Menschen, die an Krebs erkrankt sind, die ungünstige Prognose für die Heilung bestimmter Krebsarten (z. B. Pankreas) aufgrund der schlechten Wirksamkeit bisheriger Medikamente, Nebenwirkungen und Resistenzentwicklung gegenüber eingesetzten Arzneimitteln besteht ein dringender Bedarf an neuen Krebsmedikamenten.

[0006] Damit liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, weitere antitumoral wirkende Peptide bereitzustellen, sowie einen Weg zu ihrer Produktion aufzuzeigen.

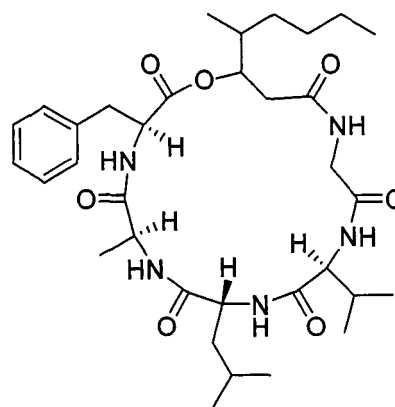
[0007] Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch die Verbindung mit den Merkmalen von Anspruch 1 gelöst. Die Unteransprüche geben vorteilhafte Ausführungen der Erfindung wieder.

[0008] Innerhalb eines wissenschaftlichen Programms zur Isolierung von biologisch aktiven natürlichen Produkten aus marinen Mikroorganismen haben die Erfinder den Pilz *Scopulariopsis brevicaulis*, isoliert aus dem Meeresschwamm *Tethya aurantium*, untersucht.

[0009] Die erfindungsgemäß bevorzugten antitumoralen Peptide Scopularid A und Scopularid B wurden aus Kulturen des Pilzes *Scopulariopsis brevicaulis* durch präparative HPLC isoliert.



Scopularid A



Scopularid B

[0010] Die physikalischen Daten von Scopularid A und B sind in den beigefügten Tabellen 1 und 2 dargestellt, wobei Tabelle 1 die NMR-Daten (600 MHz, MeOD) von Scopularid A und Tabelle 2 die NMR-Daten (600 MHz, MeOD) von Scopularid B zeigt.

[0011] Bei der Untersuchung der antiproliferativen Wirkung gegen Tumorzellen wurde nachgewiesen, dass Scopularid B signifikante Hemmwirkungen gegen Tumorzelllinien zeigt, insbesondere gegen Pankreastumor-Zelllinie Colo357 (s. Beispiel 4).

[0012] Die Anzucht und die Identifizierung des Pilzes *Scopulariopsis brevicaulis*, so wie Aufreinigung von Scopularid A und Scopularid B aus Kulturen des Pilzes und die Bestimmung der antiproliferativen Wirkung gegen Tumorzellen werden in folgenden Beispielen beschrieben.

1) Anzucht einer Kultur des Pilzes *Scopulariopsis brevicaulis*

Die Anzucht der Pilzkulturen für die Gewinnung von Scopulariden erfolgte in 2-Liter-Erlenmeyerkolben, die mit je 700 ml Nährlösung folgender Zusammensetzung (modifiziert nach Wickerham, L. J. „Taxonomy of yeasts.“ US Dept. Technol. Bull. 1951; 1029: 1–56.) beschickt wurden: 3,0 g Hefeextrakt; 3,0 g Malzextrakt; 5,0 g Pepton; 10,0 g Glucose; 30,0 g NaCl; pH 6,8. Die Sterilisation der Nährlösung erfolgte durch Autoklavieren bei 121°C/1 bar, 20 Minuten. Als Inokulum für die experimentelle Pilzkultur wurde von einer 14 Tage alten Vorkultur, die auf WM-Medium angezogen wurde, mit einer Impföse Zellmaterial in den Ansatz der Hauptkultur überführt. Die Inkubation der beimpften Nährlösung erfolgte über einen Zeitraum von 14 Tagen bei konstant 28°C in statischer Kultur im Dunkeln.

2) Identifizierung des Pilzes als *Scopulariopsis brevicaulis*

Die morphologischen Merkmale des Pilzes werden anhand der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen ermittelt. Der Pilz zeigt einzelne Konidiophoren, die aus Hyphen hervorgehen. Die Hyphen sind unverzweigt, oder ein- bzw. zweimal vertikal unterteilt. Die konidiogenen Zellen sind zylindrisch, manchmal mit einer aufgequollenen Basis, und mit einer gleichmäßig weiten annellierende Zone variabler Länge. Die Konidien sind kugelförmig bis oval (4–6 × 6–7 µm) und weisen eine abgeflachte Basis sowie raue Erhebungen auf. Die genetische Identifizierung erfolgt anhand der 18S rDNA-Analyse. Die morphologischen Kennzeichen und die 18S rDNA Sequenz ergeben eine eindeutige Identifizierung des Pilzes als *Scopulariopsis brevicaulis*.

3) Aufreinigung von Scopularid A und Scopularid B aus Kulturen des Pilzes *Scopulariopsis brevicaulis*

Das Pilzmycel wird vom Kulturüberstand abgetrennt, zerkleinert und mit Aceton extrahiert. Der Acetonextrakt wird zur Trockne eingedampft, und der Rückstand wird nacheinander mit einem Methanol-Wasser-Gemisch (2:8) und mit n-Hexan gewaschen. Der verbleibende Rückstand wird einer Auftrennung durch präparative Hochleistungsflüssigchromatographie unterzogen:

Trennsäule:

Phenomenex Luna C18, 21.2 × 250 mm, 5 µm

Lösungsmittel:

Wasser + 0.1% Ameisensäure und Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure (30:70)

Flussrate:

18 ml/min

[0013] Die Substanzen Scopularid A und Scopularid B werden nach 13 bzw. 8 min eluiert. Nach Entfernen der Lösungsmittel durch Trocknen am Vakuum erhält man die erwünschten Reinsubstanzen als weiße Feststoffe.

4) Bestimmung der antiproliferativen Wirkung gegen Tumorzellen

Die Substanzen Scopularid A und Scopularid B zeigten signifikante Hemmwirkungen gegen Tumorzelllinien, insbesondere Pankreastumor-Zelllinien Colo357 und Panc89 sowie Darmtumorzelllinie HT29 (durchschnittlich zwischen 25–50% Hemmung bei 10 µg/ml). Diese Aktivität wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt (Siegmond, D. et al. „Death receptorinduced signalling pathways are differentially regulated by gamma interferon upstream of caspase 8 processing.“ Mol. Cell. Biol. 2005; 25: 6363–6379).

Tabelle 1: Scopularid A

Farbloser feinkristalliner Feststoff.

Schmelzpunkt: 229–230°C

Optische Aktivität: $[\alpha]_{25D} -38^\circ$ (c 0.5, MeOH)

HRESIMS: m/z 672.4331 [M + H]⁺ (berechnet für C₃₆H₅₈N₅O₇ 672.4336)

NMR-Daten (600 MHz; in MeOH-d₄)

[0014]

Position		δ_c , mult.	δ_H (J in Hz)	COSY	HMBC
Phe	1	173.6, qC			
	2	55.3, CH	4.79, m	3a, 3b	1, 3
	3	39.4, CH ₂	3.18, dd (13.5, 7.5)	2, 3b	1, 2, 4, 5/9
			3.03, dd (13.5, 8.2)	2, 3a	1, 2, 4, 5/9
	4	137.8, qC			
	5/9	130.3, CH	7.24, m	6/8	3, 7, 5/9
	6/8	129.6, CH	7.28, m	5/9	4, 6/8
7	128.0, CH	7.21, m		5/9	
Ala	1	174.1, qC			
	2	50.3, CH	4.29, q (7.3)	3	1, 3, Leu-1
	3	17.6, CH ₃	1.27, d (7.3)	2	1, 2
Leu	1	175.1, qC			
	2	54.7, CH	4.19, m	3	1, 3, 4
	3	40.3, CH ₂	1.58, m	2, 4	1, 2, 4
	4	26.0, CH	1.68, m	3, 5, 6	2, 3, 5, 6
	5	23.1, CH ₃	1.00, d (6.6)	4	3, 4, 6
	6	22.3, CH ₃	0.95, d (6.6)	4	3, 4, 5
Val	1	173.4, qC			
	2	59.9, CH	4.20, m	3	1, 3, 4, Gly-1
	3	31.0, CH	2.19, m	2, 4, 5	1, 2, 4, 5
	4	19.0, CH ₃	0.98, d (6.7)	3	2, 3, 5
	5	19.7, CH ₃	0.97, d (6.7)	3	2, 3, 4
Gly	1	171.9, qC			
	2	44.0, CH ₂	4.24, d (16.8)		1, HMDA-1
			3.53, d (16.8)		1, HMDA-1
HMDA ^a	1	174.5, qC			
	2	40.9, CH ₂	2.42, m	3	1, 3, 4
	3	78.6, CH	4.77, m	2, 4	2, 4, 4-Me
	4	39.0, CH	1.54, m	3, 4-Me	
	5	3 3.6, CH ₂	1.22, m		
			0.95, m		
	6	30.6, CH ₂	1.30, m		
	7	28.2, CH ₂	1.29, m		
	8	3 3.0, CH ₂	1.26, m		
	9	23.7, CH ₂	1.31, m	10	
	10	14.42 CH ₃	0.91, t (7.2)	9	9, 8
4-Me	14.41, CH ₃	0.83, d (6.9)	4	3, 4, 5	

^aHMDA: 3-Hydroxy-4-methyldecansäure

Tabelle 2: Scopularid B

Weißer, amorpher Feststoff

Optische Aktivität: $[\alpha]_{25D} -43^\circ$ (c 0.5, MeOH)

HRESIMS: m/z 644.4007 [M + H]⁺ (berechnet für C₃₄H₅₄N₅O₇ 644.4023)

NMR-Daten (600 MHz; in MeOH-d₄)

[0015]

Position		δ_c , mult.	δ_H (J in Hz)	COSY	HMBC
Phe	1	173.6, qC			
	2	55.3, CH	4.78, m	3a, 3b	1, 3
	3	39.4, CH ₂	3.18, dd (13.5, 7.5)	2, 3b	1, 2, 4, 5/9
			3.03, dd (13.5, 8.2)	2, 3a	1, 2, 4, 5/9
	4	137.8, qC			
	5/9	130.3, CH	7.24, m	6/8	3, 7, 5/9
	6/8	129.6, CH	7.28, m	5/9	4, 6/8
7	128.0, CH	7.21, m		5/9	
Ala	1	174.1, qC			
	2	50.3, CH	4.29, q(7.3)	3	1, 3, Leu-1
	3	17.6, CH ₃	1.28, d(7.3)	2	1, 2
Leu	1	175.1, qC			
	2	54.7, CH	4.19, m	3	1, 3, 4
	3	40.4, CH ₂	1.58, m	2, 4	1, 2, 4
	4	26.0, CH	1.69, m	3, 5, 6	2, 3, 5, 6
	5	23.1, CH ₃	0.99, d (6.6)	4	3, 4, 6
	6	22.3, CH ₃	0.95, d (6.6)	4	3, 4, 5
Val	1	173.4, qC			
	2	59.9, CH	4.20, m	3	1, 3, 4, Gly-1
	3	31.0, CH	2.18, m	2, 4, 5	1, 2, 4, 5
	4	19.0, CH ₃	0.98, d (6.7)	3	2, 3, 5
	5	19.7, CH ₃	0.97, d (6.7)	3	2, 3, 4
Gly	1	171.9, qC			
	2	44.0, CH ₂	4.24, d (16.8)		1, HMOA-1
			3.53, d (16.8)		1, HMOA-1
HMOA ^a	1	174.5, qC			
	2	40.9, CH ₂	2.41, m	3	1, 3, 4
	3	78.6, CH	4.77, m	2, 4	2, 4, 4-Me
	4	39.0, CH	1.54, m	3, 4-Me	
	5	33.3, CH ₂	1.22, m		
			0.96, m		
	6	30.5, CH ₂	1.32, m	6b	
			1.32, m	6a	
	7	23.8, CH ₂	1.16, m	8	
	8	14.38 CH ₃	0.90, t (7.2)	7	6, 7
4-Me	14.41, CH ₃	0.83, d (6.9)	4	3, 4, 5	

^aHMOA: 3-Hydroxy-4-methyloctansäure

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

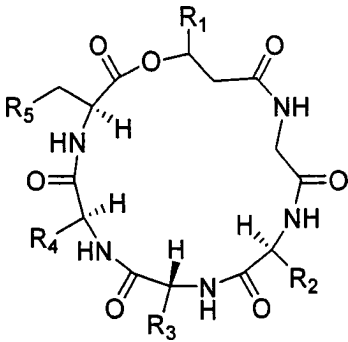
- US 5270334 [0004]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- <http://www.iarc.fr/IARCPress/pdfs/wcr/WorldCancerReport.pdf> [0002]
- http://www.who.int/whosis/whostat2007_10highlights.pdf [0002]
- http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonly-res/852A1FC3-5BD2-481B-BFAA-45ACBFA77FAC/22684/Dactinomycinmonograph_5APR07.pdf [0003]
- Romero, F. et al. „Thiocoraline, a New Depsipeptide with Antitumor Activity Produced by a Marine Microspora. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation, and Biological Activities." J. Antibiot. 1997; 50 (9): 734–7 [0003]
- Tan, R. X. „Isolation and Structure Assignments of Rostratins A-D, Cytotoxic Disulfides Produced by the Marine-Derived Fungus Exserohilum rostratum." J. Nat. Prod. 2004 Aug; 67(8): 1374–82 [0003]
- Wickerham, L. J. „Taxonomy of yeasts." US Dept. Technol. Bull. 1951; 1029: 1–56. [0012]
- Siegmund, D. et al. „Death receptorinduced signalling pathways are differentially regulated by gamma interferon upstream of caspase 8 processing." Mol. Cell. Biol. 2005; 25: 6363–6379 [0013]

Patentansprüche

1. Verbindung der allgemeinen Struktur



wobei

R_1 , R_2 , R_3 und R_4 ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoff-Atom (H) und einem C_1 - C_{20} -Alkyl,

und

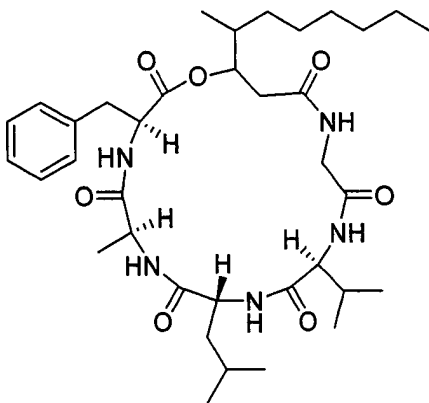
R_5 ein Phenylrest ist.

2. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Alkyl gerade, verzweigt, zyklisch und/oder teilweise ungesättigt und/oder mono- oder polysubstituiert ist.

3. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Phenylrest mono- oder polysubstituiert ist.

4. Verbindung nach einem der Ansprüche 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Substituenten des Alkyls und/oder des Phenylrests ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem linearen oder verzweigten Acylrest, einer Formyl-, Acetyl-, Trichloracetyl-, Fumaryl-, Maleyl-, Succinyl-, Benzoyl-, einer verzweigten oder Heteroatom- oder arylsubstituierten Acylgruppe, einem Halogenrest, einer unsubstituierten oder alkylsubstituierten Aminoalkylgruppe, einer Hydroxylgruppe, einer Ethergruppe und/oder einer freien und mit Alkylgruppen veresterten oder amidierten Carboxylgruppe.

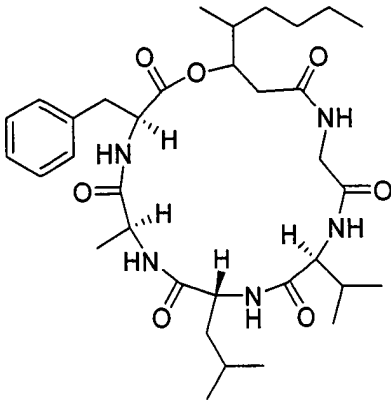
5. Verbindung nach Anspruch 1 der Formel



(Scopularid A)

einschließlich dessen Diastereomere.

6. Verbindung nach Anspruch 1 mit der Formel



(Scopularid B)

einschließlich dessen Diastereomere.

7. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch die Schritte:

- Kultivieren eines Pilzes der Gattung Scopulariopsis auf an sich bekannte Weise und
- Isolieren der Verbindung aus dem Kulturmedium und/oder dem Pilz.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Pilz *Scopulariopsis brevicaulis* ist.

9. Verwendung einer Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 6 als Arzneimittel.

10. Verwendung der Substanz nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Arzneimittel ein Antitumormittel ist.

11. Verwendung der Substanz nach einem der Ansprüche 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Arzneimittel ein Arzneimittel zur Behandlung von und zur Vorbeugung vor Pankreaskrebs ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen