



(10) **DE 10 2008 005 097 B4** 2011.04.07

(12)

## Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2008 005 097.0**  
(22) Anmeldetag: **18.01.2008**  
(43) Offenlegungstag: **23.07.2009**  
(45) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: **07.04.2011**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07K 11/02 (2006.01)**  
**C07K 4/06 (2006.01)**  
**A61K 38/15 (2006.01)**  
**A61P 35/00 (2006.01)**

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:  
**Leibniz-Institut für Meereswissenschaften, 24148  
Kiel, DE**

(74) Vertreter:  
**BOEHMERT & BOEHMERT, 24105 Kiel**

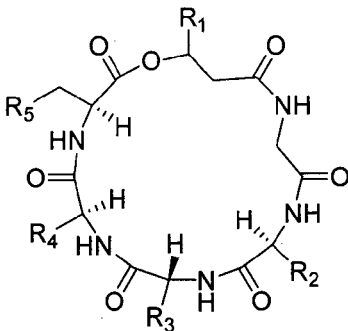
(72) Erfinder:  
**Imhoff, Johannes, Prof. Dr., 24211 Preetz, DE; Yu,  
Zhinguo, Prof. Dr., Shenyang, CN; Lang, Gerhard,  
Dr., Marly, CH; Wiese, Jutta, 23701 Eutin, DE;  
Kalthoff, Holger, Prof. Dr., 24106 Kiel, DE; Klose,  
Stephanie, 38448 Wolfsburg, DE**

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

**US 52 70 334 A**

(54) Bezeichnung: **Antitumoraler Cyclodepsipeptide, deren Herstellung und Verwendung**

(57) Hauptanspruch: Verbindung der allgemeinen Struktur



wobei

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> und R<sub>4</sub> ausgewählt sind aus der Gruppe beste-  
hend aus einem Wasserstoff-Atom (H) und einem C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-  
Alkyl,

und

R<sub>5</sub> 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 gemäß dem Patentansprüchen.

**[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/IARC-Press/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](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/rdonlyres/852A1FC3-5BD2-481-B-BFAA-45ACBFA77FAC/22684/Dactinomycinmonograph\\_5APR07.pdf](http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonlyres/852A1FC3-5BD2-481-B-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).

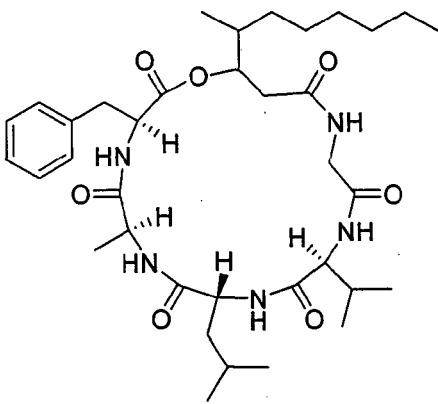
**[0005]** Im Hinblick auf die große Anzahl von Menschen, die an Krebs erkrankt sind, die ungünstige Prognose für die Heilung bestimmter Krebsarten (z. B. Pankreas) aufgrund der schlechten Wirksamkeit bisheriger Medikamente, Nebenwirkungen und Resistenzentwicklung gegenüber eingesetzten Arzneimitteln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

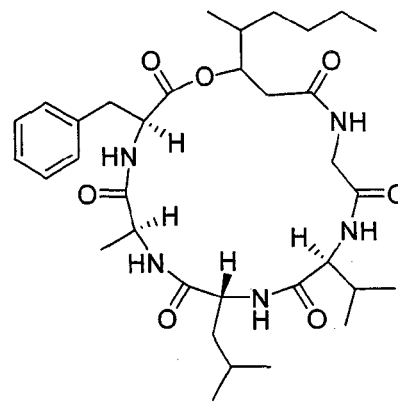
**[0007]** Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch die Verbindung mit den Merkmalen von Anspruch 1 gelöst. Die Unteransprüche geben vorteilhafte Ausführungen der Erfindung wieder.

**[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 beigegeführten 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 Pankreastumorzelllinie 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*

**[0013]** 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/l 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*

**[0014]** 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 rauhe 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*

**[0015]** 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% Ameisen saure (30:70)
Flussrate:	18 ml/min

**[0016]** 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

**[0017]** 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]<sup>+</sup> (berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>58</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 672.4336)

NMR-Daten (600 MHz; in MeOH-d<sub>4</sub>)

#### [0018]

Position		δ <sub>c</sub> , mult.	δ <sub>H</sub> (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 <sub>2</sub>	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 <sub>3</sub>	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 <sub>2</sub>	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 <sub>3</sub>	1.00, d (6.6)	4	3, 4, 6
	6	22.3, CH <sub>3</sub>	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 <sub>3</sub>	0.98, d (6.7)	3	2, 3, 5
	5	19.7, CH <sub>3</sub>	0.97, d (6.7)	3	2, 3, 4

Gly	1	171.9, qC			
	2	44.0, CH <sub>2</sub>	4.24, d (16.8)		1, HMDA-1
			3.53, d (16.8)		1, HMDA-1
HMDA <sup>a</sup>	1	174.5, qC			
	2	40.9, CH <sub>2</sub>	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	33.6, CH <sub>2</sub>	1.22, m		
			0.95, m		
	6	30.6, CH <sub>2</sub>	1.30, m		
	7	28.2, CH <sub>2</sub>	1.29, m		
	8	33.0, CH <sub>2</sub>	1.26, m		
	9	23.7, CH <sub>2</sub>	1.31, m	10	
	10	14.42, CH <sub>3</sub>	0.91, t (7.2)	9	9, 8
	4-Me	14.41, CH <sub>3</sub>	0.83, d(6.9)	4	3, 4, 5

<sup>a</sup>HMDA: 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]<sup>+</sup> (berechnet für C<sub>34</sub>H<sub>54</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 644.4023)

NMR-Daten (600 MHz; in MeOH-d<sub>4</sub>)

[0019]

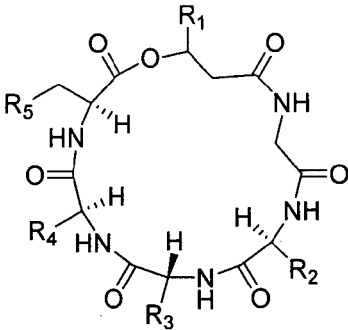
Position		$\delta_C$ , mult.	$\delta_H$ (J in Hz)	COSY	HMBC
Phe	1	173.6, qC			
	2	55.3, CH	4.78, m	3a, 3b	1, 3
	3	39.4, CH <sub>2</sub>	3.18, dd(13.5, 7.5)	2, 3b	1, 2, 4, 5/9
			3.03, dd(13.5, 8.2)	2, 3a	1, 2, 4, 5/9
	4	137.8, qC			
	5/9	130.3, CH	7.24, m	6/8	3, 7, 5/9
	6/8	129.6, CH	7.28, m	5/9	4, 6/8
	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 <sub>3</sub>	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 <sub>2</sub>	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 <sub>3</sub>	0.99, d(6.6)	4	3, 4, 6
	6	22.3, CH <sub>3</sub>	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 <sub>3</sub>	0.98, d(6.7)	3	2, 3, 5
	5	19.7, CH <sub>3</sub>	0.97, d(6.7)	3	2, 3, 4
Gly	1	171.9, qC			
	2	44.0, CH <sub>2</sub>	4.24, d(16.8)		1, HMOA-1
			3.53, d(16.8)		1, HMOA-1
HMOA <sup>a</sup>	1	174.5, qC			
	2	40.9, CH <sub>2</sub>	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 <sub>2</sub>	1.22, m		
			0.96, m		
	6	30.5, CH <sub>2</sub>	1.32, m	6b	
			1.32, m	6a	
	7	23.8, CH <sub>2</sub>	1.16, m	8	
	8	14.38, CH <sub>3</sub>	0.90, t(7.2)	7	6, 7
	4-Me	14.41, CH <sub>3</sub>	0.83, d(6.9)	4	3, 4, 5

<sup>a</sup>BMOA: 3-Hydroxy-4-methyloctansäure

### Patentansprüche

#### 1. Verbindung der allgemeinen Struktur



wobei

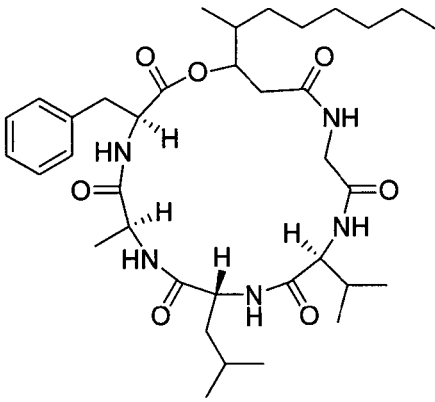
R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> und R<sub>4</sub> ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoff-Atom (H) und einem C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-Alkyl,

und

R<sub>5</sub> ein Phenylrest ist.

2. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Alkyl und/oder der Phenylrest einen Substituenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer Formyl-, Acetyl-, Trichloracetyl-, Fumaryl-, Maleyl-, Succinyl- oder Benzoylgruppe, einem Halogenrest, einer Hydroxylgruppe oder einer Carboxylgruppe aufweist.

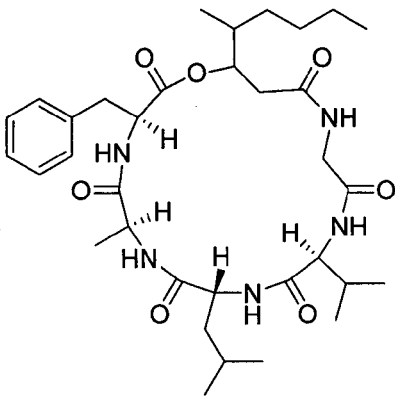
#### 3. Verbindung nach Anspruch 1 der Formel



(Scopularid A)

einschließlich dessen Diastereomere.

4. Verbindung nach Anspruch 1 mit der Formel



(Scopularid B)

einschließlich dessen Diastereomere.

5. 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.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Pilz *Scopulariopsis brevicaulis* ist.

7. Verwendung einer Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 6 als Antitumormittel.

8. Verwendung der Substanz nach Anspruch 7 zur Behandlung von und zur Vorbeugung vor Pankreaskrebs.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen