



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95895 (13) C2

(51) МПК (2011.01)
C07D 498/18 (2006.01)
A61K 31/436 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
A61P 35/00
A61P 37/06 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

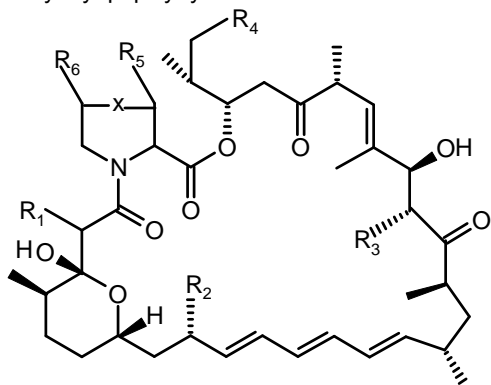
ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) АНАЛОГ 17-ДЕСМЕТИЛРАПАМІЦИНУ ТА СПОСІБ ЙОГО ОДЕРЖАННЯ (ВАРІАНТИ)

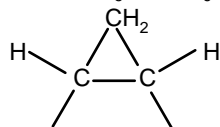
1

2

(21) а200702428
(22) 11.08.2005
(24) 26.09.2011
(86) PCT/GB2005/003158, 11.08.2005
(31) 0417852.1
(32) 11.08.2004
(33) GB
(46) 26.09.2011, Бюл.№ 18, 2011 р.
(72) ГРЕГОРІ МЕТЬЮ АЛАН, GB/GB, МАРТІН КРІ-
СТІН ДЖАНЕТ, GB/GB
(73) БІОТИКА ТЕКНОЛОДЖІ ЛІМІТЕД, GB
(56) WO 2004/007709 A, 22.01.2004
WO 01/34816 A, 17.05.2001
EP 0 589 703 A, 30.03.1994
EP 0 589 703 A, 30.03.1994
(57) 1. Аналог 17-десметилрапаміцину, що має наступну формулу:

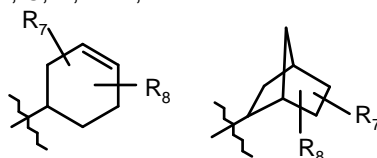


де x є прямим зв'язком, -CH₂-, -S-CH₂-, -CH₂-S- або
-S(=O)-CH₂-;
або -CHR₅-x-CHR₆- є



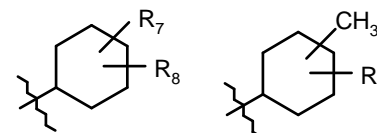
R₁ є =O або (H,H);
R₂ є OH або OMe;
R₃ є H, OH або OMe;

R₄ є структурним фрагментом, вибраним із груп A, B, C, D, E і F,



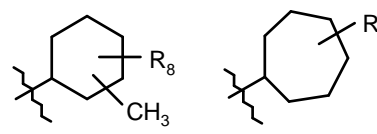
A

B



C

D



F

E

у яких
хвиляста лінія вказує на положення приєднання
фрагмента,

R₇ є H, OH або OMe і

R₈ є H, OH, OMe, галогеном, тіолом або C₁₋₄ алкі-
лом;

або R₄ альтернативно є 7-членним гетероциклом,
який містить один або більше гетероатомів, виб-
раних із групи, яка складається з O, S і N, де гете-
роцикл за необхідності заміщений одним або бі-
льше замісниками, вибраними з C₁₋₄ алкілу, OH, F і
Cl; і

R₅ і R₆ кожний незалежно є H або OH,
або його фармацевтично прийнятним похідним.

2. Сполука за пунктом 1, яка відрізняється тим,
що R₄ є структурним фрагментом, вибраним із

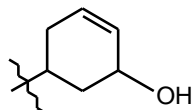
(13) C2

(11) 95895

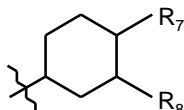
(19) UA

груп A, B, C, E і F, як визначено в пункті 1, де R_7 є H, OH або OMe і R_8 є H, OH, OMe, Cl або F.

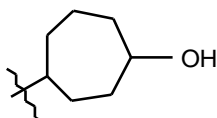
3. Сполука за пунктом 2, яка **відрізняється** тим, що R_4 є структурним фрагментом, вибраним із груп A(i), C(i), E(i) і F(i):



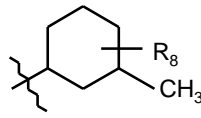
A(i)



C(i)



E(i)



F(i)

де R_7 є H або OH і R_8 є H, OH або OMe.

4. Сполука за будь-яким з попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що коли R_5 є OH, тоді R_6 є H, і коли R_6 є OH, тоді R_5 є H.

5. Сполука за будь-яким з попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що x є прямим зв'язком або CH_2 .

6. Сполука за будь-яким з попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що x є CH_2 .

7. Сполука за будь-яким з попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що R_2 є OH.

8. Сполука за будь-яким з попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що R_1 є (H,H), R_2 є OH, R_3 є H, R_4 є структурним фрагментом C(i), як визначено в пункті 3, за винятком того, що R_7 і R_8 обидва є OH, і x є CH_2 .

9. Сполука за пунктом 1, яка **відрізняється** тим, що R_1 є (H,H), R_2 є OH, R_3 є H, R_4 є структурним фрагментом C(i), як визначено в пункті 3, за винятком того, що R_7 і R_8 обидва є H, і x є CH_2 .

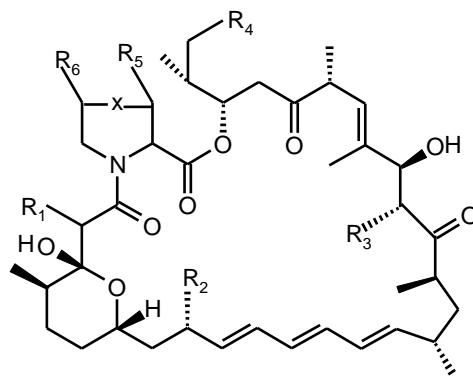
10. Сполука за пунктом 1, яка **відрізняється** тим, що R_1 є (H,H) або =O, R_2 є OH або OMe, R_3 є OH або OMe, R_4 є структурним фрагментом C(i), як визначено в пункті 3, за винятком того, що R_7 є OH і R_8 є H, OH або OMe, і x є CH_2 .

11. Сполука за пунктом 1, яка **відрізняється** тим, що R_1 є =O, R_2 є OH або OMe, R_3 є H, OH або OMe, R_4 є структурним фрагментом C(i), як визначено в пункті 3, за винятком того, що R_7 є OH і R_8 є F або Cl, і x є CH_2 .

12. Сполука за пунктом 1, яка **відрізняється** тим, що R_1 є =O, R_2 є OH, R_3 є OMe, R_4 є структурним фрагментом C(i), як визначено в пункті 3, за винятком того, що R_7 є OH і R_8 є H, і x є CH_2 .

13. Сполука за пунктом 1, яка **відрізняється** тим, що R_1 є =O, R_2 є OH, R_3 є OH, R_4 є структурним фрагментом C(i), як визначено в пункті 3, за винятком того, що R_7 є OH і R_8 є H, і x є CH_2 .

14. Аналог 17-десметилрапаміцину, що має наступну формулу:

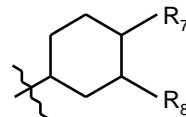


де R_1 є =O,

R_2 є OH,

R_3 є OMe,

R_4 є структурним фрагментом C(i)



C(i)

де R_7 є H або OH і R_8 є H, OH або OMe, за винятком того, що R_7 являє собою OH і R_8 являє собою OMe,

R_5 і R_6 кожен незалежно являє собою H або OH,

x являє собою CH_2 ,

або його фармацевтично прийнятна сіль.

15. Сполука за будь-яким з пунктів 1-14, яка **відрізняється** тим, що вона допустима для застосування в медицині.

16. Застосування сполуки за будь-яким з пунктів 1-14 для приготування медикаменту для індукції або підтримки імунітету, стимуляції нейрональної регенерації або лікування раку, злоякісності В-клітин, грибкових інфекцій, відторгнення трансплантата, захворювання трансплантат-протихазяїна, аутоімунних порушень, запальних захворювань і судинних захворювань.

17. Фармацевтична композиція, яка включає сполуку за будь-яким з пунктів 1-14 або її фармацевтично прийнятну сіль і фармацевтично прийнятний носій.

18. Спосіб одержання аналога 17-десметилрапаміцину за пунктом 1 або 14, де згаданий спосіб включає:

(а) заміну метилмалоніл-КоА-специфічного АТ-домена модуля 10 PKS рапаміцину малоніл-КоА-специфічним АТ-доменом;

(б) експресію генетично модифікованої PKS рапаміцину в придатній клітині-хазяїні;

(в) культивування клітини-хазяїна в таких умовах, коли продукується аналог 17-десметилрапаміцину, включаючи за необхідності постачання екзогенними попередниками;

(г) за необхідності виділення сполуки, продукуючої таким способом.

19. Спосіб одержання рекомбінантного штаму, що містить біосинтетичний кластер, що кодує генетично модифіковану полікетидсинтазу рапаміцину, де метилмалоніл-КоА-специфічний АТ-домен мо-

дуля 10 замінений малоніл-КоА-специфічним АТ-доменом.

20. Спосіб за пунктом 18 або 19, який **відрізняється** тим, що метилмалоніл-КоА-специфічний АТ-домен модуля 10 замінений малоніл-КоА-специфічним АТ-доменом з одного з наступних кластерів: рапаміцину, моненсину, FK506, еритроміцину, FK520, амфотерицину, анголаміцину, тілозину, "xir", FK523, меридаміцину, антаскоміцину, FK525 і тсукубаміцину.

21. Спосіб за пунктом 20, який **відрізняється** тим, що малоніл-КоА-специфічний АТ-домен вибирають із одного з наступних кластерів: рапаміцину, моненсину та FK506.

22. Спосіб за пунктом 21, який **відрізняється** тим, що АТ-домен вибирають із групи, що складається з АТ-домена модуля 2 рапаміцину, АТ-домена модуля 3 моненсину, АТ-домена модуля 6 моненсину, АТ-домена модуля 8 моненсину, АТ-домена модуля 3 FK506 і АТ-домена модуля 7 FK506.

23. Спосіб за пунктом 22, який **відрізняється** тим, що малоніл-КоА-специфічний АТ-домен походить із модуля 2 рапаміцину.

24. Спосіб за будь-яким з пунктів 18-23, який **відрізняється** тим, що спосіб включає додаткові етапи:

(а) виділення АТ, що підлягає введенню як єдиного фрагмента ДНК із придатними фланкуючими ділянками зв'язування рестриктаз,

(б) ампліфікацію та виділення районів послідовності ДНК, гомологічних фланкуючим послідовностям АТ-мішені, з використанням підходящих ділянок зв'язування рестриктаз,

(в) лігування разом трьох фрагментів ДНК, описаних в (а) і (б), з одержанням у фазі з рамкою зчитування послідовності лівосторонньої (LHS) гомології з наступним донорним АТ-доменом з наступною правобічною (RHS) гомологією,

(г) введення повної послідовності з (в) у вектор для введення в штам-хазяїн для одержання кінцевої плазмиди, де згадана плазміда включає:

(I) *oriT* для кон'югації,

(II) один або більше маркерів стійкості,

(III) чутливий до температури ориджин реплікації, так що інтегранти можна буде відбирати шляхом культивування при 37 °C і

(IV) ориджин реплікації *E. coli*,

(д) трансформацію штаму-хазяїна шляхом кон'югації із застосуванням кінцевої плазмиди, як описано в (г) вище,

(е) відбір трансформованих клітин за стійкістю до відповідного антибіотика,

(ж) одержання первинних інтегрантів шляхом культивування при 37 °C із селекцією за допомогою антибіотиків,

(з) скринінг вторинних рекомбінантів шляхом вирощування під час відсутності антибіотика, також при 37 °C,

(і) ідентифікацію потрібного штаму по здатності продукувати цільовий продукт, і

(к) за необхідності підтвердження генетики штаму за допомогою стандартних способів.

25. Спосіб одержання аналога 17-десметилрапаміцину, який **відрізняється** тим, що згаданий спосіб включає:

(а) одержання рекомбінантного штаму за пунктом 19, у якого метилмалоніл-КоА-специфічний АТ-домен модуля 10 PKS рапаміцину замінений малоніл-КоА-специфічним АТ-доменом, і

(б) подання неприродних вихідних кислот культури згаданого рекомбінантного штаму в умовах, що підходять для продукції полікетиду.

26. Спосіб одержання аналога 17-десметилрапаміцину, який **відрізняється** тим, що згаданий спосіб включає:

(а) одержання рекомбінантного штаму за пунктом 19, у якого метилмалоніл-КоА-специфічний АТ-домен модуля 10 PKS рапаміцину замінений малоніл-КоА-специфічним АТ-доменом,

(б) додатково, видалення або інактивацію одного або більше з допоміжних генів рапаміцину, вибраних з *garI*, *garJ*, *garK*, *garL*, *garM*, *garN*, *garO* і *garQ*, і

(в) культивування штаму, отриманого таким чином, за необхідності, у присутності екзогенного попередника, якщо потрібно, для одержання аналога 17-десметилрапаміцину.

27. Спосіб одержання аналога 17-десметилрапаміцину, який **відрізняється** тим, що згаданий спосіб включає:

(а) одержання рекомбінантного штаму за пунктом 19, у якого метилмалоніл-КоА-специфічний АТ-домен модуля 10 PKS рапаміцину замінений малоніл-КоА-специфічним АТ-доменом,

(б) додатково, видалення або інактивацію одного або більше з допоміжних генів рапаміцину, вибраних з *garI*, *garJ*, *garK*, *garL*, *garM*, *garN*, *garO* і *garQ*,

(в) повторне введення всіх або частини допоміжних генів рапаміцину *in-trans* для комплементції або для часткової комплементції делеції,

(г) культивування штаму, отриманого таким чином, за необхідності, у присутності екзогенного попередника, якщо потрібно, для одержання аналога 17-десметилрапаміцину.

28. Спосіб одержання аналога 17-десметилрапаміцину, який **відрізняється** тим, що згаданий спосіб включає:

(а) одержання рекомбінантного штаму за пунктом 19, у якого метилмалоніл-КоА-специфічний АТ-домен модуля 10 PKS рапаміцину замінений малоніл-КоА-специфічним АТ-доменом,

(б) додатково, видалення або інактивацію одного або більше з допоміжних генів рапаміцину, вибраних з *garI*, *garJ*, *garK*, *garL*, *garM*, *garN*, *garO* і *garQ*,

(в) за необхідності повторне введення всіх або частини допоміжних генів *in-trans* для комплементції або для часткової комплементції делеції,

(г) подання неприродних вихідних кислот згаданому рекомбінантному штаму в умовах, які є придатними для продукції полікетидів.

Область техніки, до якої відноситься винахід Даний винахід відноситься до продукції полікетидів і інших природних продуктів і до бібліотек сполук і індивідуальних нових сполук. Тому в одному аспекті даний винахід надає 17-десметилрапаміцин та його аналоги, способи їхнього одержання, включаючи рекомбінантні штами та виділення, і застосування сполук за винаходом. В іншому аспекті даний винахід надає застосування цих нових аналогів рапаміцину для індукції або підтримки імунідепресії, стимуляції регенерації нервової тканини або лікування раку, злоякісності В-клітин, грибкових інфекцій, відторгнення трансплантата, захворювання трансплантат-проти-хазяїна, аутоімунних порушень, запальних захворювань, судинних захворювань та фіброзних захворювань і в регуляції загоєння ран. У конкретному втіленні даний винахід надає способи інженерії біосинтетичних генів, керуючих продукцією рапаміцину, для того, щоб одержувати генетично модифіковані штами, які продукують 17-десметилрапаміцин та його аналоги. Винахід також відноситься до способів одержання бібліотеки аналогів 17-десметилрапаміцину шляхом подання такому штаму неприродних вихідних кислот і до бібліотеки сполук, отриманих таким чином, і до генерації похідних штамів, у яких клоновані гени або касети генів експресуються з метою генерації інших аналогів та способом їхнього одержання й засобам, задіяних тут (наприклад, нуклеїновим кислотам, векторам, касетам генів і генетично модифікованим штамам).

Рівень техніки

Рапаміцин (сиролімус) (Фігура 1) є ліпофільним макролідом, який продукується *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 5491 (Sehgal et al., 1975; Vézina et al., 1975; U.S. 3929992; U.S. 3993749), з 1, 2, 3-трикарбонільною частиною, пов'язаною з лактоном піпеколінової кислоти (Paiva et al., 1991). Інші споріднені макроліди (Фігура 2) включають FK 506 (такролімус) (Schreiber and Crabtree, 1992), FK520 (аскоміцин або імуноміцин) (Wu et al., 2000), FK525 (Hatanaka H. et al., 1989), FK523 (Hatanaka H. et al., 1988), антаскоміцини (Fehr T. et al., 1996) та мерідаміцин (Salituro et al., 1995). Для цілей даного винаходу нумерація атомів рапаміцину дана згідно McAlpine et al., (1991) на проти вагу нумераціям згідно Findlay et al., (1980) або Chemical Abstracts (11th Cumulative Index, 1982-1986 p60719CS).

Полікетидний кістяк рапаміцину синтезується шляхом конденсації «голова-до-хвоста» у цілому семи пропінатних і семи ацетатних ланок з вихідною ланкою похідного шикімат циклогексанкарбонної кислоти (Paiva et al., 1991). Амінокислотопохідне L-лізіна, піпеколінова кислота, конденсується через амідний зв'язок з останнім ацетатом полікетидного кістяка (Paiva et al., 1993), за чим слідує лактонізація з утворенням макроциклу. Район гена розміром 107 тисяч пар основ (т.п.о.), що містить кластер біосинтетичних генів, секвенований (Schwecke et al., 1995). Аналіз із відкритою рамкою зчитування виявив три великі гени, які кодують модульну полікетид-синтазу (PKS)

(Aparicio et al., 1996; Schwecke et al., 1995). Розташований між генами PKS, перебуває ген *rapP*, що кодує білок, з послідовності, яка є подібною, з доменами активації нерибосомальних пептид-синтаз і, як вважається, що діє аналогічним чином (Koenig et al., 1997). Район, що кодує гени PKS, фланкований по обидва боки 24 додатковими відкритими рамками зчитування кодуючими ферменти, які вважаються необхідними для біосинтезу рапаміцину (Molnar et al., 1996). Вони включають наступні ферменти пост-полікетидної модифікації: дві цитохром P-450 монооксигенази, які називають *RapJ* і *RapN*, зв'язаний фередоксин *RapO* та три SAM-залежні O-метилтрансферази *RapI*, *RapM* і *RapQ*. Інші суміжні гени відіграють передбачувану роль у регуляції та експорті рапаміцину (Molnar et al., 1996). Кластер також містить ген *rapL*, продукт якого *RapL*, як передбачається, каталізує утворення попередника рапаміцину L-піпеколінову кислоту шляхом циклодеамінації L-лізіна (Khaw et al., 1998; Paiva et al., 1993).

Полікетидна серцевина рапаміцину збирається дуже великими багатофункціональними білками, які включають полікетид-синтазу Типу I (*rap PKS*). Цей поліпептидний комплекс включає завантажувальний модуль і чотирнадцять модулів, що надбудовують, де кожний модуль відповідає як за додавання конкретного попередника ацил-коа до зростаючого полікетидного ланцюга так і за ступінь відновлення β-кетокарбонільної групи. Кожний модуль здійснює кілька біохімічних реакцій, які проводяться окремими доменами поліпептиду. Всі модулі, що надбудовують, містять домен ацилтрансферази (AT), що вибирає та потім донує ацильну групу попередника домену білка-переносника ацила (ACP), і домен β-кетосинтази (KS), що потім додає вже існуючий полікетидний ланцюг до нового ацил-ACP шляхом декарбоксилуючої конденсації. Додаткові домени присутні на деяких модулях, що надбудовують: домени β-кеторедуктази (KR), які відновлюють β-кето-групи до гідроксилів, домени дегідратази (DH), які діють на гідроксили для одержання подвійних зв'язків, і домени еноїлредуктази (ER), які відновлюють подвійні зв'язки з одержанням насичених вуглеців. Передбачено, що присутні в модулях 3 і 6 домени процесингу (обробки) β-кето-груп, неактивні, оскільки дія цих доменів не відображена в основній структурі. Кінцевий модуль, що надбудовує (модуль 14), очевидно, не містить доменів обробки β-кето-груп. Запуск біосинтезу рапаміцину відбувається шляхом включення 4,5-дигідроксициклогекс-1-енокарбонної кислоти, яка отримана шикіматним шляхом (Lowden, P. A. S., et al. 2001) і є загальною для інших FKBP-зв'язуючих молекул, таких як FK506 і FK520 (Фігура 2). Слідом за біосинтезом полікетидна, модуль NRPS, що кодується *rapP*, включає піпеколінову кислоту (похідне L-лізіна), що конденсується через амідний зв'язок з останнім ацетатом полікетидного кістяка (Paiva et al., 1993). За цим слідує лактонізація з утворенням макроциклу.

Нуклеотидна послідовність кожного із трьох генів PKS рапаміцину, NRPS-гена, який кодує, та фланкуючі послідовності пізніх генів і відповідних

поліпептидів ідентифіковані Aparicio et al., 1996, і Schwecke et al., 1995 і поміщені в NCBI під інвентарним номером X86780 і виправлення цієї послідовності недавно опубліковані в WO 04/007709.

Перший вільний від ферментів продукт класу біосинтезу рапаміцину названий пре-рапаміцином (WO 04/007709, Gregory et al., 2004). Одержання повністю доробленого рапаміцину вимагає додаткової обробки полікетид/NRPS-серцевини за допомогою ферментів, які кодуються пізніми генами рапаміцину RapJ, RapN, RapO, RapM, RapQ і RapI.

Рапаміцин має велике фармакологічне значення через широкий спектр активностей, що проявляються цією сполукою; це надає особливого значення необхідності одержання нових аналогів цих ліків. Рапаміцин проявляє помірну протигрибкову активність, в основному проти видів *Candida*, а також проти нитчатих грибків (Baker et al., 1978; Sehgal et al., 1975; Vézina et al., 1975; U.S. 3929992; U.S. 3993749). Рапаміцин інгібує проліферацію клітин, націлюючись на шляхи трансдукції сигналу в різних типів клітин, тобто шляхом інгібування сигнальних шляхів, необхідних для переходу з G₁ в S-фазу клітинного циклу (Kuo et al., 1992). У Т-клітинах рапаміцин інгібує проведення сигналу від рецептора IL-2 і наступну аутопроліферацію Т-клітин, приводячи до імунодепресії. Інгібуючі ефекти рапаміцину не обмежуються Т-клітинами, оскільки рапаміцин інгібує проліферацію багатьох типів клітин ссавців (Brunn et al., 1996). Тому рапаміцин є сильним імунодепресантом із установленими або передбаченими терапевтичними застосуваннями для запобігання відторгнення органа алотрансплантата та для лікування аутоімунних захворювань (Kahan et al., 1991). 40-O-(2-гідрокси) етил-рапаміцин (SDZ RAD, Certican, everolimus) є напівсинтетичним аналогом рапаміцину, що проявляє імунодепресивні фармакологічні дії (Sedrani, R. et al., 1998; Kirchner et al., 2000; U.S. 5,665,772). Схвалення цих ліків отримане для Європи в 2003 році та, як очікується, буде отримане в US незабаром. Ефір рапаміцину CCI-779 (Wyeth-Ayerst) інгібує ріст клітин *in vitro* та інгібує ріст пухлин *in vivo* (Yu et al., 2001). CCI-779 у даний час перебуває у фазі III клінічних випробувань. Значення рапаміцину для лікування хронічного плямистого псоріазу (Kirby and Griffiths, 2001), можливе застосування таких ефектів як стимуляція росту аксонів у PC12 клітин (Lyons et al., 1994), блокування проліферативних відповідей на цитокіни в клітин судинної та гладкої мускулатури після механічного поранення (Gregory et al., 1993) і його роль у запобіганні фіброзу алотрансплантату (Waller and Nicholson, 2001) є областями інтенсивних досліджень (Kahan and Camardo, 2001). Недавні повідомлення показують, що рапаміцин зв'язується зі зниженою наявністю рака у хворих з алотрансплантатами органів при тривалій імунодепресивній терапії, ніж у таких при інших імунодепресивних курсах лікування та що ця знижена частота захворювання раком обумовлена інгібуванням ангиогенезу (Guba et al., 2002). Показано, що нейротрофічні активності імунофілінових лігандів незалежні від їхньої імунодепресивної активно-

сті (Steiner et al., 1997) і що стимуляції росту нервової тканини сприяє руйнування комплексу зрілих стероїдних рецепторів, як описано в патентній заявці WO 01/03692. Виявлено побічні дії такі як гіперліпідемія та тромбоцитопенія, а також можливі тератогенні дії (Hentges et al., 2001; Kahan and Camardo, 2001).

Рапаміцин діє на сигнальні каскади усередині клітин шляхом інгібування p70^{S6k} кінази, серин/треонін кінази у вищих еукаріотів, які фосфорилують рибосомальний білок S6 (Ferrari et al., 1993; Kuo et al., 1992). Білок S6 перебуває в рибосомальній субодиниці 40S та, як вважається, є важливою функціональною ділянкою, залученою у зв'язування тРНК і мРНК. Регуляція трансляції мРНК шляхом фосфорилування p70^{S6k} постульована (Kawasome et al., 1998). Рапаміцин інгібує синтез білка шляхом дії на інші пов'язані з ростом події, включаючи активність циклін-залежних кіназ, фосфорилування модулятора цАМФ-респонсивного елемента (CREM) і фосфорилування білка, який зв'язує фактор елонгації 4E-BP1 (PHAS1) (Hung et al., 1996). Ліки індують накопичення дефосфорильованих видів 4E-BP1, які зв'язуються з фактором ініціації трансляції eIF-4E, у такий спосіб придушуючи ініціацію трансляції кап-залежних мРНК (Hara et al., 1997; Raught et al., 2001).

Вважається, що фармакологічні дії рапаміцину, охарактеризовані на даний момент, опосередковані взаємодією із цитозольними рецепторами, які називають FKBP або імунофілінами. Імунофіліни (цей термін застосовується для позначення білків, що зв'язують імунодепресант) катализують цис і транс-ізомеризацію зв'язків пептидил-пролін і належать до висококонсервативного сімейства ферментів, виявлених у широкій розмаїтості організмів (Rosen and Schreiber, 1992). Дві більші групи ферментів, що належать до сімейства імунофілінів, представлені FKBP та циклофілінами (Schreiber and Crabtree, 1992). Основним внутрішньоклітинним рецептором рапаміцину в еукаріотичних Т-клітин є FKBP12 (DiLella and Craig, 1991) і комплекс, який утвориться, специфічно взаємодіє з білками-мішенями, так щоб інгібувати каскад передачі сигналу в клітині. Аналіз кристалічної структури комплексу FKBP 12-рапаміцин ідентифікував рапаміцин-єднальний фармакофор, який назвали «єднальним доменом» (Van Duyn et al., 1993) (див. Фігуру 1). «Єднальний домен» необхідний для взаємодії з імунофіліном і складається з району C-1 - C-14, включаючи складноефірний зв'язок, кільце похідне піпеколінової кислоти, дикарбоніл і кільце семикеталю. Взаємодія характеризується багатьма гідрофобними контактами та декількома водневими зв'язками, включаючи одну з гідроксильною групою на циклогексановому кільці. Піпеколінове кільце (C2 - N7) глибше всього проникає в білок, де воно оточено висококонсервативними залишками ароматичних амінокислот, що вистилають гідрофобну єднальну порожнину. Обидві карбонільні групи C1 і C8 залучені до утворення водневих зв'язків і C9 карбонільна група висунута в кишеню, утворену трьома зовсім консервативними залишками ароматичних амінокис-

лот (один тирозин і два фенілаланіни) в FKBP12. Домен комплексу імунофілін-ліганд, що взаємодіє з білками-мішенями, виступає з FKBP.

Більшість імунофілінів не представляються прямо залученими в імунодепресивні активності та порівняно мало відомо про їх природні ліганди, хоча кандидати на роль природних лігандів FKBP, які називають FKBP-зв'язаними білками (FA), такі як FAP48 і FAP1, були описані. Специфічна взаємодія FAP з FKBP під час утворення комплексів запобігає рапаміцином залежним від дози чином (Chambraud et al., 1996; Kunz et al., 2000). Очевидно, імунофіліни зайняті в широкому спектрі клітинних активностей, таких як укладання білків, складання та переміщення білків, со-регуляція молекулярних комплексів, включаючи білки теплового шоку, стероїдні рецептори, іонні канали, взаємодії клітини із клітиною та транскрипцію і трансляцію генів (Galat 2000; Hamilton and Steiner 1998). Всі імунофіліни мають властивість організовувати вторинну структуру білків шляхом цис-транс-ізомеризації зв'язку пептид-пролін і декілька імунофілінів виявлено в ендоплазматичному ретикулюмі, основному місці синтезу білка в клітині. На додаток до FKBP12 (US 5109112), інші імунофіліни включають FKBP12.6 (US 5457182), FKBP13 (Hendrickson et al., 1993; U.S. 5498597), FKBP25 (Hung and Schreiber, 1992; Jin et al., 1992), FKBP14.6 (U.S. 5354845), FKBP52 (U.S. 5763590), FKBP60 (Yem et al., 1992) і FKBP65 (Patterson et al., 2000).

Мішень рапаміцин-FKBP12 комплексу ідентифікована в дріжджів як TOR (target of rapamycin) (Alarcon et al., 1999) і білок ссавців відомий як FRAP (FKBP-rapamycin associated protein) або mTOR (mammalian target of rapamycin) (Brown et al., 1994). Ці білки демонструють значну подібність із фосфотрансферазними доменами фосфатидилінозитол 3-кінази і те спостереження, що крапкова мутація в FKBP 12-рапаміцин зв'язуючому домені (FRB) в mTOR усуває кіназну активність mTOR, надає доказ участі FRB у роботі кіназного домена (Vilella-Bach et al., 1999). Отримано кристалічну структуру FKBP 12-рапаміцину з усіченою формою mTOR, що містить FRB-домен (Chen et al., 1995), визначаючи в такий спосіб «ефекторний» домен рапаміцину (Choi et al., 1996; Liang et al., 1999). Аналіз кристалічної структури виявляє, що білок-білкові контакти досить обмежені в порівнянні із взаємодією між рапаміцином і кожним білком. Ніякі водневі зв'язки між рапаміцином і FRB не ідентифіковані. Взаємодія зосереджена в серії гідрофобних контактів між триєновим районом рапаміцину та в основному ароматичними залишками FRB (Liang et al., 1999). Найбільш глибоко зануреними атомами рапаміцину є метил, з'єднаний із C23 (див. Фігуру 1). Район C23-C24 і циклогексильне кільце рапаміцину утворюють гідрофобні контакти з FRB. Невелика конформаційна зміна рапаміцину очевидна між подвійним та потрійним комплексами (Liang et al., 1999).

Виявлено розбіжності між біологічними ефектами аналогів рапаміцину, модифікованих по C16 метокси-групі, та їхньою здатністю зв'язувати FKBP12 і постульоване розташування замісників у

C16 на поверхні розділу між FKBP12 і mTOR (Luengo et al., 1995). Аналіз кристалічної структури FKBP12 з не-імунорепресивним 28-О-метил-рапаміцином виявляє велике розходження орієнтації циклогексильного кільця, що може призвести до порушення зв'язування mTOR (Kallen et al., 1996).

Описано зв'язок між передачею сигналу mTOR і синтезом білка, який перебуває в нейронах, його дія на рівень фосфорилування білків, включених у контроль трансляції, надлишок компонентів апарата трансляції на транскрипційному та трансляційному рівнях, контроль активності пермеази амінокислот і координація транскрипції багатьох ферментів, включених у метаболічні шляхи (Raught et al., 2001). Чутливі до рапаміцину шляхи передачі сигналу також, очевидно, відіграють важливу роль в ембріональному розвитку мозку, навчанні та формуванні пам'яті (Tang et al., 2002). Дослідження TOR білків у дріжджів також виявляє їхню роль у модуляції чутливих до живильних речовин шляхів передачі сигналу (Hardwick et al., 1999). Подібним чином, mTOR ідентифікований як пряма мішень для дії протеїнкінази B (akt) і як відіграючий ключову роль у передачі сигналу інсуліну (Shepherd et al., 1998; Navé et al., 1999). TOR ссавців також включена в поляризацію актинового цитоскелету та регуляцію ініціації трансляції (Alarcon et al., 1999). Фосфатидилінозит 3-кінази, такі як mTOR, задіяні в декількох аспектах патогенезу пухлин, таких як прогресія клітинного циклу, адгезія, клітинне виживання та ангіогенез (Roymans and Siegers, 2001).

Безліч FKBP, присутніх у різних типах клітин, також підкреслює користь виділення нових аналогів FKBP-ліганда з можливо зміненими зв'язуючим та/або ефекторним доменами. Наприклад, саме інгібування ферменту ротамази FKBP52, що утворює частину комплексу стероїдного рецептора, ідентифіковано як механізм, за допомогою якого аналоги рапаміцину (та інші FKBP 12- зв'язуючі сполуки) стримують (moderate) регенерацію нервової тканини і ріст аксонів (WO 01/03692).

Фармакокінетичні дослідження рапаміцину та аналогів рапаміцину продемонстрували необхідність розробки нових сполук рапаміцину, які були б більш стабільними в розчині, більш стійкими до метаболічної атаки та/або володіли б поліпшеною біодосяжністю. Багато звертаються до модифікації рапаміцину по хімічно доступних положеннях (див. нижче). Однак цей підхід обмежений усього декількома ділянками, доступними для хімічної модифікації та надалі обмежений у своїй застосовності труднощами вибіркової модифікації по конкретній позиції в присутності інших реакційно-здатних ділянок молекули.

Описано ряд аналогів рапаміцину, синтезованих із застосуванням хімічно доступних ділянок. Опис наступних сполук пристосовано до системи нумерації молекули рапаміцину, наведеної на Фігурі 1. Хімічно доступні ділянки молекули для одержання похідних або заміщення включають C40 та C28 гідроксильні групи (наприклад, U.S. №№ 5665772; 5362718), C39 і C16 метокси групи (наприклад WO 96/41807; U.S. 5728710), C32, C26 і

C9 кето-групи (наприклад, U.S. №№ 5378836; 5138051; 5665772). Гідрування по C17, C19 та/або C21, спрямоване на триєни, призводить до збереження протигрибкової активності, але до відносної втрати імунодепресивної активності (наприклад, U.S. №№ 5391730; 5023262). Значне поліпшення стабільності молекули (наприклад, утворення оксимів при C32, C40 та/або C28, U.S. №№ 5563145, 5446048), стійкість до метаболічної атаки (наприклад, U.S. №№ 5912253), біодосяжність (наприклад, U.S. №№ 5221670; 5955457; WO 98/04279) і одержання проліків (наприклад, U.S. №№ 6015815; 5432183) досягнуте шляхом дериватизації. Однак, хімічна модифікація вимагає значних кількостей вихідного рапаміцину та, як із сполукою чутливою до кислоти і луку, з нею важко працювати. Хоча хімічна дериватизація може бути вибірковою по групі, вона навряд чи може бути вибірковою по ділянці. Внаслідок цього, хімічна модифікація часто має потребу в множинних етапах введення та зняття захисту із групи і може призводити до змішаних продуктів з виходами, що варіюють.

Біологічні підходи до одержання нових аналогів рапаміцину спочатку були повільними через труднощі, які зустрілися при роботі з організмом-продуцентом (Lomovskaya et al., 1997; Kieser et al., 2000) незважаючи на доступність послідовності кластера генів біосинтезу рапаміцину з *S. hygroscopicus* (Aparicio et al., 1996; Schwecke et al., 1995). Недавня патентна заявка даного винахідника описує більш широкий спектр аналогів рапаміцину, ніж доступні раніше, шляхом модифікації шляху біосинтезу рапаміцину за допомогою маніпуляції пост-rKS генами, що модифікують (WO 04/007709). Інші аналоги також можуть бути отримані за допомогою подання альтернативних щодо природної вихідних кислот PKS рапаміцину, які включаються в структуру рапаміцину (WO 04/007709). Хоча ці способи відкривають доступ до значно більшого хімічного простору навколо молекули рапаміцину, цей підхід не дозволяє модифікувати центральний кістяк молекули рапаміцину, що кодується генами полікетид-синтази типу I.

Описане також виділення аналогів рапаміцину за допомогою біологічних способів, таких як біотрансформація та заснована на фагах генетична модифікація. Виділення мінорних метаболітів як з мутантних штамів і рапаміцин-продукуючих штамів надало невеликі кількості аналогів рапаміцину. Ці штами часто дають малий вихід і продукують суміші аналогів рапаміцину. Описано виділення 27-О-десметилрапаміцину та 27-десметоксирапаміцину з культурального супернатанта *S. hygroscopicus* NCIMB 40319 (Box et al., 1995). Протигрибкова активність 27-О-десметилрапаміцину нижче такої рапаміцину, але інгібування FKBP12 PPIазної активності представляється збільшеним. Інгібування ConA-стимулюємої проліферації Т-клітин селезінки миші та інгібування LPS-стимулюємої проліферації В-клітин селезінки миші збільшені в порівнянні з рапаміцином (Box et al., 1995). Подібним чином, протигрибкові активності аналогів рапаміцину пролілрапаміцину, 27-О-десметилрапаміцину та 27-

десметоксирапаміцину (система нумерації молекули рапаміцину, як показано на Фігурі 1) були нижче, ніж у рапаміцину (Wong et al., 1998). Аналоги рапаміцину (16-О-десметилрапаміцин, 27-О-десметилрапаміцин, 39-О-десметилрапаміцину, 16, 27-О-бісдесметилрапаміцин, пролілрапаміцин, 26-О-десметилпролілрапаміцин, 9-деоксоррапаміцин, 27-десметоксирапаміцин, 27-десметокси-39-О-десметилрапаміцин, 9-деоксо-27-десметоксирапаміцин, 28-дегідрорапаміцин, 9-деоксо-27-десметокси-39-О-десметилрапаміцин) також ізольовані з *Actinoplanes* sp N902-109 після додавання інгібіторів цитохрому P450 та/або подання попередника культури або після біотрансформації виділеного рапаміцину (Nishida et al., 1995). Застосування таких інгібіторів, однак, дозволяє тільки націлювати дію конкретного ферменту та не є вибірковою по ділянці, у такий спосіб часто призводячи до сумішей продуктів. Раціональне одержання одного обраного аналога неможливо цим способом. Одержання суміші аналогів рапаміцину скоріше, ніж єдиного продукту, впливає також на вихід. Вимірювали інгібіторну активність сполук на змішану реакцію лімфоцитів (MLR) і виявили невеликий вплив на активність виявляється після втрати метильної групи при C27 та/або C16. Більше значне зменшення активності спостерігалось для 9-деоксоррапаміцину, до того ж втрата метокси-групи при C27, гідрокси-групи при C28 і заміна групи похідного піпеколінової кислоти на пролільну групу, все це призводить до зменшення активності (Nishida et al., 1995). Подібним чином, описане біотрансформація рапаміцину та виділення 16, 39-О-бісдесметилрапаміцину (WO 94/09010). Збереження деякої інгібуючої активності в аналізі проліферації клітин сполуками, модифікованими по циклогексильному кільцю, наприклад, 39-О-десметилрапаміцином і C40 модифікації такі як SDZ RAD і CCI-779, ідентифікують цей район молекули як мішень при одержанні нових аналогів рапаміцину як з імунодепресивними, так і з протипухлинними властивостями.

Описано нові аналоги рапаміцину після подання циклогександикарбонової кислоти, циклогептанкарбонової кислоти, циклогекс-1-енокарбонової кислоти, циклогекс-3-метилциклогексанкарбонової кислоти, циклогекс-3-енокарбонової кислоти, 3-гідроксикіклогекс-4-енокарбонової кислоти та циклогепт-1-енокарбонової кислоти до культур дикого типу які продукують рапаміцин *S. hygroscopicus*, у такий спосіб показуючи гнучкість завантажувального модуля полікетид кінрази рапаміцину (P.A.S. Lowden, Ph.D dissertation, University of Cambridge, 1997; Lowden et al., 2004). Ці нові аналоги рапаміцину отримані при конкуренції із природним вихідним матеріалом, 4,5дигідроксикіклогекс-1-енокарбонової кислоти, що призводить до знижених виходів і змішаних продуктів.

Ізольовано два нові сірковмісні аналоги рапаміцину шляхом подання культури продукуючого рапаміцин *S. hygroscopicus* NRRL5491 (±) ніпекотинової кислоти для інгібування продукції L-піпеколінової кислоти та спільної подання сірков-

місних аналогів піпеколінової кислоти (S)-1,4-тіазан-3-карбонової кислоти та (S)-1,4-тіазан-4-карбонової кислоти (Graziani et al., 2003).

Описано одержання двох рекомбінантних штамів *S. hygrosopicus*, продукуючих різні аналоги рапаміцину, за допомогою біологічних способів, опосередкованих фаговою технологією (Lomovskaya et al., 1997). У присутності доданих аналогів проліну, *S. hygrosopicus* rapL делеційний мутант синтезує нові аналоги рапаміцину проліл-рапаміцин, 4-гідроксипроліл-рапаміцин і 4-гідроксипроліл-26-десметокси-рапаміцин (Khaw et al., 1998). Подібним чином, ідентифіковані нові аналоги рапаміцину 3-гідроксипроліл-рапаміцин, 3-гідроксипроліл-26-десметокси-рапаміцин і транс-3-аза-біцикло[3,1,0] гексан-2-карбонова кислота рапаміцин у культурах того ж мутантного штаму, до яких робилися добавки, як описано в WO 98/54308. Активність проліл-рапаміцину та 4-гідроксипроліл-26-десметокси-рапаміцину вимірювали в аналізі проліферації та інгібуюча активність останньої сполуки була значно нижче такої ж рапаміцину (Khaw et al., 1998). Делеція п'яти послідовних генів rapQONML (відповідальних за постполікетидні модифікації при C16, C27 і продукцію L-піпеколінової кислоти) і їхня заміна маркером стійкості до неомицину в *S. hygrosopicus* ATCC29253 за допомогою заснованої на фагах методології привело до продукції 16-О-десметил-27-десметоксирапаміцину при подання піпеколінової кислоти (Chung et al., 2001). Ніякої комплементарності цього делеційного мутанта не було показано. Надалі, у цій роботі не була виявлена специфічність до місця ні для RapM ні RapQ; тому раціональне створення аналогів рапаміцину, що вимагають метилювання при C16-OH або C27-OH, не було здійснено Chung et al. (2001). Заснована на фагах методологія страждає від багатьох недоліків, як описано більш детально нижче, прикладом чого служить вищеописане одержання всього трьох рекомбінантних штамів *S. hygrosopicus* за період 9 років від розкриття послідовності гена. Це пропонує важкий і затяжний процес одержання генетично модифікованих штамів і значно більш обмежене в застосовності в порівнянні з методологією, розкритою в ранній заявці винахідників даного винаходу (WO 04/007709).

Загальноприйняті підходи до маніпуляції що модифікують рапаміцин генами за допомогою біологічних способів включають мутацію або делецію окремих генів у хромосомі штаму-хазяїна або/та вставку окремих генів у вигляді додаткових копій гомологічних або гетерологічних генів або поокремості, або у вигляді касет генів (WO 01/79520, WO 03/048375). Однак, одержання нових аналогів рапаміцину за допомогою таких біологічних способів було обмежено через труднощі трансформації продукуючого рапаміцин організму *S. hygrosopicus*. Показано, що звичайно застосовувані способи трансформації із плазмідною ДНК або перенос шляхом кон'югації не призводять до успіху в продукуючого рапаміцин штаму (Lomovskaya et al., 1997, Schwecke et al., 1995, Kieser et al., 2000). На рівні техніки в даній області до розкриття WO 04/007709 застосовувалася ме-

тодологія Lomovskaya et al. (1997), трудомісткий заснований на фагах спосіб, що серйозно обмежений розміром фрагментів ДНК, що клонуються, які переносяться в *S. hygrosopicus* (Kieser et al., 2000). Цей спосіб обмежений переносом максимально приблизно 6,4 т.п.о. ДНК, що клонується. Таким чином, при комплементарності делеційного мутанта за допомогою цього підходу фахівець обмежений включенням генетичного матеріалу в рамках цього граничного розміру, наприклад, комплементарність обмежена двома звичайними функціональними генами (звичайно, розміром приблизно 1 т.п.о. кожний) у додавання до необхідного промотору, районам гомології (якщо потрібно) і маркеру стійкості. WO 04/007709 розкрив перший опис способів рекомбінантної технології для ефективної трансформації таких штамів як *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *hygrosopicus* NRRL5491, які містять кластер генів біосинтезу рапаміцину. До цього, хоча генетична інформація для кластера генів біосинтезу рапаміцину була доступна з 1995 року (Schwecke et al., 1995), дотепер був досягнутий тільки обмежений прогрес у цій області (Khaw et al., 1998; Chung et al., 2001; WO 01/34816). WO 04/007709 описує способи маніпуляції шляхом біосинтезу рапаміцину та одержання ряду аналогів рапаміцину шляхом комплементарності делеційного мутанта, у якого кількість пост-PKS обробки специфічно варіює та за необхідності подання екзогенних вихідних кислот штамам, у яких хоча б гарк вилучений або інактивований.

Попередня робота показала, що генами полікетид-синтази (PKS) у принципі можна маніпулювати з метою одержання нових полікетидів. Такі зміни включають:

- делеції: показано, що делеція у фазі з рамкою зчитування в ДНК, що кодує частина домена KR у модулі 5 продукуючого еритроміцину (ery) PKS *Saccharopolyspora erythraea* призводить до утворення аналогів еритроміцину, а саме, 5, діеокси-3- α -мікаррозил-5-оксоеритронолід B і 5,6-діеокси-5-оксоеритронолід B (Donadio et al., 1991).

- Інактивація окремих доменів: зміна залишків активної ділянки в домені ER модуля 4 в ery PKS шляхом генетичної модифікації відповідної що кодує PKS ДНК і введення її в *Saccharopolyspora erythraea* призводить до продукції 6,7-ангідроеритроміцину C (Donadio et al., 1993).

- Перестановки завантажувальних доменів: WO 98/01546 розкриває заміну завантажувального модуля (ery) PKS завантажувальним модулем PKS авермектину (ave) з метою одержання гібридного гена PKS типу I, що включає різні вихідні одиниці для виробництва нових аналогів еритроміцину. Була отримана гібридна тілактон-завантаження/платенолід полікетид-синтаза (Kuhstoss et al., 1996), що успішно переносила специфічність тілактон-завантажувального модуля для метилмалоніл-КоА на молекулу платеноліду. Визначення функції KS^Q (Bisang et al., 1999) і маніпуляції утримуваними KS^Q завантажувальними модулями розкриті в WO 00/00618. Перестановка завантажувального модуля в шляху біосинтезу спінозіну також була описана в WO 03/070908.

- Перестановка АТ: Oliynyk et al., (1996) і WO 98/01546 описують перестановку домена АТ, де АТ модуля 1 еритроміцину був замінений АТ-доменом модуля 2 рапаміцину та специфічність модуля 1 для одиниці, що надбудовується, змінилася відповідно. Далі перестановка доменів АТ описана, наприклад, для полікетид-синтази еритроміцину (WO 98/01546, Ruan et al., 1997; Stassi et al., 1998) і для полікетид-синтази спінозіну (WO 03/070908).

- Перестановка відновлювальних петель: наприклад, описані зміни кількості відновлювальних реакцій для β -кето-груп, утворених при кожній конденсації (WO 98/01546, WO 00/01827 і Лао et al., (1997)).

- Приклади комбінацій підходів перестановки доменів наведені в McDaniel et al., (1999).

- Сайт-специфічний мутагенез: WO 02/14482, Reeves et al., (2001), Reid et al., (2003) і Del Vecchio et al., (2003) показують, що можливо впливати на субстратну специфічність АТ-доменів шляхом вибіркової мутації конкретних залишків.

- Стискання кільця: наприклад, застосування неповної модульної полікетид-синтази (Kao et al. 1994) або пересування домена термінуючої ланцюг еритроміцину тіоестерази нижче модулів 1, 2, 3, 5 або 6 (Cortes et al., 1995; Kao et al., 1995; Kao et al., 1996; Bohm et al., 1998) PKS еритроміцину призводить до продукції очікуваних укорочених молекул еритроміцину.

- Розширення кільця: вставка модуля рапаміцину в першу ORF (відкриту рамку зчитування) між модулями 1 і 2 PKS еритроміцину веде до продукції очікуваного 16-членного макроліда (Rowe et al., 2001).

Модифікації кластерів PKS не обмежуються описаними вище. Однак, було також виявлено, що не всі маніпуляції генами PKS можуть давати передбачені нові аналоги. Коли Donadio et al. (1993) інактивували домен еноіл-редуктази (ER) в PKS еритроміцину ангідро-аналог, що утворився не пройшов повну обробку (процесинг), тому що він більше не був субстратом мікарроз-О-метилтрансферази. Подібним чином, заміна вихідної одиниці полікетиди запобігає повній елонгації та доробку аналога рифампіцину в *Amycolatopsis mediterranea* (Hunziker et al., 1998).

Якби аналоги рапаміцину можна було одержувати шляхом інженерії генів полікетид-синтази в біосинтетичному кластері, вони були б дуже бажаними, оскільки відповідно до пророкування мали би цікаву біологічну активність.

Послідовність кластера біосинтезу рапаміцину вперше опублікована в 1995 році (Schwecke et al.; Aparicio et al., 1996). Незважаючи на цінність наявних у даній області знань щодо маніпуляції PKS, описаних вище, дотепер не було ніяких повідомлень про успішну інженерію серцевини полікетид-синтази кластера рапаміцину. *S. hygrosopicus*, продуцент рапаміцину, є складним організмом для маніпуляцій (Lomovskaia et al., 1997).

Клітина-хазяїн, що модифікували для продукції 17-десметилрапаміцину, заявлена в патенті US 6670168, однак у цьому патенті відсутній який-небудь опис робочого прикладу того, як ця сполука

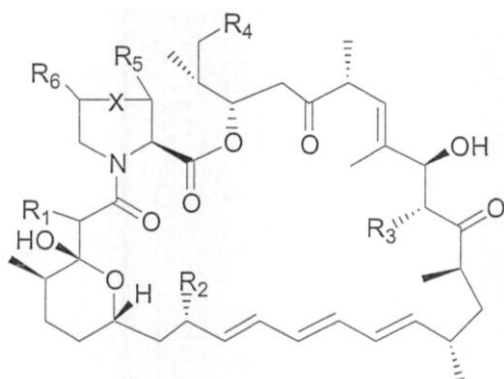
може бути отримана, крім гіпотези, що такий штам можна конструювати шляхом заміни АТ-домена модуля 10. Той факт, що заміна по цьому положенню може гіпотетично вести до 17-десметилрапаміцину, очевидний для будь-якого фахівця в даній області, але не є очевидним, як можна провести таку заміну у світлі труднощів, підкреслених вище, і ніякого пояснення цього ефекту не надано в US 6670168. У світлі відомих труднощів роботи з *S. hygrosopicus* і при відсутності детального опису того, як такий рекомбінантний штам-хазяїн можна одержати, зрозуміло, що це просто опис того, що ці автори сподіваються досягти, скоріше, ніж розкриття такого штаму. До того ж, US 6670168 не надає ніяких пояснень фахівцеві в даній області щодо того, як можна одержувати й виділяти 17-десметилрапаміцин. Стан даної області техніки щодо біосинтезу аналогів рапаміцину обмежено WO 04/007709, у якому маніпулюють генами, що кодують пост-PKS ферменти, що модифікують, і спорідненими заявками, що описують подання екзогенних вихідних кислот для включення в рапаміцин. Основна відсутність прогресу в інженерії PKS рапаміцину обумовлена технічними труднощами трансформації продукуючого організму *S. hygrosopicus* NRRL5491.

Даний винахід відноситься до виробництва 17-десметилрапаміцину та його аналогів. Одержання аналогів 17-десметилрапаміцину вимагає генетичної модифікації PKS рапаміцину. На теперішньому рівні розвитку даної області техніки не є очевидною можливість досягнення генетичної модифікації для виробництва такого штаму. У даному винаході вихідною метою є генетична модифікація *S. hygrosopicus* MG2-10. *S. hygrosopicus* MG2-1C продукує попередник рапаміцину (пре-рапаміцин), коли одержує екзогенну кислоту 3,4-дигідроксициклогексанкарбонову кислоту, як розкрито в WO 04/007709 і Gregory et al., (2004). Проведено генетичну модифікацію цього організму з метою одержання модифікованого штаму, що продукує десметилпре-рапаміцин при поданні йому екзогенної кислоти -3,4-дигідроксициклогексанкарбонової кислоти. Теперішній стан даної області техніки містить відомості, як такий штам можна застосовувати для подальших дослідів як базовий штам для комплементації касетами пізніх генів (WO 04/007709) та/або як базовий штам для подання екзогенних кислот (WO 04/007709) і одержання далі аналогів рапаміцину, але не містить відомостей, як можна одержати такий штам *S. hygrosopicus* шляхом інженерії PKS. Даний винахід описує, несподіваним чином, успішне застосування методологій інженерії PKS, подібних з такими, описаними в Oliynyk et al., 1996, до PKS рапаміцину. Це є несподіваним результатом, оскільки такі технології рекомбінантних ДНК раніше не застосовувалися успішно до *S. hygrosopicus*. Отриманий штам для продукції аналогів десметилпре-рапаміцину є корисним базовим штамом для комплементації касетою пізніх генів (WO 04/007709) та/або як базовий штам для подання екзогенних кислот (WO 04/007709). Кожний із цих аналогів рапаміцину далі можна модифікувати шляхом напівсинтезу. Це перша демон-

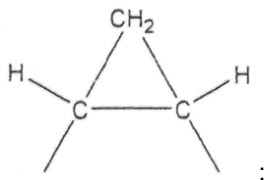
страція дійсно комбінаторного способу, який можна застосовувати для одержання бібліотеки аналогів рапаміцину, який можна змінювати на одному або більше з рівнів: рівні інженерії PKS; рівні допоміжних генів; включенні вихідних кислот, включенні амінокислот і далі доступної хімічної функціональності молекули, що залишається доступною для напівсинтезу.

Розкриття винаходу

В одному аспекті даний винахід надає 17-десметилрапаміцин та його аналоги, зокрема, цей винахід надає аналоги 17-десметилрапаміцину формули:



де x є прямий зв'язком, $-\text{CH}_2-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{S}-$ або $-\text{S}(=\text{O})-\text{CH}_2-$;
або $-\text{CHR}_5-\text{x}-\text{CHR}_6-$ є

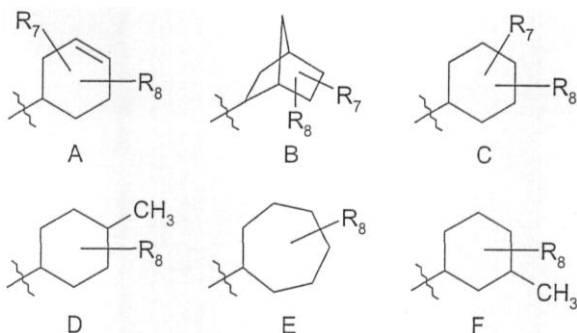


R_1 є $=\text{O}$ або (H, H) ;

R_2 є OH або OMe ;

R_3 є H , OH або OMe ;

R_4 є структурним фрагментом, обраним із груп A, B, C, D, E і F,



у яких
хвиляста лінія вказує на положення приєднання фрагмента,

R_7 є H , OH або OMe і

R_8 є H / OH , OMe , галогеном, тіолом або C_{1-4} алкілом;

або R_4 альтернативно є 7-членним гетероциклом, що містить один або більше гетероатомів,

обраних із групи, що складається з O, S і N, де гетероцикл за необхідності заміщений одним або більше замісників, обраних з C_{1-4} алкілу, OH , F і Cl; і

R_5 і R_6 кожний незалежно є H або OH , або їх фармацевтично прийнятні похідні.

В іншому аспекті даний винахід надає бібліотеку аналогів 17-десметилрапаміцину, отримані за допомогою способів за даним винаходом.

Нові аналоги рапаміцину застосовують прямо, а також як матриці для подальшого напівсинтезу або біоконверсії для одержання сполук, застосованих у якості імунодепресантів, протигрибкових агентів, протиракових агентів, протизапальних агентів, нейрорегенеративних агентів або агентів для лікування відторгнення трансплантата, хвороби трансплантат-проти-хазяїна, аутоімунних порушень, судинних захворювань і фіброзних захворювань або агентів для застосування в регуляції загоєння ран.

В подальшому аспекті даний винахід надає застосування 17-десметилрапаміцину або його аналога в медицині. В подальшому аспекті даний винахід надає застосування 17-десметилрапаміцину або його аналога в одержанні медикаменту для індукції або підтримки імунодепресії, стимуляції регенерації нервової тканини або лікування раку, злоякісності В-клітин, грибкових інфекцій, відторгнення трансплантата, хвороби трансплантат-проти-хазяїна, аутоімунних порушень, запальних захворювань, судинних захворювань або фіброзних захворювань або в регуляції загоєння ран.

В одному втіленні 17-десметилрапаміцин або його аналог застосовують у комбінаційній терапії для індукції або підтримки імунодепресії, стимуляції регенерації нервової тканини або лікування раку, злоякісності В-клітин, грибкових інфекцій, відторгнення трансплантата, хвороби трансплантат-проти-хазяїна, аутоімунних порушень, запальних захворювань, судинних захворювань і фіброзних захворювань або в регуляції загоєння ран.

Даний винахід також надає фармацевтичну композицію, що включає 17-десметилрапаміцин або його аналог або фармацевтично прийнятну сіль разом з фармацевтично прийнятним носієм.

В подальшому аспекті даний винахід також надає спосіб одержання 17-десметилрапаміцину або його аналога, де згаданий спосіб, включає:

(а) заміна метилмалоніл-КоА-специфічного АТ-домена модуля 10 PKS рапаміцину малоніл-КоА-специфічним АТ-доменом,

(б) експресію генетично модифікованої PKS рапаміцину в підходящій клітині-хазяїні,

(в) культивування клітини-хазяїна в таких умовах, що 17-десметилрапаміцин або його аналог продукуються, включаючи за необхідності постачання екзогенними попередниками,

(г) за необхідності виділення сполук, отриманих таким способом.

У кращому втіленні малоніл-КоА-специфічний АТ-домен вибирають із одного з наступних кластерів: рапаміцину, моненсину, спінозину, FK506, еритроміцину, FK520, амфотерицину, анголаміцину, тілозину, «хїг» ("hyg"), FK523, меридаміцину,

антаскоміцину, FK525 і тсукубаміцину. У більш кращому втіленні малоніл-КоА-специфічний АТ-домен вибирають із одного з наступних кластерів: рапаміцину, моненсину та FK506. У ще більш кращому втіленні АТ-домен вибирають із групи, що складається з модуля 2 рапаміцину, модуля 3 моненсину, модуля 6 моненсину, модуля 8 моненсину, модуля 3 FK506 і модуля 7 FK506. У найбільш кращому втіленні малоніл-КоА-специфічний АТ-домен походить із модуля 2 рапаміцину.

Фахівець у даній галузі зрозуміє, що цю трансформацію можна вживати з кожним із числа малоніл-КоА-специфічних ацил-трансферазних доменів будь-який PKS типу I або змішаною NRPS/PKS. Фахівець у даній галузі зрозуміє також, що включення малоніл-КоА за допомогою АТ модуля 10 може бути досягнуте шляхом мутування природного гар АТ10 з метою зміни його специфічності, наприклад, застосовуючи способи, як описано в WO 02/14482, або шляхом заміни всього модуля 10 модулем, що містить АТ-домен, що специфічний до малоніл-КоА, де згаданий модуль включає природний модуль і комбінований модуль.

У додатковому аспекті даний винахід надає спосіб одержання рекомбінантного штаму, що містить біосинтетичний кластер, який кодує генетично модифіковану полікетид-синтазу рапаміцину, де метилмалоніл-КоА-специфічний АТ-домен модуля 10 замінений малоніл-КоА-специфічним АТ-доменом. У кращому втіленні малоніл-КоА-специфічний АТ-домен вибирають із одного з наступних PKS кластерів: рапаміцину, моненсину, спінозину, FK506, еритроміцину, FK520, амфотеріцину, анголаміцину, тілозину, «хіг», FK523, меридаміцину, антаскоміцину, FK525 і тсукубаміцину. У більш кращому втіленні малоніл-КоА-специфічний АТ-домен вибирають із одного з наступних кластерів: рапаміцину, моненсину та FK506. У ще більш кращому втіленні АТ-домен вибирають із групи, що складається з модуля 2 рапаміцину, модуля 3 моненсину, модуля 6 моненсину, модуля 8 моненсину, модуля 3 FK506 і модуля 7 FK506. У найбільш кращому втіленні малоніл-КоА-специфічний АТ-домен походить із модуля 2 рапаміцину.

Хоча генетична модифікація полікетид-синтазного шляху рапаміцину наведена тут на прикладі *S. hygrosopicus* MG2-10 (одержання якого розкрито в WO 04/007709 і Gregory et al., (2004)), фахівець у даній галузі зрозуміє, що ці способи можна з однаковим успіхом застосовувати до дикого типу *S. hygrosopicus* NRRL5491 і інших споріднених штамів. Переважно, генетично модифікований штам вибирають із групи, що складається з *S. hygrosopicus* MG2-10 і *S. hygrosopicus* NRRL5491.

Втілення попередніх аспектів винаходу, надаючи спосіб одержання 17-десметилрапаміцину та його аналогів і спосіб одержання рекомбінантного штаму, який містить біосинтетичний кластер, що кодує генетично модифіковану полікетид-синтазу рапаміцину, включає додаткові етапи:

(а) виділення АТ, що підлягає введенню як єдиного фрагмента ДНК із підходящими фланкуючими ділянками зв'язування рестриктаз,

(б) ампліфікацію та виділення районів послідовності ДНК, гомологічних фланкуючим послідовностям АТ-мішені, з використанням підходящих ділянок зв'язування рестриктаз,

(в) літування трьох фрагментів ДНК, описаних в (а) і (б) разом з одержанням у фазі з рамкою зчитування послідовності LHS гомології з наступним донорним АТ-доменом з наступною RHS гомологією,

(г) введення повної послідовності з (в) у вектор для введення в штам-хазяїна для одержання кінцевої плазміді, де згадана плазміді включає

(i) oriT для кон'югації,

(ii) один або більше маркерів стійкості,

(iii) чутливий до температури ориджин реплікації, так що інтегранти можна буде відбирати при 37°C і

(iv) ориджин реплікації *E. coli*,

(v) трансформація штаму-хазяїна шляхом кон'югації із застосуванням кінцевої плазміді, як описано в (г) вище,

(vi) збір трансформованих клітин за стійкістю до відповідного антибіотика,

(vii) одержання первинних інтегрантів шляхом культивування при 37°C із селекцією за допомогою антибіотиків,

(viii) скринінг вторинних рекомбінантів шляхом вирощування під час відсутності антибіотика, також при 37°C,

(ix) ідентифікація потрібного штаму по здатності продукувати цільовий продукт і

(x) за необхідності підтвердження генетики штаму за допомогою стандартних способів.

В іншому аспекті даний винахід надає спосіб одержання аналога 17-десметилрапаміцину, де згаданий спосіб включає:

(а) одержання рекомбінантного штаму, у якого метилмалоніл-КоА-специфічний АТ-домен модуля 10 PKS рапаміцину замінений малоніл-КоА-специфічним АТ-доменом, і

(б) подання неприродних вихідних кислот культури згаданого рекомбінантного штаму в умовах, що підходять для продукції полікетиди та

(в) за необхідності виділення сполуки, отриманої у такий спосіб.

Тому даний винахід надає спосіб одержання аналогів 17-десметилрапаміцину, у які включені неприродні вихідні кислоти. У кращому втіленні в рекомбінантного штаму гарК вилучений або інактивований. В іншому кращому втіленні в рекомбінантного штаму гарК вилучений або інактивований і неприродну вихідну кислоту, що подають при рості штаму, вибирають із групи, що складається із циклогексанкарбонової кислоти, 3-метилциклогексанкарбонової кислоти, циклогептанкарбонової кислоти, 3-фтор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 4-фтор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 3-хлор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 3-хлор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти та 4-хлор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти.

В одному втіленні штам не є рекомбінантною клітиною-хазяїном *S. hygrosopicus*, що продукує 17-десметилрапаміцин. В подальшому втіленні штам не є рекомбінантною клітиною-хазяїном *S. hygrosopicus*, що продукує 17-десметилрапаміцин під час відсутності подання екзогенних попередників.

У подальшому аспекті даний винахід надає спосіб одержання аналога 17-десметилрапаміцину, де згаданий спосіб включає:

(а) одержання рекомбінантного штаму, у якого метилмалоніл-КоА-специфічний АТ-домен модуля 10 PKS рапаміцину замінений малоніл-КоА-специфічним АТ-доменом (як описано більш детально вище),

(б) додатково видалення або інактивацію одного або більше допоміжних генів рапаміцину, обраних з *rapI*, *rapJ*, *rapK*, *rapL*, *rapM*, *rapN*, *rapO* і *rapQ*,

(в) культивування штаму, отриманого таким чином, за необхідності в присутності екзогенного попередника, якщо потрібно, для одержання аналога 17-десметилрапаміцину та

(г) за необхідності виділення сполуки, отриманої таким способом.

В альтернативному кращому втіленні допоміжними генами, які були вилучені, є *rapI*, *rapJ* і *rapQ*. В альтернативному кращому втіленні допоміжними генами, які були вилучені, є *rapJ*, *rapM* і *rapQ*.

У подальшому аспекті даний винахід надає спосіб одержання аналога 17-десметилрапаміцину, де згаданий спосіб включає:

(а) одержання рекомбінантного штаму, у якого метилмалоніл-КоА-специфічний АТ-домен модуля 10 PKS рапаміцину замінений малоніл-КоА-специфічним АТ-доменом (як описано більш детально вище),

(б) додатково видалення або інактивацію одного або більше допоміжних генів рапаміцину, обраних з *rapI*, *rapJ*, *rapK*, *rapL*, *rapM*, *rapN*, *rapO* і *rapQ*,

(в) повторне введення всіх або частини допоміжних генів *in-trans* для комплементування або для часткової комплементування делеції,

(г) культивування штаму, отриманого таким чином, за необхідності в присутності екзогенного попередника, якщо потрібно, для одержання аналога 17-десметилрапаміцину та

(д) за необхідності виділення сполуки, отриманої таким способом.

У кращому втіленні на етапі (б) всі допоміжні гени рапаміцину видаляють або інактивують. В подальшому кращому втіленні рекомбінантний штам генетично комплементують одним або більше допоміжним геном, обраним із групи, що складається з *rapI*, *rapJ*, *rapK*, *rapL*, *rapM*, *rapN*, *rapO* і *rapQ* або їхніх гомологів. У конкретному втіленні штам комплементований всіма допоміжними генами. В подальшому кращому втіленні рекомбінантний штам генетично комплементований допоміжними генами *rapK*, *rapM*, *rapN*, *rapO* і *rapL* або їхніми гомологами. В альтернативному кращому втіленні рекомбінантний штам генетично

комплементований допоміжними генами *rapK*, *rapI*, *rapN*, *rapO* і *rapL* або їхніми гомологами.

У подальшому аспекті винаходу, вищеописані модифікації комбінують, тому даний винахід надає спосіб одержання аналога 17-десметилрапаміцину, де згаданий спосіб включає:

(а) одержання рекомбінантного штаму, у якого метилмалоніл-КоА-специфічний АТ-домен модуля 10 PKS рапаміцину замінений малоніл-КоА-специфічним АТ-доменом,

(б) додатково видалення або інактивацію одного або більше допоміжних генів рапаміцину, обраних з *rapI*, *rapJ*, *rapK*, *rapL*, *rapM*, *rapN*, *rapO* і *rapQ*,

(в) за необхідності повторне введення всіх або частини допоміжних генів *in-trans* для комплементування або для часткової комплементування делеції,

(г) подання неприродних вихідних кислот згаданому рекомбінантному штаму в підходящих умовах для продукції полікетидів і

(д) за необхідності виділення сполуки, отриманої таким способом.

У кращому втіленні допоміжний ген(и), які були вилучені або інактивовані, включають *rapK*.

У кращому втіленні на етапі (б) всі допоміжні гени рапаміцину вилучені або інактивовані. У конкретному аспекті даний винахід надає альтернативний спосіб одержання аналогів 17-десметилрапаміцину з неприродними вихідними кислотами шляхом генетичної комплементування рекомбінантного штаму, у якого всі допоміжні гени рапаміцину були вилучені або інактивовані, допоміжними генами рапаміцину *rapI*, *rapJ*, *rapL*, *rapM*, *rapN*, *rapO* і *rapQ*, або їхніми гомологами, що дає штам, що містить всі допоміжні гени, крім *rapK*, і подання екзогенних вихідних кислот. У кращому втіленні екзогенною неприродною вихідною кислотою є циклогексанкарбонова кислота. В альтернативному кращому втіленні неприродною вихідною кислотою є 3-метилциклогексанкарбонова кислота. В альтернативному кращому втіленні неприродною вихідною кислотою є циклогептанкарбонова кислота. В альтернативному кращому втіленні неприродну вихідну кислоту вибирають із групи, що складається з 3-фтор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 4-фтор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 3-хлор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти та 4-хлор-3-гідрокси циклогексанкарбонової кислоти.

В подальшому втіленні даний винахід надає спосіб одержання аналогів 17-десметилрапаміцину з комбінаціями активностей допоміжних генів і неприродних вихідних кислот. У кращому втіленні допоміжними генами, які вилучені, є *rapK*, *rapM*, і *rapQ*, і неприродною вихідною кислотою, що подається цьому штаму, є циклогексанкарбонова кислота. В альтернативному кращому втіленні неприродною вихідною кислотою, що подається цьому штаму з вилученими *rapK*, *rapM*, і *rapQ*, є 3-метилциклогексанкарбонова кислота. В альтернативному кращому втіленні неприродною вихідною кислотою, що подається цьому штаму з вилученими *rapK*, *rapM*, і *rapQ*, є циклогептанкарбонова кислота. У кращому втіленні допоміжними генами, які вилучені, є *rapK*, *rapM*, і *rapQ*, і

гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 3-хлор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти та 4-хлор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти. У найбільш бажаному втіленні вихідною кислотою, що подають, є циклогексанкарбонова кислота.

В альтернативному кращому втіленні згаданий рекомбінантний штам генетично комплементують *garJ*, *garN*, *garO*, *garQ* і *garL* та подають неприродну вихідну кислоту, обрану із групи, що складається з 3-метилциклогексанкарбонової кислоти, циклогексанкарбонової кислоти, циклопентанкарбонової кислоти, 3-фтор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 4-фтор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 3-хлор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти та 4-хлор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти. У найбільш бажаному втіленні вихідною кислотою, що подають, є циклогексанкарбонова кислота.

В альтернативному кращому втіленні згаданий рекомбінантний штам генетично комплементують *garM*, *garN*, *garO* і *garL* і подають неприродну вихідну кислоту, обрану із групи, що складається з 3-метилциклогексанкарбонової кислоти, циклогексанкарбонової кислоти, циклопентанкарбонової кислоти, 3-фтор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 4-фтор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 3-хлор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти та 4-хлор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти. У найбільш бажаному втіленні вихідною кислотою, що подають, є циклогексанкарбонова кислота.

В альтернативному кращому втіленні згаданий рекомбінантний штам генетично комплементують *garI*, *garN*, *garO* і *garL* та подають неприродну вихідну кислоту, обрану із групи, що складається з 3-метилциклогексанкарбонової кислоти, циклогексанкарбонової кислоти, циклопентанкарбонової кислоти, 3-фтор-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 4-фтор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 3-хлор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти та 4-хлор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти. У найбільш бажаному втіленні вихідною кислотою, що подають, є циклогексанкарбонова кислота.

У подальшому аспекті даний винахід надає спосіб одержання бібліотеки аналогів 17-десметилрапаміцину, де згаданий спосіб включає:

(а) одержання рекомбінантного штаму, у якого метилмалоніл-КоА-специфічний АТ-домен модуля 10 PKS рапаміцину замінений малоніл-КоА-специфічним АТ-доменом,

(б) за необхідності видалення або інактивацію одного або більше допоміжних генів рапаміцину, обраних з *garI*, *garJ*, *garK*, *garL*, *garM*, *garN*, *garO* і *garQ*,

(в) за необхідності повторне введення всіх або частини допоміжних генів *in-trans* для комплементування або для часткової комплементування делеції,

(г) подання ряду неприродних вихідних кислот до продукуючої культури згаданого рекомбінантного штаму для одержання ряду аналогів 17-десметилрапаміцину,

(д) подання природних або нових амінокислот до продукуючої культури згаданого рекомбінантно-

го штаму в умовах, що підходять для продукції полікетидів,

(е) за необхідності, еиділення сполуки, отриманої таким чином, і

(ж) за необхідності, проведення напівсинтезу з виділеними аналогами рапаміцину.

Ці та інші втілення винаходу описані більш детально в нижченаведеному описі, прикладах і домаганнях далі.

Короткий перелік фігур

Фігура 1. Структура рапаміцину: А представляє «зв'язуючий домен» і В представляє «ефекторний домен».

Фігура 2. Структури рапаміцину (А), FK506 (В), FK520 (С) і меридаміцину (D).

Фігура 3. Генетична модифікація MG2-10 для одержання MG7-9.

Фігура 4. Фрагментація 39-десметокси-17-десметилпре-рапаміцину при мас спектрометрії.

Фігура 5. LC-FT-ICR-MS аналіз десгідроксипре-рапаміцину.

Фігура 6. LC-FT-ICR-MSⁿ аналіз десгідроксипре-рапаміцину.

Фігура 7. Важливі ЯМР-кореляції для 17-десметил-39-десгідроксипре-рапаміцину.

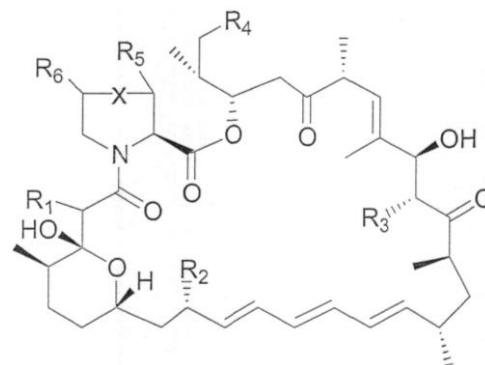
Фігура 8. Діаграма плазмиди pLL150.

Визначення

Невизначені артикли "а" і "ан" застосовуються тут для посилання на один або більше одного (наприклад, хоча б один) граматичного об'єкта, до якого відноситься артикль. Наприклад, "an analogue" означає один аналог або більш ніж один аналог.

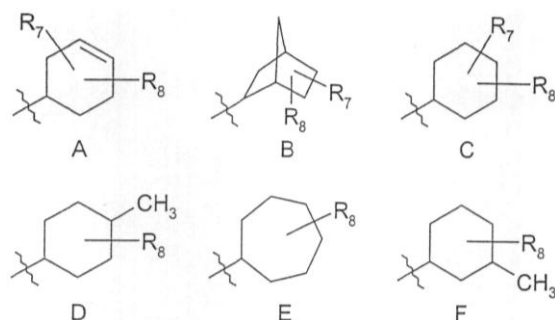
Як застосовується тут, термін "аналог(и)" відноситься до хімічних сполук, які є структурно близькими іншому, але котрі злегка відрізняються по композиції (як заміна одного атома іншим або присутність або відсутність конкретної функціональної групи).

Як застосовується тут, термін «17-десметилрапаміцин і його аналоги» повинен включати сполуки в області домагань формули I нижче:



де:

x є прямим зв'язком, -CH₂-, -S-CH₂-, -CH₂-S- або -S(=O)-CH₂-;



у яких
хвиляста лінія вказує на положення приєднання фрагмента,

R_7 представляє H , OH або OMe і

R_8 представляє H , OH , OMe , галоген, тіол або C_{1-4} алкіл;

або R_4 альтернативно представляє 7-членний гетероцикл, що містить один або більше гетероатомів, обраних із групи, що складається з O , S і N , де гетероцикл за необхідності заміщений одним або більше замісників, обраних з C_{1-4} алкілу, OH , F і Cl ; і

R_5 і R_6 кожний незалежно є H або OH ,

або їх фармацевтично прийнятні похідні,

на деякі сполуки тут посилаються як на «сполуки за винаходом».

Як застосовується тут, термін «фармацевтично прийнятні похідні» включає фармацевтично прийнятні солі (наприклад, солі додаткових кислот). Він також включає посилання на сольвати (тобто гідрати).

Як застосовується тут, термін «галоген» включає фтор, хлор, бром і йод.

Як застосовується тут, термін «тіол» включає групу SH .

Якщо не зазначено зворотнє, C_{1-4} алкільні групи, згадані тут, можуть бути лінійними або, коли є присутнім достатнє число C -атомів (тобто мінімум 3), розгалуженими. Такі C_{1-4} алкільні групи додатково можуть бути заміщені одним або більше атомами галогену (наприклад, фтор).

Гетероциклічні групи, які може представляти R_4 , можуть бути повністю насиченими, частково ненасиченими, цілком ароматичними або частково ароматичними за характером. Такі групи можуть також бути моноциклічними або, коли можливо, біциклічними. Гетероциклічні R_4 групи, які можуть згадуватися, включають діоксаніл, діоксоліл, фураніл, гексагідропіримідиніл, гідантоїніл, імідазоліл,

ізоксазолідиніл, ізоксазоліл, малеїмідо, морфолініл, оксадіазоліл, 1,2- або 1, 3-оксазинаніл, оксазоліл, піперазиніл, піперидиніл, піраніл, піразиніл, піразоліл, піридиніл, піридоніл, піримідиніл, піролідіноніл, піролідиніл, піролініл, піроліл, сульфоланіл, 3-сульфоланіл, тетрагідрофураніл, тетрагідропіраніл, 3,4,5,6-тетрагідропіридиніл, 1,2,3,4-тетрагідропіримідиніл, 3,4,5,6-тетрагідропіримідиніл, тетразоліл, тіадіазоліл, тіазолідиніл, тіазоліл, тієніл, тріазоліл і т.п. (наприклад, насичені або частково ненасичені моноциклічні групи, такі як діоксаніл, діоксоліл, гексагідропіримідиніл, гідантоїніл, ізоксазолідиніл, малеїмідо, морфолініл, піперазиніл, піперидиніл, піролідіноніл, піролідиніл, піролініл, сульфоланіл, 3-сульфоланіл, тетрагідрофураніл, тетрагідропіраніл, 3,4,5,6-тетрагідропіридиніл, 1,2,3,4-тетрагідропіримідиніл, 3,4,5,6-тетрагідропіримідиніл, тіазолідиніл і т.п. або особливо, ненасичені моноциклічні групи, які містять один гетероатом, обраний з N , S або особливо O , такі як піперидиніл, піролідиніл, тетрагідрофураніл, тетрагідропіраніл і т.п. Однак у конкретному втіленні, що відноситься до сполук за винаходом, R_4 представляє структурний фрагмент, обраний із груп A, B, C, D, E і F (тобто він не представляє гетероциклічну групу).

Як застосовується тут, термін «ген(и), що модифікує» включає гени, необхідні для постполікетид-синтазних модифікацій полікетіда, у якості не обмежувачих прикладів, цитохром P450 монооксигенази, фередоксини та SAM-Залежні O-метилтрансферази. У системі рапаміцину ці гени, що модифікують, включають garN , garO , garM , garI , garQ , та garJ . Фахівець у даній галузі зрозуміє, що гомологи цих генів існують у споріднених кластерах біосинтетичних генів і застосування цих гомологічних генів у способах за винаходом також розглядається.

Як застосовується тут, термін «ген(и) постачання попередником» включає гени, необхідні для постачання природними або неприродними попередниками, гени, необхідні для синтезу будь-яких природним або неприродним чином включених попередників і гени, необхідні для включення будь-яких природним або неприродним чином включених попередників. У якості не обмежувачих прикладів, у системі рапаміцину такі гени включають garL , garK , garP і garA . Фахівець у даній галузі зрозуміє, що гомологи цих генів існують у споріднених кластерах біосинтетичних генів і застосування цих гомологічних генів у способах за винаходом також розглядається.

Як застосовується тут, термін «допоміжний ген(и)» включає посилання на гени, що модифікують, гени постачання попередником або як гени, що модифікують так і гени постачання попередником.

Як застосовується тут, термін «попередник» включає природну вихідну кислоту (наприклад, 4,5-дігідроксициклогекс-1-енокарбонову кислоту) і неприродні вихідні кислоти, природним чином включені амінокислоти (наприклад, піпеколінова кислота, пролін), неприродним чином включені амінокислоти, малоніл-КоА та метилмалоніл-КоА.

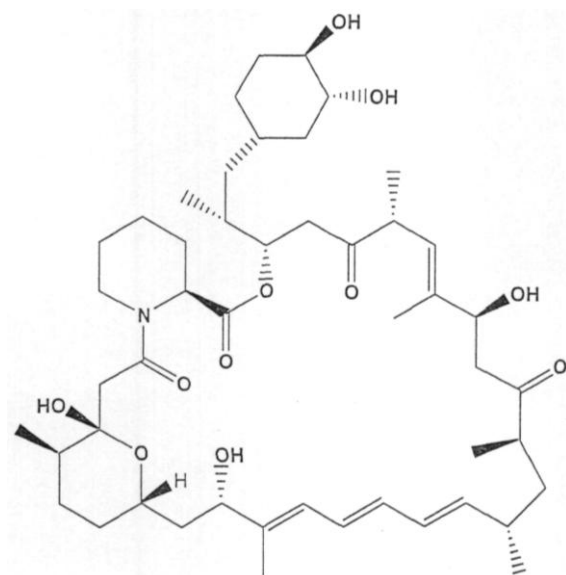
Як застосовується тут, термін «неприродна вихідна кислота» відноситься до будь-якої сполуки, що може бути включена як вихідна кислота в синтез полікетиду, що не є вихідною кислотою, що зазвичай обирається цією PKS.

Щоб уникнути різночитань, терміни «попередник» і «неприродна вихідна кислота» включають N-ацилцистеамінові тіоефіри олігокетидів (наприклад, дікетидів та трикетидів) і N-ацилцистеамінові тіоефіри або складні ефіри карбонових кислот, які можуть бути включені в кінцевий продукт.

Як застосовується тут, термін «природний модуль» відноситься до набору суміжних доменів від KS до ACP-домена, включаючи KS-AT-ACP (у такому порядку) і за необхідності додатково утримуючий один або більше домен, обраний з: домена β -кеторедуктази (KR), KR-домена та домена гідратази (DH), і KR-домена, DH-домена та домена еноліпредуктази (ER).

Як застосовується тут, термін «комбінаторний модуль» відноситься до набору суміжних доменів, що простирається від однієї точки в природному модулі до відповідної точки в наступному модулі, наприклад, від початку AT-домена в модулі A до початку AT-домена в модулі B, або від середини KS-домена в модулі B до середини KS-домена в модулі C. Такі комбінаторні модулі можуть бути «подвійними» або більше, наприклад, можуть містити таке ж число доменів, як два або більше природних модулі.

Як застосовується тут, термін «пре-рапаміцин» відноситься до першого вільного від ферменту продукту, отриманому за допомогою активності полікетид-синтази рапаміцину (що включає гарA, гарB, і гарC) та гарP до дії кожного з генів, що модифікують, і зокрема до сполуки зі структурою, показаною нижче:



Як застосовується тут, термін «аутоімунний розлад(и)» включає, не обмежуючись цим: системну червону вовчанку (SLE), ревматоїдний артрит, міастенію вагітних та розсіяний склероз.

Як застосовується тут, термін «запальні захворювання» включає, не обмежуючись цим, псоріаз, дерматити, екзему, себорею, запальні захворювання шлунково-кишкового тракту (включаючи, але не обмежуючись цим, виразковий коліт і хворобу Крона), легеневі запалення (включаючи астму, хронічне обструктивне захворювання легенів, емфізему, синдром гострої дихальної недостатності та бронхіт) і очний увеїт.

Як застосовується тут, термін «рак» відноситься до злоякісного новоутворення, яке видається з епітелію, перебуває в шкірі або більш звичайно, у тканинах органів тіла, наприклад, грудях, простаті, легенях, нирках, підшлунковій залозі, шлунку або кишечнику. Рак прагне проникнути в навколишні тканини та поширитися (метастазувати) на віддалені органи, наприклад, кістки, печінка, легені або мозок. Як застосовується тут, термін «рак» включає як метастатичні так і пухлинні типи клітин, такі як, але не обмежуючись цим, меланома, мікроманометр, лейкоз, фібросаркома, рабдоміосаркома та мастоцитомі і типи карциноми тканин, такі як, але не обмежуючись цим, рак прямої кишки, рак простати, дрібноклітинний рак легенів і не-дрібноклітинний рак легенів, рак грудей, рак підшлункової залози, рак сечового міхура, рак нирок, рак шлунка, гліобластома, первинний рак печінки та рак яєчників.

Як застосовується тут, термін «злоякісність В-клітин» включає групу порушень, що включає хронічний лімфоцитарний лейкоз (CLL), множинну мієлому, не-Ходжкінську лімфому (NHL). Вони є неопластичними захворюваннями крові та кровотворних органів. Вони викликають дисфункцію кісткового мозку та імунної системи, що робить хазяїна сильно підданим інфекції і кровотечі.

Як застосовується тут, термін «судинне захворювання» включає, не обмежуючись цим, гіперпроліферативні судинні порушення (наприклад, рестеноз і оклюзію судини), судинний атеросклероз трансплантата, серцево-судинні захворювання, церебральні судинні захворювання та периферичні судинні захворювання (наприклад, захворювання коронарних артерій, артеріосклероз, атеросклероз, неатероматозний артеріосклероз або порушення судинної стінки).

Як застосовується тут, термін «регенерація нервової тканини» відноситься до стимуляції росту нервових клітин і включає ріст аксонів і функціональне відновлення нервових клітин. Захворювання та порушення, при яких регенерація нервової тканини може мати істотне терапевтичне значення, включають, але не обмежуються цим, хворобу Альцгеймера, хворобу Паркінсона, хорею Хаттінгтона, бічний аміотрофічний склероз, тригемінальну невралгію, глоссофарінгальну невралгію, периферичний параліч лицьового нерва, м'язову дистрофію, інсульт, м'язову атрофію, що прогресує, бульбарну успадковану м'язову атрофію, що прогресує, шийний спонділез, синдром Гуллен-Барра, деменцію, периферичні нейропатії та ушкодження периферичних нервів, обумовлені фізичним пораненням (наприклад, пораненням або травмою спинного мозку, ущемленням або

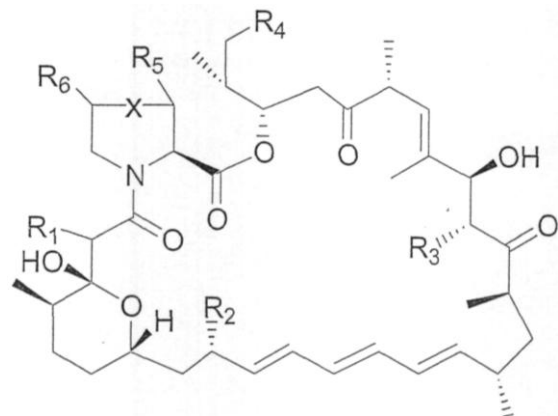
пораненням сідничного або лицьового нервів) або хворобливим станом (наприклад, діабетом).

Як застосовується тут, термін «фіброзні захворювання» відноситься до захворювань, пов'язаних з надлишковою продукцією позаклітинного матрикса та включає (не обмежуючись цим) саркоїдоз, келоїди, гломерулонефрит, кінцеву стадію ниркової хвороби, фіброз печінки (включаючи але не обмежуючись цим, алкогольне захворювання печінки та стеатогепатит), хронічну нефропатію трансплантата, васкулопатію, фіброз серця, фіброз легенів (включаючи але не обмежуючись цим ідіопатичний фіброз легенів і криптогенний фіброзний альвеоліт), дегенерацію м'язів, ретинальну та вітреальну ретинопатію або фіброз, індукований хіміотерапією або радіотерапією.

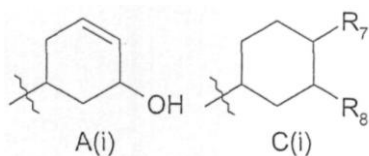
Як застосовується тут, термін «загоєння ран» відноситься до процесу заліковування, який слідує за пораненням шкіри та інших м'яких тканин і включає, не обмежуючись цим, загоєння післяопераційних ран, лікування опіків або гіпертрофованих або келоїдних рубців і запобігання хірургічній адгезії.

Здійснення винаходу

В одному аспекті даний винахід надає 17-десметилтрапаміцин та його аналоги, зокрема, даний винахід надає аналоги 17-десметилтрапаміцину у відповідності з наступною формулою:



де
x представляє прямий зв'язок, $-\text{CH}_2-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{S}-$ або $-\text{S}(-\text{O})-\text{CH}_2-$;

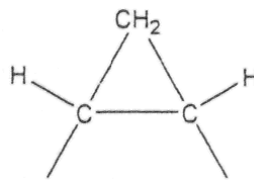


Де R^7 і R_8 , як визначено вище (наприклад, R_7 представляє H або OH і R_8 представляє H, OH або OMe).

В подальшому кращому втіленні R_4 представляє структурний фрагмент C(i), як визначено вище, у якому R_8 є H і R_7 є H, OMe або, зокрема, OH.

або $-\text{CHR}_5-\text{x}-\text{CHR}_6-$

представляє

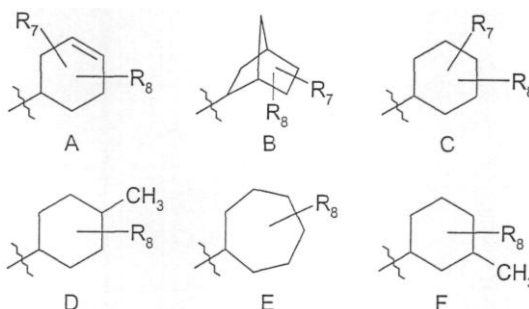


R_1 представляє $=\text{O}$ або (H,H);

R_2 представляє OH або OMe;

R_3 представляє H, OH або OMe;

R_4 представляє структурний фрагмент, обраний із груп A, B, C, D, E і F,



у яких

хвиляста лінія вказує на положення приєднання фрагмента,

R_7 представляє H, OH або OMe і

R_8 представляє H, OH, OMe, галоген, тиол або C_{1-4} алкіл;

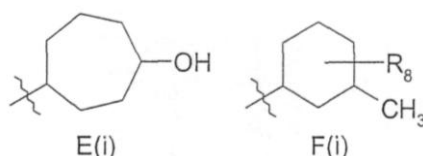
або R_4 альтернативно представляє 7-членний гетероцикл, що містить один або більше гетероатомів, обраних із групи, що складається з O, S і N, де гетероцикл за необхідності заміщений одним або більше замісниками, обраними з C_{1-4} алкілу, OH, F і Cl; і

R_6 і R_6 кожний незалежно є H або OH,

або їх фармацевтично прийнятні похідні.

В одному втіленні R_4 представляє структурний фрагмент, обраний із груп A, B, C, E і F (наприклад, структурний фрагмент, обраний із груп A, C, E і F), як визначено вище, де R_7 і R_8 , як визначено вище (наприклад, R_7 представляє H, OH або OMe і R_8 представляє H, OH, OMe, Cl або F (такий як H, OH, OMe або F)).

В подальшому втіленні R_4 представляє структурний фрагмент, обраний із груп A(i), C(i), E(i) і F(i):



У кращих втіленнях, коли R_5 представляє OH, R_6 представляє H і коли R_6 представляє OH, R_5 представляє H; x представляє прямий зв'язок або, зокрема, CH_2 .

В альтернативному втіленні R_2 представляє OH.

В альтернативному втіленні R_4 представляє 6-членне кільце з киснем у положенні 4 (тобто тетрагідрофуран-4-іл).

Краще втілення сполук за винаходом таке, у якому:

R_1 представляє (H,H) або =O;

R_2 представляє OH або OMe;

R_3 представляє OH або OMe;

R_4 представляє структурний фрагмент C(i), як визначено вище, у якому R_7 представляє OH і R_8 представляє H, OH або OMe; і

x представляє CH_2 .

У найбільш бажаному втіленні:

R_1 представляє (H,H);

R_2 представляє OH;

R_3 представляє H;

R_4 представляє структурний фрагмент C(i), як визначено вище, у якому R_7 представляє OH і R_8 представляє H; і

x представляє CH_2 .

У кращому втіленні:

R_1 представляє (H,H);

R_2 представляє OH;

R_3 представляє H;

R_4 представляє структурний фрагмент C(i), як визначено вище, у якому обое R_7 і R_8 представляють OH; і

x представляє CH_2 .

У найбільш бажаному втіленні:

R_1 представляє (H,H);

R_2 представляє OH;

R_3 представляє H;

R_4 представляє структурний фрагмент C(i), як визначено вище, у якому R_7 представляє OH і R_8 представляє F; і

x представляє CH_2 .

У найбільш бажаному втіленні:

R_1 представляє =O;

R_2 представляє OH або OMe;

R_3 представляє H, OH або OMe;

R_4 представляє структурний фрагмент C(i), як визначено вище, у якому R_7 представляє OH і R_8 представляє F або Cl; і

x представляє CH_2 .

У найбільш бажаному втіленні:

R_1 представляє =O;

R_2 представляє OH;

R_3 представляє OMe;

R_4 представляє структурний фрагмент C(i), як визначено вище, у якому R_7 представляє OH і R_8 представляє H; і

x представляє CH_2 .

У найбільш бажаному втіленні:

R_1 представляє =O;

R_2 представляє OH;

R_3 представляє OH;

R_4 представляє структурний фрагмент C(i), як визначено вище, у якому R_7 представляє OH і R_8 представляє H; і

x представляє CH_2 .

У найбільш бажаному втіленні:

R_1 представляє =O;

R_2 представляє OH;

R_3 представляє OMe;

R_4 представляє структурний фрагмент C(i), як визначено вище, у якому R_7 представляє OH і R_8 представляє OMe; і

x представляє CH_2 .

В одному втіленні сполука не є 17-десметилрапаміцином.

У відношенні всіх вищезгаданих втілень сполук за даним винаходом, у яких група R_4 представляє заміщене циклогексанове кільце, подальші втілення, які можна згадати, включають такі, у яких відносна стереохімія замісників у циклогексановому кільці така, що кожний із замісників (включаючи полікетидне кільце, до якого приєднана R_4 група) може одночасно прийняти екваторіальне положення, коли кільце перебуває в конформації крісла. Таким чином, приклади сполук за винаходом, які можна згадати, включають такі, у яких групи, приєднані до 2-, 4- та/або 6-положенням циклогексанових кілець структурних фрагментів C, D, F, C(i) і F(i) перебувають у транс-положенні відносно полікетидного кільця, приєднаного в положенні 1-циклогексанової групи. Далі, інші сполуки за винаходом, які можна згадати, включають такі, у яких групи, приєднані в 3- та/або 5-положеннях циклогексанових кілець структурних фрагментів C, D, F, C(i) і F(i) перебувають у цис-положенні відносно полікетидного кільця, приєднаного в положенні 1-циклогексанової групи. Таким чином, ще подальші сполуки за винаходом, які можна згадати, включають такі, у яких, коли група R_4 представляє структурний фрагмент C(i), тоді відносно полікетидного кільця, приєднаного в положенні 1-циклогексанової групи, група R_7 (якщо присутня і особливо якщо є OH або OMe групою) володіє транс-стереохімією та група R_8 (якщо присутня і особливо якщо є OH або OMe групою) володіє цис-стереохімією. Подібним чином, коли група R_4 представляє циклогекс-3-енове кільце (наприклад, структурний фрагмент A або A(i)), тоді сполуки за винаходом, які можна згадати, включають такі, у яких відносно полікетидного кільця, приєднаного в положенні 1-циклогексанового кільця, замісники при 2- та/або 6-положеннях мають транс-стереохімію та замісники при 3-положенні мають цис-стереохімію.

Фахівець у даній галузі зрозуміє, що способи, описані тут для одержання 17-десметилрапаміцину та його аналогів, застосовні для одержання бібліотек споріднених аналогів. Тому у подальшому аспекті даний винахід надає бібліотеки аналогів 17-десметилрапаміцину, отримані із застосуванням способів за даним винаходом. Зокрема, даний винахід надає бібліотеки аналогів 17-десметилрапаміцину, що відрізняються за однією або більше ознакою: включена вихідна кислота, включена амінокислота, ступінь пост-PKS обробки та напівсинтетична дериватизація.

Нові аналоги рапаміцину застосовні прямо і як затравки для подальшого напівсинтезу або біоконверсії з метою одержання сполук, застосовних у якості імунодепресантів, протигрибкових агентів, протиракових агентів, протизапальних агентів, нейрорегенеративних агентів або агентів для лікування відторгнення трансплантата, захворювання трансплантат-проти-хазіяїна, аутоімунних пору-

шень, судинних захворювань і фіброзних захворювань та в регуляції загоєння ран. Способи напісінтетичної дериватизації рапаміцину та його аналогів добре відомі в даній області і включають (але не обмежені цим) такі модифікації, описані в, наприклад, U.S. 5665772; U.S. 5362718, WO 96/41807; U.S. 5728710, U.S. 5378836; U.S. 5138051; U.S. 5665772, U.S. 5391730; U.S. 5,023262, U.S. 5563145, U.S. 5446048, U.S. 5912253, U.S. 5221670; U.S. 5955457; WO 98/04279, U.S. 6015815 і U.S. 5432183).

У подальшому аспекті даний винахід надає застосування 17-десметилрапаміцину або його аналогів у медицині. У подальшому аспекті даний винахід надає застосування 17-десметилрапаміцину або його аналогів в одержанні медикаментів для індукції або підтримки імуні-депресії, стимуляції регенерації нервової тканини або лікування раку, злоякісності В-клітин, грибкових інфекцій, відторгнення трансплантата, захворювання трансплантат-проти-хазяїна, аутоімунних порушень, запальних захворювань, судинних захворювань і фіброзних захворювань і в регуляції загоєння ран.

Також відомо, що аналоги рапаміцину є корисними при лікуванні інших станів, включаючи, але не обмежуючись цим, лімфангіолейоміоматоз і туберозний склероз. Застосування й способи, що включають сполуку за винаходом, також охоплюють ці інші симптоми.

Фахівець у даній галузі зможе за допомогою рутинних дослідів визначити здатність цих сполук інгібувати ріст грибків (наприклад, Baker, H., et al., 1978; NCCLS Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts: Approved standard M27-A, 17(9). 1997). Додатково, фахівець у даній галузі зможе за допомогою рутинних дослідів визначити здатність цих сполук інгібувати ріст пухлинних клітин (див Dudkin, L., et al., 2001; Yu et al. 2001). У подальшому аспекті сполуки за даним винаходом застосовні для індукції імунідепресії, аналізи для визначення ефективності сполук щодо цього добре відомі фахівцям в даній області, наприклад, але не обмежуючись цим, Immunosuppressant activity - Warner, L.M., et al., 1992, Kahan et al. (1991) & Kahan & Camarao, 2001); Allografts - Fishbein, T.H., et al., 2002, Kirchner et al. 2000; Autoimmune/Inflammatory/Asthma - Carlson, R.P. et al., 1993, Powell, N. et al., 2001; Diabetes I - Rabinovitch, A. et al., 2002; Psoriasis - Reitamo, S. et al., 2001; Rheumatoid arthritis - Foey, A., et al., 2002; Fibrosis - Zhu, J. et al., 1999, Jain, S., et al., 2001, Gregory et al. 1993.

Здатність сполук за даним винаходом індукувати імунідепресію може бути продемонстрована в стандартних тестах, застосовуваних для цієї мети. У подальшому аспекті сполуки за даним винаходом застосовні у зв'язку з антифіброзним, нейрорегенеративним і проти-ангіогенним механізмами, фахівець у даній галузі зможе за допомогою рутинних дослідів визначити здатність цих сполук запобігати ангіогенезу (наприклад, Guba, M., et al., 2002). Фахівець у даній галузі зможе за допомогою рутинних дослідів визначити застосов-

ність цих сполук для лікування гіперпроліферативних судинних порушень, наприклад в ендопротезах судин (наприклад, Morice, M.C., et al., 2002). Додатково, фахівець у даній галузі зможе за допомогою рутинних дослідів визначити нейрорегенеративну здатність цих сполук (наприклад, Myskatsyn, T.M., et al., 2002, Steiner et al. 1997).

Даний винахід також надає фармацевтичну композицію, що включає 17-десметилрапаміцин або його аналог, або його фармацевтично прийнятну сіль разом з фармацевтично прийнятним носієм.

Вищезгадані сполуки за винаходом або їхній склад можна застосовувати загальноприйнятими способами, наприклад але не обмежуючись цим, їх можна застосовувати парентерально, орально, топікально (включаючи защічне, під'язичне або черешкірне застосування), за допомогою медичного пристосування (наприклад, ендопротез судини), шляхом інгаляції або ін'єкції (підшкірної або внутрім'язової). Застосування може складатися з одиничної дози або декількох доз за період часу.

Хоча можливо застосовувати сполуку за винаходом саму по собі, бажано включати її у фармацевтичний склад разом з одним або більше прийнятними носіями. Носій(і) повинні бути «прийнятними» у сенсі їхньої сумісності із сполуками за винаходом та відсутності шкідливої дії на реципієнта. Приклади підходящих носіїв описані більш детально нижче.

Сполуки за винаходом можна застосовувати самі по собі або в комбінації з іншими терапевтичними агентами, спільне застосування двох (або більше) агентів дозволяє значно понизити дози кожного з них для застосування, у такий спосіб зменшуючи спостережувані побічні дії.

В одному втіленні 17-десметилрапаміцин або його аналог застосовують разом з іншим терапевтичним агентом для індукції або підтримки імунідепресії, для лікування відторгнення трансплантата, захворювання трансплантат-проти-хазяїна, аутоімунних порушень, запальних захворювань, де кращі агенти включають, але не обмежуються цим, імунорегуляторні агенти, наприклад, азатіоприн, кортикостероїди, циклофосфамід, циклоспорин А, FK506, мікофенолат мофетіл, OKT-3 і ATG.

В альтернативному втіленні 17-десметилрапаміцин або його аналог застосовують разом з іншим терапевтичним агентом для лікування раку або злоякісності В-клітин, кращі агенти включають але не обмежені цим, метотрексат, лейковорин, адриаміцин, пренізон, блеоміцин, циклофосфамід, 5-фторурацил, паклітаксель, доцетаксель, вінкрістин, вінбластин, вінорелбін, доксорубіцин, тамоксифен, тореміфрен, мегестрол ацетат, анастрозол, гозерелін, анти-HER2 моноклональне антитіло (наприклад, Herceptin™), капецитабін, ралоксифен гідрохлорид, інгібітори EGFR (наприклад, Iressa®, Tarceva™, Erbitux™), інгібітори VEGF (наприклад, Avastin™), інгібітори протеасом (e.g. Velcade™), Glivec® або інгібітори hsp90 (наприклад, 17-AAG). До того ж, 17-десметилрапаміцин або його аналог можна застосовувати в комбінації з іншими терапіями, включа-

ючи але не обмежуючись цим, радіотерапію або хірургію.

В одному втіленні 17-десметилрапаміцин або його аналог призначають разом з іншим терапевтичним агентом для лікування судинного захворювання, кращі агенти включають але не обмежуються цим, інгібітори ACE, антагоністи рецептора ангіотензину II, похідні фібрової кислоти, інгібітори HMG-CoA редуктази, блокатори β -адренергетиків, блокатори кальцієвих каналів, антиоксиданти, антикоагулянти та інгібітори кров'яних пластинок (наприклад, Plavix™).

В одному втіленні 17-десметилрапаміцин або його аналог призначають разом з іншим терапевтичним агентом для стимуляції регенерації нервової тканини, кращі агенти включають але не обмежуються цим, нейротрофічні фактори, наприклад, фактор росту нервової тканини, фактор росту, отриманий із глії, фактор росту, отриманий з мозку, циліарний нейротрофічний фактор і нейротрофінін-3.

В одному втіленні 17-десметилрапаміцин або його аналог вводять разом з іншим терапевтичним агентом для лікування грибкових інфекцій, кращі агенти включають, але не обмежуються цим, амфотеріцин В, флуцитозин, ехінокандіни (наприклад, каспофунгін, анідулафунгін або мікафунгін), гризеофульвін, імідазольний або триазольний протигрибковий агент (наприклад, клотримазол, міконазол, кетоконазол, еконазол, бутконазол, оксіконазол, терконазол, ітраконазол, флуконазол або воріконазол).

У спільне введення включені всі способи доставки двох або більше терапевтичних агентів хворому як частина того самого режиму лікування, що очевидно для фахівця в даній області. Хоча два або більше агенти можуть застосовуватися одночасно в єдиному складі, це не є важливим. Агенти можуть вводитися в різних складах і в різний час.

Склади можуть перебувати зручним чином в одиничних лікарських формах і можуть бути отримані кожним зі способів, добре відомих фахівцям в області фармацевтики. Такі способи включають етап одержання суміші активного інгредієнта (сполуки за винаходом) з носієм, що становить один або більше додаткових інгредієнтів. В основному, склади одержують шляхом однорідного та ретельного змішування активного інгредієнта з рідкими носіями або тонко здрібненими твердими носіями або ними обома потім за необхідності, надання продукту форми.

Сполуки за винаходом звичайно застосовують орально або кожним з парентеральних шляхів, у вигляді фармацевтичного складу, що включає активний ігредієнт, за необхідності у вигляді додаткової солі нетоксичних органічних або неорганічних кислоти або основи у фармацевтично прийнятній лікарській формі. Залежно від порушення та хворого на лікуванні, а також шляху застосування, композиції можна застосовувати в різних дозах.

Наприклад, сполуки за винаходом можна застосовувати орально, за щічно або під'язично у формі таблеток, капсул, пігулок (ovules), еліксирів, розчинів або суспензій, які можуть містити віддуш-

ки або барвні агенти, для негайного, затриманого або контрольованого визільнення. Сполуки за винаходом можна також застосовувати шляхом внутрішньокавернозної ін'єкції.

Розчини або суспензії сполук за винаходом, що підходять для орального застосування, можуть також містити наповнювачі, наприклад, N,N-диметацетамід, диспергуючі засоби, наприклад, полісорбат 80, поверхнево-активні речовини та солюбілізатори, наприклад, поліетиленгліколь, Фозал 50 ПГ (який складається з фосфатиділхоліну, соєвих жирних кислот, етанолу, моно/діглицеридів, пропіленгліколю та аскорбіл пальмітату).

Таблетки можуть містити наповнювачі, такі як мікрокристалічна целюлоза, лактоза (наприклад, моногідрат лактози або безводну лактозу), цитрат натрію, карбонат кальцію, двоосновний фосфат кальцію та гліцин, розпушувачі такі як крохмаль (переважно, кукурудзяний, картопляний або тапіоковий крохмаль), крохмаль-гліколат натрію, кроскармелоза натрію та деякі комплексні силікати і зв'язувальні речовини гранул такі як полівінілпіролідон, гідроксипропілметилцелюлоза (HPMC), гідроксипропілцелюлоза (HPC), макрогол 8000, сахароза, желатин і акація. Додатково, можна включати агенти, що змазують, такі як стеарат магнію, стеаринова кислота, гліцерил-бегенат і тальк.

Тверді композиції подібного типу можна застосовувати як наповнювачі в желатинових капсулах. Кращі наповнювачі щодо цього включають лактозу, крохмаль, целюлозу, молочний цукор або поліетиленгліколі з високою молекулярною вагою. Для водних суспензій та/або еліксирів сполуки за винаходом можна комбінувати з різними підсолоджувачами або віддушками, барвниками або фарбами, з емульгаторами та/або суспендуєчими агентами та з розріджувачами такими як вода, етанол, пропіленгліколь і гліцерин та їхнє сполучення.

Таблетки можна одержувати шляхом пресування або формування, за необхідності з одним або більше допоміжними інгредієнтами. Пресовані таблетки можна одержувати шляхом пресування в підходящому агрегаті активного інгредієнта у вільно-текучому вигляді, такому як порошок або гранули, за необхідності змішаного зі зв'язувальною речовиною (наприклад, повідон, желатином, гідроксиметилцелюлозою), речовиною, що змащує, інертним розріджувачем, консервантом, розпушувачем (таким як крохмаль-гліколат натрію, що поперечно-зшитий повідон, поперечно-зшита карбоксиметилцелюлоза натрію), поверхнево-активним або диспергуючим агентом. Формування таблеток можна одержувати шляхом формування в підходящому агрегаті суміші порошкоподібної сполуки, зволоженої інертним рідким розріджувачем. Таблетки за необхідності можна покривати або наносити на них борозенки і можна формулювати так, щоб надати повільне або контрольоване вивільнення активного інгредієнта, застосовуючи, наприклад, гідроксипропілметилцелюлозу в різних пропорціях для надання бажаного профілю вивільнення.

Склади за даним винаходом, що підходять для орального застосування, можуть бути присутніми у вигляді окремих одиниць, таких як капсули, облатки або таблетки, де кожна містить певну кількість активного інгредієнта; як порошки або гранули; як розчин або суспензія у водній рідині або неполярній рідині; або як рідка емульсія олія-в-воді або емульсія воді-в-олії. Активний інгредієнт може також бути присутнім у вигляді пігулки, лікарської кашки або пасти.

Склади, що підходять для місцевого застосування через рот включають коржики, що включають активний інгредієнт в ароматизованій основі, звичайно в сахарозі, акції або трагаканті; пастилки, що включають активний інгредієнт в інертній основі, такий як желатин або гліцерин або сахарозу й акацію; полоскання для рота, що включають активний інгредієнт у підходящому рідкому носії.

Варто розуміти, що на додаток до інгредієнтів, особливо відзначених вище,клади за даним винаходом можуть включати інші агенти, загальноприйняті в даній області техніки, що мають відношення до типу розглянутого складу, наприклад, такі, підходящі для орального застосування, можуть включати ароматизуючі агенти.

Фармацевтичні композиції, пристосовані для місцевого застосування, можуть бути складені у вигляді мазей, кремів, суспензій, лосьйонів, порошків, розчинів, паст, гелів, імпрегнованих перев'язних матеріалів, спреїв, аерозолів або масел, трансдермальних пристосувань, порошків для присипки та т.п. Ці композиції можна одержувати за допомогою загальноприйнятих способів і містять активний агент. Таким чином, вони можуть також включати сумісні загальноприйняті носії та додаткові засоби, такі як консерванти, розчинники для сприяння проникненню ліків, засобу для зм'якшення в кремах або мазах і етанол або олеїловий спирт у лосьйонах. Такі носії можуть становити від приблизно 1% до приблизно 98% композиції. Звичайно, вони становлять до приблизно 80% композиції. Тільки для ілюстрації, крем або мазь одержують шляхом змішування достатньої кількості гідрофільного матеріалу та води, що містять від приблизно 5-10% по вазі сполуки, у достатніх кількостях для одержання крему або мазі, що мають потрібну консистенцію.

Фармацевтичні композиції, пристосовані для трансдермального застосування, можуть бути присутніми у вигляді окремих пластирів, призначених для перебування в близькому контакті з епідермісом реципієнта протягом довгого періоду часу. Наприклад, активний агент можна доставляти з накладки шляхом іонофорезу.

На додаток до зовнішніх тканин, наприклад, до рота та шкіри, композиції звичайно застосовують у вигляді місцевої мазі і крему. При готуванні у вигляді мазі, активний агент можна застосовувати разом з основою мазі, що змішується з парафіном або водою.

Альтернативно, активний агент можна готувати у вигляді крему з основою крему типу олія-у-воді або вода-в-олії.

Для парентерального застосування, рідкі одиничні лікарські форми готують із застосуванням

активного інгредієнта та стерильного розріджувача, наприклад, але не обмежуючись цим, води, спиртів, поліолів, гліцерину та рослинних олій, причому вода краща. Активний інгредієнт, залежно від розріджувача та застосованої концентрації, можна або суспендувати, або розчиняти в розріджувачі. При готуванні розчинів активний інгредієнт можна розчиняти у воді для ін'єкції та стерилізувати через фільтр перед заповненням підходящої пляшечки або ампули і його герметичним закриттям.

Переважно, такі агенти, як місцеві анестетики, консерванти та буферні агенти можна розчиняти в розріджувачі. Для збільшення стабільності композицію можна заморожувати після заповнення пляшечки та видаляти воду під вакуумом. Сухий ліофілізований порошок потім герметично закривають у пляшечці та додаткову пляшечку із водою для ін'єкцій можна поставляти для заповнення рідини перед уживанням.

Парентеральні суспензії готують, в основному, таким же способом, як розчини, крім того, що активний інгредієнт суспендують у розріджувачі замість того, щоб розчиняти, і стерилізацію не можна проводити шляхом фільтрації. Активний інгредієнт можна стерилізувати шляхом обробки окисом етилену перед суспендуванням у стерильному розріджувачі. Переважно, поверхнево-активна речовина або зволожуючий агент включають у композиції для полегшення однорідного розподілу активного інгредієнта.

Сполуки за винаходом можна також застосовувати за допомогою медичних пристосувань, відомих у даній області. Наприклад, в одному втіленні фармацевтичну композиції за винаходом можна застосовувати з безголковим пристосуванням для гіподермальних ін'єкцій, таким як пристосування, розкриті в патентах U.S. №№ 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824; або 4596 556. Приклади добре відомих імплантів і модулів, застосованих у даному винаході, включають US 4487 603, що розкриває вживляємий мікроінфузійний насос для подання ліків з контрольованою швидкістю; US 4486194, що розкриває терапевтичне пристосування для застосування медикаментів через шкіру; US 4447233, що розкриває медичний інфузійний насос для доставки ліків з точною швидкістю інфузії; US 4447224, що розкриває вживляємий інфузійний апарат змінного потоку для постійної подання ліків; US 4439196, що розкриває осмотичну систему доставки ліків, що характеризується багатокамерними відділеннями, та US 4475196, що розкриває осмотичну систему доставки ліків. У конкретному втіленні сполуки за винаходом можна застосовувати за допомогою елююючого ліки протеза судини, наприклад, що відповідає таким, описаним в WO 01/87263 і споріднених публікаціях або описаним Перин (Perin, EC, 2005). Багато інші такі імпланти, системи доставки та модулі відомі фахівцеві в даній області.

В альтернативному втіленні даного аспекту, сполуки за винаходом можна давати хворому у вигляді проліків, це особливо застосовно у випадку протиракового агента, але може також застосовуватися для інших випадків.

Термін «проліки», як застосовується в цій заявці, відноситься до попередника або похідної форми фармацевтично активної сполуки, яка менш цитотоксична в порівнянні із самими ліками та здатна до ензиматичної активації або перетворення в більше активну батьківську форму (див наприклад, Wilman D.E.V., 1986 і Stella V.J. et al, 1985).

Дозування для застосування сполуки за винаходом варіює залежно від конкретної сполуки, наявного захворювання, суб'єкта та природи і тяжкості захворювання та фізичного стану суб'єкта і обраного шляху застосування. Підходящі дозування можуть бути легко встановлені фахівцем у даній області.

Композиції можуть містити від 0,1% по вазі, переважно, від 10-60% або більше по вазі сполуки за винаходом залежно від способу застосування.

Фахівець у даній галузі легко здогадається, що оптимальна кількість і розподіл індивідуальних дозувань сполуки за винаходом визначається природою та ступенем стану, що підлягає лікуванню, формою, шляхом і місцем застосування та віком і станом окремого суб'єкта для лікування і що терапевт в остаточному підсумку визначить необхідне дозування для застосування. Це дозування можна повторювати так часто, як потрібно. У випадку розвитку побічних ефектів кількість та/або частоту застосування можна змінити або зменшити відповідно до нормальної клінічної практики.

В альтернативному аспекті даний винахід надає спосіб одержання 17-десметилрапаміцину або його аналога, де згаданий спосіб включає:

(а) заміну метилмалоніл-КоА-специфічного АТ-домена модуля 10 PKS рапаміцину малоніл-КоА-специфічним АТ-доменом.

(б) експресію генетично модифікованого PKS рапаміцину в підходящій клітині-хазяїні;

(в) культивування клітини-хазяїна в таких умовах, коли продукується 17-десметилрапаміцин або його аналог, включаючи за необхідності подання екзогенних попередників;

(г) за необхідності виділення сполуки, отриманої таким способом.

У конкретному втіленні отримана сполука не є 17-десметилрапаміцином.

Заміна призводить до включення малоніл-КоА за допомогою модуля 10 PKS рапаміцину та відсутності метильної гілки при C17 у порівнянні з рапаміцином або пре-рапаміцином. У кращому втіленні малоніл-КоА-специфічний АТ-домен вибирають із одного з наступних кластерів полікетид-синтазних генів: рапаміцину, монексину, FK506, еритроміцину, FK520, амфотерицину, анголаміцину, тілозину, «хіг», FK523, меридаміцину, антаскоміцину, FK525 і тсукубаміцину. У більше кращому втіленні малоніл-КоА-специфічний АТ-домен вибирають із одного з наступних кластерів: рапаміцину, монексину або FK506. У більш бажаному втіленні малоніл-КоА-специфічний АТ-домен вибирають із групи, що складається з АТ-домена модуля 2 рапаміцину, АТ-домена модуля 3 монексину, АТ-домена модуля 6 монексину, АТ-домена модуля 8 монексину, АТ-домена модуля 3 FK506 і АТ-домена модуля 7 FK506. У найбільш кращому

втіленні малоніл-КоА-специфічний АТ-домен є АТ-домена модуля 2 рапаміцину.

Варто відмітити, що ряд помилок у закладеній у базу даних послідовності були ідентифіковані, як показано в WO 04/007709. Справжні автори передбачають, що можуть ще бути помилки в закладеній у базу даних послідовності, деякі з яких можуть розташовуватися в районах, застосовуваних у даній роботі для генетичної модифікації кластера. Послідовності в номенклатурі послідовностей представляють послідовності синтезованих олігонуклеотидів, які створені на основі опублікованої послідовності та фрагментів ДНК, ампліфікованих за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (PCR), які секвенували. Тому вони можуть не бути ідентичними закладеній в базу даних послідовності. Фахівець у даній галузі зрозуміє, що в клонованих фрагментах ДНК, які не були секвеновані, буде послідовність, біологічно вірна для утворення функціональних білків і помилки в послідовності, поміщеної в банк даних, ніяк не вплинуть на це. Також ідентифіковані (NCBI інвентарний номер X86780) передбачені продукти трансляції PKS генів і (Aparicio et al., 1996) границі доменів і модулів. Фахівець у даній галузі зрозуміє, що є якась розпливчастість у визначенні домена, і границі, як визначено в Schwecke et al., (1995), варто розглядати як приклади того, де границі можуть розташовуватися.

Фахівець у даній галузі зрозуміє, що є багато малоніл-КоА-специфічних АТ-доменів у полікетид-синтазах типу I (і змішаних PKS-NRPS), які можна застосовувати як донорів АТ-доменів, і що ця трансформація може бути проведена з кожним із числа вибірових по малоніл-КоА ацилтрансферазних доменів з будь-якою PKS типу I або змішаних NRPS/PKS. Фахівець у даній галузі зрозуміє, що включення малоніл-КоА за допомогою АТ модуля 10 можна здійснити шляхом мутації гарАТ10, так щоб змінити його специфічність, наприклад, застосовуючи способи, як описано в WO 02/14482 або шляхом заміни модуля 10 модулем, що містить АТ-домен, вибіровий по малоніл-КоА, де згаданий модуль включає природний модуль або комбінаторний модуль.

Вставка малоніл-КоА-специфічного АТ у модуль 10 PKS рапаміцину досягається шляхом вставки ділянок зв'язування рестриктаз, що фланкують донорний домен, і клонування його у фазі з рамкою зчитування в те ж положення, що в ацилтрансферази модуля 10 рапаміцину. Фахівець у даній галузі зрозуміє, що цього можна досягти шляхом застосування ряду ділянок зв'язування ферментів рестрикції та ряду ділянок сполуки (junction). У кращому втіленні малоніл-КоА-специфічний АТ-домен АТ2 рапаміцину вставляють у фрагмент ДНК, фланкований ділянками зв'язування ферментів рестрикції MscI і AvrII. Ділянку MscI вводять у початок АТ-домена, перекриваючи послідовність ДНК, що кодує консервативну послідовність амінокислот PGQ, див нижче. Ділянку AvrII вводять у кінець АТ-домена, перекриваючи послідовність ДНК, що кодує консервативну послідовність амінокислот VLG, див нижче. Фахівець у даній галузі зрозуміє, що в рамках стратегії клону-

вання ділянка MscI метильована і потрібне проведення через такий штам *E. coli* як ET12567 для одержання dcm⁻ ДНК перед обробкою ферментом рестрикції MscI. Альтернативні втілення включають застосування інших ділянок зв'язування фер-

ментів рестрикції, наприклад, але не обмежуючись цим, SpeI і AvrII, MscI і BglII, SpeI і BglII. Альтернативною кращою парою ділянок рестрикції є SpeI і AvrII.

Одержання ділянки MscI у початки AT-домена:

Rap AT10 F P G Q G (SEQ ID NO:1)

ttt ccc ggg cag gga (SEQ ID NO:2)

Rap AT2 F P G Q G (SEQ ID NO:3)

ttc ccg ggt cag ggg (SEQ ID NO:4)

MscI сполука F P G Q G (SEQ ID NO:5)

ttt cct ggc cag ggg (SEQ ID NO:6)

Одержання ділянки AvrII наприкінці AT-домена

Rap AT10 A V L G D (SEQ ID NO:7)

gcg gtg ctg ggt gat (SEQ ID NO:8)

Rap AT2 A V L G D (SEQ ID NO:9)

gcg gtg ctg ggt gat (SEQ ID NO:10)

AvrII сполука A V L G D (SEQ ID NO:11)

gcg gtc cta ggt gat (SEQ ID NO:12)

У кращому втіленні полікетид-синтаза рапаміцину з *S. hygrosopicus* MG2-10 генетично модифікована для одержання малоніл-КоА-специфічного АТ у модулі 10. У бажаному втіленні малоніл- КоА є АТ2 рапаміцину, як описано в прикладі 1 тут.

Фахівець у даній галузі зрозуміє, що є кілька шляхів, за допомогою яких ДНК можна ввести в клітину для того, щоб здійснити генетичну модифікацію генного кластера PKS. У прикладі 1 ми описуємо спосіб кон'югації із застосуванням чутливого до температури ориджену реплікації плазмиди. Фахівець у даній галузі зрозуміє, що інші способи також можна застосовувати, наприклад, але не обмежуючись цим, гомологічну рекомбінацію без застосування вектора, здатного до самореплікації, способи, як описано в WO 03/033699. Тому рекомбінантні підходи до одержання модифікованого PKS рапаміцину не слід обмежувати описаними тут.

Однак, описані тут способи є кращими способами створення генетично модифікованого кластера PKS. На даний момент не показано успішної генетичної модифікації гарА, гарВ або гарС за допомогою альтернативних способів, описаних вище.

У подальшому аспекті даний винахід надає спосіб створення рекомбінантного штаму, що містить генетично модифікований біосинтетичний кластер, що кодує полікетид-синтазу рапаміцину, де метилмалоніл-КоА-специфічний АТ-домен модуля 10 замінений малоніл- КоА -специфічним АТ-доменом, як описано вище. У кращому втіленні

малоніл- КоА -специфічний АТ-домен обраний з одного з наступних кластерів полікетид-синтазних генів: рапаміцину, моненсину, FK506, еритроміцину, FK520, амфотерицину, анголаміцину, тілозину, «хіг», FK523, мерідаміцину, антаскоміцину, FK525 і тсукубаміцину. У більш кращому втіленні малоніл-КоА-специфічний АТ-домен вибирають із одного з наступних кластерів: рапаміцину, моненсину та FK506. У ще більш кращому втіленні АТ-домен вибирають із групи, що складається з модуля 2 рапаміцину, модуля 3 моненсину, модуля 6 моненсину, модуля 8 моненсину, модуля 3 FK506 і модуля 7 FK506. У найбільш кращому втіленні малоніл-КоА-специфічний АТ-домен походить із модуля 2 рапаміцину.

Хоча генетична модифікація полікетид-синтазного шляху рапаміцину наведена тут як приклад для *S. hygrosopicus* MG2-10 (одержання якого розкрито в WO 04/007709 і в Gregory et al., (2004)), фахівець у даній галузі зрозуміє, що ці способи можна так само застосовувати до дикого типу *S. hygrosopicus* NRRL54 91 і до інших споріднених штамів (див нижче). Переважно, генетично модифікований штам вибирають із групи, що складається з *S. hygrosopicus* MG2-10 і *S. hygrosopicus* NRRL5491.

У цьому контексті штами, споріднені *S. hygrosopicus* NRRL5491, включають: *Actinoplanes* sp. N902-109 (наприклад, FERM BP-3832), *Streptomyces* sp. AA6554, *Streptomyces hygrosopicus* var. *ascomyceticus* MA 6475 (наприклад, ATCC 14891), *Streptomyces hygrosopicus*

var. *ascomyceticus* MA 6678 (наприклад, ATCC 55087), *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6674, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (наприклад, ATCC 55276), *Streptomyces tsukubaensis* No.9993 (наприклад, FERM BP-927), *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *yakushimaensis*, *Streptomyces* sp. (наприклад, DSM 4137), *Streptomyces* sp. (наприклад, DSM 7348), *Micromonospora* n.sp. A92-306401 (наприклад, DSM 8429) і *Streptomyces* sp. MA 6858 (наприклад, ATCC 55098). В одному втіленні штам не є рекомбінантною *S. hygroscopicus* клітиною-хазяїном, продукуючою 17-десметилрапаміцин. В іншому втіленні штам не є рекомбінантною клітиною-хазяїном, продукуючою 17-десметилрапаміцин під час відсутності подання екзогенних попередників. У подальшому втіленні штам не є рекомбінантною клітиною-хазяїном *S. hygroscopicus*, що містить делецію п'яти суміжних генів, *garQONML*.

За необхідності, спосіб можна комбінувати зі способами, розкритими в WO 04/007709, для одержання аналогів 17-десметилрапаміцину, які відрізняються від природної структури рапаміцину ступенем обробки пост-PKS ферментами або включенням неприродних вихідних кислот.

Втілення попередніх аспектів за винаходом, що надає спосіб одержання 17-десметилрапаміцину та його аналогів і спосіб одержання рекомбінантного штаму, що містить біосинтетичний кластер, що кодує сконструйовану полікетид-синтазу рапаміцину, включає наступні етапи:

(а) виділення АТ з метою ввести його як єдиний фрагмент ДНК із підходящими фланкуючими ділянками зв'язування рестриктаз,

(б) ампліфікація та виділення районів послідовності ДНК, гомологічних фланкуючим послідовностям АТ-мішені за допомогою тих же підходящих ділянок зв'язування рестриктаз,

(в) літування разом трьох фрагментів ДНК, описаних в (а) і (б), з одержанням у фазі з рамкою зчитування послідовності LHS гомології з наступним донорним АТ-доменом з наступної RHS гомології,

(г) введення повної послідовності з (в) у вектор для введення в штам-хазяїн для одержання кінцевої плазмід, де згадана плазмідка включає:

(1) *oriT* для кон'югації,

(2) один або більше маркер стійкості до антибіотика,

(3) чутливий до температури ориджин реплікації, так що інтегранти можна буде відбирати при 37°C і

(4) ориджин реплікації *E. coli*,

(д) трансформація штаму-хазяїна шляхом кон'югації із застосуванням кінцевої плазмід, як описано в (г) вище,

(е) відбір трансформованих клітин за стійкістю до відповідного антибіотика,

(ж) одержання первинних інтегрантів шляхом культивування при 37°C із селекцією за допомогою антибіотика,

(з) скринінг вторинних рекомбінантів шляхом вирощування під час відсутності антибіотика, також при 37°C,

(і) ідентифікація потрібного штаму по здатності продукувати цільовий продукт і

(к) за необхідності, підтвердження генетики штаму за допомогою стандартних способів.

Фахівець у даній галузі зрозуміє, що підходящі ділянки зв'язування рестриктаз, на які посилаються на етапі (б), повинні бути такими, щоб три послідовності виявилися у фазі з рамкою зчитування, коли вони лігровані разом, вони не обов'язково є такими ж, як ті дві ділянки, що застосовані для АТ; точніше, ділянка зв'язування рестриктаз із правої сторони (RHS) лівостороннього району гомології повинна бути такою ж, як ділянка з лівої сторони (LHS) АТ, або сумісною з нею, щоб дати послідовність у фазі з рамкою зчитування; ділянка рестрикції з лівої сторони лівостороннього району гомології може бути будь-якою ділянкою, що підходить для проведення наступних етапів клонування. Подібним чином, ділянка з лівої сторони правобічного району гомології повинна бути такою ж, як ділянка із правої сторони АТ, або сумісною з нею, щоб дати послідовність у фазі з рамкою зчитування; ділянка рестрикції із правої сторони правобічного району гомології може бути будь-якою ділянкою, що підходить для проведення наступних етапів клонування.

У подальшому аспекті даний винахід надає спосіб одержання аналога 17-десметилрапаміцину, де згаданий спосіб включає:

(а) створення рекомбінантного штаму, у якого метилмалоніл-КоА-специфічний АТ-домен модуля 10 PKS рапаміцину замінений малоніл-КоА-специфічним АТ-доменом,

(б) подання неприродних вихідних кислот культурі згаданого рекомбінантного штаму в умовах, що підходять для продукції полікетид, і

(в) за необхідності виділення сполук, отриманих таким способом.

Тому даний винахід надає спосіб одержання аналогів 17-десметилрапаміцину, які включають неприродні вихідні кислоти. Зокрема, даний винахід надає включення циклічних і гетероциклічних вихідних кислот в аналог 17-десметилрапаміцину, де згаданий спосіб включає подання згаданих альтернативних вихідних кислот штаму, що містить генетично модифікований кластер біосинтетичних генів рапаміцину, що відповідає дальній за синтез серцевини десметилпрепараміцину. В одному втіленні в рекомбінантного штаму ген виробництва попередника вилучений або інактивований. У кращому втіленні геном виробництва попередника, що був вилучений або інактивований, є *garK*. У подальшому кращому втіленні в рекомбінантного штаму *garK* вилучений або інактивований і неприродну кислоту, що подається при рості штаму, вибирають із групи, що складається із циклогексанкарбонової кислоти, 3-метилциклогексанкарбонової кислоти, циклогептанкарбонової кислоти, 3-фтор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 4-фтор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 3-хлор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти та 4-хлор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти. В одному втіленні штам не є рекомбінантними *S. hygroscopicus* клітинами-хазяїнами, які продукують

17-десметилрапаміцин. У подальшому втіленні штам не є рекомбінантними клітинами-хазяїнами *S. hygrosopicus*, які продукують 17-десметилрапаміцин під час відсутності подання екзогенних попередників.

Цей аспект винаходу надає способи ефективного виробництва безлічі базових продуктів шляхом включення неприродних попередників (наприклад, циклічних або гетероциклічних вихідних кислот). Способи можуть також охоплювати подальші аспекти, як описано нижче.

Тому в одному аспекті даний винахід надає спосіб одержання аналогів 17-десметилрапаміцину, які включають циклічну або гетероциклічну вихідну кислоту, де згаданий спосіб включає:

(а) модифікацію згаданого рекомбінантного штаму, що містить генетично модифіковані гени PKS рапаміцину, щоб додатково видалити або інактивувати хоча б один ген виробництва попередника, і

(б) подання циклічної або гетероциклічної вихідної кислоти згаданому рекомбінантному штаму.

У кращому втіленні рекомбінантний штам одержують із застосуванням способів, описаних в WO 04/007709 і тут. У кращому втіленні, одним з генів виробництва попередника, що був вилучений або інактивований, є *garK*.

В одному втіленні подавані екзогенні кислоти включають (не обмежуючись цим) циклоалкілкарбонові кислоти або їх прості складні ефіри з розміром кільця, що варіює від 5 до 7 атомів. У кращому втіленні карбоновими кислотами є такі, описані в WO 04/007709.

В іншому кращому втіленні неприродними вихідними кислотами є описані в прикладі 2 тут. У більше кращому втіленні неприродні вихідні кислоти, що подаються при рості цього штаму, вибирають із групи, що складається із циклогексанкарбонової кислоти, циклогептанкарбонової кислоти, 3-фтор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 4-фтор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 3-хлор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти та 4-хлор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти.

В одному втіленні гетероциклічні вихідні кислоти, які можна подавати, включають (не обмежуючись цим): гетероциклічні карбонові кислоти або їх прості складні ефіри з розміром кільця, що варіює від 5 до 7 атомів, згадані кільця можуть містити один або більше гетероатомів, коли кільце містить більше одного гетероатома, згадані гетероатоми можуть бути однаковими або вони можуть бути різними. Гетероатом можна вибирати із групи, що складається з O, S або N. Коли кільце містить N, він може бути у вигляді вільної основи (NH), у вигляді ацильованого аміну (N-ацил), у вигляді алкільованого аміну (N-алкіл) або у вигляді алкільованого N-окису (N-алкіл, N-O). Коли кільце містить S, вона може бути у вигляді циклічного тіоефіру, сульфоксиду або сульфону. У всіх вищеописаних гетероциклічних карбонових кислотах, залишок кільця може бути незаміщеним або за необхідності він може містити один або більше замісник, включаючи, але не обмежуючись цим, C₁₋₄ алкіл, OH, F

і Cl. Переважно, в одному втіленні гетероциклічна карбонова кислота містить 6-членне кільце з атомом кисню в четвертому положенні. У подальшому кращому втіленні гетероциклічна карбонова кислота є тетрагідро-2H-піран-4-карбоновою кислотою.

У подальшому аспекті даний винахід надає спосіб одержання аналога 17-десметилрапаміцину, де згаданий спосіб включає:

(а) створення рекомбінантного штаму, у якого метилмалоніл-КоА-специфічний АТ-домен модуля 10 PKS рапаміцину замінений малоніл-КоА-специфічним АТ-доменом (як описано більш детально вище),

(б) додатково видалення або інактивацію одного або більше з допоміжних генів рапаміцину, обраних з *garI*, *garJ*, *garK*, *garL*, *garM*, *garN*, *garO* і *garQ*,

(в) культивування штаму, отриманого таким чином, за необхідності в присутності екзогенного попередника, якщо потрібно, для одержання аналога 17-десметилрапаміцину та

(г) за необхідності виділення сполуки, отриманої в такий спосіб.

У кращому втіленні допоміжними генами, які видаляють або інактивують, є *garI*, *garJ* і *garQ*. З альтернативному кращому втіленні допоміжними генами, які видаляють або інактивують, є *garJ*, *garM* і *garQ*.

В альтернативному аспекті даного винаходу, змінений PKS рапаміцину експресують у клітині-хазяїні, у якій один або більше з допоміжних генів рапаміцину вилучений або інактивований. В альтернативному втіленні змінений PKS рапаміцину експресують у клітині-хазяїні, у якій всі допоміжні гени вилучені або інактивовані, наприклад, але не обмежуючись цим, у штамі *S. hygrosopicus* MG2-10 (WO 04/007709; Gregory et al., 2004). Фахівець у даній галузі зрозуміє, ґрунтуючись на розкритті, представленому в WO 04/007709, що якщо *garK* був вилучений або інактивований, необхідно буде надати екзогенну кислоту для одержання 17-десметилрапаміцину або його аналога.

У подальшому аспекті даний винахід надає спосіб одержання аналога 17-десметилрапаміцину, де згаданий спосіб включає:

(а) створення рекомбінантного штаму, у якого метилмалоніл-КоА-специфічний АТ-домен модуля 10 PKS рапаміцину замінений малоніл-КоА-специфічним АТ-доменом (як описано більш детально вище),

(б) додатково, видалення або інактивацію одного або більше з допоміжних генів рапаміцину, обраних з *garI*, *garJ*, *garK*, *garL*, *garM*, *garN*, *garO* і *garQ*,

(в) повторну вставку всіх або частини допоміжних генів рапаміцину *in-trans* для комплементції або часткової комплементції делеції,

(г) культивування штаму, отриманого таким чином, за необхідності в присутності екзогенного попередника, якщо потрібно, для одержання аналога 17-десметилрапаміцину та

(г) за необхідності виділення сполуки, отриманої в такий спосіб.

У кращому втіленні на етапі (б) видаляють або інактивують всі допоміжні гени рапаміцину. У по-

дальшому кращому втіленні рекомбінантний штам генетично комплементують одним або більше допоміжними генами, обраними із групи, що складається з *garI*, *garJ*, *garK*, *garL*, *garM*, *garN*, *garO* і *garQ* або їхніми гомологами. У конкретному втіленні штам комплементують всіма допоміжними генами. У подальшому кращому втіленні рекомбінантний штам генетично комплементують допоміжними генами рапаміцину *garK*, *garM*, *garN*, *garO* і *garL* або їхніми гомологами. В альтернативному кращому втіленні рекомбінантний штам генетично комплементують допоміжними генами рапаміцину *garK*, *garI*, *garN*, *garO* і *garL* або їхніми гомологами.

Тому в конкретному аспекті за даним винаходом перестановка АТ здійснюється в *S. hygroscopicus* MG2-10 (що розкрито в WO 04/007709 і Gregory et al., (2004)), де всі допоміжні гени були вилучені для одержання штаму, що має потребу в хімічній комплементції за допомогою екзогенних кислот для виробництва продукту рапаміцину. Наприклад, подання циклогексанкарбонової кислоти приводить до виробництва 17-десметил-39-десгідроксипре-рапаміцину та подання вихідної кислоти 3, 4-дигідроксициклогексанкарбонової кислоти призводить до виробництва 17-десметилпре-рапаміцину. У кращому втіленні штамом, отриманим шляхом перестановки АТ в *S. hygroscopicus* MG2-10 є *S. hygroscopicus* MG7-9, що створюють, як описано в прикладі 1, шляхом введення ацил-трансферази модуля 2 рапаміцину в модуль 10 з метою заміни природної АТ10.

Фахівець у даній галузі зрозуміє, що в *S. hygroscopicus* MG7-9 відсутня копія *garL* і що описана хімічна комплементція не відноситься до додавання піпеколінової кислоти або альтернативної амінокислоти. Це той випадок, коли доповнення складеного середовища росту лізіном служить для надання штаму піпеколінової кислоти (за допомогою процесу не розкритого, але виявленого шляхом спостереження виробництва аналогів пре-рапаміцину). Вирощування цього штаму (*S. hygroscopicus* MG7-9) призводить до спів-продукції аналогів 17-десметилпролілрапаміцину, спостережуваних у малих кількостях, і подібні спостереження зроблені для інших штамів, дефіцитних по *RapL*. Екзогенні природні та нові амінокислоти можна включати в молекулу рапаміцину дикого типу шляхом подання їх у середовище росту в безпосередній конкуренції з піпеколіновою кислотою. Фахівець у даній галузі зрозуміє, що подібним чином природні або неприродні амінокислоти можна подавати штамам з вилученим *garL*, таким як, але не обмежуючись цим, *S. hygroscopicus* MG7-9 для того, щоб надати далі нові аналоги рапаміцину.

За необхідності один або більше з вилучених допоміжних генів можна ввести в згадану клітину-хазяїна під контролем підходящого промотору. У кращому втіленні один або більше з вилучених генів можна ввести в хромосомну ділянку приєднання фага *Streptomyces phiBT1* (Gregory et al., 2003). Фахівець у даній галузі зрозуміє, що комплементція *in-trans* не обмежується цією ділянкою приєднання фага, або, дійсно, застосуванням ділянки приєднання. Тому комплементцію вилу-

чених допоміжних генів також можна провести, не обмежуючись цим, шляхом вставки одного або більше допоміжних генів під контролем підходящого промотору в ділянку приєднання іншого фага, такого як ділянка приєднання фага *Streptomyces phiC31* наприклад, за допомогою застосування похідного pSET152 (Bierman et al., 1992). Таку інтеграцію можна подібним чином робити за допомогою інших доступних функцій інтеграції, включаючи але не обмежуючись цим: вектори, засновані на pSAM2 інтегразі (наприклад, в pPM927 (Smovkina et al., 1990)), R4 інтегразі (наприклад, в pAT98 (Matsuura et al., 1996)), VWB інтегразі (наприклад, в pKT02 (Van Mellaert et al., 1998)), і L5 інтегразі (наприклад, Lee et al., 1991). Фахівець у даній галузі зрозуміє, що є багато фагів актиноміцетів, які, як можна чекати, містять функції інтеграції, які можна перенести у вектор достатньо разом з підходящим промотором для одержання далі систем, які можна застосовувати для введення генів в *S. hygroscopicus*. Дійсно, ще багато фагів *S. hygroscopicus* ідентифіковано та з них можна одержувати функції інтеграції й застосовувати подібним чином. У міру опису більшого числа фагів, можна чекати, що з'явиться більше доступних інтеграз, які можна буде застосовувати подібним чином. У деяких випадках це може вимагати зміни штаму-хазяїна шляхом додавання специфічного attB ділянки для інтегрази, щоб здійснити високу ефективність інтеграції. Введення допоміжних генів під контролем підходящого промотору також можна провести, але не обмежуючись цим, шляхом гомологічної рекомбінації в нейтральне положення в хромосомі, гомологічної рекомбінації в не-нейтральне положення в хромосомі (наприклад, для переривання обраного гена). Вектори, здатні до само-реплікації також можна застосовувати, наприклад але не обмежуючись цим, вектори, що містять *Streptomyces* початок реплікації з pSG5 (наприклад, pKC1139 Bierman et al., 1992), pIJ101 (наприклад, pIJ487, Kieser et al., 2000) і SCP2* (наприклад, pIJ698, Kieser et al., 2000). Більш, ніж одна з перерахованих вище систем може застосовуватися для генетичної модифікації рекомбінантного штаму з метою одержання аналога 17-десметилрапаміцину. Фахівець у даній галузі зрозуміє, що можна також одержувати біосинтетичні шляхи, які будуть продукувати ті ж продукти, як у випадку видалення всіх допоміжних генів і комплементції *in trans*, шляхом інактивації або видалення кожного допоміжного гена по потребі. Експресія таких генів у згаданій клітині-хазяїна при поданні вільних кислот по потребі веде до продукції аналогів 17-десметилрапаміцину, у які включені природні або неприродні вихідні кислоти та/або в яких змінені рівні пост-полікетидної обробки. У подальшому втіленні змінений PKS рапаміцину можна експресувати у гетерологічній клітині-хазяїні, у якій від природи відсутні допоміжні гени рапаміцину (або їхні еквіваленти) разом з відбором згаданих допоміжних генів. У кращому втіленні хоча б *garK* вилучений або, з іншого боку, *RapK* відсутній у штаму-хазяїна та різноманітні екзогенні карбонові кислоти можна подавати згаданому штаму-хазяїнові для одержання аналогів 17-

десметилрапаміцину із включеними неприродними вихідними кислотами.

У подальшому аспекті за винаходом, вищезгадані модифікації комбінують, тому даний винахід надає спосіб одержання аналога 17-десметилрапаміцину, де згаданий спосіб включає:

(а) створення рекомбінантного штаму, у якого метилмалоніл-КоА-специфічний АТ-домен модуля 10 PKS рапаміцину замінений малоніл-КоА-специфічним АТ-доменом,

(б) додатково, видалення або інактивацію одного або більше з допоміжних генів рапаміцину, обраних з *garI*, *garJ*, *garK*, *garL*, *garM*, *garN*, *garO* і *garQ*,

(в) за необхідності повторну вставку всіх або частини допоміжних генів *in trans* для комплементарності або часткової комплементарності делеції,

(г) подання неприродних вихідних кислот згаданому рекомбінантному штаму в умовах підходящих для продукції полікетидів, та

(д) за необхідності виділення сполуки, отриманої в такий спосіб.

У кращому втіленні допоміжний ген(и), які вилучені або інактивовані, включають *garK*.

У кращому втіленні на етапі (б) видаляють або інактивують всі допоміжні гени рапаміцину. У конкретному аспекті даний винахід надає альтернативний спосіб одержання аналогів 17-десметилрапаміцину з убудованими неприродними вихідними кислотами шляхом генетичної комплементарності рекомбінантного штаму, у якого вилучені або інактивовані всі допоміжні гени рапаміцину, допоміжними генами рапаміцину *garI*, *garJ*, *garL*, *garM*, *garN*, *garO* і *garQ* або їхніми гомологами, з одержанням штаму, що містить всі допоміжні гени крім *garK*, і подання екзогенних вихідних кислот. У кращому втіленні екзогенною неприродною вихідною кислотою є циклогексанкарбонова кислота. В альтернативному кращому втіленні неприродною вихідною кислотою є циклогептанкарбонова кислота. В альтернативному кращому втіленні неприродні вихідні кислоти вибирають із групи, що складається з 3-фтор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 4-фтор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 3-хлор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти та 4-хлор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти.

У подальшому аспекті даний винахід надає спосіб одержання аналогів 17-десметилрапаміцину шляхом ферментації рекомбінантного штаму з комбінаціями активностей допоміжних генів і неприродних вихідних кислот. У кращому втіленні вилученими допоміжними генами є *garK*, *garM* і *garQ*, і неприродною вихідною кислотою, що подається цьому штаму, є циклогексанкарбонова кислота. В альтернативному кращому втіленні неприродною вихідною кислотою, що подається цьому штаму з вилученими генами *garK*, *garM* і *garQ*, є 3-метилциклогексанкарбонова кислота. В альтернативному кращому втіленні неприродною вихідною кислотою, що подається цьому штаму з вилученими допоміжними генами *garK*, *garM* і *garQ*, є циклогептанкарбонова кислота. У

кращому втіленні вилученими допоміжними генами є *garK*, *garM* і *garQ*, і неприродну вихідну кислоту, що подається цьому штаму, вибирають із групи, що складається з 3-фтор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 4-фтор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 3-хлор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти та 4-хлор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти.

У подальшому кращому втіленні вилученими допоміжними генами є *garK*, *garI* і *garQ*, і неприродну вихідну кислоту, що подається цьому штаму, вибирають із групи, що складається з 3-метилциклогексанкарбонової кислоти, циклогексанкарбонової кислоти, циклогептанкарбонової кислоти, 3-фтор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 4-фтор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 3-хлор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти та 4-хлор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти. У більш бажаному втіленні вилученими допоміжними генами є *garK*, *garI* і *garQ*, і неприродною вихідною кислотою, що подається цьому штаму, є 3-метилциклогексанкарбонова кислота. У більш бажаному втіленні вилученими допоміжними генами є *garK*, *garI* і *garQ*, і неприродною вихідною кислотою, що подається цьому штаму, є циклогексанкарбонова кислота.

В альтернативному кращому втіленні вилученими допоміжними генами є *garK* і *garM* і неприродну вихідну кислоту, що подається цьому штаму, вибирають із групи, що складається з 3-метилциклогексанкарбонової кислоти, циклогексанкарбонової кислоти, циклогептанкарбонової кислоти, 3-фтор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 4-фтор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 3-хлор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти та 4-хлор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти. У найбільш бажаному втіленні неприродною вихідною кислотою, що подається цьому штаму, є циклогексанкарбонова кислота.

У подальшому альтернативному кращому втіленні вилученими допоміжними генами є *garK*, *garI* і *garM*, і неприродну вихідну кислоту, що подається цьому штаму, вибирають із групи, що складається з 3-метилциклогексанкарбонової кислоти, циклогексанкарбонової кислоти, циклогептанкарбонової кислоти, 3-фтор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 4-фтор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 3-хлор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти та 4-хлор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти. У найбільш бажаному втіленні неприродною вихідною кислотою, що подається цьому штаму, є циклогексанкарбонова кислота.

В альтернативному кращому втіленні вилученими допоміжними генами є *garK*, *garI*, *garJ* і *garQ*, і неприродну вихідну кислоту, що подається цьому штаму, вибирають із групи, що складається з 3-метилциклогексанкарбонової кислоти, циклогексанкарбонової кислоти, циклогептанкарбонової кислоти, 3-фтор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 4-фтор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти, 3-хлор-4-гідроксициклогексанкарбонової кислоти та 4-хлор-3-гідроксициклогексанкарбонової кислоти.

(б) за необхідності видалення або інактивацію одного або більше з допоміжних генів rapA, rapB, rapC, rapD, rapE, rapF, rapG, rapH, rapI, rapJ, rapK, rapL, rapM, rapN, rapO і rapQ.

(в) за необхідності повторну вставку всіх або частини допоміжних генів *in trans* для комплементування або часткової комплементування делеції,

(г) подання ряду неприродних вихідних кислот згаданому рекомбінантному штаму для одержання ряду аналогів 17-десметилрапаміцину,

(д) подання природних або нових амінокислот в умовах, що підходять для продукції полікетидів,

(д) за необхідності виділення сполук, отриманих таким чином, і

(е) за необхідності проведення напівсинтезу із застосуванням виділених аналогів рапаміцину.

Даний винахід далі проілюстрований наступними прикладами, які жодним чином не розглядаються як обмежуючі область домагань винаходу.

Приклади

Матеріали

Всі ферменти та реагенти для молекулярної біології отримані з комерційних джерел.

Бактеріальні штами та умови росту

Escherichia coli DH10B (GibcoBRL) вирощують у середовищі 2xTY як описано в Sambrook et al. (1989) і *E. coli* ET12567(pUZ8002) як описано в Paget et al. (1999) у середовищі 2xTY з канаміцином (25 мг/л). Вектор pUC18 отриманий від New England Biolabs. Вектор pKC1139 описаний в Practical Streptomyces Genetics, Kieser et al. (2000). Трансформовані клітини *E. coli* відбирають у присутності 100 мг/л ампіциліну або 50 мг/л апраміцину.

S. hygroscopicus MG2-10 (WO 04/007709; Gregory et al., 2004) і його похідні підтримують на чашках з агаризованим середовищем 1 (див нижче) при 28°C і культивують в TSBGM (триптичний соєвий бульйон з 1,0% глюкозою та 100 мМ MES, рН 6,0), як описано в (Khaw et al. 1998), доповненої 50 мг/л апраміцину, коли потрібно.

Рідкі культури вирощують при 28°C у колбах Ерленмейєра або в пробірках Falcon на качалці при 300 об/хв.

Способи подання екзогенних кислот:

Запасні розчини спор для всіх штамів одержують після вирощування на середовищі 1, зберігають в 20% гліцерині (вага/об'єм):10% лактози (вага/об'єм) у дистильованій воді та зберігають при -80°C. Вегетативні культури одержують шляхом інокуляції 0,1 мл замороженого запасного розчину спор в 50 мл середовища 2 (див. нижче) у колбі на 250 мл. Культуру інкубують від 36 до 48 годин при 28°C, 300 об/хв.

Процедура подання екзогенних кислот: Вегетативні культури інокують по 0,5 мл в 7 мл середовища 3 у пробірках на 50 мл. Вирощування проводять протягом 7 днів, при 26°C, 300 об/хв. Подання/додавання обраних карбонових кислот («неприродних вихідних кислот» або «природних вихідних кислот») проводять протягом 24 годин після інокуляції та подають по 1 мМ, якщо не оголошено інакше.

Середовище 1

компонент	Джерело	№ за каталогом	На л
Порошок зернового екстракту	Sigma	C-8160	2,5 г
Дріжджовий екстракт	Difco	0127-17	3 г
Карбонат кальцію	Sigma	C5929	3 г
Сульфат заліза	Sigma	F8633	0,3 г
ВАСТО агар			20 г
Пшеничний крохмаль	Sigma	S2760	10 г
Вода до			1 л

Середовище потім стерилізують автоклавуванням при 121°C, 20 хв

Середовище 2. Посівне середовище RapV7

Компонент	На л
Соєве борошно (Nutrisoy)	5 г
Avedex W80 декстрин (Deymer Ingredients Ltd)	35 г
Твердий зерновий екстракт (Corn Steep Solids) (Sigma)	4 г
Глюкоза	10 г
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 г
Молочна кислота (80%)	1, 6 мл
CaCO ₃ (Sigma)	7 г
Довести рН до 7,5 з 1 М NaOH	

Середовище потім стерилізують автоклавуванням при 121°C, 20 хв. Після стерилізації додають 0,16 мл 4% глюкози на кожні 7 мл середовища.

Середовище 3: Середовище MD6 (середовище ферментації)

Компонент	На л
Соєве борошно (Nutrisoy)	30 г
Кукурудзяний крохмаль (Sigma)	30 г
Avedex W80 декстрин (Deymer Ingredients Ltd)	19 г
Дріжджі (Allinson)	3 г
Твердий зерновий екстракт (Sigma)	1 г
KH ₂ PO ₄	2,5 г
K ₂ HPO ₄	2,5 г
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 г
NaCl	5 г
CaCO ₃ (Caltec)	10 г
MnCl ₂ 4H ₂ O	10 мг
MgSO ₄ 7H ₂ O	2, 5 мг
FeSO ₄ 7H ₂ O	120 мг
ZnSO ₄ 7H ₂ O	50 мг
MES (морфоліноетан-сульфонова кислота моногідрат)	21,2 г
рН доводять до 6,0 за допомогою 1 М NaOH	

Перед стерилізацією додають 0,4 мл α -амілази (Sigma, BAN250) на 1 л середовища. Середовище стерилізують протягом 20 хв при 121°C.

Після стерилізації додають 0,35 мл стерильної 40% фруктози та 0,10 мл L-лізину (140 мг/мл у воді, стерилізовано фільтрацією) на кожні 7 мл.

Середовище 4: Посівне середовище RapV7a

Компонент	На л
Соеве борошно (Nutrisoy)	5 г
Avedex W80 декстрин (Deymer Ingredients Ltd)	35 г
Твердий зерновий екстракт (Sigma)	4 г
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 г
Молочна кислота (80%)	1,6 мл
CaCO ₃ (Sigma)	7 г
Довести pH до 7,5 за допомогою 1 M NaOH.	

Середовище потім стерилізують автоклавуванням при 121°C, 20 хв.

Середовище 5:

MD6/5-1 середовище (середовище ферментації)

Компонент	На л
Соеве борошно (Nutrisoy)	15 г
Avedex W80 декстрин (Deymer Ingredients Ltd)	50г
Дріжджі (Allinson)	3 г
Твердий зерновий екстракт (Sigma)	1 г
KH ₂ PO ₄	2,5 г
K ₂ HPO ₄	2,5 г
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 г
NaCl	13 г
CaCO ₃ (Caltec)	10 г
MnCl ₂ 4H ₂ O	3, 5 мг
MgSO ₄ 7H ₂ O	15 мг
FeSO ₄ 7H ₂ O	150 мг
ZnSO ₄ 7H ₂ O	60 мг
SAG 471	0, 1 мл

Середовище стерилізують протягом 30 хв при 121°C.

Після стерилізації додають 15 г фруктози на л.

In vitro біоаналіз протиракової активності

Оцінка протиракової активності сполук in vitro на вибірці з 12 ліній пухлинних клітин людини в аналізі проліферації в моношарі проводять у підрозділі онкологічного тестування Інституту експериментальної онкології, Фрайбург (Oncotest Testing Facility, Institute for Experimental Oncology, Oncotest GmbH, Freiburg). Характеристики 12 відібраних ліній клітин підсумовані в таблиці 1.

Таблиця 1

Лінії клітин для тестування

№	Лінія клітин	Характеристики
1	SF-268	CNS, NCI стандарт
2	GXF 251L	Шлунок
3	NCI-H460	Легені, NCI стандарт

4	MCF-7	Груди, NCI стандарт
5	MEXF 394NL	Меланома
6	OVCAR-3	Яєчники - р8 5 мутація. АКТ ампліфікування.
7	DU145	Простата - PTEN позитивні
8	LNCAP	Простата - PTEN негативні
9	UXF 1138L	Матка

Ліни клітин uncotest відіорані із ксенотрансплантатів пухлин людини, як описано Roth et al. 1999. Походження донорних ксенотрансплантатів описане Fiebig et al. 1992. Інші клітинні лінії або отримані з NCI (H460, SF-268, OVCAR-3, DU145, MDA-MB-231, MDA-MB-468), або закуплені в DSMZ, Braunschweig, Germany (LNCAP).

Всі клітинні лінії, якщо не відзначено особливо, вирощують при 37°C у зволоженій атмосфері (95% повітря, 5% CO₂) у готовому середовищі ('ready-mix'), що містить середовище RPMI 1640, 10% сироватки плода корови та 0,1 мг/мл гентаміцину (PAA, Colbe, Germany).

Аналіз моношару

Модифікований аналіз із пропідій-йодидом застосовують для встановлення дії тестуємих сполук на ріст дванадцяти ліній пухлинних клітин людини (Dengler et al, 1995).

Коротко, клітини збирають на експонентній фазі росту культур шляхом обробки трипсином, підраховують і розсіюють у мікротитровані планшети на 96 плоскодонних лунок при щільності клітин залежно від клітинної лінії (5-10000 життєздатних клітин/лунку). Через 24 години витримки, щоб дозволити клітинам досягти експонентного росту, 0,01 мл культурального середовища (6 контрольних лунок на планшет) або культурального середовища, що містить 39-десметоксирапаміцин, додають у лунки. Кожну концентрацію застосовують із потрійним повтором. 39-десметоксирапаміцин застосовують у двох концентраціях (0,001 мм і 0,01 мм). Після 4 днів безперервної інкубації клітинне культуральне середовище в присутності або під час відсутності 39-десметоксирапаміцину заміняють на 0,2 мл розчину водного пропідій йодиду (PI) (7мг/мл). Для визначення частки живих клітин, клітини роблять проникними шляхом заморожування планшетів. Після відтавання планшетів, вимірюють флуоресценцію за допомогою флуориметра для мікропланшетів Cytofluor 4000 (поручення 530 нм, випущення 620 нм), одержуючи пряму пропорційність загальній кількості життєздатних клітин.

Інгібування росту виражають у вигляді співвідношення оброблені/контрольні x100 (% T/C) і надають для відбору клітинних ліній. Для активних сполук усереднені значення IK₅₀ (IC₅₀) і IK₇₀ за всім списком досліджених клітинних ліній оцінюють шляхом побудови графіків залежності концентрації сполуки від життєздатності клітин, що також надають.

Приклад 1. Одержання генетично модифікованого штаму S. hygroscopicus MG7-9

1) Одержання плазмиди pALK8 3

Праймери MG308 5'-GTCTAGGTGATGTCCCGCAACACG-3' (SEQ ID NO:13) i MG309 5'-

CACCTGCAGGCCCAACTCGGCCAGCTCGCT-3' (SEQ ID NO:14) застосовують для ампліфікації району гомології вище ацил-трансферази модуля 10 рапаміцину (rapAT10) (від нуклеотида 11693 до нуклеотида 13289 у рапаміциновому кластері як описане Schwecke et al., 1995) за допомогою ДНК косміди (cos26, див Schwecke et al., 1995), отриманої з *S. hygrosopicus* NRRL54 91 як матриця. Продукт ПЦР розміром 1596 баз (SEQ ID NO:15) фосфорилують за допомогою T4 полінуклеотид кінрази та лігують в оброблену Sinai плазмиду pUC18, що була дефосфорильована. Після трансформації *E. coli* DH10B виділяють плазмиду pMG255-4. Праймери MG310 5'-CCTGGCCAGGAAAGACGAACACGATCCT-3' (SEQ ID NO:16) і MG311 5'-CGAAGCTTGAGCCGCTGGCGATCGTGGGA-3' (SEQ ID NO:17) застосовують для ампліфікації району гомології нижче AT модуля 10 рапаміцину (від нуклеотида 14191 до нуклеотида 15742 у рапаміциновому кластері, як описано Schwecke et al., 1995) за допомогою ДНК косміди (cos26, див Schwecke et al., 1995) отриманої *S. hygrosopicus* NRRL54 91 як матриця. Продукт ПЦР розміром 1551 баз (SEQ ID NO:18) фосфорилують за допомогою T4 полінуклеотид кінрази та лігують в оброблену Sinai плазмиду pUC18, що була дефосфорильована. Після трансформації *E. coli* DH10B виділяють плазмиду pMG256-1. Правильність вставки в кожен плазмиду підтверджують за допомогою аналізу послідовності.

Кожний із плазмід pCJR26 (Rowe et al., 1998) і pMG256-I трансформують *E. coli* ET12567 і виділяють деметильовані (dam⁻, dcm⁻, hsdn⁻) плазмідні ДНК. Плазмиду pMG255-4 обробляють AvrII/HindIII і фрагмент розміром приблизно 4.3 т.п.о. виділяють; деметильовану pCJR26 обробляють MscI/AvrII і фрагмент розміром приблизно 1 т.п.о. виділяють і деметильовану pMG256-1 обробляють HindIII, частково переварюють MscI і фрагмент розміром приблизно 1.5 т.п.о. виділяють. Ці три фрагменти ДНК лігують і застосовують для трансформації *E. coli* DH10B. Плазмиду, що вийшла pMG291-14 виділяють. Цю плазмиду обробляють HindIII/XbaI і фрагмент розміром приблизно 4 т.п.о. виділяють і лігують в pKC1139, оброблену HindIII/XbaI і ДНК застосовують для трансформації *E. coli* DH10B. Плазміда, що вийшла pALK83 містить домен ацил-трансферази модуля 2 рапаміцину, фланкований районами ДНК, щоб дозволити гомологічну рекомбінацію в модуль 10, для проведення перестановки AT шляхом подвійної рекомбінації.

II) Виділення генетично модифікованого штаму *S. hygrosopicus* MG7-9

E. coli ET12567, що несе плазмиду pUZ8002, трансформують плазмидою pALK83 для одержання донорного штаму *E. coli* для кон'югації. Його застосовують для трансформації *S. hygrosopicus* MG2-10 (WO 04/007709; Gregory et al., 2004) за допомогою кон'югації. Стійкі до апраміцину колонії ізолюють і висівають на середовищі 1 плюс 50 мг/л апраміцину та 25 мг/л налідиксової кислоти. Цей висів далі застосовують для інокуляції колби, що містить TSBGM з 50 мг/л апраміцину. Таку культу-

ру інкубують протягом двох днів при 28°C, потім ще два дні при 37°C. Цю культуру висівають штрихом на чашки із середовищем 1, що містить 50 мг/л апраміцину, і інкубують протягом 7 днів при 37°C. Одиночні колонії пересівають на чашки із середовищем 1 з 50 мг/л апраміцину та вирощують протягом 7 днів при 37°C. Ці зростаючі культури застосовують для інокуляції судин з TSBGM без антибіотиків, які далі вирощують протягом 3 днів при 37°C. Культуру висівають штрихом на чашки із середовищем 1 і одиночні колонії застосовують для посіву на чашки із середовищем 1 у присутності та під час відсутності апраміцину (50 мг/л) для перевірки чутливості, що представляє другу подію рекомбінації, що включає втрату плазмідного кістяка. Чотирнадцять чутливих до апраміцину зон росту застосовують для інокуляції 14x7 мл середовища 2 (rapV7) і ці вихідні культури вирощують протягом 3 днів при 28°C. Їх потім застосовують для інокуляції (0,5 мл в 7 мл) середовища 3 (MD6) і культивують протягом 5 днів при 26°C із поданням циклогексанкарбонної кислоти в кінцевій концентрації 1 мМ після 24 годин. Екстракти цих культур досліджують на продукцію аналогів рапаміцину за допомогою РХ-МС. Виявлено, що деякі окремих культур продукують нові сполуки з молекулярною масою, що відповідає десгідроксипре-рапаміцину. Одну із цих культур вибирають, ґрунтуючись на рівні продукції та робастності культури, щоб вирощувати у великому розмірі для виділення нової сполуки; цьому штаму привласнюється назва *S. hygrosopicus* MG7-9.

III) Аналіз нового аналога рапаміцину з *S. hygrosopicus* MG7-9.

Спостережуваний новий аналог рапаміцину вважають шуканим десгідроксипре-рапаміцином на підставі наступних даних аналізу. Новий аналог рапаміцину більше полярний (час утримання 5,9-6,2 хв), ніж десгідроксипре-рапаміцин (час утримання 6,35-6,95 хв), як треба було очікувати при втраті метильної групи.

Мас-спектрометричні аналізи РХ-МС і ЖХ-MSⁿ екстрактів MG7-9 показують, що співвідношення *m/z* (маса/заряд) для нового аналога рапаміцину на 14 одиниць маси нижче, ніж для десгідроксипре-рапаміцину, що відповідає відсутності метильної групи. Спостережувані іони: [M-H]⁻ 810,8, [M+Na]⁺ 834,8, [M+K]⁺ 850,8. Фрагментація натрієвого аддукта дає передбачені іони для 17-десметил-39-десгідроксипре-рапаміцину відповідно до раніше ідентифікованого шляху фрагментації (Figura 4) (J. A. Reather, Ph.D. Dissertation, University of Cambridge, 2000). Ці дані мас-спектрометрії фрагментів звужують область ідентифікації нового рапалога до фрагмента C16-C27, де відбувається втрата метильної групи і який у природної форми містить три метильні групи. Ці метили приєднані при C17 (трієн), C23 (1 вуглець вилучений із трієну) і C25 (три вуглеці вилучені із трієну). Ультрафіолетова характеристика трієна рапаміцину спостерігається, але УФ максимум центрального піка здвинутий (λ =270 нм порівняти з λ =278 нм для 39-десгідроксипре-рапаміцину). Це строго вказує, що відбулася зміна функціональності на триєні, оскільки такі зміни в довжині хвилі

не спостерігаються для змін функціональності при C16 (ОН/ОСН₃); спостережувана зміна знаходиться відповідно до очікуваного при втраті метильної групи при C17.

Накопичений продукт також аналізують за допомогою ЖХ високого дозволу-мас-спектрометрії з перетворенням Фур'є іонного циклотронного резонансу (LC-FT-ICR-MS).

Точні дані мас отримані для натрієвого аддукта батьківського іона (виявлено: 834,51342 (Фігура 5, А), C₄₇H₇₃NO₁₀Na розрахована: 834,51319, відхилення 0.28 м.д.) і ключового дочірнього іона, як показано в таблиці нижче (див прикладену Фігуру 4 щодо шляху фрагментації).

Фрагмент	формула	виявлено	Розраховано	Відхилення
A	C ₄₁ H ₆₂ O ₈ Na	705,43403	705,43422	0,27 м.буд.
B	C ₄₀ H ₆₂ O ₆ Na	661,44495	661,44439	0,84 м.буд.
C	C ₂₃ H ₃₄ O ₅ Na	413,22953	413,23038	2,05 м.буд.

(див. також Фігуру 6)

Ці дані мас-спектрометрії фрагментів цілком узгоджуються з наявністю 17-десметил-39-десгідроксипре-рапаміцину.

IV) Ферментація нового аналога рапаміцину для його виділення

Культури спор всіх штамів одержують після вирощування на середовищі 1, зберігають в 20% (вага/об'єм) гліцерині:10% (вага/об'єм) лактозі в дистильованій воді та зберігають при -80°C. Первинні вегетативні культури одержують шляхом інокуляції 0,1 мл замороженої культури спор в 50 мл середовища 4 у колбі на 250 мл. Культуру інкубують протягом 48 годин при 28°C на качалці при 250 об/хв. Культуру потім переносять в 400 мл середовища 4 у колбах на 2000 мл для одержання вторинної вегетативної культури. Культуру інкубують протягом 2-4 годин при 28°C, 250 об/хв.

Вегетативні культури інокують із розрахунку 7,5% за обсягом в 15 л середовища 5 (див вище) у ферментері на 20 л. Культивування проводять протягом 6 днів при 26°C, 0,5 об/об у хв. ≥30% розчиненого кисню, швидкості перемішування мінімум 1,18 мс⁻¹ і максимум 2,75 мс⁻¹. Подання циклогексанкарбонової кислоти проводять через 24 години та 4-8 годин після інокуляції з одержанням кінцевої концентрації 2 мм/л. Через 48 годин після інокуляції додають 9,5 г L-лізину в 200 мл води.

(1) Екстракція та очищення

Середовище ферментації (12 л) перемішують із рівним об'ємом метанолу протягом 2 годин і потім центрифугують для осадження клітин (10 хв, 3500 об/хв). Супернатант перемішують зі смолою Diaion® HP20 (43 г/л) протягом 1,5 годин і потім фільтрують. Смола промивають у склянці порційми ацетону (загальний об'єм 7,5 л) для зняття паралога та видаляють розчинник під вакуумом, водний концентрат, що утвориться (800 мл) потім розводять до 1 л водою та екстрагують етилаце-

татом (3×1 л). Розчинник видаляють під вакуумом з одержанням клейкого коричневого екстракту (10,9 г). Екстракт розчиняють в ацетоні (приблизно 20 мл), нашаровують на силікагелі, наносять на стовпчик із силікагелем (3×6,5 см у діаметрі) і елюють за допомогою східчастого градієнта ацетон/гексан (20%-40%). Фракції, що містять рапалог, поєднують і розчинник видаляють під вакуумом. Залишок (840 мг) далі піддають хроматографії на Sephadex LH20, елюючи сумішшю 10:10:1 хлороформ/гептан/етанол. Напівочищений рапалог (151 мг) розчиняють в ацетонітрилі (2,7 мл), центрифугують (10 хв, 13200 об/хв) і очищають за допомогою препаративної ВЕРХ зі зверненою фазою (318), застосовуючи Gilson ВЕРХ, елюючи колонкові Phenomenex 21.2×250 мм Luna 5 μм C18 BDS при 21 мл/хв 60%-ним розчином ацетонітрила у воді. Самі чисті фракції (ідентифіковані за допомогою аналітичної ВЕРХ) поєднують і розчинник видаляють під вакуумом з одержанням 17-десметил-39-десгідроксипре-рапаміцину (10 мг).

V) Характеризація

Проводять ряд ЯМР експериментів з використанням ¹H, ¹³C, АРТ, COSY, HMQC, HMBC, TOCSY. Повний і вичерпний розгляд цих даних дозволяють ідентифікувати основну частину протонів і вуглеців обох ротомерів 17-десметил-39-десгідроксипре-рапаміцину. Відсутність олефінового метильного резонансу негайно виявилось в спектрі ¹H-ЯМР. Кореляції між H16 і олефіновим метином (не присутні в спектрі 39-десгідроксипре-рапаміцину) можна бачити в COSY спектрі, що підтверджує відсутність метильної групи при C17. Важливі ЯМР кореляції показані на Фігурі 7 для C17, що містить частини кожного з відомих ротомерів сполуки (різниця між цими двома перебуває в амідній частині структури, що не показана).

Таблиця 2: Дані ^1H і ^{13}C ЯМР для 17-десметил-39-десгідроксипре-рапаміцину

протон	δ_{H}		Мультиплетність		сполучення		δ_{C}	
1							171,6	169,0
2	5,38	4,37					52,6	55,7
3a	1,73	1,50					26,2	26,7
3b	2,20	2,40						
4a	1,28						20,9	20,6
4b	1,73	1,69						
5a	1,48	1,32					25,1	24,4
5b	1,72	1,63						
6a	3,26	2,21					44,5	39,0
6b	3,82	4,50	br. d	br. d	12,8	10,0		
8							172,4	171,9
9a	2,53	2,47					40,4	39,0
9b	2,95	2,67	d		13,7			
10							98,7	98,4
11	1,53	1,41					38,6	38,5
12a		1,51					27,6	27,5
12b	1,63	1,68						
13a	1,33	1,30					31,9	32,1
13b	1,51	1,55						
14	3,99	4,25					68,9	70,8
15a	1,51	1,50					43,1	40,3
15b	1,66	1,74						
16	4,24	4,44					70,3	71,3
17	5,60	5,86	dd	m	15,1, 4,8		135,7	137,1
18	6,39	6,13	ddd		15,1, 10,1, 1,5		129,2 _a	127,9
19	6,07	6,13					131,4 _b	132,1 _c
20	6,11	6,06					131,9	131,6

протон	δ_H		Мультиплетність		сполучення		δ_C	
							c	b
21	5,98	5,96	dd	dd	15,0, 9,9	14,9, 10,0	129,9	129,1 a
22	5,28	5,24	dd	dd	15,0, 9,6	14,9, 9,8	139,7	140,6
23	2,16	2,10					38,0	39,8
24a	1,31	1,35					40,0	40,6
24b	1,75	1,98						
25	2,41	2,44					45,9	46,6
26							215,7	216,6
27a	2,50	2,39					46,7	48,2
27b	2,68	2,63						
28	4,32	4,36	dd		8,5, 2,2		71,5	71,9
29							139,1	139,4
30	5,34	5,50					123,7	125,0
31	3,30	3,37	dq	dq	9,7, 6,7	10,0, 6,7	46,4	45,9
32							208,8	209,1
33a	2,62	2,65					41,1	39,5
33b	2,62	2,76		dd		18,1, 9,8		
34	5,14	5,34					76,3	74,6
35	1,88	1,94					32,9	32,9
36a	0,99	0,97					37,9	40,0
36b	1,11	1,10						
37	1,23						33,7	33,8
38a	0,79	0,88					30,2	30,8
38b	1,72	1,76						
39a	1,17	1,20					35,2	35,3
39b	1,94							
40	3,53	3,53					71,0	71,0
41a	1,28 ^e	1,26 ^e					35,5	35,5
41b								
42a							32,5	31,9
42b								

протон	δ_H		Мультиплетність		сполучення		δ_C	
43	0,95	0,94	d	d	6,4	6,7	16,7	16,9
44	1,02	1,00	d	d	6,4	6,7	21,7 ^d	21,6 ^d
45	1,00	1,03	d	d	6,7	7,0	17,1	19,3
46	1,61	1,51	d	d	1,0	0,9	13,5	12,1
47	1,07	1,04	d	d	6,8	6,7	16,0	14,5
48	0,87	0,88	d	d	7,2	7,4	16,1	15,0

a, b, c, ci, e: ці ідентифікації можуть бути взаємозамінними

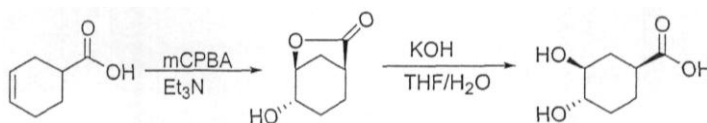
Дані ЯМР отримані в $CDCl_3$ при 500 МГц для 1H -ЯМР і 125 для ^{13}C -ЯМР.

Приклад 2 Подання серії вихідних кислот S. hygroscopicus MG7-9.

Таблиця 3: Джерела кислот для застосування в експерименті з поданням серії вихідних кислот

Кислота	фірма	Номер за каталогом	синтез
Циклогексанкарбонова кислота	Aldrich	10,183-4	
(1R*, 3R*, 4R*)-3, 4-дигідроксицикло-гексанкарбонова кислота			На місці у способі А
1-циклогексенкарбонова кислота	Aldrich	32,836-7	
3- циклогексенкарбонова кислота	Aldrich	45,375-7	
циклогептанкарбонова кислота	Aldrich	C9,850-0	
етил (1R*, 5R*)- 3-енкарбоксилат			На місці у способі Б
етил (1R*, 4R*)- 4-гідроксицикло-гексанкарбоксилат			На місці у способі В
3- (цис/транс) - метилциклогексанкарбонова кислота	Aldrich	33,061-2	

Спосіб А: синтез (1R*,3R*,4R*)-3,4-дигідроксициклогексанкарбонової кислоти



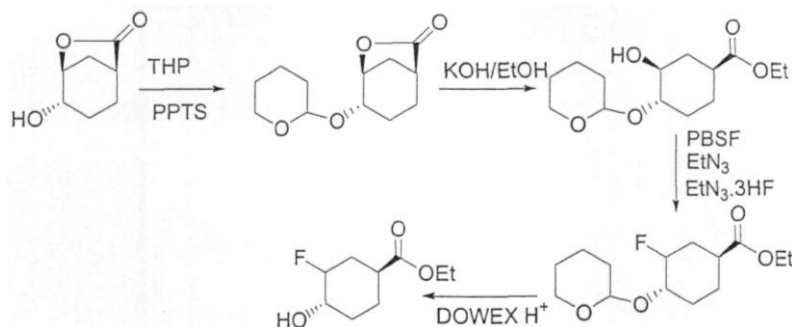
(1R*,3R*,4R*)-3,4-дигідроксициклогексанкарбонову кислоту легко одержувати з комерційно доступної рацемичної 3-циклогексенкарбонової кислоти. Цю кислоту епоксидують шляхом обробки позначка-хлорпербензойною кислотою (mCPBA) і перетворюють в (1R*,3R*,4R*)-гідроксициклогексан-1,3-карболактон in situ шляхом додавання основи

(тріетиламіну), установлюючи в такий спосіб відносну стереохімію. Цей лактон потім гідролізують шляхом дії водного гідроокису калію й кінцевий продукт очищають на іонообмінній смолі (Corey, E.J. and Huang, H. 1989).

Спосіб Б: Синтез етил (1R*,5R*)-3-енкарбоксилата



Названу сполуку одержують у рацемічній формі шляхом одержання (1R*,3R*,4R*)-йодциклогексан-1,3-карболактону із циклогекс-3-енкарбонової кислоти, що потім обробляють основою DBU (1,8-діазабіцикло[5.4.0]ундек-7-ен) для елімінації HI. Сполука, що вийшло (1R*,5S*)-



(1R*,3R*,4R*)-гідроксициклогексан-1,3-карболактон одержують за способом А, уводять захист із одержанням (1R*,3R*,4R*)-4-(1-тетрагідропіранілокси)циклогексан-1,3-карболактону, що обробляють гідроокисом калію в етанолі з одержанням етил (1R*,3R*,4R*)-гідрокси-4-(1-тетрагідропіранілокси)циклогексанкарбоксилату. Фтор уводять у положення 3 за допомогою способу активації-заміщення (Yin et al, 2004) і 4-(1-тетрагідропіранілокси) групу видаляють за допомогою кислотої смоли DOWEX.

І) Експеримент із подачею серії вихідних кислот

S. hygroscopicus MG7-9 вирощують на середовищі 1 протягом 14 днів при 28°C поки не наступить споруляція. Ділянка агару діаметром 0,5 см з міцелієм і суперечками відбирають із чашки й переносять в 7 мл середовища 2 (garV7) у про-

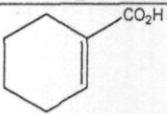
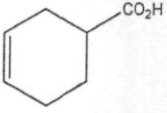
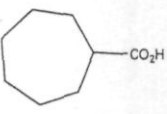
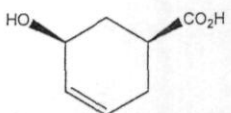
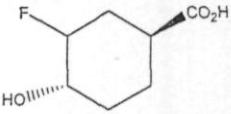
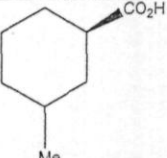
3-ен-1,5-карболактон потім обробляють гідроокисом калію, розчиненої в етанолі, з одержанням названої сполуки (Marshall, J. A., and Shiping, X., 1995).

Способ В: синтез етил (1R*,4R*)-4-гідроксициклогексанкарбоксилата

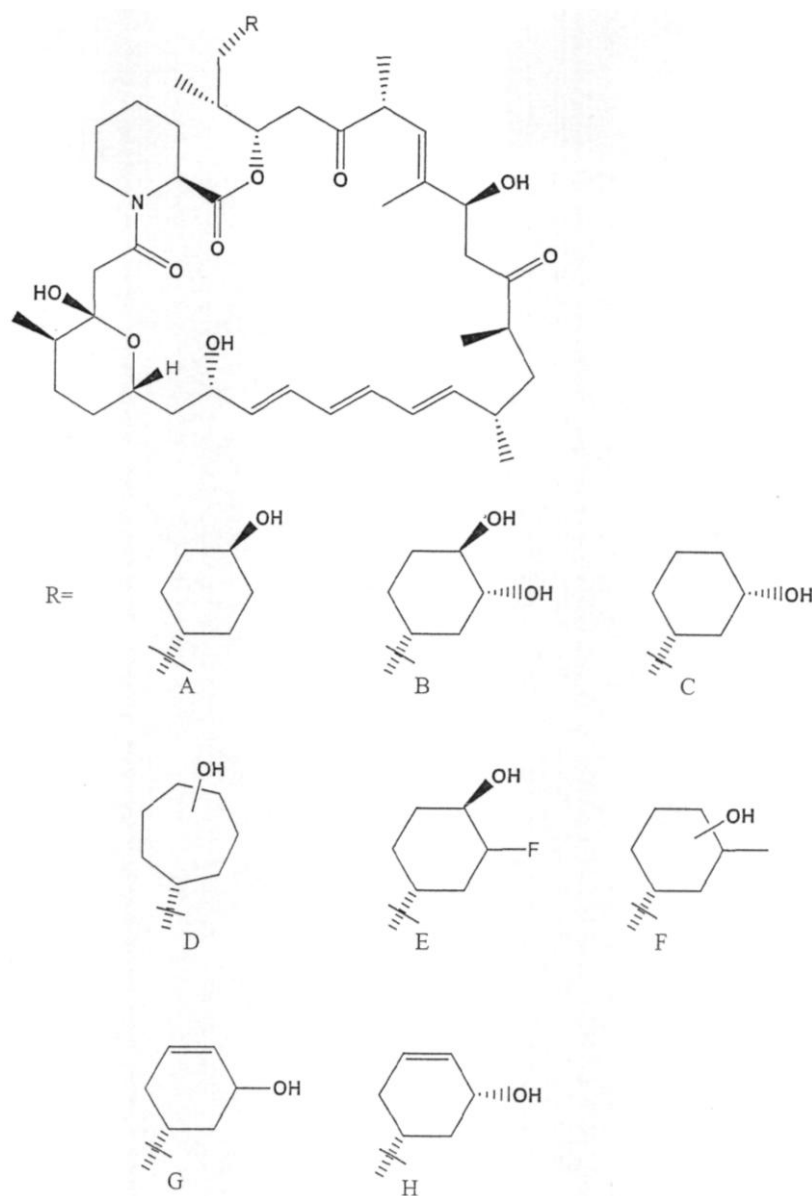
бірку Falcon на 50 мл із із пінною пробкою (foam bung) і вирощують при 28°C протягом 48 годин на качалці при 300 об/хв. 0,5 мл такої вихідної культури потім переносять в 7 мл середовища 3 (MD6) у пробірці Falcon на 50 мл з пінною пробкою й вирощують протягом 24 годин при 26°C на качалці при 300 об/хв. Кожну вихідну кислоту, розчинену в 0,05 мл метанолу, подають у відповідні культури до кінцевої концентрації 2 мМ (див список вихідних кислот у таблиці 1). Культури вирощують ще 4 дні при 26°C. 1 мл культури потім видаляють із кожної судини й додають до 1 мл ацетонітрила в епандорфівській пробірці на 2 мл, перемішують протягом 1 години при кімнатній температурі й потім центрифугують протягом 15 хв у мікроцентрифузі при 13000 об/хв. 0,2 мл верхні шари поміщають у пробірки для ВЕРХ і аналізують за допомогою ВЕРХ, застосовуючи детекцію УФ і РХ-МС.

Таблиця 4: аналіз екстрактів

Вихідна кислота, яка є у продажу	Молекулярна маса продукту	Структура продукту
	811,52	Структура А, як показано нижче
	827,52	Структура В, як показано нижче

Вихідна кислота, яка є у продажу	Молекулярна маса продукту	Структура продукту
	811,52	Структура З, як показано нижче
	809,51	Структура Г, як показано нижче*,
	827,52	Невідомий додатковий мінорний рапалог
	825,54	Структура Д, як показано нижче*
	841,53	Невідомий додатковий мінорний рапалог
	809,51	Структура Н, як показано нижче
	825,50	Невідомий додатковий мінорний рапалог
	829,51	Структура Е, як показано нижче *
	845,51	Невідомий додатковий мінорний рапалог
	825,54	Структура Ф як показана нижче*
	841,53	Невідомий додатковий мінорний рапалог

* = регіохімія та/або стереохімія гідроксильної або фтор-групи у включеній вихідній кислоті не була визначена; це відбито в структурній діаграмі нижче. Однак, варто помітити, що ця діаграма має на меті показати одиночний отриманий продукт, фахівець у даній галузі, ознайомившись із вищенаведеними прикладами, зможе виділити й охарактеризувати цей продукт, якщо буде потрібно.



Приклад 3. Конструкція кон'югативного вектора pLL150.

Плазмиду pSGsetI (WO 04/007709) розщеплюють за допомогою SpeI і BstEII і фрагмент розміром 2,481 т.п.о. виділяють і лігують у вектор pRT801 (Gregory et al., 2003), подібним чином оброблений SpeI і BstEII. Після трансформації *E. coli* DH10B, солоні піддають скринінгу за допомогою розщеплення ферментами рестрикції й виділяють кінцеву плазмиду pLL150. Див. Фігуру 8.

Приклад 4. Виділення 17-десметилрапаміцину шляхом комплементції *S. hygroscopicus* MG7-9 касетою допоміжних генів

I) Одержання комплементційної плазмиди pLL158, що містить допоміжні гени рапаміцину rapK, rapI, rapJ, rapN, rapO, rapM, rapQ і rapL (rap KIJN/OMQL)

Плазмиду pSGsetrapKIJN/OMQL (WO 04/007709) розщеплюють за допомогою SpeI і HindIII і фрагмент 8.516 т.п.о. (утримуючий rap KIJN/OMQL) виділяють і лігують у кон'югативний

вектор pLL150, подібним чином розщепленої SpeI і HindIII. Після трансформації *E. coli* DH10B, кінцеву плазмиду pLL158 ідентифікують і підтверджують за допомогою обробки ферментами рестрикції.

II) Виділення штаму *S. hygroscopicus* MG7-9 (pLL158)

E. coli ET12567, що несе плазмиду pUZ8002, трансформують за допомогою pLL158 для одержання донорного штаму *E. coli* для кон'югації. Його застосовують для трансформації *S. hygroscopicus* MG7-9 шляхом кон'югації. Стійкі до апраміцину колонії ізолюють на середовищі 1 (з 50 мг/л апраміцину й 25 мг/л налідиксової кислоти) і висівають на середовищі 1 з 50 мг/л апраміцину та 25 мг/л налідиксової кислоти. Ці культури вирощують при 28°C перед вторинним посівом на середовище ISP3 з 50 мг/л апраміцину й вирощують протягом 14-21 дня при 28°C. Пляма з кожної зони росту застосовують для інокуляції окремої пробірки Falcon, що містить 7 мл середо-

вища 2 (parV7) з 50 мг/л апраміцину. Ці вихідні культури інкубують протягом 2 днів при 28°C, 300 об/хв. Їх потім застосовують для інокуляції (0,5 мл в 7 мл) середовища 3 (MD6) і культивують протягом 6 днів при 26°C, 300 об/хв. Вторинні метаболіти екстрагують із цих культур шляхом додавання рівного об'єму ацетонітрила. Клітинні уламки видаляють центрифугуванням. Зразки потім досліджують на предмет продукції 17-десметилрапаміцину за допомогою РХ-МС.

III) Аналіз 17-десметилрапаміцину

Виявлений новий рапалог вважається 17-десметилрапаміцином на підставі даних LC-MS. Ці дані показують, що новий рапалог на 14 одиниць маси менше рапаміцину, що узгоджується з відсутністю метильної групи. Спостережувані іони: [M-H]⁻ 898,7, [M+Na]⁺ 922,7, [M+K]⁺ 938,6. Ультрафіолетова характеристика триена рапаміцину спостерігається, але УФ максимум центрального піка зрушає (λ=270 нм зрівняти з λ=278 нм для рапаміцину).

IV) Ферментація 17-десметилрапаміцину для його виділення Первинні вегетативні культури одержують шляхом інокуляції 0,1 мл замороженої культури в 50 мл середовища 4 у колбі на 250 мл. Культуру інкубують протягом 48 годин при 28°C на качалці при 250 об/хв. Культуру потім переносять в 400 мл середовища 4 у колбі на 2000 мл для одержання вторинної вегетативної культури. Культуру інкубують протягом 24 годин при 28°C, 250 об/хв.

Вегетативні культури інокують із розрахунку 7,5% по обсязі в 15 л середовища 5 (див вище) у ферментері на 20 л. Культивування проводять протягом 6 днів при 26°C, 0,5 про/про у хв. ≥30% розчиненого кисню, швидкості перемішування мінімум 1,18 мс⁻¹ і максимум 2,7 5 мс⁻¹. Через 4 8 годин після інокуляції додають 9,5 г L-Лізіна в 200 мл води.

V) Екстракція й очищення і

Середовище ферментації (12 л) перемішують із рівним об'ємом метанолу протягом 2 годин і потім центрифугують для осадження клітин (10 хв, 3500 об/хв). Супернатант перемішують зі смолою Diaion® HP20 (43 г/л) протягом 1,5 годин і

потім фільтрують. Смола промивають у склянці порціями ацетону (загальний об'єм 7,5 л) для зняття паралога й видаляють розчинник під вакуумом, водний концентрат, що утвориться (близько 800 мл) розводять до 1 л водою й екстрагують етилацетатом (3×1 л). Розчинник видаляють під вакуумом з одержанням клейкого коричневого екстракту.

Екстракт розчиняють в ацетоні (приблизно 20 мл), нашаровують на силікагелі, наносять на стовпчик із силікагелем (3×6,5 см у діаметрі) і елюють за допомогою східчастого градієнта ацетон/гексан (20%-40%). Фракції, що містять рапалог, поєднують і розчинник видаляють під вакуумом. Залишок далі піддають хроматографії на Sephadex LH20, елюючи сумішшю 10:10:1 хлороформ/гептан/етанол. Напівочищений рапалог розчиняють в ацетонітрилі (2,7 мл), центрифугують (10 хв, 13200 об/хв) і очищають за допомогою препаративної ВЕРХ зі зверненою фазою (318), застосовуючи Gilson ВЕРХ, елюючи колонкові Phenomenex 21,2×250 мм Luna 5 μm C18 BDS при 21 мл/хв 60% розчином ацетонітрила у воді. Самі чисті фракції (ідентифіковані за допомогою аналітичної ВЕРХ) поєднують і розчинник видаляють під вакуумом з одержанням десметилрапаміцину (133 мг).

VI) Характеризація

Виділений продукт піддають РХ-МСн-Аналізу й фрагментація натрієвого аддукта дає передвіщені іони для 17-десметилрапаміцину відповідно до ідентифікованого шляху фрагментації (J. A. Reather, Ph.D. Dissertation, University of Cambridge, 2000). Ці дані мас-спектрометрії фрагментів обмежують область ідентифікації нового рапалога фрагментом з 16-327, де має місце втрата мітила. Проводять ряд ЯМР експериментів з використанням ¹H, ¹³C, АРТ, COSY, НМРС, НМРС, ТОСН. Повний і вичерпний розгляд цих даних дозволяє описати 17-десметилрапаміцин. Відсутність олефінового метильного резонансу особливо інформативно, і важливі спостережувані кореляції описані в таблиці 5 нижче.

Таблиця 5: ¹H і ¹³C ЯМР дані для 17-десметилрапаміцину

Положення	¹ H-ЯМР			¹³ C-ЯМР δ м.буд.	НМРС кореляції ¹ H з ¹³ C
	δ м.буд.	Мультиплетність, Гц	COSY		
1	-	-		169,3	-
2	5,23	br. d, 5	H-3	51,5	C-1, C-3, C-4, C-6 і C-8
3	2,35	m, складний	H-2, H-4	27,1	C-1, C-2, C-4 і C-5
4	1,80 1,46	m, складний m, складний	H-3, H-5	20,6	C-2, C-3, C-5, і C-6
5	1,75 1,45	m, складний m, складний	H-4, H-6	25,2	C-3, C-4, і C-6
6	2,67 2,58	ddd, 16, 10, 5, 5 ddd, 16, 9, 5,	H-5	44,2	C-2, C-4, C-5, і C-8

Положення	¹ H-ЯМР			¹³ C-ЯМР δ м.б.б.д.	HMBC кореляції ¹ H з ¹³ C
	δ м.б.б.д.	Мульти- плетність, Гц	COSY		
		6			
7	-	-		N	-
8	-	-		166,5	-
9	-	-		193,2	-
10	-	-		98,6	-
10-OH	4,68	br. s	-	0	C-10 і C-11
11	1,69	ddq, 11,5, 4, 6,5	H- 11CH ₃ , H-12	33,2	C-9, C-10, C- 12, C-13 і 11- CH ₃
11-CH ₃	1,02	d, 6,5	H-11	16,2	C-10, C-11, і C- 12
12	1,42	m, складний	H-11, H-13	26,9	C-10, C-11, C- 13, C-14 і 11- CH ₃
13	2,01 1,65	m, складний m, складний	H-12, H-14	31,1	C-1, C-3, C-4, C-6 і C-8
14	4,05	m, складний	H-13, H-15	67,0	C-11, C-12, C-14 і C-15
15	1,15 1,44	ddd, 16, 10,5, 11 ddd, 16,5,5, 6	H-14, H-16	39,9	C-13, C-14, C-16, і C-17
16	4,00	ddd, 8, 5,5, 5,5	H-15, H-17	84,4	C-1, C-3, C-4, C-6 і C-8
16-OCH ₃	3,34	s	-	55,4	C-16, C-15 і C- 17
17	5,50	dd, 10,5, 8	H-16, H-18	134,7	-
18	6,21	dd, 11, 10,5	H-17, H-19	132,2	C-16, C-17, C- 19, C-20 і 17- CH ₃
19	6,25	dd, 14,5, 11	H-18, H-20	133,2	C-17, C-18, C-20 і C-21
20	6,18	dd, 14,5, 10,5	H-19, H-21	126,5	C-18, C-19, C-21 і C-22
21	6,06	dd, 15, 10,5	H-20, H-22	129,8	C-19, C-20, C-22 і C-23
22	5,45	dd, 15, 8	H-21, H-23	140,5	C-20, C-21, C- 23, C-24 і 23- CH ₃
23	2,30	m, складний	H-22, 23- CH ₃ , H-24	35,4	C-21, C-22, C- 24, C-25 і 23- CH ₃
23-CH ₃	0,96	d, 6,5	H-23	21,5	C-22, C-23 і C- 24
24	1,45	m, складний	H-23,	40,5	C-22, C-23, C-

Положення	¹ H-ЯМР			¹³ C-ЯМР δ м.буд.	HMBC кореляції ¹ H з ¹³ C
	δ м.буд.	Мульти- плетність, Гц	COSY		
	1,15	m, складний	H-25		25, C-26, 23-CH ₃ і 25-CH ₃
25	1,89	ddq, 10,5, 6,5, 4	H-24, 25-CH ₃	41,1	C-23, C-24, C- 26, C-27 і 25- CH ₃
25-CH ₃	0,91	d, 6,5	H-25	13,7	C-24, C-25 і C- 26
26	-	-	-	214,5	-
27	3,77	d, 4	H-28	84,9	C-25, C-26, C- 28, C-29 і 27- OCH ₃
27-OCH ₃	3,28	s	-	58,3	C-27
28	4,18	d, 4	H-27	75,3	C-26, C-27, C- 29, C-30 і 29- CH ₃
28-OH	3,54	br. s	-	0	C-27, C-28 і C- 29
29	-	-	-	135,8	-
29-CH ₃	1,73	s	-	13,2	C-28, C-29 і C- 30
30	5,41	d, 11	H-31	129,9	C-28, C-29, C- 31, C-32, 29-CH ₃ і 31-CH ₃
31	3,25	dq, 11, 6,5	H-30, 31-CH ₃	46,4	C-29, C-30, C- 32, C-33 і 31- CH ₃
31-CH ₃	1,07	d, 6,5	H-31	15,8	C-30, C-31 і C- 32
32	-	-	-	207,9	-
33	2,74 2,52	dd, 17,5, 5,5 dd, 17,5, 4	H-34	41,5	C-31, C-32, C-34 і C-35
34	5,21	ddd, 7, 5,5, 4	H-33, H-35	73,9	C-1, C-32, C- 33, C-35, C-36 і 35-CH ₃
35	1,60	m, складний	H-34, 35- CH ₃ , H-36	31,1	C-33, C-34, C- 36, C-37 і 35- CH ₃
35-CH ₃	0,89	d, 6,5	H-35	15,7	C-34, C-35 і C- 36
36	1,60	m, складний	H-35, H-37	38,5	C-34, C-35, C- 37, C-38, C-42 і 35-CH ₃
37	1,67	m, складний	H-36, H-38, H-42	34,0	C-35, C-36, C- 38, C-39, C-41 і C-42

Положення	¹ H-ЯМР			¹³ C-ЯМР δ м.буд.	НМВС кореляції ¹ H з ¹³ C
	δ м.буд.	Мульти-плетність, Гц	COSY		
38	2,11 1,98	ddd, 16,5, 5, 4 ddd, 16,5, 10, 13,5	H-37, H-39	34,2	C-36, C-37, C-39, C-40 і C-42
39	2,94	ddd, 13,5, 12,5, 5	H-38, H-40	84,3	C-37, C-38, C-40 і C-41
39-OCH ₃	3,20	s	-	55,2	C-39
40	3,30	ddd, 14,4, 12,5, 6	H-39, H-41	73,9	C-38, C-39, C-41 і C-42
40-OH	3,57	br, s	-	0	C-39, C-40 і C-41
41	1,60	m, складний	H-40, H-42	31,2	C-37, C-39, C-37, C-40 і C-42
42	1,78 1,58	m, складний m, складний	H-41, H-37	31,5	C-36, C-37, C-38, C-40 і C-41

• Дані ЯМР отримані в CDCl₃ при 500 МГц для ¹H-ЯМР і

125 для ¹³C-ЯМР

Приклад 5. Виділення 9-деоксо-17-десметил-27-О-десметил-39-О-десметилрапаміцину шляхом комплементції *S. hygrosopicus* MG7-9 касетою допоміжних генів

I) Одержання комплементційної плазмиди pLL174, що містить допоміжні гени рапаміцину *rapK*, *rapN*, *rapO*, *rapM* і *rapL* (*rap* KN/OML)

Плазмиду pSGsetrapKN/OML (WO 04/007709) розщеплюють за допомогою *SpeI* і *HindIII* і фрагмент 5.795 т.п. о. (утримуючий *rap* KN/OML) виділяють і лігують з кон'югативним вектором pLL150, подібним чином розщепленим *SpeI* і *HindIII*. Після трансформації *E. coli* DH10B кінцеву плазмиду pLL174 ідентифікують і підтверджують за допомогою розщеплення ферментами рестрикції.

II) Виділення штаму *S. hygrosopicus* MG7-9 (pLL174)

E. coli ET12567, що несе плазмиду pUZ8002, трансформують за допомогою pLL174 для одержання донорного штаму *E. coli* для кон'югації. Його застосовують для трансформації *S. hygrosopicus* MG7-9 шляхом кон'югації. Стійкі до апраміцину колонії ізолюють на середовищі 1 (з 50 мг/л апраміцину й 25 мг/л налідиксової кислоти) і висівають на середовищі 1 з 50 мг/л апраміцину й 25 мг/л налідиксової кислоти. Ці культури вирощують при 28°C перед вторинним посівом на середовище ISP3 з 50 мг/л апраміцину й вирощують протягом 14-21 дня при 28°C. Пляма з кожної зони росту застосовують для інокуляції окремої пробірки Falcon, що містить 7 мл середовища 2 (*rapV7*) з 50 мг/л апраміцину. Ці вихідні культури інкубують протягом 2 днів при 28°C, 300 об/хв. Їх потім застосовують для інокуляції (0,5 мл в 7 мл) середовища 3 (MD6) і культивують протягом 6 днів при 26°C, 300 об/хв.

Вторинні метаболіти екстрагують із цих культур шляхом додавання рівного об'єму ацетонітрилу. Клітинні уламки видаляють центрифугуванням. Ці культури далі досліджують на предмет

продукції 9-деоксо-17-десметил-27-О-десметил-39-О-десметилрапаміцину за допомогою РХ-МС.

III) Аналіз 9-деоксо-17-десметил-27-О-десметил-39-О-десметилрапаміцину

Новий рапалог, що утворився вважають 9-деоксо-17-десметил-27-О-десметил-39-О-десметилрапаміцином на підставі даних РХ-МС. Ці дані показують, що новий рапалог на 42 одиниці маси менше 17-десметилрапаміцину, що узгоджується з відсутністю 3-х метильних груп. Спостережувані іони: [M-H]⁺ 856,8, [M+Na]⁺ 880,7, [M+K]⁺ 896,6.

Приклад 6. Виділення 9-деоксо-16-О-десметил-17-десметил-27-О-десметилрапаміцину шляхом комплементції *S. hygrosopicus* MG7-9 касетою допоміжних генів

I) Одержання комплементційної плазмиди pLL173, що містить допоміжні гени рапаміцину *rapK*, *rapL*, *rapN*, *rapO* і *rapL* (*rap* KIN/OL)

Плазмиду pSGsetrapKIN/OL (WO 04/007709) розщеплюють за допомогою *SpeI* і *HindIII* і фрагмент 5.624 т.п.о. (утримуючий *rap* KIN/OL) виділяють і лігують з кон'югативним вектором pLL150, подібним чином розщепленим *SpeI* і *HindIII*. Після трансформації *E. coli* DH10B кінцеву плазмиду pLL174 ідентифікують і підтверджують за допомогою розщеплення ферментами рестрикції.

II) Виділення штаму *S. hygrosopicus* MG7-9 (pLL173)

E. coli ET12567, що несе плазмиду pUZ8002, трансформують за допомогою pLL173 для одержання донорного штаму *E. coli* для кон'югації. Його застосовують для трансформації *S. hygrosopicus* MG7-9 шляхом кон'югації. Стійкі до апраміцину колонії ізолюють на середовищі 1 (з 50 мг/л апраміцину й 25 мг/л налідиксової кислоти) і висівають на середовищі 1 з 50 мг/л апраміцину й 25 мг/л налідиксової кислоти. Ці культури вирощують при 28°C перед вторинним посівом на середовище ISP3 з 50 мг/л апраміцину й вирощують протягом 14-21 дня при 28°C. Пляма з

кожної зони росту застосовують для інокуляції окремої пробірки Falcon, що містить 7 мл середовища 2 (garV7) з 50 мг/л апраміцину. Ці вихідні культури інкубують протягом 2 днів при 28°C, 300 об/хв. Їх потім застосовують для інокуляції (0,5 мл в 7 мл) середовища 3 (MD6) і культивують протягом 6 днів при 26°C, 300 об/хв.

Вторинні метаболіти екстрагують із цих культур шляхом додавання рівного об'єму ацетонітрила. Клітинні уламки видаляють центрифугуванням. Ці культури далі досліджують на предмет продукції 9-деоксо-16-О-десметил-17-десметил-27-О-десметилпраміцину за допомогою РХ-МС.

III) Аналіз 9-деоксо-16-О-десметил-17-десметил-27-О-десметилрапаміцину

Новий рапалог, що утворився вважають 9-деоксо-16-О-десметил-17-десметил-27-О-десметилрапаміцином на підставі даних РХ-МС. Ці дані показують, що новий рапалог на 4 2 одиниці маси менше 17-десметилрапаміцину, що узгоджується з відсутністю 3 метильних груп. Спостережувані іони $[M-H]^+$ 856,8, $[M+Na]^+$ 880,7, $[M+K]^+$ 896,6.

Приклад 7. Виділення 17-десметил-39-десметоксирапаміцину шляхом комплементції *S. hygroscopicus* MG7-9 касетою допоміжних генів і доповнення середовища росту вихідними кислотами

І) Одержання комплементативної плазміди pLL178, що містить допоміжні гени рапаміцину rapI, rapJ, rapN, rapO, rapM, rapQ і rapL (rapIJN/OMQL).

Плазміду рMG262 (WO 04/007709) (експресують гени *gapI*, *gapJ*, *gapN*, *gapO*, *gapM*, *gapQ* і *gapL*) розщеплюють за допомогою *SpeI* і *HindIII* і фрагмент 7.259 т.п.о. (утримуючий *gap IJN/OMQL*) виділяють і лігують у кон'югативний вектор рLL150. Подібним чином розщепленої *SpeI* і *HindIII*. Після трансформації *E. coli* DH10В кінцеву плазміду рLL178 ідентифікують і підтверджують за допомогою розщеплення ферментами рестрикції.

II) Виділення штаму *S. hygroscopicus* MG7-9 (pLL178)

Е. coli ET12567, що несе плазмиду pUZ8002, трансформують за допомогою pLL178 для одержання донорного штаму Е. coli для кон'югації. Його застосовують для трансформації *S. hygrosopicus* MG7-9 шляхом кон'югації. Стійкі до апраміцину колонії ізолюють на середовищі 1 (з 50 мг/л апраміцину й 25 мг/л налідиксової кислоти) і висівають на середовищі 1 з 50 мг/л апраміцину й 25 мг/л налідиксової кислоти. Ці культури вирощують при 28°C перед вторинним посівом на середовище ISP3 з 50 мг/л апраміцину й вирощують протягом 14-21 дня при 28°C. Цяма з кожної зони росту застосовують для інокуляції окремої пробірки Falcon, що містить 7 мл середовища 2 (rapV7) з 50 мг/л апраміцину. Ці вихідні культури інкубують протягом 2 днів при 28°C, 300 об/хв. Їх потім застосовують для інокуляції (0,5 мл в 7 мл) середовища 3 (MD6) і культивують протягом 6 днів при 26°C, 300 об/хв. Після 24 годин росту в середовищі 3 культурам подають

циклогексанкарбонову кислоту до кінцевої концентрації 1 мм.

Вторинні метаболіти екстрагують із цих культур шляхом додавання рівного об'єму ацетонітрила. Клітинні уламки видаляють центрифугуванням. Ці культури далі досліджують на предмет продукції 17-десметил-39-десметоксирапаміцину за допомогою РХ-МС.

III) Аналіз десметоксирапаміцину	17-десметил-39-
-------------------------------------	-----------------

Новий рапалог, що утворився вважають 17- десметил-39-десметоксирапаміцину на підставі даних РХ-МС. Ці дані показують, що новий рапалог на 30 одиниць маси менше 17- десметилрапаміцину, що узгоджується з відсутністю 1 метокси групи. Спостережувані іони $[M-H]^-$ 868,3, $[M+Na]^+$ 892,3, $[M+K]^+$ 908,3. Ультрафіолетова характеристика триена рапаміцину спостерігається, але УФ максимум центрального піка зрушає ($\lambda=270$ нм зрівняти з $\lambda=278$ нм для рапаміцину).

IV) Ферментація 39-десметоксирапаміцину для виділення Первинні вегетативні культури одержують шляхом інокуляції

0,1 мл замороженої культури в 50 мл середовища 4 у колбі на 250 мл. Культуру інкубують протягом 48 годин при 28°C на качалці при 250 об/хв. Культуру потім переносять в 400 мл середовища 4 у колбі на 2000 мл для одержання вторинної вегетативної культури. Культуру інкубують протягом 24 годин при 28°C, 250 об/хв.

Вегетативні культури інокують із розрахунку 7,5% по обсязі в 15 л середовища 5 (див вище) у ферментері на 20 л. Культивуацію проводять протягом 6 днів при 26°C, 0,5 про/про у хв. $\geq 30\%$ розчиненого кисню, швидкості перемішування мінімум $1,18 \text{ мс}^{-1}$ і максимум $2,75 \text{ мс}^{-1}$. Через 48 годин після інокуляції додають 9,5 г L-Лізіна в 200 мл води.

V) Екстракція й очищення

Середовище ферментації (12 л) перемішують із рівним об'ємом метанолу протягом 2 годин і потім центрифугують для осадження клітин (10 хв, 3500 об/хв). Супернатант перемішують зі смолою Diaion® HP20 (43 г/л) протягом 1,5 годин і фільтрують. Смолу промивають у скляній порцеляни ацетоном (загальний об'єм 7,5 л) для відділення рапалога й видаляють розчинник під вакуумом, водний концентрат, що утвориться (близько 800 мл) потім розводять до 1 л водою й екстрагують етилацетатом (3x1 л). Розчинник видаляють під вакуумом з одержанням клейкого коричневого екстракту.

Екстракт розчиняють в ацетоні (приблизно 20 мл), нашаровують на силікагель, наносять на стовпчик із силікагелем (3×6,5 см у діаметрі) і елюють за допомогою східчастого градієнта ацетон/гексан (20%-40%). Фракції, що містять рапалог, поєднують і розчинник видаляють під вакуумом. Залишок далі піддають хроматографії на Sephadex LH20, елюючи сумішшю 10:10:1 хлороформ/гептан/етанол. Напівочищений рапалог розчиняють в ацетонітрилі (2,7 мл), центрифугують (10 хв, 13200 об/хв) і очищають за допомогою препаративної ВЕРХ зі зверненою фазою

(318), застосовуючи Gilson ВЕРХ, елюючи колонкові Phenomenex 21,2×250 мм Luna 5 цм C18 BDS при 21 мл/хв 60%-ним розчином ацетонітрила у воді. Самі чисті фракції (ідентифіковані за допомогою аналітичної ВЕРХ) поєднують і розчинник видаляють під вакуумом з одержанням 17-десметил-39-десметоксирапаміцину (30 мг).

VI) Характеризація

Виділений продукт піддають РХ-МСⁿ-Аналізу й фрагментація натрієвого аддукта дає передвіщені іони для 17-десметил-39-десметоксирапаміцину відповідно до ідентифікованого шляху фрагментації (J. A. Reather, Ph.D.

Dissertation, University of Cambridge, 2000). Ці дані мас-спектрометрії фрагментів обмежують область ідентифікації нового рапалога фрагментом 3 16-327, де має місце втрата мітила, і фрагментом 3 28-344, де відбувається втрата метоксигрупи. Поставлено ряд ЯМР експериментів з використанням ¹H, ¹³C, APT, COSY, HMQC, HMBC, TOCSY. Повний і вичерпний розгляд цих даних дозволяє описати 17-десметил-39-десметоксирапаміцину. Відсутність олефінового метильного резонансу особливо інформативно і Ямр-Визначення протонів описане в таблиці 6 нижче.

1H ЯМР		
Положення	δ, м.б.уд.	Мультиплетность, Гц
1	–	–
2	5,20	br. d, 5
3	2,35	m, складний
4	1,88	m, складний
1H ЯМР		
Положення	δ, м.б.уд.	Мультиплетность, Гц
	1,46	m, складний
5	1,70 1,55	m, складний m, складний
6	2,65 2,51	ddd, 16, 10, 5, 5 ddd, 16, 9, 5, 6
7	–	–
8	–	–
9	–	–
10	–	–
10-ОН	4,70	br, s
11	1,59	ddq, 11, 5, 4, 6, 5
11-CH ₃	1,02	d, 6, 5
12	1,50	m, складний
13	1,97 1,67	m, складний m, складний
14	4,15	m, складний
15	1,48 1,11	ddd, 16, 10, 5, 11 ddd, 16, 5, 5, 6
16	3,90	ddd, 8, 5, 5, 5, 5
16-ОСН ₃	3,29	s
17	5,43	dd, 10, 5, 8
18	6,15	dd, 11, 10, 5
19	6,21	dd, 14, 5, 11
20	6,09	dd, 14, 5, 10, 5
21	6,06	dd, 15, 10, 5
22	5,33	dd, 15, 8
23	2,31	m, складний
23-CH ₃	0,94	d, 6, 5
24	1,45 1,15	m, складний m, складний
25	1,99	ddq, 10, 5, 6, 5, 4
25-CH ₃	0,90	d, 6, 5
26	–	–
27	3,65	d, 4
27-ОСН ₃	3,19	s
28	4,13	d, 4
28-ОН	4,52	br, s
29	–	–
29-CH ₃	1,73	s

30	5,40	d, 11
31	2,74	dq, 11, 6,5
31-CH ₃	1,12	d, 6,5
32	-	-
33	2,74 2,52	dd, 17,5, 5,5 dd, 17,5, 4
34	5,13	ddd, 7, 5,5, 4
35	1,60	m, складний
1H ЯМР		
Положення	δ, м.буд.	Мультиплетність, Гц
35-CH ₃	0,84	d, 6,5
36	1,60	m, складний
37	1,67	m, складний
38	2,03- 1,11	m, складний
39	2,03- 1,11	m, складний
40	3,90	m, складний
40-OH	4,28	br. s
41	2,03- 1,11	m, складний
42	2,03- 1,11	m, складний

Дані ЯМР в CDCl₃ при 400 Мгц.

Приклад 8. Виділення 16-О-десметил-17-десметил-39-десметоксирапаміцину шляхом комплементарності S. hygroscopicus MG7-9 касетою допоміжних генів і доповнення середовища росту вихідною кислотою.

I) Одержання комплементарної плазмиди pLL184, що містить допоміжні гени рапаміцину rapI, rapJ, rapN/O, rapQ і rapL (rap IJN/OQL).

Плазмиду pMG260 (WO 04/007709) (експресують гени rapI, rapJ, rapN, rapO, rapQ і rapL) розщеплюють за допомогою SpeI і HindIII і фрагмент 6,3 т. п. о. (утримуючий rap IJN/OQL) виділяють і лігують у кон'югативний вектор pLL150, подібним чином розщеплений SpeI і HindIII. Після трансформації E. coli DH10B кінцеву плазмиду pLL184 ідентифікують і підтверджують за допомогою розщеплення ферментами рестрикції.

II) Виділення штаму S. hygroscopicus MG7-9 (pLL184)

E. coli ET12567, що несе плазмиду pUZ8002, трансформують за допомогою pLL184 для одержання донорного штаму E. coli для кон'югації. Його застосовують для трансформації S. hygroscopicus MG7-9 шляхом кон'югації. Стійкі до апраміцину колонії ізолюють і висівають на середовищі 1 з 50 мг/л апраміцину й 25 мг/л налідиксової кислоти. Ці культури вирощують при 28°C перед вторинним посівом на середовище ISP3 з 50 мг/л апраміцину й вирощують протягом 14-21 дня при 28°C. Плями з кожної зони росту застосовують для інокуляції окремої пробірки Falcon, що містить 7 мл середовища 2 (rapV7) з 50 мг/л апраміцину. Ці вихідні культури інкубують протягом 2 днів при 28°C, 300 об/хв. Їх потім застосовують для інокуляції (0,5 мл в 7 мл) середовища 3 (MD6) і культивують протягом 6 днів при 26°C, 300 об/хв. Після 24 годин росту в середовищі 3

культурам подають циклогексанкарбонову кислоту до кінцевої концентрації 1 мм.

Вторинні метаболіти екстрагують із цих культур шляхом додавання рівного об'єму ацетонітрила. Клітинні уламки видаляють центрифугуванням. Ці культури далі досліджують на предмет продукції 16-О-десметил-17-десметил-39-десметоксирапаміцину за допомогою РХ-МС.

III) Аналіз 16-О-десметил-17-десметил-39-десметоксирапаміцину

Новий рапалог, що утворився вважають 16-О-десметил-17-десметил-39-десметоксирапаміцину на підставі даних РХ-МС. Ці дані показують, що новий рапалог на 4 4 одиниці маси менше 17-десметилрапаміцину, що узгоджується з відсутністю 1 метокси-групи й 1 метильної групи. Спостережувані іони [M-H]⁻ 854,2, [M+Na]⁺ 878,3, [M+K]⁺ 894,3.

Приклад 9. Виділення 16-О-десметил-17-десметил-39-десметоксирапаміцину шляхом комплементарності S. hygroscopicus MG7-9 касетою допоміжних генів і доповнення середовища росту вихідною кислотою.

I) Одержання комплементарної плазмиди pLSS24 9, що містить допоміжні гени рапаміцину rapJ, rap N/O, rapQ і rapL (rap JN/OQL)

Плазмиду pSGsetrapKIJN/OQL (WO 04/007709) розщеплюють EcoRI і BglII і виділяють фрагмент 3, 774 т.п.о. (утримуючий rap JN/OQL) і лігують з подібним чином розщепленою pSGsetrapJ (WO 04/007709). Після трансформації E. coli DH10B, плазмиду pLSS238 ідентифікують за допомогою розщеплення ферментами рестрикції. Плазмиду pLSS238 далі розщеплюють SpeI і HindIII і виділяють фрагмент 7,311 т.п.о. (утримуючий rap JN/OQL) і лігують з кон'югативним вектором pLL150, що був подібним чином розщеплений SpeI і HindIII. Після трансформації E. coli

DH10B кінцеву плазмиду pLSS249 ідентифікують і підтверджують за допомогою розщеплення ферментами рестрикції.

II) Виділення штаму *S. hygroscopicus* MG7-9 (pLSS249)

E. coli ET12567, що несе плазмиду pUZ8002, трансформують за допомогою pLSS249 для одержання донорного штаму *E. coli* для кон'югації. Його застосовують для трансформації *S. hygroscopicus* MG7-9 шляхом кон'югації. Стійкі до апраміцину колонії ізолюють і висівають на середовищі 1 з 50 мг/л апраміцину й 25 мг/л налідиксової кислоти. Ці культури вирощують при 28°C перед вторинним посівом на середовище ISP3 з 50 мг/л апраміцину й вирощують протягом 14-21 дня при 28°C. Пляма з кожної зони росту застосовують для інокуляції окремої пробірки Falcon, що містить 7 мл середовища 2 (rapV7) з 50 мг/л апраміцину. Ці вихідні культури інкубують протягом 2 днів при 28°C, 300 об/хв. Їх потім застосовують для інокуляції (0,5 мл в 7 мл) середовища 3 (MD6) і культивують протягом 6 днів при 26°C, 300 об/хв. Після 24 годин росту в середовищі 3 культурам подають циклогексанкарбонову кислоту до кінцевої концентрації 1 мм.

Вторинні метаболіти екстрагують із цих культур шляхом додавання рівного об'єму ацетонітрилу. Клітинні уламки видаляють центрифугуванням. Ці культури далі досліджують на предмет продукції 16-О-десметил-17-десметил-39-десметоксирапаміцину за допомогою РХ-МС.

III) Аналіз 16-О-десметил-17-десметил-39-десметоксирапаміцину

РХ-МС нового рапалога показує, що він має таку ж масу й час утримання, як рапалог, описаний у прикладі 8.

Приклад 10. Виділення 9-деоксо-17-десметил-27-О-десметил-39-О-десметилрапаміцину шляхом комплементції *S. hygroscopicus* MG7-9 касетою допоміжних генів і доповнення середовища росту і вихідною кислотою.

I) Одержання комплементційної плаزمиди pLL191, що містить допоміжні гени рапаміцину rapM, rapN/O і rapL (rap MN/OL)

Одержання плазмиди pMG237: плазмиду pSGsetrapKJMN/O є похідній плазмиди pSETI52, у якій гени rapK, rapJ, rapM, rapN і rapO поміщені під контроль промотору actI, що сам контролюється actII-ORF4, також присутнім у плазміді. Це аналогічна ситуація іншим утримуючу касету плазмідам, застосованим у цій роботі. Плазмиду pSGsetrapKJMN/O розщеплюють BglII/XbaI і виділений фрагмент вектора лігують із фрагментом в 1 т.п.о., отриманим за допомогою XbaI/BglII з pSGLitrapL_{his}. Плазмиду pMG237 (експресирующу rapK, rapJ, rapM, rapN, rapO, і rapL) виділяють.

Плазмиду pMG237 (експресирующу гени rapK, rapJ, rapM, rapN, rapO і rapL) розщеплюють ферментами рестрикції SpeI і HindIII і фрагмент 6,841 т.п.о. виділяють і лігують з кон'югативним вектором pLL150, подібним чином розщепленням SpeI і HindIII. Після трансформації *E. coli* DH10B, плазмиду pLL171 ідентифікують за допомогою

розщеплення ферментами рестрикції. Плазмиду pLL171 розщеплюють AsiSI і NheI і фрагмент 5,293 т.п.о. (утримуючий rap MN/OL) виділяють і лігують з pSGsetrapM (WO 04/007709), подібним чином розщепленою AsiSI і NheI. Після трансформації *E. coli* DH10B, плазмиду pLL180 ідентифікують за допомогою розщеплення ферментами рестрикції. Плазмиду pLL180 експресує гени rapM, rapN/O і rapL. Їх переносять у кон'югативний вектор pLL150 за допомогою розщеплення SpeI і HindIII. Фрагмент 4,785 т.п.о., виділений за допомогою SpeI/HindIII з pLL180, виділяють і лігують у подібним чином розщеплену pLL150. Після трансформації *E. coli* DH10B, кінцеву плазмиду pLL191 ідентифікують і підтверджують за допомогою розщеплення ферментами рестрикції.

II) Виділення штаму *S. hygroscopicus* MG7-9 (pLL191)

E. coli ET12567, що несе плазмиду pUZ8002, трансформують за допомогою pLL191 для одержання донорного штаму *E. coli* для кон'югації. Його застосовують для трансформації *S. hygroscopicus* MG7-9 шляхом кон'югації. Стійкі до апраміцину іісолонії ізолюють і висівають на середовищі 1 з 50 мг/л апраміцину й 25 мг/л налідиксової кислоти. Ці культури вирощують при 28°C перед вторинним посівом на середовище ISP3 з 50 мг/л апраміцину й вирощують протягом 14-21 дня при 28°C. Пляма з кожної зони росту застосовують для інокуляції окремої пробірки Falcon, що містить 7 мл середовища 2 (rapV7) з 50 мг/л апраміцину. Ці вихідні культури інкубують протягом 2 днів при 28°C, 300 об/хв. Їх потім застосовують для інокуляції (0,5 мл в 7 мл) середовища 3 (MD6) і культивують протягом 6 днів при 26°C, 300 об/хв. Після 24 годин росту в середовищі 3 культурам подають циклогексанкарбонову кислоту до кінцевої концентрації 1 мм.

Вторинні метаболіти екстрагують із цих культур шляхом додавання рівного об'єму ацетонітрила. Клітинні уламки видаляють центрифугуванням. Ці культури далі досліджують на предмет продукції 9-деоксо-17-десметил-27-О-десметил-39-О-десметилрапаміцину за допомогою РХ-МС.

III) Аналіз 9-деоксо-17-десметил-27-О-десметил-39-О-десметилрапаміцину

Новий рапалог, що утворився вважають 9-деоксо-17-десметил-27-О-десметил-39-О-десметилрапаміцином на підставі даних РХ-МС. Ці дані показують, що новий рапалог на 30 одиниць маси більше 17-десметил-39-десгідроксипре-рапаміцину, що узгоджується з додаванням 1 метильної групи й 1 гідроксигрупи. Спостережувані іони: [M-H]⁺ 840,6, [M+Na]⁺ 864,6, [M+K]⁺ 880,6.

Приклад 11. Виділення 9-деоксо-16-О-десметил-17-десметил-27-О-десметил-39-десметоксирапаміцину шляхом комплементції *S. hygroscopicus* MG7-9 касетою допоміжних генів і доповнення середовища росту вихідною кислотою.

I) Одержання комплементційної плазмиди pLL190, що містить допоміжні гени рапаміцину rapI, rapN/O і rapL (rap IN/OL)

Плазмиду pSGsetKIN/OL розщеплюють за допомогою BglII і фрагмент 3,272 т.п.о. (утримуючий гар IN/OL) виділяють і лігують із плазмидой pSGsetrapI (WO 04/007709), розщепленої BglII, і розщеплюють лужною фосфатазою. Після трансформації *E. coli* DH10B плазмиду pLL177 ідентифікують за допомогою розщеплення ферментами рестрикції. Плазмиду pLL177 далі розщеплюють за допомогою SpeI і HindIII і фрагмент 5,624 т.п.о. (утримуючий гар IN/OL) виділяють і лігують у кон'югативний вектор pLL150, подібним чином розщеплений SpeI і HindIII. Після трансформації *E. coli* DH10B кінцеву плазмиду pLL190 ідентифікують і підтверджують за допомогою розщеплення ферментами рестрикції.

II) Виділення штаму *S. hygroscopicus* MG7-9 (pLL190)

E. coli ET12567, що несе плазмиду pUZ8002, трансформують за допомогою pLL190 для одержання донорного штаму *E. coli* для кон'югації. Його застосовують для трансформації *S. hygroscopicus* MG7-9 шляхом кон'югації. Стійки до апраміцину колонії ізолюють і висівають на середовищі 1 з 50 мг/л апраміцину й 25 мг/л налідиксової кислоти. Ці культури вирощують при 28°C перед вторинним посівом на середовище ISP3 з 50 мг/л апраміцину й вирощують протягом 14-21 дня при 28°C. Пляма з кожної зони росту застосовують для інокуляції окремої пробірки Falcon, що містить 7 мл середовища 2 (гарV7) з 50 мг/л апраміцину. Ці вихідні культури інкубують протягом 2 днів при 28°C, 300 об/хв. Їх потім застосовують для інокуляції (0,5 мл в 7 мл) середовища 3 (MD6) і культивують протягом 6 днів при 26°C, 300 об/хв. Після 24 годин росту в середовищі 3

культурам подають циклогексанкарбонову кислоту до кінцевої концентрації 1 мм.

Вторинні метаболіти екстрагують із цих культур шляхом додавання рівного об'єму ацетонітрила. Клітинні уламки видаляють центрифугуванням. Ці культури далі досліджують на предмет продукції 9-деоксо-16-О-десметил-17-десметил-27-О-десметил-39-десметоксирапаміцину за допомогою РХ-МС.

III) Аналіз 9-деоксо-16-О-десметил-17-десметил-27-О-десметил-39-десметоксирапаміцину

Новий рапалог, що утворився вважають 9-деоксо-16-О-десметил-17-десметил-27-О-десметил-39-десметоксирапаміцином на основі даних РХ-МС. Ети дані показують, що новий рапалог на 16 одиниць маси більше 17-десметил-39-десгидроксирапаміцину, що узгоджується з додаванням 1 гідрокси-групи. Наблюдаемые іони: [M-H]⁻ 826,7, [M+Na]⁺ 850,6, [M+K]⁺ 866,6.

Приклад 12. In vitro біоаналіз протиракової активності

Оцінка in vitro протиракової активності 17-десметил-39-десметоксирапаміцину на вибірці з 12 ліній пухлинних клітин людини в аналізі проліферації моношару проводять, як описано вище, за допомогою модифікованого аналізу із пропідій йодидом.

Результати наведені в таблиці 7 нижче, кожний результат представляє середнє досвіду з подвійним повтором. Таблиця 8 показує значення ІК₅₀ і ІК₇₀ для тестуемого Сполука й рапаміцину по всіх досліджених лініях клітин.

Таблиця 7

Лінія клітин	Тест/контроль (%) при концентрації ліків				
	Рапаміцин		17-десметил-39-десметоксирапаміцин		
	1 μM	10 μM	1 μM	10 μM	100 μM
SF268	53,5	46	57	37	4
251L	75,5	40	85	89	16
H460	67	66	82	76	3
MCF7	68,5	26,5	59	52	8
394NL	45	44	66	61	4
OVCAR3	69	69,5	84	61	8
DU145	50,5	54	69	66	5
LNCAp	61	34	59	43	15
1138L	42	21,5	59	46	5

Таблиця 8

	Рапаміцин	17-десметил-39-десметоксирапаміцину
Середня ІК ₅₀ (μM)	3,5	13,3
Середня ІК ₇₀ (μM)	9,1	38,2

Список літератури

1. Alarcon, C.M., Heitman, J., and Cardenas, M.E. (1999) Protein kinase activity and identification of a toxic effector domain of the target of rapamycin TOR proteins in yeast. *Molecular Biology of the Cell* 10: 2531-2546.
2. Aparicio, J.F., Molnar, I., Schwecke, T., Konig, A., Haydock, S.F., Khaw, L.E., Staunton, J., and Leadlay, P.F. (1996) Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene* 169: 9-16.
3. Baker, H., Sidorowicz, A., Sehgal, S.N., and Vezina, C. (1978) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. III. In vitro and in vivo evaluation. *Journal of Antibiotics* 31: 539-545.
4. Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E.T., Nagaraja Rao, R., and Schoner, B.E. (1992) Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* 116: 43-49.
5. Bisang, C., Long, P.F., Cortes, J., Westcott, J., Crosby, J., Matharu, A.-L., Cox, R.L., Simpson, T.J., Staunton, J. and Leadlay, P.F. (1999) A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases. *Nature* 401: 502-505.
6. Bohm, I., Holzbaur, I.E., Hanefeld, U., Cortes, J., Staunton, J. and Leadlay, P.F. (1998) Engineering of a minimal modular polyketide synthase, and targeted alteration of the stereospecificity of polyketide chain extension. *Chemistry & Biology* 5:407-412.
7. Box, S.J., Shelley, P.R., Tyler, J.W., Verrall, M.S., Warr, S.R.C., Badger, A.M., Levy, M.A., and Banks, R.M. (1995) 27-O-Demethylrapamycin, an immunosuppressant compound produced by a new strain of *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Antibiotics* 48: 1347-1349.
8. Brown, E.J., Albers, M.W., Shin, T.B., Ichikawa, K., Keith, C.T., Lane, W.S., and Schreiber, S.L. (1994) A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369: 756-758.
9. Brunn, G.J., Williams, J., Sabers, C., Wiederrecht, G., Lawrence, J.C., and Abraham, R.T. (1996) Direct inhibition of the signalling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO Journal* 15: 5256-5267.
10. Carlson, R.P., Hartman, D.A., Tomchek, L.A., Walter, T.L., Lugay, J.R., Calhoun, W., Sehgal, S.N., Chang, J.Y. (1993) Rapamycin, a potential disease-modifying antiarthritic drug. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266 (2): 1125-38.
11. Chambraud, B., Radanyi, C., Camonis, J.H., Shazand, K., Rajkowski, K., and Baulieu, E.E. (1996) FAP48, a new protein that forms specific complexes with both immunophilins FKBP59 and FKBP12. Prevention by the immunosuppressant drugs FK506 and rapamycin. *Journal of Biological Chemistry* 271: 32923-32929.
12. Chen, J., Zheng, X.F., Brown, E.J., and Schreiber, S.L. (1995) Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 4947-4951.
13. Choi, J.W., Chen, J., Schreiber, S.L., and Clardy, J. (1996) Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* 273: 239-242.
14. Chung, L., Liu, L., Patel, S., Carney, J.R., and Reeves, C.D. (2001) Deletion of rapQNM1 from the rapamycin gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* gives production of the 16-O-desmethyl-27-desmethoxy analog. *Journal of Antibiotics* 54: 250-256.
15. Corey, E. J. and Huang, H., (1989) *Tetrahedron Letters*, 30, 5235-5238.
16. Cortes, J., Wiesmann, K. E. H., Roberts, G. A., Brown, M. J. B., Staunton, J. and Leadlay, P. F. (1995) Repositioning of a domain in a modular polyketide synthase to promote specific chain cleavage. *Science* 268: 1487-1489.
17. Del Vecchio' F., Petkovic H., Kendrew, S.G., Low, L.,Wilkinson, B., Lill, R.E. Cortes, J., Rudd, B.A.M., Staunton, J. and Leadlay, P.F. (2003) Active-site residue, domain and module swaps in modular polyketide synthases. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 8: 489-494.
18. Dengler W.A., Schulte J., Berger D.P., Mertelsmann R. and Fiebig HH. (1995) Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assay. *Anti-Cancer Drugs*, 6:522-532.
19. DiLella, A.G., and Craig, R.J. (1991) Exon organization of the human FKBP-12 gene: correlation with structural and functional protein domains. *Biochemistry* 30: 8512-8517.
20. Donadio, S., Staver, M.J., McAlpine, J.B., Swanson, S.J. and Katz, L. (1991) Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis *Science* 252: 675-679.
21. Donadio, S., McAlpine, J.B., Sheldon, P.J., Jackson, M. and Katz, L. (1993) An erythromycin analog produced by reprogramming of polyketide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 7199-7123.
22. Dudkin, L., Dilling, M.B., Cheshire, P.J., Harwood, F.C., Hollingshead, M., Arbuck, S.G., Travis, R., Sausville, E.A. and Houghton, P.J. (2001). Biochemical correlates of mTOR inhibition by the rapamycin ester CCI-779 and tumor growth inhibition. *Clin. Cancer Res.* 7(6):1758-64
23. Dutton, C.J., Gibson, S.P., Goudie, A.C., Holdom, K.S., Pacey, M.S., Ruddock, J.C., Bu'Lock, J.D. and Richards, M.K. (1991) Novel avermectins produced by mutational biosynthesis. *Journal of Antibiotics* 44: 357-365.
24. Fehr, T., Sanglier, J.-J., Schuler, W., Gschwind, L., Ponelle, M., Schilling, W., Wioland, C. (1996). Antascomicin A, B, C, D and E: Novel FKBP12 binding compounds from a *Micromonospora* strain. *Journal of Antibiotics* 49(3): 230-233.

25. Fiebig H.H., Dengler W.A. and Roth T. (1999) Human tumor xenografts: Predictivity, characterization, and discovery of new anticancer agents. In: Fiebig HH, Burger AM (eds). *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development*. Contrib. Oncol., 54: 29-50.
26. Ferrari, S., Pearson, R.B., Siegmann, M., Kozma, S.C., and Thomas, G. (1993) The immunosuppressant rapamycin induces inactivation of P70^{S6k} through dephosphorylation of a novel set of sites. *Journal of Biological Chemistry* 268: 16091-16094.
27. Findlay J.A. and Radics, L. (1980) *Canadian Journal of Chemistry* 58:579.
28. Fishbein, T.M., Florman, S., Gondolesi, G., Schiano, T., LeLeiko, N., Tschernia, A. and Kaufman, S. (2002). Intestinal transplantation before and after the introduction of sirolimus. *Transplantation* 73(10):1538-42.
29. Foey, A., Green, P., Foxwell, B., Feldmann, M. and Brennan, F. (2002). Cytokine-stimulated T cells induce macrophage IL-10 production dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and p70S6K: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 4(1): 64-70. Epub 2001 Oct 10.
30. Galat, A. (2000) Sequence diversification of the FK506-binding proteins in several different genomes. *European Journal of Biochemistry* 267: 4945-4959.
31. Graziani, E.I., Ritacco, F.V., Summers, M.Y., Zabriskie, M., Yu, K., Mernan, V.S., Greenstein, M. and Carter, G.T. (2003) Novel sulphur-containing rapamycin analogs prepared by precursor-directed biosynthesis. *Organic Letters* 5: 2385-2388.
32. Gregory, C.R., Huie, P., Billingham, M.E. and Morris, R.E. (1993) Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury. Its effect on cellular, growth factor and cytokine response in injured vessels. *Transplantation* 55 (6) :1409-1418.
33. Gregory, M.A., Till R, and Smith M.C.M. (2003) Integration site for *Streptomyces* phage \times BT1 and the development of site-specific integrating vectors. *Journal of Bacteriology* 185: 5320-5323.
34. Gregory, M.A., Gaisser, S., Lill, R.E., Hong, H., Sheridan, R.M., Wilkinson, B., Petkovic, H., Weston, A.J., Carletti, I., Lee, H.-L., Staunton, J. and Leadlay, P.F. (2004) Isolation and characterization of pre-rapamycin, the first macrocyclic intermediate in the biosynthesis of the immunosuppressant rapamycin by *S. hygroscopicus*. *Angewandte Chemie -International Edition* 43: 2551-2553.
35. Guba, M., von Breitenbuch, P., Steinbauer, M., Koehl, G., Flegel, S., Hornung, M., Bruns, C.J., Zuelke, C, Farkas, S., Anthuber, M., Jauch, K.W., and Geissler, E.K. (2002) Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nature Medicine* 8: 128-135.
36. Hamilton, G.S., and Steiner, J.P. (1998) Immunophilins: Beyond immunosuppression. *Journal of Medicinal Chemistry* 41: 5119-5143.
37. Hara, K., Yonezawa, K., Kozlowski, M.T., Sugimoto, T., Andrabi, K., Weng, Q.P., Kasuga, M., Nishimoto, I., and Avruch, J. (1997) Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *Journal of Biological Chemistry* 272: 26457-26463.
38. Hardwick, J.S., Kuruvilla, F.G., Tong, J.K., Shamji, A.F., and Schreiber, S.L. (1999) Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signalling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 14866-14870.
39. Hatanaka, H., Kino, T., Miyata, S., Inamura, N., Kuroda, A., Goto, T., Tanaka, H., Okuhara, M. (1988). FR-900520 and FR-900523, novel immunosuppressants isolated from a *Streptomyces*. II. Fermentation, isolation and physico-chemical and biological characteristics. *Journal of Antibiotics* (Tokyo). 41 (11):1592-601.
40. Hatanaka H, Kino T, Asano M, Goto T, Tanaka H, Okuhara M. (1989). FK506 related compounds produced by *Streptomyces tsukubaensis* No. 9993. *Journal of Antibiotics* (Tokyo). 42 (4): 620-2.
41. Hendrickson, B.A., Zhang, W., Craig, R.J., Jin, Y.J., Bierer, B.E., Burakoff, S., and DiLella, A.G. (1993) Structural organization of the genes encoding human and murine FK506-binding protein (FKBP)13 and comparison to FKBP1. *Gene* 134: 271-275.
42. Hentges, K.E., Sirry, B., Gingeras, A.C., Sarbassov, D., Sonenberg, N., Sabatini, D., and Peterson, A.S. (2001) FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 13796-13801.
43. Hung, D.T., and Schreiber, S.L. (1992) cDNA cloning of a human 25 kDa FK506 and rapamycin binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 184: 733-738.
44. Hung, D.T., Jamison, T.F., and Schreiber, S.L. (1996) Understanding and controlling the cell cycle with natural products. *Chemistry & Biology* 3: 623-639.
45. Hunziker, D., Yu, T.W., Hutchinson, C.R., Floss, H.G. and Khosla, C. (1998) Primer unit specificity in rifamycin biosynthesis principally resides in the later stages of the biosynthetic pathway. *J. Am. Chem. Soc.* 12: 1092-1093.
46. Jain, S., Bicknell, G.R., Whiting, P.H. and Nicholson, M.L. (2001). Rapamycin reduces expression of fibrosis-associated genes in an experimental model of renal ischaemia reperfusion injury. *Transplant Proc.* 33 (1-2): 556-8.
47. Jin, Y.J., Burakoff, S.J., and Bierer, B.E. (1992) Molecular cloning of a 25-kDa high affinity rapamycin binding protein, FKBP25. *Journal of Biological Chemistry* 267: 10942-10945.
48. Kahan, B.D., Chang, J.Y., and Sehgal, S.N. (1991) Preclinical evaluation of a new potent immunosuppressive agent, rapamycin. *Transplantation* 52: 185-191.
49. Kahan, B.D., and Camardo, J.S. (2001) Rapamycin: Clinical results and future opportunities. *Transplantation* 72: 1181-1193.
50. Kallen, J. A., Sedrani, R., and Cottens S. (1996) X-ray crystal structure of 28-O-methylrapamycin complexed with FKBP12: Is the cyclohexyl moiety

part of the effector domain of rapamycinx Journal of the American Chemical Society 118: 5857-5861.

51. Kao, C.M., Luo, G.L., Katz, L., Cane, D.E. and Khosla, C. (1994) Engineered biosynthesis of a triketide lactone from an incomplete modular polyketide synthase. Journal of the American Chemical Society 116: 11612-11613.

52. Kao, C.M., Luo, G.L., Katz, L., Cane, D.E. and Khosla, C. (1995) Manipulation of macrolide ring size by directed mutagenesis of a modular polyketide synthase. Journal of the American Chemical Society 117: 9105-9106.

53. Kao, C.M., Luo, G.L., Katz, L., Cane, D.E. and Khosla, C. (1996) Engineered biosynthesis of structurally diverse tetraketides by a trimodular polyketide synthase. Journal of the American Chemical Society 118: 9184-9185.

54. Kao, C.M., McPherson, M., McDaniel, R.N., Fu, H., Cane, D.E. and Khosla, C. (1997) Gain of function mutagenesis of the erythromycin polyketide synthase. 2. Engineered biosynthesis of eight-membered ring tetraketide lactone. Journal of the American Chemical Society 119: 11339-11340.

55. Kawasome, H., Papst, P., Webb, S., Keller, G.M., Johnson, G.L., Gelfand, E.W., and Terada, N. (1998) Targeted disruption of p70^{s6k} defines its role in protein synthesis and rapamycin sensitivity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 5033-5038.

56. Khaw, L.E., Bohm, G.A., Metcalfe, S., Staunton, J., and Leadlay, P.F. (1998) Mutational biosynthesis of novel rapamycins by a strain of Streptomyces hygroscopicus NRRL 5491 disrupted in rapL, encoding a putative lysine cyclodeaminase. Journal of Bacteriology 180: 809-814.

57. Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., and Hopwood, D.A. (2000) Practical Streptomyces Genetics, John Innes Foundation, Norwich.

58. Kirby, B., and Griffiths, C.E.M. (2001) Psoriasis: the future. British Journal of Dermatology 144: 37-43.

59. Kirchner, G.I., Winkler, M., Mueller L., Vidal, C., Jacobsen, W., Franzke, A., Wagner, S., Blick, S., Manns M.P., and Sewing K.-F. (2000) Pharmacokinetics of SDZ RAD and cyclosporin including their metabolites in seven kidney graft patients after the first dose of SDZ RAD. British Journal of Clinical Pharmacology 50:449-454.

60. Konig, A., Schwecke, T., Molnar, I., Bohm, G., Lowden, P.A.S., Staunton, J., and

61. Leadlay, P.F. (1997) The pipecolate-incorporating enzyme for the biosynthesis of the immunosuppressant rapamycin. Nucleotide sequence analysis, disruption and heterologous expression of rapP from Streptomyces hygroscopicus. European Journal of Biochemistry 247: 526-534.

62. Kuhstoss, S., Huber, M., Turner, J.R., Paschal, J.W. and Rao, R.N. (1996) Production of a novel polyketide through the construction of a hybrid polyketide synthase. Gene 183: 231-236.

63. Kunz, J., Loeschmann, A., Deuter-Reinhard, M., and Hall, M.N. (2000) FAP1, a homologue of human transcription factor NF-X1, competes with rapamycin

for binding to FKBP12 in yeast. Molecular Microbiology 37: 1480-1493.

64. Kuo, C.J., Chung, J.K., Fiorentino, D.F., Flanagan, W.M., Blenis, J., and Crabtree, G.R. (1992) Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. Nature 358: 70-73.

65. Lee MH, Pascopella L, Jacobs WR Jr, Hatfull GF. (1991), Site-specific integration of mycobacteriophage L5: integration-proficient vectors for Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium tuberculosis, and bacille Calmette-Guerin. Proc Natl Acad Sci USA.; 88: 3111-5.

66. Liang, J., Choi, J., and Clardy, J. (1999) Refined structure of the FKBP12-rapamycin-FRB ternary complex at 2.2 Å resolution. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography 55: 736-744.

67. Lomovskaya, N., Fonstein, L., Ruan, X., Stassi, D., Katz, L., and Hutchinson, C.R. (1997) Gene disruption and replacement in the rapamycin-producing Streptomyces hygroscopicus strain ATCC 29253. Microbiology-Uk 143: 875-883.

68. Lowden, P. A. S., (1997) Ph.D. Dissertation, University of Cambridge. "Studies on the biosynthesis of rapamycin".

69. Lowden, P. A. S., B. Wilkinson, et al. (2001). "Origin and true nature of the starter unit for the rapamycin polyketide synthase". Angewandte Chemie-International Edition 40(4): 777-779.

70. Lowden, P. A., Bohm, G. A., Metcalfe, S., Staunton, J. and Leadlay, P. F. (2004) New rapamycin derivatives by precursor-directed biosynthesis. ChemBioChem 5: 535-538.

71. Luengo, J.I., Yamashita, D.S., Dunnington, D., Beck, A.K., Rozamus, L.W., Yen, H.K., Bossard, M.J., Levy, M.A., Hand, A., Newmantarr, T., Badger, A., Faucette, L., Johnson, R.K., Dalessio, K., Porter, T., Shu, A.Y.L., Heys, R., Choi, J.W., Kongsaree, P., Clardy, J., and Holt, D.A. (1995) Structure-Activity Studies of Rapamycin Analogs - Evidence That the C-7 Methoxy Group Is Part of the Effector Domain and Positioned at the Fkbp12-Frap Interface. Chemistry & Biology 2: 471-481.

72. Lyons, W.E., George, E.B., Dawson, T.M., Steiner, J.P., and Snyder, S.H. (1994) Immunosuppressant FK506 promotes neurite outgrowth in cultures of PC12 cells and sensory ganglia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91:3191-3195.

73. Marshall, J. A., and Shiping, X. (1995) J. Org. Chem., 60, 7230-7237.

74. Matsuura, M., Noguchi, T., Yamaguchi, D., Aida, T., Asayama, M., Takahashi, H. and Shirai, M. (1996). The sre gene (ORF469) encodes a site-specific recombinase responsible for integration of the R4 phage genome. J Bact. 178 (11): 3374-3376.

75. McAlpine, J. B., Swanson S. J., Jackson, M., Whittern, D.N. (1991). Revised NMR assignments for rapamycin. Journal of Antibiotics 44: 688-690.

76. McDaniel, R., Thamchaipenet, A., Gustafsson, C, Fu, H., Betlach, M. and Ashley, G. (1999) Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel "unnatural" natural products. Proceedings of the National

Academy of Sciences of the United States of America 96: 1846-1851.

77. Molnar, I., Aparicio, J.F., Haydock, S.F., Khaw, L.E., Schwecke, T., Konig, A., Staunton, J., and Leadlay, P.F. (1996) Organisation of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of genes flanking the polyketide synthase. *Gene* 169: 1-7.

78. Morice, M.C., Serruys, P.W., Sousa, J.E., Fajadet, J., Ban Hayashi, E., Perin, M., Colombo, A., Schuler, G., Barragan, P., Guagliumi, G., Molnar, F. and Falotico, R. (2002). RAVEL Study Group. Randomized Study with the Sirolimus-Coated Bx Velocity Balloon-Expandable Stent in the Treatment of Patients with de Novo Native Coronary Artery Lesions. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N. Eng. J. Med.* 346 (23): 1773-80.

79. Myckatyn, T.M., Ellis, R.A., Grand, A.G., Sen, S.K., Lowe, J.B. 3rd, Hunter, D.A. and Mackinnon, S.E. (2002). The effects of rapamycin in murine peripheral nerve isografts and allografts. *Plast. Reconstr. Surg.* 109 (7): 2405-17.

80. Nave, B.T., Ouwens, D.M., Withers, D.J., Alessi, D.R., and Sheperd, P.R. (1999) Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochemical Journal* 344: 427-431.

81. NCCLS Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing for Yeasts: Approved Standard M27-A, vol. 17 No. 9. (1997).

82. Nishida, H., Sakakibara, T., Aoki, F., Saito, T., Ichikawa, K., Inagaki, T., Kojima, Y., Yamauchi, Y., Huang, L.H., Guadiana, M.A., Kaneko, T., and Kojima, N. (1995) Generation of novel rapamycin structures by microbial manipulations. *Journal of Antibiotics* 48: 657-666.

83. Oliynyk, M., Brown, M.J.B., Cortes, J., Staunton, J. and Leadlay, P. F. (1996) A hybrid modular polyketide synthase obtained by domain swapping. *Chemistry & Biology* 3: 833-839.

84. Paget, M.S.B., Chamberlin, L., Atrih, A., Foster, S.J., and Buttner, M.J. (1999) Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor σ^E is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of Bacteriology* 181: 204-211.

85. Paiva, N.L., Demain, A.L., and Roberts, M.F. (1991) Incorporation of acetate, propionate, and methionine into rapamycin By *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Natural Products* 54: 167-177.

86. Paiva, N.L., Demain, A.L., and Roberts, M.F. (1993) The immediate precursor of the nitrogen-containing ring of rapamycin is free pipecolic acid. *Enzyme and Microbial Technology* 15: 581-585.

87. Patterson, C.E., Schaub, T., Coleman, E.J., and Davies E.C. (2000) Developmental regulation of FKBP65. An ER-localized extracellular matrix binding-protein. *Molecular Biology of the Cell* 11:3925-3935.

88. Perin, E C, (2005), "Choosing a Drug-Eluting Stent: A Comparison Between CYPHER and TAXUS", *Reviews in Cardiovascular Medicine*, 6 (suppl 1), ppS13-S21.

89. Powell, N., Till, S., Bungre, J., Corrigan, C (2001). The immunomodulatory drugs cyclosporin A, mycophenolate mofetil, and sirolimus (rapamycin) inhibit allergen-induced proliferation and IL-5 production by PBMCs from atopic asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108 (6): 915-7.

90. Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W.L., Shapiro, A.M., Rajotte, R.V. and Power, R. (2002). Combination therapy with sirolimus and interleukin-2 prevents spontaneous and recurrent autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 51 (3): 638-45.

91. Raught, B., Gingras, A.C., and Sonenberg, N. (2001) The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 7037-7044.

92. J. A. Reather, Ph.D. Dissertation, University of Cambridge, 2000.

93. Reeves, CD., Murli, S., Ashley, G.W., Piagentini, M., Hutchinson, C.R. and McDaniel, R. (2001) Alteration of the substrate specificity of a modular polyketide synthase acyltransferase domain through site-specific mutations. *Biochemistry* 40: 15464-15470.

94. Reid, R., Piagentini, M., Rodriguez, E., Ashley, G., Viswanathan, N., Carney, J., Santi, D.V., Hutchinson, C.R. and McDaniel, R. (2003) A model of structure and catalysis for ketoreductase domains in modular polyketide synthases. *Biochemistry* 42: 72-29.

95. Reitamo, S., Spuls, P., Sassolas, B., Lahfa, M., Claudy, A. and Griffiths, C.E.; Sirolimus European Psoriasis Study Group. (2001). Efficacy of sirolimus (rapamycin) administered concomitantly with a subtherapeutic dose of cyclosporin in the treatment of severe psoriasis: a randomized controlled trial. *Br. J. Dermatol.* 145 (3): 438-45.

96. Rosen, M.K. and Schreiber, S.L. (1992) Natural products as probes of cellular function: studies of immunophilins. *Angewandte Chemie-International Edition in English* 31: 384-400.

97. Roth T., Burger A.M., Dengler W., Willmann H. and Fiebig H.H. (1999) Human tumor cell lines demonstrating the characteristics of patient tumors as useful models for anticancer drug screening. In: Fiebig HH, Burger AM (eds). *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development*. *Contrib. Oncol.*, 54: 145-156.

98. Rowe, C.J., Cortes, J., Gaisser, S., Staunton, J. and Leadlay, P.F. (1998) Construction of new vectors for high-level expression in actinomycetes. *Gene* 216, 215-223.

99. Rowe, C.J., Bohm, I.U., Thomas, I.P., Wilkinson, B., Rudd, B.A.M., Foster, G., Blackaby, A.P., Sidebottom, P.J., Roddis, Y., Buss, A. D., Staunton, J. and Leadlay, P.F. (2001) Engineering a polyketide with a longer chain by insertion of an extra module into the erythromycin-producing polyketide synthase. *Chemistry & Biology* 8: 475-485.

100. Roymans, D., and Siegers, H. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *European Journal of Biochemistry* 268: 487-498.

101. Ruan, X., Pereda, A., Stassi, D.L., Zeidner, D., Summers, R.G., Jackson, M., Shivakumar, A., Kakavas, S., Staver, M.J., Donadio, S. and Katz, L. (1997) Acyltransferase domain substitutions in erythromycin polyketide synthase yield novel erythromycin derivatives. *Journal of Bacteriology* 179: 6416-6425.
102. Salituro, G.M., Zink, D.L., Dahl, A., Nielsen, J., Wu, E., Huang, L., Kastner C. and Dumont, F. (1995) Meridamycin: a novel nonimmunosuppressive FKBP12 ligand from *Streptomyces hygroscopicus*. *Tetrahedron letters* 36: 997-1000.
103. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
104. Schreiber, S.L., and Crabtree, G.R. (1992) The mechanism of action of cyclosporine A and FK506. *Immunology Today* 13: 136-142.
105. Schwecke, T., Aparicio, J.F., Molnar, I., Konig, A., Khaw, L.E., Haydock, S.F., Oliynyk, M., Caffrey, P., Cortes, J., Lester, J.B., Bohm, G.A., Staunton, J., and Leadlay, P.F. (1995) The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 7839-7843.
106. Sedrani, R., Cottens, S., Kallen, J., and Schuler, W. (1998) Chemical modifications of rapamycin: the discovery of SDZ RAD. *Transplantation Proceedings* 30: 2192-2194.
107. Sehgal, S.N., Baker, H., and Vezina, C. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic II. Fermentation, isolation and characterization. *Journal of Antibiotics* 28: 727-733.
108. Shepherd, P.R., Withers, D.J., and Siddle K. (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochemical Journal* 333: 471-490.
109. Smovkina, T., Mazodier, P., Bocard, F., Thompson, C.J. and Guerineau, M. (1990) Construction of a series of pSAM2-based integrative vectors for use in actinomycetes. *Gene* 94: 53-59.
110. Stassi, D.L., Kakavas, S.J., Reynolds, K.A., Gunawardana, G., Swanson, S., Zeidner, D., Jackson, M., Liu, H., Buko, A. and Katz, L. (1998) Ethyl-substituted erythromycin derivatives produced by directed metabolic engineering *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 7305-7309.
111. Steiner, J.P., Hamilton, G.S., Ross, D. T., Valentine, H.L., Guo, H., Connolly, M.A., Liang, S., Ramsey, C., Li, J.-H.J., Huang, W., Howorth, P., Soni, R., Fuller, M., Sauer, H., Nowotnik, A.C., and Suzdak, P.D. (1997) Neutrophilic immunophilin ligands stimulate structural and functional recovery in neurodegenerative animal models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:2019-2024.
112. Stella V.J. et al (1985) "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery" Directed Drug Delivery R. Borchardt et al (ed.) pages 247-267 (Humana Press).
113. Tang, S.J., Reis, G., Rang, H., Gingras, A.-C., Sonenberg, N., and Schuman, E.M. (2002) A rapamycin-sensitive signalling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1: 467-472.
114. Van Duyne, G.D., Standaert, R.F., Karplus, P.A., Schreiber, S.L., and Clardy, J. (1993) Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *Journal of Molecular Biology* 229: 105-124.
115. Van Mellaert, L., Mei, L., Lammertyn, E., Schacht, S., and Anne, J. (1998) Site-specific integration of bacteriophage VVB genome into *Streptomyces venezuelae* and construction of a VVB-based integrative vector. *Microbiology* 144: 3351-3358.
116. Vezina, C, Kudelski, A., and Sehgal, S.N. (1975) Rapamycin (AY-22, 989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *Journal of Antibiotics* 28: 721-726.
117. Vilella-Bach, M., Nuzzi, P., Fang, Y.M., and Chen, J. (1999) The FKBP12-rapamycin-binding domain is required for FKBP12-rapamycin-associated protein kinase activity and Gi progression. *Journal of Biological Chemistry* 274: 4266-4272.
118. Waller, J.R., and Nicholson, M.L. (2001) Molecular mechanisms of renal allograft fibrosis. *British Journal of Surgery* 88:1429-1441.
119. Warner, L.M., Adams, L.M., Chang, J.Y. and Sehgal, S.N. (1992) A modification of the in vivo mixed lymphocyte reaction and rapamycin's effect in this model. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 64 (3): 242-7.
120. Wilman D.E.V. (1986) "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions* 14, 375-382 (615th Meeting, Belfast)
121. Wong, G.K., Griffith, S., Kojima, I., and Demain, A.L. (1998) Antifungal activities of rapamycin and its derivatives, prolylrapamycin, 32-desmethylrapamycin, and 32-desmethoxyrapamycin. *Journal of Antibiotics* 51: 487-491.
122. Wu, K., Chung, L., Revill, W.P., Katz, L., and Reeves, CD. (2000) The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units. *Gene* 251: 81-90.
123. Yem, A.W., Tomasselli, A.G., Heinrichson, R.L., Zurcher-Neely, H., Ruff, V.A., Johnson, R.A., and Deibel, M.R. (1992) The Hsp56 component of steroid receptor complexes binds to immobilized FK506 and shows homology to FKBP-12 and FKBP-13. *Journal of Biological Chemistry* 267: 2868-2871.
124. Yin, J., Zarkowsky, D.S., Thomas, D.W., Zhao, M.M., and Huffman, M. A. (2004) *Org. Lett.* 6: 1465-1468.
125. Yu, K., Toral-Barza, L., Discafani, C, Zhang, W.G., Skotnicki, J., Frost, P., Gibbons, J.J. (2001) mTOR, a novel target in breast cancer: the effect of CCI-779, an mTOR inhibitor, in preclinical models of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 8: 249-258.

126. Zhu, J., Wu J., Frizell, E., Liu, S.L., Bashey, R., Rubin, R., Norton, P. and Zern, M.A. (1999). Rapamycin inhibits hepatic stellate cell proliferation

in vitro and limits fibrogenesis in an in vivo model of liver fibrosis. *Gastroenterology*. 117 (5): 1198-204.

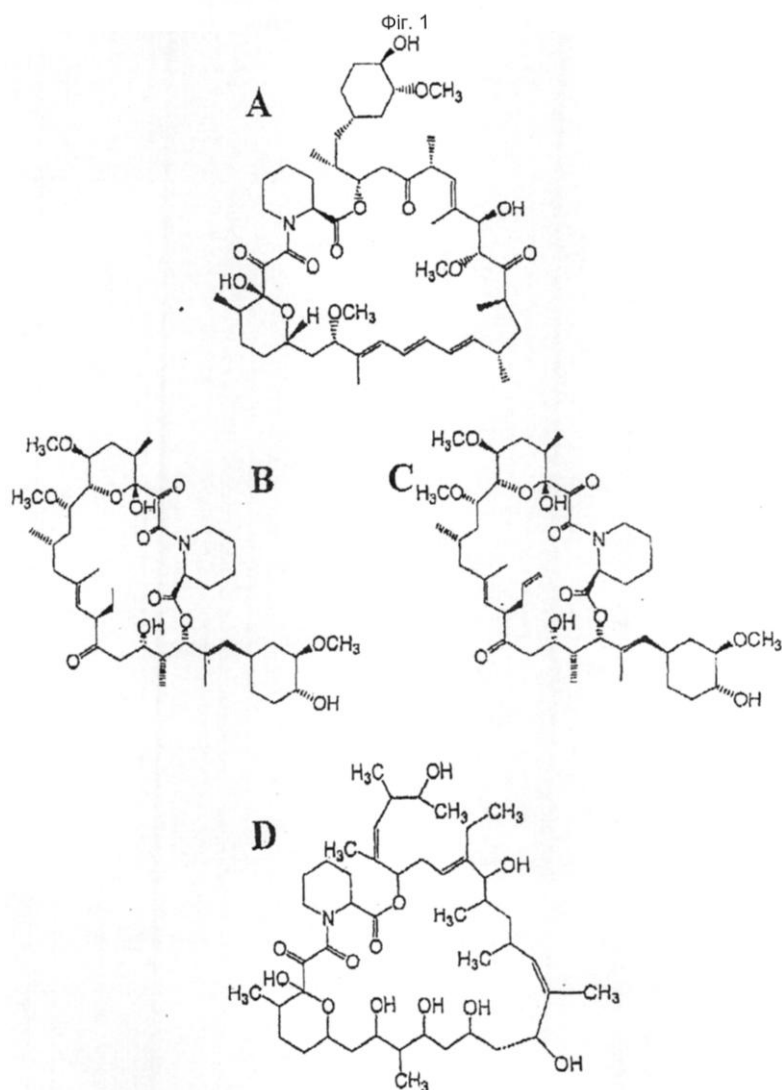
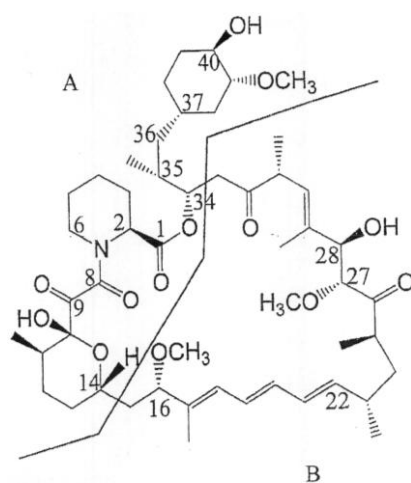
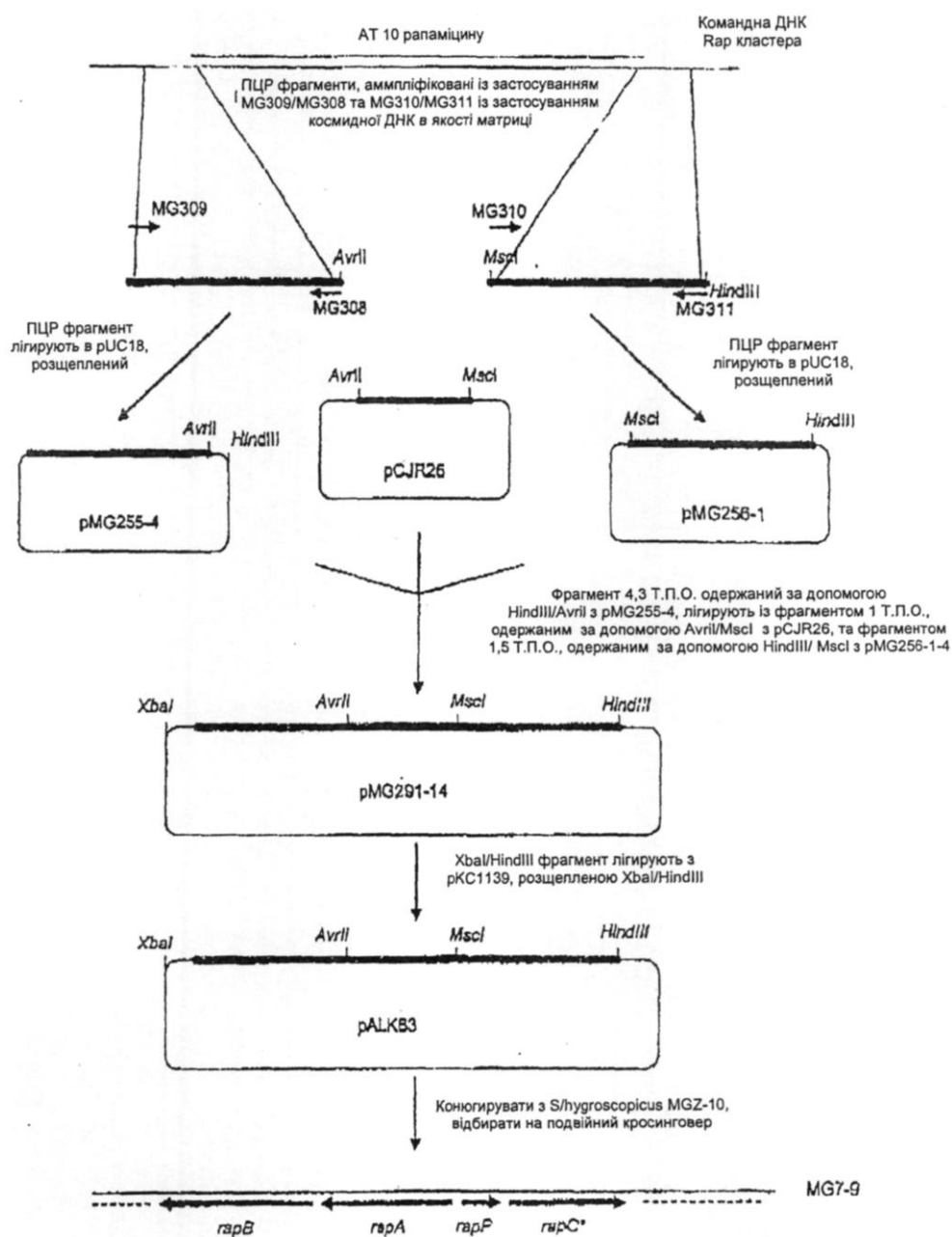


Fig. 2

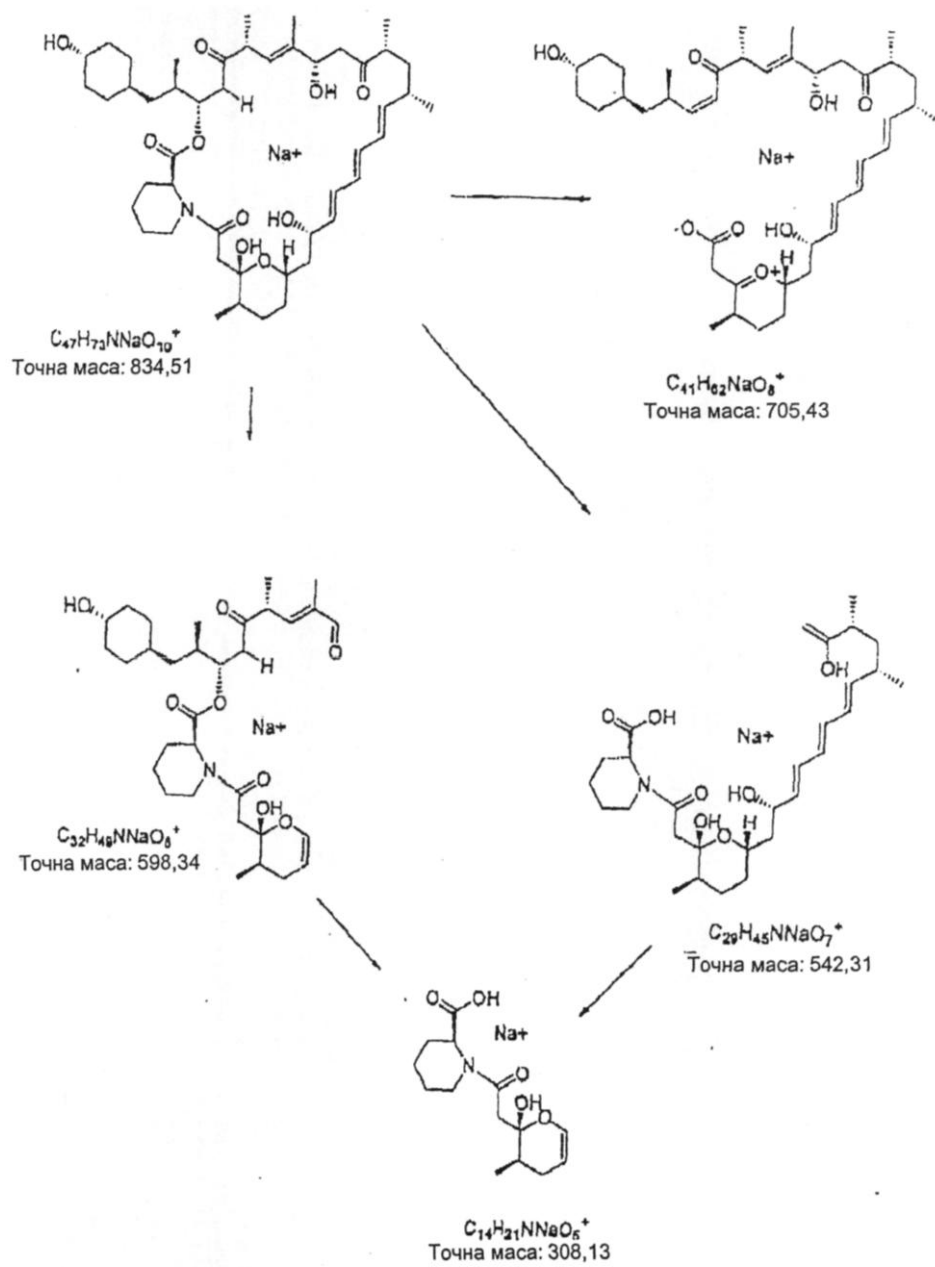


Фіг. 3

109

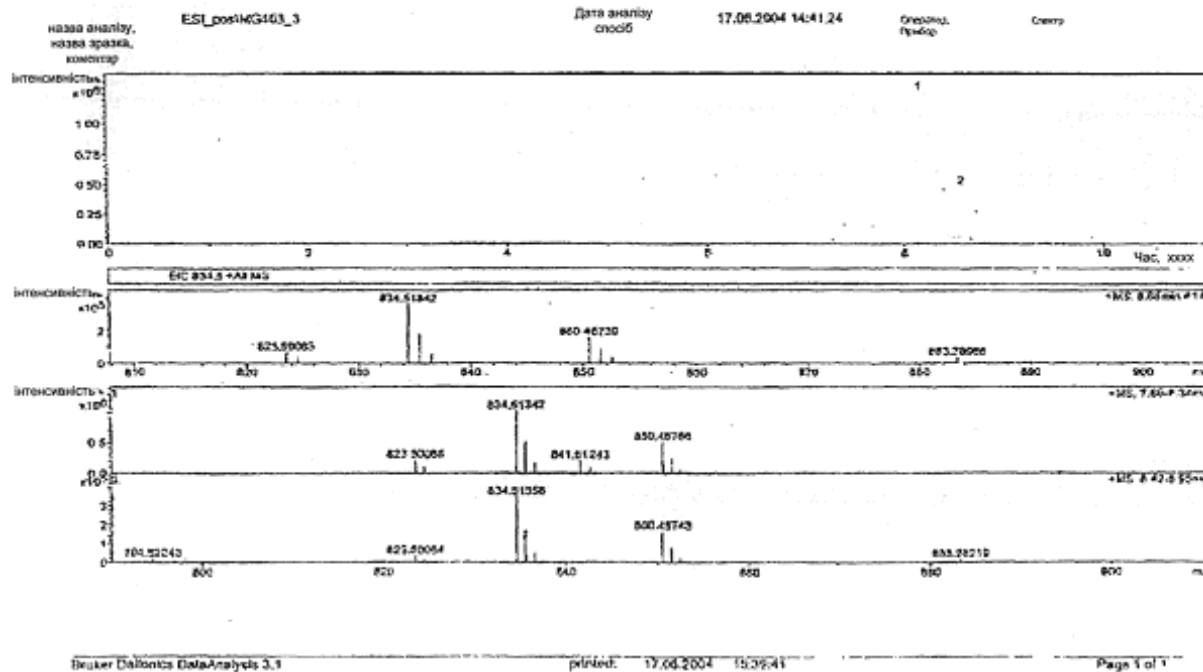
95895

110



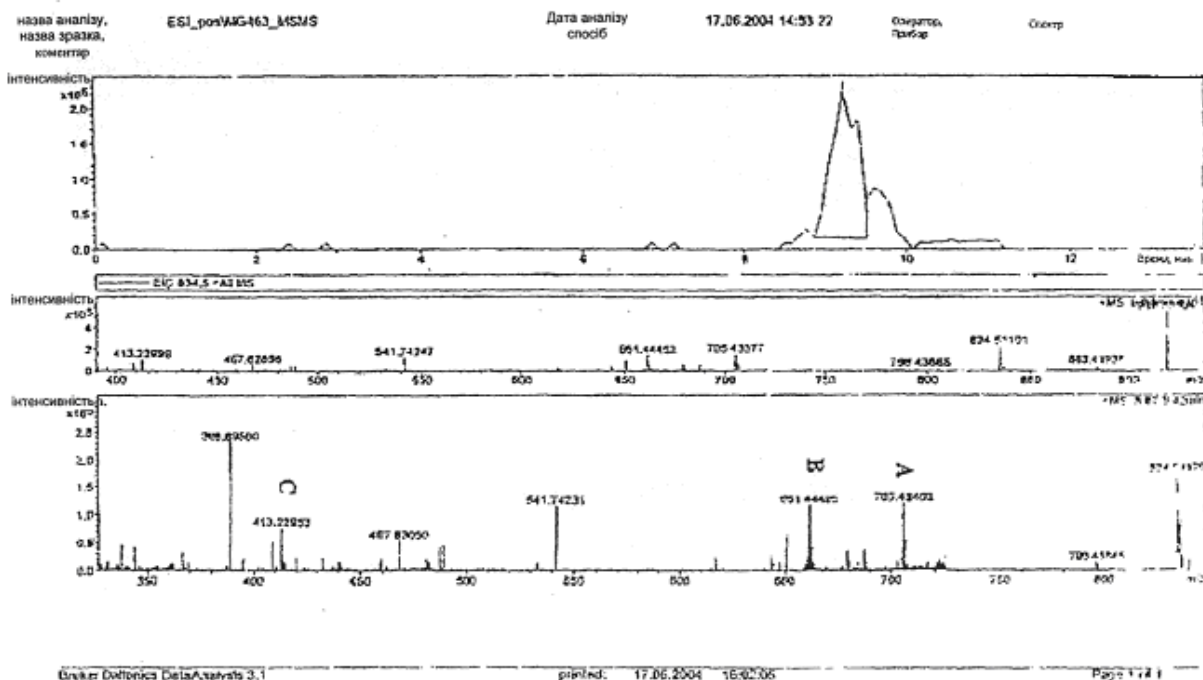
Фіг. 4

Роздрукування результатів



Фіг. 5

Роздрукування результатів

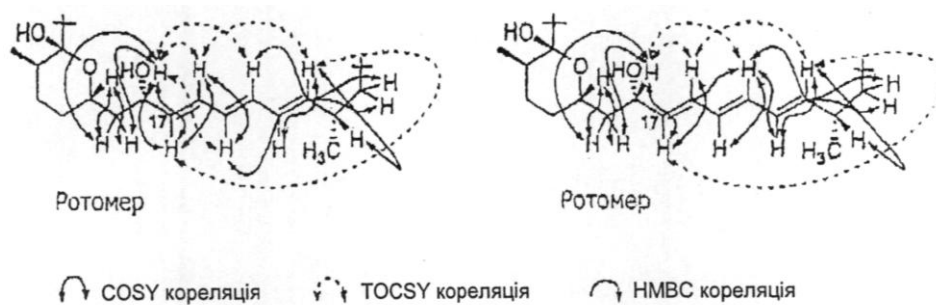


Фіг. 6

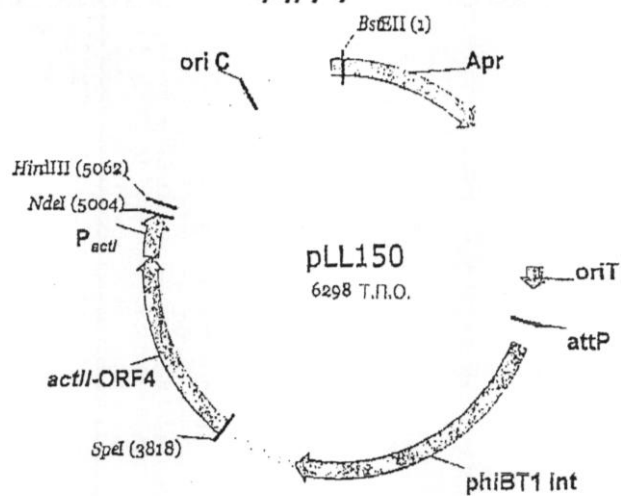
113

95895

114



Фіг. 7



Фіг. 8