PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:
307 305

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07H 15/16	(2006.01)
C12P 19/64	(2006.01)
C12R 1/465	(2006.01)
C07G 11/00	(2006.01)
C12N 15/31	(2006.01)
C12N 15/52	(2006.01)
C12N 1/21	(2006.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

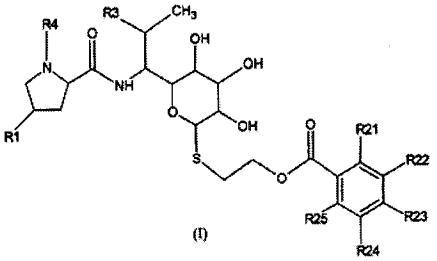
(21) Číslo přihlášky: **2017-137**
(22) Přihlášeno: **10.03.2017**
(40) Zveřejněno: **23.05.2018**
(Věstník č. 21/2018)
(47) Uděleno: **11.04.2018**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **23.05.2018**
(Věstník č. 21/2018)

(56) Relevantní dokumenty:
Chemical science (20170501) Vol. 8, No. 5, pp. 3349-3355; Electronic Publication Date: 2017.03.23; ISSN: 2041-6520; Janata, J et al."Elucidation of salicylate attachment in celesticetin biosynthesis opens the door to create a library of more efficient hybrid lincosamide antibiotics"; HANADA, Minoru, et al. Antibiotic Bu-2545, a new member of the celesticetin-lincomycin class. The Journal of antibiotics, 1980, 33.7: 751-753; ISSN: 0021-8820; Journal of the American Chemical Society (20160525), 138(20), pp. 6348-6351 In English CODEN: JACSAT ISSN: 0002-7863; Wang, Min et al:"Differences in PLP-Dependent Cysteinyl Processing Lead to Diverse S-Functionalization of Lincosamide Antibiotics".
CZ 2009-278; WO 2010/127645; US 3671647 A; US 3544552 A.

(73) Majitel patentu:
Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i., Praha 4 - Krč, CZ

(72) Původce:
Ing. Jiří Janata, CSc., Psáry, CZ
Mgr. Zdeněk Kameník, Ph.D., Praha 7, CZ
Mgr. Stanislav Kadlčík, Ph.D., Ratíškovice, CZ
Mgr. Lucie Najmanová, Ph.D., Praha 4, CZ
Ing. Radek Gažák, Ph.D., Praha - východ, CZ

(74) Zástupce:
INVENTIA s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na Bělidle 3, 150 00 Praha 5



(I)

(54) Název vynálezu:
Linkosamidy, jejich příprava a použití

(57) Anotace:
Předkládané řešení poskytuje linkosamidy obecného vzorce I, kde
R1 je vybrán z C2-C8 alkyl, C2-C8 alkenyl; R3 je vybrán z OH, O(C1-C4 alkyl), SH, S(C1-C4 alkyl) nebo halogen; R4 je H nebo C1-C3 alkyl; každý z R21, R22, R23, R24, R25 je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující H, OH, C1-C4 alkyl, C1-C4 alkenyl, C1-C4 alkynyl, halogen, O(C1-C4 alkyl), O(C1-C4 alkenyl), O(C1-C4 alkynyl), NH_2, N(C1-C4 alkyl)$_2$, N(C1-C4 alkenyl)$_2$, N(C1-C4 alkynyl)$_2$; a jejich farmaceuticky přijatelné soli.
Poskytnut je i způsob jejich přípravy, zejména biosyntetický způsob využívající nově zjištěných funkcí celesticetinových biosyntetických proteinů Ccb1 a/nebo Ccb2.
Linkosamidy obecného vzorce I jsou vhodné pro použití jako antibakteriální a antiprotozoální látky.

CZ 307305 B6

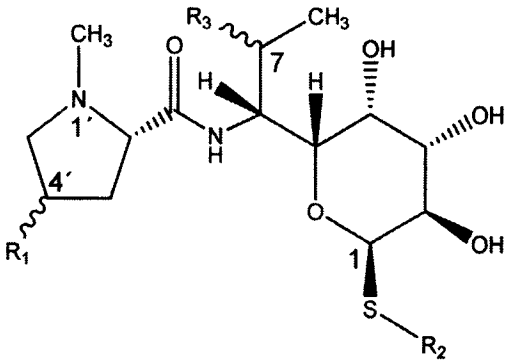
Linkosamidy, jejich příprava a použití

Oblast techniky

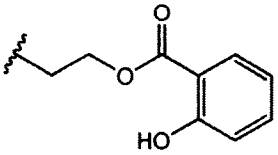
Předkládaný vynález se týká nových hybridních linkosamidů, jejich přípravy využívající enzymových aktivit z biosyntézy celesticetinu, a jejich použití jako antimikrobiálních látek.

Dosavadní stav techniky

Linkosamidy jsou malá skupina přírodních látek. Pomineme-li vedlejší kultivační produkty, byly dosud popsány pouze tři přírodní linkosamidové látky. Strukturní jádro linkosamidů tvoří aminokyselinová jednotka, derivát prolinu, a jednotka cukerná, neobvyklá aminooktosa, vzájemně propojené amidovou vazbou. Obecný vzorec a substituenty odpovídající třem přírodním linkosamidovým látkám jsou uvedeny níže. Strukturně nejjednodušším přírodním linkosamidem je Bu–2545 (R_1=H; R_2=CH_3; R_3=O–CH_3). Biosynteticky komplikovanější přírodní látkou je linkomycin s propylovým bočním řetězcem v pozici 4' prolinové jednotky (R_1=C_3H_7; R_2=CH_3; R_3=OH). Třetí přírodní linkosamidová látka, celesticetin, naopak boční alkylový řetězec prolinové jednotky postrádá (R_1=H), oproti linkomycinu však obsahuje navíc dvě modifikace aminocukerné jednotky, jednak O–methylaci v pozici 7, shodně s Bu–2545, a především salicylátovou jednotku vázanou dvouuhlíkatým linkerem k atomu síry (R_2=CH_2–CH_2–salicylát; R_3=O–CH_3).



Bu-2545: R_1=H, R_2=CH_3, R_3=OCH_3 (*R* konfigurace)
Linkomycin: R_1=C_3H_7 (*R* konfigurace), R_2=CH_3, R_3=OH (*R* konfigurace)

Celesticetin: R_1=H, R_2= 

, R_3=OCH_3 (*R* konfigurace)

Přírodní linkosamidy mají antibakteriální aktivitu. Avšak pouze nejúčinnější z nich, linkomycin, je průmyslově vyráběn a medicínsky přímo využíván jako antibiotikum. Navíc se jeho chlorací vyrábí semisyntetický derivát, klindamycin (R_3=Cl, *S* konfigurace), nejúčinnější vyráběná linkosamidová látka. Využívá se především jako antibakteriální agens, díky antiprotozoální aktivitě někdy i jako antimalarikum.

Bylo testováno mnoho derivátů linkomycinu chemicky modifikovaných jak na aminokyselinové, tak na cukerné jednotce, některé i účinnější než linkomycin, a dokonce i než klindamycin. V základní struktuře linkomycinu tak byly dosud identifikovány tři pozice, jejichž modifikace ovlivňuje aktivitu: Vedle pozice 7 cukerné jednotky, jejíž chlorací vzniká klindamycin, je to pozice 4' prolinové jednotky, kde delší alkylové boční řetězce než propyl přítomný v linkomycinu, zejména 4–6 uhlíkaté, významně zvyšují antibakteriální aktivitu příslušných

látek. V kombinaci s chlorací v pozici 7 tyto látky navíc vykazují významné účinky antiplazmodiální. Antibakteriální i antimalarické účinky derivátů klindamycinu dále potencuje absence N–methylové skupiny v pozici 1'. Dosud nejúčinnějšími deriváty linkomycinu jsou 1'–demethyl–4'–depropyl–4'–pentylklindamycin a 1'–demethyl–4'–depropyl–4'–hexylklindamycin, jejich příprava chemickou syntézou je však velmi komplikovaná a jejich výroba tak není reálná.

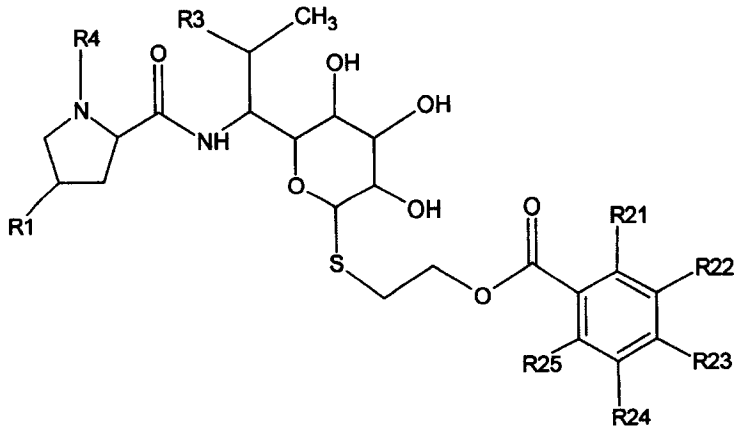
Naopak celesticetin jeví nízkou antimikrobiální aktivitu, proto jeho deriváty unikaly pozornosti výzkumu. Podobně nebyly připraveny ani testovány žádné hybridní látky kombinující zároveň výše zmíněné specifické modifikace linkomycinu (R_1=alkyl) a celesticetinu (R_2=2C–salicylát): Logicky bylo považováno za neperspektivní modifikovat aktivnější linkomycin na atomu síry navázaného v pozici 1 cukerné jednotky právě substituentem R_2 specifickým pro méně účinný celesticetin, mj. i s přihlédnutím ke značné náročnosti přípravy takové hybridní látky chemickou syntézou.

Stále přetrvává potřeba hledat nové linkosamidové látky, které budou kombinovat vysokou antimikrobiální aktivitu s málo komplikovanou a ekonomicky přijatelnou přípravou.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje nové linkosamidy kombinující zároveň substituci alkylem v poloze 4' prolinové jednotky a ornamentaci glykosidicky vázaného atomu síry dvouuhlíkatým alkylem s esterově vázanou kyselinou benzoovou nebo jejím derivátem. Žádné hybridní linkosamidové látky kombinující modifikace specifické pro celesticetin (CH_2–CH_2–salicylát jako R_2) a linkomycin (propylový boční řetězec jako R_1) nebyly dosud připraveny, tedy ani testovány. Překvapivě a v rozporu s dosavadním obecným názorem tato kombinace substitucí vede ke zvýšení antimikrobiální aktivity. Výroba hybridních látek modifikovaných současně v pozicích 4' i 1 chemickou syntézou by byla extrémně náročná. Předkládaný vynález navrhuje cestu enzymatickou. Příprava těchto látek je tedy umožněna využitím enzymově katalyzovaných procesů na základě nových poznatků o mechanismu funkce enzymů podílejících se na přirozené biosyntéze celesticetinu, které byly získány původci v rámci práce na tomto vynálezu.

Předmětem předkládaného vynálezu jsou látky obecného vzorce I



(I),

kde

R1 je vybrán z C2–C8 alkylů nebo C2–C8 alkenylů;

R3 je vybrán z OH, O(C1–C4 alkyl), SH, S(C1–C4 alkyl) nebo halogen; s výhodou OH, O(C1–C2 alkyl), SH, S(C1–C2 alkyl) nebo halogen;

R4 je H nebo C1–C3 alkyl; s výhodou H nebo C1–C2 alkyl;

každý z R21, R22, R23, R24, R25 je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující H, OH, C1–C4 alkyl, C1–C4 alkenyl, C1–C4 alkynyl, halogen, O(C1–C4 alkyl), O(C1–C4 alkenyl), O(C1–C4 alkynyl), NH_2, N(C1–C4 alkyl)$_2$, N(C1–C4 alkenyl)$_2$, N(C1–C4 alkynyl)$_2$; s výhodou H, OH, C1–C2 alkyl, halogen, O(C1–C2 alkyl), NH_2, N(C1–C2 alkyl)$_2$;

a jejich farmaceuticky přijatelné soli.

Halogeny zahrnují F, Cl, Br, I. Nejvýhodněji je halogenem Cl.

R1 je lineární nebo rozvětvený C2–C8 alkyl nebo C2–C8 alkenyl. S výhodou je R1 lineární nebo rozvětvený C2–C8 alkyl. Výhodněji je R1 lineární C2–C8 alkyl. Výhodněji je R1 C3–C6 alkyl. Výhodněji je R1 vybrán ze skupiny zahrnující propyl, butyl, pentyl, hexyl.

R3 je s výhodou OH, OCH_3,OCH_2CH_3 nebo Cl.

R4 je s výhodou H nebo CH_3.

Každý z R21, R22, R23, R24, R25 je s výhodou nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující H, OH, CH_3, CH_2CH_3, Cl, Br, I, OCH_3, OCH_2CH_3, NH_2.

S výhodou je R21 vybrán ze skupiny zahrnující OH, CH_3, CH_2CH_3, Cl, Br, I, OCH_3, OCH_2CH_3, NH_2, H.

S výhodou je R22 vybrán ze skupiny zahrnující H, OH, NH_2, Cl.

S výhodou je R23 vybrán ze skupiny zahrnující OH, CH_3, CH_2CH_3, Cl, Br, I, OCH_3, OCH_2CH_3, NH_2, H.

S výhodou je R24 vybrán ze skupiny zahrnující H, OH, NH_2, Cl.

S výhodou je R25 vybrán ze skupiny zahrnující OH, CH_3, CH_2CH_3, Cl, Br, I, OCH_3, OCH_2CH_3, NH_2, H.

Nejvýhodněji je R25 skupina OH a R21, R22, R23, R24 jsou H.

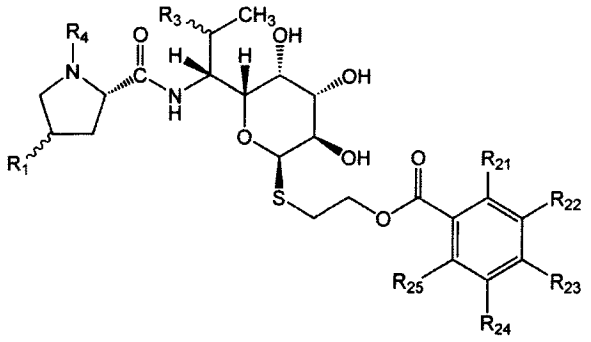
Další výhodné kombinace skupin R21 až R25 jsou uvedeny v tabulce:

R21	R22	R23	R24	R25
H	H	H	H	NH_2
H	H	H	H	CH_3
H	H	H	H	Cl
H	H	H	H	Br
H	H	H	H	I
H	H	H	H	OCH_3
H	H	H	H	H
H	H	H	OH	H
H	H	H	NH_2	H

H	H	H	Cl	H
H	H	OH	H	H
H	H	NH_2	H	H
H	H	CH_3	H	H
H	H	Cl	H	H
OH	H	H	H	OH
H	H	OH	H	OH
H	H	NH_2	H	OH
H	H	NH_2	H	Cl
H	H	Cl	H	Cl
H	H	OH	OH	H
H	H	Cl	Cl	H
H	OH	H	OH	H
H	Cl	H	Cl	H
H	OH	H	H	OH
H	OH	OH	OH	H
H	H	Cl	OH	H
H	H	OH	Cl	H
H	Cl	H	OH	H

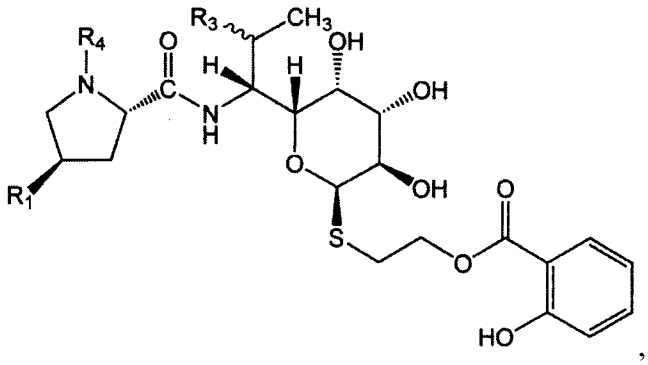
Farmaceuticky přijatelné kyseliny, které mohou tvořit farmaceuticky přijatelné adiční soli látek obecného vzorce I, jsou zejména 1–hydroxynaftalen–2–karboxylová kyselina, 2,2–dichloroctová kyselina, 2–hydroxyethansulfonová kyselina, 2–oxoglutarová kyselina, 4–acetamidobenzoová kyselina, 4–aminosalicylová kyselina, octová kyselina, adipová kyselina, askorbová kyselina, asparagová kyselina, benzensulfonová kyselina, benzoová kyselina, kyselina chlorovodíková, kafrová kyselina, kafr–10–sulfonová kyselina, dekanova kyselina, hexanová kyselina, oktanová kyselina, kyselina uhličitá, skořicová kyselina, citrónová kyselina, cyklámová kyselina, dodecylsírová kyselina, ethan–1,2–disulfonová kyselina, ethansulfonová kyselina, kyselina mravenčí, fumarová kyselina, galaktarová kyselina, gentisová kyselina, glukoheptanová kyselina, glukonová kyselina, glukuronová kyselina, glutamová kyselina, glutarová kyselina, glycerofosforečná acidglykolová kyselina, hippurová kyselina, kyselina bromovodíková, isobutanová kyselina, kyselina mléčná, kyselina laktobionová, kyselina laurová, kyselina maleinová, kyselina malonová, kyselina jablečná, kyselina mandlová, methansulfonová kyselina, naftalen–1,5–disulfonová kyselina, naftalen–2–sulfonová kyselina, nikotinová kyselina, kyselina dusičná, kyselina olejová, kyselina šťavelová, kyselina palmitová, kyselina pamoová, kyselina fosforečná, kyselina propanová, kyselina pyroglutamová, kyselina salicylová, kyselina sebaková, kyselina stearová, kyselina jantarová, kyselina sírová, kyselina tartarová, kyselina thiokyanová, toluensulfonová kyselina, undecylenová kyselina (P. H. Stahl and C. G. Wermuth, editors, *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use,* Weinheim/Zürich:Wiley–VCH/VHCA, 2002).

S výhodou má obecný vzorec I konfiguraci na chirálních centrech uvedenou níže:



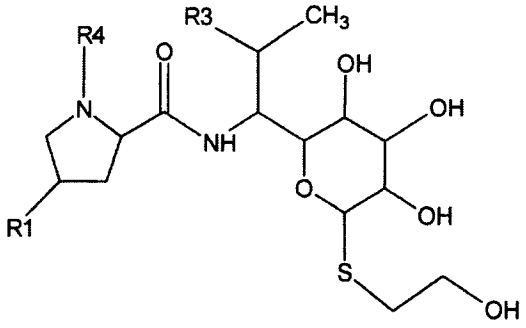
Chirální centra s navázanými skupinami R1 a R3 mohou mít konfigurace *R* i *S* (všechny čtyři možné kombinace). Výhodněji má ovšem chirální centrum se skupinou R1 konfiguraci *R*. Výhodněji má chirální centrum se skupinou R3 konfiguraci *R*, pokud R3=OH, OCH_3, OCH_2CH_3 a naopak konfiguraci *S*, pokud R3=halogen. Nejvýhodněji má chirální centrum se skupinou R3 konfiguraci *S*, pokud R3=chlor.

Nejvýhodněji mají nové linkosamidy strukturu:



kde R1=propyl nebo butyl nebo pentyl nebo hexyl, R3=OH (konfigurace *R)* nebo OCH_3 (konfigurace *R*) nebo Cl (konfigurace *S*), R4=H nebo CH_3.

Předkládaný vynález dále poskytuje způsob přípravy látek dle obecného vzorce I, který zahrnuje krok enzymaticky katalyzované aktivace derivátu kyseliny benzoové substituované substituenty R21, R22, R23, R24, R25 navázáním koenzymu A a krok enzymaticky katalyzované esterifikace prekurzoru vzorce II



(II)

konjugátem derivátu kyseliny benzoové substituované substituenty R21, R22, R23, R24, R25 a koenzymu A.

Ve vzorci II mohou být substituenty R1, R3, R4 jak je uvedeno pro vzorec I.

Látky, kde R3 je halogen, se získávají z produktů enzymaticky katalyzované reakce následnou syntetickou halogenací známými postupy, např. látky s R3=Cl lze získat postupy chlorace používanými při výrobě klindamycinu.

Látky, kde Rl je alkyl delší než C_3H_7, lze získat analogií postupu publikovaného (Ulanova D., et al. (2010) *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(2), 927) a patentovaného (WO2010127645) dříve pro přípravu 4'–butyl–4'–depropyllinkomycinu a 4'–depropyl–4'–pentyllinkomycinu.

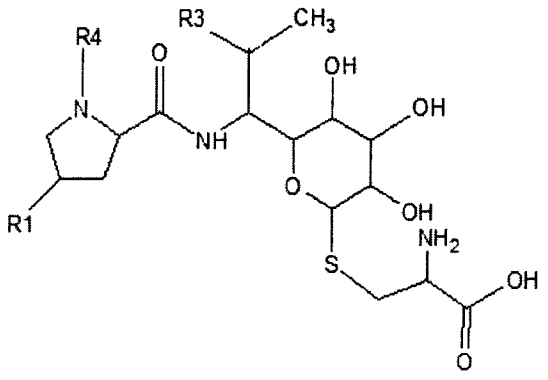
Jako enzym pro enzymaticky katalyzovanou aktivaci derivátu kyseliny benzoové substituované substituenty R21, R22, R23, R24, R25 navázáním koenzymu A lze použít s výhodou protein obsahující celesticetinový biosyntetický protein Ccb2, jehož aminokyselinová sekvence je zveřejněna v databázi GenBank pod přístupovým číslem ADB92576, nebo obsahující Ccb2–podobný protein vykazující alespoň 95% identitu s aminokyselinovou sekvencí Ccb2 (5% rozdílnost může obecně zahrnovat prodloužení nebo zkrácení řetězce, nebo bodovou záměnu aminokyselin). Protein může kromě Ccb2 nebo Ccb2–podobného proteinu obsahovat navíc například tzv. kotvu nebo jinou sekvenci, která není nezbytná pro enzymatickou aktivitu.

Jako enzym pro esterifikaci prekurzoru vzorce II lze použít s výhodou protein obsahující celesticetinový biosyntetický protein Ccbl, jehož aminokyselinová sekvence je zveřejněna v databázi GenBank pod přístupovým číslem ADB92559, nebo obsahující Ccbl–podobný protein s alespoň 95% identitou s aminokyselinovou sekvencí Ccbl (5% rozdílnost může obecně zahrnovat prodloužení nebo zkrácení řetězce, nebo bodovou záměnu aminokyselin). Protein může kromě Ccbl nebo Ccbl podobného proteinu obsahovat například tzv. kotvu nebo jinou sekvenci, která není nezbytná pro enzymatickou aktivitu.

Příprava nových látek dle obecného vzorce I je tedy umožněna využitím enzymově katalyzovaných procesů na základě nových poznatků o vlastnostech enzymů podílejících se na přirozené biosyntéze celesticetinu, konkrétně o dvojici enzymů připojujících salicylátovou jednotku: o Ccb2, který aktivuje salicylát připojením koenzymu A, a zejména o Ccbl, acyltransferase katalyzující vlastní připojení (esterifikaci) aktivovaného salicylátu k cukerné jednotce antibiotika přes S–CH_2–CH_2–OH linker (odpovídající esterifikaci aktivovaného derivátu kyseliny benzoové a prekurzoru vzorce II). Tyto nové poznatky o dvojici enzymů Ccb2 a Ccbl byly získány původci v rámci práce na tomto vynálezu a zjištěná široká substrátová specifita enzymů k oběma substrátům esterifikační reakce (aktivovaných derivátů kyseliny benzoové i prekurzoru dle obecného vzorce II) je dokumentována v části Příklady provedení vynálezu, tj. využita pro enzymatickou přípravou linkosamidů 1–120 obecného vzorce I.

S výhodou reakční směs obsahuje Ccb2, Ccbl, derivát benzoové kyseliny nesoucí substituenty R21 až R25, adenosintrifosfát, koenzym A, $MgCl_2$ a pufr s pH v rozmezí 6 až 9 (s výhodou Tris pufr, pH 7,5). Reakční směs je preinkubována při teplotě v rozmezí 20 až 40 °C, s výhodou 24 až 34 °C, po dobu 15 až 60 minut, s výhodou 25 až 40 minut, poté se přidá prekurzor dle obecného vzorce II a směs se inkubuje při teplotě ve stejném rozmezí po dobu 1 až 3 hodin. Linkosamidy obecného vzorce I lze ze směsi izolovat precipitací proteinů (s výhodou lze použít kyselinu mravenčí), centrifugací, extrakcí supernatantu a izolací z extraktu chromatografickou separací. Vhodná je chromatografická kolona s reversní stacionární fází (s výhodou C18 ligand) a gradientová separace s mobilní fází, jejíž vodná složka má kyselé nebo neutrální pH (s výhodou roztok kyseliny mravenčí v kombinaci s organickým modifikátorem – např. methanol nebo acetonitril).

Prekurzor dle obecného vzorce II lze získat známými postupy, například enzymatickou transformací prekurzoru dle obecného vzorce III.



(III)

K této enzymatické transformaci lze použít s výhodou proteiny obsahující celesticetinové biosyntetické proteiny: CcbF, jehož aminokyselinová sekvence je uveřejněna v databázi GenBank pod přístupovým číslem ADB92565, nebo CcbF–podobný protein s alespoň 95% identitou s aminokyselinovou sekvencí CcbF (5% rozdílnost může obecně zahrnovat prodloužení nebo zkrácení řetězce, nebo bodovou záměnu aminokyselin); Ccb5, jehož aminokyselinová sekvence je uveřejněna v databázi GenBank pod přístupovým číslem ADB92579, nebo Ccb5–podobný protein s alespoň 95% identitou s aminokyselinovou sekvencí Ccb5 (5% rozdílnost může obecně zahrnovat prodloužení nebo zkrácení řetězce, nebo bodovou záměnu aminokyselin); a popřípadě Ccb4, jehož aminokyselinová sekvence je uveřejněna v databázi GenBank pod přístupovým číslem ADB92578, nebo obsahující Ccb4–podobný protein s alespoň 95% identitou s aminokyselinovou sekvencí Ccb4 (5% rozdílnost může obecně zahrnovat prodloužení nebo zkrácení řetězce, nebo bodovou záměnu aminokyselin). CcbF, Ccb5 a Ccb4 byly popsány v Kamenik, Z., et al. (2016) *Chem. Sci.*, 7(1), 430–435; Wang, M., etal. (2016) *J. Am. Chem. Soc.*, 138(20), 6348–6351.

S výhodou jsou v reakční směsi přítomny CcbF, Ccb5, prekurzor dle vzorce III a pyridoxal–5–fosfát, v pufru o pH 6 až 9 (výhodněji Tris pufr, pH 7,5). Pokud R3 má být OCH_3, pak je v reakční směsi přítomen také Ccb4 a S–adenosylmethionin. Reakční směs je inkubována při teplotě v rozmezí 20 až 40 °C, s výhodou 24 až 34 °C, po dobu 1 až 4 hodin, s výhodou 90 až 150 minut.

Ve vzorci III mohou být substituenty R1, R3, R4 jak je uvedeno pro vzorec I.

V jednom výhodném provedení se enzymaticky katalyzovaná aktivace derivátu kyseliny benzoové substituované substituenty R21, R22, R23, R24, R25 navázáním koenzymu A a enzymaticky katalyzovaná esterifikace prekurzoru vzorce II konjugátem derivátu kyseliny benzoové substituované substituenty R21, R22, R23, R24, R25 a koenzymu A provádějí biosynteticky s použitím mikroorganismu nesoucího kódující sekvence celesticetinových biosyntetických proteinů Ccb1 a/nebo Ccb2 nebo biosyntetických proteinů majících 95% identitu s aminokyselinovými sekvencemi Ccb1 a Ccb2.

S výhodou je takovým mikroorganismem mikroorganismus třídy Actinobacteria, s výhodou rodu *Streptomyces.*

Ve výhodném provedení tento mikroorganismus nese kódující sekvence celesticetinových biosyntetických proteinů Ccb1, Ccb2, Ccb5, CcbF, a pro případ, kdy R3 je OCH_3, také Ccb4, nebo biosyntetických proteinů majících alespoň 95% identitu aminokyselinové sekvence s Ccb1, Ccb2, Ccb5, CcbF, případně Ccb4, a postup vychází z prekurzoru vzorce III.

Výhodněji tento mikroorganismus spolu s výše uvedenými kódujícími sekvencemi dále nese i kódující sekvence proteinů řídících biosyntézu prekurzoru vzorce III, tj. příslušné geny linkomycinového a/nebo celesticetinového biosyntetického shluku genů. Biosyntetické genové shluky jsou popsány v odborné literatuře a jejich nukleotidové sekvence jsou zveřejněny

v databázi GenBank, konkrétně pro linkomycin (Koběrská, M., et al. (2008) *Folia Microbiol,* 53(5), 395–401; GenBank EU124663) a pro celesticetin (Janata, J., et al. (2015) *PloS One,* 10(3), e0118850; GenBank GQ844764). Z literatury je pro odborníka zřejmá i biosyntetická relevance jednotlivých genů pro vznik konkrétních variant prekurzoru III lišících se v R1, R3 a R4 (kromě výše uvedených zdrojů dále Kamenik, Z., et al. (2016) *Chem. Sci.,* 7(1), 430–435; Jiraskova P., et al. (2016) *Front. Microbiol.,* 7, 276; Najmanova, L., et al. (2013) *ChemBioChem,* 14(7), 2259).

Způsob přípravy linkosamidových látek vzorce I s R1 alkylem delším než C_3H_7 vyplývá z dostupné odborné literatury, a může vycházet z prekurzoru vzorce III, v němž na pozici R1 se již nachází prodloužený alkyl. Takový prekurzor lze ve výhodném provedení získat tak, že kultivační médium mikroorganismu produkujícího prekurzor dle vzorce III, kde R1=C_3H_7, se obohatí o synteticky připravený 4–alkyl–L–prolin, přičemž délka tohoto 4–alkylu odpovídá délce alkylu na pozici R1 vzniklého prekurzoru vzorce III. Příprava syntetických 4–alkyl–L–prolinů a jejich použití pro přípravu derivátů linkomycinu s R1 delším než C_3H_7 je popsána v odborné literatuře (Ulanova D., et al. (2010) *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(2), 927); dokument WO2010127645).

Všechny látky získané výše uvedenými postupy mohou být dále dle potřeby modifikovány syntetickými postupy, které jsou odborníkovi v oboru dobře známy, např. chlorací v poloze 7 cukerného zbytku (za vytvoření R3=Cl).

Předmětem předkládaného vynálezu jsou dále geneticky modifikované produkční mikroorganismy třídy Actinobacteria, s výhodou rodu *Streptomyces,* nesoucí kódující sekvence celesticetinových biosyntetických proteinů Ccb1 a/nebo Ccb2, nebo biosyntetických proteinů majících alespoň 95% identitu aminokyselinové sekvence s Ccb1, resp. Ccb2, a s výhodou dále nesoucí i kódující sekvence proteinů řídících biosyntézu prekurzoru vzorce II, tj. příslušné geny linkomycinového a/nebo celesticetinového biosyntetického shluku genů. Biosyntetické genové shluky jsou popsány v odborné literatuře a jejich nukleotidové sekvence jsou zveřejněny v databázi GenBank, konkrétně pro linkomycin (Koběrská, M., et al. (2008) *Folia Microbiol,* 53(5), 395–401; GenBank EU124663) a pro celesticetin (Janata, J., et al. (2015) *PloS One,* 10(3), e0118850; GenBank GQ844764). Z literatury je odborníkovi v oboru zřejmá i biosyntetická relevance jednotlivých genů pro vznik konkrétních variant prekurzoru II lišících se v R1, R3 a R4 (kromě výše uvedených zdrojů dále Kamenik, Z., et al. (2016) *Chem. Sci.,* 7(1), 430–435; Jiraskova P., et al. (2016) *Front. Microbiol.,* 7, 276; Najmanova, L., et al. (2013) *ChemBioChem,* 14 (7), 2259).

Předmětem předkládaného vynálezu jsou i geneticky modifikované produkční mikroorganismy třídy Actinobacteria, s výhodou rodu *Streptomyces,* nesoucí kódující sekvence celesticetinových biosyntetických proteinů Ccb1, Ccb2, Ccb5, CcbF, a pro případ, kdy produkované linkosamidy mají R3=OCH_3, také Ccb4, nebo biosyntetických proteinů majících alespoň 95% identitu sCcb1, Ccb2, Ccb5, CcbF, případně Ccb4, a dále nesoucí i kódující sekvence proteinů řídících biosyntézu prekurzoru vzorce III, tj. příslušné geny linkomycinového a/nebo celesticetinového biosyntetického shluku genů. Nukleotidové sekvence biosyntetických shluků jsou popsány v odborné literatuře a jejich nukleotidové sekvence jsou zveřejněny v databázi GenBank, konkrétně pro linkomycin (Koběrská, M., et al. (2008) *Folia Microbiol,* 53(5), 395–401; GenBank EU 124663), pro celesticetin (Janata, J., et al. (2015) *PloS One,* 10(3), e0118850; GenBank GQ844764). Z literatury je odborníkovi v oboru zřejmá i biosyntetická relevance jednotlivých genů pro vznik konkrétních variant prekurzoru III lišících se v R1, R3 a R4 (kromě výše uvedených zdrojů dále Kamenik, Z., et al. (2016) *Chem. Sci.,* 7(1), 430–435; Jiraskova P., et al. (2016) *Front. Microbiol,* 7, 276; Najmanova, L., et al. (2013) *ChemBioChem,* 14 (7), 2259).

V případě proteinů majících alespoň 95% identitu s celesticetinovými biosyntetickými proteiny se rozumí, že mutace jsou takové, aby zůstala zachována jejich enzymatická aktivita, tj. aby měly alespoň 50 % enzymatické aktivity příslušného celesticetinového biosyntetického proteinu. Toto lze ověřovat metodami známými odborníkovi v oboru.

Dále jsou předmětem předkládaného vynálezu látky obecného vzorce I pro použití jako léčiva, zejména jako antimikrobiální léčiva. Pod pojmem "antimikrobiální léčiva" se zde rozumí léčiva s účinky na jednobuněčné mikroorganismy, jako jsou bakterie a jednobuněčné eukaryotické parazitické mikroorganismy, zejména na Gram–pozitivní bakterie a parazity kmene Apicomplexa obsahující cílové organely, apikoplasty, zejména se jedná o organismy rodu *Plasmodium, Toxoplasma, Babesia, Theileria* a třídy *Coccidia.*

Pro léčebné použití mohou být látky formulovány do farmaceutických kompozic, které obsahují směsi aktivních látek obecného vzorce I nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí s pomocnými látkami. Pomocné látky zahrnují zejména rozpouštědla, jako jsou voda, ethanol, propylenglykol, butylenglykol, glycerol, makrogoly, oleje, isopropylmyristát, benzylalkohol, ethyloleát, tekutý parafin, decyloleát, isopropylpalmitát, ethyloleát; masťové a krémové základy jako jsou parafín, vazelína, silikony, tuky, vosky, vyšší alifatické alkoholy a kyseliny, celulóza, ethery a estery celulózy, škrob, tragant, alginan sodný, mastek, oxidy zinku, hořčíku, titanu, uhličitan vápenatý, uhličitan horečnatý, koloidní oxid křemičitý, stearáty hliníku, hořčíku, zinku, laktóza; plniva jako je laktóza, nativní nebo modifikované škroby, mikrokrystalická celulóza, manitol, fosforečnan vápenatý, síran vápenatý, sacharóza; pojiva jako je škrob, želatina, celulóza a jejich deriváty, např. methylcelulóza, sodná sůl karboxymethylcelulózy, hydroxypropylcelulóza, hydroxypropylmethylcelulóza, arabská guma, tragant, sacharóza, glukóza, kyselina alginová a algináty, guarová guma, polyvinylpyrrolidon; kluzné látky jako jsou mastek, kukuřičný škrob, stearan horečnatý, koloidní oxid křemičitý. Dále mohou pomocné látky zahrnovat stabilizátory, látky podporující rozpad, antioxidanty a konzervanty. Farmaceutické kompozice mohou být zejména ve formě tablet, kapslí, čípků, mastí, krémů, mlék, roztoků, nebo suspenzí. Farmaceutické kompozice mohou dále obsahovat kromě aktivních látek dle obecného vzorce I i další účinné látky, zejména antibiotika a antimalarika.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1: Příprava prekurzoru vzorce III, kde R1 je C3 alkyl, R3 je OH, R4 je H nebo CH_3

Kultivace kmenů streptomycet v tekutém médiu

Kultura bakteriálního kmene *Streptomyces lincolnensis ΔlmbIH* (konstrukce tohoto kmene z *S. lincolnensis* ATCC 25466 byla popsána dříve – Janata, J., et al. (2008) *PLoS One,* 2015, 10, e0118850) byla připravena inokulací spor z kultivační misky s MS agarem do 50 mL YEME (Kieser, T., et al. (2000) Practical Streptomyces Genetics. Norwich, UK, p. 613) média bez sacharózy a byla inkubována v 500mL baňkách s plochým dnem při 28 °C po dobu 120 h. Poté bylo kultivační médium odděleno centrifugací (4000xg, 20 °C, 15 min) a supernatant byl použit pro izolaci linkosamidových prekurzorů dle obecného vzorce III ve výhodné kombinaci substituentů (R1 je C3 alkyl, R3 je OH, R4 je H nebo CH_3).

Izolace linkosamidových prekurzoru vzorce III

Supernatant kultivačního média byl přečištěn pomocí Oasis HLB 6cc extrakčních kolonek (Waters, USA): Supernatant (50 mL) byl nanesen na kolonku předem kondicionovanou a ekvilibrovanou methanolem (5 mL) a vodou (5 mL) a část matrice vzorku byla vymyta vodou (5 mL). Frakce obsahující linkosamidové prekurzory byly eluovány methanolem (15 mL), odpařeny do sucha a rekonstutituovány ve 200 μl methanolu. Takto získaný extrakt byl rekonstituován ve 2 mL methanolu a dávkován do vysokoúčinného kapalinového chromatografu (HPLC, firma Waters, USA) vybaveného gradientovou pumpou 600, autosamplerem 717 a UV detektorem 2487 monitorujícího UV záření při 194 nm. Data byla zpracována pomocí software Empower 2 (Waters, USA). Linkosamidové prekurzory byly separovány na Luna Cl8

chromatografické koloně (250 x 15 mm, velikost částic 5 μm, Phenomenex, USA) pomocí dvousložkové mobilní fáze, A a B, kde jako fáze A byl použit 0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí (v/v) a jako fáze B methanol. Pro chromatografické analýzy byl využit lineární gradientovy program při průtoku 3 mL min^{-1} (min/%B): 0/5, 31/27,5 s následným promytím kolony (100% B, 9 min) a ekvilibrací před další analýzou (5% B, 9 min). Frakce obsahující linkosamidové prekurzory byly odpařeny dosucha, rekonstituovány v methanolu a podrobeny další HPLC separaci na chromatografické koloně XTerra Prep RP18 (150 x 7,8 mm, velikost částic 5,0 μm, Waters, USA) s využitím isokratického elučního programu při průtoku 1,5 mL min^{-1} s mobilní fází 1mM mravenčan amonný (pH 9,0):acetonitril (90:10 v/v). Linkosamidové prekurzory izolované tímto způsobem byly dále použity pro in vitro enzymatické reakce.

Příklad 2: Příprava prekurzoru vzorce II, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3, R4=H nebo CH_3
Heterologní produkce a purifikace proteinů CcbF, Ccb1, Ccb2, Ccb4 a Ccb5

Proteiny CcbF (GenBank ADB92565), Ccb1 (GenBank ADB92559), Ccb2 (GenBank ADB92576), Ccb4 (GenBank ADB92578) a Ccb5 (GenBank ADB92579) pro přípravu nových linkosamidových látek byly produkovány heterologně v buňkách *E. coli.* Geny *ccbF, ccb1, ccb2, ccb4* a *ccb5* byly s použitím primerů dle tabulky 1 amplifikovány metodou PCR z genomové DNA kmene *Streptomyces caelestis* ATCC 15084, produkujícího celesticetin. PCR produkty byly opracovány restrikčními enzymy (dle tabulky 1) a vloženy do vektorů pET28b (Novagen) pro *ccb1, ccb4* nebo *ccb5,* nebo pET42b (Novagen) pro *ccbF* nebo *ccb2.* Proteiny Ccb1, Ccb4 a Ccb5 tak byly produkovány s N–terminální histidinovou kotvou a proteiny CcbF a Ccb2 byly produkovány s C–terminální histidinovou kotvou. K produkci proteinů byl použit kmen *E. coli* BL21 (DE3) nesoucí konstrukt pro expresi GroES a GroEL chaperoninů. Pro všechny rekombinantní proteiny byla nadprodukce indukována při OD (600 nm) kultury 0,6 až 0,8 isopropyl β–D–1–thiogalaktopyranosidem (0.4 mM). Kultura byla po indukci inkubována při 17 °C při 200 otáčkách za minutu po dobu 20 h. Poté byla kultura centrifugována (4000xg, 20 min, 4 °C) a sediment byl použit k přípravě hrubého extraktu pomocí ultrazvukové homogenizace v pufru I (20 mM TRIS pH 8, 100 mM NaCl, 10% glycerol, and 20 mM imidazol). Homogenát byl následně centrifugován 9000xg, 25 min, 4 °C. Proteiny byly z hrubého extraktu purifikovány pomocí 1mL HiTrap™ Ni^{2+} kolonky dle protokolu výrobce (GE Healthcare). Protein Ccb2 byl eluován pufrem II (20 mM TRIS pH 8, 100 mM NaCl, 10% glycerol, and 100 mM imidazol), proteiny Ccb4 a Ccb5 byly eluovány pufrem III (20 mM TRIS pH 8, 100 mM NaCl, 10% glycerol, and 200 mM imidazol) a proteiny CcbF a Ccb1 byly eluovány pufrem IV (20 mM TRIS pH 8, 100 mM NaCl, 10% glycerol, and 250 mM imidazol). Imidazol byl z roztoku purifikovaných proteinů eliminován pomocí Amicon centrifugačních tub (Millipore) a pufru V (20 mM TRIS pH 8, 100 mM NaCl, 10% glycerol). Všechny takto připravené proteiny byly stabilní bez poklesu aktivity při 4 °C po dobu alespoň jednoho týdne; proteiny CcbF, Ccb1, Ccb2, a Ccb5 byly navíc stabilní po dobu alespoň jednoho měsíce při –80 °C.

Tabulka 1. Primery použité pro amplifikaci genů *S. caelestis.* Restrikční místa určená pro vložení do vektoru jsou podtržena

Gen	Primer I	Primer II
ccbF	CCGCATATGTCCGACTTAGCTGCCG	CCGCTCGAGGCGGGGCTGCCAGGCG
ccb1	CTGCATATGCATCTTGATCCAACCAC	ATAGAATTCTCATCGGTGGTCGTCGC
ccb2	AACCCCATATGAAGCGACGTGGCATGG	AACCCCTCGAGTAAGGTCATGAACTCCGCACG
ccb4	CTACATATGAAGACGCCCGGTACATC	CTAGAATTCTCAGCACGGAGTGGCCT
ccb5	ATAGCTAGCGCGACCGTCCCCGCC	CTGGAATTCTCATGAGTCCGCGCGCC

In vitro enzymatická příprava linkosamidových prekurzoru vzorce II

Reakční směs 1 obsahovala: 20 μM CcbF, 20 μM Ccb5, 200 μM linkosamidový prekurzor dle obecného vzorce III, kde R1 je C3 alkyl, R3 je OH, R4 je H nebo CH_3, 200 μM pyridoxal–5–fosfát, 100 mM Tris pH 7,5. V případě přípravy prekurzoru vzorce II, kde R3=OCH_3, reakční směs navíc obsahovala 20 μM Ccb4 a 4 mM S–adenosylmethionin. Reakční směs 1 byla inkubována při 30 °C po dobu 2h.

Příklad 3: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 *(R* konfigurace), R4=H nebo CH_3,R21–R24 jsou H a R25 je OH

Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina salicylová, 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2) obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II v poměru 1:1a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h.

Izolace nových linkosamidových látek vzorce I z enzymatické reakční směsi

Proteiny byly z reakční směsi precipitovány 98% kyselinou mravenčí (30 μL na 1 mL vzorku) a směs byla centrifugována (13500 otáček za minutu, 5 min). Supernatant byl extrahován pomocí Oasis HLB 6cc kolonek dle protokolu popsaného výše v odstavci Izolace linkosamidových prekurzoru. Extrakt byl dále podroben separaci pomocí HPLC přístroje definovaného výše v odstavci. Izolace linkosamidových prekurzoru. Nové linkosamidové látky byly separovány na Luna C18 chromatografické koloně (250 x 15 mm, velikost částic 5 μm, Phenomenex, USA) pomocí dvousložkové mobilní fáze, A a B, kde jako fáze A byl použit 0,1 % vodný roztok kyseliny mravenčí (v/v) a jako fáze B acetonitril. Pro chromatografické analýzy byl využit lineární gradientový program při průtoku 3 mL min^{-1} (min/%B): 0/30, 40/65 s následným promytím kolony (100% B, 9 min) a ekvilibrací před další analýzou (30% B, 9 min).

Testy antibakteriální aktivity

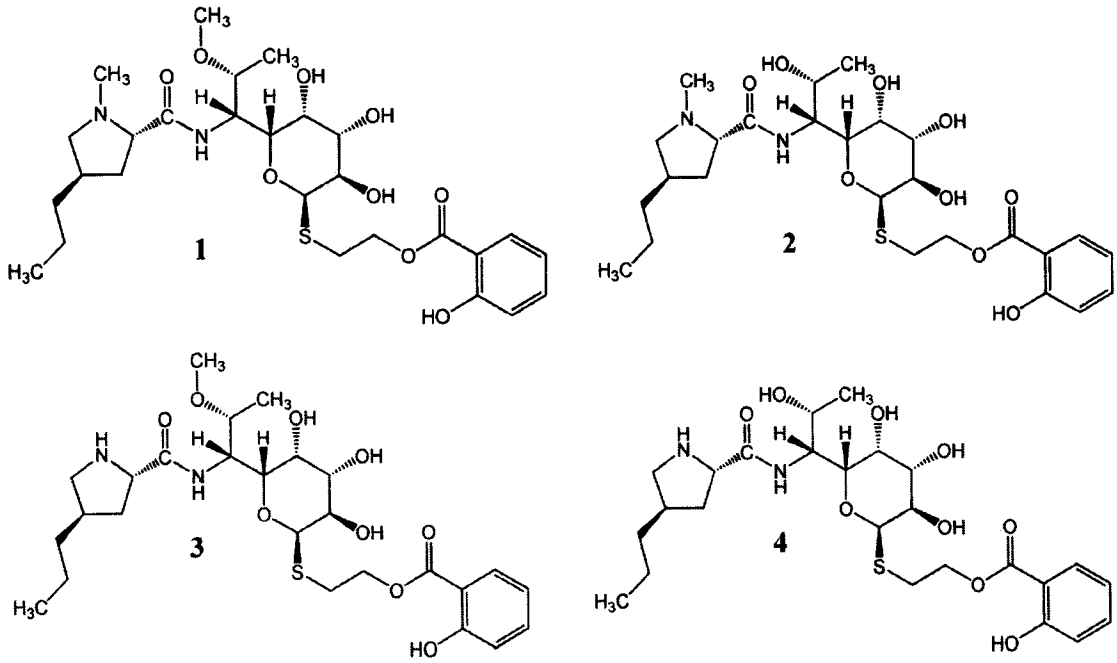
Filtrační papírové disky (geometrický průměr 5 mm) nasycené 5 nmol testovaných nových linkosamidových látek byly umístěny na misky s LB agarem (trypton 10 g; kvasničný extrakt 5 g; NaCl 10 g; doplněno destilovanou vodou do objemu 1000 mL; pH 7,5; agar 15 g) souvisle pokryté kulturou testovacího kmene *Kocuria rhizophila.* Misky byly inkubovány při 37 °C pro dobu 20 h. Minimální inhibiční koncentrace byly stanoveny na základě metody publikované dříve (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), Clin Microbiol Infect (2003), 9 (8), ix–xv). 5 μL suspenze (0,5 dle McFarlandovy stupnice) bakteriální kultury *K. rhizophila* bylo inokulováno do 1 mL LB média obsahujícího testované látky o požadované koncentraci (testován byl koncentrační rozsah 25–1600 nM). Kultury byly inkubovány po dobu 24 h při 37 °C.

Tabulka 2: Výsledky testů biologické aktivity

Testovaná látka	Diskový difusní test: velikost inhibičních zón [mm]	Minimální inhibiční koncentrace [nM]
Celesticetin	19	1600
Linkomycin	24	400
Látka vzorce I, kde R1=propyl, R21-R24=H, R25=OH, R3=OCH_3, R4=CH_3	28	100
Látka vzorce I, kde R1=propyl, R21-R24=H, R25=OH, R3=OH, R4=CH_3	29	100

Analýza technikou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC–MS analýza)

Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 1–4 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 3.



Tabulka 3. Výsledky LC–MS analýzy látek 1–4

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované ionty (*m/z*)
1	7,10	571,2690	571,2703	373,23; 126,13
2	6,25	557,2533	557,2543	359,22; 126,13
3	7,00	557,2533	557,2532	359,22; 112,11
4	6,30	543,2376	543,2358	345,20

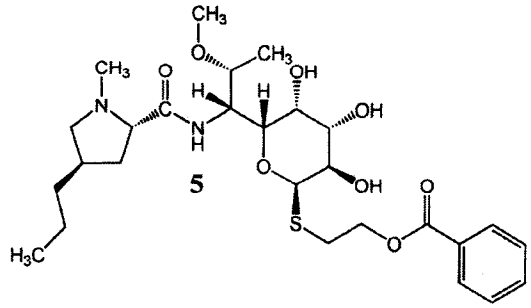
LC–MS analýzy byly provedeny na ultra vysokoúčinném kapalinovém chromatografu Acquity UPLC spojeným s LCT premiér XE hmotnostním spektrometrem a analyzátorem doby letu (Waters, USA). Vzorek o objemu 5 μl byl dávkován na Acquity UPLC BEH C18 chromatografickou kolonu (50 mm x 2,1 mm, velikost částic 1,7 μm, Waters, USA), která byla temperována na 40 °C. Vzorek byl z kolony eluován dvousložkovou mobilní fází, jako složka A byl použit vodný roztok 0,1% kyseliny mravenčí (v/v) a jako složka B byl použit acetonitril. K separaci byl při průtoku 0,4 mL min^{-1} využit následující lineární gradientový program (min/% B) 0/5, 1.5/5, 12.5/58. Analýza byla zakončena výplachem kolony (1,5 min, 100% B) a ekvilibrací před další analýzou (1,5 min, 5% B). Hmotnostní spektrometr byl nastaven na mód W s následujícími parametry: napětí na kapiláře, +2800 V; napětí vložené na vstup do analyzátoru, +40V; průtok desolvatačního plynu (dusík), 800 Lh^{-1}; teplota desolvatačního plynu, 350 °C; teplota bloku iontového zdroje, 120 °C; průtok desolvatačního plynu při vstupu do analyzátoru, 50 Lh^{-1}; doba skenu, 0,15 s; prodleva mezi skeny, 0,01 s. Přesnost hmoty pod 5 ppm byla udržována pomocí referenční látky leucin–enkefalin (2 ng μL^{-1}, 5 μL min^{-1}). Fragmentace ve zdroji (srážkami vyvolaná disociace – CID) byla vyvolána zvýšením hodnoty apertuře I na +50 V. Data byla zpracována pomocí software MassLnyx V4,1 (Waters, USA).

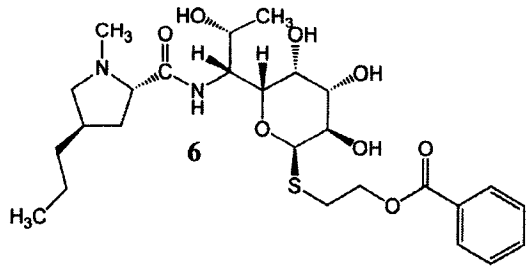
Příklad 4: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3, R21–R25 jsou H

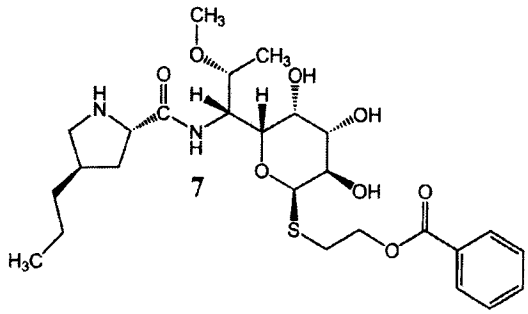
Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina benzoová, 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou benzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

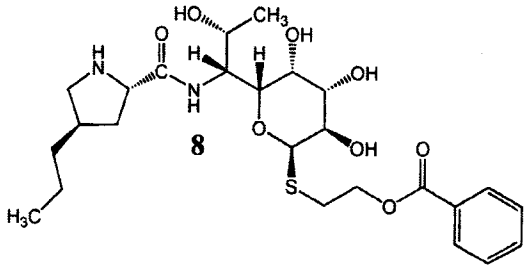
Výsledky LC–MS analýzy

Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 5–8 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 4.









Tabulka 4. Výsledky LC–MS analýzy látek 5–8

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované ions (*m/z*)
5	6,85	555,2741	555,2743	373,23; 126,13
6	6,00	541,2584	541,2578	359,22; 126,13
7	7,00	541,2584	541,2584	359,22; 112,11
8	6,10	527,2427	527,2424	345,20

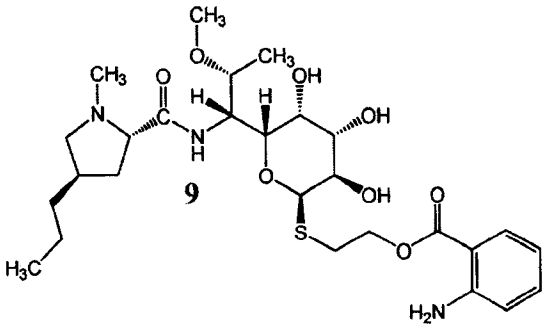
LC-MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

Příklad 5: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3, R21–R24 jsou H, R25 je NH_2

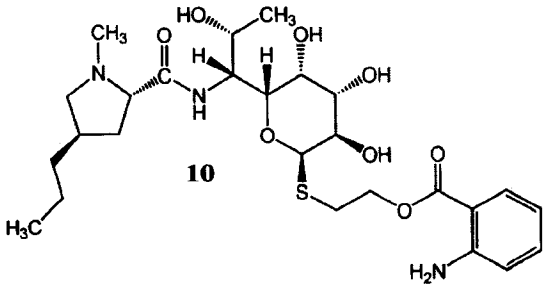
Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina anthranilová (2–aminobenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou anthranilovou (2–aminobenzoovou) byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

LC–MS analýza

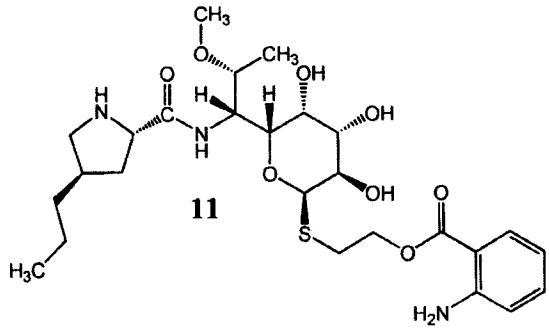
Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 9–12 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 5.



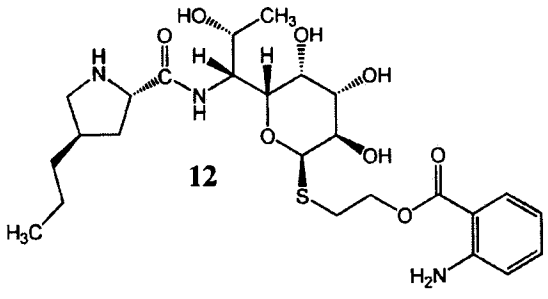
9



10



11



12

Tabulka 5. Výsledky LC–MS analýzy látek 9–12

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované ion (*m/z*)
9	6,50	570,2850	570,2842	373,23; 126,13
10	5,70	556,2393	556,2703	359,22; 126,13
11	6,50	556,2393	556,2709	359,22; 112,11
12	5,40	542,2536	542,2548	345,20; 112,11

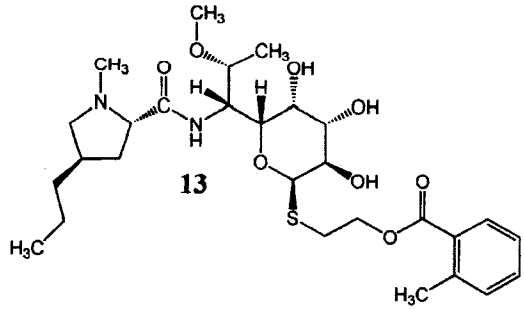
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

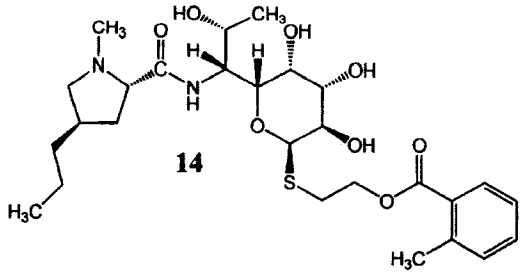
Příklad 6: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3, R21–R24 jsou H, R25 je CH_3

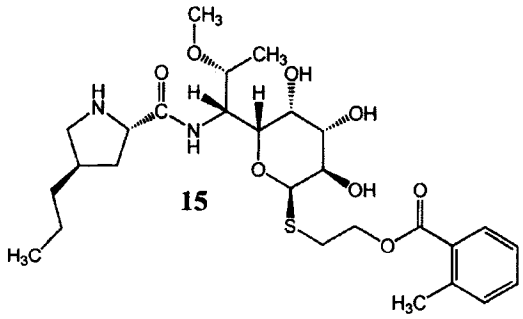
Reakční směs 2 obsahovala: 2 [illegible]M Ccb2, 2 [illegible]M Ccb1, 2 mM kyselina 2–methylbenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 2–methylbenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

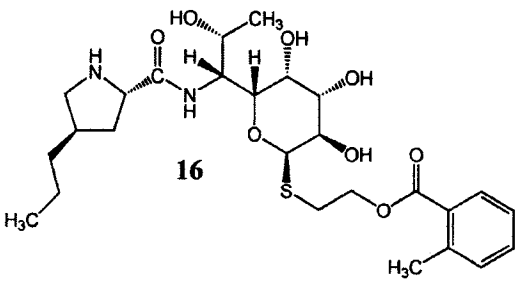
LC–MS analýza

Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 13–16 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 6.









Tabulka 6. Výsledky LC–MS analýzy látek 13–15

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované ionty (*m/z*)
13	9,00	569,2897	569,2917	373,23; 126,13
14	7,60	555,2740	555,2742	359,22; 126,13
15	8,00	555,2740	555,2714	359,22
16	5,75	541,2583	541,2570	345,20; 112,11

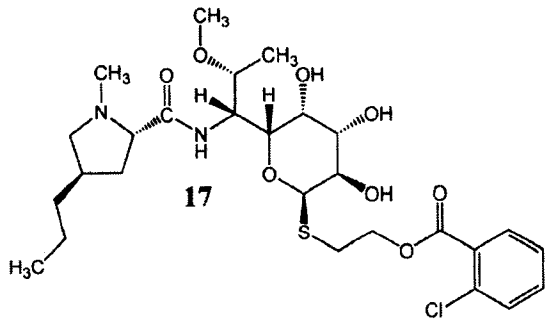
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

Příklad 7: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3, R21–R24 jsou H, R25 je Cl

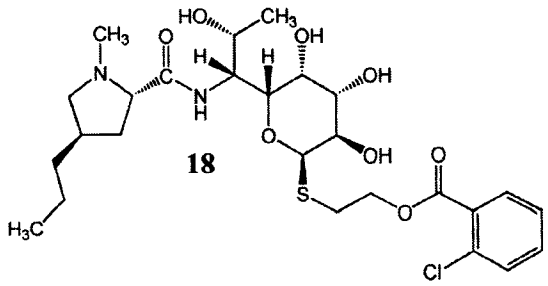
Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 2–chlorbenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 2–chlorbenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

LC–MS analýza

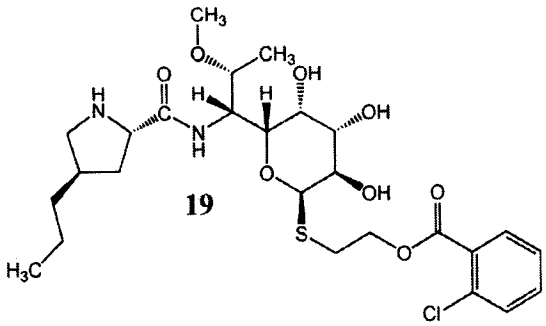
Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 17–20 s následujícími strukturami a LC–MS parametry vedenými v tabulce 7.



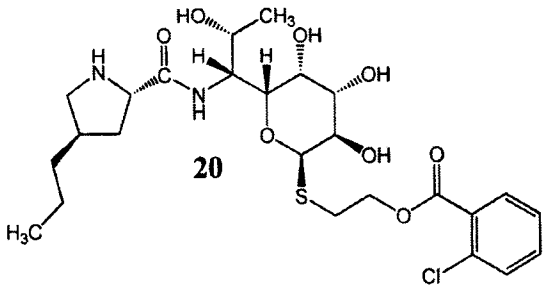
17



18



19



20

Tabulka 7. Výsledky LC–MS analýzy látek 17–20

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro	Majoritní detekovaný ion v MS spektru	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované ions
		z=1	(*m/z*)	(*m/z*)
17	8,63	589,2351	589,2335	373,23; 126,13
18	7,25	575,2194	575,2183	359,22; 126,13
19	6,50	575,2194	575,2169	359,22
20	5,52	561,2037	561,2045	345,20

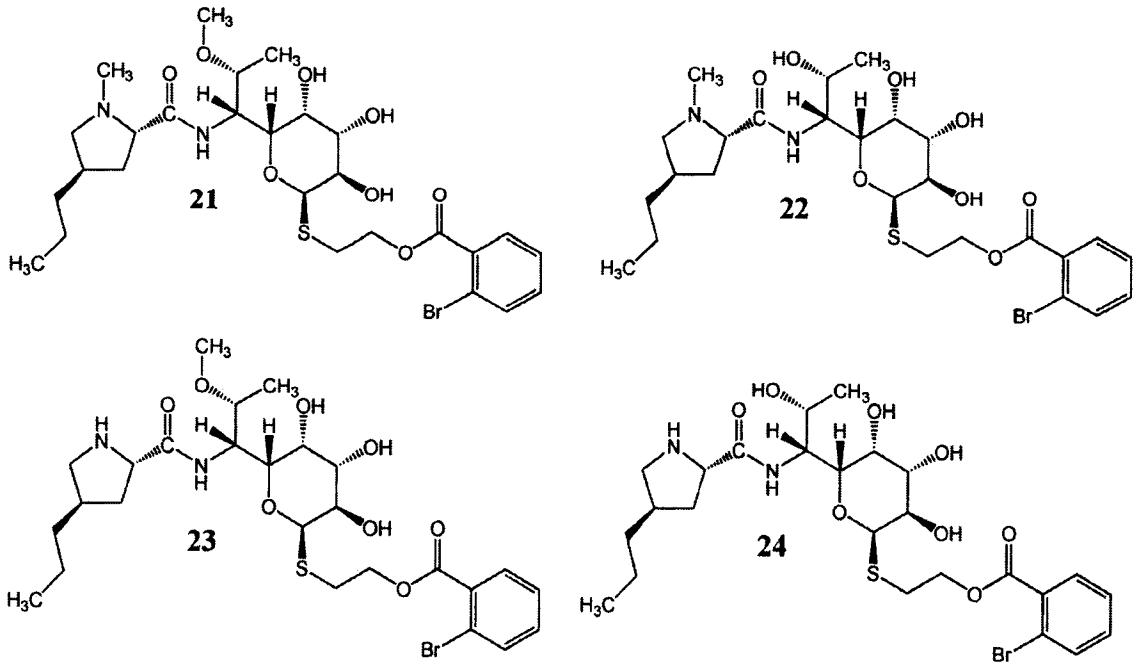
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

Příklad 8: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3, R21–R24 jsou H, R25 je Br

Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 2–brombenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 2–brombenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

LC–MS analýza

Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 21–24 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 8.



Tabulka 8. Výsledky LC–MS analýzy látek 21–24

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1 (A+2 peak)	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*); A+2 peak	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované ions (*m/z*)
21	8,75	635,1826	635,1833	373,24; 126,13
22	7,50	621,1669	621,1666	359,22; 126,13
23	6,63	621,1669	621,1635	359,22
24	5,63	607,1511	607,1506	345,21

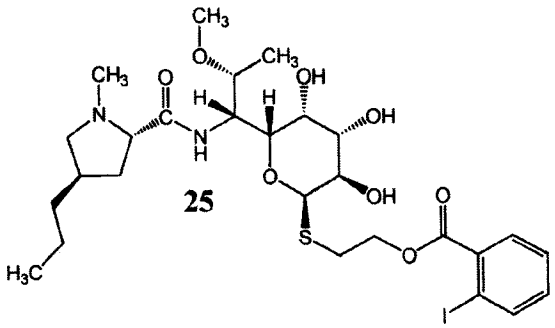
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

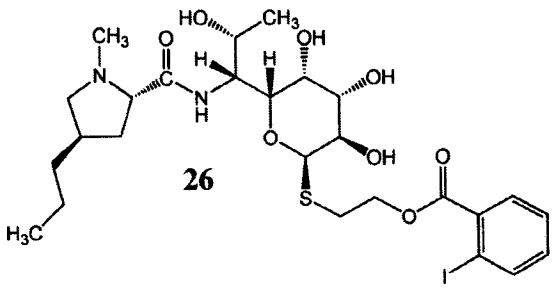
Příklad 9: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3, R21–R24 jsou H, R25 je I

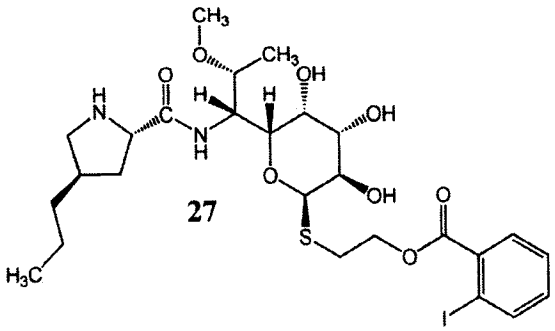
Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 2–jodbenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 2–jodbenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

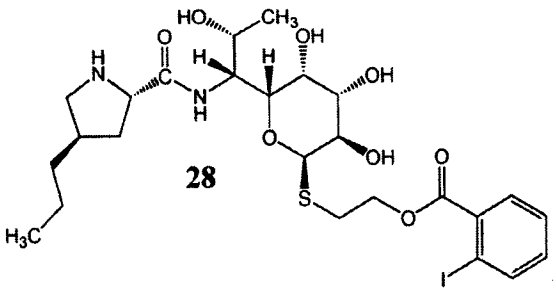
LC–MS analýza

Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 25–28 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 9.









Tabulka 9. Výsledky LC–MS analýzy látek 25–28

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované iony (*m/z*)
25	9,13	681,1707	681,1691	373,24; 126,13
26	7,88	667,1550	667,1524	359,22
27	7,00	667,1550	667,1500	359,22
28	5,87	653,1393	653,1382	345,20

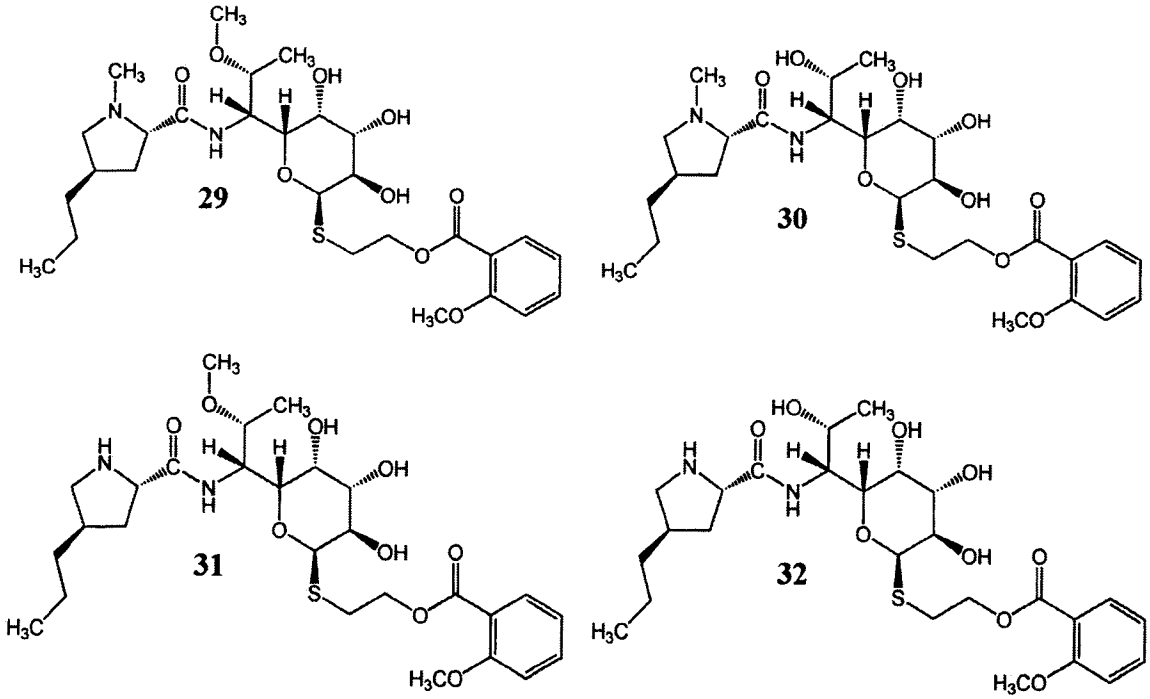
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

Příklad 10: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3, R21–R24 jsou H, R25 je OCH_3

Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 2–methoxybenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 2–methoxybenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

LC–MS analýza

Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 29–32 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 10.



Tabulka 10. Výsledky LC–MS analýzy látek 29–32

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované ionty (*m/z*)
29	7,52	585,2846	585,2855	373,24; 126,13
30	6,36	571,2689	571,2693	359,22
31	5,83	571,2689	571,2694	359,22
32	4,80	557,2532	557,2521	345,20

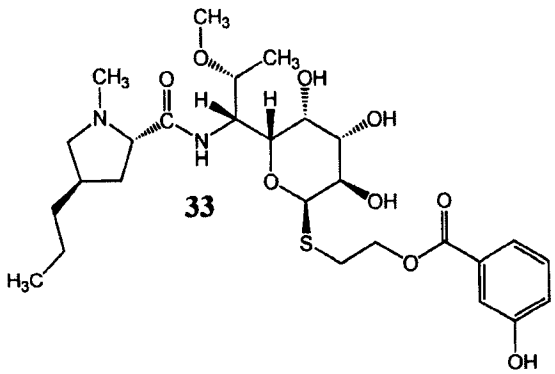
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

Příklad 11: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3, R21–R23, R25 jsou H, R24 je OH

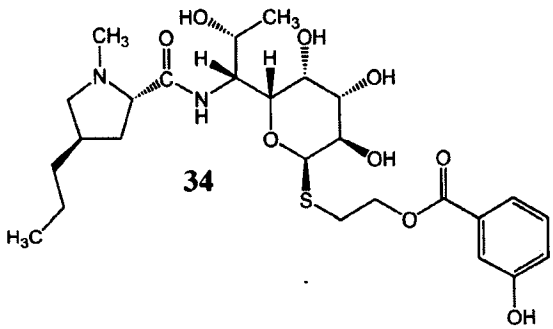
Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 3–hydroxybenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 3–hydroxybenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

LC–MS analýza

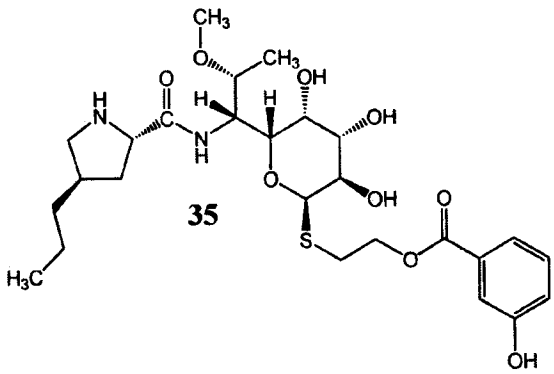
Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 33–36 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 11.



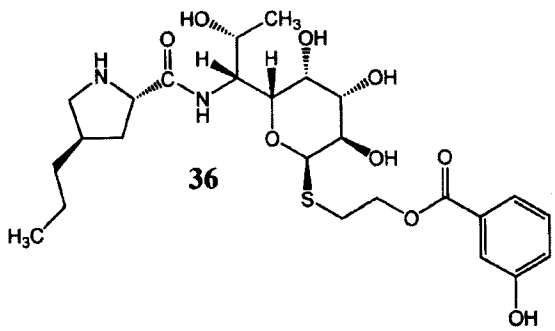
33



34



35



36

Tabulka 11. Výsledky LC–MS analýzy látek 33–36

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované ionty (*m/z*)
33	5,85	571,2690	571,2688	373,24; 126,13
34	5,09	557,2533	557,2531	359,22; 126,13
35	5,92	557,2533	557,2538	359,22
36	5.07	543,2376	543,2355	345,20

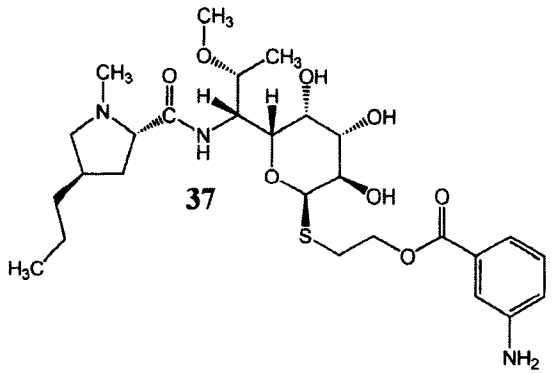
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

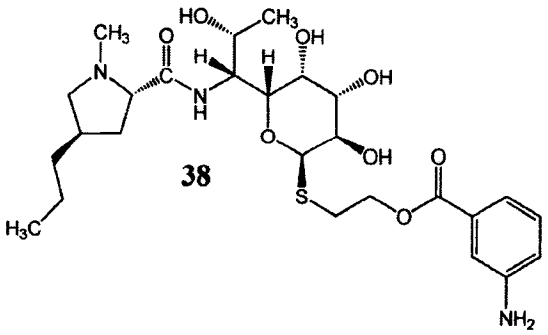
Příklad 12: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3, R21–R23, R25 jsou H, R24 je NH_2

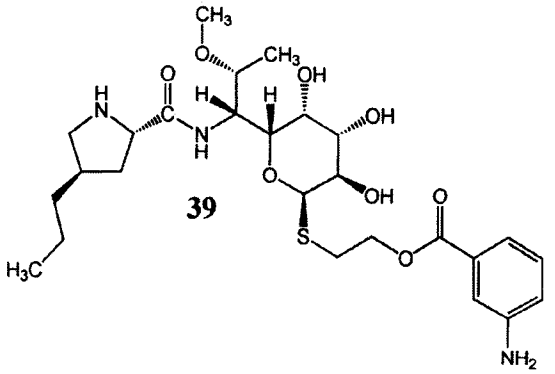
Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 3–aminobenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 3–aminobenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

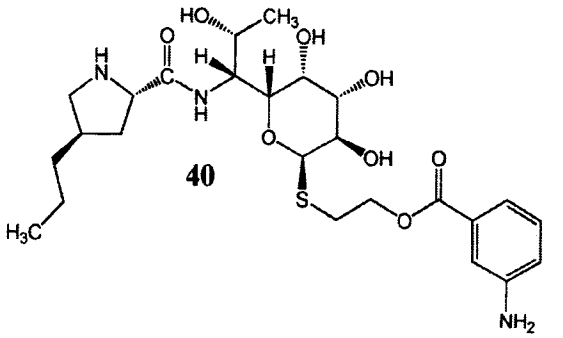
LC–MS analýza

Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 37–40 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 12.









Tabulka 12. Výsledky LC–MS analýzy látek 37–40

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované ionty (*m/z*)
37	5,35	570,2850	570,2839	373,24; 126,13
38	4,08	556,2393	556,2684	359,20; 126,12
39	5,35	556,2393	556,2696	359,22; 112,11
40	4,13	542,2536	542,2541	345,20

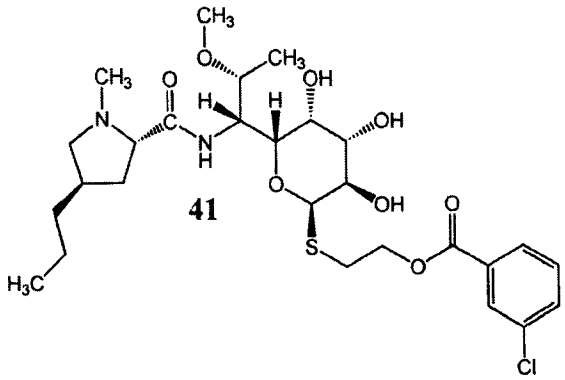
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

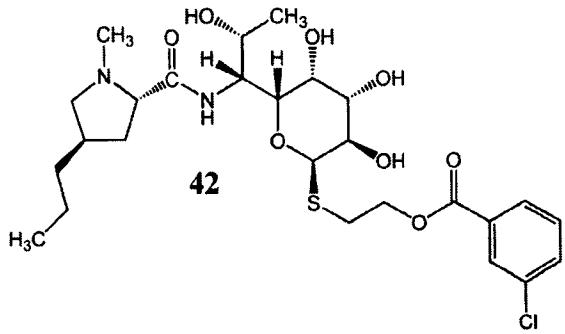
Příklad 13: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3, R21–R23, R25 jsou H, R24 je Cl

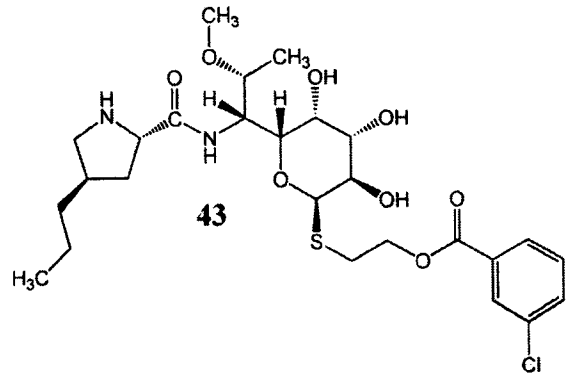
Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 3–chlorbenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 3–chlorbenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

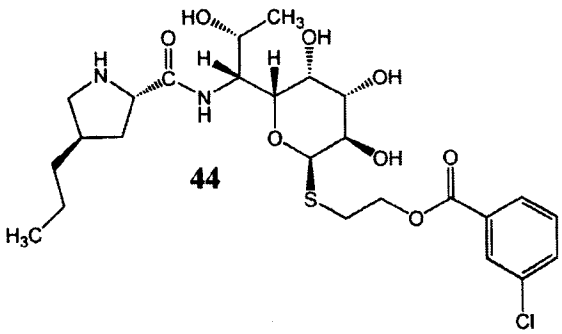
LC–MS analýza

Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 41–44 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 13.









Tabulka 13. Výsledky LC–MS analýzy látek 41–44

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované iony (*m/z*)
41	7,20	589,2351	589,2365	373,24; 126,13
42	6,77	575,2194	575,2185	359,22; 126,13
43	7,53	575,2194	575,2209	359,21
44	6,55	561,2037	561,2030	345,21

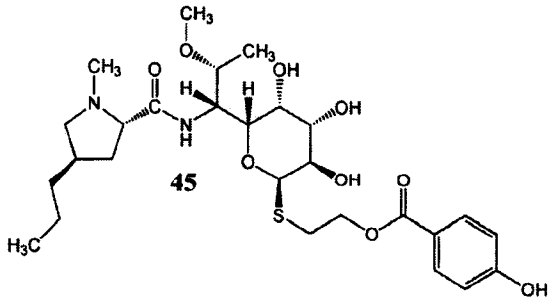
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

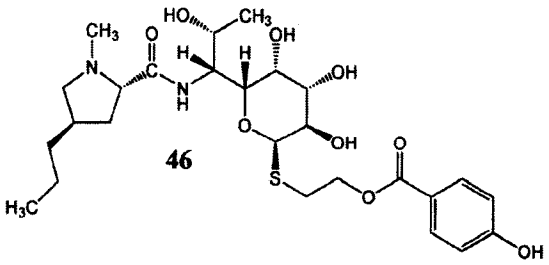
Příklad 14: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3; R21, R22, R24, R25 jsou H, R23 je OH

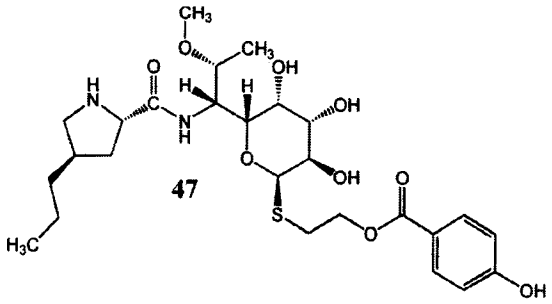
Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 4–hydroxybenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 4–hydroxybenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

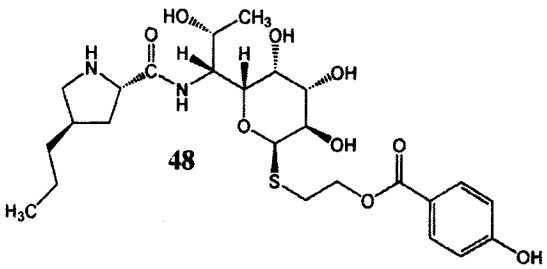
LC–MS analýza

Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 45–48 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 14.









Tabulka 14. Výsledky LC–MS analýzy látek 45–48

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované iony (*m/z*)
45	5,76	571,2690	571,2706	373,23; 126,13
46	4,91	557,2533	557,2551	359,22; 126,13
47	5,74	557,2533	557,2540	359,21; 112,11
48	4,97	543,2376	543,2467	345,20

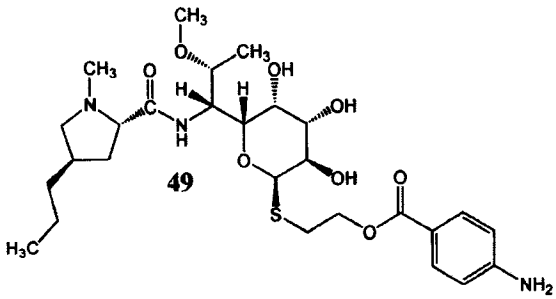
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

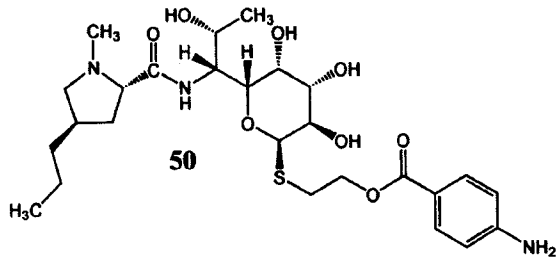
Příklad 15: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3; R21, R22, R24, R25 jsou H, R23 je NH_2

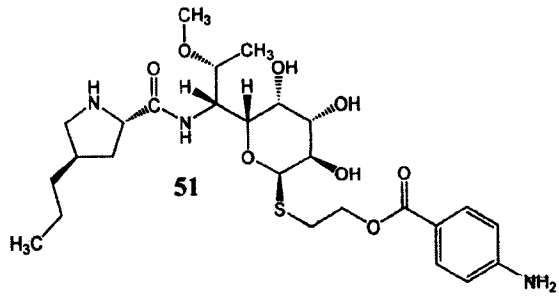
Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 4–aminobenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 4–hydroxybenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

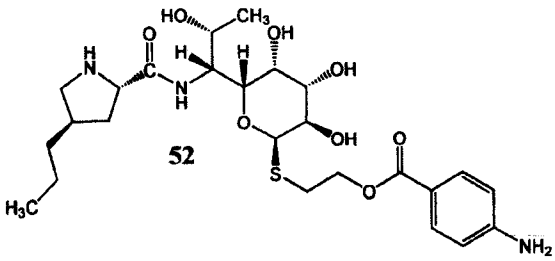
LC–MS analýza

Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 49–52 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 15.









Tabulka 15. Výsledky LC–MS analýzy látek 49–52

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované iony (*m/z*)
49	6,81	570,2850	570,2847	373,23; 126,13
50	5,50	556,2393	556,2692	359,22; 126,13
51	5,77	556,2393	556,2664	359,21; 112,11
52	3,72	542,2536	542,2545	345,20

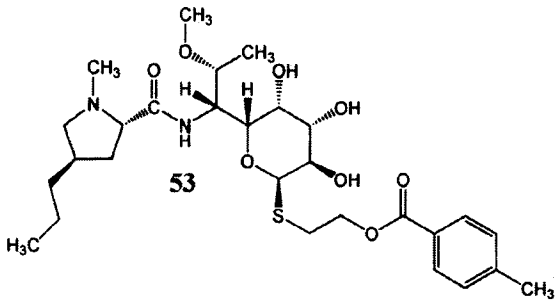
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

Příklad 16: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3; R21, R22, R24, R25 jsou H, R23 je CH_3

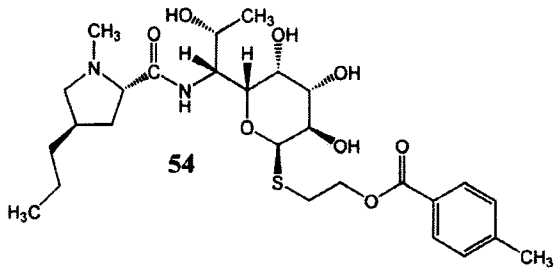
Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 4–methylbenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 4–hydroxybenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

LC–MS analýza

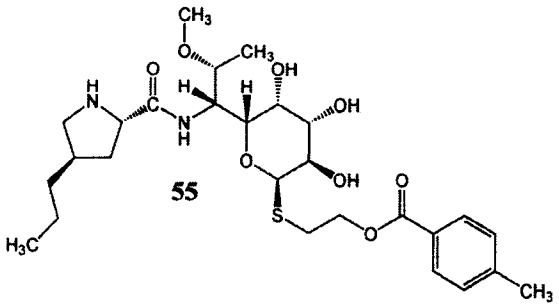
Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 53–56 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 16.



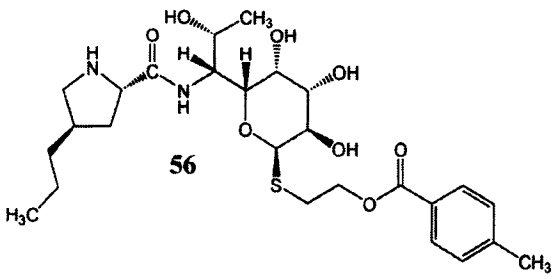
53



54



55



56

Tabulka 16. Výsledky LC–MS analýzy látek 53–56

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované iony (*m/z*)
53	8,80	569,2897	569,2879	373,24; 126,13
54	8,08	555,2740	555,2748	359,22; 126,13
55	6,83	555,2740	555,2725	359,22
56	5,67	541,2583	541,2572	345,20

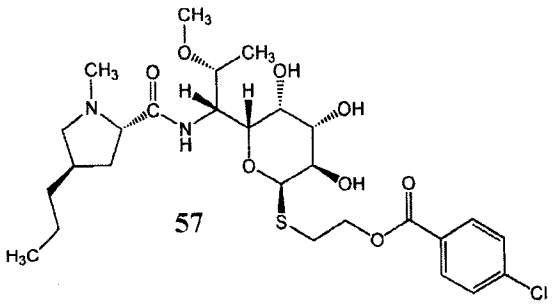
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

Příklad 17: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3; R21, R22, R24, R25 jsou H, R23 je Cl

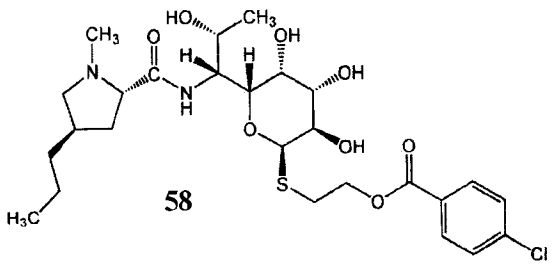
Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 4–chlorbenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 4–hydroxybenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

LC–MS analýza

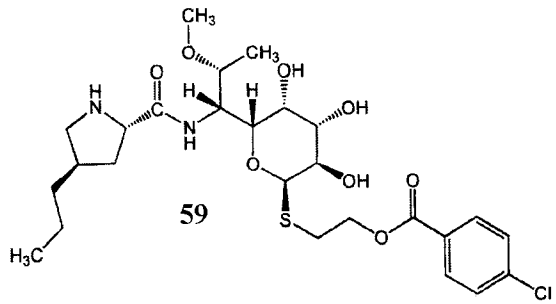
Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 57–60 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 17.



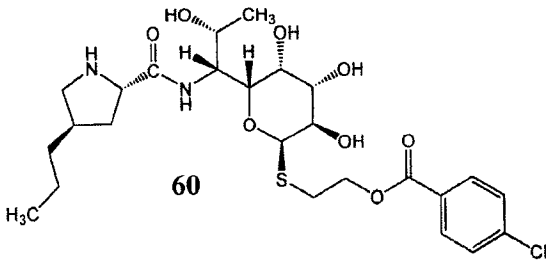
57



58



59



60

Tabulka 17. Výsledky LC–MS analýzy látek 57–60

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované ionty (*m/z*)
57	7,52	589,2351	589,2364	373,23; 126,13
58	7,60	575,2194	575,2183	359,22
59	7,54	575,2194	575,2197	359,22; 112,11
60	6,02	561,2037	561,2037	345,20

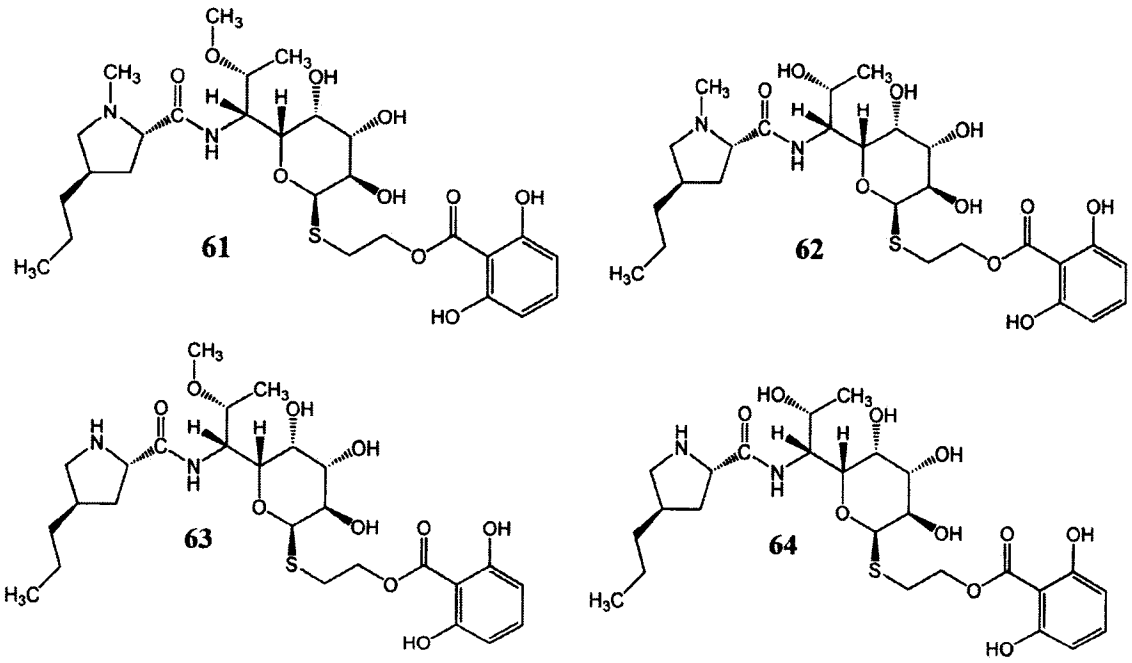
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

Příklad 18: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3; R21, R25 jsou OH; R22–R24 jsou H

Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 2,6–dihydroxybenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 2,6–dihydroxybenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

LC–MS analýza

Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 61–64 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 18.



Tabulka 18. Výsledky LC–MS analýzy látek 61–64

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované iony (*m/z*)
61	7,27	587,2639	587,2656	373,24; 126,13
62	5,90	573,2482	573,2484	359,22; 126,13
63	7,03	573,2482	573,2490	359,22
64	4,99	559,2325	559,2310	345,20

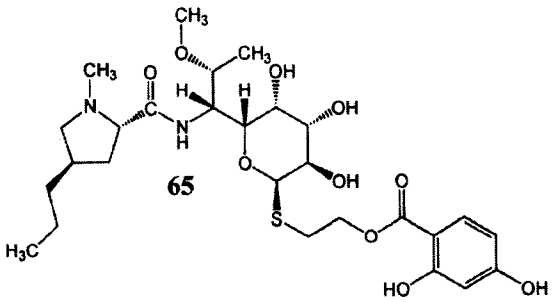
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

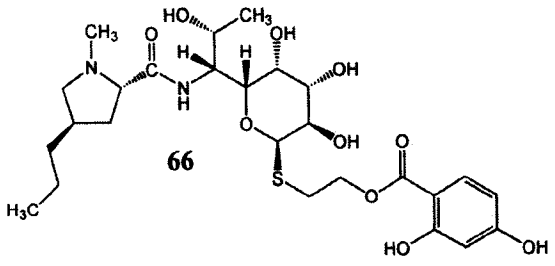
Příklad 19: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3; R21, R22, R24 jsou H; R23, R25 jsou OH

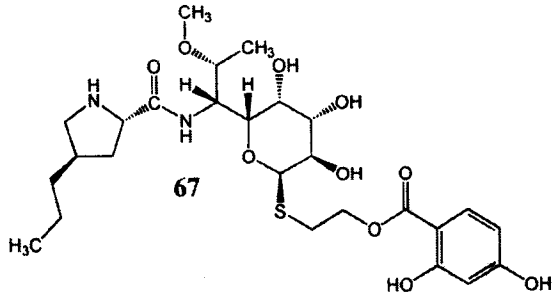
Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 2,4–dihydroxybenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 2,4–dihydroxybenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

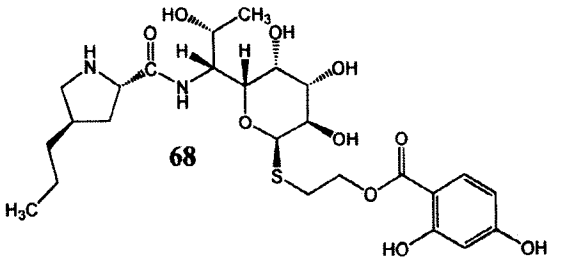
LC–MS analýza

Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 65–68 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 19.









Tabulka 19. Výsledky LC–MS analýzy látek 65–68

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované iony (*m/z*)
65	7,38	587,2639	587,2648	373,24; 126,13
66	6,05	573,2482	573,2483	359,22; 126,13
67	6,35	573,2482	573,2487	359,21
68	5,11	559,2325	559,2294	345,20

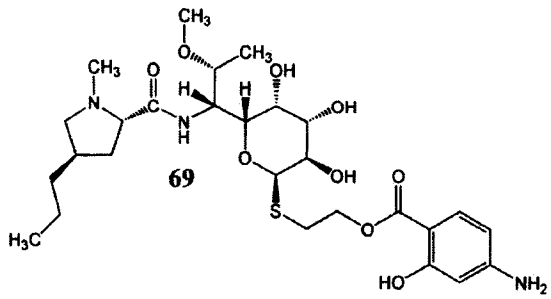
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

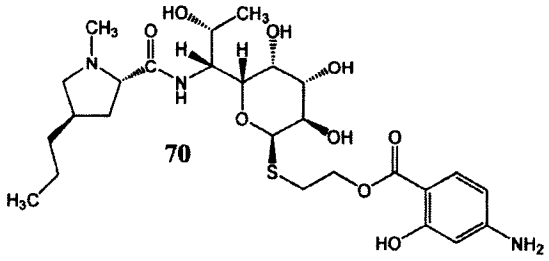
Příklad 20: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3; R21, R22, R24 jsou H; R23 je NH_2; R25 je OH

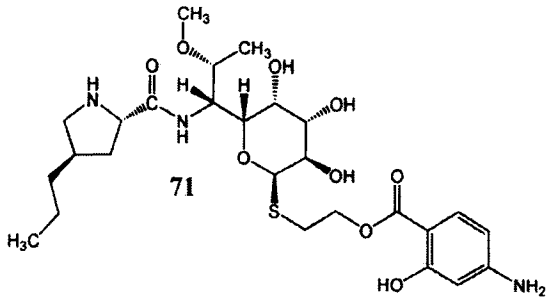
Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 4–amino–2–hydroxybenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 4–amino–2–hydroxybenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

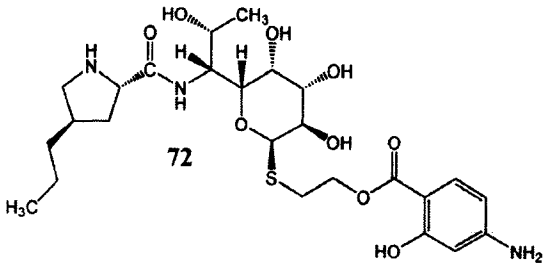
LC–MS analýza

Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 69–72 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 20.









Tabulka 20. Výsledky LC–MS analýzy látek 69–72

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované iony (*m/z*)
69	5,82	586,2799	586,2789	373,24; 126,13
70	4,97	572,2642	572,2646	359,22; 126,13
71	5,95	572,2642	572,2663	112,11
72	4,85	558,2485	558,2480	345,20

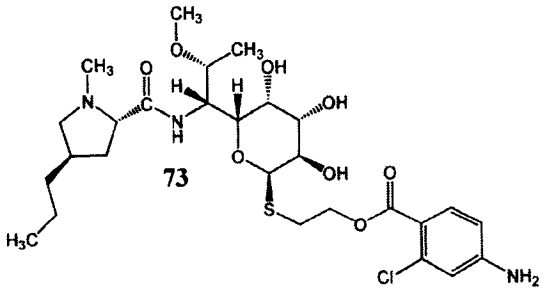
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

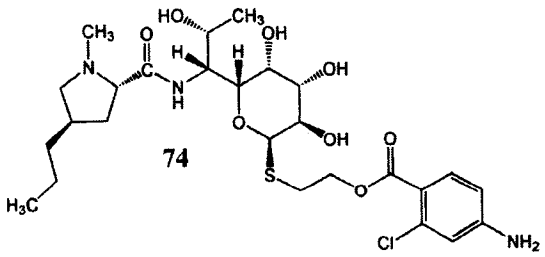
Příklad 21: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3; R21, R22, R24 jsou H; R23 NH_2; R25 je Cl

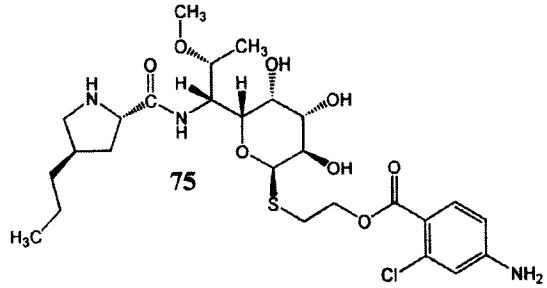
Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 4–amino–2–chlorobenzoová, 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 4–amino–2–chlorobenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

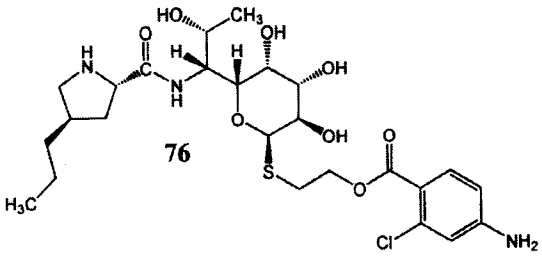
LC–MS analýza

Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 73–76 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 21.









Tabulka 21. Výsledky LC–MS analýzy látek 73–76

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované iony (*m/z*)
73	7,05	604.2460	604,2453	373,24; 126,13
74	5,83	590,2303	590,2281	359,22; 126,13
75	5,38	590,2303	590,2286	359,22
76	4,38	576,2146	576,2155	345,20

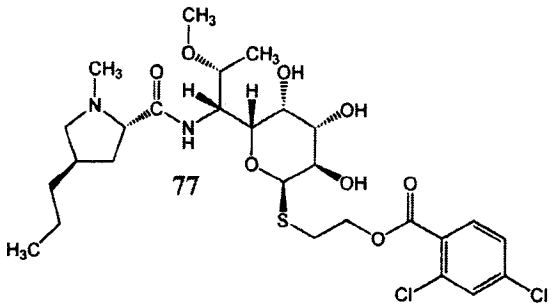
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

Příklad 22: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3; R21, R22, R24 jsou H; R23, R25 jsou Cl

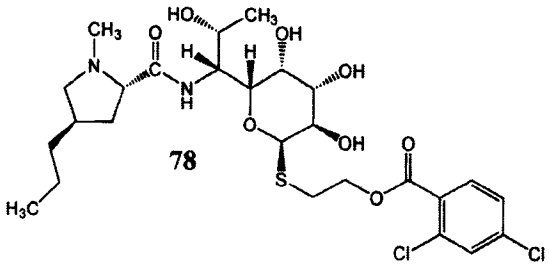
Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 2,4–dichlorobenzoová, 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 2,4–dichlorobenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

LC–MS analýza

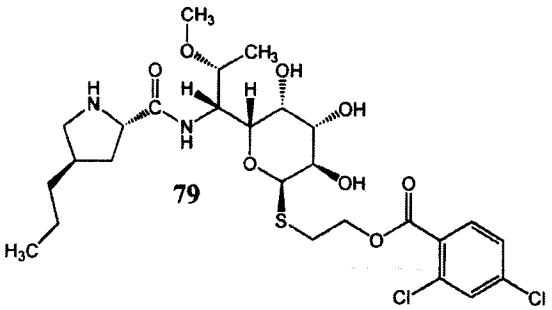
Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 77–80 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 22.



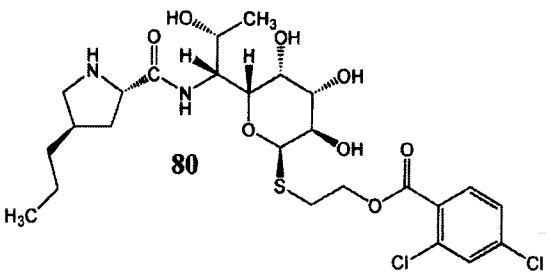
77



78



79



80

Tabulka 22. Výsledky LC–MS analýzy látek 77–80

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované iony (*m/z*)
77	9,78	623,1961	623.1944	373,24; 126,13
78	8,51	609,1804	609,1783	359,22; 126,13
79	8,37	609,1804	609,1724	359,22
80	6,48	595,1647	595,1632	345,20

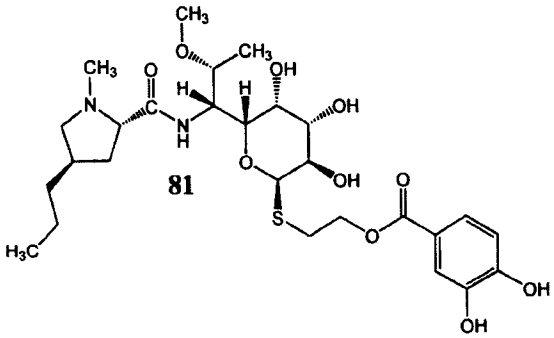
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

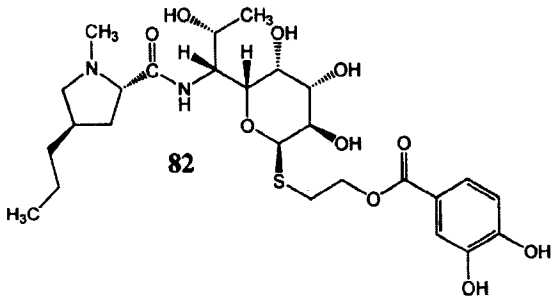
Příklad 23: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3; R21, R22, R25 jsou H; R23, R24 jsou OH

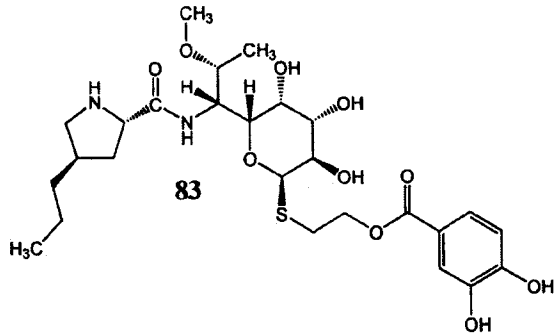
Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 3,4–dihydroxybenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 3,4–dihydroxybenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

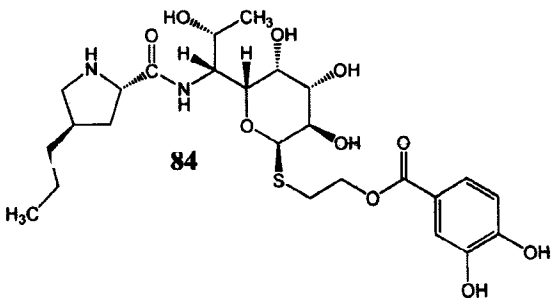
LC–MS analýza

Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 81–84 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 23.









Tabulka 23. Výsledky LC–MS analýzy látek 81–84

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované iony (*m/z*)
81	6,20	587,2639	587,2625	373,24; 126,13
82	5,00	573,2482	573,2493	359,22; 126,13
83	4,71	573,2482	573,2455	359,21
84	3,86	559,2325	559,2330	345,20

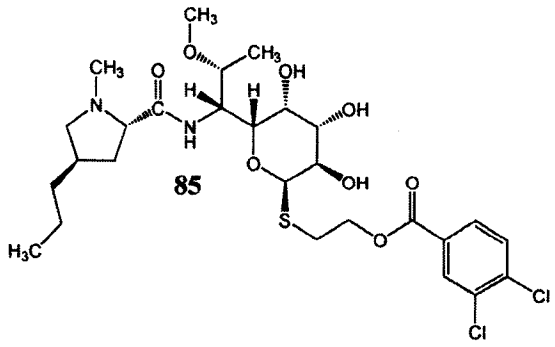
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

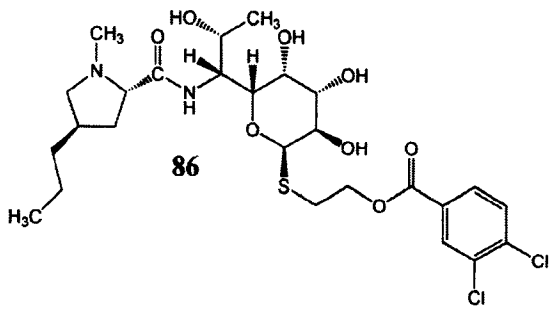
Příklad 24: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3; R21, R22, R25 jsou H; R23, R24 jsou Cl

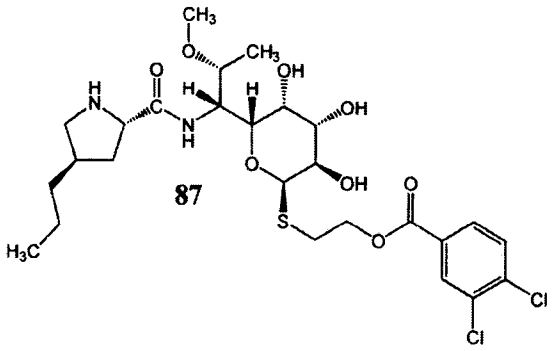
Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 3,4–dichlorobenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 3,4–dichlorobenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

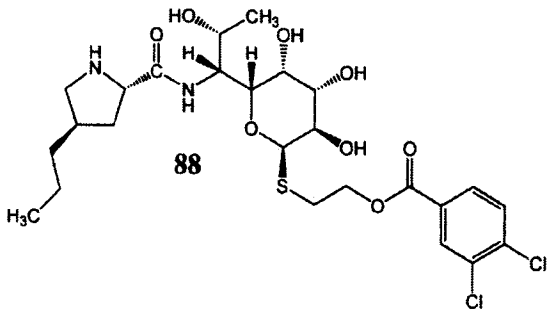
LC–MS analýza

Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 85–88 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 24.









Tabulka 24. Výsledky LC–MS analýzy látek 85–88

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované ionty (*m/z*)
85	10,09	623,1961	623,1955	373,24; 126,13
86	8,77	609,1804	609,1821	359,22; 126,13
87	8,35	609,1804	609,1766	359,21
88	6,77	595,1647	595,1626	345,20

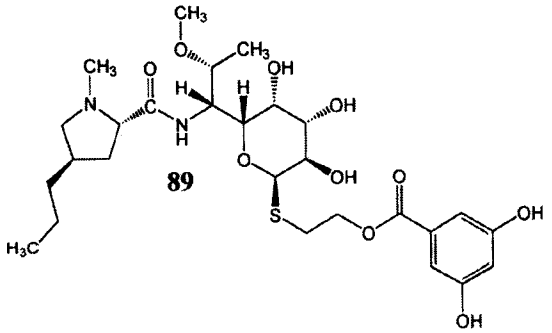
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

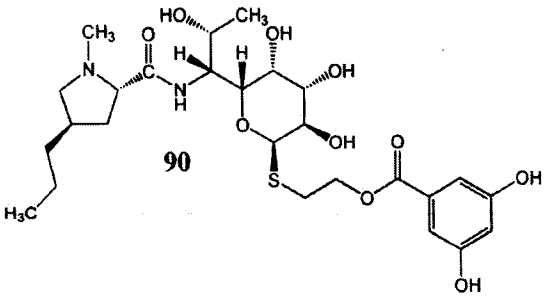
Příklad 25: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3; R21, R23, R25 jsou H; R22, R24 jsou OH

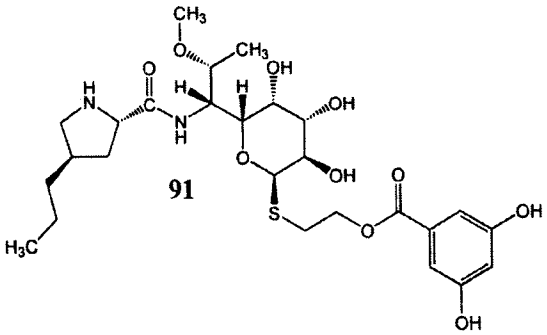
Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 3,5–dihydroxybenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 3,5–dihydroxybenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

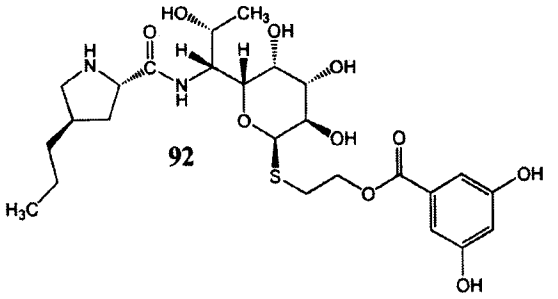
LC–MS analýza

Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 89–92 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 25.









Tabulka 25. Výsledky LC–MS analýzy látek 89–92

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované iony (*m/z*)
89	5,95	587,2639	587,2632	373,24; 126,13
90	4,94	573,2482	573,2468	359,22; 126,13
91	4,40	573,2482	573,2460	359,21
92	3,48	559,2325	559,2320	345,20

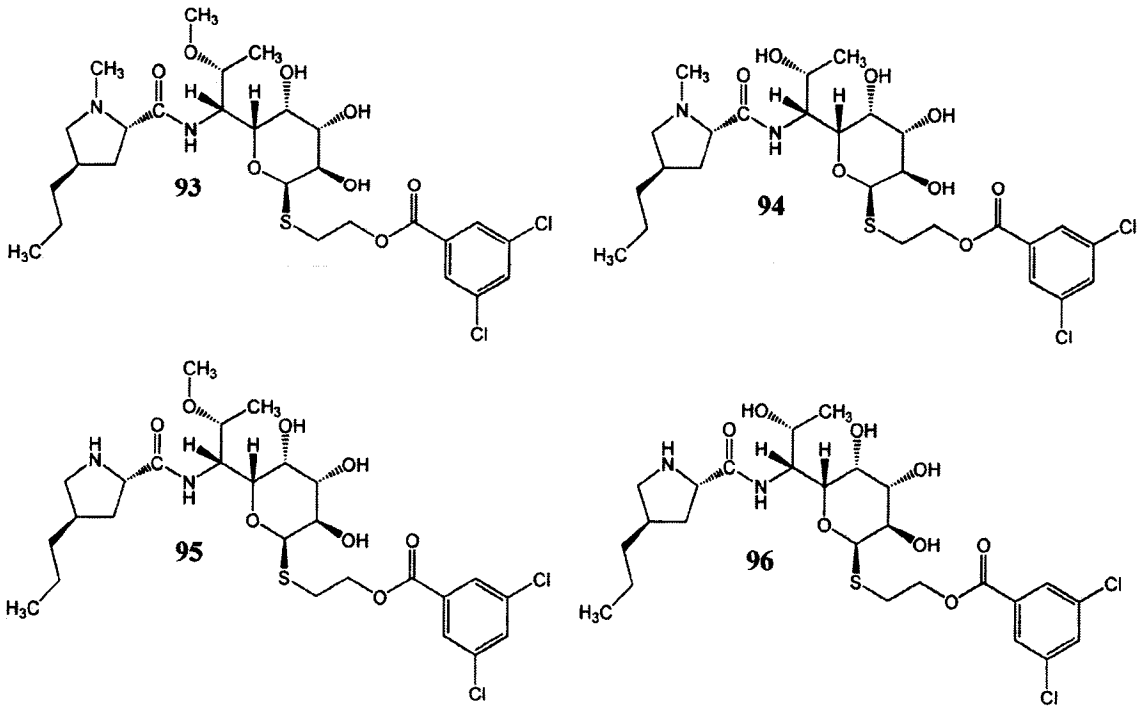
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

Příklad 26: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3; R21, R23, R25 jsou H; R22, R24 jsou Cl

Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 3,5–dichlorobenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 3,5–dichlorobenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

LC–MS analýza

Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 93–96 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 26.



Tabulka 26. Výsledky LC–MS analýzy látek 93–96

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované ióny (*m/z*)
93	10,37	623,1961	623,1967	373,24; 126,13
94	8,87	609,1804	609,1788	359,22; 126,13
95	8,10	609,1804	609,1755	359,22
96	6,80	595,1647	595,1620	345,20

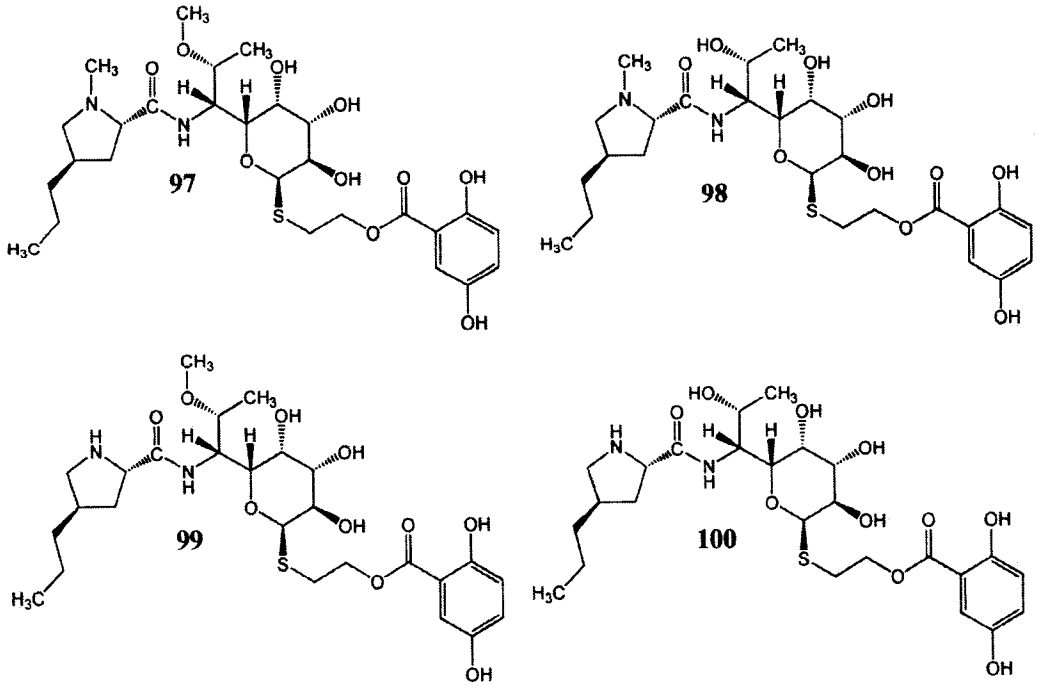
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

Příklad 27: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3; R22, R23, R25 jsou H; R21, R24 jsou OH

Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 2,5–dihydroxybenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM MgCl2, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 2,5–dihydroxybenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

LC–MS analýza

Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 97–100 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 27.



Tabulka 27. Výsledky LC–MS analýzy látek 93–96

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované iony (*m/z*)
97	7,46	587,2639	587,2649	373,24; 126,13
98	6,09	573,2482	573,2463	359,22; 126,13
99	6,18	573,2482	573,2466	359,22
100	4,32	559,2325	559,2320	345,20

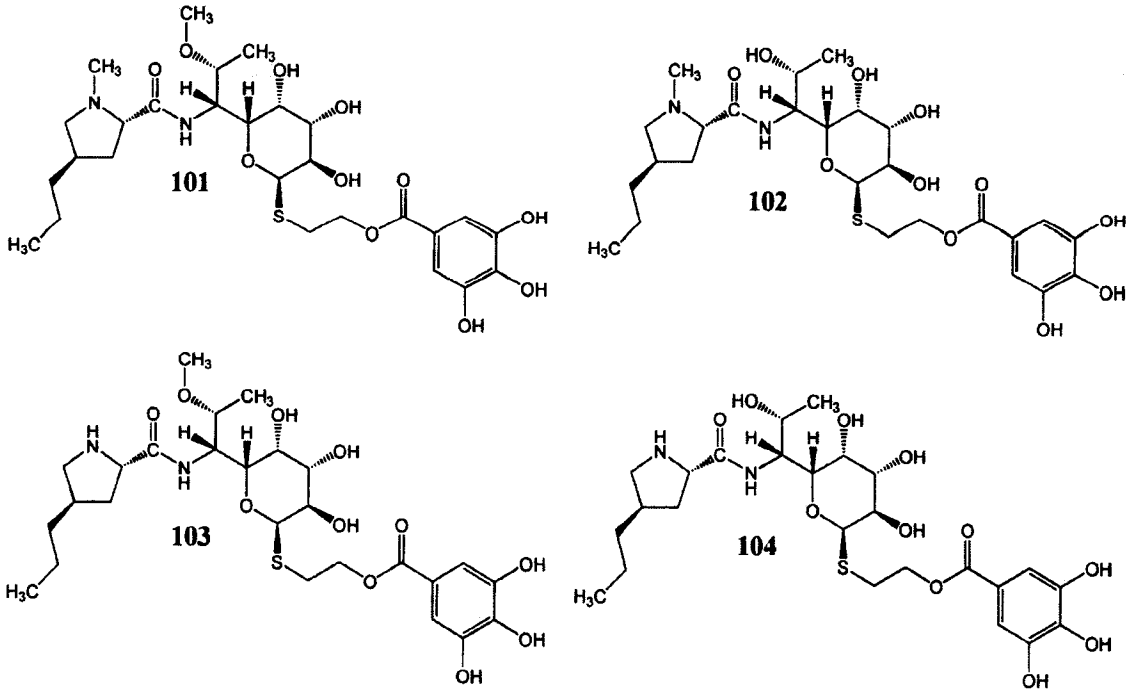
LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

Příklad 28: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3; R21, R25 jsou H; R22–R24 jsou OH

Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2 mM kyselina 3,4,5–trihydroxybenzoová), 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 2), obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II, v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Nový linkosamid s inkorporovanou kyselinou 3,4,5–trihydroxybenzoovou byl z reakční směsi izolován dle postupu uvedeného v příkladu 3.

LC–MS analýza

Celkem byly připraveny čtyři linkosamidy: látky 101–104 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 28.

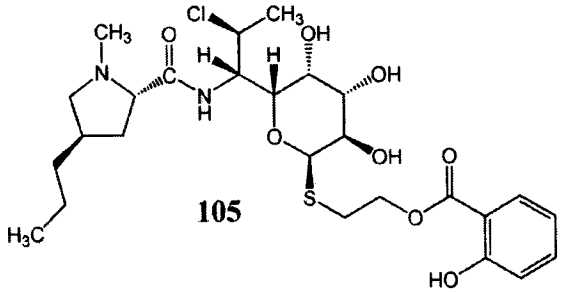


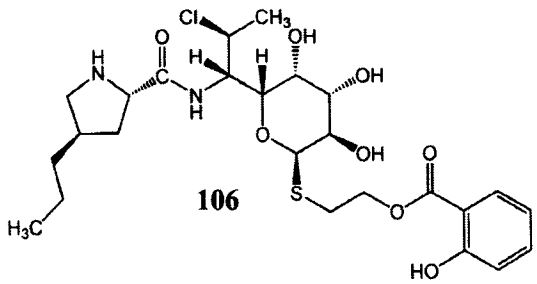
Tabulka 28. Výsledky LC–MS analýzy látek 101–104

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované iony (*m/z*)
101	4,65	603,2588	603,2582	373,24; 126,13
102	3,77	589,2431	589,2422	359,22; 126,13
103	4,76	589,2431	589,2427	359,21
104	3,08	575,2274	575,2269	345,20

LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

Příklad 29: Příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C3 alkyl, R3=Cl (*S* konfigurace), R4=H nebo CH_3; R21–24 jsou H, R25 je OH.





Příprava nových linkosamidů, kde R3=Cl vychází z těch linkosamidů připravených v příkladu 3, jejichž R3=OH (R konfigurace). Tyto jsou synteticky chlorovány následujícím postupem. K suspenzi *N*–chloromethylen)–*N*–methylmethaniminium chloridu (11 mmol) v dichlormethanu (3,5 ml) intenzivně míchané v inertní atmosféře (Ar) za chlazení externí lázní obsahující vodu a led byl přidán po částech během 15 min linkosamid (2 mmol) a 3–*terc*–butyl–4–hydroxy–5–methylfenyl sulfid (9 mg) za vzniku adičního produktu. Chlazení bylo odstaveno, reakční směs byla míchána 2 h při laboratorní teplotě a následně zahřívána na 60 °C po dobu 6 h, pak další 4 h na 68 °C. Následně byla reakční směs ochlazena k 0 °C a pomalu přikapávána do roztoku NaOH (0,66 g) ve směsi vody s ledem (6 g) chlazené externí lázní se směsí aceton/suchý led (–78 °C) tak, aby teplota reakční směsi nepřekročila 21 °C. Během přikapávání reakční směsi bylo pH udržováno kolem 6 případným přídavkem dalšího podílu vodného roztoku NaOH. Poté bylo pH směsi zvýšeno na 10,5 a mícháno 2 h, následně upraveno na pH = 7 a mícháno přes noc. Pak byla směs ochlazena k 0 °C vodou s ledem, pH bylo sníženo na 1,5 přídavkem HCl a extrahováno CH_2Cl_2 (5 x 5 ml). Každá z organických fází byla promyta 7,5 ml roztoku zředěné HCl (pH 1,5). Vodné fáze byly spojeny, alkalizovány zředěným roztokem NaOH na pH = 10,5 a extrahovány CH_2Cl_2 (5 x 5 ml). Každá organická fáze byla promyta 2 x 7,5 ml fosfátového pufru (0,5 M, pH = 6,2). Organické fáze byly spojeny, vysušeny bezvodým Na_2SO_4, přefiltrovány a zakoncentrovány. Získaný olej byl rozpuštěn v ethylacetátu (20 ml), odpařen na vakuové odparce a tato operace byla ještě jednou zopakována. Olej byl rozpuštěn v ethylacetátu a podroben odbarvování pomocí aktivního uhlí (50 mg) po dobu 30 min. Následně přefiltrováno přes Celit a zakoncentrováno na olej. Následně rozpuštěno v ethylacetátu (8 ml) a absolutním ethanolu (2 ml) a za intenzivního míchání přidávána koncentrovaná HCl do konečného pH = 0,5. Vzniklá suspenze byla míchána 1 h při laboratorní teplotě, poté 30 min při 0 °C. Krystaly byly odfiltrovány, promyty ethylacetátem (1 ml) a sušeny přes noc při 80 °C za vakua. Takto byl získán ethanolový solvát hydrochlorid linkosamidů vzorce I, kde R3=Cl (*S* konfigurace) v celkovém výtěžku kolem 80 %.

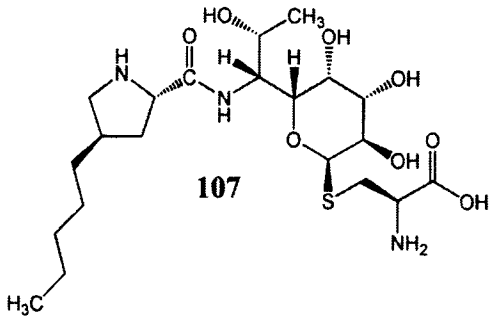
Příprava hydrochlorid hydrátu: Ethanolový solvát, připravený výše uvedeným postupem, je rozpuštěn ve vodě, odpařen na sirup, rozpuštěn v horkém acetonu, pak pomalu ochlazen na laboratorní teplotu po dobu 4 h. Následným ochlazením acetonového roztoku k 0 °C začnou vypadávat krystaly hydrochlorid hydrátu linkosamidů. Ty jsou po 30 min míchání při 0 °C odfiltrovány a vysušeny na vzduchu. Výtěžek se pohybuje kolem 90 %.

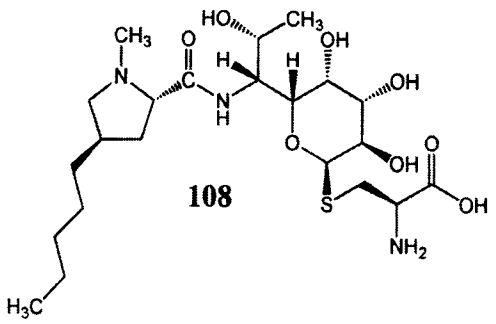
Příklad 30: Příprava prekurzoru vzorce III, kde R1 je C4–C6 alkyl, R3 je OH (*R* konfigurace), R4 je H nebo CH_3

Příprava je analogická postupu pro přípravu prekurzoru vzorce III, kde R1=C3 alkyl tak, jak je popsáno v příkladu 1 s tím rozdílem, že bakteriální kultura inkubována v médiu YEME je v časech kultivace 24h, 48h, a 72h obohacena o 50μl 200mM roztoku 4–butyl–L–prolinu (pro R1=C4 alkyl) nebo 4–pentyl–L–prolinu (pro R1=C5 alkyl) nebo 4–hexyl–L–prolinu (pro R1=C6 alkyl). Izolace prekurzoru vzorce III je pak provedena analogicky postupu uvedenému v příkladu 1.

LC–MS analýza

Byly připraveny dva prekurzory, látky 107, 108 s následujícími strukturami a LC–MS parametry uvedenými v tabulce 29.





Tabulka 29. Výsledky LC–MS analýzy látek 107, 108

Linkosamid	Retenční čas (min)	Pseudomolekulární ion - teoretická hodnota *m/z* pro *z*=1	Majoritní detekovaný ion v MS spektru (*m/z*)	Fragmentace ve zdroji – hlavní detekované iony (*m/z*)
107	4,21	494,2536	494,2499	373,23; 140,14
108	5,11	508,2693	508,2666	387,25; 154,16

LC–MS analýzy byly provedeny dle postupu popsaného v příkladu 3.

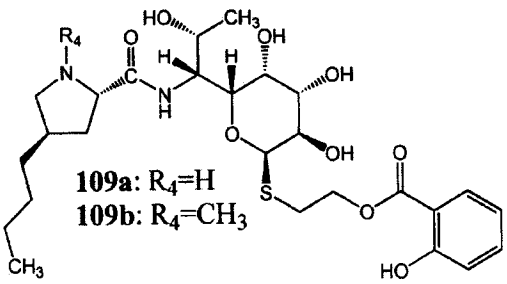
Příklad 31: Příprava prekurzoru vzorce II, kde R1 je C4–C6 alkyl, R3 je OH nebo OCH_3 (*R* konfigurace), R4 je H nebo CH_3

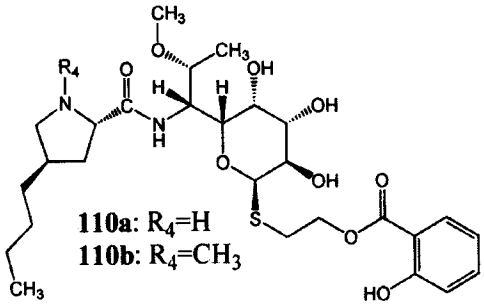
Reakční směs 1 obsahovala: 20 μM CcbF, 20 μM Ccb5, 200 μM linkosamidový prekurzor dle obecného vzorce III, kde R1 je C4–C6 alkyl, R3 je OH, R4 je H nebo CH_3 a R5 je H – příprava popsána v příkladu 31, 200 μM pyridoxal–5–fosfát, 100 mM Tris pH 7,5. V případě přípravy nových linkosamidových látek dle obecného vzorce II, kde R3=OCH_3, reakční směs navíc

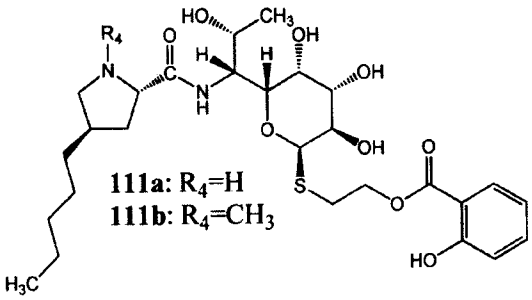
obsahovala 20 μM Ccb4 a 4 mM S–adenosylmethionin. Reakční směs 1 byla inkubována při 30 °C po dobu 2h. Příprava heterologních proteinů je popsána v příkladu 2.

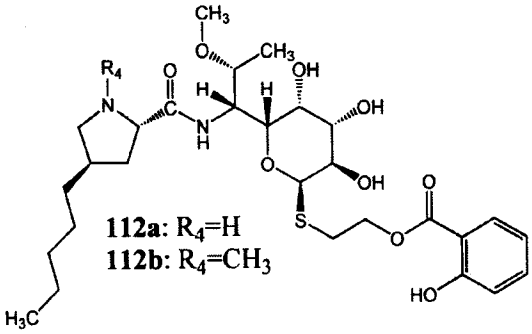
Příklad 32: In vitro enzymatická příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C4–C6 alkyl, R3=OH nebo OCH, (*R* konfigurace), R4=H nebo CH_3, R21–R24 jsou H a R25 je OH

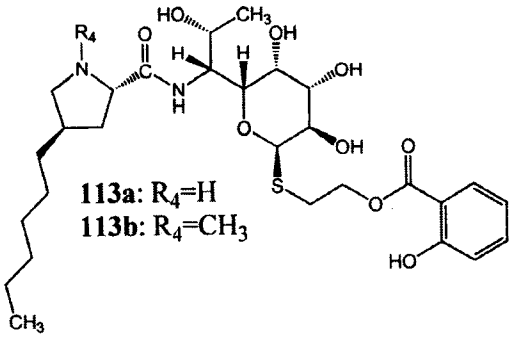
Reakční směs 2 obsahovala: 2 μM Ccb2, 2 μM Ccb1, 2mM kyselina salicylová, 4,5 mM adenosintrifosfát, 2 mM koenzym A, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 7,5. Reakční směs 2 byla inkubována při 30 °C po dobu 30 min. Poté byla reakční směs 2 smíchána s reakční směsí 1 (příprava dle příkladu 32) obsahující linkosamidový prekurzor dle vzorce II v poměru 1:1 a byla inkubována při 30 °C po dobu dalších 2h. Izolace linkosamidů byla provedena stejně, jak je popsáno v příkladu 3.

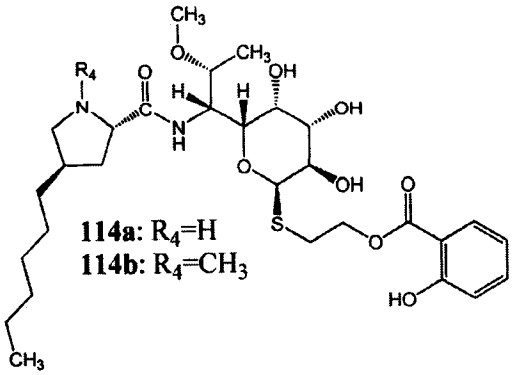




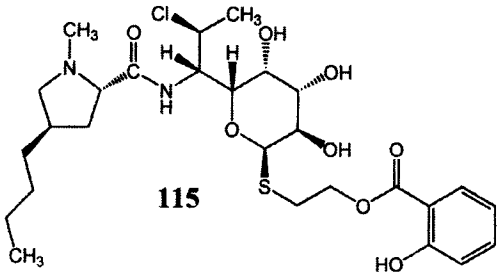




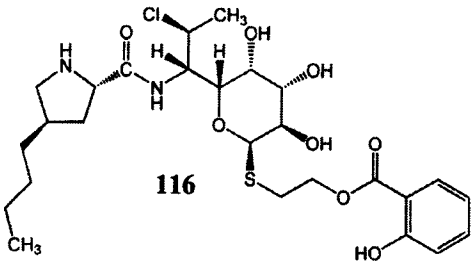




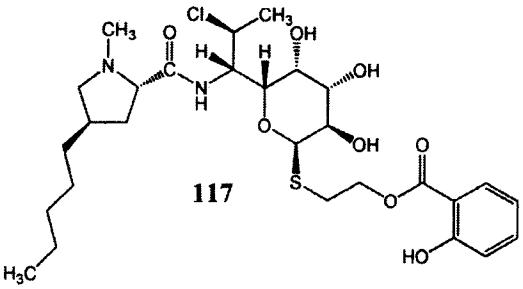
Příklad 33: Příprava nových linkosamidových látek vzorce I, kde R1=C4–C6 alkyl, R3=Cl (*S* konfigurace), R4=H nebo CH_3, R21–R24 jsou H a R25 je OH



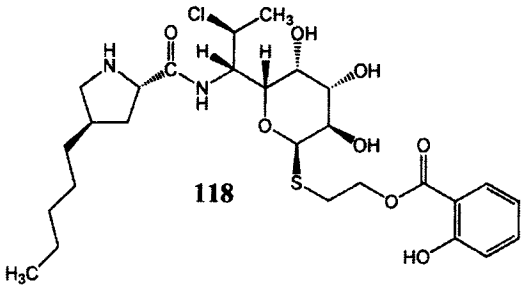
115



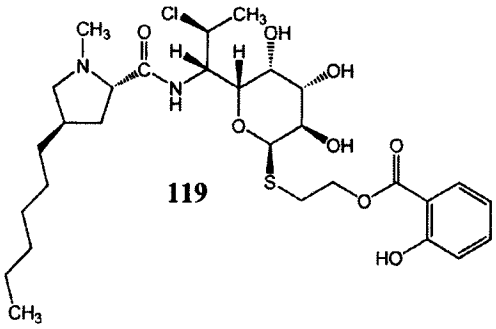
116



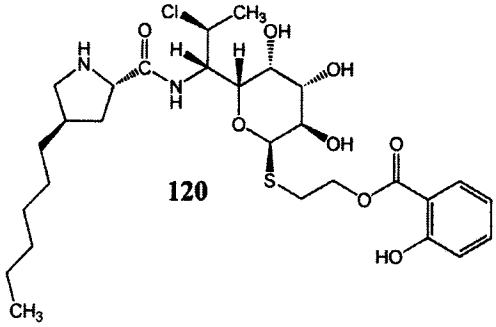
117



118



119

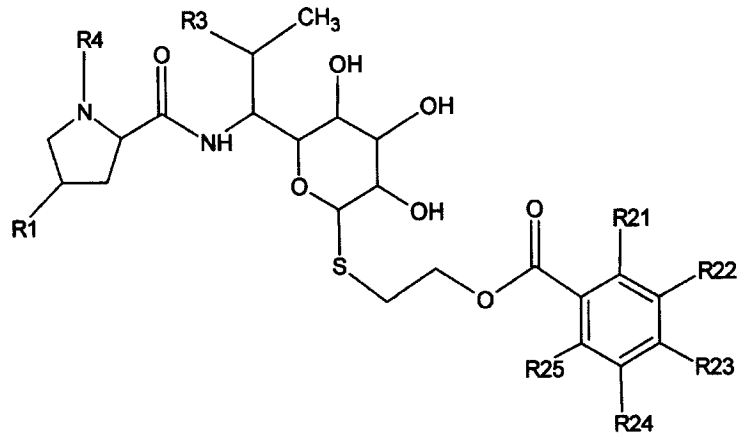


120

Příprava nových linkosamidů, kde R1=C4–C6 alkyl, R3=Cl vychází z těch linkosamidů připravených v příkladu 32, jejichž R3=OH (*R* konfigurace). Tyto jsou synteticky chlorovány stejným chloračním postupem jako je uvedeno v příkladu 29.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Linkosamidy obecného vzorce I



(I),

kde

R1 je vybrán z C2–C8 alkyl nebo C2–C8 alkenyl;

R3 je vybrán z OH, O(C1–C4 alkyl), SH, S(C1–C4 alkyl) nebo halogen;

R4 je H nebo C1–C3 alkyl;

každý z R21, R22, R23, R24, R25 je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující H, OH, C1–C4 alkyl, C1–C4 alkenyl, C1–C4 alkynyl, halogen, O(C1–C4 alkyl), O(C1–C4 alkenyl), O(C1–C4 alkynyl), NH_2, N(C1–C4 alkyl)$_2$, N(C1–C4 alkenyl)$_2$, N(C1–C4 alkynyl)$_2$;

a jejich farmaceuticky přijatelné soli.

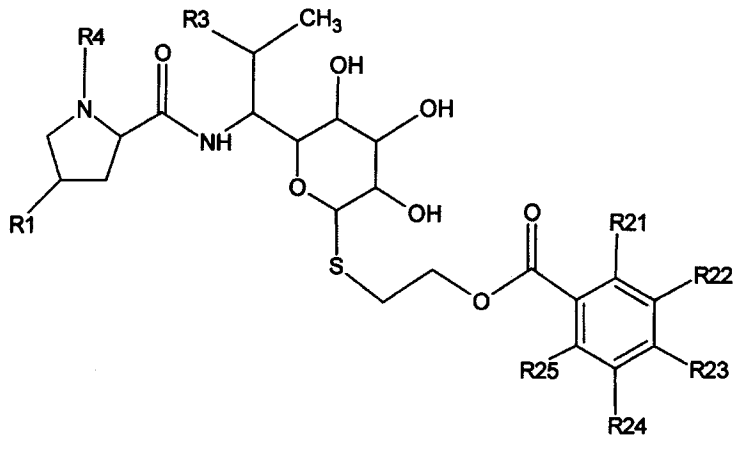
2. Linkosamidy podle nároku 1, kde R1 je C3–C6 alkyl, s výhodou vybraný z propyl, butyl, pentyl, hexyl.

3. Linkosamidy podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, kde R3 je OH, OCH_3, OCH_2CH_3 nebo Cl.

4. Linkosamidy podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, kde R4 je H nebo CH_3.

5. Linkosamidy podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, kde každý z R21, R22, R23, R24, R25 je s výhodou nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující H, OH, CH_3, CH_2CH_3, Cl, Br, I, OCH_3, OCH_2CH_3, NH_2.

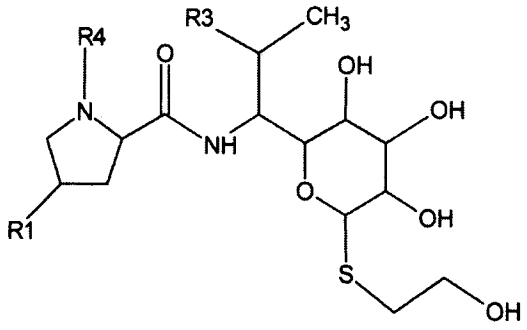
6. Linkosamidy podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, kde má obecný vzorec I konfiguraci na chirálních centrech uvedenou níže:



(I),

přičemž R1 a R3 mohou mít konfigurace *R* i *S*; s výhodou má chirální centrum nesoucí skupinou R1 konfiguraci *R*; výhodněji má chirální centrum se skupinou R3 konfiguraci *R*, pokud R3=OH, OCH_3, OCH_2CH_3, a konfiguraci *S*, pokud R3=halogen.

7. Způsob přípravy látek obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, **vyznačený tím**, že zahrnuje krok enzymaticky katalyzované aktivace derivátu kyseliny benzoové substituované substituenty R21, R22, R23, R24, R25 navázáním koenzymu A a krok enzymaticky katalyzované esterifikace prekurzoru vzorce II

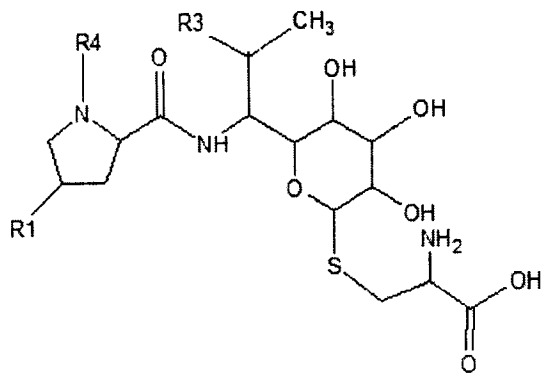


(II)

konjugátem derivátu kyseliny benzoové substituované substituenty R21, R22, R23, R24, R25 a koenzymu A, přičemž ve vzorci II jsou substituenty R1, R3, R4, jak je uvedeno pro vzorec I.

8. Způsob podle nároku 7, **vyznačený tím**, že jako enzym pro enzymaticky katalyzovanou aktivaci derivátu kyseliny benzoové substituované substituenty R21, R22, R23, R24, R25 navázáním koenzymu A se použije protein obsahující celesticetinový biosyntetický protein Ccb2, nebo obsahující Ccb2–podobný protein s alespoň 95% identitou s aminokyselinovou sekvencí Ccb2, a/nebo jako enzym pro esterifikaci prekurzoru vzorce II se použije protein obsahující celesticetinový biosyntetický protein Ccb1, nebo obsahující Ccb1–podobný protein s alespoň 95% identitou s aminokyselinovou sekvencí Ccb1.

9. Způsob podle nároku 7 nebo 8, kde se prekurzor podle obecného vzorce II získá enzymatickou transformací prekurzoru podle obecného vzorce III



(III)

působením celesticetinových biosyntetických proteinů CcbF, Ccb5, a popřípadě Ccb4, nebo proteinů s alespoň 95% identitou s CcbF, Ccb5, a popřípadě Ccb4, přičemž ve vzorci III jsou substituenty R1, R3, R4, jak je uvedeno pro vzorec I.

10. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 7 až 9, **vyznačený tím**, že se enzymaticky katalyzovaná aktivace derivátu kyseliny benzoové substituované substituenty R21, R22, R23, R24, R25 navázáním koenzymu A a/nebo enzymaticky katalyzovaná esterifikace prekurzoru vzorce II konjugátem derivátu kyseliny benzoové substituované substituenty R21, R22, R23, R24, R25 a koenzymu A provádějí biosynteticky s použitím mikroorganismu nesoucího kódující sekvence celesticetinových biosyntetických proteinů Ccb1 a/nebo Ccb2, nebo biosyntetických proteinů majících alespoň 95% identitu aminokyselinové sekvence s Ccb1 a/nebo Ccb2, přičemž mikroorganismem je s výhodou mikroorganismus třídy Actinobacteria, výhodněji rodu *Streptomyces.*

11. Způsob podle nároku 10, **vyznačený tím**, že mikroorganismus dále nese kódující sekvence celesticetinových biosyntetických proteinů Ccb5, CcbF, a popřípadě Ccb4 nebo biosyntetických proteinů majících alespoň 95% identitu s Ccb5, CcbF, a popřípadě Ccb4, a postup vychází z prekurzoru vzorce III.

12. Způsob podle nároku 11, **vyznačený tím**, že mikroorganismus dále nese i kódující sekvence příslušných linkomycinových a/nebo celesticetinových biosyntetických proteinů, v kombinaci nezbytných pro biosyntézu prekurzoru vzorce III v buňce.

13. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 10 až 12, **vyznačený tím**, že biosynteticky získaná látka obecného vzorce I je dále podrobena syntetické modifikaci, s výhodou chloraci v poloze 7 cukerného zbytku.

14. Linkosamidy obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 pro použití jako léčiva, zejména jako antimikrobiální léčiva.

15. Linkosamidy obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 pro použití při inhibici nebo zabíjení bakterií a jednobuněčných eukaryotických parazitických mikroorganismů, zejména Gram–pozitivních bakterií a parazitů kmene Apicomplexa obsahujících cílové organely, apikoplasty, zejména organismů rodu *Plasmodium, Toxoplasma, Babesia, Theileria* a třídy *Coccidia.*

Konec dokumentu