

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2002-1891**
(22) Přihlášeno: **25.11.2000**
(30) Právo přednosti: **08.12.1999 EP 1999/99124456**
(40) Zveřejněno: **14.08.2002**
(Věstník č. 08/2002)
(47) Uděleno: **12.10.04**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **15.12.2004**
(Věstník č. 12/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/EP2000/011752**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2001/042210**

(13) Druh dokumentu:

B6

(51) Int. Cl. : ⁷

C 07 D 207/44
C 12 P 17/10
A 61 K 31/4015
A 61 P 31/04

(73) Majitel patentu:

AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH,
Frankfurt am Main, DE

(72) Původce:

Hopmann Cordula, Frankfurt am Main, DE
Kurz Michael, Hofheim, DE
Decker Heinrich, Bremtal, DE
Le Beller Dominique, Jaux, FR
Aszodi Jozsef, Pontault Combault, FR

(74) Zástupce:

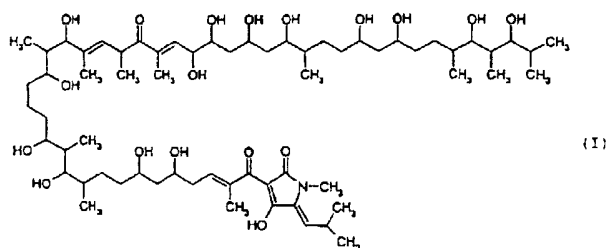
Ing. Jan Kubát, Přístavní 24, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu:

**Amycomycin, způsob jeho přípravy a
farmaceutické prostředky, které ho obsahují**

(57) Anotace:

Sloučenina nazvaná amycomycin, vzorce I, a její farmaceuticky přijatelné soli, estery a ethery, ve všech jejich stereoizomerních a tautomerních formách, kterou lze získat kultivací mikroorganismu Amycolatopsis sp., ST101170 (DSM 12216), a lze ji použít jako léčivo, zejména jako antibiotikum.



Amycomycin, způsob jeho přípravy a farmaceutické prostředky, které ho obsahují

Oblast techniky

5

Předkládaný vynález se týká sloučeniny nazvané amycomycin, kterou lze získat kultivací mikroorganismu *Amycolatopsis* sp., ST101170 (DSM 12216), a jejích farmaceuticky přijatelných solí a derivátů. Dále se předkládaný vynález týká způsobu přípravy amycomycinu, použití amycomycinu a jeho farmaceuticky přijatelných solí a derivátů jako léčiv, zejména jejich použití jako antibiotik, a farmaceutických kompozic obsahujících amycomycin nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl nebo derivát.

10

Dosavadní stav techniky

15

O infekcích způsobených kmeny *Staphylococcus aureus* rezistentními vůči methicillinu je známo, že jsou u určitých stavů, jako např. ran a popálení, převládající. Vancomycin a teicoplanin, které náleží ke glykopeptidové skupině antibiotik, jsou jedinými dvěma antibiotiky kliniky používanými k léčení infekcí způsobených kmeny *Staphylococcus aureus* rezistentními vůči methicillinu. Vzhledem k tomu, že se v nedávné době objevily kmeny rezistentní vůči vancomycinu a kmeny rezistentní vůči teicoplaninu, jsou tyto infekce považovány za nebezpečné a fatální. Proto započalo intenzivní hledání strukturálně odlišné skupiny sloučenin účinných proti těmto kmenům rezistentním vůči vancomycinu a teicoplaninu. Dříve byl, jako antibiotikum účinné proti kmenům rezistentním vůči vancomycinu a teicoplaninu, popsán například cyklických thiopeptid methylsulfomycin I (EP-A-0818539 ze dne 11. července 1996).

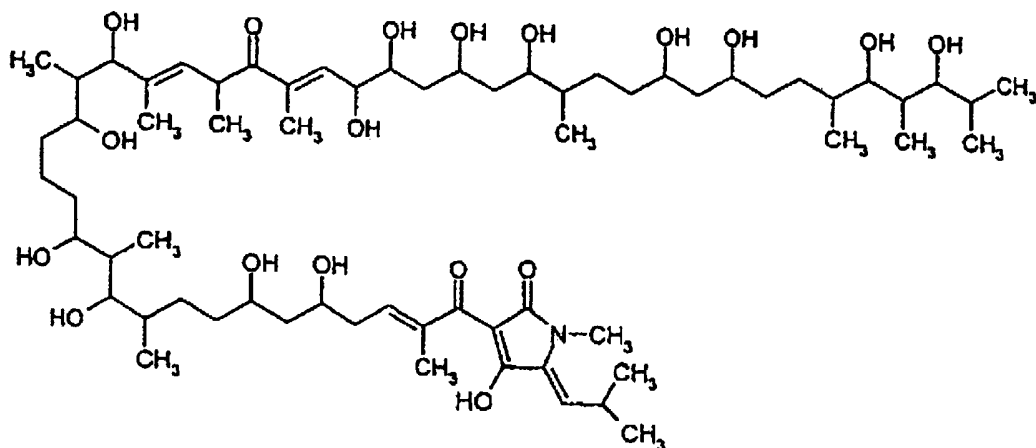
20

25

Podstata vynálezu

30

Nyní bylo zjištěno, že nová sloučenina nazvaná amycomycin má antibiotickou účinnost. Předkládaný vynález se proto týká sloučeniny vzorce:



a jejích farmaceuticky přijatelných solí a derivátů, jako jsou estery, ethery, včetně všech stereoizomerních forem a všech tautomerních forem.

35

Amycomycin obsahuje charakteristický zbytek kyseliny tetramové s vysoce oxygenovaným bočním řetězcem, obsahujícím 45 uhlíkových atomů. Její molekulový vzorec je $C_{65}H_{115}NO_{18}$, a lze ji získat kultivací mikroorganismu *Amycolatopsis* species ST101170 (DSM 12216) za aerobních podmínek v živném prostředí, obsahujícím zdroje uhlíku a dusíku, následované izolací a purifikací známými způsoby. Mikroorganismus ST101170 patří do řádu Actinomycetales, rodu Amyco-

40

latopsis a byl uložen 4. června 1998 v Německé sbírce mikroorganismů a buněčných kultur (DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Branschweig, Německo a bylo mu přiděleno číslo DSM č. 12216.

5 Předkládaný vynález dále poskytuje způsob přípravy sloučeniny nazvané amycomycin pomocí kultivace mikroorganismu amycolatopsis species ST101170, jeho mutací a variací, za aerobních podmínek v živném prostředí, obsahujícím jeden nebo více zdrojů uhlíku a jeden nebo více zdrojů dusíku a popřípadě živné anorganické soli nebo/a stopové prvky, následné izolace uvedené sloučeniny a purifikace obvyklými způsoby.

10 Mutace a variace mikroorganismu ST101170 mohou být také schopné syntetizovat sloučeninu podle předkládaného vynálezu. Tyto mutace lze vytvořit známými způsoby pomocí fyzikálních prostředků, například záření, jako jsou ultrafialové záření a paprsky X, nebo pomocí chemických mutagenů, jako jsou ethylmethylansulfonát (EMS), 2-hydroxy-4-methoxy-benzofenon (MOB),
15 nebo N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG).

Vyhledávání vhodných mutací a variací, které mohou vytvořit sloučeninu podle předkládaného vynálezu, lze provádět pomocí stanovování biologické účinnosti účinných sloučenin hromadících se v kultivačním bujónu, například pomocí testované antibakteriálního účinku, zejména proti
20 kmenům rezistentním vůči vancomycinu (viz. tabulka 2 níže).

Výhodnými zdroji uhlíku vhodnými pro aerobní fermentaci jsou asimilovatelné uhlovodíky a cukerné alkoholy, jako jsou glukóza, laktóza nebo D-Mannit, a rovněž tak přírodní produkty obsahující uhlovodíky, jako je sladový výtažek. Vhodnými zdroji dusíku jsou například aminokyseliny, peptidy a proteiny, což zahrnuje i jejich degradační produkty, jako jsou peptony a tryptony, masový výtažek, mletá semena, například kukuřice, bílé fazole, sóji nebo bavlíku, destilační zbytky z výroby alkoholu, masná moučka a kvasnicové extrakty, avšak také amoniové soli a nitráty. Vhodnými anorganickými solemi, které může živný roztok obsahovat, jsou například chloridy, uhličitany, sírany a fosforečnany alkalických kovů nebo kovů alkalických zemin, iontů zinku,
30 kobaltu nebo hořčíku.

Tvorba amycomycinu probíhá obzvláště dobře například v živném prostředí, obsahujícím přibližně 0,5 až 5 % škrobu (rozpustného), výhodně 1 a 2 %, přibližně 0,5 až 5 % glukózy, výhodně 1 až 3 %, přibližně 0,5 až 5 % glycerinu, výhodně 1 až 2 %, přibližně 0,1 až 0,5 % kukuřičného výluhu, výhodně 0,2 až 0,3 %, přibližně 0,2 až 1 % pentonu, výhodně 0,4 až 0,6 %, přibližně 0,1 až 0,5 % kvasnicového extraktu, výhodně 0,2 až 0,4 %, přibližně 0,05 až 0,2 % chloridu sodného, výhodně 0,1 % až 0,2 % a přibližně 0,1 až 0,5 % uhličitanu vápenatého, výhodně 0,2 až 0,3 %. Tato množství jsou hmotnostní a jsou vztažena k celému živnému prostředí.

40 Kultivace ST101170 se provádí za aerobních podmínek, například submerzně pomocí protřepávání nebo míchání v protřepávacích nádobách nebo laboratorních fermentačních nádobách, popřípadě se zavedením vzduchu nebo kyslíku. Kultivaci pomocí fermentace lze provádět například ve sterilních lahvích se širokým hrdlem nebo nádobách s kruhovým dnem rozličných objemů, ve skleněných fermentačních nádobách nebo V₂A-ocelových nádržích.

45 Kultivace ST101170 lze provádět při teplotách, které se pohybují přibližně mezi 20 a 35 °C, výhodně mezi přibližně 25 a přibližně 30 °C, a pH pohybujícím se mezi 4 a 10, výhodně mezi 6 a 8. Za těchto podmínek se mikroorganismy kultivují obvykle po dobu 20 až 200 hodin, výhodně 24 až 150 hodin.

50 Kultivace se výhodně provádí v několika stupních. Nejprve lze připravit jednu nebo více předkultur v kapalném živném prostředí. Hlavní kultura, tj. aktuální produkční prostředí se poté inokuluje předkulturou například v objemovém poměru činícím 1:10. Předkultura se získá například inokulací živného prostředí sporifikovaným myceliem a kultivace po dobu přibližně 20 až 120 hodin, výhodně 24 až 90 hodin. Sporifikované mycelium lze získat například růstem mikroorga-
55

nismů po dobu přibližně 1 až 40 dní, výhodně 5 až 12 dní, na pevném či kapalném živném prostředí jako je kvasnico–sladový agar nebo bramboro–dextrózový agar.

- 5 Průběh fermentace a tvorbu amycomycinu lze monitorovat způsoby odborníky známými, jako například pomocí měření biologické aktivity kultivačního bujónu v bioanalýzách nebo pomocí chromatografických metod, jako jsou tenkovrstevná chromatografie (DC) nebo vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC).

- 10 Sloučenina zvaná amycomycin je přítomna v kultivačním filtrátu a rovněž tak v myceliu. Obvykle je však významné množství obsaženo v myceliu. Sloučeninu lze izolovat pomocí známých separačních technik. Z kultivačního filtrátu ji lze tedy získat například filtrací nebo odstředováním. Filtrát lze získat pomocí rozpouštědla nemísitelného s vodou, jako jsou 1–butanol, ethylacetát, chloroform, dichlormethan apod., výhodně butanol nebo ethylacetát.

- 15 Účinnou látku lze také získat z mycelia pomocí extrakce rozpouštědlem mísitelným s vodou, jako jsou methanol, aceton, acetonitril, n–propanol nebo izopropanol, výhodně methanol nebo aceton, nebo rozpouštědlem nemísitelným s vodou, jako jsou t–butanol, ethylacetát, chloroform, dichlormethanol apod., výhodně butanol nebo ethylacetát.

- 20 Extrakci kultivačního filtrátu lze provádět v širokém rozmezí pH. Je však výhodné extrakci provádět v neutrálním nebo v lehce kyselém prostředí, výhodně při pH pohybujícím se mezi 4 a 9. Organický extrakt lze koncentrovat ve vakuu a sušit za vzniku účinné surové látky.

- 25 Izolaci a purifikaci sloučeniny zvané amycomycin lze provádět známými způsoby, které berou v úvahu chemické, fyzikální a biologické vlastnosti přírodní sloučeniny.

Jednou z metod izolace amycomycinu podle vynálezu je dělení roztoku způsoby o sobě známými.

- 30 Jinou metodou purifikace amycomycinu je chromatografie na adsorpčních pryskyřicích, jako Diaion® HP–20 (Mitsubishi Casei Corp. Tokyo), na Amberlite® XAD 7 (Rohm and Haas, USA), on Amberchrom® CG (Toso Haas, Philadelphia, USA) nebo na podobných pryskyřicích. Separaci lze provádět v širokém rozmezí pH. Výhodně toto rozmezí pH činí 1 až 9, výhodněji činí 2 až 8. Vhodné jsou též četné nosiče pro chromatografii s reverzní fází, například RP₈ a RP₁₈, které byly publikovány ve spojení s vysokotlakou kapalinovou chromatografií (HPLC). Další z možností purifikace sloučeniny podle vynálezu spočívá v použití tzv. nosičů pro chromatografii s normální fází, jako jsou silikagel nebo Al₂O₃ (oxid hlinitý) či jiné, způsoby o sobě známými. K tomuto účelu jsou vhodné mnohé eluenty, jako jsou dichlormethan, chloroform, methanol, ethylacetát, aceton, petrolether nebo jejich kombinace. Hodnotu pH lze upravovat například přidáním triethylaminu.

- 45 Alternativním způsobem izolace sloučeniny zvané amycomycin je použití molekulárních sít, jako jsou Fractogel® TSK HW–40, Sephadex® LH–20 a jiné, způsoby o sobě známými. Dále je také možné získat sloučeninu zvanou amycomycin ze surového materiálu krystalizací. K tomu jsou vhodné například organická rozpouštědla a jejich směsi, bezvodá nebo s přídavkem vody.

- 50 Další způsob izolace a purifikace sloučeniny podle předkládaného vynálezu spočívá v použití aniontových měničů, výhodně v rozmezí pH činicích 7 až 10, a kationtových měničů, výhodně v rozmezí pH činicím od 3 do 7. Obzvláště vhodné k tomuto účelu je použití pufovacích roztoků, k nimž se přidá určité množství organického rozpouštědla.

- 55 Dalším možným způsobem purifikace je protisměrná chromatografie s použitím dvoufázových eluačních systémů, zhotovených ze dvou nebo více rozpouštědel, jako jsou voda, methanol, ethanol, butanol, izopropanol, aceton, dichlormethan, ethylacetát nebo petrolether.

Sloučeninu zvanou amycomycin nebo její chemické deriváty lze přeměnit na odpovídající farmakologicky přijatelné soli způsobem odborníkovi v oboru známými.

5 Farmakologicky přijatelnými solemi sloučenin podle vynálezu jsou anorganické soli nebo organické soli, jako například ty popsané v Remington's Pharmaceutical Sciences (17. vydání, str., 1418, 1985). Možnými solemi jsou soli alkalických kovů, amoniové soli, soli kovů alkalických zemin, soli s fyziologicky přijatelnými aminy a soli s anorganickými a organickými kyselinami, jako jsou kyselina chlorovodíková, kyselina bromovodíková, kyselina sírová, kyselina maleinová a kyselina fumarová.

10 Odvoditelnými chemickými ekvivalenty sloučenin podle předkládaného vynálezu jsou sloučeniny s drobnými chemickými odlišnostmi, které však mají vhodné nebo podobné účinky, nebo sloučeniny, které lze lehce přeměnit na sloučeniny podle vynálezu. Příklady odvoditelných ekvivalentů jsou estery, ethery, aminoderiváty, komplexy nebo adukty sloučenin podle vynálezu nebo se sloučeninami podle vynálezu.

20 Ethery lze připravit například reakcí amycomycinu s karboxylovými kyselinami v přítomnosti činidel, jako je dicyklohexylkarbodiimid (DCC), nebo podrobením této sloučeniny působení acylačního činidla, jako je chlorid kyseliny.

Ethery lze z amycomycinu připravit například reakcí s alkylačními činidly za bazických podmínek.

25 Další způsoby přípravy esterů a etherů jsou popsány v literatuře, například v Advanced Organic Synthesis, 4. vydání. J. March, John Wiley & Sons., 1992.

30 Chemickými ekvivalenty mohou být stabilní komplexy s ionty kovů, např. přechodných kovů jako jsou La^{3+} , Sm^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , které jsou typické pro deriváty kyseliny tetramové a lze je připravit způsoby popsanými v literatuře (K. Tanaka a kol., Chem. Pharm. Bull, 1979, 27, 1901, K. Matsuo, Chem. Pharm. Bull. 1980, 28, 2494).

35 Dvojně vazby bočních alkylových řetězců lze redukovat způsoby, které jsou popsány v literatuře, například v P.N. Rylander, „Hydrogenation Methods“, Academic Press, New York, 1985, kapitola 2, nebo je lze hydrohalogenovat způsoby popsanými v H. O. House, „Modern Synthetic Reactions“, W.A. Benjymin, Inc., New York, 1972, str. 446 až 452. Hydroxylované deriváty lze připravovat reakcí dvojných vazeb s činidly jako je OsO_4 , jak je popsáno v literatuře, např. v Chem. Rev. 1980, 80, 187.

40 Deriváty lze vytvořit také konverzí dvojných vazeb na epoxidy pomocí oxidace, např. m-chlorperoxybenzoovou kyselinou (MCPBA), jak je popsáno v Advanced Organic Synthesis, 4. vydání. J. March, John & Sons., 1992.

45 Fyzikálně-chemické a rovněž tak spektroskopické charakteristiky sloučeniny zvané amycomycin podle předkládaného vynálezu jsou následující:

Vzhled: bezbarvá pevná látka, rozpustná v methanolu, dimethylsulfoxidu (DMSO), pyridinu.

Molekulový vzorec: $\text{C}_{65}\text{H}_{115}\text{NO}_{18}$.

50 HPLC (vysokotlaká kapalinová chromatografie):

Sloupec: Purospher Star RP.18e (Merck), 55x4 mm, 3 μm .

Eluent: $\text{CH}_3\text{CN}/0,01\% \text{ H}_3\text{PO}_4$ (85%).

Gradient:

	Čas (min)	% CH ₃ Cn
5	0,00	5,0
	3,00	95,0
	5,00	95,0
	6,00	5,0
10	10,00	5,0

Tok: 2 ml/min

Teplota: 40 °C

Detekce: 210 nm, 254, 280, 320, 380.

t_R: 2,67 min.

Molekulová hmotnost: 1198,64.

Hmotová spektrometrie (HR-FAB-MS): 1220, 801187 [M+Na]⁺ ¹H- a ¹³C-NMR: viz tabulka 1

UV/VIS (viditelné světlo):

methanol (MeOH), max(log) = 229 nm (3,29), 281 (3,16).

Tabulka 1

Chemický posun amycomycinu v deuteromethanolu (MeOD) při 300 K

	¹ H	¹³ C
1	0,86	14,76
2	0,97	20,83
3	1,89	31,20
4	3,41	82,20
5	1,70	39,55
6	0,77	13,63
7	3,54	80,19
8	1,65	36,32
9	0,86	12,71
10	1,43	31,20
11	1,44	36,46
12	3,75	71,98
13	1,62/1,54	44,79
14	3,74	72,22
15	1,58/1,37	36,46
16	1,63/1,14	29,27
17	1,51	40,69
18	0,90	15,70
19	3,70	72,90
27	1,51/1,46	42,12
28	4,07	66,31
29	1,52	42,12
30	3,80	72,54
31	4,33	73,26
32	6,62	142,18

33	–	138,47
34	1,83	12,75
35	–	206,04
36	4,21	41,00
37	1,14	17,77
38	5,36	128,37
39	–	138,72
40	1,69	12,75
41	3,98	80,54
42	1,64	41,25
43	0,88	8,02
44	3,59	73,88
45	1,49	36,46
46	1,62/1,32	23,50
47	1,55/1,32	23,50
48	3,80	75,09
49	1,74	42,71
50	0,77	11,92
51	3,41	77,87
52	1,61	36,46
53	0,86	12,75
54	1,55/1,32	31,37
55	1,61/1,144	36,46
56	3,77	71,83
57	1,67	44,53
58	3,92	71,12
59	2,30	37,54
60	5,84 (b)	~131,7 (c)
61	–	(c)
62	1,82	13,81
63	–	(c)
64	–	(c)
65	3,24 (b)	27,91
66	–	(c)
67	–	(c)
68	–	(c)
69	5,50 (b)	~119,3 (c)
70	3,09	26,52
71	1,10	24,31
72	1,10	24,31

b) široké signály

c) Tyto signály nejsou viditelné. C60 a C69 lze určit pouze spektrem HMQC.

5

10

Amycomycin vykazuje mimořádné antibakteriální účinky, zejména vůči grampozitivním bakteriím jako jsou, například, stafylokoky a enterokoky. Minimální inhibiční koncentrace amycomycinu vůči širokému spektru bakterií jsou uvedeny v tabulce 2 níže. U těchto kmenů se zejména v poslední době stále více ukazuje, že jsou kmeny problematickými, tj. že jsou mikroorganismy, které se staly rezistentními vůči existujícím antibiotikům. Lepší účinky sloučeniny podle vynálezu v porovnání s jinými antibiotiky ukazuje například inhibice kmenů rezistentních vůči vankomycinu a teicoplaninu, jako jsou například *E. faecalis*, *E. Faecium* nebo *E. gallinarium*.

Tabulka 2

Minimální inhibiční koncentrace (mg/l) (mikrodiluční test)

5

Grampozitivní kmeny	Kód		Amycomycin	Vancomycin
<i>S. aureus</i>	0,11H3T	oxy S ery S	0,08	0,3
<i>S. aureus</i>	011HT18	ATCC13709 Smith	0,08	0,3
<i>S. epidermidis</i>	012GO20	oxa S ery S tet R	0,3	0,6
<i>S. aureus</i>	011HT1	nov R	<=0,04	0,08
<i>S. aureus</i>	011DU5	nov R tet R	0,08	0,15
<i>S. aureus</i>	011CB20	oxa R ery Rc tet R	0,08	0,15
<i>S. aureus</i>	011GO71	ofl S oxa R ery S tet R	0,15	0,6
<i>S. aureus</i>	0,11GO64	ofl R oxa R ery Rc tet R	0,3	1,2
<i>S. epidermidis</i>	012GO42	oxa R	0,3	1,2
Staph. coag. negative	012HT5	ofl R oxa R tet R	0,15	0,6
<i>S. aureus</i>	011GR91	pri R oxa R ery R nov R	1,2	1,2
<i>S. pyogenes</i>	02A1SH1	van S ery Rc	0,3	0,15
<i>S. pyogenes</i>	02A1UC1	van S ery S	0,6	0,15
<i>S. pyogenes</i>	02A1FI6	ery R	0,6	0,08
Strepto gr. G	02GOCB2	tet R rif R nov R	0,6	0,15
<i>S. pneumoniae</i>	030B12	ery R	0,15	0,15
<i>S. mileri</i>	02milGR12	ery S van S	1,2	0,3
<i>S. mitis</i>	02mitGR16	ery Ri Van S	1,2	0,3
<i>E. faecium</i>	02D3AP9	nov S van R ery S tei R	0,6	>40
<i>E. aucium</i>	02D3HT12	tei R van R ery R tet R	0,6	>40
<i>E. faecium</i>	02D3IP2	tei R van R ery R tet R	ND	>40
<i>E. faecium</i>	02D3HM3	nov S van A ery R tei R	1,2	>40
<i>E. gallinarium</i>	02D0HM8	van C tet R ery S	1,2	>40
<i>E. faecalis</i>	02D2HM9	nov R van B ery R tei S	2,5	>40
<i>E. faecalis</i>	02D2UC5	ATCC 29212 nov R	2,5	2,5
<i>E. faecalis</i>	02D2DU18	tet R nov R	1,2	0,3
<i>E. faecalis</i>	02D2HT10	nov R van S tet R	1,2	0,6
Gramnegativní kmeny				
<i>E. coli</i>	DB10 2501P5	ery S fuc S nov S	ND	>40
<i>P. auruginosa</i>	1771 391HT2		>40	>40
<i>P. auruginosa</i>	1771m	mutant perméable	>40	>40
	391HT3			

10 Amycomycin a jeho farmaceuticky přijatelné soli a deriváty lze podávat zvířatům, výhodně savcům, a zejména lidem jako farmaceutika jako taková, ve směsích s jinými léčivy, a ve formě farmaceutických kompozic, které umožňuje parenterální nebo jiné způsoby podávání. Proto se předkládaný vynález také týká amycomycinu a jeho farmaceuticky přijatelných solí a derivátů pro použití jako léčiva, a použití amycomycinu a jeho farmaceuticky přijatelných solí a derivátů k přípravě léčiv s antibakteriálními účinky. Předkládaný vynález se dále týká farmaceutických kompozic, obsahujících účinné množství amycomycinu nebo/a jedné či více jeho farmaceuticky přijatelných solí nebo/a jeho derivátů, společně s farmaceuticky přijatelným nosičem.

15

Amycomycin lze podávat enterálně (orální cestou), parenterálně (intravenózně nebo intramuskulárně), rektálně či lokálně (topicky). Farmaceutické kompozice obsahující amycomycin nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl nebo jeho derivát s dalšími farmaceuticky účinnými látkami lze

přípravit smícháním účinných sloučenin s jednou nebo více farmakologicky tolerovanými pomocnými látkami nebo/a excipienty, a poté převedením směsi do vhodné farmaceutické formy vhodné pro podávání, jako jsou roztoky, prášky (tablety, kapsle včetně mikrokapslí), masti (krémy nebo gely), liposomové přípravky, lipidové komplexy, koloidní disperze nebo čípky.

5

Možnými pomocnými látkami nebo/a excipienty pro přípravky tohoto typu jsou obvyklá farmaceutická, kapalná nebo pevná plnidla a extendery, rozpouštědla, emulzifikátory, lubrikanty, činidla upravující chuť, barviva nebo/a pufrovací látky.

10

Jak je obvyklé, konkrétní galenický přípravek a konkrétní způsob podávání a rovněž tak konkrétní rozmezí dávek, které jsou vhodné v určitém případě, závisí na druhu, který má být léčen, a na studiu dotyčného stavu nebo onemocnění, a lze optimalizovat způsoby v oboru známými. Jako příklad může být vhodná dávka pohybující se v rozmezí 0,001 až 10 mg, výhodně 0,1 až 5 mg, výhodněji 1,0 mg, na tělesnou hmotnost činící přibližně 75 kg. Dávka by měla být dostatečná alespoň k dosažení požadovaného účinku.

15

Následující příklady provedení předkládaného vynálezu slouží pro ilustraci vynálezu, a v žádném případě nikterak neomezuji jeho rozsah.

20

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

25

Příprava očkovacího materiálu

30

100 ml živného roztoku (4 g/l kvasnicového extraktu, 15 g/l rozpustného škrobu, 1 g/l K_2HPO_4 , 0,5 g/l $MgSO_4 \times 7 H_2O$, doplněné vodou na 1000 ml, pH 7,0 před sterilizací) ve sterilní 300 ml Erlenmeyerově baňce se inokuluje kmenem *Amycolatopsis* sp. (DSM 12216) a poté inkubuje po dobu 5 dní při 28 °C a na rotačním protřepávacím při 180 otáčkách za minutu. Následně se 1,5 ml této kultury rozředí 1,5 ml 99% glycerinu a uchovává se při 20 °C.

35

Příklad 2

Příprava kultura nebo předkultury *Amycolatopsis* sp., ST101170 (DSM 12216) v Erlenmeyerových baňkách

40

Sterilní Erlenmeyerova baňka, obsahující 100 ml následujícího živného prostředí: 10 g/l roztoku škrobu, 10 g/l glukózy, 10 g/l 99% glycerinu, 2,5 g/l kukuřičného výluhu, 5 g/l peptonu, 2 g/l kvasnicového extraktu, 1 g/l NaCl a 3 g/l $CaCO_3$, se inokuluje kličkou s narostlou kulturou (stejný živný roztok, avšak s 2 % aragu) nebo 1 ml glycerinové kultury (viz příklad 1), a poté se inkubuje na protřepávacím při 180 otáčkách za minutu a 28 °C. Maximální tvorby sloučeniny zvané amycomycin se dosáhne po 72 hodinách.

45

Submerzní kultura stará 72 hodin (připravená podle způsobu popsané pro protřepávané kultury, příklad 1, avšak s následujícím prostředím: 15 g/l glukózy, 15 g/l sójové moučky, 3 g/l $CaCO_3$ a 5 g/l NaCl, pH 7,5) postačuje k inokulaci 10 a 200l fermentačních nádob při inokulačním množství činicím 10 %.

50

Příklad 3

Příprava sloučeniny zvané amycomycin

Ve 200l fermentační nádobě se spustí fermentace s následujícími parametry:

Živné prostředí:	10 g/l škrobu
	10 g/l glukózy
	10 g/l 99% glycerinu
	2,5 g/l kukuřičného výluhu
	5 g/l peptonu
	2 g/l kvasnicového extraktu
	7 g/l NaCl
	3 g/l CaCO ₃
	pH 7,2 (před sterilizací)
Inokulum:	10 % objemu fermentační nádoby
Inkubační doba:	60 až 80 hodin
Inkubační teplota:	28 °C
Protřepávání:	50 otáček za minutu
Provozdušňování:	150 l/min

Přidáním 1 až 2 ml ethanolového polyolového roztoku lze omezit tvoření pěny. Maximální tvorby se dosáhne po 69 hodinách.

Příklad 4

Izolace sloučeniny zvané amycomycin

200 ml roztoku kultury získaného v příkladu 3 se odstředí a mycelium se zcela extrahuje pomocí methanolu. Methanolvý extrakt se poté koncentruje na poměr činící přibližně 1 ku 10 a získá se bezbarvý precipitát, který se vyfiltruje. Tato procedura se opakuje, dokud lze látku zvanou amycomycin detekovat ve filtrátu (HPLC). Zůstatek se suší mrazením a následně purifikuje pomocí HPLC:

1. Sloupec:	Fractogel® TSK–HW 40 (4 l, 500x100 mm)
Eluent:	methanol
Rychlost toku:	20 ml/min
Detekce:	204 až 236 nm

Frakce obohacené amycomycinem eluují po 125 minutách. Frakce se spojí na základě HPLC (za podmínek uvedených výše). Spojené účinné frakce s požadovanou sloučeninou se koncentrují ve vakuu a suší mrazením.

2. Sloupec:	Fractogel® TSK–HW 40 (1 l, 500x50 mm)
Eluent:	methanol
Rychlost toku:	5 ml/min
Detekce:	204 až 236 nm

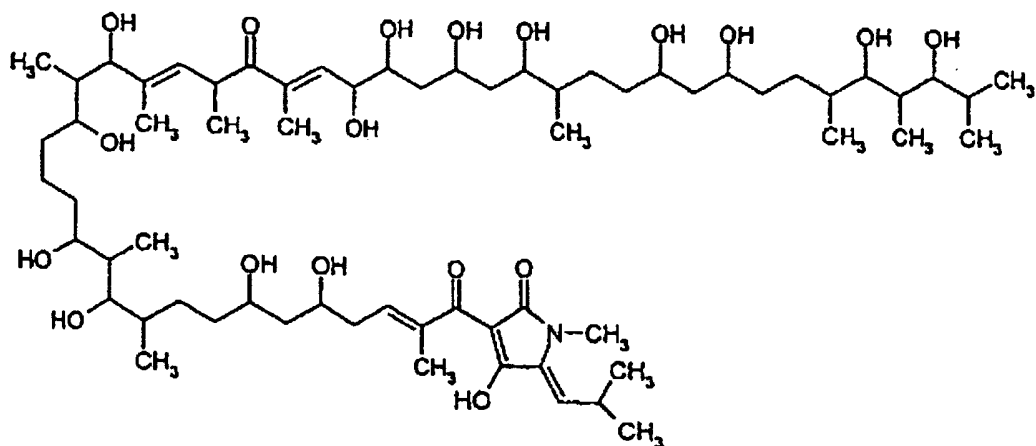
Účinná složka zvaná amycomycin se eluuje po 112 minutách.

Z 200 l fermentačního bujonu lze podle výše uvedených způsobů získat 110 mg amycomycinu.

PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. Sloučenina vzorce



a její farmaceuticky přijatelné soli, estery a ethery, ve všech jejich stereoizomerních a tautomer-
ních formách.

10

2. Způsob přípravy sloučeniny podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se kultivuje mikroorganismus *Amycolatopsis species*, ST101170, DSM 12216, za aerobních podmínek v živ-
ném prostředí, obsahujícím zdroje uhlíku a dusíku, a sloučenina se následně izoluje a purifikuje.

15

3. Způsob podle nároku 2, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se výsledná sloučenina dále pře-
mění na farmakologicky tolerovatelnou sůl, ester nebo ether.

4. Sloučenina podle nároku 1 nebo její farmaceuticky přijatelná sůl, ester nebo ether pro použi-
tí jako léčivo.

20

5. Farmaceutická kompozice, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje účinné množství slou-
čeniny podle nároku 1 a farmaceuticky přijatelný nosič.

6. Sloučenina podle nároku 1 nebo její farmaceuticky přijatelná sůl, ester nebo ether pro použi-
tí jako antibiotikum.

25

30

Konec dokumentu
