

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. Juni 2001 (21.06.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/44264 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07H 15/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/12208

(22) Internationales Anmeldedatum:
5. Dezember 2000 (05.12.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 60 640.4 16. Dezember 1999 (16.12.1999) DE

(71) Anmelder: AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND
GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, 65929 Frankfurt
(DE).

(72) Erfinder: HOPMANN, Cordula; Baustr. 8a, 60322
Frankfurt am Main (DE). KNAUF, Martin, Albert;
Ingelheimer Strasse 7, 60529 Frankfurt am Main (US).
WEITHMANN, Klaus-Ulrich; Am Domherrenwald 18,
65719 Hofheim (DE). WINK, Joachim; Magdeburger
Strasse 14, 63322 Rödermark (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

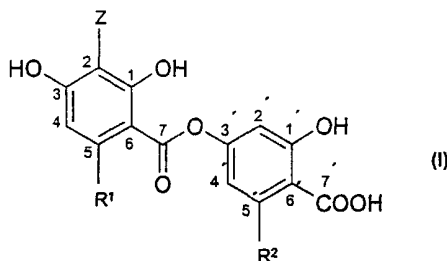
Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: NOVEL STROMELYSIN INHIBITORS

(54) Bezeichnung: NEUE STROMELYSIN INHIBITOREN



(57) Abstract: The invention relates to compounds of formula (I), which are suitable for the production of medicaments for the treatment and prophylaxis of diseases, in which an increased activity of matrix-degrading enzymes, in particular, stromelysin, are implicated.

(57) Zusammenfassung: Verbindungen der Formel (I) eignen sich zur Herstellung von Arzneimitteln zur Prophylaxe und Therapie von Erkrankungen, an deren Verlauf eine verstärkte Aktivität von Matrix-abbauenden Enzymen, insbesondere Stromelysin, beteiligt ist.



WO 01/44264 A2

Beschreibung

Neue Stromelysin Inhibitoren

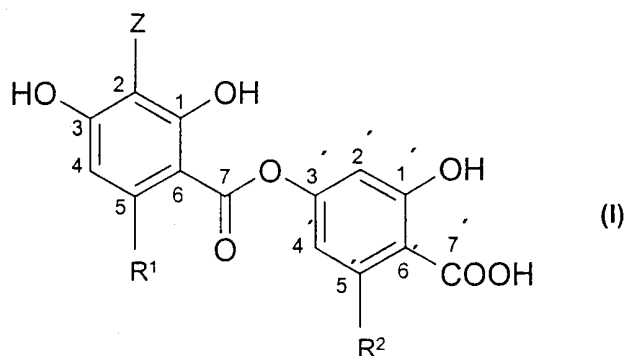
5

Die Erfindung betrifft Stromemycin, Stromemycinderivate, Verfahren zu deren Herstellung und Verwendung derselben als Arzneimittel und Stromelysin Inhibitoren.

10 Stromelysin (Matrix Metalloproteinase 3) ist eine Matrix Metalloproteinase, die als Enzym beim Abbau der Proteoglykane, die wichtige Bestandteile des Knorpelgewebes sind, maßgeblich beteiligt ist (A. J. Fosang et al. J. Clin. Invest. 98 (1996) 2292-2299). Verbindungen, die dem Stromemycin strukturell ähnlich sind, wurden von Yasuzawa et al. (The Journal of Antibiotics, Band XLIII, Nr. 4, (1990), Seiten 336 – 343) beschrieben.

15 In dem Bestreben, wirksame Verbindungen zur Behandlung von Bindegewebs-erkrankungen zu finden, wurde nun gefunden, dass das erfindungsgemäße Stromemycin und die Stromemycinderivate Inhibitoren der Matrix Metalloproteinase Stromelysin sind.

20 Die Erfindung betrifft daher die Verbindung der Formel I



und/oder eine stereoisomere Form der Verbindung der Formel I und/oder ein physiologisch verträgliches Salz der Verbindung der Formel I, wobei

R¹ für 1. (C₃ – C₁₀)-Alkyl, worin Alkyl gerade oder verzweigt ist und unsubstituiert
25 oder ein-, zwei- oder dreifach substituiert ist durch

2

1.1 -OR³, worin R³ Wasserstoffatom oder (C₁-C₄)-Alkyl bedeutet,

1.2 -NR⁴R⁵, worin R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander Wasserstoffatom oder (C₁-C₄)-Alkyl bedeuten,

1.3 Halogen wie -F, -Cl, -Br oder -I,

1.4 =O oder

1.5 -COOH, oder

2. (C₃ – C₁₀)-Alkenyl, worin Alkenyl gerade oder verzweigt ist und unsubstituiert oder ein-, zwei- oder dreifach substituiert ist durch

2.1 -OR³, worin R³ Wasserstoffatom oder (C₁-C₄)-Alkyl bedeutet,

2.2 -NR⁴R⁵, worin R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander Wasserstoffatom oder (C₁-C₄)-Alkyl bedeuten,

2.3 Halogen wie -F, -Cl, -Br oder -I,

2.4 =O oder

2.5 -COOH, steht,

R² für 1. (C₃ – C₁₀)-Alkyl, worin Alkyl gerade oder verzweigt ist und unsubstituiert oder ein-, zwei- oder dreifach substituiert ist durch

1.1 -OR³, worin R³ Wasserstoffatom oder (C₁-C₄)-Alkyl bedeutet,

1.2 -NR⁴R⁵, worin R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander Wasserstoffatom oder (C₁-C₄)-Alkyl bedeuten,

1.3 Halogen wie -F, -Cl, -Br oder -I,

1.4 =O oder

1.5 -COOH, oder

2. (C₃ – C₁₀)-Alkenyl, worin Alkenyl gerade oder verzweigt ist und unsubstituiert oder ein-, zwei- oder dreifach substituiert ist durch

2.1 -OR³, worin R³ Wasserstoffatom oder (C₁-C₄)-Alkyl bedeutet,

2.2 -NR⁴R⁵, worin R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander Wasserstoffatom oder (C₁-C₄)-Alkyl bedeuten,

2.3 Halogen wie -F, -Cl, -Br oder -I,

2.4 =O oder

2.5 -COOH, steht, und

Z für eine Hexose steht, wobei der Zucker in pyranoider Form über eine C-glycosidische Bindung verknüpft ist.

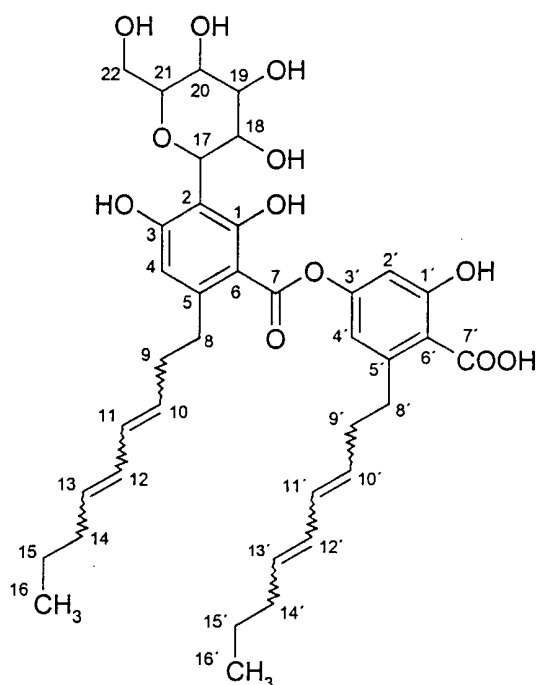
5 Bevorzugt ist eine Verbindung der Formel I, wobei

R¹ für Nonadienyl steht,

R² für Nonadienyl steht und

Z für D(+)-Glucose, D(+)-Mannose, D(+)-Galactose oder D(+)-Talose steht.

10 Insbesondere bevorzugt ist



Diese Verbindung wird im folgenden als Stromemycin bezeichnet.

Mit dem Begriff Hexose werden alle in der Natur vorkommenden Hexosen der

15 allgemeinen Formel C₆H₁₂O₆ verstanden, beispielsweise D(+)-Glucose, D(+)-Mannose, D(+)-Galactose oder D(+)-Talose.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung der Verbindung der Formel I und/oder einer stereoisomeren Form der Verbindung der Formel I und/oder eines

20 physiologisch verträglichen Salzes der Verbindung der Formel I, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- a) den Mikroorganismus DSM 12038 oder dessen Mutanten oder Varianten in einem wässrigen Nährmedium kultiviert und die Verbindung Stromemycin isoliert und reinigt, oder
- b) Stromemycin durch reduktive Hydrierung in eine Verbindung der Formel I überführt, worin R^1 und R^2 für C_9 -Alkyl steht, oder
- c) Stromemycin durch Ozonolyse in eine Verbindung der Formel I überführt, worin R^1 und R^2 für
- 1.) $-CH_2CH_2CH_2-OH$,
 - 2.) $-CH_2CH_2CHO$ oder
 - 3.) $-CH_2CH_2COOH$
- steht, oder
- d) eine nach dem Verfahren c)2) hergestellte Verbindung der Formel I durch Umsetzung mit Alkylidenphosphoranen um 1 bis 7 Methylengruppen verlängert, wobei die eingeführten Seitenketten funktionelle Gruppen wie Hydroxy-, Ether-, Amino-Gruppen oder F-, Cl-, Br- oder I-Reste besitzen können.
- e) eine nach den Verfahren a), b), c) oder d) hergestellte Verbindung der Formel I, die aufgrund ihrer chemischen Struktur in enantiomeren Formen auftritt, durch Salzbildung mit enantiomerenreinen Säuren oder Basen, Chromatographie an chiralen Stationärphasen oder Derivatisierung mittels chiraler enantiomerenreinen Verbindungen wie Aminosäuren, Trennung der somit erhaltenen Diastereomeren, und Abspaltung der chiralen Hilfsgruppen in die reinen Enantiomeren auftrennt, oder
- f) die nach den Verfahren a), b), c), d) oder e) hergestellte Verbindung der Formel I entweder in freier Form isoliert oder im Falle des Vorliegens von sauren oder basischen Gruppen in physiologisch verträgliche Salze umwandelt.

Der Mikroorganismus DSM 12038 gehört zur Gruppe der Pilze und wurde am 4. März 1998 unter den Bedingungen des Budapester Vertrags bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig unter der Nummer DSM 12038 hinterlegt.

Unter Varianten von DSM 12038 werden Stämme von DSM 12038 verstanden, die durch Vereinzelung aus einer Kultur von DSM 12038 gewonnen wurden, soweit sie Stromemycin herstellen. Unter Mutanten von DSM 12038 werden Stämme von DSM

12038 verstanden, die nach Mutation aus einer Kultur von DSM 12038 gewonnen wurden, soweit sie Stromemycin herstellen. Mutanten von DSM 12038 können in an sich bekannter Weise durch physikalische Mittel, beispielsweise Bestrahlung wie Ultraviolett- oder Röntgenstrahlung oder durch chemische Mutagene, beispielsweise

5 Ethylmethansulfonat (EMS); 2-Hydroxy-4-methoxy-benzophenon (MOB) oder N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) erzeugt werden.

Das Auffinden der Mutanten erfolgt beispielsweise durch Probennahme aus dem Kultivierungsmediums und Bestimmung der inhibierenden Wirkung auf das Stromelysin.

10 Die Herstellung von Stromemycin erfolgt durch Kultivierung von DSM 12038. Die Nährlösung enthält Kohlenstoffquellen wie Saccharose, Maisstärke, Dextrose, Lactose, D-Mannit, Molasse oder Malzextrakt und Stickstoffquellen wie Sojabohnenmehl, Erdnußmehl, Proteine, Peptone, Peptide, Tryptone, Fleischextrakt, Hefeextrakt oder Ammoniumsalze oder Nitrate.

15 Die Nährlösung enthält auch anorganische Salze wie Natriumhydrogenphosphat, Natriumchlorid, Calciumchlorid, Calciumsulfat, Calciumcarbonat, Magnesiumsulfat oder Kaliumhydrogenphosphat. Ferner kann dem Nährmedium auch Fett wie Ölsäuremethylester oder Sojaöl zugesetzt werden. Daneben werden auch

20 Spurenelemente wie Eisen-, Mangan-, Kupfer-, Zink-, Kobalt- oder andere Metallsalze zugegeben.

Eine bevorzugte Nährlösung enthält etwa von 0,1 % bis 2 % Caseinpepton, vorzugsweise von 0,3 % bis 1 %, von etwa 0,1 % bis 2 % Fleischpepton, vorzugsweise

25 von 0,3 % bis 2 %, von 0,5 % bis 5 % Glucose, vorzugsweise von 0,5 % bis 2 %, und von 0,5 % bis 5 % Maltose, vorzugsweise von 0,3 % bis 2 %. Die Prozentangaben beziehen sich auf das Gewicht der gesamten Nährlösung.

Die Kultivierung von DSM 12038 erfolgt bei Temperaturen von 20 °C bis 35 °C,

30 bevorzugt bei 23 °C bis 28°C und bei pH-Werten von 5 bis 9, vorzugsweise bei Werten von 4 bis 6. Die Kultivierung erfolgt aerob zunächst im Schüttelkolben und danach im Fermenter unter Rühren und Belüftung mit Luft oder reinem Sauerstoff. Die Kultivierung der Mikroorganismen in den Fermentern erfolgt über einen Zeitraum von 48 bis 240 Stunden, bevorzugt von 15 bis 72 Stunden, insbesondere von 15 bis 30 Stunden.

Die Bildung von Stromemycin erreicht ihr Maximum nach etwa 15 bis 30 Stunden.

Die Isolierung von Stromemycin erfolgt direkt aus der Nährlösung oder nach Abtrennung der Zellen beispielsweise durch Zentrifugation oder Filtration. Die Isolierung von

5 Stromemycin kann durch Extraktion mit Lösungsmitteln oder durch Adsorption an Harze wie XAD 16, HP 20, MCI Gel® CHP20P oder Ionenaustauscher erfolgen.

Die Reinigung erfolgt beispielsweise durch Chromatographie an Adsorptionsharzen wie an Diaion® HP-20 (Mitsubishi Casei Corp., Tokyo), an Amberlite® XAD 7 (Rohm and Haas, USA), an Amberchrom® CG (Toso Haas, Philadelphia, USA). Die Trennungen

10 können in einem weiten pH-Bereich durchgeführt werden. Bevorzugt ist der Bereich von pH 1 bis pH 9, besonders bevorzugt von pH 2 bis pH 8. Geeignet sind darüber hinaus Reverse Phase-Träger, die im Rahmen der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) eingesetzt werden. Ein weiteres Isolierungsverfahren ist die Verwendung von Molekularsieben wie Fractogel® TSK HW-40S oder Sephadex® LH-20.

15 In dem C₉-Alkenylrest (Nonadienylseitenkette) können ein oder zwei Doppelbindungen vorkommen, bevorzugt zwei, die in cis- und/oder in trans-Konfiguration vorliegen. Bei dem Zuckerrest sind alle entsprechend C-glycosidisch verknüpften C₆-Stereoisomere möglich.

20 Als Ausgangsstoff für die Herstellung der Stromemycinderivate dient das mikrobiologisch hergestellte Stromemycin. Die Herstellung der Verbindungen der Formel I, worin R¹ und/oder R² für C₉-Alkyl steht erfolgt durch reduktive Hydrierung von Stromemycin in an sich bekannter Weise, beispielsweise wie beschrieben bei P. N.

25 Rylander in "Hydrogenation Methods", Academic Press, New York (1985), Kapitel 2. Durch Umsetzung mit Reagenzien wie OsO₄ ist es möglich die Doppelbindungen in den Seitenketten zu hydroxylieren (siehe in Chem. Rev. 80, 187 (1980)).

30 Durch Ozonolyse der Doppelbindung in den Nonadienylseitenketten (R¹ und R²) entstehen bekanntlich entsprechende Derivate mit C₃-Seitenketten, die je nach oxidativer oder reduktiver Aufarbeitung Aldehyd- (z. B. mit Zn/Essigsäure oder Dimethylsulfid/Methanol), Carboxyl- (z. B. mit H₂O₂) oder OH-Gruppen (z. B. mit LiAlH₄ oder NaBH₄), als funktionelle Gruppen tragen (W. Carruthers, "Some Modern Methods of Organic Synthesis", Cambridge University Press (1971), Ch. 6; White, King und

O'Brien, Tetrahedron Lett. 3591 (1971); Bailey, P. S., "Ozonisation in Organic Chemistry", Vol.1 and Vol.2, New York, Academic Press (1978, 1982)).

Durch Umsetzung der Aldehydderivate mit Alkylidenphosphoranen mittels der bekannten Wittig-Reaktion lassen sich anschließend die C₃-Ketten unter milden Bedingungen

- 5 wieder verlängern, z. B. zu einer Länge von 4 bis 10 Kohlenstoffatomen, wobei die eingeführten Seitenketten funktionelle Gruppen, z. B. OR³ (R³ = H oder Alkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen), NR⁴R⁵ (R⁴, R⁵ = H oder Alkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen), F, Cl, Br, I beinhalten können, wie beschrieben in: H. J. Bestmann et al., "Selected Topics of the Wittig Reaction in the Synthesis of Natural Products"
- 10 Topics in Current Chemistry 109, 85, (1983).

Die Modifikation der Zucker in der Verbindung der Formel I erfolgt nach bekannten Verfahren (H. Paulsen, Angew. Chem. Int. Ed. 21 (1982) S. 155; R.R. Schmidt, Angew. Chem. Int. Ed. 25 (1986) S. 212-235; T. Ogawa, Tetrahedron Lett. 31 (1990) 2439 –

15 2442).

Unter pharmakologisch verträglichen Salzen der Verbindung der Formel I versteht man sowohl anorganische als auch organische Salze, wie sie in Remington's Pharmaceutical Sciences (17. Auflage, Seite 1418 (1985)) beschrieben sind. Die Herstellung

- 20 physiologisch verträglicher Salze aus zur Salzbildung befähigten Verbindungen der Formel I, einschließlich deren stereoisomeren Formen, erfolgt in an sich bekannter Weise. Die Carbonsäure bildet mit basischen Reagenzien wie Hydroxiden, Carbonaten, Hydrogencarbonaten, Alkoholaten sowie Ammoniak oder organischen Basen, beispielsweise Trimethyl- oder Triethylamin, Ethanolamin oder Triethanolamin oder auch
- 25 basischen Aminosäuren, etwa Lysin, Ornithin oder Arginin, stabile Alkali-, Erdalkali- oder gegebenenfalls substituierte Ammoniumsalze. Sofern die Verbindung der Formel I basische Gruppen aufweist, lassen sich mit starken Säuren auch stabile Säureadditionssalze herstellen. Hierfür kommen sowohl anorganische als auch organische Säuren wie Chlorwasserstoff-, Bromwasserstoff-, Schwefel-, Benzolsulfon-,
- 30 Phosphor-, Methansulfon-, p-Toluolsulfon-, 4-Brombenzol-sulfon-, Trifluormethylsulfon-, Cyclohexylamid-sulfon-, Essig-, Oxal-, Wein-, Bernstein- und Trifluoressigsäure in Frage.

Die Erfindung betrifft auch Arzneimittel, gekennzeichnet durch einen wirksamen Gehalt an mindestens einer Verbindung der Formel I und/oder eines physiologisch verträglichen Salzes der Verbindung der Formel I und/oder eine gegebenenfalls stereoisomere Form der Verbindung der Formel I, zusammen mit einem pharmazeutisch geeigneten und
5 physiologisch verträglichen Trägerstoff, Zusatzstoff und/oder anderen Wirk- und Hilfsstoffen.

Aufgrund der pharmakologischen Eigenschaften eignen sich die erfindungsgemäßen Verbindungen zur Prophylaxe und Therapie all solcher Erkrankungen, an deren Verlauf
10 eine verstärkte Aktivität von Matrix-abbauenden Enzymen wie Matrix Metalloproteinase Stromelysin, beteiligt ist. Dazu gehören degenerative Gelenkerkrankungen wie Osteoarthrosen, Spondylosen, Knorpelschwund nach Gelenktrauma oder längerer Gelenksruhigstellung nach Meniskus- oder Patellaverletzungen oder Bänderrissen. Ferner gehören dazu auch Erkrankungen des Bindegewebes wie Kollagenosen,
15 Periodontalerkrankungen, Wundheilungsstörungen und chronische Erkrankungen des Bewegungsapparates wie entzündliche, immunologisch oder stoffwechselbedingte akute und chronische Arthritiden, Arthropathien, Myalgien und Störungen des Knochenstoffwechsels. Ferner eignen sich die Verbindungen der Formel I zur Behandlung der Ulceration, Atherosklerose und Stenosen. Weiterhin eignen sich die
20 Verbindungen der Formel I zur Behandlung von Entzündungen, Krebserkrankungen, Tumormetastasenbildung, Kachexie, Anorexie und septischem Schock.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel werden im allgemeinen oral oder parenteral verabreicht. Die rektale, inhalative, nasale oder transdermale Applikation ist auch
25 möglich.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, das dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Verbindung der Formel I mit einem pharmazeutisch geeigneten und physiologisch verträglichen Träger und gegebenenfalls
30 weiteren geeigneten Wirk-, Zusatz- oder Hilfsstoffen in eine geeignete Darreichungsform bringt.

Geeignete feste oder galenische Zubereitungsformen sind beispielsweise Granulate, Pulver, Dragees, Tabletten, (Mikro)Kapseln, Suppositorien, Sirupe, Säfte, Suspensionen, Emulsionen, Tropfen oder injizierbare Lösungen sowie Präparate mit

5 Trägerstoffe, Spreng-, Binde-, Überzugs-, Quellungs-, Gleit- oder Schmiermittel, Geschmacksstoffe, Süßungsmittel und Lösungsvermittler Verwendung finden. Als häufig verwendete Hilfsstoffe seien Magnesiumcarbonat, Titandioxid, Laktose, Mannit und andere Zucker, Talkum, Milcheiweiß, Gelatine, Stärke, Cellulose und ihre Derivate, tierische und pflanzliche Öle wie Lebertran, Sonnenblumen-, Erdnuß- oder Sesamöl, 10 Polyethylen-glykol und Lösungsmittel wie etwa steriles Wasser und ein- oder mehrwertige Alkohole wie Glycerin, genannt.

Vorzugsweise werden die pharmazeutischen Präparate in Dosierungseinheiten hergestellt und verabreicht, wobei jede Einheit als aktiven Bestandteil eine bestimmte

15 Dosis der erfindungsgemäßen Verbindung der Formel I enthält. Bei festen Dosierungseinheiten wie Tabletten, Kapseln, Dragees oder Suppositorien, kann diese Dosis bis zu etwa 1000 mg, bevorzugt jedoch etwa 50 bis 300 mg und bei Injektionslösungen in Ampullenform bis zu etwa 300 mg, vorzugsweise aber etwa 10 bis 100 mg, betragen.

20 Für die Behandlung eines erwachsenen, etwa 70 kg schweren Patienten sind je nach Wirksamkeit der Verbindung gemäß Formel I, Tagesdosen von etwa 20 mg bis 1000 mg Wirkstoff, bevorzugt etwa 100 mg bis 500 mg indiziert. Unter Umständen können jedoch auch höhere oder niedrigere Tagesdosen angebracht sein. Die Verabreichung der 25 Tagesdosis kann sowohl durch Einmalgabe in Form einer einzelnen Dosierungseinheit oder aber mehrerer kleinerer Dosierungseinheiten als auch durch Mehrfachgabe unterteilter Dosen in bestimmten Intervallen erfolgen.

30 Beispiel 1 Herstellung einer Sporensuspension von DSM 12038

100 mL Nährlösung (20 g Malzextrakt, 2 g Hefeextrakt, 10 g Glucose, 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ in 1 L Leitungswasser, pH-Wert vor der Sterilisation: 6.0) in einem 500 mL sterilen Erlenmeyerkolben wurden mit dem Stamm DSM 12038 beimpft und 72

Stunden bei 25 °C und 140 UpM auf einer rotierenden Schüttelmaschine inkubiert. Dann wurden 120 mL Kulturflüssigkeit in einem sterilen 500 mL Erlenmeyerkolben mit dem Nährboden Hafermehlinfus, 2.0 g/L, dem zusätzlich 15 g Agar/L zur Verfestigung zugegeben wurden, gleichmäßig verteilt und mit der Schüttelkultur beimpft. Der Stamm wurde 10 bis 14 Tage bei 25 °C inkubiert. Die vom Stamm DSM 12038 gebildeten Sporen wurden mit 500 mL entionisiertem Wasser, welches einen Tropfen Triton® X 100 (Firma Serva) enthielt, abgeschwemmt, sofort weiterverwendet oder bei –22 °C in 50 % Glycerin oder in 10 % Dimethylsulfoxid bei –140 °C aufbewahrt.

10

Beispiel 2: Herstellung einer Schüttelkultur

Ein steriler 500 mL Erlenmeyerkolben mit 100 mL einer Nährlösung enthaltend 0,5 % Caseinpepton, 0,5 % Fleischpepton, 1 % Glucose und 10 % Maltose wurde mit 0,2 mL Sporensuspension, hergestellt gemäß Beispiel 1, beimpft und auf einer Schüttelmaschine unter Ausschluß von Licht bei 140 UpM und 25 °C inkubiert. Die maximale Menge von Stromemycin wurde nach etwa 27 Stunden erreicht. Zum Animpfen von 10 L oder 100 L Fermentern wurde eine 72 h alte Schüttelkultur, enthaltend den Stamm DSM 12038 und eine Nährlösung aus 2 % Malzextrakt, 0,2 % Hefeextrakt, 1 % Glucose und 0,05 % Ammoniumhydrogenphosphat verwendet (Animpfmenge etwa 5 %).

Beispiel 3 Herstellung von Stromemycin

Ein 10 L Fermenter wurde unter folgenden Bedingungen betrieben:

Nährmedium:	Caseinpepton	5 g/L
	Fleischpepton	5 g/L
	Glucose	10 g/L
	Maltose	10 g/L
Inkubationszeit:	25 bis 30 Stunden	
Inkubationstemperatur:	25 °C	

30

Rühreregeschwindigkeit: 300 UpM

Belüftung: 0,5 L/min

pH 5 ± 0.5

5 Durch Zugabe von 1 bis 2 mL ethanolischer Polyollösung konnte die Schaumbildung unterdrückt werden. Das Produktionsmaximum wurde nach 27 Stunden erreicht.

Beispiel 4: Isolierung von Stromemycin

10 7,5 L der nach Beispiel 3 gewonnenen Kulturlösung wurden abzentrifugiert und das Kulturfiltrat im Batchverfahren auf 1,5 L Adsorptionsharz MCI Gel[®] CHP20P adsorbiert. Das Harz wurde auf eine Nutsche gegeben und zunächst mit 4 L H₂O gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution mit jeweils 2 L Fraktionen eines Isopropanol/Wasser Gemisches, enthaltend jeweils 20%, 40%, 70% oder 100 % Isopropanol. Nach HPLC
15 Prüfung und Aktivitätstest wurde Stromemycin mit den ersten beiden Fraktionen (20% und 40% Isopropanol) eluiert. Die Fraktionen wurden gesammelt und gefriergetrocknet. Das Produkt wurde anschließend mittels HPLC weiter aufgereinigt:

1.) Säule: RP18, Nucleosil 100 RP18-AB (Macherey & Nagel), 250 x 21 mm, 5 μ
20 Eluant: CH₃CN / 0.1%TFA
Gradient: 37 min 40% CH₃CN isokratisch, anschließend in 10 min auf 100% CH₃CN. Fluß: 9 ml/ min; Detektion : 275 nm
Stromemycin eluierte nach 52 min.

25 2.) Säule: Fractogel TSK HW40S, 200ml (Erimatechnik), 300 x 25 mm
Eluant: MeOH; Fluß: 2 ml/min; Detektion: 230 nm
Stromemycin eluierte nach 75 min.
Ausbeute: 25 mg aus 7.5 L Fermentermedium.

30 Das gewonne Stromemycin hat folgende Eigenschaften:

Aussehen: farbloser Feststoff; löslich in Methanol, Dimethylsulfoxid (DMSO);
stabil in neutralem Milieu, jedoch unbeständig in stark-saurer und
alkalischer Lösung.

Summenformel: $C_{38}H_{48}O_{12}$

HPLC (High Pressure

Liquid Chromatography): Säule: Purospher RP-18e (125 x 3 mm, 5 μ)

Eluant: Gradient: CH₃CN / 0,1% H₃PO₄ in 20 min von 0% auf
100% CH₃CN

Fluß: 0,6 ml/min

Retentionszeit: 16,4 min

Detektion: 230 nm

Molekulargewicht: 696,8 Da

HR-FAB-MS: 697,32332 [M+H]⁺

¹H- und ¹³C-NMR: siehe Tabelle 1

UV/VIS: MeOH $\lambda_{nm}(\log \epsilon)$: 216 nm (4.87), 267 (4.33), 304 (4.34)

FT-IR: (KBr), $\nu=3419\text{ cm}^{-1}(\text{br})$, 2929 (m), 1608 (s), 1434 (w), 1252 (m),
1204 (w), 1151 (m), 1084 (w).

Tabelle 1: ¹H- und ¹³C-chemische Verschiebungen von Stromemycin in DMSO-d₆, ppm rel. TMS, 300K

Position	¹ H [ppm]	¹³ C [ppm]
1	-	158.29
1-OH	9.70	-
2	-	110.56
3	-	159.32
3-OH	9.81	-
4	6.33	109.58
5	-	142.46
6	-	108.83
7	-	167.36
8	2.75	34.27
9	2.32	34.02
10	5.58	130.79
11	6.0	130.72 (130.79) ^{a)}
12	6.0	130.24 (130.31) ^{a)}
13	5.55	132.22 (132.38) ^{a)}

14	1.99	34.02
15	1.34	21.96 (21.97) ^{a)}
16	0.85	13.50
17	4.70	74.40
18	3.68	71.53
19	3.24	78.38
20	3.27	69.65
21	3.24	81.21
22	3.54/3.66	60.51
1'	-	157.17
1'-OH	10.67 ^{c)}	-
2'	6.63	107.31
3'	-	151.55
4'	6.56	113.18
5'	-	142.25
6'	-	118.40
7'	-	169.73
7'-COOH	n.d.	-
8'	2.71	33.44
9'	2.29	33.61
10'	5.58	130.79
11'	6.0	130.79 (130.72) ^{a)}
12'	6.0	130.31 (130.24) ^{a)}
13'	5.55	132.38 (132.22) ^{a)}
14'	1.99	34.02
15'	1.34	21.97 (21.96) ^{a)}
16'	0.85	13.50

^{a)} Wegen Signalüberlagerung ist eine eindeutige Zuordnung der chemischen Verschiebungen nicht möglich. ^{b)} Nahezu identische chemische Verschiebungen der Positionen 10-16 und 10'-16' verhindern eine eindeutige Unterscheidung der HMBC-Korrelation bezüglich beider Dien-Seitenketten. ^{c)} „tentative assignment“

Pharmakologische Beispiele

10

Darstellung und Bestimmung der enzymatischen Aktivität der katalytischen Domäne des humanen Stromelysins

Das Enzym -Stromelysin (MMP-3) wurde dargestellt nach Ye et al. (Biochemistry; 31 (1992) Seiten 11231-11235). Zur Messung der Enzymaktivität oder der Enzyminhibitorwirkung wurden 70 µl Pufferlösung, und 10 µl Enzymlösung mit 10 µl einer 10%igen (v/v) wässrigen Dimethylsulfoxid-Lösung, die gegebenenfalls den Enzyminhibitor enthielt, für 15 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl einer 10%igen (v/v) wässrigen Dimethylsulfoxid-Lösung, die 1 mmol/l des Substrates enthielt, wurde die Enzymreaktion fluoreszenzspektroskopisch verfolgt (328 nm (ex) / 393 nm(em)). Die Enzymaktivität wird dargestellt als Extinktionszunahme/Minute. Der IC₅₀-Wert wurde als diejenige Inhibitorkonzentration ermittelt, die jeweils zu einer 50%igen Inhibierung des Enzyms führte.

Die Pufferlösung enthielt 0,05% Brij (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) sowie 0,1 mol/l Tris/HCl, 0,1 mol/l NaCl, 0,01 mol/l CaCl₂ und 0,1 mol/l Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure] (pH=6,5).

Die Enzymlösung enthielt 5 µg/ml einer der nach Ye et al. dargestellten Enzymdomänen. Die Substratlösung enthielt 1 mmol/l des fluorogenen Substrates (7-Methoxycoumarin-4-yl)acetyl-Pro-Leu-Gly-Leu-3-(2',4'-dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropionyl-Ala-Arg-NH₂ (Bachem, Heidelberg, Deutschland).

Der IC₅₀-Wert für Stromemycin wurde mit 115 µM bestimmt.

15

INTERNATIONAL FORM

Hoechst Marion Roussel
65926 Frankfurt/Main

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Hoechst Marion Roussel Address: 65926 Frankfurt/Main	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 12038 Date of the deposit or the transfer ¹ : 1998-02-27
III. VIABILITY STATEMENT	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 1998-02-27 ¹ . On that date, the said microorganism was (X) ² viable () ² no longer viable	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 1998-03-04

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

INTERNATIONAL FORM

Hoechst Marion Roussel
65926 Frankfurt/Main

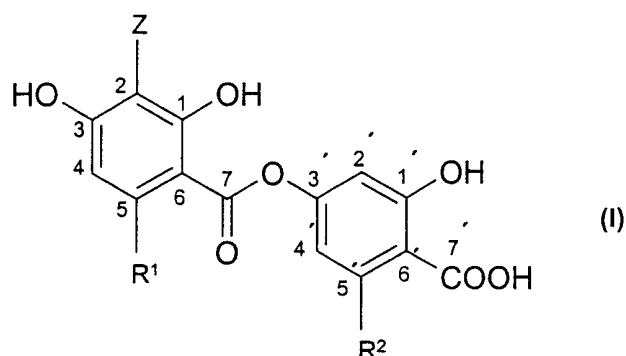
RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: FH 5998	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 12038
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 1998-02-27 (Date of the original deposit) ¹ .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 1998-03-04

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

Patentansprüche

1. Verbindung der Formel I



und/oder eine stereoisomere Form der Verbindung der Formel I und/oder ein physiologisch verträgliches Salz der Verbindung der Formel I, wobei

R^1 für 1. $(C_3 - C_{10})$ -Alkyl, worin Alkyl gerade oder verzweigt ist und unsubstituiert oder ein-, zwei- oder dreifach substituiert ist durch

1.1 $-OR^3$, worin R^3 Wasserstoffatom oder $(C_1 - C_4)$ -Alkyl

bedeutet,

1.2 $-NR^4R^5$, worin R^4 und R^5 unabhängig voneinander Wasserstoffatom oder $(C_1 - C_4)$ -Alkyl bedeuten,

1.3 Halogen wie $-F$, $-Cl$, $-Br$ oder $-I$,

1.4 $=O$ oder

1.5 $-COOH$, oder

2. $(C_3 - C_{10})$ -Alkenyl, worin Alkenyl gerade oder verzweigt ist und unsubstituiert oder ein-, zwei- oder dreifach substituiert ist durch

2.1 $-OR^3$, worin R^3 Wasserstoffatom oder $(C_1 - C_4)$ -Alkyl

bedeutet,

2.2 $-NR^4R^5$, worin R^4 und R^5 unabhängig voneinander Wasserstoffatom oder $(C_1 - C_4)$ -Alkyl bedeuten,

2.3 Halogen wie $-F$, $-Cl$, $-Br$ oder $-I$,

2.4 $=O$ oder

2.5 $-COOH$, steht,

R^2 für 1. $(C_3 - C_{10})$ -Alkyl, worin Alkyl gerade oder verzweigt ist und unsubstituiert oder ein-, zwei- oder dreifach substituiert ist durch

1.1 -OR³, worin R³ Wasserstoffatom oder (C₁-C₄)-Alkyl bedeutet,

1.2 -NR⁴R⁵, worin R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander Wasserstoffatom oder (C₁-C₄)-Alkyl bedeuten,

1.3 Halogen wie -F, -Cl, -Br oder -I,

1.4 =O oder

1.5 -COOH, oder

2. (C₃ – C₁₀)-Alkenyl, worin Alkenyl gerade oder verzweigt ist und unsubstituiert oder ein-, zwei- oder dreifach unabhängig voneinander substituiert ist durch

2.1 -OR³, worin R³ Wasserstoffatom oder (C₁-C₄)-Alkyl bedeutet,

2.2 -NR⁴R⁵, worin R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander Wasserstoffatom oder (C₁-C₄)-Alkyl bedeuten,

2.3 Halogen wie -F, -Cl, -Br oder -I,

2.4 =O oder

2.5 -COOH, steht, und

Z für Hexose steht, wobei die Hexose in pyranoider Form über eine C- glycosidische Bindung gebunden ist.

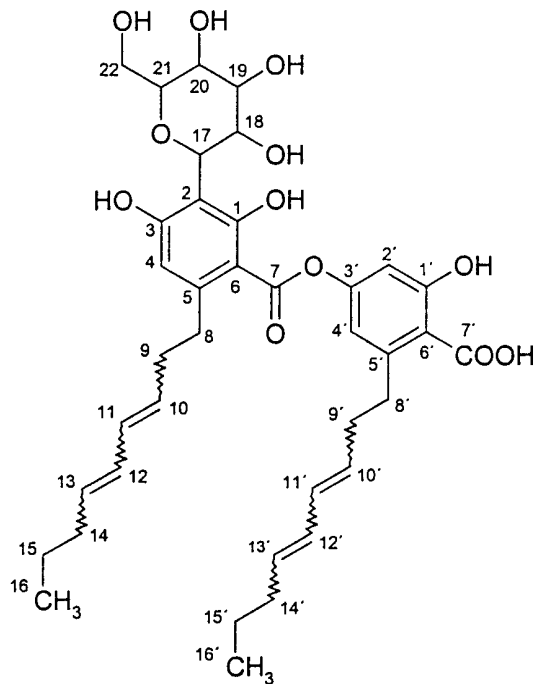
2. Verbindung der Formel I, gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R¹ für Nonadienyl steht,

R² für Nonadienyl steht und

Z für D(+)-Glucose, D(+)-Mannose, D(+)-Galactose oder D(+)-Talose

steht.

3. Verbindung der Formel I gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgende Struktur hat



4. Verfahren zur Herstellung der Verbindung der Formel I, gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man
- den Mikroorganismus DSM 12038 oder dessen Mutanten oder Varianten in einem wässrigen Nährmedium kultiviert und die Verbindung Stromemycin isoliert und reinigt, oder
 - Stromemycin durch reduktive Hydrierung in eine Verbindung der Formel I überführt, worin R^1 und R^2 für C_9 -Alkyl steht, oder
 - Stromemycin durch Ozonolyse in eine Verbindung der Formel I überführt, worin R^1 und R^2 für
 - $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$,
 - $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ oder
 - $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ steht, oder
 - eine nach dem Verfahren c)2) hergestellte Verbindung der Formel I durch Umsetzung mit Alkylidenphosphoranen um 1 bis 7 Methylengruppen verlängert, wobei die eingeführten Seitenketten funktionelle Gruppen wie Hydroxy-, Ether-, Amino-Gruppen oder F-, Cl-, Br- oder I-Reste besitzen können.
 - eine nach den Verfahren a), b), c) oder d) hergestellte Verbindung der Formel I, die aufgrund ihrer chemischen Struktur in enantiomeren Formen auftritt, durch Salzbildung mit enantiomerenreinen Säuren oder Basen,

Chromatographie an chiralen Stationärphasen oder Derivatisierung mittels chiraler enantiomerenreinen Verbindungen wie Aminosäuren, Trennung der somit erhaltenen Diastereomeren, und Abspaltung der chiralen Hilfsgruppen in die reinen Enantiomeren auftrennt, oder

5

- f) die nach den Verfahren a), b), c), d) oder e) hergestellte Verbindung der Formel I entweder in freier Form isoliert oder im Falle des Vorliegens von sauren oder basischen Gruppen in physiologisch verträgliche Salze umwandelt.

10

5. Arzneimittel, gekennzeichnet durch einen wirksamen Gehalt an mindestens einer Verbindung der Formel I gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3 zusammen mit einem pharmazeutisch geeigneten und physiologisch verträglichen Trägerstoff, Zusatzstoff und/oder anderen Wirk- und Hilfsstoffen.

15

6. Verwendung von mindestens einer Verbindung der Formel I gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, zur Herstellung von Arzneimitteln zur Prophylaxe und Therapie von Erkrankungen, an deren Verlauf eine verstärkte Aktivität von Matrix-abbauenden Metalloproteinasen beteiligt ist.

20

7. Verwendung gemäß Anspruch 6, zur Behandlung von degenerativen Gelenkerkrankungen wie Osteoarthrosen, Spondylosen, Knorpelschwund nach Gelenktrauma oder längerer Gelenksruhigstellung nach Meniskus- oder Patellaverletzungen oder Bänderrissen, Erkrankungen des Bindegewebes wie Kollagenosen, Periodontalerkrankungen, Wundheilungsstörungen und chronische Erkrankungen des Bewegungsapparates wie entzündliche, immunologisch oder stoffwechselbedingte akute und chronische Arthritiden, Arthropathien, Myalgien und Störungen des Knochenstoffwechsels, der Ulceration, Atherosklerose und Stenosen, aber auch zur Behandlung von Entzündungen, Krebserkrankungen, Tumormetastasenbildung, Kachexie, Anorexie und septischem Schock.

25

30

8. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, dadurch gekennzeichnet, daß

man mindestens eine Verbindung der Formel I gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3 mit einem pharmazeutisch geeigneten und physiologisch verträglichen Träger und gegebenenfalls weiteren geeigneten Wirk-, Zusatz- oder Hilfsstoffen in eine geeignete Darreichungsform bringt.