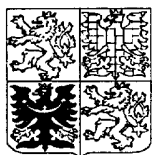


# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 286 364

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1994 - 964

(22) Přihlášeno: 21.04.1994

(30) Právo přednosti:  
23.04.1993 JP 1993/98058

(40) Zveřejněno: 16.11.1994  
(Věstník č. 11/1994)

(47) Uděleno: 27.01.2000

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 15.03.2000  
(Věstník č. 3/2000)

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>:

C 07 F 9/655

C 12 P 17/06

A 61 K 31/665

A 61 P 7/00

(73) Majitel patentu:

Sankyo Company Limited, Tokyo,  
JP;

(72) Původce vynálezu:

Sugimura Yukio, Tokyo, JP;  
Shibata Tomoyuki, Tokyo, JP;  
Tamaki Kazuhiko, Tokyo, JP;  
Kurihara Shinwa, Tokyo, JP;  
Kohama Takafumi, Tokyo, JP;  
Shiraishi Akio, Tokyo, JP;  
Kobayashi Tomowo, Tokyo, JP;  
Sasagawa Kazuhiko, Tokyo, JP;  
Shimazaki Naomi, Tokyo, JP;

(74) Zástupce:

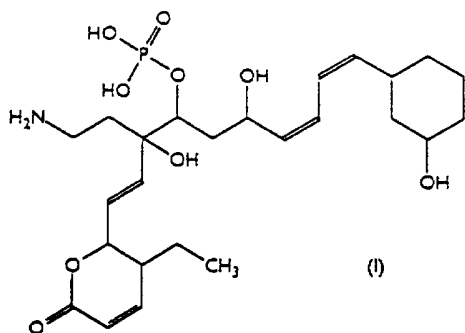
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1,  
110 00;

(54) Název vynálezu:

**Leustroductsin H, způsob výroby a  
farmaceutické prostředky s jeho obsahem**

(57) Anotace:

Leustroductsin H vzorce I a farmaceuticky přijatelné soli. Tato sloučenina může být vyrobena hydrolyzou přírodně se vyskytujících Leustroductsinů a používána k léčbě nebo prevenci trombocytopenie.



CZ 286364 B6

**Leustroductsin H, způsob výroby a farmaceutické prostředky s jeho obsahem**Oblast techniky

5

Vynález předkládá novou sloučeninu, nazvanou Leustroductsin H, jejíž složení vyjadřuje vzorec I, uvedený dále. Vynález rovněž zahrnuje způsob výroby této sloučeniny a prostředky které ji obsahují.

10

Látka, předkládaná vynálezem, je novou sloučeninou, která stimuluje tvorbu krevních destiček, což lze využít k léčbě trombocytopenie.

Dosavadní stav techniky

15

Trombocytopenii mohou vyvolat různé příčiny, jako imunitní abnormality nebo nepříznivé reakce po ozařování nebo chemoterapii rakoviny. Jedná se o vážné onemocnění, které v případě zhoršení působí tělní krvácení a může končit smrtelně. Až dosud je jediným spolehlivým způsobem léčby trombocytopenie symptomatická terapie, zahrnující transfuzi krevních destiček.

20

V současné době jsou známy různé typy cytokinů, které vykazují hematopoietickou aktivitu. Patří mezi ně některé interleukiny, například interleukin 6 (dále uváděný jako IL-6), interleukin 11 (dále jen IL-11) a faktor inhibující leukemii (leukemia inhibitory factor, dále jen LIF). Kromě dalších aktivit mohou tyto sloučeniny stimulovat tvorbu krevních destiček a jako takové by mohly být klinicky využívány (Ishibashi se spol., Blood 74, 1241-1244, 1989, Asano se spol., Blood 75, 1602-1605, 1990; Okada se spol., Blood Tumor 22, 23-31, 1991).

25

Bylo zjištěno, že u lidí vyvolává podání samotných těchto látek různými způsoby aplikace zřetelné farmakologické účinky, které naznačují možné využití uvedených sloučenin v terapii. Je však známo, že je určité typy buněk vytvářejí pouze in vivo (např. lymfocyty, monocyty, fibroblasty, cévní endoteliální buňky a stromatické buňky), prostřednictvím komplikovaného regulačního systému, a že tyto látky působí homeostaticky při vývoji různých typů krevních buněk. Pokud by byly podávány bez ohledu na citlivou rovnováhu regulačního mechanismu, mohly by se projevit různé vedlejší účinky, vyvolané narušením tohoto regulačního mechanismu. Příkladem může být poškození jaterní tkáně, úbytek váhy, horečka a zimnice.

30

35

Je také známo, že různé druhy imunomodulátorů o nízké molekulové hmotnosti, jako jsou např. muramylđipeptidy (dále uváděné jako MDP), mohou zvýšit celkový počet krevních destiček (R. Nakajima se spol., Arzneimittelforsch./Drug Research 41, 60-65, 1989). Předpokládá se, že tyto látky nepřímo stimulují tvorbu IL-6 prostřednictvím aktivace monocytů a makrofágů. Vzniklý IL-6 pak vyvolává zvýšení počtu trombocytů. Současně však byly pozorovány i další, možná méně vítané fyziologické účinky, způsobené aktivací makrofágů, například tvorba monokinů, jako je interleukin 1 (IL-1) a faktor nekrosy tumorů (tumor necrosis factor, TNF). Vyskytly se i nepříznivé reakce jako třeba horečka (Jap. J. Radiotherapy 48 (4), 514, 1988).

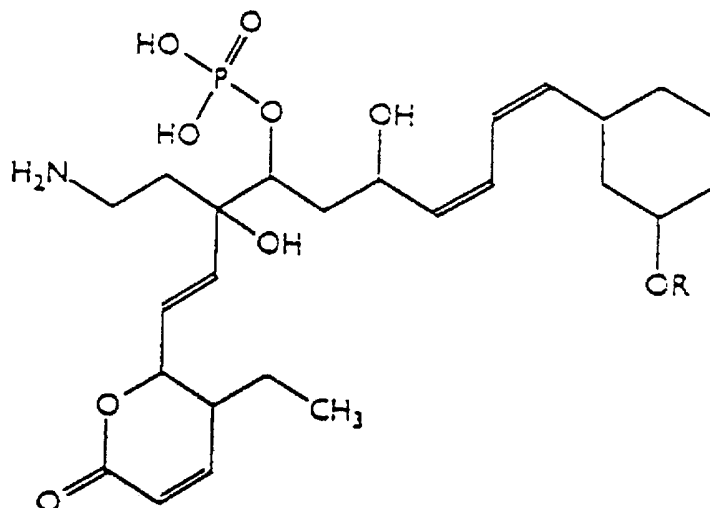
40

45

Je zřejmé, že přetrvává potřeba činidla, které by stimulovalo tvorbu krevních destiček a bylo by tak využitelné k léčbě trombocytopenie, které by však současně nenarušovalo rovnováhu žádného vnitřního regulačního mechanismu a nepůsobilo výše popsané nepříznivé reakce.

50

Evropský patent č. 506 463 uvádí některé nové deriváty pyranonu, nazvané Leustroductsin A, B a C, mající následující vzorec:



5 kde R znamená 5-methylhexanoylovou, 6-methyloxanoylovou nebo 7-methyloxanoylovou skupinu. Tyto látky, izolované z mikroorganismu kmene *Streptomyces platensis*, projevují aktivitu v oblasti snižování nepříznivých reakcí, vznikajících při ozařování nebo chemoterapii rakoviny, v oblasti ochrany proti infekcím, při aktivaci makrofágů, při zlepšování mozkových funkcí a působí i proti houbovým onemocněním.

10 Japonský patent Hei 5 - 213758, který byl zveřejněn 24. srpna 1993, popisuje použití Leustroductsinu A, B a C při léčbě trombocytopoesy.

15 Evropský patent č. 329 361 se zabývá určitými novými deriváty 2-pyranonu, které se podobají sloučenině, o níž pojednává tento vynález; liší se však tím že jsou substituovány podobným způsobem jako sloučeniny, popsané v evropském patentu č. 506 463, viz výše. Tyto dříve patentované sloučeniny jsou však označeny pouze jako zemědělské biocidy a nejsou v patentu uváděny jako látky se značnou a neočekávanou terapeutickou a profylaktickou aktivitou, jako látky předkládané tímto vynálezem.

20 Další sloučeniny, velmi podobné těm, které uvádí evropský patent č. 329 361 a se stejným použitím, jsou popsány v japonském patentu Kokai Hei 2 - 186.

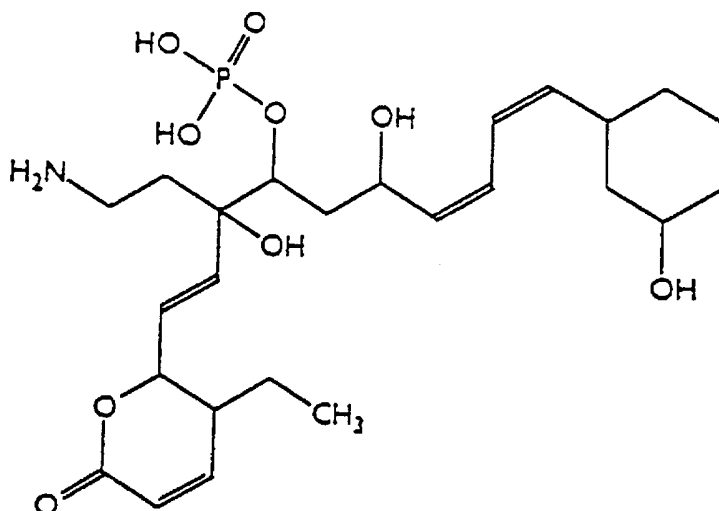
25 Časopis *Journal of Antibiotics* č. 42, str. 1331-1343, z roku 1989, předkládá novou protirakovinnou sloučeninu, nazývanou autory "fosfolin", kterou produkují mikroorganismy rodu *Streptomyces*. Tato látka obsahuje, stejně jako sloučenina předkládaná tímto vynálezem, jak fosfátovou skupinu, tak aminoskupinu, ale liší se molekulovým vzorcem. Je proto od sloučeniny popisované tímto vynálezem snadno odlišitelná.

### 30 Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je nový leustroductsin se značnou farmakologickou aktivitou.

35 Předpokládá se, že sloučenina podle vynálezu bude mít značné uplatnění v léčbě trombocytopenie, vyvolané zejména chemoterapií nebo ozařováním při léčení rakoviny a imunitními odchylkami.

Vynález tedy předkládá sloučeninu vzorce I:



(I)

a její farmaceuticky vhodné soli. Tato sloučenina byla nazvána Leustroductsin H.

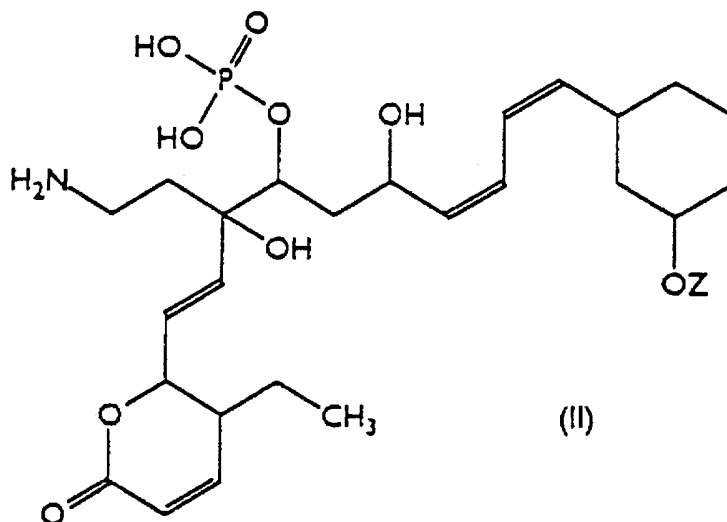
- 5 Vynález dále zahrnuje i způsob výroby Leustroductsinu H, který bude podrobněji popsán dále.

Vynález také předkládá farmaceutický přípravek, obsahující Leustroductsin H nebo jeho farmaceuticky vhodnou sůl, ve směsi s farmaceuticky vhodným rozpouštědlem nebo nosičem.

- 10 Z výše uvedeného vzorce je zřejmé, že leustroductsin podle tohoto vynálezu obsahuje množství asymetrických uhlíkových atomů a několik dvojných vazeb. Může tedy vytvářet různé optické a geometrické isomery. I když jsou zde všechny zastoupeny jedním molekulovým vzorcem, předkládaný vynález zahrnuje všechny jednotlivé izolované isomery a směsi, včetně jejich racemátů. V případě použití stereospecifických metod syntézy nebo při využití opticky  
15 aktivních látek jako výchozího materiálu mohou být jednotlivé isomery připravovány přímo. Pokud je však připravena směs isomerů, mohou být jednotlivé isomery získány konvenčními dělicími metodami.

- Leustroductsin podle předkládaného vynálezu obsahuje jak kyselou skupinu (fosfátovou), tak  
20 i zásaditou skupinu (aminoskupinu) a může tak vytvářet sole. Pokud mají být použity pro léčebné účely, není povaha těchto solí, za předpokladu, že jsou farmaceuticky vhodné, ničím zvláště omezena a omezení se rovněž neuplatňuje, pokud jsou určeny pro neléčebné účely, tj. jako meziprodukty pro přípravu dalších a možná aktivnějších sloučenin. Látky podle tohoto vynálezu mohou tvořit soli se zásaditými látkami. Příkladem takových solí jsou: soli s alkalickým kovem,  
25 jako je sodík draslík nebo lithium, soli s kovy alkalických zemin, například s bariem nebo kalciumem, soli s jiným kovem, jako s hořčíkem nebo hliníkem, dále soli organických bází, jakou je například sůl dicyklohexylaminu a také soli se zásaditou aminokyselinou, například lysinem nebo argininem. Sloučeniny podle předkládaného vynálezu mohou tvořit i kyselé adiční sole. Jejich příkladem jsou soli s minerálními kyselinami, zvláště s hydrogenovanými kyselinami  
30 halových prvků (s kyselinou bromovodíkovou, jodovodíkovou nebo chlorovodíkovou), s kyselinou dusičnou, chloristou, uhličitou, sírovou nebo fosforečnou; soli s nižšími alkylsulfonovými kyselinami jako s methansulfonovou, trifluormethansulfonovou či s ethansulfonovou kyselinou, soli s arylsulfonovými kyselinami, například s benzensulfonovou nebo p-toluensulfonovou kyselinou, soli s organickými karboxylovými kyselinami, jako octovou,  
35 fumarovou, vinnou, šťavelovou, maleinovou, jablečnou, jantarovou nebo s kyselinou citronovou, také soli s aminokyselinami, s kyselinou glutamovou nebo asparagovou.

Leustroducsin podle tohoto vynálezu může být připravován hydrolyzou sloučeniny vzorce II nebo její soli:



5

kde Z je skupina acylu, doprovázená případně další tvorbou solí ze získané sloučeniny.

Hydrolytická reakce může být prováděna za použití kteréhokoli hydrolytického činidla, obecně  
 10 užívaného při reakcích tohoto typu, jako například hydrolytického enzymu nebo zásaditého  
 činidla. Ve výše uvedeném vzorci (II) představuje Z acylovou skupinu. Přesný charakter acylové  
 skupiny není pro tento vynález podstatný, pokud může být hydrolyticky odstraněna tak, aby byla  
 získána sloučenina podle vzorce (I). Obecně bylo zjištěno, že vhodným výchozím materiálem  
 15 jsou sloučeniny, kde Z představuje rovný nebo větvený řetězec alifatické acylové skupiny, anebo  
 cyklickou alifatickou acylovou skupinu, obsahující 2 až 16 uhlíkových atomů. Pokud Z  
 představuje takovouto acylovou skupinu, může jít například o butyryl-, isobutyryl-, isovaleryl-,  
 2-methylbutyryl-, 4-methylvaleryl-, cyklohexankarbonyl-, 4-methylhexanoyl-, 5-methyl-  
 15 hexanoyl-, 6-methylheptanoyl-, cyklohexylethylkarbonyl-, oktanoyl-, 6-methyloktanoyl nebo  
 7-methyloktanoylovou skupinu.

20 Sloučeniny vzorce II, používané jako výchozí látky při způsobu výroby, popsaném tímto  
 vynálezem, u nichž Z představuje isobutyrylovou, isovalerylovou, 4-methylvalerylovou,  
 cyklohexankarbonylovou nebo 4-methylhexanoylovou skupinu, jsou známy a jsou popsány  
 například v Journal of Antibiotics 42, z roku 1989, na str. 1019-1036.

25 Sloučeniny podle vzorce II, používané jako výchozí látky při způsobu výroby, popsaném tímto  
 vynálezem, u nichž Z představuje butyrylovou, isobutyrylovou, isovalerylovou, 2-methyl-  
 butyrylovou, cyklohexankarbonylovou, 4-methylhexanoylovou, 6-methylheptanoylovou,  
 cyklohexylethylkarbonylovou nebo oktanoylovou skupinu, jsou známy a zveřejněny například  
 30 v evropském patentu číslo 329 361. Výchozí materiál, v němž Z je jednou z uvedených skupin,  
 může být připraven kultivací mikroorganismu rodu Streptomyces platensis SAM 0654 a separací  
 žádané sloučeniny z kultivačního roztoku. Streptomyces platensis SAM 0654 byl ve spojitosti  
 s evropským patentem číslo 329 361 uložen dne 22. ledna 1988 ve Výzkumném ústavu kvasném  
 Agentury pro průmyslovou vědu a techniku (Fermentation Research Institute, Agency of  
 Industrial Science and Technology) pod číslem FERM BP-1668. Vhodné techniky kultivace  
 35 mikroorganismu a separace požadované sloučeniny podává evropský patent číslo 329 361.

Sloučeniny vzorce II, kde Z představuje 5-methylhexanoyl-, 6-methyloktanoyl-, nebo 7-  
 methyloktanoylovou skupinu jsou rovněž známy a jsou popsány například v evropském patentu  
 číslo 506 463.

Sloučeniny vzorce II, používané jako výchozí látky při způsobu výroby, popsaném tímto vynálezem, u nichž Z představuje 4-methylhexanoylovou, 5-methylhexanoylovou, 6-methylheptanoylovou, cyklohexylethylkarbonylovou, oktanoylovou, 6-methyloktanoylovou nebo 7-methyloktanoylovou skupinu, jsou známé a mohou být připraveny například kultivací *Streptomyces platensis* SANK 60191 a následnou separací z kultivačního média. Vhodné podmínky pro kultivaci tohoto mikroorganismu udává například evropský patent číslo 506 463. *Streptomyces platensis* SANK 60191 byl ve spojitosti s evropským patentem číslo 506 463 uložen dne 20. února 1991 ve Výzkumném ústavu kvasném Agentury pro průmyslovou vědu a techniku (Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology) pod číslem FERM BP-3288.

#### Způsob 1: Použití hydrolytického enzymu

Za použití tohoto způsobu výroby je sloučenina vzorce I připravena reakcí sloučeniny vzorce II s hydrolytickým enzymem.

Přesná charakteristika enzymu není pro tento vynález nezbytná, může být použit kterýkoli hydrolytický enzym, běžně užívaný k reakcím tohoto typu. Obecně se dává přednost enzymům jako je vepřová jaterní esterasa (porcine liver esterase, PLE), lipasa, acetylesterasa, Takadiastasa nebo cholesterolsterasa.

Reakce se běžně a s výhodou provádí v přítomnosti rozpouštědla. Charakter použitého solventu není nijak zvláště vymezen za předpokladu, že na reakci nebo v ní zúčastněné reagenty nepůsobí nepříznivě a že je schopen tyto reagenty rozpouštět, alespoň do určité míry. Mezi příklady vhodného rozpouštědla patří: směs alkoholu, jako methanolu nebo ethanolu, s roztokem pufru, nejlépe fosfátového, o hodnotě pH přibližně mezi 6 a 8, nebo směs ketonu, např. acetonu nebo methylethylketonu, s roztokem pufru, nejlépe fosfátového, o hodnotě pH přibližně mezi 6 a 8.

Zvláštní přednost se dává takové reakci, která využívá buď PLE nebo lipasy jako hydrolytického enzymu v prostředí rozpouštědla, které obsahuje směs fosfátového pufru o pH 6 až 8 s acetonem nebo methanolem.

Reakce může probíhat v širokém teplotním rozmezí a přesná reakční teplota není pro tento vynález podstatná, ačkoli doporučená teplota může kolísat v závislosti na typu výchozí sloučeniny a použitého enzymu, stejně jako na druhu rozpouštědla. Obecně je výhodné, aby reakce probíhala při teplotě mezi přibližně 10 °C a 40 °C, s výhodou mezi 20 °C a 40 °C.

Doba průběhu reakce může také široce kolísat v závislosti na množství faktorů, zvláště reakční teplotě a typu výchozích sloučenin, použitého enzymu a rozpouštědla. Za předpokladu, že reakce probíhá za vhodných podmínek popsaných výše, dostatečnou dobou bude obvykle 12 hodin až 30 dní, s výhodou pak 3 až 15 dní.

Po skončení reakce může být sloučenina podle vzorce (I) extrahována z reakční směsi a vyčištěna za použití běžných metod. Vhodný postup zahrnuje například odstranění s vodou mísitelného rozpouštědla, např. acetonu, destilací za sníženého tlaku a následnou extrakci vodné fáze organickým rozpouštědlem, například ethylacetátem. Poté může následovat frakcionace a vyčištění vodné fáze například za použití Cosmosilu<sup>(R)</sup> v otevřené koloně.

#### Způsob 2: Použití zásaditého činidla

Za použití tohoto způsobu výroby je sloučenina podle vzorce (I) připravena reakcí sloučeniny podle vzorce (II) se zásaditým činidlem.

Druh použitého zásaditého činidla nepodléhá zvláštním omezením, může být použito kteréhokoliv zásaditého činidla běžně užívaného v reakcích tohoto typu, které nemá nepříznivé účinky na žádnou z částí molekuly nebo ostatní reagentie. Příklady zásaditých činidel, jimž se dává přednost, zahrnují: anorganické zásadité sloučeniny, například uhličitany alkalických kovů, jako uhličitany sodný, draselný, černý nebo lithný; hydrogenuhličitany alkalických kovů, jako hydrogenuhličitany sodný, draselný nebo lithný; hydroxidy alkalických kovů, jako hydroxid sodný, draselný nebo lithný; nebo hydroxidy kovů alkalických zemin, jako hydroxid barnatý, hořečnatý či vápenatý. Přednost se dává použití uhličitanu nebo hydrogenuhličitanu alkalického kovu, nejlépe uhličitanu sodnému, draselnému či hydrogenuhličitanu sodnému.

Reakce se běžně a s výhodou provádí v přítomnosti rozpouštědla. Charakter použitého rozpouštědla není nijak zvláště vymezen za předpokladu, že na reakci nebo v ní zúčastněná činidla nepůsobí nepříznivě a že je schopno tato činidla rozpouštět, alespoň do určité míry. Mezi příklady vhodného rozpouštědla patří: směs alkoholu (například methanolu nebo ethanolu) s vodou, nebo směs ketonu (jako acetonu methylethylketonu) s vodou.

Reakce může probíhat v širokém teplotním rozsahu a přesná reakční teplota není pro tento vynález podstatná, ačkoli doporučená teplota může kolísat v závislosti na typu výchozí sloučeniny a zásaditého činidla, tak i na druhu rozpouštědla. Obecně je výhodné, aby reakce probíhala při teplotě přibližně mezi 0 °C a 40 °C, s výhodou přibližně mezi 5 °C do 30 °C.

Doba průběhu reakce může také široce kolísat v závislosti na množství faktorů, zvláště reakční teplotě a typu výchozích sloučenin, zásaditého činidla a rozpouštědla. Za předpokladu, že reakce probíhá za vhodných podmínek popsanych výše, doba od 3 hodin do 5 dnů, s výhodou pak od 3 hodin do 2 dnů bude obvykle postačující.

Po skončení reakce může být sloučenina vzorce 1 extrahována z reakční směsi a vyčištěna za použití běžných metod. Vhodný postup zahrnuje například odstranění s vodou mísitelného rozpouštědla, např. acetonu, destilací za sníženého tlaku a následnou extrakci vodné fáze organickým rozpouštědlem, například ethylacetátem. Poté může následovat frakcionace a vyčištění vodné fáze například za použití Cosmosilu<sup>(R)</sup> v otevřené koloně.

### Biologická aktivita

Následující příklady dokládají aktivitu sloučeniny podle tohoto vynálezu jako trombopoietického činidla. Výrazem "trombopoietické činidlo" se v tomto vynálezu rozumí látka, která po podání vyvolává v těle tvorbu krevních destiček in vivo, stejně jako látka, kterou lze využít k léčení trombocytopenie, způsobené různými příčinami, jako imunitními odchylkami a nepříznivými reakcemi po ozařování nebo chemoterapii rakoviny.

### Pokus 1

#### Zvýšení trombocytopenie u myši po intravenosním podání Leustroducsinu H

Trombopoietická aktivita sloučeniny podle tohoto vynálezu může být sledována za použití metody Ishibashiho a spolupracovníků, popsané v časopisu Blood 74 z roku 1989, na stranách 1241-1244.

Pokus probíhal tak, že testovaná sloučenina podle tohoto vynálezu byla rozpuštěna ve fyziologickém roztoku, obsahujícím 1,25 objemových % vodného roztoku ethanolu. Vzorek této směsi byl po dobu 5 dnů podáván intravenosně myším kmene C57BL (samici 7 týdnů starým) v intervalu 24 hodin. Kontrolní zvířata dostávala pouze fyziologický roztok s 1,25 objem. %

vodného roztoku ethanolu. 72 hodin po poslední aplikaci byly zvířatům odebrány vzorky krve z očního orbitu a byly v nich spočítány krevní destičky. Stanovení se provádělo elektrickou odporovou metodou za použití automatického počítače krevních buněk (Blood cell counter K-1000, Toa-Iyo Denshi Co.). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

5

Přesné reakční podmínky uvedené výše nejsou pro stanovení počtu krevních destiček zásadní, změny se mohou týkat například použitých zvířat, způsobu podání látky, celkové doby testování nebo intervalu aplikace. Testovanými zvířaty mohou být myši, potkani, psi nebo opice a testované látky lze podávat parenterálně, intraperitoneálně, intramuskulárně nebo subkutánně.

10

Tabulka 1

| sloučenina      | dávka<br>(mg/kg) | doba testování<br>(dny) | počet destiček<br>( $\times 10^4/\mu\text{l}$ ) |
|-----------------|------------------|-------------------------|---|
| kontrola        | 0                | 5                       | 93,31 $\pm$ 6,34*                               |
| Leustroducsin H | 0,05             | 5                       | 130,08 $\pm$ 1,67                               |
|                 | 0,1              | 5                       | 125,71 $\pm$ 6,60                               |
|                 | 0,5              | 5                       | 121,18 $\pm$ 9,22                               |
|                 | 1,0              | 5                       | 127,70 $\pm$ 3,34                               |

15

20

\* = průměr  $\pm$  standardní chyba

25

## Pokus 2

### Studie toxicity

30

4 mg/kg Leustroducsinu H bylo intravenosně podáno myším kmene BALB/c. Po 10 dnech nebyla pozorována žádná úmrtí.

35

Z výše uvedených výsledků je zřejmé, že Leustroducsin H podle tohoto vynálezu vykazuje vynikající trombopoietickou aktivitu in vivo spolu s nízkou toxicitou a jako takový je užitečný jako terapeutický prostředek k léčení trombocytopenie, způsobené různými příčinami, například imunitními odchylkami a nepříznivými reakcemi po ozařování nebo chemoterapii rakoviny.

40

K tomuto účelu může být sloučenina podle vzorce (I) podávána orálně ve formě tablet, kapslí, granulí, prášků nebo sirupů nebo parenterálně v intravenosních, subkutánních či intramuskulárních injekcích, v čípcích a podobně. Toto farmaceutické zpracování může být provedeno smísením sloučenin podle vynálezu s jedním či více adjuvantními prostředky, jako jsou pomocné látky (například organické pomocné látky včetně: derivátů cukrů jako je laktosa, sacharosa, glukosa, mannitol nebo sorbitol; derivátů škrobu jako je kukuřičný škrob, bramborová moučka, škrob  $\alpha$ , dextrin nebo karboxymethylovaný škrob; derivátů celulózy jako je krystalická celulóza, níže hydroxypropyl- substituovaná celulóza, hydroxypropylmethylcelulóza, karboxymethylcelulóza, vápenatá karboxymethylcelulóza nebo vnitřními můstky vázaná sodná karboxymethylcelulóza; arabské gumy; dextranu; Pullulanu; dále anorganické pomocné látky včetně: křemičitanů, jako je lehký anhydrid kyseliny křemičité a syntetický křemičitan hlinitý nebo metakřemičitan hořečnatohlinitý; fosforečnanů jako je fosforečnan vápenatý; uhličitanů, jako je uhličitan vápenatý; síranů, jako je síran vápenatý); kluzné látky, (například stearáty kovů alkalických zemin, jako je kyselina stearová, stearát vápenatý nebo hořečnatý; talek; koloidní křemík; vosk, jako je včelí vosk nebo vorvaňovina; kyselina boritá, kyselina adipová; sírany,

50

jako je síran sodný; glykol; kyselina fumarová; benzoan sodný; D,L-leucin; sodné soli alifatických kyselin; laurylsulfáty, jako je laurylsulfát sodný nebo hořečnatý; křemičitany, jako je anhydrid kyseliny borité nebo její hydrát; dříve zmíněné škrobové deriváty); pojiva (například polyvinylpyridon, Macrogol; také sloučeniny podobné jmenovaným pomocným látkám);  
 5 desintegrační činidla (například sloučeniny, podobné uvedeným pomocným látkám; chemicky modifikované škrobové celulózy, jako je sodná Crosscarmelosa, sodný karboxymethylový škrob nebo zesítený polyvinylpyrrolidon), stabilizační činidla (například p-hydroxybenzoáty, jako je methylparabenoát nebo propylparabenoát; alkoholy jako je chlorobutanol, benzylalkohol nebo fenylethylalkohol; chlorid benzalkonia; fenoly, jako je fenol nebo kresol; thimerosal; kyselina  
 10 dehydrooctová; kyselina sorbová); doplňková činidla (například sladidla, ocet nebo parfémy, které se běžně užívají), rozpouštědla a podobně.

Dávka se mění v závislosti na podmínkách a věku pacienta a také vzhledem ke způsobu podání, ovšem například sloučeniny podle tohoto vynálezu mohou být podávány v denní dávce od 0,01  
 15 do 10 mg/kg (s výhodou 0,01 až 1 mg/kg) buď jednorázově nebo odděleně v několika dávkách.

#### Příklady provedení vynálezu

20 Příprava některých sloučenin podle vynálezu je dále zobrazena v následujících Příkladech. Oddíl Způsob výroby ukazuje přípravu některých látek, použitých v Příkladech jako výchozího materiálu.

#### 25 Příklad 1

5,61 g surové olejovité látky, získané ve stupni B Způsobu výroby 1, viz dále, bylo rozpuštěno ve 130 ml acetonu. Poté bylo přidáno 1400 ml 0,05 M fosfátového pufru ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 6,7) a výsledná směs byla dobře promíchána. Po přidavku 807 mg vepřové jaterní esterasy (PLE,  
 30 výroba Amano Pharm, Co., Ltd.) byla výsledná směs opět míchána při 35 °C. Retenční čas výchozího materiálu při vysokoučinné kapalinové chromatografii (HPLC) činí 8,8 minuty, což umožnilo sledovat pomocí této techniky postup reakce. V průběhu 2 týdnů byla při 35 °C k reakční směsi přidána PLE v množství 0,82 g, 1,52 g, 1,02 g, a 0,9 g a výsledná směs byla 2 týdny míchána. Poté byla reakční směs zfiltrována přes pomocný filtr Celite<sup>(R)</sup> k odstranění  
 35 PLE. Filtrát byl extrahován ethylacetátem a vodný podíl byl frakcionován a chromatograficky vyčištěn průchodem přes kolonu s 400 g Cosmosilu 75C18-OPN (R výrobek firmy Nakaraitesque Inc.) za použití vodného roztoku methanolu jako eluentu, čímž se získalo 1,73 g Leustroductsinu H.

40 HPLC probíhala za následujících podmínek:

kolona: Cosmosil 5C18-AR<sup>TM</sup> 4,6 x 250 mm;  
 (výrobek Nakaraitesque Inc.)

45 eluční roztok: 20 objem. % acetonitrilu : 0,5 objem. % triethylaminu: 79,5 objem. % fosfátového pufru (pH 3,0);

průtoková rychlost: 1,0 ml/min.;

vlnová délka: 230 nm.

50 Hmotnostní spektrum při ostřelování pomalými atomy:  $m/z = 530 (m+1)$ , 528 ( $m-1$ )

Spektrum nukleární magnetické resonance

(270 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm:

7,02 (1H, dublet dubletů, J=5,4 & 9,8 Hz); 6,21 (1H, dublet dubletů, J=11,7 & 20,5 Hz); 6,12 (1H, dublet dubletů, J=12,2 & 20,5 Hz); 5,93-5,84 (2H, multiplet); 5,71 (1H, dublet, J=16,6 Hz); 5,32-5,25 (2H, multiplet); 3,94 (1H, dublet tripletů, J=3,4 & 10,3 Hz); 3,48 (1H, multiplet); 2,93 (2H, triplet, J=7,8 Hz); 2,53-2,40 (2H, multiplet); 2,03 (1H, multiplet); 1,80 0,73 (13H, multiplet), 0,73 (3H, triplet, J=7,8 Hz).

#### Příklad 2

20 mg sloučeniny podle dříve uvedeného vzorce II, kde Z je 4-methylhexanoylová skupina [připravená podle bodu B odstavce Způsob výroby 1], bylo rozpuštěno v malém množství methanolu. Po zředění výsledného roztoku fosfátovým pufrům (pH 6,7) do něho bylo přidáno 10 mg PLE (výrobek firmy Amano Pharm, Co., Ltd.) a reakční směs byla po 6 dnů míchána při teplotě 30 °C. Poté byla zfiltrována a veškerý zbývající methanol byl z filtrátu odstraněn destilací za sníženého tlaku. Vzniklý vodný roztok byl frakcionován a vyčištěn průchodem přes kolonu C18-Cosmosilu za užití vodného roztoku methanolu jako eluentu. Podíl, eluovaný pomocí 20 objemových % vodného methanolu, obsahoval 13 mg sloučeniny o fyzikálních vlastnostech shodných se sloučeninou, získanou podle výše uvedeného Příkladu 1.

#### Příklad 3

Použitý způsob výroby byl podobný jako v Příkladu 2, ale z výchozího množství 50 mg sloučeniny podle dříve uvedeného vzorce II, kde Z je 4-methylhexanoylová skupina [připravená podle Stupně B odstavce Způsob výroby 1], bylo získáno 30 mg Leustroducsinu H.

Leustroducsin H o stejných vlastnostech, jaké byly popsány výše v Příkladu 1, byl za využití způsobu uvedeného v Příkladu 2 připraven ze sloučeniny o vzorci II, v němž Z představuje následující skupiny (viz tabulka II). Množství výchozího materiálu a sloučeniny podle tohoto vynálezu, které byly získány, jsou rovněž uvedeny v této tabulce.

Tabulka 2

| příklad č. | Z                  | množství<br>výchozí látky | výtěžek |
|------------|--------------------|---------------------------|---------|
| 4          | isobutyryl         | 20 mg                     | 14 mg   |
| 5          | isovaleryl         | 20 mg                     | 14 mg   |
| 6          | 2-methylbutyryl    | 20 mg                     | 10 mg   |
| 7          | cyklohexankarbonyl | 20 mg                     | 8 mg    |

#### Příklad 4

20 mg sloučeniny vzorce II, kde Z je 6-methylheptanoylová skupina [připravená podle bodu B odstavce Způsob výroby 1], bylo rozpuštěno v malém objemu vodného roztoku methanolu. Poté byl přidán nasycený vodný roztok dihydrogenuhličitanu sodného a výsledný roztok byl míchán po dobu 1 dne. Hodnota pH reakční směsi byla po této době upravena přidávkem vhodného množství zředěné kyseliny chlorovodíkové na pH 2 a výsledná směs byla frakcionována a vyčištěna průchodem přes kolonu C18-Cosmosilu se získáním 3 mg Leustroducsinu H.

## Způsob výroby 1

## Kultivace a izolace výchozích látek

## 5 1(A) Kultivace

Jedna platinová plná bakteriální klička spor *Streptomyces platensis* SANK 60191 (FERM BP - 3288) byla naočkována do 500 ml Erlenmeyerovy baňky vybavené přepážkami, která obsahovala předem sterilizované kultivační médium o složení uvedeném dále. Mikroorganismus byl 10 kultivován po 3 dny v rotační třepačce při 200 otáčkách za minutu (poloměr rotace 7 cm) a při teplotě 28 °C.

## Kultivační médium:

|    |                                |         |
|----|--------------------------------|---------|
| 15 | rozpuštěný škrob               | 30 g    |
|    | surové kvasinky                | 10 g    |
|    | sojová moučka                  | 7 g     |
|    | rybí moučka                    | 5 g     |
|    | obilný výluh (corn steep liq.) | 2 g     |
| 20 | masový extrakt                 | 1 g     |
|    | uhličitan vápenatý             | 1 g     |
|    | voda do                        | 1000 ml |

## pH 7 (před sterilizací)

25 15 litrů stejného kultivačního média, 30 minut tepelně sterilizovaného při 120 °C, bylo použito pro nasazení kultury do každého ze čtyř 30 litrových nerezových kvasných tanků. Po přidání 150 ml očkovací kultury, připravené podle předchozího popisu, byla směs 3 dny kultivována při teplotě 28 °C, za provzdušňování (rychlost 15 litrů za minutu) a míchání. K udržení koncentrace 30 kyslíku v roztoku na hodnotě 5 ppm byla rychlost míchání upravována automaticky v rozmezí 100 až 300 otáček za minutu.

## 1(B) Izolace

35 2,4 kg Celitu 545 (výrobní název produktu Johns & Manville Project Corporation, USA) bylo přidáno jako pomocný filtr k 60 litrům kultivační tekutiny, připravené jak bylo popsáno výše v odstavci 1(A) a směs byla zfiltrována. Filtrací se získalo 7,2 kg bakteriálních buněk. Ty byly jednou extrahovány 30 litry 50 % a dvakrát pomocí vždy 20 litrů 80 % (objem. procenta) vodného roztoku acetonu.

40 Všechny extrakty byly spojeny a organické rozpouštědlo bylo odstraněno destilací v rotační odparce. Ke zbytku byla přidána dostatečně zředěná kyselina chlorovodíková k úpravě pH na hodnotu 2,0 a vzniklá směs byla dvakrát extrahována vždy 10 litry ethylacetátu. Po spojení 45 extraktů k nim bylo přidáno 10 litrů 1 % (váha/objem) vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného. Aktivní podíly přešly do vodné vrstvy, ethylacetát byl oddělen a znovu extrahován 5 litry 1 % vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného. Obě části použitého roztoku hydrogenuhličitanu sodného byly pak spojeny a jejich pH bylo přidávkem zředěné kyseliny chlorovodíkové upraveno na hodnotu 2,0. Výsledný roztok byl dvakrát extrahován vždy 10 litry ethylacetátu. Organické extrakty byly spojeny, promyty vodou a nasyceným vodným roztokem 50 chloridu sodného a vysušeny v přítomnosti bezvodého síranu sodného. Za stálého přidávání methanolu byl roztok zahuštěn odpařením na rotační odparce za sníženého tlaku k zisku 10 ml olejovité látky. Ta byla rozpuštěna ve 100 ml 60 % (objem. procenta) vodném roztoku methanolu a vzniklý roztok byl adsorbován na patrony Sep-Pak Vac 20 cc C<sub>18</sub> (chráněný název výrobku firmy Waters Co., USA). Nečistoty byly vymyty 30 ml 60 % (objem. %) vodného roztoku

methanolu. Leustroducsiny byly uvolněny promytím 15 ml 100 % methanolu a eluát byl zahuštěn k získání 800 mg olejovité látky. Ta byla použita přímo, bez dalšího čištění, ve výše uvedeném Příkladu 1. Aby mohla být vyčištěna, byla tato olejovitá látka rozpuštěna v 10 ml methanolu a dělena pomocí HPLC. Podíly, vykazující maximum v elučním čas 13, 19 a 24 minut, byly zachyceny a označeny jako "hrubý podíl A", "hrubý podíl B" a "hrubý podíl C". Podmínky pro chromatografické dělení jsou následovné:

#### Preparativní kapalinová chromatografie

10 kolona: Radial-Pak 25 x 10 (Waters, USA);  
 eluční činidlo: 50 % (objem. %) vodný roztok acetonitrilu,  
 obsahující 0,5 % roztok triethylamin - fosfátového pufru o pH 3,0;  
 průtoková rychlost: 9 ml/min.;  
 vlnová délka: 230 nm.

15 Všechny tři uvedené podíly byly zahuštěny a děleny pomocí preparativní HPLC. Hrubý podíl A byl podroben preparativní chromatografii, při níž byly odebírány podíly, jejichž maxima byla zaznamenána za dále uvedených podmínek přibližně v 53. a v 56. minutě; ty byly poté odsoleny a zahuštěny za použití patron Sep-Pak se ziskem 22,03 mg sloučeniny podle vzorce (II), kde Z je 4-methylhexanoylová skupina, a 11,66 mg Leustroducsinu A.

#### Podmínky přípravy hrubé frakce A

25 kolona: Cosmosil 5C 18-AR 20 x 250 mm (Nakaraitesque Inc.)  
 eluční činidlo: 42 % (objem. %) vodný roztok acetonitrilu, obsahující 0,5 % roztok triethylamin - fosfátového pufru o pH 3,0;  
 průtoková rychlost: 9 ml/min.;  
 vlnová délka: 230 nm.

30 Hrubý podíl B byl podroben preparativní chromatografii, při níž byly odebírány podíly, jejichž maxima byla zaznamenána za dále uvedených podmínek přibližně v 74., 79. a 82. minutě; ty byly poté odsoleny a zahuštěny za použití patron Sep-Pak se ziskem 26,16 mg sloučeniny podle vzorce (II), kde Z je 6-methylheptanoylová skupina, 23,24 mg sloučeniny podle vzorce (II), kde Z je cyklohexylethylkarbonylová skupina a 3,24 mg sloučeniny podle vzorce (II), kde Z je oktanoylová skupina.

#### Podmínky přípravy hrubé frakce B

40 kolona: Cosmosil 5C 18-AR 20 x 250 mm (Nakaraitesque Inc.)  
 eluční činidlo: 47 % (objem. %) vodný roztok acetonitrilu, obsahující 0,5 % roztok triethylamin - fosfátového pufru o pH 3,0;  
 průtoková rychlost: 9 ml/min.;  
 vlnová délka: 230 nm.

45 Hrubý podíl C byl podroben preparativní chromatografii, při níž byly odebírány podíly, jejichž maxima byla zaznamenána za dále uvedených podmínek přibližně ve 47. a 51. minutě; ty byly poté odsoleny a zahuštěny za použití patron Sep-Pak se ziskem 9,83 mg Leustroducsinu B a 5,22 mg Leustroducsinu C.

#### 50 Podmínky přípravy hrubé frakce C

kolona: Cosmosil 5C 18-AR 20 x 250 mm (Nakaraitesque Inc.)  
 eluční činidlo: 47 % (objem. %) vodný roztok acetonitrilu, obsahující 0,5 % roztok triethylamin - fosfátového pufru o pH 3,0;

průtoková rychlost: 9 ml/min.;  
vlnová délka: 230 nm.

### Způsob výroby 2

5

Kultivace a izolace výchozích látek

Podle způsobu, popsaného v evropském patentu č. 329 361, byl kultivován *Streptomyces platensis* SAM-0654 (FERM BP-1668) a z kultivačního bujónu byly izolovány sloučeniny podle vzorce (II), kde Z představuje butyrylovou, isobutyrylovou, isovalerylovou, 2-methylbutyrylovou, cyklohexankarbonylovou, 4-methylhexanoylovou, 6-methylheptanoylovou, cyklohexylethylkarbonylovou nebo oktanoylovou skupinu.

10

### Zpracování 1

15

Výroba kapslí

|                   |          |
|-------------------|----------|
| Leustroducsin H   | 100 mg   |
| laktosa           | 100 mg   |
| obilný škrob      | 148,8 mg |
| stearát hořečnatý | 1,2 mg   |
| celkem            | 350 mg   |

20

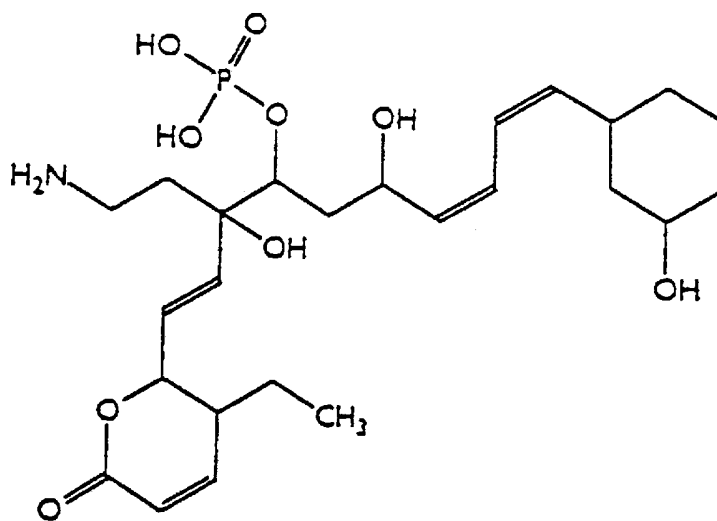
Po smíchání uvedených přísad a průchodu přes síto č. 20 (standard Tyler) byl vzniklý prášek naplněn do kapslí.

25

30

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Leustroducsin H vzorce I:



35

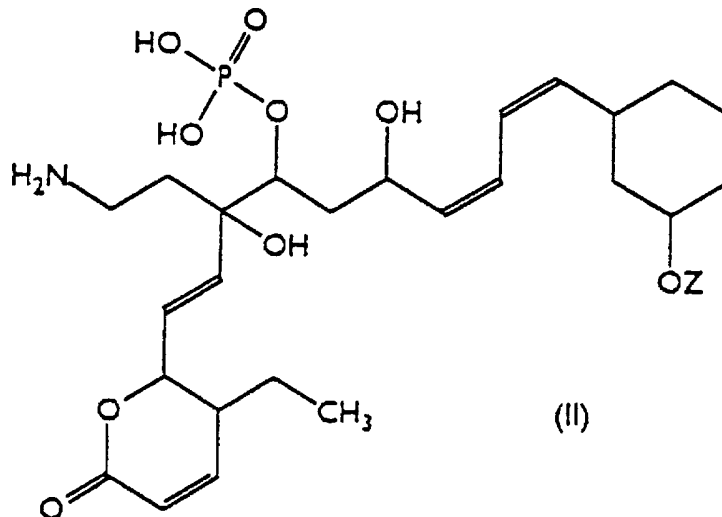
(I)

a jeho farmaceuticky vhodné soli.

2. Farmaceutický přípravek, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje Leustroducsin vzorce I nebo jeho farmaceuticky vhodné sole podle nároku 1, ve směsi s farmaceuticky vhodnými rozpouštědly nebo nosiči.

5

3. Způsob výroby Leustroducsinu vzorce I podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se hydrolyzuje sloučenina vzorce II nebo její sůl:



10

kde Z je acylová skupina a popřípadě se získaný produkt převede na farmaceuticky vhodnou sůl.

15

4. Způsob podle nároku 3, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že hydrolyza se provádí za použití zásaditého činidla nebo enzymu.

20

5. Způsob podle nároku 3, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že Z představuje rovný nebo větvený řetězec alifatické acylové skupiny nebo cyklické alifatické skupiny, mající 2 až 16 uhlíkových atomů.

25

6. Způsob podle nároku 3, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že Z představuje butyrylovou, isobutyrylovou, isovalerylovou, 2-methylbutyrylovou, 4-methylvalerylovou, cyklohexan-karbonylovou, 4-methylhexanoylovou, 5-methylhexanoylovou, 6-methylheptanoylovou, cyklohexylethylkarbonylovou, oktanoylovou, 6-methyloktanoylovou nebo 7-methyloktanoylovou skupinu.

30

---

Konec dokumentu

---