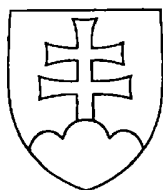


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

- (22) Dátum podania prihlášky: **25. 4. 2001**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **100 21 731.1**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **4. 5. 2000**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **DE**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **1. 4. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **4/2003**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/EP01/04652**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO01/83497**

(11), (21) Číslo dokumentu:

1560-2002

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

**C07F 9/6574,
A61K 31/665,
A61P 3/10,
C12P 9/00,
C12N 1/20**

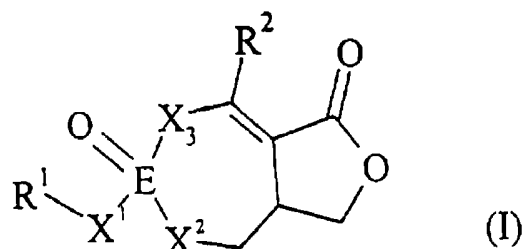
(71) Prihlasovateľ: **AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH, Frankfurt, DE;**

(72) Pôvodca: **Vertesy Laszlo, Eppstein-Vockenhausen, DE;
Ehrlich Klaus, Rüsselsheim, DE;
Kurz Michael, Hofheim, DE;
Wink Joachim, Rödermark, DE;**

(74) Zástupca: **Čechvalová Dagmar, Bratislava, SK;**

(54) Názov **Cyclipostin, spôsob jeho výroby a farmaceutický prípravok s jeho obsahom**

(57) Anotácia:
Opisujú sa zlúčeniny všeobecného vzorca (I), kde R^1 , R^2 , E , X_1 , X_2 a X_3 majú definíciu uvedenú vo vynáleze, ktoré sa získavajú kultiváciou mikroorganizmu *Streptomyces species* HAG 004107 (DSM 13381), a ich fyziologicky prijateľné soli a chemické ekvivalenty uvedenej zlúčeniny. Vynález tiež opisuje spôsob výroby cyclipostinov a ich fyziologicky prijateľných solí alebo ekvivalentov a ich použitie ako liečiv, obzvlášť pri liečení ochorení, kde sa uplatňujú ako inhibítory lipáz, vynález ďalej opisuje farmaceutické prípravky obsahujúce tieto zlúčeniny a ich použitie.



Cyclipostin, spôsob jeho výroby a farmaceutický prípravok s jeho obsahom

Oblasť techniky

Vynález sa týka novej zlúčeniny, nazvanej cyclipostin, ktorú je možné získať kultiváciou druhov *Streptomyces* HAG 004107 (DSM 13381) a jej fyziologicky prijateľných solí a jej chemických ekvivalentov. Vynález sa ďalej zaoberá spôsobom výroby cyclipostinu mikroorganizmom HAG 004107 (DSM 13381), spôsobom použitia cyclipostinu a jeho fyziologicky prijateľných solí a chemických ekvivalentov ako liečiv, obzvlášť ako inhibítorov lipáz, rovnako ako farmaceutických prípravkov obsahujúcich cyclipostin alebo jeho fyziologicky prijateľné soli alebo jeho ekvivalent.

Doterajší stav techniky

Ochorenie, ktoré môže byť obzvlášť výhodne liečené pomocou inhibítorov lipáz, je cukrovka *diabetes mellitus*. *Diabetes mellitus* je ochorenie vyznačujúce sa zvýšenou koncentráciou cukru v krvi vyplývajúce z porušenej látkovej výmeny. Porucha látkovej výmeny je spôsobená nedostatkom inzulínu alebo jeho nedostatočným pôsobením. Chýbajúce pôsobenie inzulínu vedie k nedostatočnému využitiu glukózy nachádzajúcej sa v krvi pomocou telesných buniek. Tým dochádza, rovnako ako novým vznikom glukózy z proteínov (glukoneogenéza), k zvýšeniu hladiny krvnej glukózy. Okrem toho vedie znížené pôsobenie inzulínu k tomu, že sa prostredníctvom inzulínového antagonistu - hormónu glukagónu, zvyšuje lipolýza v tukovom tkanive, a tým sa zvyšuje koncentrácia mastných kyselín v krvi. Dochádza ku ketoacidóze, to znamená zvýšenej tvorbe ketonických zlúčenín (kyseliny octovej, β -hydroxymaslovej kyseliny, acetónu). Za akútnych podmienok je zlá biochemická regulácia života nebezpečná a ak nie je liečená, vedie k diabetickej kóme a na záver k rýchlej smrti. Cukrovka patrí k častým poruchám látkovej výmeny u ľudí, odhaduje sa, že

až 3% populácie vykazuje diabetické alebo prediabetické dispozície, a tým aj akútne ohrozenie. Je teda veľká potreba prostriedkov na liečenie *diabetes mellitus*.

Liečenie cukrovky sa uskutočňuje pomocou dávok inzulínu, u starších pacientov sa proti diabetes, tzv. na inzulíne nezávislom diabetes (NIDDM) alebo tiež diabetes typu II, podávajú predovšetkým sulfonylmočoviny. Princíp pôsobenia sulfonylmočovín je založený na zvýšení vylučovania inzulínu β -bunkami v slinivke brušnej, čím sa vyrovnáva množstvo inzulínu alebo inzulínovej rezistencie. Pri pokročilom ochorení sa ale rovnako musí podávať inzulín. Pôsobenie inzulínu je teda možné zhrnúť nasledovne. Tento peptidový hormón znižuje koncentráciu glukózy v krvi a vedie k zvýšeniu anabolických a zároveň k zníženiu katabolitckých procesov:

- zvyšuje transport glukózy v telesných bunkách,
- zvyšuje tvorbu glykogénu v pečeni a vo svaloch,
- potláča lipolýzu,
- zvyšuje tvorbu mastných kyselín v tukových tkanivách, a
- zvyšuje tvorbu aminokyselín v telesných bunkách takisto ako syntézu proteínov.

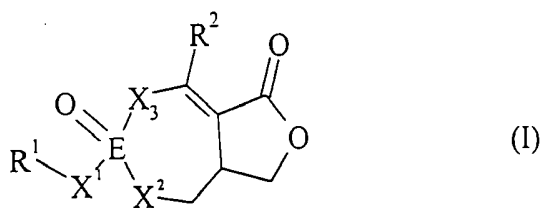
Jeden z najsilnejších efektov inzulínu je potlačenie lipolýzy. U cukrovky typu II nepokračuje táto regulácia lipolýzy ďalej a dochádza k zvýšenej hladine voľných mastných kyselín v krvi. Voľné mastné kyseliny v krvi stimulujú glukoneogénu v pečeni a znižujú využitie glukózy v skeletálnom svalstve. Kontrolovaná lipolýza, to znamená uvoľňovanie voľných mastných kyselín prostredníctvom tzv. hormónsenzitívnej lipázy (HSL), ktorá sa nachádza v telesných bunkách, je znižovaná inzulínom pomocou fosforylačnej kaskády. Potrebné sú teda inhibítory, to znamená látky zabraňujúce HSL, ktoré by simulovali pôsobenie inzulínu a umožňovali by znižovanie koncentrácie krvného tuku. Takéto činidlá by boli vhodné na liečenie cukrovky typu II, na kontrolu látkovej výmeny tukov, ale tiež na liečenie ochorení súvisiacich

s ďalšími zásobnými látkami. Zo všetkých uvedených dôvodov sú nové inhibítory HSL a ďalších lipáz potrebné, a teda sa hľadajú.

Prekvapujúco sa zistilo, že kmeň mikroorganizmov rodu *Streptomyces* HAG 004107, DSM 13381, vie produkovať nové, vysoko účinné lipázové inhibítory, ktoré blokujú pôsobenie hormónsensitívnej lipázy vo veľmi nízkych koncentráciách. Nové prírodné zlúčeniny sú organofosfáty, ktoré sa skladajú z dvojnásobného cyklického systému (bicyklus) a substituovaného uhľovodíkového reťazca, a ktoré špecificky blokujú lipázy. Kruhový základ, ktorý má len metylovú skupinu namiesto uhľovodíkového reťazca, bol prvý raz opísaný ako inhibítor acetylcholínu esterázy, CGA 134 736, R. Neumann a H.H. Peter v *Experientia*, diel 43, stránka 1235-1237, 1987. Neskôr bola rovnaká zlúčenina opísaná ako cyclophostin (T. Kurokawa a kol., v *J. Antibiotics*, 46, 1315-1318, 1993). Táto štruktúrne príbuzná zlúčenina nevykazovala žiadne vlastnosti, ako je selektívne blokovanie lipázy. Skôr známe látky vykazujú nevýhody, ako sú nedostatočne vysoké pôsobenie, vyššia toxicita a/alebo nežiaduce vedľajšie účinky.

Podstata vynálezu

Predložený vynález opisuje zlúčeniny všeobecného vzorca I



kde

R^1 je

1. uhľovodíkový reťazec s 2 až 30 atómami uhlíka, ktorý môže byť priamy, rozvetvený, nasýtený alebo nenasýtený, karbocyklický alebo heterocyklický, pričom uhľovodíkový reťazec je prípadne raz alebo dvakrát substituovaný:

1.1 -OH skupinou,

- 1.2 =O skupinou,
- 1.3 -O-C₁-C₆-alkylom, kde alkyl je priamy alebo rozvetvený,
- 1.4 -O-C₂-C₆-alkenylom, kde alkenyl je priamy alebo rozvetvený,
- 1.5 -C₁-C₆-alkylom, kde alkyl je priamy alebo rozvetvený,
- 1.6 -arylom,
- 1.7 -C₁-C₆-alkylbenzénom,
- 1.8 -difenylom,
- 1.9 -NH-C₁-C₆-alkylom, kde alkyl je priamy alebo rozvetvený,
- 1.10 -NH-C₂-C₆-alkenylom, kde alkenyl je priamy alebo rozvetvený,
- 1.11 -NH₂ skupinou,
- 1.12 =S skupinou,
- 1.13 -S-C₁-C₆-alkylom, kde alkyl je priamy alebo rozvetvený,
- 1.14 -S-C₂-C₆-alkenylom, kde alkenyl je priamy alebo rozvetvený,
- 1.15 halogénom,

kde substituenty 1.1 až 1.15 môžu byť tiež substituované,

2. -[-aryl-(CH₂)_n]_m skupina, kde -[-aryl-(CH₂)_n]_m skupina je raz alebo dvakrát substituovaná podľa opisu v 1.1 až 1.15 a n a m sú nezávisle od seba celé čísla 0, 1, 2 alebo 3;

R² je

- 1. C₁-C₆-alkyl, kde alkyl je nesubstituovaný alebo substituovaný raz alebo dvakrát substituentami opísanými v 1.1 až 1.15,
- 2. C₂-C₆-alkenyl, kde alkenyl je nesubstituovaný alebo substituovaný raz alebo dvakrát substituentami opísanými v 1.1 až 1.15,
- 3. C₁-C₆-alkinyl, kde alkinyl je nesubstituovaný alebo substituovaný raz alebo dvakrát substituentami opísanými v 1.1 až 1.15,

E je fosfor (P) alebo síra (S),

X¹, X² a X³ sú nezávisle od seba

- 1. -O-,
- 2. -NH-,

3. $-N=$,
4. $-S-$, alebo
5. $-CH_2-$ a $-CHR^2-$,

vo všetkých ich stereochemických formách a zmesiach týchto foriem v ľubovoľnom pomere, rovnako ako ich fyziologicky prijateľné soli a chemické ekvivalenty.

R^1 má výhodne reťazec obsahujúci 6 až 24 uhlíkových atómov, obzvlášť výhodne 10 až 18 uhlíkových atómov. Reťazec môže byť nasýtený, napríklad -alkyl, kde alkylový zvyšok môže byť priamy alebo rozvetvený, alebo môže byť nenasýtený, napr. -alkenyl alebo -alkinyl, kde alkenyl alebo alkinylový zvyšok môže byť priamy alebo rozvetvený. R^1 môže byť nesubstituovaný alebo raz alebo dvakrát rovnako alebo rôzne substituovaný substituentami opísanými v skupinách 1.1 až 1.15. Výhodné sú substituenty na uhlíkových atómoch číslo 8' až 16', obzvlášť výhodné sú pozície 10' až 14'. Substituenty 1.1 až 1.15 môžu byť tiež substituované jednou alebo viacerými skupinami vybranými zo skupiny obsahujúcej: alkohol-, aldehyd-, acetal-, ketál-, éter-, karboxyl-, ester-, amino-, nitril-, nitro-, oxím-, oxíméter a halogén.

Karbocyklický uhľovodíkový reťazec, ktorý má 2 až 30 uhlíkových atómov, označuje reťazec s 2 až 30 uhlíkovými atómami s jedným alebo viacerými, výhodne s jedným, dvoma alebo troma kruhovými systémami, obsahujúcimi výhodne 4, 5, 6 alebo 7 uhlíkových atómov. Kruhy môžu byť mono-, di- alebo tricyklické, výhodne monocyklické a môžu byť umiestnené na začiatku, v strede alebo na konci uhľovodíkoveho reťazca. Karbocykly môžu byť alifatickej alebo aromatickej povahy. Príkladmi sú difenyl alebo alkylbenzén.

Heterocyklický uhľovodíkový reťazec, ktorý má 2 až 30 uhlíkových atómov, označuje reťazec s 2 až 30 uhlíkovými atómami s jedným alebo viacerými, výhodne s jedným až troma kruhovými systémami, u ktorých je aspoň jeden atóm uhlíka nahradený hete-

roatómom, ako napríklad O, S alebo N. Kruhy môžu byť mono-, di- alebo tricyklické, výhodne monocyklické a môžu byť umiestnené na začiatku, v strede alebo na konci uhlovodíkoveho reťazca. Kruhy môžu byť výhodne 4-, 5-, 6- alebo 7-členné, alifatickej alebo aromatickej povahy. Príkladmi sú alkylpiperidín, substituovaný alebo nesubstituovaný.

Aryl označuje aromatický kruh alebo kruhový systém, ktorý má 6 až 14 uhlíkových atómov, výhodne 6 až 10 uhlíkových atómov, ako napríklad prípadne substituovaný alkylfenol alebo alkylnaftol. Halogén označuje chlorid, bromid, fluorid alebo pseudohalogenid ako je kyanid (nitril).

-C₁-C₆-alkyl označuje priamy alebo rozvetvený alkyl, ktorý má 1, 2, 3, 4, 5 alebo 6 uhlíkových atómov, ako napríklad metyl, etyl, izopropyl, terc-butyl a hexyl.

-C₂-C₆-alkenyl označuje priamy alebo rozvetvený alkyl, ktorý má 2, 3, 4, 5 alebo 6 uhlíkových atómov, ako napríklad alyl, krotyl a pentenyl.

-C₂-C₆-alkinyl označuje priamy alebo rozvetvený alkyl, ktorý má 2, 3, 4, 5 alebo 6 uhlíkových atómov, ako napríklad propinyl, butinyl a pentinyl.

R¹ výhodne znamená:

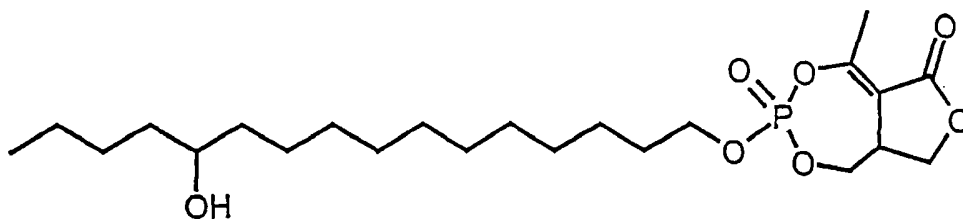
1. -(CH₂)₁₅CH₃,
2. -(CH₂)₁₃CH(CH₃)₂,
3. -(CH₂)₁₁CH(OH)(CH₂)₃CH₃,
4. -(CH₂)₁₂CH(OH)CH₂CH(CH₃)₂,
5. -(CH₂)₁₂CH(OH)(CH₂)₂CH₃,
6. -(CH₂)₁₃CH(OH)CH₂CH₃,
7. -(CH₂)₁₄CH(OH)CH₃,
8. -(CH₂)₁₅CH₂(OH),
9. -(CH₂)₁₆CH₃, alebo
- 10.0 -(CH₂)₁₃C=OCH₂CH₃,

- 11.0 $-(\text{CH}_2)_{12}\text{C}=\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$,
 12.0 $-(\text{CH}_2)_{11}\text{C}=\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$,
 13.0 $-(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$,
 14.0 $-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}(\text{CH}_3)_2$,
 15.0 $-(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$, alebo
 16.0 $-(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}(\text{CH}_3)_2$,

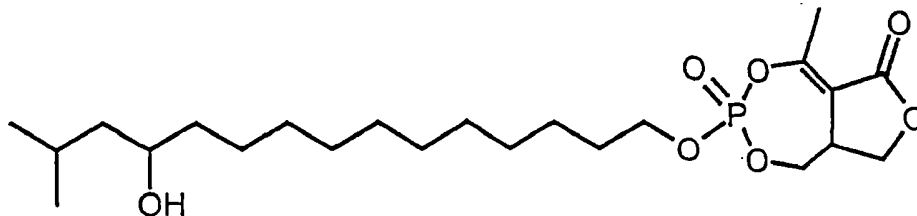
R^2 označuje výhodne C_1 - C_6 -alkyl, obzvlášť metyl, etyl alebo propyl.

Výhodné zlúčeniny podľa tohto vynálezu sú uvedené ďalej:

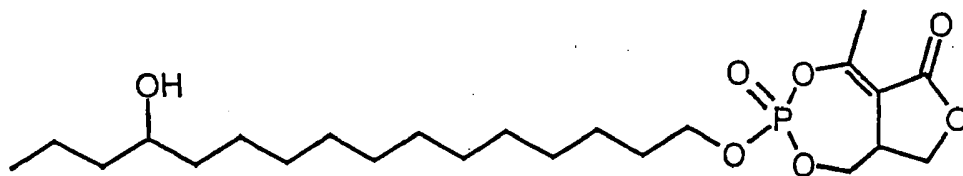
Cyclipostin A všeobecného vzorca II:



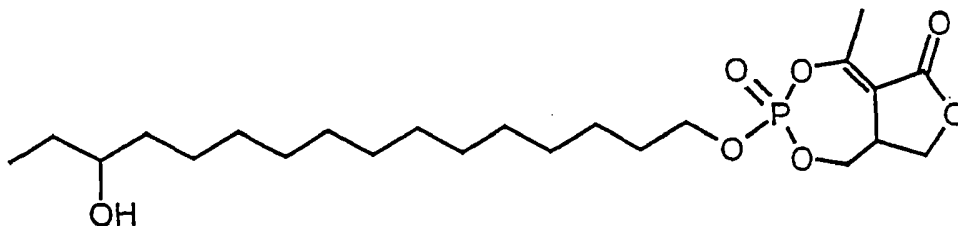
Cyclipostin A2 všeobecného vzorca IIA:



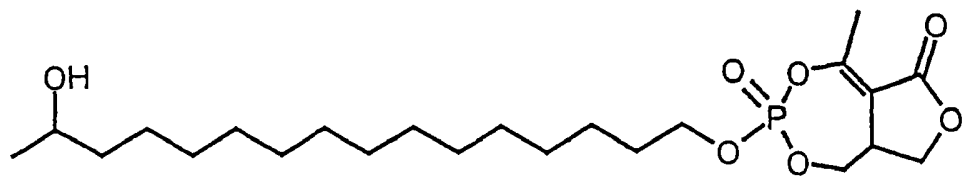
Cyclipostin B všeobecného vzorca III:



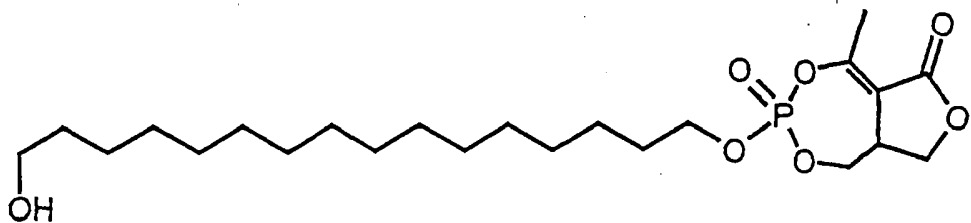
Cyclipostin C všeobecného vzorca IV:



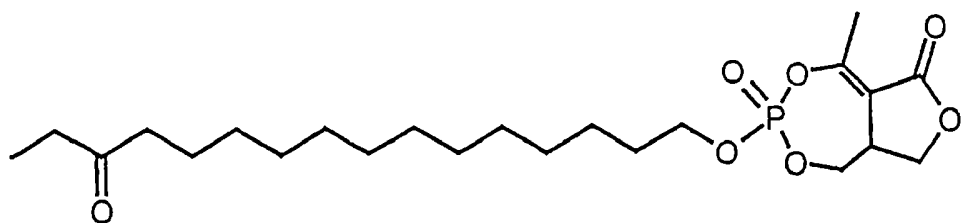
Cyclipostin D všeobecného vzorca V:



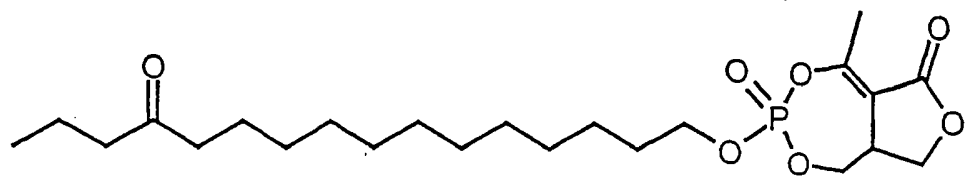
Cyclipostin E všeobecného vzorca VI:



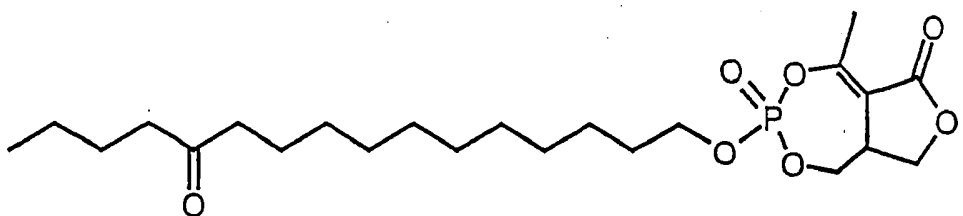
Cyclipostin F všeobecného vzorca VII:



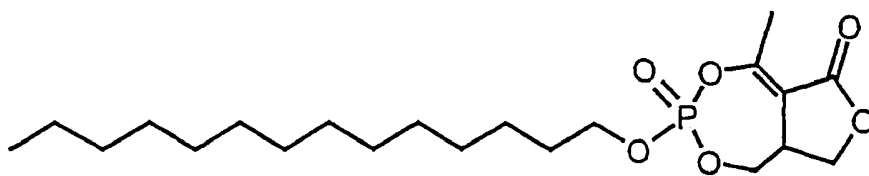
Cyclipostin G všeobecného vzorca VIII:



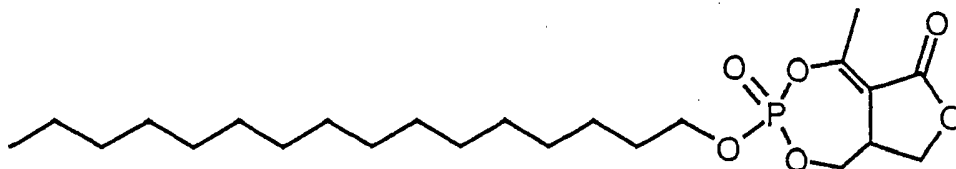
Cyclipostin H všeobecného vzorca IX:



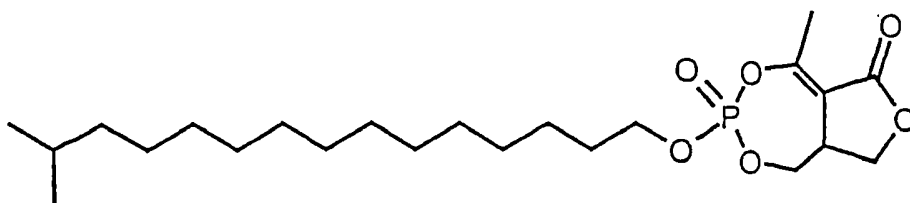
Cyclipostin N všeobecného vzorca X:



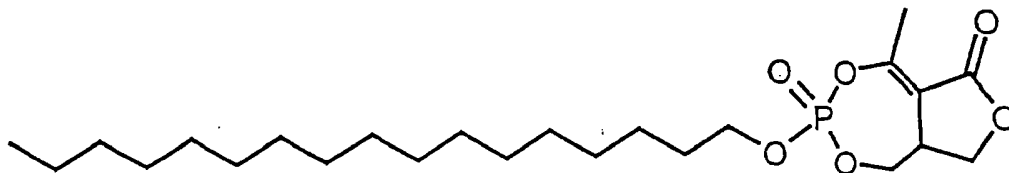
Cyclipostin P všeobecného vzorca XI:



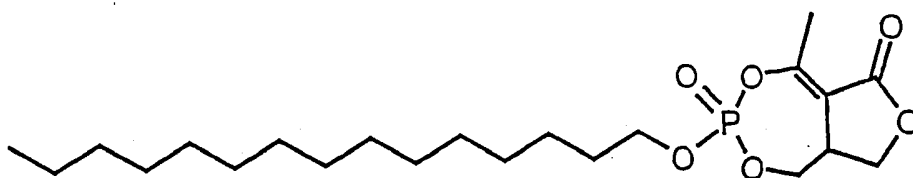
Cyclipostin P2 všeobecného vzorca XIA:



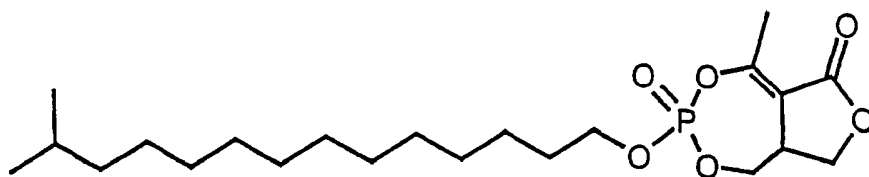
Cyclipostin Q všeobecného vzorca XII:



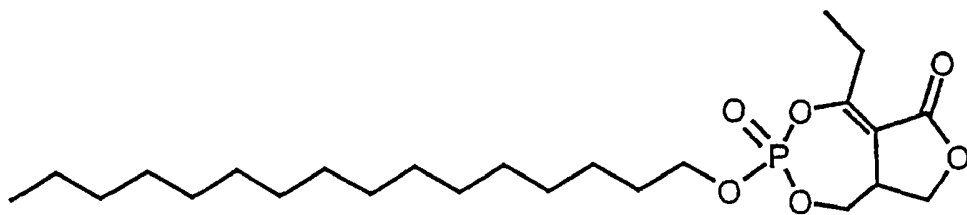
Cyclipostin R všeobecného vzorca XIII:



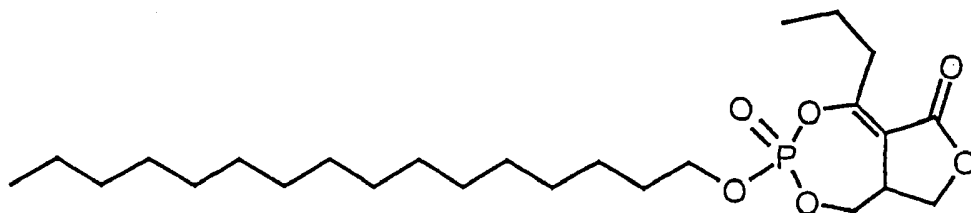
Cyclipostin R2 všeobecného vzorca XIII A:



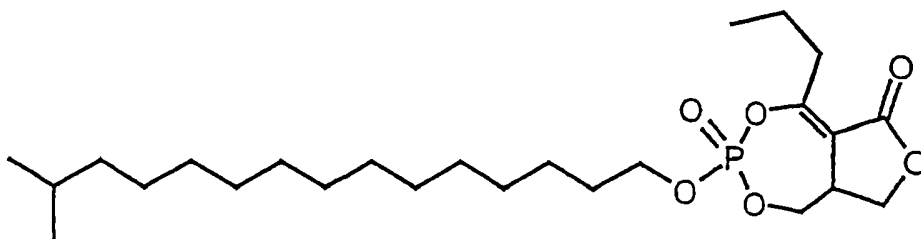
Cyclipostin S všeobecného vzorca XIV:



Cyclipostin T všeobecného vzorca XV:

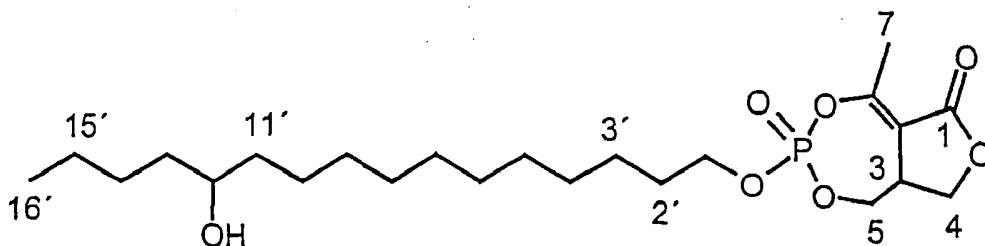


Cyclipostin T2 všeobecného vzorca XVA:



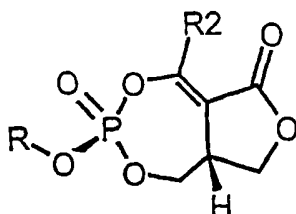
všetky ich stereochemické formy a zmesi týchto foriem v ľubovoľnom zastúpení, rovnako ako ich fyziologicky prijateľné soli a chemické ekvivalenty.

Spôsob počítania uhľikových atómov pre NMR spektrá skôr uvedených vzorcov je nasledujúci:



Samotný kruhový systém obsahuje dva asymetricky substituované atómy, uhľikový atóm 3 a atóm fosforu. Obidva atómy môžu vykazovať konfiguráciu R- alebo S-. S prekvapením sa zistilo, že

kmeň rodu *Streptomyces* HAG 004107, DSM 13381 dokáže vytvárať viaceré stereoizoméry zlúčenín všeobecného vzorca I, to znamená, že kmeň dokáže syntetizovať zlúčeniny, u ktorých zaujímajú atómy C3 a P nezávisle od seba konfiguráciu R- alebo S-. Izomér s priestorovou konfiguráciou na atóme uhlíka R- a konfiguráciou S- na atóme fosforu všeobecného vzorca IA je rozšírený u kultúry rodu *Streptomyces* HAG 004107, DSM 13381.



Okrem toho sa tvoria tiež cyclipostiny iných konfigurácií, ako napríklad (R,R), (S,S) alebo (S,R), ktoré prekvapujúco tiež vykazujú značný blokačný vplyv na lipázy.

Zlúčenina všeobecného vzorca I alebo jej fyziologicky prijateľná soľ alebo jej chemický ekvivalent sa môže pripraviť pomocou mikroorganizmu rodu *Streptomyces* HAG 004107, DSM 13381 alebo jeho variantom alebo mutáciou za vhodných podmienok fermentáciou v kultivačnom médiu až do namnoženia jednej alebo viacerých zlúčenín všeobecného vzorca I v kultivačnom médiu, pričom môžu byť získané záverečnou izoláciou z kultivačného média a prípadne prevedené do formy chemického ekvivalentu a fyziologicky prijateľnej soli.

Cyclipostiny podľa tohto vynálezu môžu byť produkované druhmi *Actinomycetales*, výhodne pomocou druhov *Streptomyces* HAG 004107, DSM 13381. Druh *Streptomyces* HAG 004107, DSM 13381 vykazuje slonovinové sfarbenie mycely (RAL 1014) a vyznačuje sa konidioformi charakteristickými pre *Streptomycéty*.

Izolát sa uložil v Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1B, D 38124 Braunschweig, Nemecko na základe budapeštianskej dohody zo 16. marca 2000 pod

nasledujúcim číslom: *Streptomyces species* HAG 004107, DSM 13381.

Namiesto kmeňa *Streptomyces species* HAG 004107, DSM 13381 sa môžu tiež použiť mutácie a varianty, ktoré syntetizujú jednu alebo viac cyclipostinových zlúčenín podľa tohto vynálezu. Takéto mutanty sa môžu pripraviť známymi spôsobmi pomocou fyzikálnych prostriedkov, napríklad žiarením ako je ultrafialové alebo röntgenové žiarenie alebo chemickými mutáciami, napríklad pomocou etylmetánsulfonátu (EMS), 2-hydroxy-4-metoxybenzofenónu (MOB) alebo N-metyl-N'-nitro-N-nitrózoguanidínu (MNNG).

Vynález sa týka spôsobu výroby zlúčenín všeobecného vzorca I alebo ich fyziologicky prijateľných solí, vyznačujúceho sa tým, že sa mikroorganizmus *Streptomyces species* HAG 004107, DSM 13381 alebo jeho variant alebo mutácia fermentuje v kultivačnom médiu za vhodných podmienok až do nahromadenia jednej alebo viacerých zlúčenín všeobecného vzorca I v kultivačnom médiu, ktoré sa potom z kultivačného média izolujú a prípadne prevádzajú na ich chemický ekvivalent a fyziologicky prijateľné soli.

Výhodne sa kmeň *Streptomyces species* HAG 004107, DSM 13381, jeho mutácia a/alebo variant fermentuje v živnom roztoku (označovanom tiež ako kultivačné médium) so zdrojom uhlíka a dusíka s bežnými anorganickými soľami, až do nahromadenia cyclipostinu v kultivačnom médiu a potom sa cyclipostin izoluje z kultivačného média a prípadne sa rozdeľuje na jednotlivé aktívne komponenty.

Fermentácia sa výhodne uskutočňuje za aeróbnych podmienok, výhodne pri teplotách od 18 do 35°C pri pH 6 až 8.

Spôsob výroby podľa tohto vynálezu sa môže použiť na fermentáciu v laboratórnom meradle (mililitre až litre) a v priemyselnom meradle (kubické metre). Všetky percentuálne označenia sú uvádzané, ak nie je uvedené inak, v hmotnostných percentách. Pomer v zmesi u kvapalín sa vzťahuje na objem, ak nie je uvedené inak.

Ako výhodné zdroje uhlíka na aeróbnú fermentáciu sa hodia asimilovateľné uhľohydráty a cukrové alkoholy, ako je glukóza, laktóza, sacharóza alebo D-manitol, rovnako ako prírodné produkty obsahujúce sacharidy ako napríklad ovsenné vločky, sójová múčka a sladový extrakt. Ako dusíkaté zásobné látky prichádzajú do úvahy aminokyseliny, peptidy a proteíny, rovnako ako produkty ich odbúrania, ako je napríklad peptón alebo tryptón, rovnako ako mäsový extrakt, extrakt z kvasníc, pomleté semená napríklad kukurice, pšenice, fazule, sóje alebo bavlníka, destilačný zvyšok z výroby alkoholu, mäsová múčka alebo kvasnicový extrakt, rovnako ako amónne soli a nitráty. Zásobný roztok môže obsahovať anorganické soli ako napríklad chloridy, uhličitany, sulfáty alebo fosfáty alkalických kovov alebo kovov alkalických zemín, železa, zinku, kobaltu a mangánu.

Tvorba cyclipostínu všeobecných vzorcov II až XVA podľa tohto vynálezu prebieha obzvlášť dobre v kultivačnom médiu obsahujúcom 0,1 až 5%, výhodne 0,3 až 3% ovsenných vločiek a stopových prvkov. Údaje v percentách sú uvedené v hmotnostných percentách vzťahnutých na celé kultivačné médium.

Tvorba cyclipostínu všeobecných vzorcov VII až XVA podľa tohto vynálezu prebieha obzvlášť výhodne v kultivačnom médiu obsahujúcom 0,1 až 5%, výhodne 0,3 až 2% glycerínu a 0,2 až 5%, výhodne 0,5 až 3% sójovej múčky a 0,05 až 1,0 g/l, výhodne 0,1 až 1,0 g/l chloridu sodného.

V kultivačnom médiu produkuje *Streptomyces species* HAG 004107, DSM 13381 zmes cyclipostínov. Podľa zloženia kultivačného média sa môžu zastúpenia jedného alebo viacerých cyclipostínov podľa tohto vynálezu líšiť. Okrem toho je možné zložením média dosiahnuť syntézu jediného cyclipostínu mikroorganizmom, takže jeden alebo viac cyclipostínov vôbec nevzniká, prípadne vzniká v množstvách menších, ako je hranica pozorovateľnosti.

Výhodne obsahuje kultúra preukázateľný cyclipostín.

Výhodne vznikajú cyclipostin A alebo P alebo P2.

Okrem cyclipostinu A až T2 (zlúčeniny všeobecného vzorca II až XVA) vytvára *Streptomyces species* HAG 004107, DSM 13381 v kultivačnom médiu ďalšie príbuzné zlúčeniny, ktoré sa od skôr uvedených zlúčenín líšia rôznymi zvyškami R^1 a R^2 vo všeobecných vzorcoch II až XVA. V menších množstvách sa preukázali cyclipostiny, ktoré majú skrátенý alebo viac rozvetvený zvyšok R^1 . V kultúre *Streptomyces* HAG 004107, DMS 13381 sú tiež ako vedľajšie produkty preukázané oxidačné produkty (produkty hydroxylácie).

Kultivácia mikroorganizmov sa uskutočňuje aeróbne tiež napríklad submerzným spôsobom za trepania alebo miešania v banke alebo fermentore, prípadne zavádzaním vzduchu alebo kyslíka. Môže sa uskutočňovať v teplotnom rozsahu od 18 do 35°C, výhodne od 25 do 32°C, obzvlášť pri teplotách od 26 do 30°C. pH hodnoty by mali byť v rozsahu 6 až 8, výhodne v rozsahu 6,5 až 7,8. Mikroorganizmus sa za týchto podmienok všeobecne kultivuje počas 24 až 300 hodín, výhodne 30 až 90 hodín.

Výhodne sa kultivuje vo viacerých stupňoch, t. z. že najprv sa pripraví jedna alebo viaceré predkultúry v tekutom kultivačnom médiu, ktorá(é) sa potom preočkuje do vlastného produkčného média, hlavnej kultúry, napr. v objemovom pomere 1:10. Predkultúra sa získa napr. tým, že sa mycélium naočkuje do živného roztoku a nechá sa asi 36 až 120 hodín, výhodne 48 až 96 hodín rásť. Mycélium sa môže udržiavať v kmeni asi 3 až 40 dní, výhodne 4 až 10 dní na pevnej alebo kvapalnej živnej pôde, napríklad na sladovom-kvasinkovom agare alebo agare z ovsenných vločiek.

Priebeh fermentácie sa môže sledovať pomocou pH hodnôt kultúry alebo mycélia, rovnako ako pomocou chromatografických metód, ako napríklad tenkovrstvová chromatografia alebo vysokotlaková kvapalinová chromatografia alebo pomocou sledovania biologickej aktivity. Cyclipostiny podľa tohto vynálezu sú z malej časti obsiahnuté tiež vo filtráte kultúry. Spôsob čistenia opi-

saný v nasledujúcom texte slúži na čistenie cyclipostinu podľa tohto vynálezu, výhodne na čistenie cyclipostinu A a P.

Izolácia, prípadne čistenie cyclipostinov podľa tohto vynálezu z kultivačného média sa uskutočňuje známymi spôsobmi s ohľadom na chemické, fyzikálne a biologické vlastnosti prírodných látok. Na testovanie koncentrácie cyclipostinu v kultivačnom médiu alebo v jednotlivých izolovaných frakciách sa môže použiť tenkovrstvová chromatografia, napríklad na silikagéli s využitím zmesi dichlórmétán-etylacetát alebo chloroform-metanol (napríklad v pomere 98:1) ako elučného činidla alebo pomocou HPLC. Detekcia pri delení pomocou tenkovrstvovej chromatografie sa môže uskutočňovať napríklad pomocou farbiacich činidiel, ako je molybdatofosforečná kyselina alebo pomocou pár I_2 , pričom množstvo vzniknutej látky sa meria porovnaním so štandardným roztokom.

Pri izolácii cyclipostinu podľa tohto vynálezu sa mycélium najskôr oddelí od kultivačného média obvyklým spôsobom a potom sa cyclipostin extrahuje z bunkovej hmoty pôsobením rozpúšťadla miešateľného s vodou. Fáza organického rozpúšťadla obsahujúceho cyclipostin podľa tohto vynálezu sa následne koncentruje vo vákuu a čistí sa ďalej podľa uvedeného opisu.

Filtrát kultúry sa prípadne spojí s koncentrátom mycéliového extraktu a extrahuje sa s vhodným rozpúšťadlom, nemiešateľným s vodou, ako napríklad *n*-butanolom alebo etylacetátom. Na záver sa oddelená organická fáza skoncentruje vo vákuu a rozpustí sa v zodpovedajúcom objeme zmesi voda/metanol 1/30.

Ďalšie čistenie jedného alebo viacerých cyclipostinov podľa tohto vynálezu sa uskutočňuje pomocou chromatografie na vhodných materiáloch, výhodne napríklad na molekulárnych sitách, normálnych fázových nosičoch ako napríklad na silikagéli, oxide hlinitom, ionomeničových živiciach alebo adsorbčných živiciach ako napríklad na obrátenej (reverznej, RP) fáze. S pomocou týchto chromatografií sa cyclipostiny rozdelia. Chromatografia cycli-

postinov sa uskutočňuje s organickým rozpúšťadlom alebo so zmesou vodného a organického rozpúšťadla.

Pod termínom zmes vodného alebo organického rozpúšťadla sa myslia všetky rozpúšťadlá miešateľné s vodou, výhodne metanol, propanol a acetonitril, v koncentráciách rozpúšťadla 10 až 100%, výhodne 60 až 90% rozpúšťadla alebo tiež pufrované vodné roztoky, ktoré sú miešateľné s organickými rozpúšťadlami. Použité pufry sú rovnaké ako je opísané skôr.

Rozdelenie cyclipostinov je založené na ich rozdielnej polarite a uskutočňuje sa pomocou chromatografie na reverznej fáze, napríklad MCI® (adsorbčná živica od firmy Mitsubishi, Japonsko) alebo Amberlite® (Tosohaas), na ďalších hydrofóbných materiáloch ako napríklad na RP-8- alebo RP-18-fázach. Okrem toho môže byť delenie uskutočňované s pomocou chromatografie na normálnej fáze, napríklad silikagéli, oxide hlinitom a podobne.

Chromatografia cyclipostinov sa uskutočňuje s pufrovanými alebo nasýtenými vodnými roztokmi alebo zmesou vodných roztokov s alkoholmi alebo inými rozpúšťadlami miešateľnými s vodou. Ako organické rozpúšťadlá sa používajú propanol a acetonitril. Pod pojmom pufrované alebo nasýtené vodné roztoky sa rozumie napr. voda, fosfátový pufor, acetát amónny, citrátový pufor v koncentráciách od 1 mM do 0,5 M rovnako ako kyselina mravčia, kyselina octová, kyselina trifluóroctová alebo iné bežne používané kyseliny známe odborníkom v odbore, výhodne v koncentráciách od 0,01 do 3%, výhodne 0,1%.

Chromatografia gradientom začína so 100% vodným pufrom a končí so 100% rozpúšťadlom, výhodne sa používa lineárny gradient od 50 do 100% 2-propanolu alebo acetónu.

Alternatívne sa môže použiť gélová chromatografia alebo chromatografia na hydrofóbnej fáze.

Gélová chromatografia sa uskutočňuje na polyakrylamidových

gélach alebo gélach zo zmesových polymérov, ako napríklad Bio-gel-P2® (firma Biograd), Fractogel TSK HW 40® (firma Merck, Nemecko alebo Toso Haas, USA) alebo Sephadex® (firma Pharmacia, Uppsala, Švédsko).

Poradie chromatografií je navzájom zameniteľné.

Ďalšia veľmi dôležitá metóda čistenia cyclipostinu je kryštalizácia. Cyclipostiny kryštalizujú z roztokov organických rozpúšťadiel a zmesí vody s organickými rozpúšťadlami. Kryštalizácia sa uskutočňuje známymi postupmi, ako napríklad koncentrovaním alebo ochladením nasýteného roztoku cyclipostinu.

Cyclipostiny podľa tohto vynálezu sú stabilné v tuhom stave alebo v kvapalnom stave a v roztoku pri hodnotách pH od 4 do 8, obzvlášť v rozsahu 5 až 7, a dovoľujú spracovanie do galenických foriem.

Vynález zahŕňa ďalšie obvyklé chemické ekvivalenty zlúčenín všeobecného vzorca I, ktoré vykazujú nepatrné chemické rozdiely a ktoré majú rovnaké účinky alebo sa za miernych podmienok premieňajú na zlúčeniny podľa tohto vynálezu. K známym ekvivalentom patrí napríklad ester a éter, rovnako ako produkty oxidácie, produkty redukcie a produkty hydrogenácie zlúčenín podľa tohto vynálezu.

Esterové a éterové deriváty, produkty oxidácie, produkty redukcie a produkty hydrogenácie sa pripravujú spôsobmi opísanými v literatúre, napríklad v "Advanced Organic Synthesis, 4. vydanie, J. March, John Wiley & Sons., 1992.

Tento vynález zahŕňa všetky stereoizomérmne formy zlúčenín všeobecného vzorca I až XVA. Zlúčeniny všeobecných vzorcov I až XVA obsahujú asymetrické centrá, ktoré môžu mať navzájom nezávisle konfiguráciu S- alebo R-. K vynálezu patria všetky možné enantioméry a diastereoizoméry, rovnako ako zmesi dvoch alebo viacerých stereoizomérnych foriem, napríklad zmesi enantiomérov

a/alebo diastereoizomérov vo všetkých pomeroch. Enantioméry sú tiež v enantiomérnych formách, rovnako ako ľavotočivé tak aj pravotočivé antipódy, R- a S-konfigurácie, vo forme racemátov a vo forme zmesí obidvoch enantiomérov vo všetkých pomeroch predmetom tohto vynálezu. Predmetom vynálezu sú tiež *cis/trans* izoméry, rovnako ako *cis*-forma, prípadne *trans*-forma alebo zmesi týchto foriem vo všetkých pomeroch.

Na základe ich vynikajúcich farmakologických vlastností sú zlúčeniny podľa tohto vynálezu vhodné na použitie ako liečivá v humánnej a/alebo veterinárnej medicíne. Blokujú lipázy a sú vhodné na liečenie ochorení vyvolaných poruchou látkovej výmeny, ktoré majú príčiny v poruchách výmeny lipidických látok. Zlúčeniny všeobecného vzorca I podľa tohto vynálezu vykazujú prekvapujúci blokovací účinok na hormónsenzitívnu lipázu, HSL, alosterický enzým v adipocytoch, ktorý je blokovaný inzulínom a je zodpovedný za odbúranie tukov v tukových bunkách a tým aj za kolobeh tukového podielu v krvnom toku. Inhibícia tohto enzýmu zodpovedá tiež inzulínu podobnému pôsobeniu zlúčenín podľa tohto vynálezu, čo nakoniec vedie k zníženiu obsahu voľných mastných kyselín v krvi a krvného cukru. Môžu byť tiež nasadené pri poruchách látkovej výmeny ako napríklad pri na inzulíne nezávislom diabetes mellitus, u diabetického syndrómu a pri priamom poškodení pankreasu.

Vynález zahŕňa tiež farmaceutické prípravky, obsahujúce jeden alebo viac cyclipostínov podľa tohto vynálezu a/alebo ich chemických ekvivalentov. Výhodne sa používajú v zmesi s vhodnými pomocnými látkami alebo nosičmi. Ako nosný materiál sa používajú všetky farmakologicky prijateľné nosiče a/alebo pomocné látky.

Vynález opisuje ďalej spôsob výroby liečiv podľa tohto vynálezu, vyznačujúci sa tým, že sa aspoň jedna zlúčenina podľa tohto vynálezu zmieša s vhodným farmaceuticky prijateľným nosičom a prípadne ďalšou vhodnou účinnou látkou, prídavnou látkou alebo pomocnou látkou vo forme vhodnej na podávanie.

Liečivé prípravky podľa tohto vynálezu sa všeobecne podávajú vo forme orálnej, lokálnej alebo parenterálnej, ale sú tiež principiálne možné ako rektálne prostriedky. Vhodné tuhé alebo kvapalné galenické formy sú napríklad granulát, prášok, tablety, dražé, (mikro)kapsuly, sirupy, emulzie, suspenzie, aerosóly, kvapky alebo injikovateľné roztoky vo forme ampúl, rovnako ako preparáty so spomalenou formou uvoľňovania, u ktorých sa používa obvyklý nosič a prídavné alebo pomocné činidlo, ako sú napríklad dezintegrátory, spojivá, potahovacie činidlá, napučiavacie látky, mastencové múčky alebo mazadlá, chuťové látky, sladidlá alebo rozpúšťadlá. Ako často používaný nosič alebo pomocnú látku môžeme uviesť napr. uhličitan horečnatý, oxid titaničitý, laktózu, manitol a ďalšie cukry, mastenec, želatínu, škroby, vitamíny, celulózu a jej deriváty, živočíšne alebo rastlinné oleje, polyetylén glykoly a rozpúšťadlá, ako je sterilná voda, alkohol, glycerín a viacsýtné alkoholy.

Prípadne môže byť dávkovacia forma na orálne podávanie pripravená ako mikrokapsuly, s cieľom spomaliť uvoľňovanie alebo predĺžiť ho na dlhší čas, ako napríklad pomocou potiahnutia alebo vložením účinnej látky do častice vhodného polyméru, vosku alebo podobne.

Výhodne sa farmaceutické prípravky zhotovujú v dávkovacích formách, kde každá jednotka obsahuje ako aktívnu zložku známu dávku jednej alebo viacerých cyclipostinových zlúčenín podľa tohto vynálezu a/alebo ich chemického derivátu. U tuhých dávkovacích foriem, ako sú tablety, kapsuly a čapíky, môžu tieto dávky obsahovať až 200 mg, výhodne asi 0,1 až 100 mg a u injikovateľných roztokov vo forme ampúl až 200 mg, výhodne asi 1,0 až 100 mg denne.

Podávané denné dávky sú závislé od telesnej hmotnosti, veku, závažnosti a stavu pacientov. Podľa podmienok sa môžu podávať nižšie alebo tiež vyššie denné dávky. Podávanie dennej dávky môže byť uskutočňované pomocou jedinej dávkovacej formy alebo

pomocou viacerých menších dávkovacích foriem alebo pomocou viacnásobne rozdelenej dávky v určitých intervaloch. Vynález tiež zahŕňa farmaceutické prípravky, obsahujúce jeden alebo viac cyclipostinov a/alebo jeho chemických ekvivalentov podľa tohto vynálezu. Výhodné je použitie v zmesi s vhodnou pomocnou látkou alebo nosičom. Ako nosič sa môže použiť akýkoľvek farmakologicky prijateľný nosič a/alebo pomocná látka.

Pôsobenie zlúčenín všeobecného vzorca I podľa tohto vynálezu sa skúša nasledujúcim enzýmovým systémom:

Príprava enzýmu

Príprava čiastočne čisteného HSL

Izolované krysie tukové bunky sa získali z tukového tkaniva u samčích pohlavných žliaz neošetrovaných ľudských krýs (wistar, 220-250 g) pomocou postupu spracovania s kolagenázou, publikovanom napr. v: B.S. Nillson a kol., Anal. Biochem. 158, 1986, 399-407; G.Frederikson a kol., J. Biol. Chem. 256, 1981, 6311-6320; H. Tornquist a kol., J. Biol. Chem., 251, 1976, 813-819). Tukové bunky z 10 krýs sa premyli trikrát flotáciou, každý raz 50 ml homogenizačného pufra (25 ml Tris/HCl, pH 7,4, 0,25 M sacharóza, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 µg/ml leupeptínu, 10 µg/ml antipatínu, 20 µg/ml pepstatínu) a rozpustili sa v 10 ml homogenizačného pufra. Tukové bunky sa dali do homogenizátora typu "teflón v skle" (Braun-Melsungen) a homogenizovali pri 1500 otáčkach za minútu pri 15°C. Homogenizát sa centrifugoval (Sorwall SM24-Rörchen, 5000 otáčok za minútu, 4°C). Fáza medzi hore ležiacou vrstvou tuku a tuhú peletou sa odobrala a znova centrifugovala. Takto získaná fáza sa znova centrifugovala (Sorwall SM24-Rörchen, 20000 otáčok za minútu, 45 minút, 4°C). Medzifáza sa odobrala a nechala sa reagovať s 1 g heparínu na sepharose (Pharmacia-Biotech, CL-6B, 5 x premyla s 25 mM Tris/HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl). Po inkubácii počas 60 minút pri 4°C (pretrepané v intervaloch 10 minút) sa reakčná zmes centrifugovala. Kvapalina sa upravila prídavkom kyseliny octovej na pH 5,2 a inkubovala 30

minút pri 4°C. Zrazenina sa centrifugovala (Sorwall SM34, 12000 otáčok za minútu, 10 minút, 4°C) a zvyšok sa suspendoval v 2,5 ml 20 mM Tris/HCl, pH 7,0, 1 mM EDTA, 65 mM NaCl, 13% sacharózy, 1 mM DTT, 10 µg/ml leupeptín/pepstatín/antipatín. Suspenzia sa dialyzovala cez noc proti roztoku 25 mM Tris/HCl, pH 7,4, 50% glycerín, 1 mM DTT, 10 µg/ml leupeptín, pepsatín, antipatín a potom dala na stípec hydroxyapatitu (0,1 g na 1 ml suspenzie, ekvilibrovanom s 10 mM fosfátu draselného, pH 7,0, 30% glycerínu, 1 mM DTT). Stípec sa premyl so štyrmi objemami ekvilibračného pufra s rýchlosťou toku od 20 do 30 ml/hod. HSL sa eluoval jedným objemom ekvilibračného pufra obsahujúceho 0,5 M fosfátu draselného a potom dialyzoval (pozri skôr) a 5 krát až 10 krát koncentroval pomocou ultrafiltrácie (Amicon Diaflo PM 10 filter) pri 4°C. Čiastočne čistený HSL sa môže prechovávať 4 až 6 týždňov pri teplote -70°C.

Stanovenie

Na prípravu substrátu sa zmiešalo 25-50 µCi [³H]trioleoylglycerínu (v toluéne), 6,8 µmol neznačeného trioyleoylglycerínu a 0,6 mg fosfolipidu (fosfatidylcholí/fosfatidylinositol 3:1 w/v), zmes sa sušila pomocou N₂ a potom rozpustila v 2 ml 0,1 M KP_i (pH 7,0) s opracovaním pomocou ultrazvuku (Branson 250, mikrostriečka, nastavenie 1-2, 2 x 1 min. v 1 minútových intervaloch). Po pridani 1 ml KP_i a obnovenom pôsobení ultrazvuku (4 x 30 sekúnd, v lade po 30 sekundových intervaloch) sa pridal 1 ml 20% BSA (bovinný sérový albumín) (v KP_i) (výsledná koncentrácia trioyleoylglycerínu 1,7 mM). Na reakciu sa pipetovalo 100 µl roztoku substrátu k 100 µl HSL roztoku (HSL pripravený ako je uvedené skôr, zriedený v 20 mM KP_i, pH 7,0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,02% BSA, 20 µg/ml pepstatín, 10 µg/ml leupeptín) a inkubovalo sa 30 minút pri 37°C. Po prídavku 3,25 ml zmesi metanol/chloroform/heptán (10:9:7) a 1,05 ml 0,1 M K₂CO₃, 0,1 M kyseliny boritej (pH 10,5) sa všetko dobre zmiešalo a na záver centrifugovalo (800 x g, 20 min.). Po oddelení fáz sa odo-

bral jeden ekvivalent hornej fázy (1 ml) a odmerala sa rádioaktivita pomocou kvapalinového scintilačného zariadenia.

Vyhodnotenie

Látky sa skúšali skôr opísaným spôsobom v štyroch nezávislých meraniach. Blokovanie enzymatickej aktivity HSL pomocou testovanej zlúčeniny sa určovalo porovnaním s nechránenou kontrolnou reakciou. Výpočet hodnoty IC_{50} sa uskutočnil pomocou krivky s aspoň 10 koncentráciami testovanej zlúčeniny. Na analýzu dát sa použil softwarový paket Graphit, Elsevier-Biosoft. V tomto teste vykazovali zlúčeniny podľa tohto vynálezu nasledujúce účinky:

Cyclipostin A, P, P2 a R blokujú lipolýzu u krysích adipocytov s $IC_{50} = \sim 0,2 \mu M$, inhibujú ľudskú hormón-senzitívnu lipázu (HSL) s trioleoylglycerínom ako substrátom: $IC_{50} = \sim 0,07$ až $0,5 \mu M$. HSL z krýs sa blokovalo s NBD (4-chlór-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol) ako substrátom, v koncentráciách od 4 nM do 10 nM.

Cyclipostin chráni hormónsenzitívnu lipázu (HSL), rovnako ako mono-acyl-glycerín-lipázu krysieho extraktu v submikromolárnych koncentráciách.

V nasledujúcich príkladoch je ďalej vysvetlený tento vynález. Uvedené percentuálne údaje sú hmotnostné percentá. Obsah zmesí u kvapalín je udávaný v objemových percentách, ak nie je uvedené inak.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Príprava glycerínovej kultúry *Streptomyces species* HAG 004107, DSM 13381

100 ml živného roztoku (sladový extrakt 2,0%, kvasnicový ex-

trakt 0,2%, glukóza 1,0%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,05%, pH 6,0) v sterilnej 300 ml Erlenmeyerovej banke sa naočkovalo s kmeňom *Streptomyces species* HAG 004107, DSM 13381 a inkubovalo 7 dní pri teplote 28°C a 180 otáčkach za minútu na rotačnej trepačke. 1,5 ml tejto kultúry sa na záver zriedilo s 1,5 ml 99% glycerínu a uložilo pri 20°C.

Príklad 2

Príprava predkultúry *Streptomyces species* HAG 004107, DSM 13381 v Erlenmeyerovej banke

Sterilná Erlenmeyerova banka sa naplnila so 100 ml nasledujúceho živného roztoku: 15 g/l glukózy, 15 g/l sójovej múčky, 5 g/l zrna, 2 g/l CaCO_3 a 5 g/l NaCl a naočkovala pomocou jednej skúmavky (rovnaký živný roztok s 2% agaru) rastovej kultúry na šikmom agare alebo s 1 ml glycerínovej kultúry (pozri Príklad 1) a trepačka sa prevádzkovala pri 180 otáčkach za minútu pri 28°C. K naočkovaniu 10 a 200 l fermentora stačí 48 až 96 hodín stará submerzná kultúra (očkovacie množstvo asi 10%) z rovnakého živného roztoku.

Príklad 3

Príprava kultúry *Streptomyces species* HAG 004107, DSM 13381 v Erlenmeyerovej banke

Sterilná 300 ml Erlenmeyerova banka sa naplnila 100 ml nasledujúceho živného roztoku: 20 g/l psích ovsenných vločiek, 2,5 ml roztoku stopových prvkov, a naočkovala s 10% očkovacím množstvom predkultúry (Príklad 2) a inkubovala na trepačke pri 180 otáčkach za minútu pri 28°C. Kultúra sa mohla po dvoch dňoch očkovať do fermentora na výrobu cyclipostinu. Roztok stopových prvkov mal nasledujúce zloženie:

3 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$,
 1 g/l Fe(III)-citrát,
 0,2 g/l $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$,
 0,1 g/l ZnCl_2 ,

0,025 g/l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$,
0,02 g/l Na-tetraborát,
0,004 g/l $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$,
0,01 g/l Na-molybdát.

Príklad 4

Produkcia cyclipostinov všeobecného vzorca II až IX

200 l fermentor sa naplnil 90 l živného roztoku za nasledujúcich podmienok:

Živné médium:

20 g/l ovsenných vločiek vo vode,
2,5 ml/l stopových prvkov,
pH 7,8 (pred sterilizáciou).

Živný roztok sa 30 minút sterilizoval pomocou tepla a po ochladení sa naočkovalo 5% objemu očkovacieho materiálu, získaného podľa Príkladu 3.

Roztok stopových prvkov:

3 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$,
1 g/l Fe(III)-citrát,
0,2 g/l $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$,
0,1 g/l ZnCl_2 ,
0,025 g/l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$,
0,02 g/l Na-tetraborát,
0,004 g/l $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$,
0,01 g/l Na-molybdát.

Trvanie procesu: 72 hodín.

Teplota inkubácie: 27°C.

Rýchlosť miešania: 65 otáčok za minútu.

Zavzdušňovanie: 6 m³ vzduchu za hodinu.

Fermentácia sa uskutočňovala bez prídavku činidiel na potlačenie tvorby peny. Produkčné maximum sa dosiahlo po 48 hodinách.

Príklad 5

Produkcia cyclipostinov všeobecného vzorca X až XVA

200 l fermentor spracováva 100 l obsah za nasledujúcich podmienok:

Živné médium:

5g/l glukózy;

20g/l glycerínu;

20g/l sójovej múčky;

5g/l kvasnicového extraktu

3g/l chloridu sodného;

2,5 ml/l roztoku stopových prvkov

pH 7,0 (pred sterilizáciou)

Trvanie procesu: 72 hodín.

Teplota inkubácie: 27°C.

Rýchlosť miešania: 65 otáčok za minútu.

Zavzdušňovanie: 6 m³ vzduchu za hodinu.

Fermentácia sa uskutočňuje bez pridania činidiel na potlačenie tvorby peny. Maximum produkcie sa dosiahne po cca 48 hodinách.

Príklad 6

Izolácia cyclipostinovej zmesi z kultivačného média *Streptomyces species* HAG 004107, DSM 13381

Po ukončení fermentácie *Streptomyces species* HAG 004107, DSM 13381 sa 100 l kultivačnej zmesi z fermentora, získanej podľa príkladu 4 za prídavku asi 2% filtračného činidla (napríklad Celit®) sfiltrovalo a bunková hmota (10 l) sa extrahovala so 40 l metanolu. Metanolický roztok účinnej látky sa zbavil mycélia pomocou filtrácie a skoncentroval sa vo vákuu. Koncentrát sa nalial na pripravený stĺpec 7 l @MCI GEL, CHP20P. Eluoval sa s gradientom vody a propan-2-olu. Výtok z kolóny (20 litrov za

hodinu) sa zachytával vo frakciách (po 10 litrov) a frakcie obsahujúce cyclipostiny (frakcie 19 až 21) sa skoncentrovali vo vákuu. Frakcie sa skúmali pomocou HPLC (pozri Príklad 6). Frakcia 19 obsahovala cyclipostin A až E, rovnako ako ich izoméry, frakcia 20 obsahovala cyclipostin F a jej izoméry, frakcia 21 obsahovala cyclipostin N, P, P2, Q, R, S a T rovnako ako ich izoméry.

Príklad 7

HPLC analýza cyclipostinov

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia HPLC-analýza cyclipostinov sa uskutočňovala pomocou zariadenia HP 1100® s kolónou YMC-Pack Pro C18® [AS-303, 250 x 4,6 mm, S-5 µm, 120°C]. Rýchlosť toku bola 1 ml/minúta, teplota kolóny 40°C. Kolóna sa eluovala gradientom 0,05% trifluóroctovej kyseliny v acetonitrile. Čistý acetonitril sa dosiahol po 11 minútach a potom sa kolóna eluovala izokraticky len s týmto rozpúšťadlom. Detekcia sa uskutočňovala pomocou merania absorpcie ultrafialového svetla pri 210 nm. Za týchto podmienok mali cyclipostiny nasledujúce retenčné časy:

Cyclipostin A	12,7 minút
Cyclipostin A 2	12,6 minút
Cyclipostin F	13,2 minút
Cyclipostin N	15,9 minút
Cyclipostin P	17,7 minút
Cyclipostin P 2	17,3 minút
Cyclipostin Q	18,3 minút
Cyclipostin R	16,7 minút
Cyclipostin R2	16,4 minút
Cyclipostin S	18,5 minút
Cyclipostin T	19,1 minút a
Cyclipostin T 2	18,7 minút.

Príklad 8

Získanie čistého cyclipostinu A a A2

Frakcia 19, získaná podľa Príkladu 6, sa odparila vo vákuu, pridal sa 1 g kontrastného činidla rozpusteného v zmesi voda-metanol (1:1) a zmes sa naniesla na kolónu Nucleoprep 100-5 C18 AB® (21 x 250 mm). Kolóna sa eluovala s gradientom 50% acetonitrilu v 0,01% trifluóroctovej kyseline až do 100% acetonitrilu. Prietok sa nastavil na 50 ml za minútu. Výstup z kolóny sa skúmal meraním absorpcie svetla pri 210 nm, čím sa testovalo blokačné pôsobenie na lipázu. Odoberali sa frakcie s veľkosťou 60 ml. Frakcie číslo 34 a 35 obsahovali cyclipostin A, vo frakciách 41 až 44 bol cyclipostin A2. Tieto frakcie sa spojili, odparili vo vákuu a potom oddelili na kolóne SP 250/10 Nucleosil 100-5 C18 HD® (21 x 250 mm). Ako gradient sa použil 50 až 66% acetonitril v 0,01% trifluóroctovej kyseline, pH hodnota roztoku sa prikvapkaním roztoku hydroxidu amónneho nastavila na 4,0. Frakcie obsahujúce čisté zlúčeniny sa spojili a odparili do sucha. Získalo sa 5,4 mg čistého cyclipostinu A vo forme voskovitej látky a 3 mg cyclipostinu A2 vo forme oleja.

Príklad 9

Charakterizácia cyclipostinu A

Vzhľad: Látka rozpustná v organických rozpúšťadlách obsahujúcich kyslík, zatiaľ čo vo vode a petroléteroch len málo rozpustná, neutrálna, bezfarebná, voskovitá substancja.

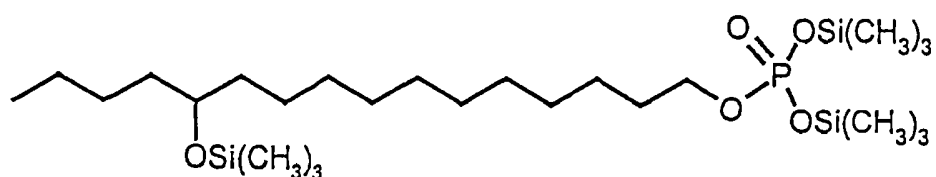
UV-maximum: 228 nm v metanole.

IR-pásky: 1752 a 1671 cm^{-1} .

Pomocou vysokorozlišovacej hmotnostnej spektrometrie v matici nitrobenzylalkohol/LiCl sa našla nasledujúca molekulárna hmotnosť: 467,2757 amu, zodpovedajúca sumárnemu vzorcu cyclipostinu A-Li $\text{C}_{23}\text{H}_{41}\text{O}_7\text{PLi}$. Z toho vyplýva sumárny vzorec pre cyclipostin A $\text{C}_{23}\text{H}_{41}\text{O}_7\text{P}$, molekulárna hmotnosť 460.

Pomocou elektrónsprejovej hmotnostnej spektrometrie v pozi-

tívnom ionizačnom móde (ESI, pozitívne) sa našli píky 461 amu, zodpovedajúce nájdenému $(M+H)^+$, okrem toho charakteristický pík pri 221 amu, zodpovedajúci $C_7H_{10}O_6P$. V ESI negatívnom móde sa našli píky 459 amu $(M-H)^-$ ($C_{16}H_{34}O_5P$) a 219 amu ($C_7H_8O_6P$). Na určenie polohy alkoholovej skupiny sa zlúčenina derivatizovala pomocou N-metyl-N-trimetylsilyltrifluóracetamidu a vzorka sa skúmala pomocou hmotnostnej spektrometrie využívajúcej elektrónovú ionizáciu. Vzniká trimetylsilyl derivát:



s hmotnosťou 554 amu. Poloha silylovanej hydroxyskupiny sa preukázala pomocou intenzívnych iónov 497 (α -štiepenie) a 159 amu (α -štiepenie).

NMR signály: pozri Tabuľka 1

Tabuľka 1:

^1H a ^{13}C NMR chemické posuny cyclipostinu A v metanol- d_4 pri 300 K

	^1H	^{13}C
1	-	171,08 (1,4 Hz) ^{b)}
2	-	114,61 (3,4 Hz) ^{b)}
3	3,87	40,75
4	4,46/3,86	66,04
5	4,31/4,25	69,39 (6,0 Hz) ^{b)}
6	-	161,47 (8,0 Hz) ^{b)}
7	2,40	17,89 (4,6 Hz) ^{b)}
1'	4,25	71,61 (6,6 Hz) ^{b)}
2'	1,73	31,16 (6,6 Hz) ^{b)}
3'	1,41	26,39
n'	3,49	72,45
n±1	1,46-1,33	38,44, 38,15
4'-14' (a)	1,37-1,26	30,85-30,58

15'	1,34	23,84
16'	0,91	14,43

a) okrem n a $n+1$.

b) v zátvorke uvedené $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ interakčné konštanty.

Príklad 10

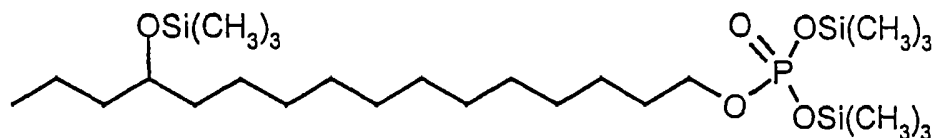
Charakterizácia cyclipostinu B

Cyclipostin B sa pripravil podľa opisu v Príklade 8 pre cyclipostin A, viacnásobným opakovaním chromatografického postupu a charakterizoval sa rovnako ako v Príklade 8.

Vzhľad: látka rozpustná v organických rozpúšťadlách obsahujúcich kyslík, zatiaľ čo vo vode a petroléteroch len málo rozpustná, neutrálna, bezfarebná, voskovitá substancie.

UV-maximum: 228 nm v metanole.

Pomocou elektrónsprejovej hmotnostnej spektrometrie v pozitívnom ionizačnom móde (ESI, pozitívne) sa našli píky 461 amu, zodpovedajúce nájdenému $(\text{M}+\text{H})^+$, okrem toho charakteristický pík pri 221 amu, zodpovedajúci $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_6\text{P}$. V ESI negatívnom móde sa našli píky 459 amu $(\text{M}-\text{H})^-$, 337 amu ($\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{O}_5\text{P}$) a 219 amu ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_6\text{P}$). Na určenie polohy alkoholovej skupiny sa zlúčenina derivatizovala pomocou N-metyl-N-trimetylsilyltrifluóracetamidu a vzorka sa skúmala pomocou hmotnostnej spektrometrie využívajúcej elektrónovú ionizáciu. Vzniká trimetylsilyl derivát s hmotnosťou 554 amu:



Poloha silylovanej hydroxyskupiny sa preukázala pomocou intenzívnych iónov pri 511 amu (α -štiepenie) a 145 amu (α -štiepenie).

Sumárny vzorec cyclipostinu B: $C_{23}H_{41}O_7P$,
molekulová hmotnosť: 460.

Príklad 11

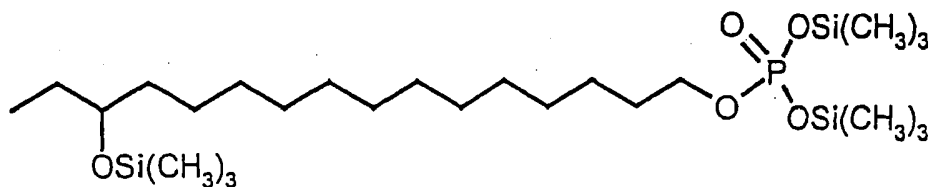
Charakterizácia cyclipostinu C

Cyclipostin C sa pripravil podľa opisu v Príklade 8 pre cyclipostin A, viacnásobným opakovaním chromatografického postupu a charakterizoval sa rovnako ako v Príklade 8.

Vzhľad: látka rozpustná v organických rozpúšťadlách obsahujúcich kyslík, zatiaľ čo vo vode a petroléteri len málo rozpustná, neutrálna, bezfarebná, voskovitá substancia.

UV-maximum: 228 nm v metanole.

Pomocou elektrónsprejovej hmotnostnej spektrometrie v pozitívnom ionizačnom móde (ESI, pozitívne) sa našli píky 461 amu, zodpovedajúce nájdenému $(M+H)^+$, okrem toho charakteristický pík pri 221 amu, zodpovedajúci $C_7H_{10}O_6P$. V ESI negatívnom móde sa našli píky 459 amu $(M-H)^-$, 337 amu ($C_{16}H_{34}O_5P$) a 219 amu ($C_7H_8O_6P$). Na určenie polohy alkoholovej skupiny sa zlúčenina derivatizovala pomocou N-metyl-N-trimetylsilyltrifluóracetamidu a vzorka sa skúmala pomocou hmotnostnej spektrometrie využívajúcej elektrónovú ionizáciu. Vzniká trimetylsilyl derivát s hmotnosťou 554 amu:



Poloha silylovanej hydroxyskupiny sa preukázala pomocou intenzívnych iónov pri 525 amu (α -štiepenie) a 131 amu (α -štiepenie).

Sumárny vzorec cyclipostinu B: $C_{23}H_{41}O_7P$,
molekulová hmotnosť: 460.

Príklad 12

Charakterizácia cyclipostinu F

Frakcia 20, získaná podľa Príkladu 6 sa oddelila rovnako ako je opísané v Príklade 8 a cyclipostin F sa získal viacnásobným opakovaním chromatografického postupu a charakterizoval sa rovnako ako v Príklade 9.

Retenčný čas: 13,2 min.

Vzhľad: látka rozpustná v organických rozpúšťadlách obsahujúcich kyslík, zatiaľ čo vo vode a petroléteri len málo rozpustná, neutrálna, bezfarebná, voskovitá substancja.

UV-maximum: 228 nm v metanole.

Pomocou elektrónsprejovej hmotnostnej spektrometrie v pozitívnom ionizačnom móde (ESI, pozitívne) sa našli píky 459 amu, zodpovedajúce nájdenému $(M+H)^+$, okrem toho charakteristický pík pri 221 amu, zodpovedajúci $C_7H_{10}O_6P$. V ESI negatívnom móde sa našli píky 457,6 amu $(M-H)^-$, 336 amu ($C_{16}H_{32}O_5P$) a 219 amu ($C_7H_8O_6P$).

Sumárny vzorec cyclipostinu B: $C_{23}H_{39}O_7P$,
molekulová hmotnosť: 458.

Príklad 13

Charakterizácia cyclipostinu P

Frakcia 21, získaná podľa Príkladov 5 a 6 sa oddelila rovnako ako je opísané v Príklade 9 a cyclipostin P sa získal viacnásobným opakovaním chromatografického postupu (210 mg) a charakterizoval sa rovnako ako v Príklade 9. Cyclipostin P sa kryštalizoval rozpustením 210 mg v 3 ml propan-2-olu a 13 ml acetonitrilu a prídavkom 8 ml vody.

Retenčný čas: 17,7 min.

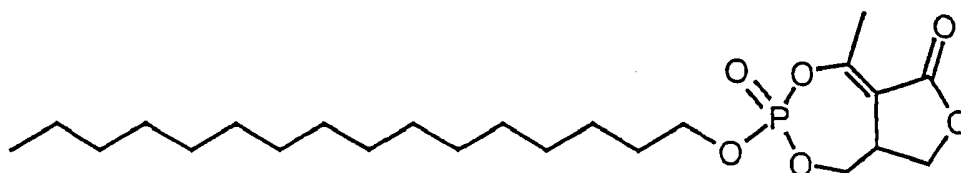
Vzhľad: látka rozpustná v organických rozpúšťadlách obsahujúcich kyslík, zatiaľ čo vo vode a petroléteri len málo rozpustná,

neutrálna, bezfarebná, voskovitá substancia.

UV-maximum: 228 nm v metanole.

IČ pásy: 2917, 2852, 1753, 1671, 1471, 1214, 996 a 832 cm^{-1} .

Pomocou vysokorozlišovacej hmotnostnej spektrometrie v matrici nitrobenzylalkoholu sa našla nasledujúca molekulárna hmotnosť: 445,2717 amu, zodpovedajúca $(\text{M}+\text{H})^+$ sumárnemu vzorcu cyclipostinu P: $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{O}_6\text{P}$. Z toho vyplýva sumárny vzorec pre cyclipostin P $\text{C}_{23}\text{H}_{41}\text{O}_6\text{P}$, molekulárna hmotnosť 444. Pomocou elektrónsprejovej hmotnostnej spektrometrie v pozitívnom ionizačnom móde (ESI, pozitívne) sa našli píky 445 amu, zodpovedajúce nájdenému $(\text{M}+\text{H})^+$, okrem toho charakteristický pík pri 221 amu, zodpovedajúci $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_6\text{P}$. V ESI negatívnom módu sa našli píky 443 amu $(\text{M}-\text{H})^-$, 321 amu ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{P}$) a 219 amu ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_6\text{P}$).



NMR dáta sú uvedené v Tabuľke 2.

Tabuľka 2: Chemické posuny cyclipostinu P v MeOD pri 300 K.

	^1H	^{13}C
1	-	171,08
2	-	114,60 (3,0 Hz) ^{a)}
3	3,87	40,74
4	4,47/3,85	66,05
5	4,30/4,25	69,40 (6,0 Hz) ^{a)}
6	-	161,47 (8,0 Hz) ^{a)}
7	2,40	17,90 (4,6 Hz) ^{a)}
1'	4,24	71,62 (6,9 Hz) ^{a)}
2'	1,73	31,16 (6,3 Hz) ^{a)}
3'	1,41	26,38
4'-13'	1,34-1,29	30,76-30,11
14'	1,34-1,29	33,07

15'	1,31	23,72
16'	0,89	14,42

a) V zátvorkách sú uvedené interakčné konštanty $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$.

Príklad 14

Charakterizácia cyclipostinu P2

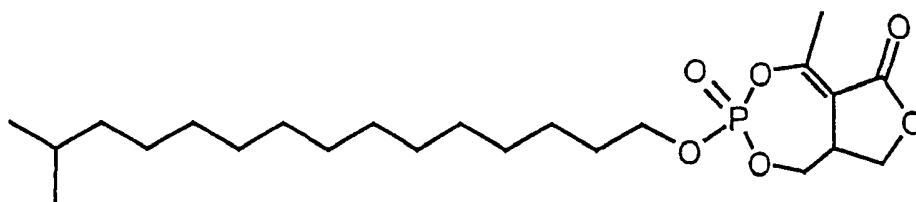
Frakcia 21, získaná podľa Príkladov 5 a 6 sa oddelila rovnako ako je opísané v Príklade 8 a cyclipostin P sa získal viacnásobným opakovaním chromatografického postupu (130 mg) a charakterizoval sa rovnako ako v Príklade 9.

Retenčný čas: 17,1 min.

Vzhľad: látka rozpustná v organických rozpúšťadlách obsahujúcich kyslík, zatiaľ čo vo vode a petroléteroch len málo rozpustná, neutrálna, bezfarebná, voskovitá substancie.

UV-maximum: 228 nm v metanole.

Pomocou vysokorozlišovacej hmotnostnej spektrometrie v matrici nitrobenzylalkoholu sa našla nasledujúca molekulárna hmotnosť: 445,2721 amu, zodpovedajúca $(\text{M}+\text{H})^+$ sumárnemu vzorcu cyclipostinu P: $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{O}_6\text{P}$. Z toho vyplýva sumárny vzorec pre cyclipostin P2 $\text{C}_{23}\text{H}_{41}\text{O}_6\text{P}$, molekulárna hmotnosť 444. Pomocou elektro-sprej hmotnostnej spektrometrie v pozitívnom ionizačnom móde (ESI, pozitívne) sa našli píky 445 amu, zodpovedajúce $(\text{M}+\text{H})^+$, okrem toho charakteristický pik pri 221 amu, zodpovedajúci $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_6\text{P}$. V ESI negatívnom móde sa našli píky 443 amu $(\text{M}-\text{H})^-$, 321 amu ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{P}$) a 219 amu ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_6\text{P}$).



NMR dáta sú uvedené v Tabuľke 3.

Tabuľka 3: Chemické posuny cyclipostinu P2 v MeOD pri 300 K.

	^1H	^{13}C
1	-	171,05
2	-	114,60 (3,2 Hz) ^{a)}
3	3,87	40,74
4	4,46/3,85	66,02
5	4,30/4,25	69,38 (6,0 Hz) ^{a)}
6	-	161,46 (8,0 Hz) ^{a)}
7	2,40	17,90 (4,6 Hz) ^{a)}
1'	4,24	71,60 (6,9 Hz) ^{a)}
2'	1,73	31,16 (6,3 Hz) ^{a)}
3'	1,41	26,39
4'-11'	1,34-1,29	31,04-30,11
12'	1,29	28,53
13'	1,17	40,25
14'	1,52	29,15
15',16'	0,87	23,04

a) V zátvorkách sú uvedené interakčné konštanty $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$.

Príklad 15

Výroba a charakterizácia cyclipostinu N

Frakcia 21, získaná podľa Príkladov 5 a 6 sa oddelila rovnako ako je opísané v Príklade 8 a cyclipostin N sa získal viacnásobným opakovaním chromatografického postupu (2 mg) a charakterizoval sa rovnako ako v Príklade 9.

Retenčný čas: 15,9 min.

Vzhľad: látka rozpustná v organických rozpúšťadlách obsahujúcich kyslík, zatiaľ čo vo vode a petroléteroch len málo rozpustná, neutrálna, bezfarebná, voskovitá substancie.

UV-maximum: 228 nm v metanole.

Pomocou vysokorozlišovacej hmotnostnej spektrometrie v mat-

rici nitrobenzylalkoholu sa našiel kvázi-molekulárny ión $(M+H)^+$ 417,2405 amu, zodpovedajúci sumárnemu vzorcu cyclipostinu N: $C_{21}H_{38}O_6P$ (Teória: 417,2406). Charakteristický pík v ESI pozitívnom móde: 221 amu.

Tabuľka 4: Chemické posuny cyclipostinu N v MeOD pri 300 K.

	^1H	^{13}C
1	-	171,07
2	-	114,60 (3,1 Hz) ^{a)}
3	3,87	40,74
4	4,45/3,84	66,03
5	4,30/4,25	69,39 (5,9 Hz) ^{a)}
6	-	161,47 (8,0 Hz) ^{a)}
7	2,40	17,90 (4,9 Hz) ^{a)}
1'	4,24	71,60 (6,6 Hz) ^{a)}
2'	1,73	31,16 (6,2 Hz) ^{a)}
3'	1,41	26,38
4'-11'	1,35-1,26	30,76-30,11
12'	1,35-1,26	33,06
13'	1,31	23,72
14'	0,89	14,41

a) V zátvorkách sú uvedené interakčné konštanty $^{13}C/^{31}P$.

Príklad 16

Výroba a charakterizácia cyclipostinu R

Frakcia 21, získaná podľa Príkladov 5 a 6 sa oddelila rovnako ako je opísané v Príklade 8 a cyclipostin R sa získal viacnásobným opakovaním chromatografického postupu (8 mg) a charakterizoval sa rovnako ako v Príklade 9.

Retenčný čas: 16,7 min.

Vzhľad: látka rozpustná v organických rozpúšťadlách obsahujúcich kyslík, zatiaľ čo vo vode a petroléteroch len málo rozpustná,

neutrálna, bezfarebná, voskovitá substancia.

UV-maximum: 228 nm v metanole.

Pomocou vysokorozlišovacej hmotnostnej spektrometrie za podmienok FAB-MS sa našiel kvázi-molekulárny ión $(M+H)^+$ 431,2561 amu, zodpovedajúci sumárnemu vzorcu cyclipostinu R: $C_{22}H_{40}O_6P$ (Teória: 431,2562). Charakteristický pík v ESI pozitívnom móde: 221 amu.

Tabuľka 5: Chemické posuny cyclipostinu R v MeOD pri 300 K.

	^1H	^{13}C
1	-	171,06
2	-	114,58 (3,2 Hz) ^{a)}
3	3,87	40,75
4	4,45/3,85	66,04
5	4,30/4,25	69,40 (6,0 Hz) ^{a)}
6	-	161,48 (8,0 Hz) ^{a)}
7	2,40	17,90 (5,0 Hz) ^{a)}
1'	4,24	71,61 (7,0 Hz) ^{a)}
2'	1,73	31,16 (6,2 Hz) ^{a)}
3'	1,41	26,38
4'-12'	1,37-1,25	30,74-30,10
13'	1,17	33,06
14'	1,30	23,71
15'	0,89	14,40

a) V zátvorkách sú uvedené interakčné konštanty $^{13}C/^{31}P$.

Príklad 17

Výroba a charakterizácia cyclipostinu R2

Frakcia 21, získaná podľa Príkladov 5 a 6 sa oddelila rovnako ako je opísané v Príklade 8 a cyclipostin R2 sa získal viacnásobným opakovaním chromatografického postupu (8 mg) a charakterizoval sa rovnako ako v Príklade 9.

Retenčný čas: 16,4 min.

Vzhľad: látka rozpustná v organických rozpúšťadlách obsahujúcich kyslík, zatiaľ čo vo vode a petroléteroch len málo rozpustná, neutrálna, bezfarebná, voskovitá substancja.

UV-maximum: 228 nm v metanole.

Pomocou vysokorozlišovacej hmotnostnej spektrometrie za podmienok FAB-MS sa našiel kvázi-molekulárny ión $(M+H)^+$ 431,2564 amu, zodpovedajúci sumárnemu vzorcu cyclipostinu R2: $C_{22}H_{40}O_6P$ (Teória: 431,2562). Charakteristický pík v ESI pozitívnom móde: 221 amu.

Tabuľka 6: Chemické posuny cyclipostinu R2 v MeOD pri 300 K.

	^1H	^{13}C
1	-	171,06(1,7 Hz) ^{a)}
2	-	114,58(3,1 Hz) ^{a)}
3	3,87	40,75
4	4,46/3,85	66,03
5	4,30/4,25	69,39(6,0 Hz) ^{a)}
6	-	161,47(8,0 Hz) ^{a)}
7	2,40	17,90(4,9 Hz) ^{a)}
1'	4,24	71,60(6,9 Hz) ^{a)}
2'	1,73	31,16(6,6 Hz) ^{a)}
3'	1,41	26,38
4'-10'	1,37-1,25	31,02-30,10
11'	1,29	28,51
12'	1,16	40,24
13'	1,51	29,15
14',15'	0,87	23,02

a) V zátvorkách sú uvedené interakčné konštanty $^{13}C/^{31}P$.

Príklad 18

Výroba a charakterizácia cyclipostinu S

Frakcia 21, získaná podľa Príkladov 5 a 6 sa oddelila rovnako ako je opísané v Príklade 8 a cyclipostin S sa získal viacnásobným opakovaním chromatografického postupu (0,7 mg) a charakterizoval sa rovnako ako v Príklade 9.

Retenčný čas: 18,5 min.

Vzhľad: látka rozpustná v organických rozpúšťadlách obsahujúcich kyslík, zatiaľ čo vo vode a petroléteri len málo rozpustná, neutrálna, bezfarebná, tuhá substancia.

UV-maximum: 228 nm v metanole.

Pomocou vysokorozlišovacej hmotnostnej spektrometrie za podmienok FAB-MS sa našiel kvázi-molekulárny ión $(M+H)^+$ 459,2883 amu, zodpovedajúci sumárnemu vzorcu cyclipostinu S: $C_{24}H_{44}O_6P$ (Teória: 459,2575). Charakteristický pík v ESI pozitívnom móde: 235 amu.

Tabuľka 7: Chemické posuny cyclipostinu S v MeOD pri 300 K.

	^1H	^{13}C
1	-	170,87 (1,4 Hz) ^{a)}
2	-	113,66 (3,1 Hz) ^{a)}
3	3,85	40,77
4	4,45/3,85	66,04
5	4,29/4,24	69,17 (6,0 Hz) ^{a)}
6	-	165,80 (8,3 Hz) ^{a)}
7	2,98/2,82	25,05 (4,6 Hz) ^{a)}
8	1,16	10,86
1'	4,25	71,57 (6,9 Hz) ^{a)}
2'	1,74	31,19 (6,3 Hz) ^{a)}
3'	1,42	26,41
4'-13'	1,34-1,29	30,76-30,11
14'	1,34-1,29	33,07
15'	1,31	23,73
16'	0,89	14,43

a) V zátvorkách sú uvedené interakčné konštanty $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$.

Príklad 19

Výroba a charakterizácia cyclipostinu T

Frakcia 21, získaná podľa Príkladov 5 a 6 sa oddelila rovnako ako je opísané v Príklade 8 a cyclipostin T sa získal viacnásobným opakováním chromatografického postupu (5 mg) a charakterizoval sa rovnako ako v Príklade 9.

Retenčný čas: 19,1 min.

Vzhľad: látka rozpustná v organických rozpúšťadlách obsahujúcich kyslík, zatiaľ čo vo vode a petroléteri len málo rozpustná, neutrálna, bezfarebná, tuhá substancia.

UV-maximum: 228 nm v metanole.

Pomocou vysokorozlišovacej hmotnostnej spektrometrie za podmienok FAB-MS sa našiel kvázi-molekulárny ión $(\text{M}+\text{H})^+$ 473,3030 amu, zodpovedajúci sumárnemu vzorcu cyclipostinu T: $\text{C}_{25}\text{H}_{46}\text{O}_6\text{P}$ (Teória: 473,3032). Charakteristický pík v ESI pozitívnom móde: 249 amu.

Tabuľka 8: Chemické posuny cyclipostinu T v MeOD pri 300 K.

	^1H	^{13}C
1	–	171,98 (1,7 Hz) ^{a)}
2	–	114,39 (3,1 Hz) ^{a)}
3	3,87	40,78
4	4,46/3,85	66,02
5	4,29/4,26	69,23 (5,9 Hz) ^{a)}
6	–	164,69 (8,7 Hz) ^{a)}
7	2,89/2,83	33,35 (4,5 Hz) ^{a)}
8	1,65	20,63
9	0,98	13,84
1'	4,25	71,57 (6,6 Hz) ^{a)}
2'	1,74	31,18 (6,2 Hz) ^{a)}
3'	1,42	26,42

4'-13'	1,34-1,29	30,78-30,11
14'	1,34-1,29	33,06
15'	1,31	23,72
16'	0,89	14,42

a) V zátvorkách sú uvedené interakčné konštanty $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$.

Príklad 20

Výroba a charakterizácia cyclipostinu T2

Frakcia 21, získaná podľa Príkladov 5 a 6 sa oddelila rovnako ako je opísané v Príklade 8 a cyclipostin T2 sa získal viacnásobným opakovaním chromatografického postupu (4 mg) a charakterizoval sa rovnako ako v Príklade 9.

Retenčný čas: 18,7 min.

Vzhľad: látka rozpustná v organických rozpúšťadlách obsahujúcich kyslík, zatiaľ čo vo vode a petroléteroch len málo rozpustná, neutrálna, bezfarebná, tuhá substancia.

UV-maximum: 228 nm v metanole.

Pomocou vysokorozlišovacej hmotnostnej spektrometrie za podmienok FAB-MS sa našiel kvázi-molekulárny ión $(\text{M}+\text{H})^+$ 473,3035 amu, zodpovedajúci sumárnemu vzorcu cyclipostinu T: $\text{C}_{25}\text{H}_{46}\text{O}_6\text{P}$ (Teória: 473,3032). Charakteristický pík v ESI pozitívnom móde: 249 amu.

Tabuľka 9: Chemické posuny cyclipostinu T2 v MeOD pri 300 K.

	^1H	^{13}C
1	-	170,98 (1,7 Hz) ^{a)}
2	-	114,40 (3,1 Hz) ^{a)}
3	3,87	40,78
4	4,46/3,85	66,02
5	4,29/4,25	69,23 (5,9 Hz) ^{a)}
6	-	164,69 (8,7 Hz) ^{a)}
7	2,90/2,83	33,35 (4,5 Hz) ^{a)}

8	1,65	20,63
9	0,98	13,84
1'	4,24	71,57 (6,9 Hz) ^{a)}
2'	1,74	31,18 (6,2 Hz) ^{a)}
3'	1,42	26,42
4'-11'	1,37-1,25	31,03-30,11
12'	1,29	28,52
13'	1,17	40,25
14'	1,52	29,15
15',16'	0,87	23,03

a) V zátvorkách sú uvedené interakčné konštanty $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$.

Príklad 21

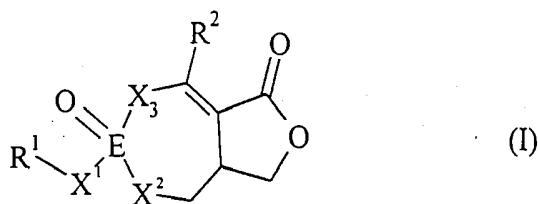
Blokovanie hormón-senzitívnej lipázy (HSL)

Hodnoty IC_{50} na blokovanie hormón-senzitívnej lipázy u krýs s trioleylglycerínom ako substrátom:

Cyclipostin A: 20 nM,
 Cyclipostin N: 450 nM,
 Cyclipostin P: 30 nM,
 Cyclipostin P2: 40 nM,
 Cyclipostin R: 10 nM,
 Cyclipostin R2: 220 nM,
 Cyclipostin S: 20 nM,
 Cyclipostin T: 200 nM,
 Cyclipostin T2: 60 nM.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Zlúčenina všeobecného vzorca I



kde

R¹ je

1. uhľovodíkový reťazec s 2 až 30 atómami uhlíka, ktorý môže byť priamy, rozvetvený, nasýtený alebo nenasýtený, karbocyklický alebo heterocyklický, pričom uhľovodíkový reťazec je prípadne raz alebo dvakrát substituovaný s:

1.1 -OH skupinou,

1.2 =O skupinou,

1.3 -O-C₁-C₆-alkylovou skupinou, kde alkyl je priamy alebo rozvetvený,

1.4 -O-C₂-C₆-alkenylovou skupinou, kde alkenyl je priamy alebo rozvetvený,

1.5 -C₁-C₆-alkylovou skupinou, kde alkyl je priamy alebo rozvetvený,

1.6 -arylovou skupinou,

1.7 -C₁-C₆-alkylbenzénom,

1.8 -difenylovou skupinou,

1.9 -NH-C₁-C₆-alkylovou skupinou, kde alkyl je priamy alebo rozvetvený,

1.10 -NH-C₂-C₆-alkenylovou skupinou, kde alkenyl je priamy alebo rozvetvený,

1.11 -NH₂ skupinou,

1.12 =S skupinou,

1.13 -S-C₁-C₆-alkylovou skupinou, kde alkyl je priamy alebo rozvetvený,

1.14 -S-C₂-C₆-alkenylovou skupinou, kde alkenyl je priamy alebo rozvetvený,

1.15 halogénom,

kde substituenty 1.1 až 1.15 môžu byť tiež substituované,

2.0 $[-\text{aryl}-(\text{CH}_2)_n]_m$ skupina, kde $[-\text{aryl}-(\text{CH}_2)_n]_m$ skupina je nesubstituovaná alebo substituovaná raz alebo dvakrát substituentami opísanými v 1.1 až 1.15 a n a m sú nezávisle od seba celé čísla 0, 1, 2 alebo 3;

R^2 je

1.0 $\text{C}_1\text{-C}_6$ -alkylová skupina, kde alkyl je nesubstituovaný alebo substituovaný raz alebo dvakrát substituentami opísanými v 1.1 až 1.15,

2.0 $\text{C}_2\text{-C}_6$ -alkenylová skupina, kde alkenyl je nesubstituovaný alebo substituovaný raz alebo dvakrát substituentami opísanými v 1.1 až 1.15,

3.0 $\text{C}_1\text{-C}_6$ -alkinylová skupina, kde alkynyl je nesubstituovaný alebo substituovaný raz alebo dvakrát substituentami opísanými v 1.1 až 1.15,

E je fosfor (P) alebo síra (S),

X^1 , X^2 a X^3 sú nezávisle od seba

1.0 $-\text{O}-$,

2.0 $-\text{NH}-$,

3.0 $-\text{N}=\text{}$,

4.0 $-\text{S}-$, alebo

5.0 $-\text{CH}_2-$ a $-\text{CHR}^2-$,

vo všetkých ich stereochemických formách a zmesiach týchto foriem v ľubovoľnom pomere, rovnako ako jej fyziologicky prijateľné soli a chemické ekvivalenty.

2. Zlúčenina všeobecného vzorca I alebo jej fyziologicky prijateľná soľ podľa nároku 1, kde R^1 predstavuje uhľovodíkový reťazec

s 10 až 18 atómami uhlíka, ktorý môže byť priamy, rozvetvený, nasýtený alebo nenasýtený, karbocyklický alebo heterocyklický alebo aromatický, pričom uhľovodíkový reťazec je nesubstituovaný alebo raz alebo dvakrát substituovaný substituentami opísanými v 1.1 až 1.15.

3. Zlúčenina všeobecného vzorca I, alebo jej fyziologicky prijateľná soľ, podľa nárokov 1 alebo 2, kde

R^1 je

- 1.0 $-(CH_2)_{15}CH_3$,
- 2.0 $-(CH_2)_{13}CH(CH_3)_2$,
- 3.0 $-(CH_2)_{11}CH(OH)(CH_2)_3CH_3$,
- 4.0 $-(CH_2)_{11}CH(OH)CH_2CH(CH_3)_2$,
- 5.0 $-(CH_2)_{12}CH(OH)(CH_2)_2CH_3$,
- 6.0 $-(CH_2)_{13}CH(OH)CH_2CH_3$,
- 7.0 $-(CH_2)_{14}CH(OH)CH_3$,
- 8.0 $-(CH_2)_{15}CH_2(OH)$,
- 9.0 $-(CH_2)_{16}CH_3$,
- 10.0 $-(CH_2)_{13}C=OCH_2CH_3$,
- 11.0 $-(CH_2)_{12}C=OCH_2CH_2CH_3$,
- 12.0 $-(CH_2)_{11}C=OCH_2CH_2CH_2CH_3$,
- 13.0 $-(CH_2)_{13}CH_3$,
- 14.0 $-(CH_2)_{11}CH(CH_3)_2$,
- 15.0 $-(CH_2)_{14}CH_3$, alebo
- 16.0 $-(CH_2)_{12}CH(CH_3)_2$.

4. Zlúčenina všeobecného vzorca I alebo jej fyziologicky prijateľná soľ, podľa nárokov 1, 2 alebo 3, kde R^2 je alkyl, ktorý má 1 až 6 atómov uhlíka.

5. Zlúčenina všeobecného vzorca I alebo jej fyziologicky prijateľná soľ, podľa nároku 4, kde R^2 je $-CH_3$, $-CH_2CH_3$ alebo $-CH_2CH_2CH_3$ skupina.

6. Zlúčenina všeobecného vzorca I alebo jej fyziologicky prijateľná soľ podľa jedného alebo viacerých nárokov 1 až 5, ktorá sa dá pripraviť pomocou mikroorganizmu *Streptomyces species* HAG 004107, DSM 13381 alebo jedným z jeho variantov alebo mutácií za vhodných podmienok fermentáciou v kultivačnom médiu až do nahromadenia jednej alebo viacerých zlúčenín všeobecného vzorca I v kultivačnom médiu, pričom sa zlúčenina následne izoluje z kultivačného média, a prípadne sa prevedie do formy chemického ekvivalentu a fyziologicky prijateľnej soli.

7. Spôsob výroby zlúčeniny všeobecného vzorca I alebo jej fyziologicky prijateľnej soli, podľa jedného alebo viacerých nárokov 1 až 6, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa mikroorganizmus *Streptomyces species* HAG 004107, DSM 13381 alebo jeden z jeho variantov alebo mutácií fermentuje v kultivačnom médiu za vhodných podmienok až do nahromadenia jednej alebo viacerých zlúčenín všeobecného vzorca I v kultivačnom médiu, pričom zlúčenina sa následne izoluje z kultivačného média, a prípadne sa prevedie do formy chemického ekvivalentu a fyziologicky prijateľnej soli.

8. Spôsob výroby zlúčeniny všeobecného vzorca I podľa nároku 7, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa fermentácia uskutočňuje za aeróbnych podmienok pri teplotách od 18 do 35°C, pri hodnotách pH od 6 do 8.

9. Zlúčenina všeobecného vzorca I alebo jej fyziologicky prijateľná soľ podľa jedného alebo viacerých nárokov 1 až 6 na použitie ako liečivo.

10. Zlúčenina všeobecného vzorca I alebo jej fyziologicky prijateľná soľ podľa jedného alebo viacerých nárokov 1 až 6 na použitie ako liečivo na inhibíciu lipáz.

11. Zlúčenina všeobecného vzorca I alebo jej fyziologicky prijateľná soľ podľa jedného alebo viacerých nárokov 1 až 6 na použitie ako antidiabetikum.

12. Farmaceutický prípravok, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje aspoň jednu zlúčeninu všeobecného vzorca I alebo jej fyziologicky prijateľnú soľ podľa jedného alebo viacerých nárokov 1 až 6.

13. Spôsob výroby farmaceutického prípravku podľa nároku 12, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa aspoň jedna zlúčenina všeobecného vzorca I alebo jej fyziologicky prijateľná soľ, podľa jedného alebo viacerých nárokov 1 až 6 privedie do vhodnej dávkovacej formy spolu s vhodnou pomocnou látkou a/alebo nosičom.

14. *Streptomyces species* HAG 004107, DSM 13381.