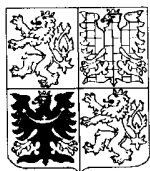


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **15.06.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **24.06.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/98111636**

(33) Země priority: **EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.05.2001**
(Věstník č. 5/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/EP99/04127**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/67408**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 4841

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 P 1/04

C 07 G 17/00

C 12 N 1/20

A 61 K 31/00

//(C 12 P 1/04, C 12 R 1:465)

(71) Přihlašovatel:

AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH
, Frankfurt, DE;

(72) Původce:

Ramakrishna Nirogi Venkata Satya, Mumbai, IN;
Swamy Keshavapura Hosamane Sreedhara, Mumbai,
IN;
Kumar Erra Koteswara Satya Vijaya, Mumbai, IN;
Kushwaha Manoj Maniram Singh, Thane, IN;
Kota Sridevi, Mumbai, IN;
Raman Mythili, Mumbai, IN;
Tare Swati Dhananjay, Mumbai, IN;
Deshmukh Sunil Kumar, Thane, IN;
Schummer Dietmar, Langen, DE;
Kurz Michael, Hofheim, DE;
Kogler Herbert, Glashütten, DE;

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Mumbaistatin, způsob jeho přípravy a použití
mumbaistatinu jako léčiva**

(57) Anotace:

Sloučenina mumbaistatin s molekulárním sumárním vzorcem $C_{28}H_{20}O_{12}$ se připravuje kultivací mikroorganismů druhu streptomyces HIL 008003 (DSM 11641) v aerobních podmínkách v živém médiu obsahujícím zdroj uhlíku a dusíku. Poté se mumbaistatin izoluje a purifikuje a případně se konvertuje na lakton L 970860 s molekulovým sumárním vzorcem $C_{28}H_{18}O_{11}$, nebo soli nebo deriváty mumbaistatinu nebo laktonu. Mumbaistatin nebo lakton L 970860 jsou inhibitory translokázy glukózo-6-fosfátu.

Mumbaistatin, způsob jeho přípravy a použití mumbaistatinu jako léčiva

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nové sloučeniny nazvané mumbaistatin, kterou lze získat kultivací mikroorganismu HIL-008003 (DSM 11641), a jejích farmaceuticky přijatelných solí a derivátů. Mumbaistatin je inhibitor translokázy glukózo-6-fosfátu a lze ho užít k léčení *diabetes mellitus*. Předkládaný vynález se dále týká způsobu výroby mumbaistatinu, mikroorganismu HIL-008003 (DSM 11641), použití mumbaistatinu a jeho farmaceuticky přijatelných solí a derivátů jakožto léčiva, a zejména jejich použití k léčení *diabetes mellitus*, a dále se týká farmaceutického přípravku obsahujícího mumbaistatin nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl nebo derivát.

Dosavadní stav techniky

Zvýšená míra vylučování jaterní glukózy je obecným znakem onemocnění *diabetes mellitus*. Zvláště silná korelace mezi hladinou glukózy v plazmě po hladovění a výstupem jaterní glukózy byla nalezena v případě *diabetes mellitus* nezávislého na inzulínu (NIDDM). Dvě metabolické dráhy, ve kterých se tvoří glukóza v játrech, jsou glukoneogeneze a glykogenolýza. Konečné kroky obou těchto metabolických drah jsou katalyzovány mikrosomální glukózo-6-fosfatázou, klíčovým enzymem homeostatické regulace hladiny krevní glukózy. Je známo, že hladina tohoto enzymu je zvýšená jak při

experimentálním tak i patologickém diabetu. Ovlivnění tohoto enzymu by tedy mělo vést ke snížené tvorbě glukózy v játrech.

Jaterní glukózo-6-fosfatáza je mnohasložkový systém obsahující nejméně tři funkční aktivity: translokázu glukózo-6-fosfátu (T1), glukózo-6-fosfátfosfohydrolázu a translokázu fosfát/pyrofosfátu (T2). Translokáza glukózo-6-fosfátu umožňuje transport glukózo-6-fosfátu do lumen endoplazmatického retikula (ER). Fosfohydroláza, s aktivním místem situovaným na vnitřním (do lumen obráceném) povrchu ER, hydrolyzuje glukózo-6-fosfát a uvolňuje glukózu a fosfát do lumen. Zatímco výtok fosfátu je umožněn translokázou fosfát/pyrofosfátu, přesný mechanismus výtoku glukózy není dosud znám.

Vysoký stupeň substrátové specifčnosti translokázy glukózo-6-fosfátu z ní činí potenciální cíl pro farmakologickou intervenci při léčení *diabetes mellitus*. Ze všech fyziologicky se vyskytujících cukerných fosfátů pouze glukózo-6-fosfát je transportován translokázou. Naproti tomu fosfatáza je nespecifická a je známo, že hydrolyzuje celou řadu organických fosforečných esterů.

V odborné literatuře byla popsána řada nespecifických inhibitorů glukózo-6-fosfatázy, např. phlorrhizin (J. Biol. Chem. 242, 1955-1960, 1967, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoová kyselina (Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 694-699, 1972, 2,2'-diisothiokyanostilben a 2-isothiokyanato-2'-acetostilben (J. Biol. Chem. 255, 1113-1119, 1980). První terapeuticky využitelný inhibitor glukózo-6-fosfatázového systému byly navrženy v Evropských patentových přihláškách EP-A-587 087 a EP-A-587 088. Kodaistatiny A, B, C a D, popsané v mezinárodní patentové přihlášce publikované jako WO 98/47888, byly prvními inhibitory translokázy glukózo-6-fosfátu z mikrobiálního zdroje.

Podstata vynálezu

Bylo zjištěno, že z různých mikrobiálních zdrojů je možné získat novou sloučeninu s vysokou inhibiční aktivitou pro translokázu glukózo-6-fosfát, která byla nazvána mumbaistatin. Předkládaný vynález se týká této sloučeniny mumbaistatinu, která má sumární vzorec $C_{28}H_{20}O_{12}$ a která je charakterizována jednou nebo několika fyzikálně-chemickými vlastnostmi a spektrálními vlastnostmi uvedenými dále v popisu, jako jsou např. 1H NMR spektroskopická data, uvedená na 1H NMR spektru na obr. 9, a ^{13}C NMR spektroskopická data, uvedená na ^{13}C NMR spektru na obr. 10, a jeho farmaceuticky přijatelných solí a derivátů, jako jsou estery, ethery a zřejmé chemické ekvivalenty, včetně všech stereoisomerních a tautomerních forem.

Mumbaistatin má novou, dosud nepopsanou strukturu, patřící do třídy chinonových sloučenin. Průzkum chemické literatury v databázi Chemical Abstract užitím molekulového vzorce jakožto vyhledávacího klíče ukázal, že mumbaistatin je nová sloučenina. Žádná jiná sloučenina nemá strukturní vlastnosti mumbaistatinu.

Mumbaistatin je možné získat kultivací mikroorganismu označeného jako kultura HIL-008003 nebo Y-9645974 (v této přihlášce označován jako HIL-008003). Tento mikroorganismus použitý k produkci mumbaistatinu byl izolován ze vzorků půdy z řečiště řeky Hiranyakeshi v blízkosti Amboli, Maharashtra v Indii. Mikroorganismus označený HIL-008003 byl později identifikován jako *Streptomyces litmocidini* a byl uložen dne 4. července 1997 v Německé sbírce mikroorganismů a buněčných kultur (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124, Braunschweig, Německo) jako vzorek č. DSM 11641.

Předkládaný vynález dále poskytuje způsob přípravy nové sloučeniny nazvané mumbaistatin a jejích farmaceuticky přijatelných solí a derivátů z kmenu *Streptomyces litmocidini* HIL-008003, jeho mutant a variant. Tento způsob spočívá v tom, že se kultivuje kultura HIL-008003 v aerobních podmínkách v živném médiu obsahujícím jeden nebo více zdrojů uhlíku a jeden nebo více zdrojů dusíku a případně další anorganické soli sloužící k výživě a/nebo stopové prvky, a pak se sloučenina podle předkládaného vynálezu izoluje a purifikuje obvyklým způsobem.

Živné médium výhodně obsahuje zdroje uhlíku, dusíku a dalších živných anorganických solí a případně i stopové prvky. Zdrojem uhlíku je např. škrob, glukóza, sacharóza, dextrin, fruktóza, melasa, glycerol, laktóza, galaktóza, výhodně glukóza. zdrojem dusíku je např. sojový nebo arašidový bujón, kvasničný extrakt, hovězí extrakt, pepton, tryptonový nebo sladový extrakt, kukuřičný výluh, želatina nebo casaminové kyseliny, výhodně sojový bujón a kukuřičný výluh.

Surový materiál může být dále purifikován pomocí kterékoliv z technik jako jsou:

- chromatografie s normální fází užívající oxid hlinitý nebo silikagel jakožto stacionární fází a eluenty jako ethylacetát, chloroform, methanol nebo jejich kombinace,

- chromatografie s reverzní fází užívající silikagel pro reverzní fází jako je např. dimethyloktadecylsilylsilikagel, zvaný též RP-18, nebo dimethyloktylsilylsilikagel, zvaný též RP-8, jakožto stacionární fází, a eluenty jako voda, pufrý, např. fosfátový, acetátový nebo citrátový (pH 2 až 8) a organická rozpouštědla jako methanol, acetonitril, aceton, tetrahydrofuran nebo jejich kombinace,

- gelová permeační chromatografie užívající pryskyřice

jako jsou Sephadex®LH-20 (Pharmacia Chemical Industries, Švédsko), TSKgel® Toypearl HW-40F (TosoHaas, Tosoh Corp., Japonsko) s rozpouštědly jako je methanol, chloroform, aceton, ethylacetát nebo jejich kombinace, a nebo Sephadex® G-10 a G-25 s vodou, nebo

- protiproudová chromatografie užívající dvoufázový rozpouštědlový systém ze dvou a více rozpouštědel jako je voda, methanol, ethanol, isopropanol, n-propanol, tetrahydrofuran, aceton, acetonitril, methylenchlorid, chloroform, ethylacetát, petrolether, benzen a toluen.

Tyto metody lze užívat opakovaně nebo lze kombinovat různé metody. Výhodným způsobem je chromatografie přes Toypearl® následovaná reverzní fází modifikovaného silikagelu (RP-18).

Sloučenina mumbaistatin může být konvertována na farmaceuticky přijatelné soli a deriváty, jako jsou např. estery a ethery a jiné zřejmě chemické ekvivalenty, které jsou také součástí předkládaného vynálezu. Vynález se také týká všech solí a derivátů mumbaistatinu, které samy osobě nejsou vhodné jako léčiva, ale mohou být užity jako meziprodukty při přípravě farmaceuticky přijatelných solí a derivátů. Vynález zahrnuje soli a deriváty mumbaistatinu ve všech izomerních a tautomerních formách. Soli a deriváty mumbaistatinu mohou být připraveny standardními postupy, které jsou odborníkovi známy. Soli jako jsou např. sodné a vápenaté soli mohou být připraveny např. působením vhodné sodné a vápenaté baze na mumbaistatin. Estery mohou být připraveny např. reakcí mumbaistatinu s karboxylovými kyselinami za přítomnosti činidla jako je např. dicyklohexylkarbodiimid (DCC) nebo působením acylačních činidel, jako jsou např. acylchloridy, na mumbaistatin. Další způsoby přípravy esterů byly např. popsány v publikaci

J. March, Advanced Organic Synthesis, 43. vydání, John Willey and Sons, 1992.

K esterům mumbaistatinu podle předkládaného vynálezu patří také intramolekulární estery, tj. laktony. Specifickou sloučeninou tohoto typu je sloučenina označená L970860 a její farmaceuticky přijatelné soli a deriváty včetně všech stereomerních a tautomerních forem. Sloučenina L970860 je lakton, připravitelný tak, že se působí kyselinou trifluoroctovou na mumbaistatin. Má molekulový sumární vzorec $C_{28}H_{18}O_{11}$ a je charakterizován kteroukoliv z následujících fyzikálně chemických a spektrálních vlastností, jako jsou např. 1H NMR spektroskopická data uvedená v 1H NMR spektru na obr. 7 a ^{13}C NMR spektroskopická data uvedená na obr. 8. Laktonizace mumbaistatinu, kterou vzniká sloučenina L970860, může být využita pro izolaci a purifikaci mumbaistatinu.

Ethery mohou být připraveny např. reakcí mumbaistatinu s alkylačními činidly v bazických podmínkách. Další metody přípravy etherů byly popsány v odborné literatuře, např. Advanced Organic Synthesis, 4th Edition, J. March, John Willey and Sons, 1992.

Mumbaistatin je silným inhibitorem translokázy glukózo-6-fosfátu z mikrosomů jater potkana. Výsledky získané ve farmakologických testech jsou uvedeny níže. Mumbaistatin a jeho farmaceuticky přijatelné soli a deriváty jsou proto vhodné jako farmaceuticky účinné látky, zejména pro přípravky k léčení *diabetes mellitus*, a obecně k léčení a profylaxi stavů, které jsou způsobeny nebo alespoň souvisí se zvýšenou aktivitou translokázy glukózo-6-fosfátu, nebo v případech, kdy je cílem snížení aktivity translokázy glukózo-6-fosfátu.

Mumbaistatin a jeho farmaceuticky přijatelné soli a deriváty mohou být podávány zvířatům, výhodně savcům, a zvláště lidem, jako léky samy o sobě, ve směsi, nebo jako

farmaceutické přípravky vhodné pro enterální nebo parenterální podávání. Předkládaný vynález se tudíž také týká mumbaistatinu a jeho farmaceuticky přijatelných solí a derivátů pro použití jako léků a také použití mumbaistatinu a jeho farmaceuticky přijatelných solí a derivátů pro výrobu léků ke snížení aktivity translokázy glukózo-6-fosfátu, zejména pro výrobu léků k léčení diabetes mellitus. Předkládaný vynález se dále týká farmaceutického přípravku, který obsahuje účinné množství mumbaistatinu a/nebo jednu nebo několik jeho farmaceuticky přijatelných solí a/nebo derivátů společně s farmaceuticky přijatelným nosičem.

Mumbaistatin může být podáván perorálně, intramuskulárně, intravenózně nebo i jinými způsoby. Farmaceutický přípravek obsahující mumbaistatin nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli nebo deriváty samotné nebo jejich kombinaci může být připraven standardním způsobem smícháním jednotlivých složek s jedním nebo několika farmaceuticky přijatelnými excipienty a/nebo pomocnými látkami, jako jsou např. plnidla, emulgátory, lubrikanty, ochucovadla, barviva a pufry, a tato směs se pak upraví do vhodné lékové formy jako jsou např. tablety, potahované tablety, tobolky, suspenze nebo roztoky vhodné pro enterální nebo parenterální podávání.

K příkladům vhodných excipientů a/nebo pomocných látek patří např. škrob, tragakant, laktóza, mastek, agar-agar, polyglykoly, ethanol a voda. Výhodné pro parenterální podávání jsou suspenze nebo roztoky ve vodě. Je také možné podávat účinnou látku jako takovou, tj. bez vehikula nebo rozpouštědla, ve formě tobolek. farmaceutické přípravky obsahující mumbaistatin nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli nebo deriváty mohou obsahovat také další farmaceuticky účinné složky.

Jak je obvyklé, galenické formulace a způsoby podávání, stejně jako dávkování, vhodné pro konkrétní případy, jsou závislé na tom, jaký biologický druh je léčen, na stavu a závažnosti nemoci, a mohou být optimalizovány metodami odborníkům známými.

Kromě užití jako účinné látky nebo jako meziprojektu pro výrobu derivátů, mumbaistatin a jeho soli nebo deriváty mohou být užity pro pomocné nebo diagnostické účely, např. pro *in vitro* diagnostiku a pro výzkumné účely při biochemickém výzkumu, kdy je potřeba inhibovat translokázu glukózo-6-fosfátu.

Následující příklady jsou ilustrativní a předmět předkládaného vynálezu nijak neomezují. V příkladech jsou užity zkratky: MeOH pro methanol, DMSO pro dimethylsulfoxid a TFA pro trifluorocetovou kyselinu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Izolace kultury HIL-008003 z půdy

a) Složení izolačního živného média

Kukuřičný škrob:	10,0 g
Kasein:	1,0 g
Pepton:	1,0 g
Kvasničný extrakt:	1,0 g
K ₂ HPO ₄ :	0,5 g
Agar v prášku:	13,0 g
Demineralizovaná voda:	1,0 l
pH:	7,0

b) Kultivace z půdy a izolace

10 g půdy odebrané z údolí řeky Hiranyakeshi v blízkosti Amboli, Maharashtra, Indie, bylo přidáno k 90 ml sterilní demineralizované vody do 250ml Erlenmayerovy baňky, která pak byla třepána 2 hodiny na rotační třepačce (220 rpm). Takto vytvořená půdní suspenze byla pak sériově naředěna vždy 10x v každém kroku až do 10⁻⁵. 1 ml z posledního ředění byl nanesen do středu skleněné Petriho misky (průměr 15 cm), do které pak bylo nalito 50 ml výše popsaného izolačního média s přidavkem 25 µg/ml amfotericinu jakožto fungicidního činidla. Médium bylo před nalitím zchlazeno na 45 °C a misky byly "promíchány" důkladným kroužením. Směs suspenze a média pak byla ponechána, aby se usadila a dále byla inkubována ve 28°C (±1°C) po 7 dnů. Petriho misky byly pravidelně vizuálně kontrolovány a z mikroorganismů, které na nich narostly, byla izolována kultura HIL-008003 (kultura č. Y-9645974).

Příklad 2

Udržování kultury HIL-008003

Kultura HIL-008003 byla udržována v médiu následujícího složení:

Sladový extrakt:	10,0 g
Kvasničný extrakt:	4,0 g
Glukóza:	4,0 g
Agar v prášku:	13,0 g
Demineralizovaná voda:	1,0 l
pH:	7,0

Po důkladném rozpuštění výše uvedených složek za současného zahřívání bylo médium rozděleno do zkumavek a pak sterilizováno 20 minut při 121 °C. Zkumavky pak byly zchlazeny a médium ztuhlo v šikmé poloze. Na šikmé plochy média ve zkumavkách pak byla přeočkována kultura HIL-008003 drátěnou očkovací kličkou a zkumavky byly inkubovány při 28°C dokud nebyl zaznamenán viditelný růst. Dobře rostoucí kultury byly uchovány v lednici při 8 °C.

Příklad 3

Fermentace kultury HIL008003 v protřepávaných kultivačních nádobách

Složení kultivačního média:

Glukóza:	15,0 g
Sojová moučka:	15,0 g
Kukuřičný výluh:	5,0 g
NaCl:	5,0 g
CaCO ₃ :	2,0 g
Demineralizovaná voda:	1,0 l
pH:	7,0

Toto médium bylo rozděleno do po 80ml do 500ml Erlenmayerových baněk a sterilizováno v autoklávu 20 minut při 121 °C. Baňky pak byly ochlazeny na teplotu místnosti a každá baňka byla inokulována očkovací kličkou z dobře rostoucí kultury popsané v příkladu 2 a pak dále kultivována na rotační třepačce 72 hodin při 240 rpm ve 27 °C (±1°C), čímž byla připravena očkovací kultura.

Složení produkčního média:

Glukóza:	20,0 g
Sojová moučka:	10,0 g
CaCO ₃ :	2,0 g
Chlorid kobaltnatý:	0,001 g
Demineralizovaná voda:	1,0 l
pH:	7,0

Toto produkční médium bylo rozděleno do po 60 ml do 500ml Erlenmayerových baněk a sterilizováno v autoklávu 20 minut při 121 °C. Baňky pak byly ochlazeny na teplotu místnosti a každá baňka byla inokulována výše popsanou očkovací kulturou (1 % objem.). Fermentace dále probíhala na rotační třepačce při 240 rpm ve 27 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$) po dobu 40 až 48 hodin.

Produkce mumbaistatinu byla monitorována měřením inhibice translokázy glukózo-6-fosfátu. Po sklizení bylo kultivační médium centrifugováno a mumbaistatin byl izolován z filtrátu postupem popsaným v příkladu 5.

Příklad 4

Fermentace kultury HIL008003 ve fermentoru

1. fáze: Příprava očkovací kultury v protřepávané lahvi

Očkovací médium z příkladu 3 bylo rozděleno po 160 ml do 11 Erlenmayerových baněk a sterilizováno 20 minut v autoklávu. Očkovací kultura byla pěstována stejně jak bylo popsáno v příkladu 3.

2. fáze: Příprava očkovací kultury ve fermentoru

80 l očkovacího média popsaného v příkladu 32 ve 100l Marubishiho fermentoru bylo sterilizováno *in situ* 45 minut při 121 °C, ochlazeno na 27 °C $\pm$ 1 °C a pak zaočkováno 4,5 l očkovací kultury popsané v 1. fázi.

Fermentace probíhala s následujícími hodnotami příslušných parametrů:

Teplota:	27 °C ($\pm$ 0,5 °C)
Třepání:	80 ot/min (rpm)
Aerace:	50 l/min (lpm)
Doba kultivace:	24 hodin

3. fáze: Velkoobjemová fermentace

700 l produkčního média popsaného v příkladu 3 v 1000l Marubishiho fermentoru společně se 150 ml přípravku Desmophen® (polypropylenoxid) jakožto proptipěnotvorného činidla bylo sterilizováno *in situ* 45 minut při 121°C, ochlazeno na 27°C $\pm$ 1°C a pak zaočkováno 75 l očkovací kultury popsané ve 2. fázi

Fermentace probíhala s následujícími hodnotami příslušných parametrů:

Teplota:	27 °C ($\pm$ 0,5 °C)
Třepání:	50 ot/min (rpm)
Aerace:	450 l/min (lpm)
Doba kultivace:	40 až 44 hodin

Produkce mumbaistatinu byla monitorována měřením inhibice translokázy glukózo-6-fosfátu. Když byla fermentace přerušena, hodnota pH kultivačního média byla 6,0 až 7,0. Po sklizení bylo kultivační médium centrifugováno a mumbaistatin byl izolován z filtrátu postupem popsaným v příkladu 5.

Příklad 5

Izolace a purifikace mumbaistatinu

Přibližně 1000 l kultivačního média bylo sklizeno a mycélia (12 g) byla odstraněna centrifugací. Požadovaná sloučenina, tj. mumbaistatin, byla zjištěna především ve filtrátu kultivačního média. Filtrát kultivačního média (730 l) byl nanesen na kolonu Diaion® HP-20 (28 litrů, 3 až 4 % obj.). Pak byla kolona důkladně propláchnuta demineralizovanou vodou (250 l) a pak eluována krokovým gradientem MeOH ve vodě. Takže eluce byla provedena 10% MeOH (120 l) a 40% MeOH (300 l). Byly odebírány frakce velikosti 15 l. Frakce aktivního eluátu (15 x 16 l) získané se 40% MeOH byly sloučeny, koncentrovány za sníženého tlaku 1,333 až 13,33 kPa (10 až 100 mm Hg) při 35 °C a lyofylizovány, což poskytlo 240 g surového aktivního produktu, který vykazoval hodnotu IC_{50} 5 µg/ml.

Surový materiál (240 g) byl nanesen na druhou kolonu HP-20. Kolona byla důkladně propláchnuta demineralizovanou vodou (150 l) a pak eluován krokovým gradientem MeOH ve vodě. Takže eluce byla provedena 20% MeOH (80 l) a 40% MeOH (100 l). Byly odebírány frakce velikosti 10 l a pak 2 l. Frakce aktivního eluátu (2 x 30 l) získané se 40% MeOH byly sloučeny, koncentrovány za sníženého tlaku 1,333 až 13,33 kPa (10 až 100 mm Hg) při 35 °C a lyofylizovány, což poskytlo 20 g obohaceného materiálu, který vykazoval IC_{50} 1 µg/ml.

Takto získaný obohacený materiál byl dále purifikován dvakrát po sobě gelovou permeační chromatografií na Sephadex® LH-20 s různým poměrem substrátu a gelu. Takže výše popsany obohacený materiál prošel 4 vrstvami obsahujícími po 5 g Sephadex® LH-20 (1,5 l) ve skleněné koloně 4 cm x 120 cm.

Mobilní fáze byla voda a průtok byl udržován na 2,5 ml/minuta. Byly odebírány frakce velikosti 25 ml. Aktivní eluát byl monitorován HPLC na koloně Lichrocart® 100RP-18 (250 mm x 4 mm) s gradientem 0,1% vodné TFA na CH₃CN ve 20 minutách při průtoku 1 ml/minuta a detekci ve 270 nm. Aktivní eluáty s požadovanou složkou byly sloučeny a koncentrovány za sníženého tlaku 1,333 až 13,33 kPa (10 až 100 mm Hg) při 35 °C a lyofylizovány, což poskytlo 1 g vysoce obohaceného materiálu, který vykazoval IC₅₀ 0,1 až 0,3 µg/ml.

Takto získaný materiál byl dále purifikován ve dvou várkách po 500 mg přes Sephadex® LH-20 ve skleněné koloně (2,5 cm x 110 cm). Mobilní fáze byla voda a průtok byl udržován na 0,5 ml/minuta. Byly odebírány frakce velikosti 6 ml. Frakce byly na základě HPLC analýzy (viz výše) sloučeny. Aktivní eluáty s požadovanou složkou byly sloučeny a koncentrovány za sníženého tlaku 1,333 až 13,33 kPa (10 až 100 mm Hg) při 35 °C a lyofylizovány, což poskytlo 160 mg semipurifikované sloučeniny, která vykazovala IC₅₀ 0,06 µg/ml.

Nakonec byl semipurifikovaný materiál dále purifikován preparativní HPLC na koloně Eurosphere® 100 C18, 10 µm (250 x 16 mm) užitím gradientu 5% methanolu a 40% methanolu ve vodě po 30 minutách. Průtok byl udržován na 6 ml/minuta a detekce byla při 270 nm, čímž byl získán čistý mumbaistatin (70 mg).

Mumbaistatin poskytl spektra ¹H NMR a ¹³C NMR špatné kvality. Charakterizace parentální sloučeniny mumbaistatinu byla tedy primárně založena na spektrální analýze laktonu L970860, který byl získán působením TFA na mumbaistatin postupem, který je popsán v příkladu 6.

Příklad 6

Příprava laktonu L970860

K 70 mg mumbaistatinu rozpuštěného v 5 ml methanolu bylo přidáno 50 ml 0,1% TFA a reakční směs se zahřívala 1 hodinu při 50 °C. Pak byla směs odpařena za sníženého tlaku 1,333 až 13,33 kPa (10 až 100 mm Hg) při 35 °C do sucha. Takto získaný reakční produkt byl purifikován preparativní HPLC na koloně Eurosphere® 100, C18, 10 μ (250 mm x 16 mm) užitím gradientu 30 % CH₃CN v 0,1% TFA až 80 % CH₃CN v 0,1% TFA ve 20 minutách při průtoku 6 ml/minuta a detekci při 270 nm, čímž bylo získáno 55 mg čistého L970860.

Fyzikálně chemické a spektrální vlastnosti mumbaistatinu a laktonu L970860 jsou souhrnně uvedeny v tabulce 1. Spektroskopické údaje pro tyto sloučeniny jsou uvedeny na obrázcích 2, 3 a 5 až 10. Obrázky 1 a 4 ukazují HPLC chromatogramy. Obsah jednotlivých obrázků je uveden v tabulce 1.

Farmakologická charakterizace mumbaistatinu a laktonu L970860

Mumbaistatin silně inhibuje aktivitu translokázy glukózo-6-fosfátu z mikrosomů potkanů, přičemž hodnota IC₅₀ je 25 nM. Naproti tomu mumbaistatin inhibuje aktivitu fosfatázy mikrosomů rozrušených detergentem s hodnotou IC₅₀ > 100 μ M, což ukazuje na vysokou specifickou pro translokázu. Mumbaistatin neovlivňuje aktivitu translokázy fofát/pyrofosfátu. Mumbaistatin je reverzibilní a kompetitivní inhibitor translokázy glukózo-6-fosfátu.

Tabulka 1

	mumbaistatin	L970860
Povaha sloučeniny	červenohnědá tuhá	červenohnědá tuhá
Rozpustnost	MeOH a DMSO	MeOH a DMSO
Teplota tání	>250°C (rozkládá se)	>250°C (rozkládá se)
[α] _D	-50° (c 0,024, MeOH)	-45° (c 0,02, MeOH)
HPLC (vysokotlaká kapalin. chromatografie)	retenční čas: 10,83 minuty viz obr. 1	retenční čas: 13,08 minuty viz obr. 4
ESI-MS (elektrorozptyl. ionizační hmotnost)	547 (M-H)	529 (M-H)
Sumární vzorec	C ₂₈ H ₂₀ O ₁₂	C ₂₈ H ₁₈ O ₁₁
UV spektra	viz obr. 2	viz obr. 5
IR spektra	viz obr. 3	viz obr. 6
¹ H NMR	viz obr. 9 (600 MHz, D ₄ -MeOH, 27 °C)	viz obr. 7 (300 MHz, D ₆ -DMSO)
¹³ C NMR	viz obr. 10 (150 MHz, D ₄ -MeOH, 27 °C)	viz obr. 8 (75 MHz, D ₆ -DMSO)

Mumbaistatin byl dále testován na izolovaných potkanních hepatocytech na účinek na výstup glukózy. Ukázalo se, že inhibuje jak fruktózou indukovanou glukoneogenezi, tak i glukagonem indukovanou glykogenolýzu s hodnotami IC₅₀ 0,3 μM a 0,6 μM, v uvedeném pořadí.

L970860 inhibuje aktivitu translokázy glukózo-6-fosfátu z mikrosomů potkanů, přičemž hodnota IC₅₀ je 1,8 μM.

21.12.00

17

Doklad o uložení v Německé sbírce mikroorganismů (DSMZ)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Hoechst Marion Roussel GmbH

65926 Frankfurt

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

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: HIL 008003	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 11641
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: () a scientific description (X) a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 1997-07-04 (Date of the original deposit) ¹ .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): <i>V. Wals</i> Date: 1997-07-07

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

21.12.00

18

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Hoechst Marion Roussel GmbH
65926 FrankfurtVIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Hoechst Marion Roussel GmbH Address: 65926 Frankfurt	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 11641 Date of the deposit or the transfer ¹ : 1997-07-04
III. VIABILITY STATEMENT	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 1997-07-04 ² . On that date, the said microorganism was (X) ³ viable () ³ no longer viable	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): <i>C. W. K.</i> Date: 1997-07-07

- ¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
- ² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
- ³ Mark with a cross the applicable box.
- ⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

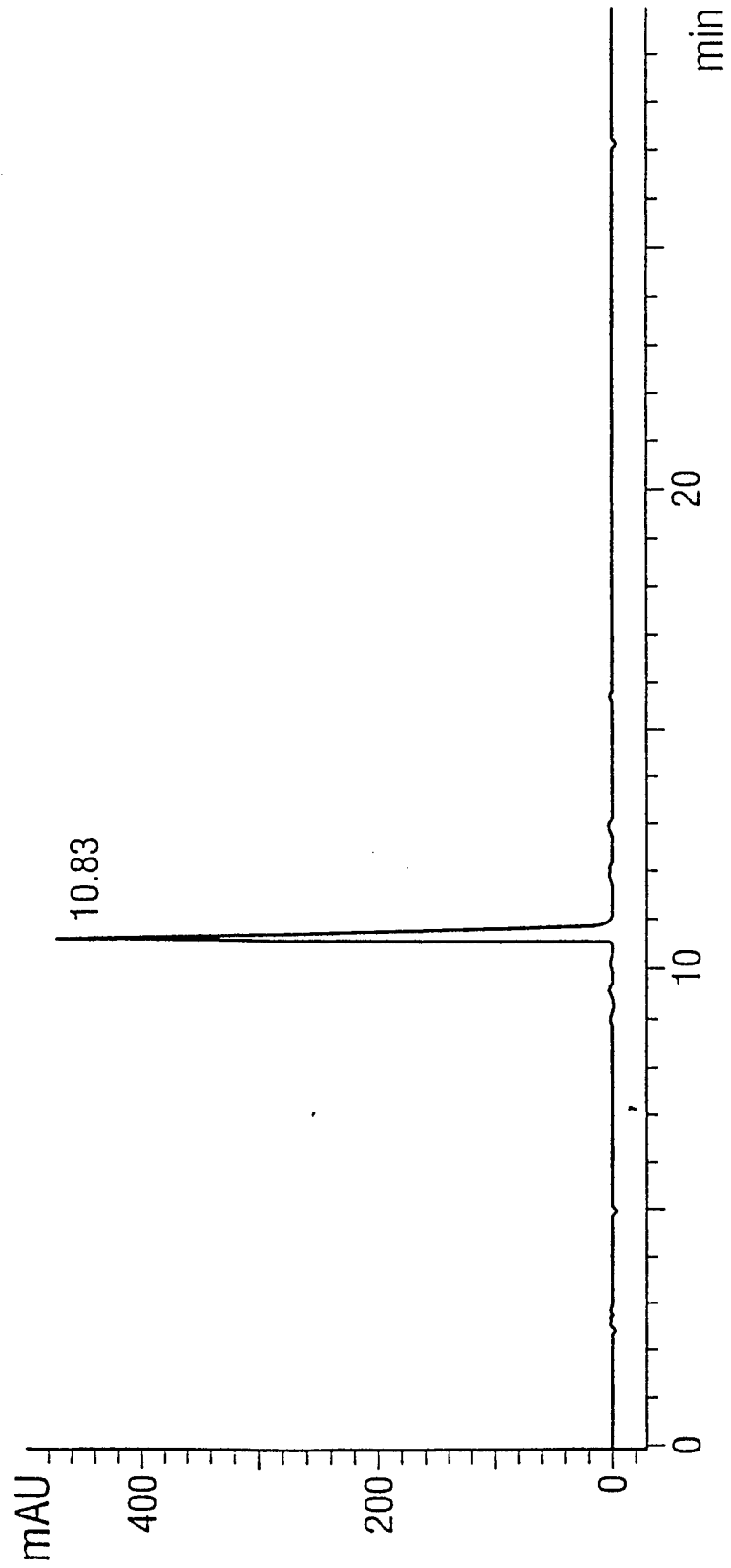
1. Mumbaistatin, sloučenina s molekulovým sumárním vzorcem $C_{28}H_{20}O_{12}$, která je charakterizována svým 1H NMR spektrem (obr. 9) a ^{13}C NMR spektrem (obr. 10), a jeho farmaceuticky přijatelné soli a deriváty ve všech stereoizomerních a tautomerních formách.
2. Mumbaistatin, sloučenina s molekulovým sumárním vzorcem $C_{28}H_{20}O_{12}$, která je připravitelná kultivací mikroorganismů druhu *Streptomyces* HIL-008003 (DSM 11641) v aerobních podmínkách v živném médiu obsahujícím zdroj uhlíku a dusíku, a následnou izolací a purifikací obvyklým způsobem, a jeho farmaceuticky přijatelné soli a deriváty ve všech stereoizomerních a tautomerních formách.
3. Lakton L970860, sloučenina s molekulovým sumárním vzorcem $C_{28}H_{18}O_{11}$, která je charakterizována svým 1H NMR spektrem (obr. 7) a ^{13}C NMR spektrem (obr. 8), a jeho farmaceuticky přijatelné soli a deriváty ve všech stereoizomerních a tautomerních formách.
4. Způsob přípravy mumbaistatinu podle nároku 1 nebo 2 nebo laktonu L970860 podle nároku 3, nebo jejich solí nebo derivátů, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky, kdy se kultivuje mikroorganismus druhu *Streptomyces* HIL-008003 (DSM 11641) v aerobních podmínkách v živném médiu obsahujícím zdroj uhlíku a dusíku, a následně se mumbaistatin izoluje a purifikuje obvyklým způsobem, a případně se konvertuje na lakton

L970860 nebo soli nebo deriváty mumbaistatinu nebo laktonu.

5. Kmen *Streptomyces* sp. HIL-008003 (DSM 11641).
6. Mumbaistatin podle nároku 1 nebo 2 nebo lakton L970860 podle nároku 3, nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli nebo deriváty, pro použití jako léčivo.
7. Farmaceutický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje účinné množství mumbaistatinu podle nároku 1 nebo 2 nebo laktonu L970860 podle nároku 3, nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí nebo derivátů, a dále obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič.
8. Mumbaistatin podle nároku 1 nebo 2 nebo lakton L970860 podle nároku 3, nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli nebo deriváty, pro použití jako inhibitor translokázy glukózo-6-fosfátu.
9. Mumbaistatin podle nároku 1 nebo 2 nebo lakton L970860 podle nároku 3, nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli nebo deriváty, pro použití k léčení *diabetes mellitus*.

PV 2000 - 4841
21.12.00

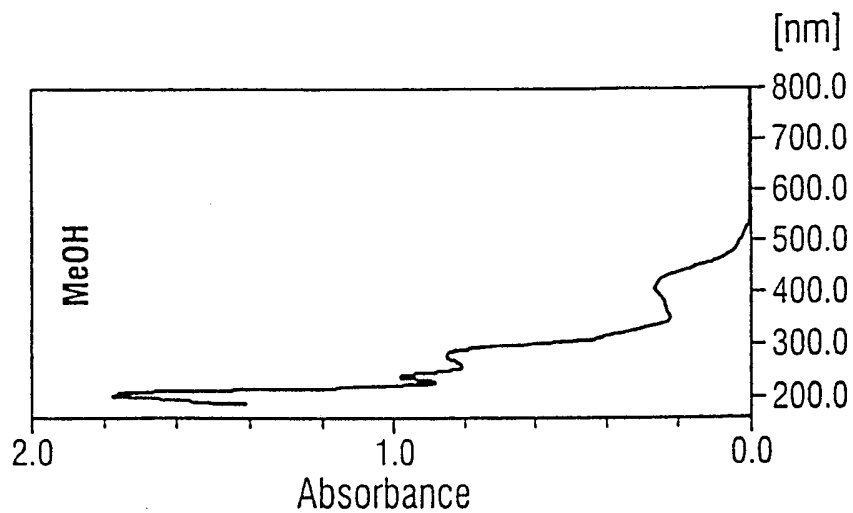
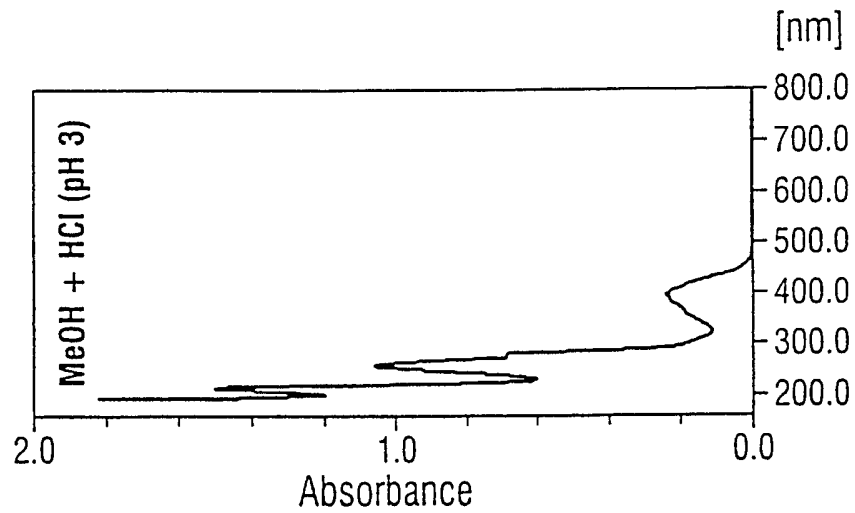
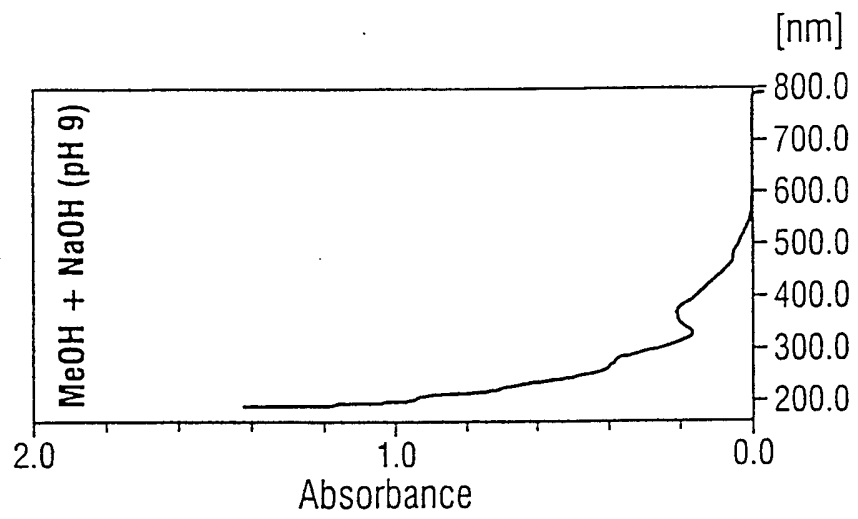
1 / 10



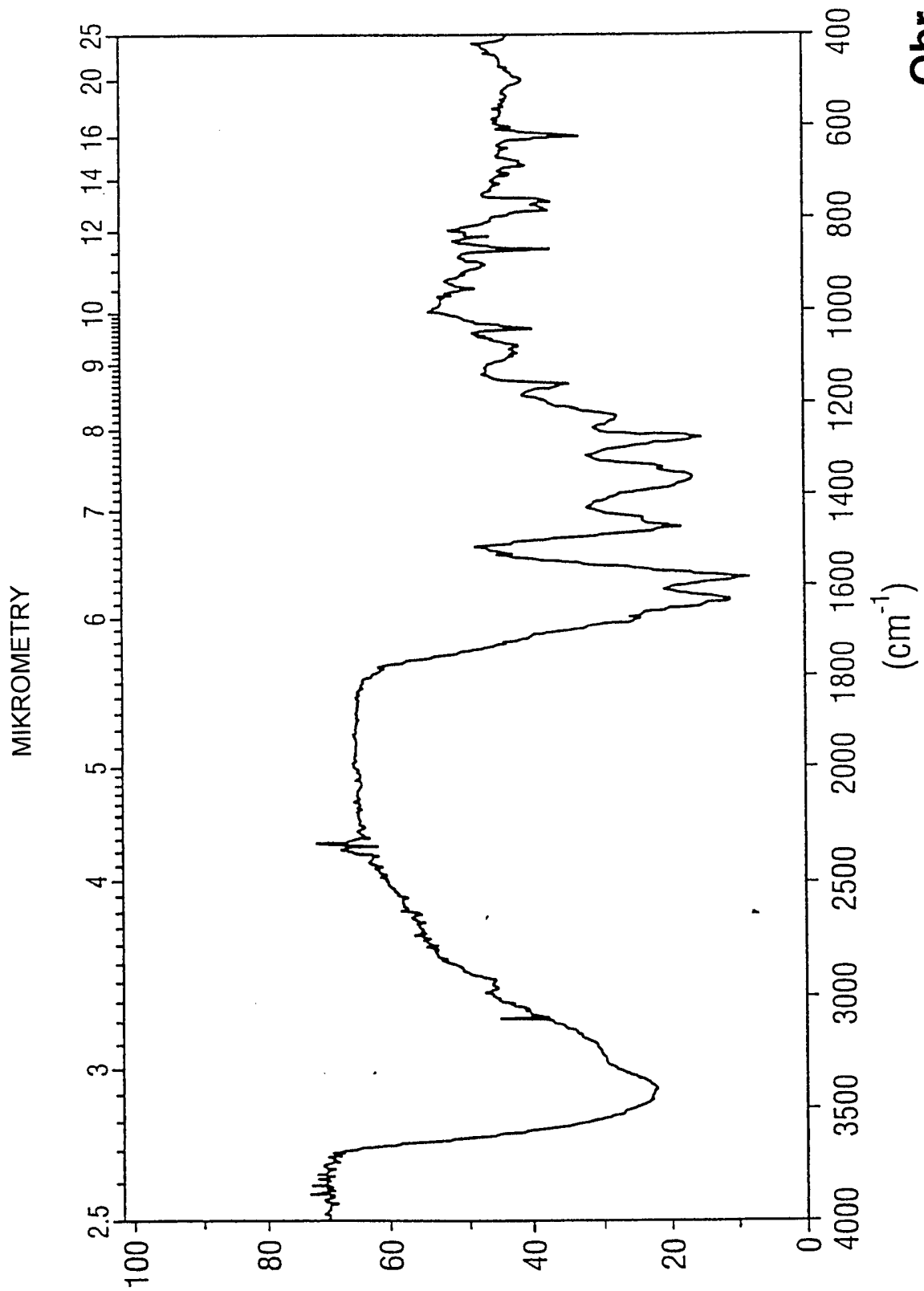
Obr. 1

2 / 10

Obr. 2



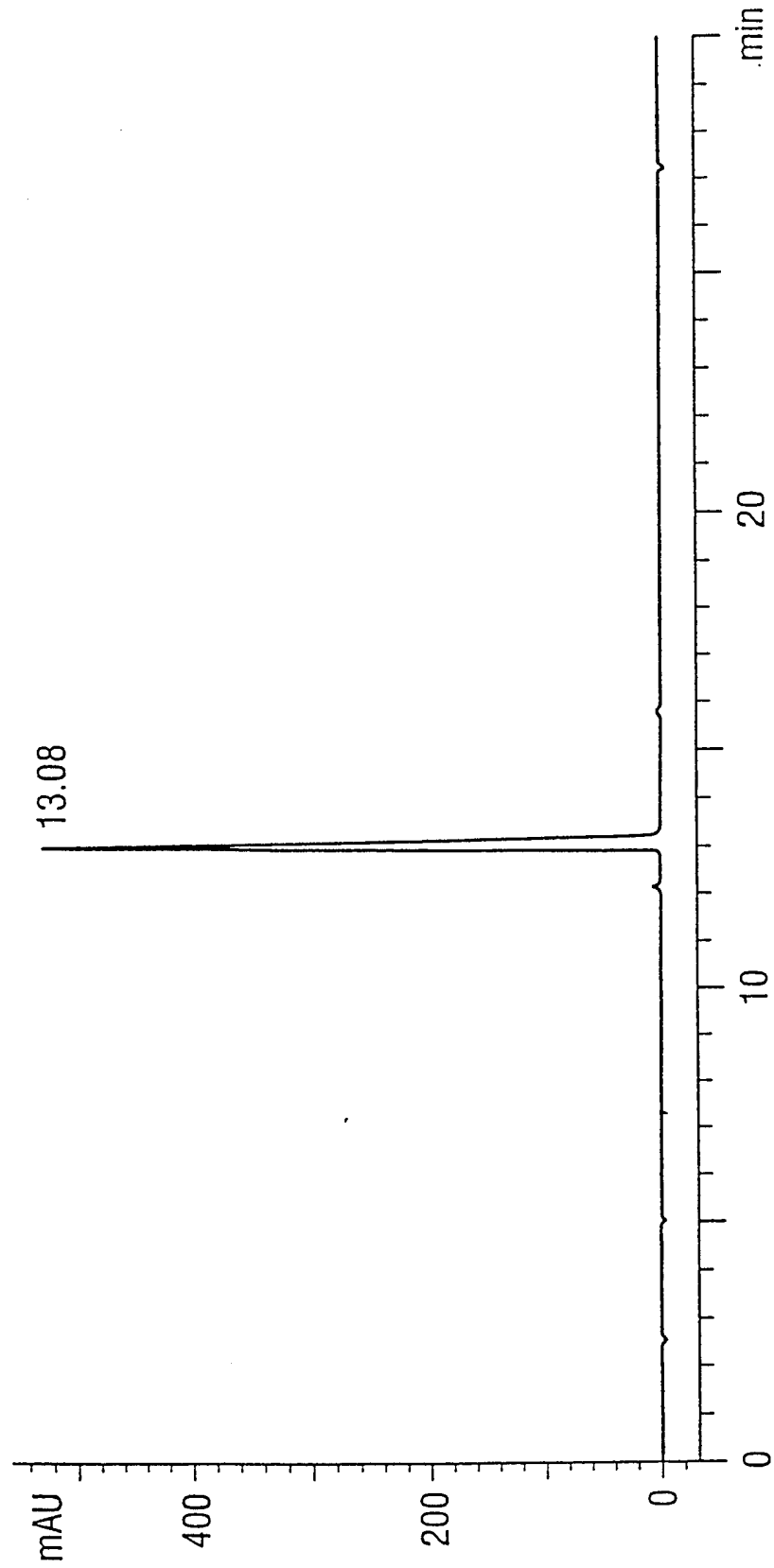
3 / 10



Obr. 3

PV 2000 - 4841
21.12.00

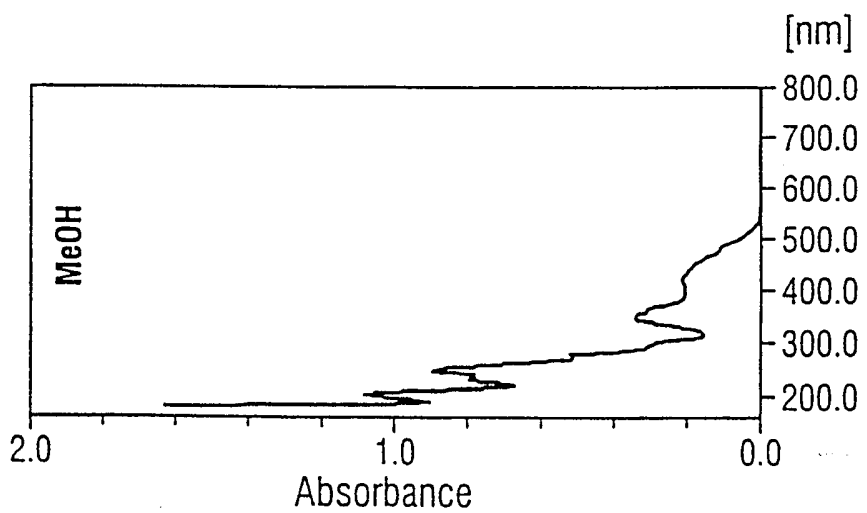
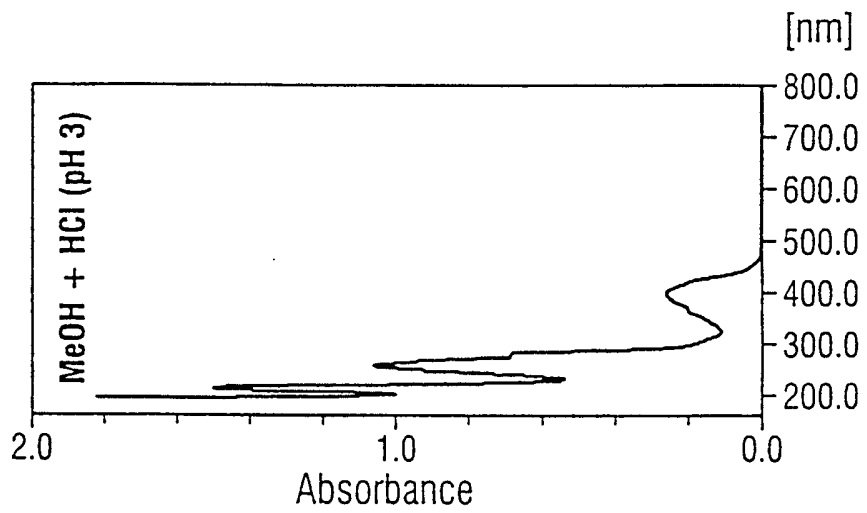
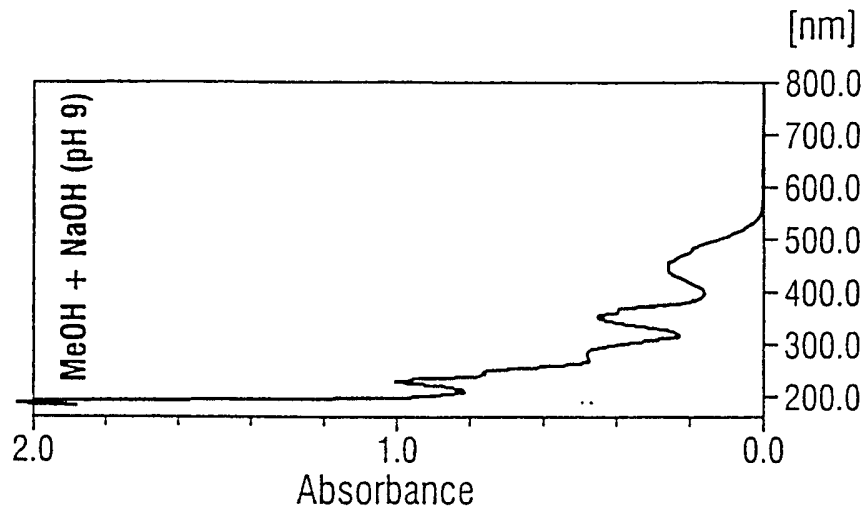
4 / 10



Obr. 4

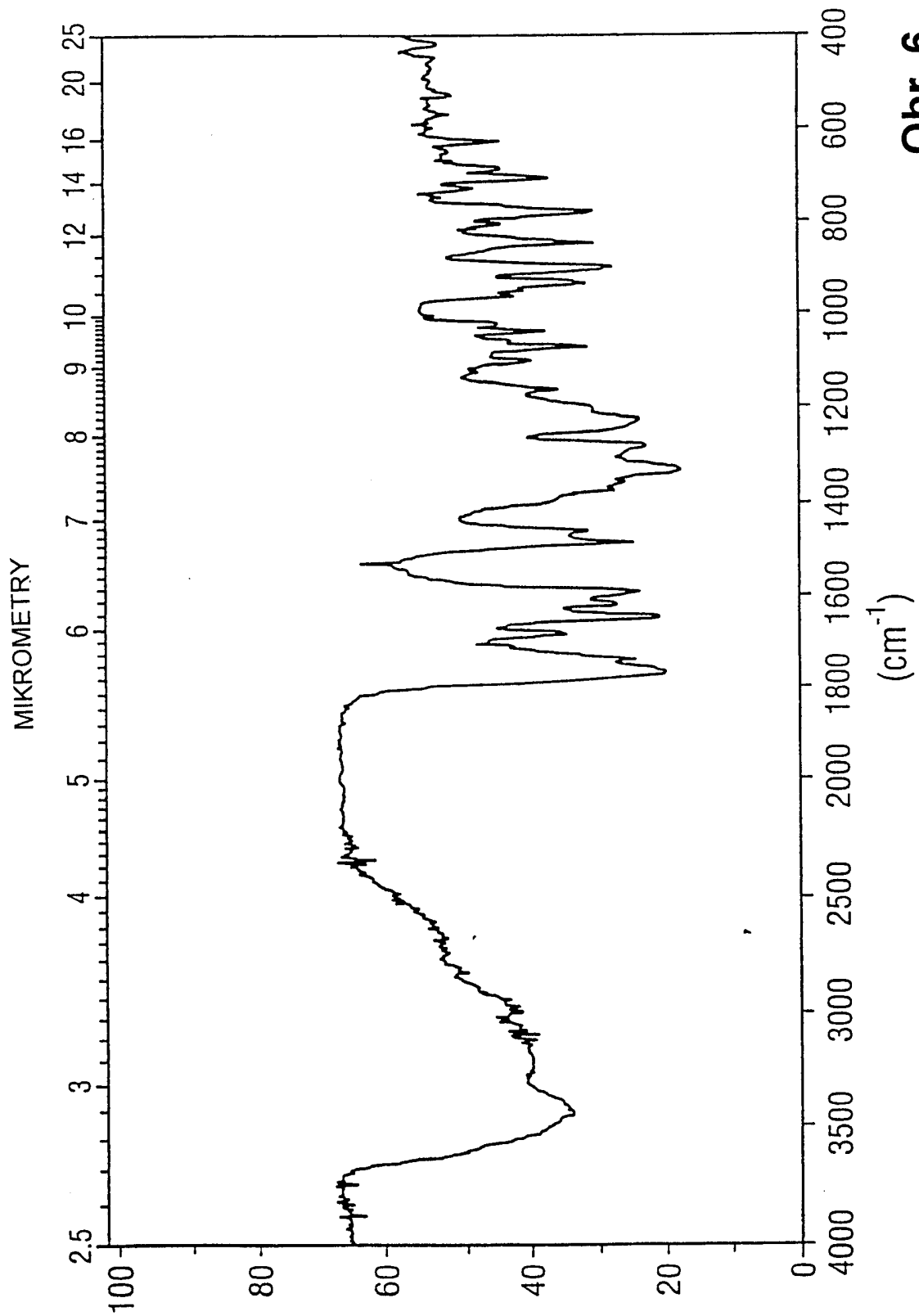
5 / 10

Obr. 5

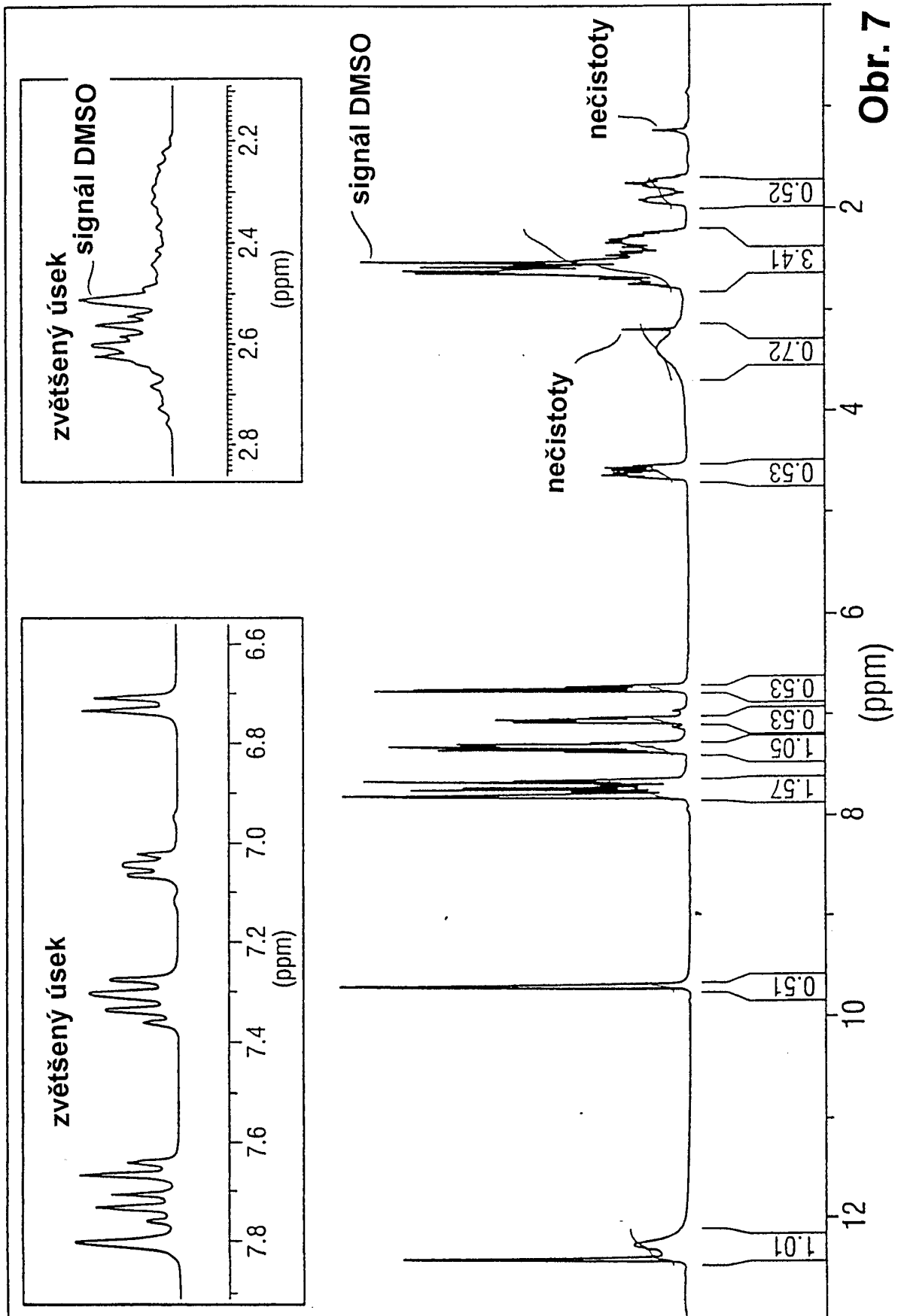


94 2000-4841
21.12.00

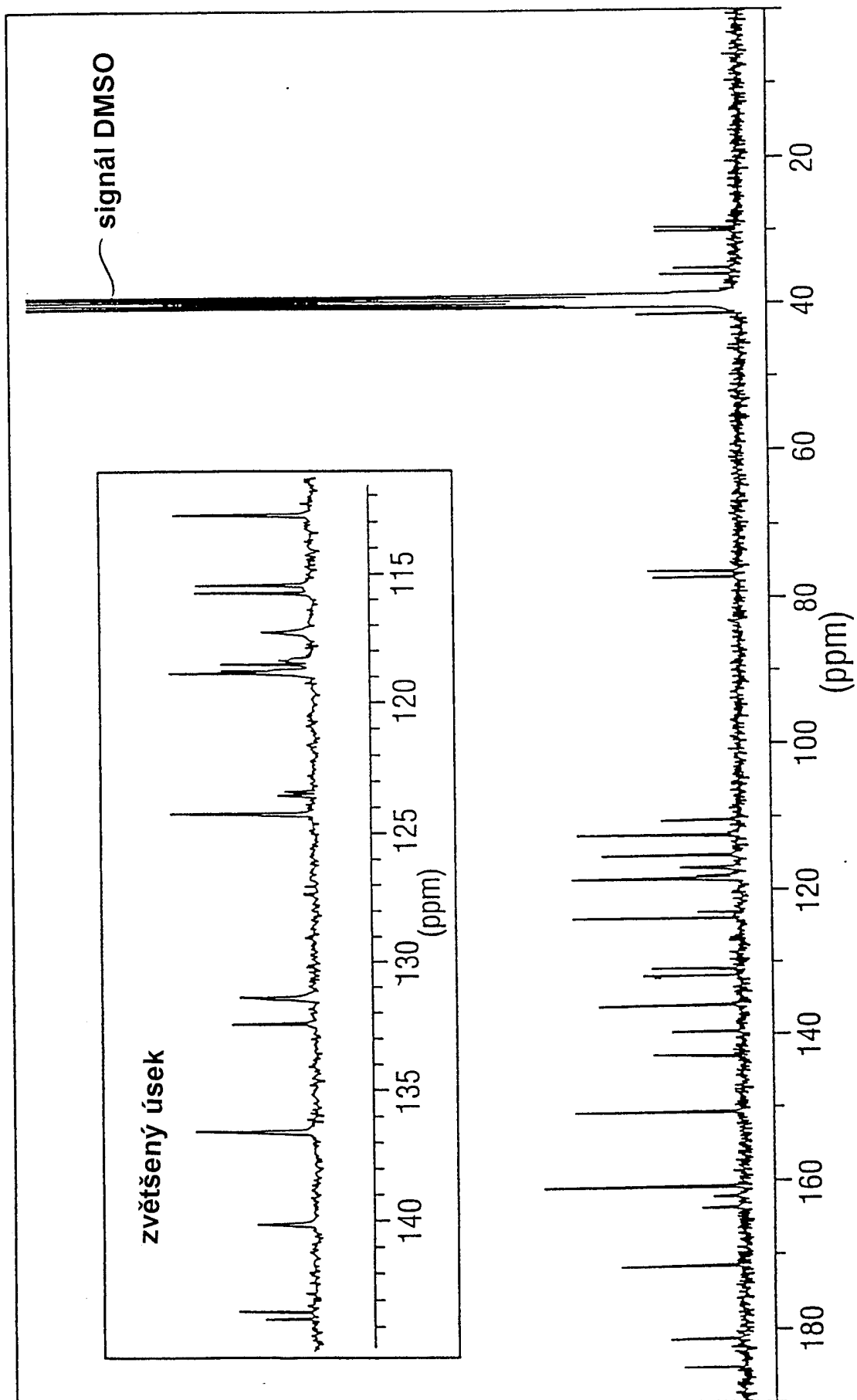
6 / 10



Obr. 6

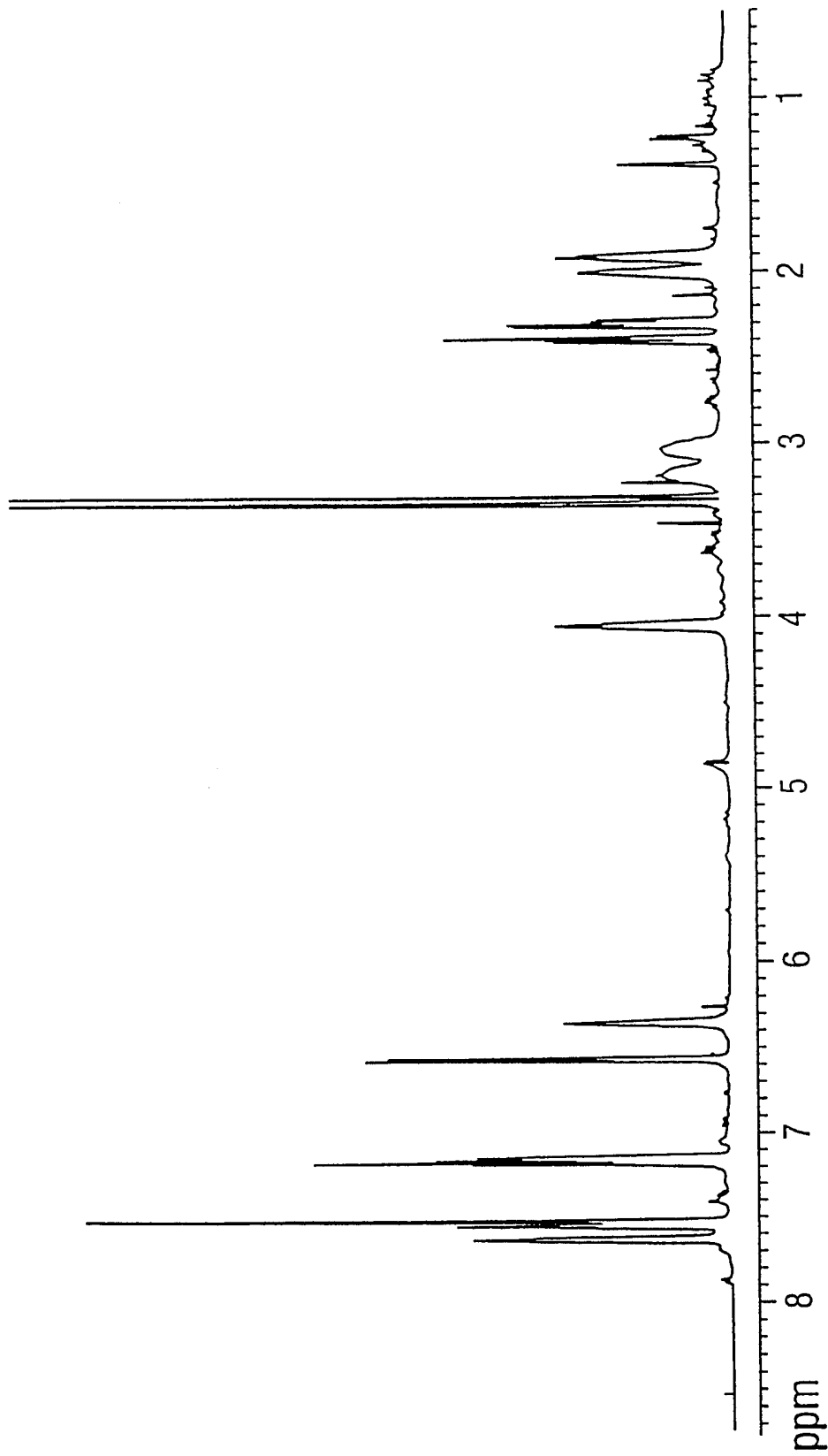


Obr. 8



74-2000-4841
21:12:00

9 / 10



Obr. 9

91 2000-4841
21.12.00

10 / 10

Obr. 10

