



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

① CH 648 327 A5

⑤ Int. Cl.⁴: C 07 H 15/252
C 12 P 19/56
A 61 K 31/70

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

// (C 12 P 19/56, C 12 R 1:465)

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑳ Gesuchsnummer: 5895/81

㉒ Anmeldungsdatum: 11.09.1981

③⑩ Priorität(en): 16.10.1980 GB 8033399

㉔ Patent erteilt: 15.03.1985

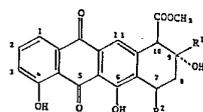
④⑤ Patentschrift veröffentlicht: 15.03.1985

⑦③ Inhaber:
F. Hoffmann-La Roche & Co. Aktiengesellschaft,
Basel

⑦② Erfinder:
Fujiwara, Akiko, Kamakura-shi/Kanagawa-ken (JP)
Hoshino, Tatsuo, Kamakura-shi/Kanagawa-ken (JP)
Tazoe, Masaaki, Yokohama-shi/Kanagawa-ken (JP)

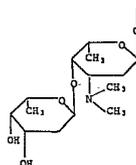
⑤④ Anthracycline.

⑤⑦ Die neuen Anthracycline der allgemeinen Formel

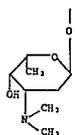


I

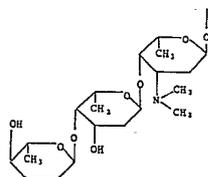
worin R¹ Methyl oder Acetyl und R² eine Gruppe der Formeln



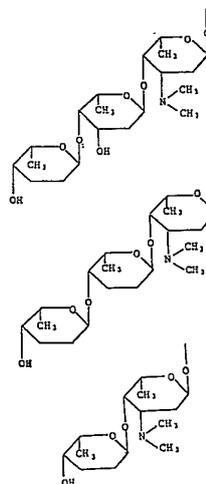
C



D



E



F

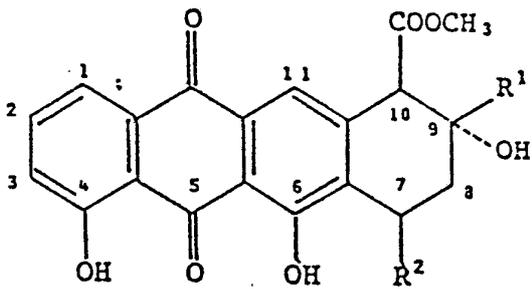
G

H

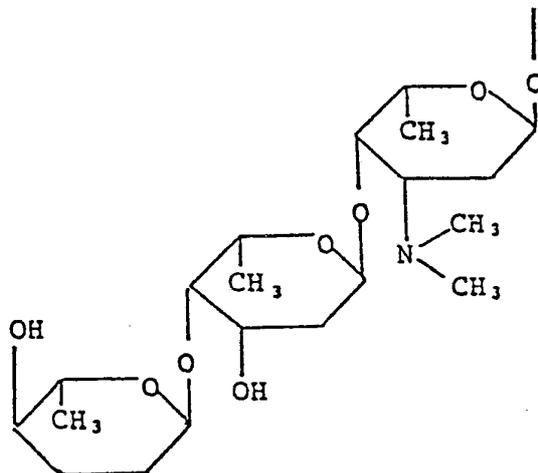
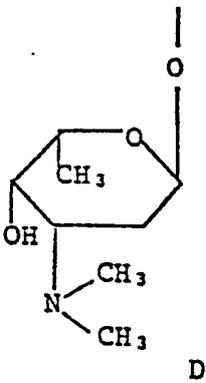
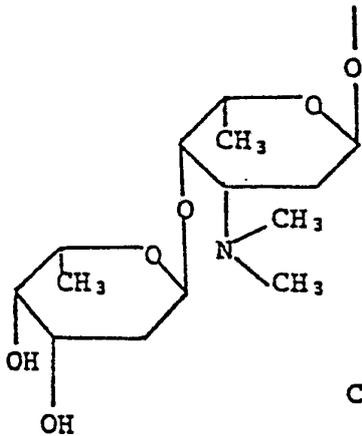
darstellt, besitzen antibiotische Eigenschaften. Man erhält diese Verbindungen durch Fermentation von *Streptomyces galilaeus* sp., besonders *S. galilaeus* ATCC 31534, oder durch Abwandlung der Zuckerreste von Auramycin bzw. Sulfurmycin A, B, C, E, F oder G.

PATENTANSPRÜCHE

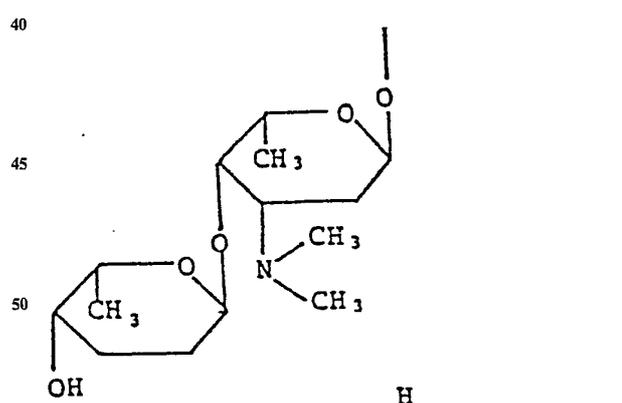
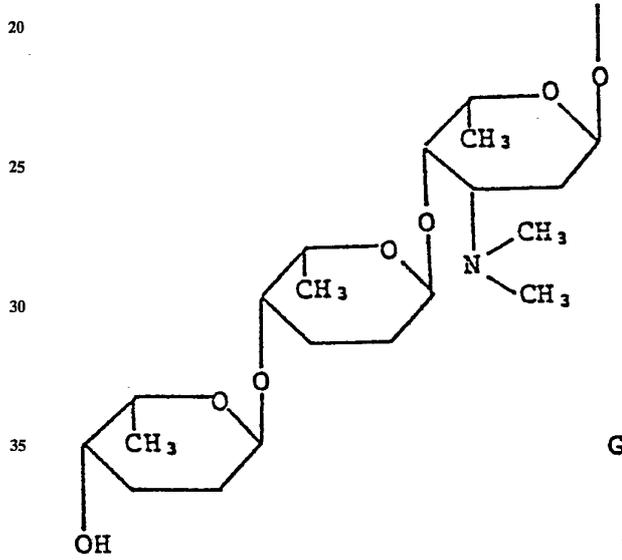
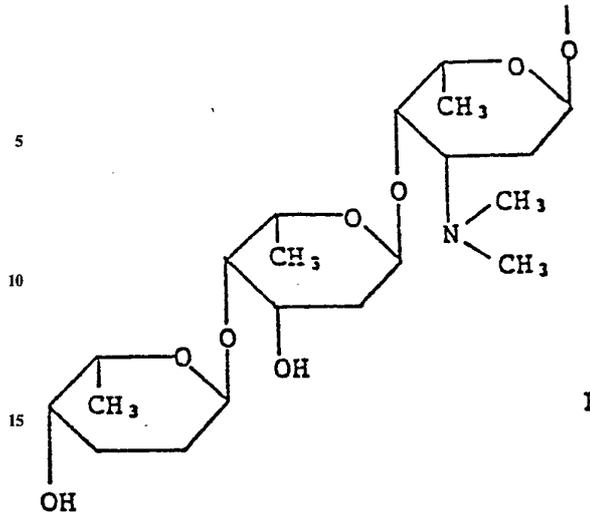
1. Verbindungen der allgemeinen Formel



worin R¹ Methyl oder Acetyl und R² eine Gruppe der Formeln



I

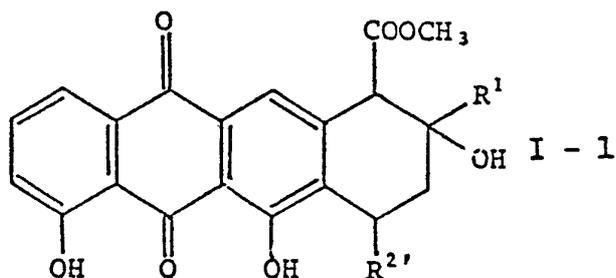


darstellt.

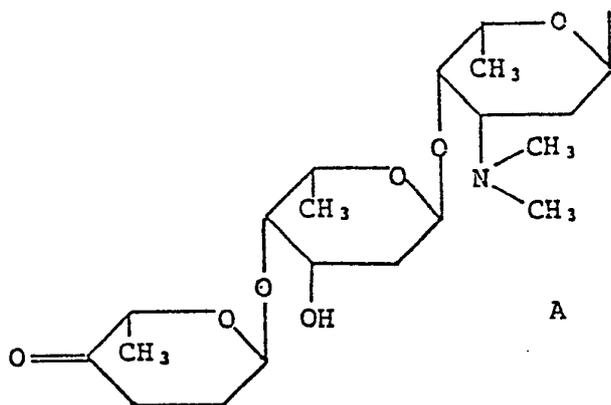
2. Verbindungen gemäss Anspruch 1 als Antibiotika.

3. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Mutante von Streptomyces galilaeus OBB-111, die zur Produktion von Verbindungen der Formel I befähigt ist, in einem wässrigen Nährmedium unter aeroben Bedingungen kultiviert und die genannten Verbindungen aus der Fermentationslösung isoliert.

4. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I, worin R² eine Gruppe der Formel C ist, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der allgemeinen Formel

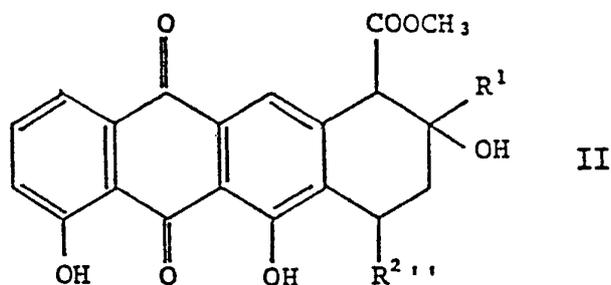


worin R^1 die obige Bedeutung hat und $R^{2'}$ eine Gruppe der oben genannten Formel E oder F oder der Formel

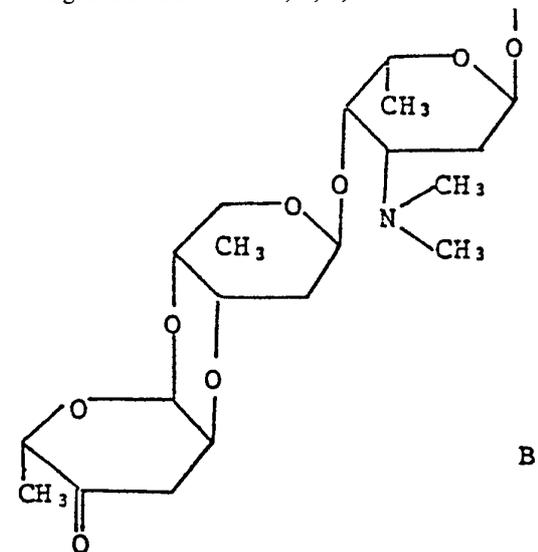


darstellt, unter sauren Bedingungen unter Umwandlung der Gruppe R^2 in eine Gruppe der Formel C hydrolysiert.

5. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I, worin R^2 eine Gruppe der Formel D ist, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel

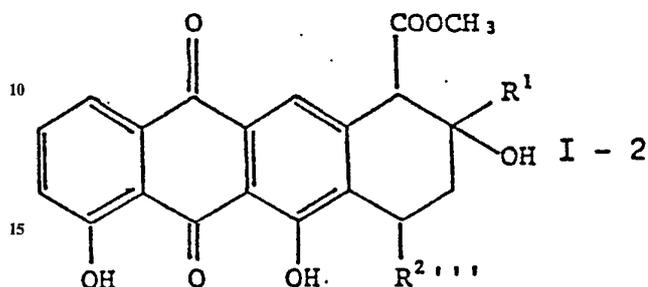


worin R^1 die obige Bedeutung hat und $R^{2''}$ eine Gruppe der oben genannten Formeln A, C, E, F oder G oder der Formel



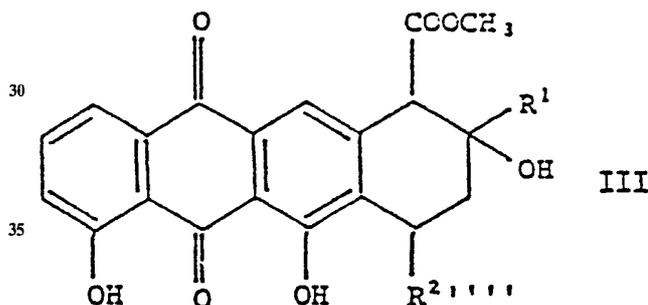
darstellt, unter sauren Bedingungen unter Umwandlung der Gruppe $R^{2''}$ in eine Gruppe der Formel D hydrolysiert.

6. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I, worin R^2 eine Gruppe der Formel H ist, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel



worin R^1 die obige Bedeutung hat und $R^{2'''}$ eine Gruppe der obigen Formel G darstellt, unter sauren Bedingungen unter Umwandlung der Gruppe $R^{2'''}$ in eine Gruppe der Formel H hydrolysiert.

7. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I, worin R^2 eine Gruppe der Formeln E oder F ist, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der allgemeinen Formel



worin R^1 die obige Bedeutung hat und $R^{2''''}$ eine Gruppe der oben genannten Formel A darstellt, unter Umwandlung der Gruppe $R^{2''''}$ in eine Gruppe der Formeln E oder F reduziert.

8. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Mutante von *Streptomyces galilaeus* OBB-111 *Streptomyces galilaeus* OBB-111-610 (FERM-P Nr. 4883 oder ATCC 31534) ist.

9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man mittels Natriumborhydrid oder Lithiumaluminiumhydrid reduziert.

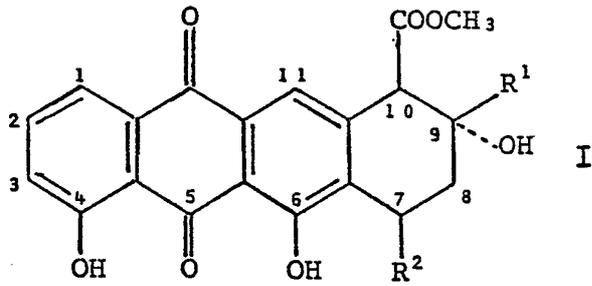
10. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man mittels Enzymen aus Tierleberhomogenaten oder mittels Zellen antibiotikaproduzierenden Mikroorganismen reduziert.

11. Pharmazeutische Präparate mit antibakterieller oder Anti-Tumor-Aktivität, enthaltend eine Verbindung der allgemeinen Formel I.

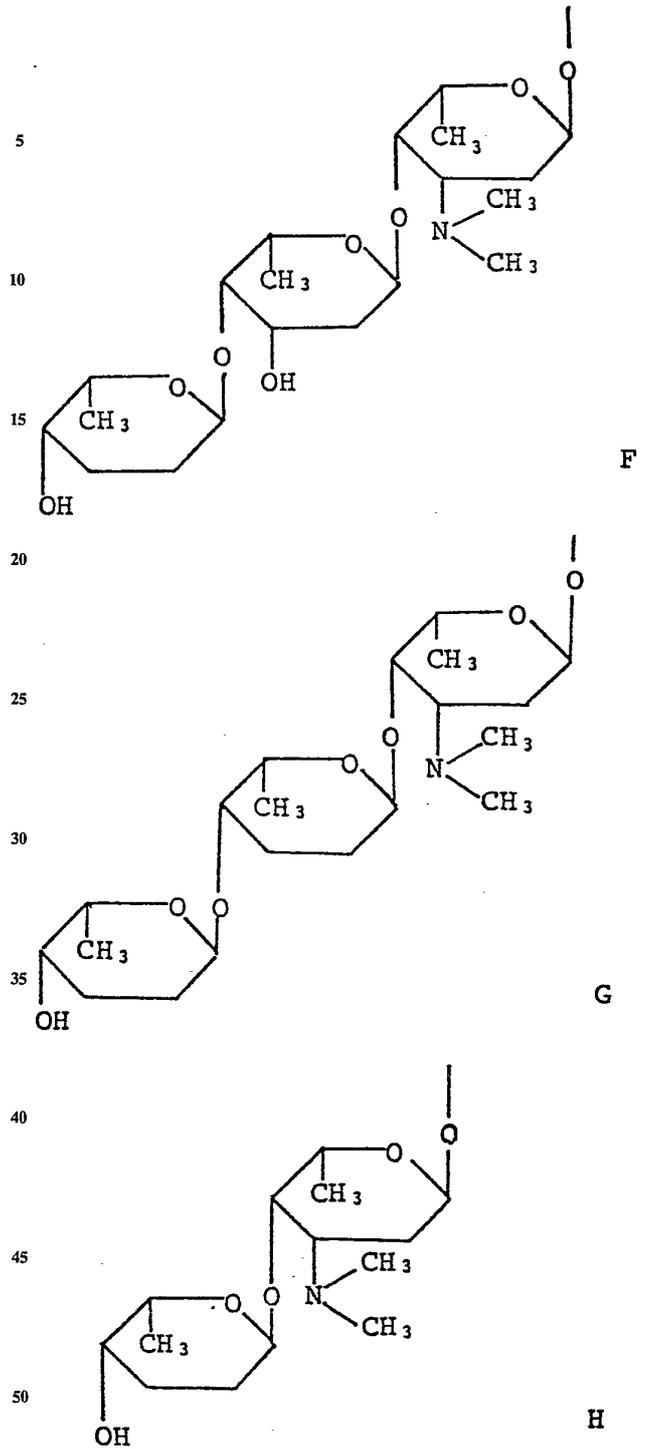
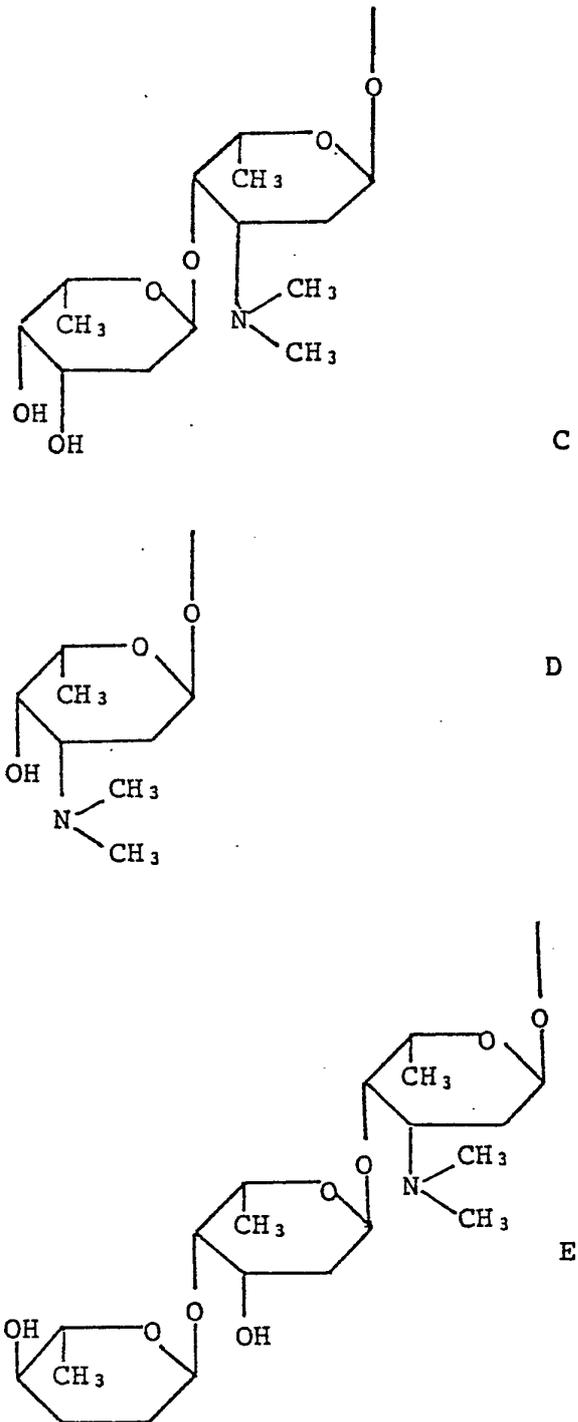
60

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Anthracycline, ein Verfahren zu ihrer Herstellung und pharmazeutische Präparate, die diese Verbindungen, die gegen Tumoren und Bakterien wirksam sind, enthalten.

Die neuen erfindungsgemässen Anthracycline besitzen die allgemeine Formel



worin R¹ Methyl oder Acetyl und R² eine Gruppe der Formeln



darstellt.

Die von Formel I umfassten spezifischen Verbindungen werden im folgenden wie folgt benannt:

R ₁	R ₂	Verbindung
	C	Auramycin C
	D	Auramycin D
	E	Auramycin E
	F	Auramycin F
	G	Auramycin G
	H	Auramycin H
-CH ₃	C	Sulfurmycin C
	D	Sulfurmycin D

R1	R2	Verbindung
-CH ₂ -CO-CH ₃	E	Sulfurmycin E
	F	Sulfurmycin F
	G	Sulfurmycin G
	H	Sulfurmycin H

Die neuen erfindungsgemässen Verbindungen werden durch die folgenden physiko-chemischen Daten charakterisiert, wobei als Lösungsmittel bei der Dünnschichtchromatographie (TLC) Chloroform/Methanol, 7:1, V/V (Lösungsmittel A); Benzol/Methanol, 5:1, V/V (Lösungsmittel B) und Chloroform/Methanol, 5:1, V/V (Lösungsmittel C) verwendet wurden:

Auramycin C (C₃₅H₄₃O₁₃N)

MW: 685,3

Schmelzpunkt: 151,0°C (Zers.)

Spezifische Drehung: α_D²⁰ +78,8° (c = 0,1 in Chloroform)

TLC (Silicagel): Rf 0,20 (Lösungsmittel A), Rf 0,30 (Lösungsmittel B)

Auramycin D (C₂₉H₃₃O₁₀N)

MW: 555,2

Schmelzpunkt: 139,5°C (Zers.)

Spezifische Drehung: +189,3° (c = 0,1 in Chloroform)

TLC (Silicagel): Rf 0,08 (Lösungsmittel A), Rf 0,14 (Lösungsmittel B)

Auramycin E (C₄₁H₅₃O₁₅N)

MW: 799,9

Schmelzpunkt: 157,0°C (Zers.)

Spezifische Drehung: +32,3° (c = 0,1 in Chloroform)

TLC (Silicagel): Rf 0,44 (Lösungsmittel A), Rf 0,41 (Lösungsmittel B)

Auramycin F (C₄₁H₅₃O₁₅N)

MW: 799,9

Schmelzpunkt: 160,0°C (Zers.)

Spezifische Drehung: +26,7° (c = 0,1 in Chloroform)

TLC (Silicagel): Rf 0,39 (Lösungsmittel A), Rf 0,38 (Lösungsmittel B)

Auramycin G (C₄₁H₅₃O₁₄N)

MW: 783,9

Schmelzpunkt: 148,5°C (Zers.)

Spezifische Drehung: +38,5° (c = 0,1 in Chloroform)

TLC (Silicagel): Rf 0,38 (Lösungsmittel A), Rf 0,40 (Lösungsmittel B)

Auramycin H (C₃₅H₄₃O₁₂N)

MW: 669,3

Schmelzpunkt: 119,5°C (Zers.)

Spezifische Drehung: - (nicht bestimmt)

TLC (Silicagel): Rf 0,33 (Lösungsmittel C)

Sulfurmycin C (C₃₇H₄₅O₁₄N)

MW: 727,3

Schmelzpunkt: 146,0°C (Zers.)

Spezifische Drehung: +55,8° (c = 0,1 in Chloroform)

TLC (Silicagel): Rf 0,20 (Lösungsmittel A), Rf 0,30 (Lösungsmittel B)

Sulfurmycin D (C₃₁H₃₅O₁₁N)

MW: 597,2

Schmelzpunkt: 128,0°C (Zers.)

Spezifische Drehung: +167,6° (c = 0,1 in Chloroform)

TLC (Silicagel): Rf 0,08 (Lösungsmittel A), Rf 0,14 (Lösungsmittel B)

Sulfurmycin E (C₄₃H₅₅O₁₆N)

MW: 841,9

Schmelzpunkt: 151,0°C (Zers.)

Spezifische Drehung: +19,6° (c = 0,1 in Chloroform)

TLC (Silicagel): Rf 0,38 (Lösungsmittel A), Rf 0,37 (Lösungsmittel B)

Sulfurmycin F (C₄₃H₅₅O₁₆N)

MW: 841,9

Schmelzpunkt: 151,5°C (Zers.)

Spezifische Drehung: +7,9° (c = 0,1 in Chloroform)

TLC (Silicagel): Rf 0,34 (Lösungsmittel A), Rf 0,36 (Lösungsmittel B)

Sulfurmycin G (C₄₃H₅₅O₁₅N)

MW: 825,9

Schmelzpunkt: 139,0°C (Zers.)

Spezifische Drehung: +25,6° (c = 0,1 in Chloroform)

TLC (Silicagel): Rf 0,33 (Lösungsmittel A), Rf 0,36 (Lösungsmittel B)

Sulfurmycin H (C₃₇H₄₅O₁₃N)

MW: 711,3

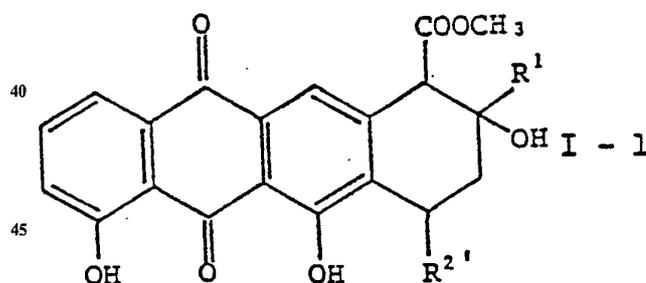
Schmelzpunkt: 98,5°C (Zers.)

Spezifische Drehung: +59,0° (c = 0,1 in Chloroform)

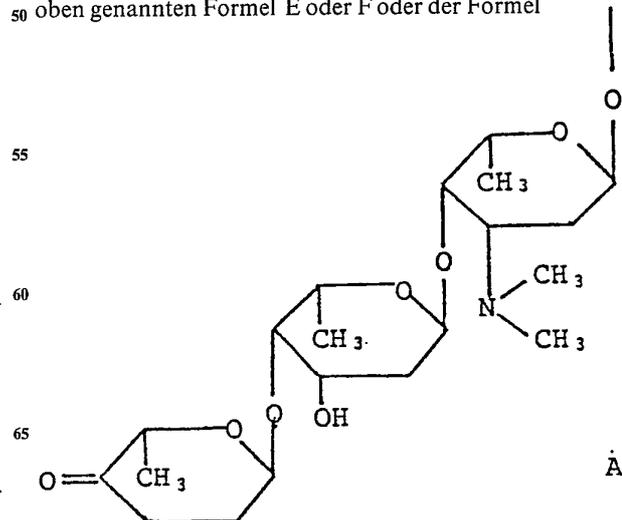
TLC (Silicagel): Rf 0,28 (Lösungsmittel C)

Die neuen Verbindungen der Formel I werden erfindungsgemäss dadurch hergestellt, dass man

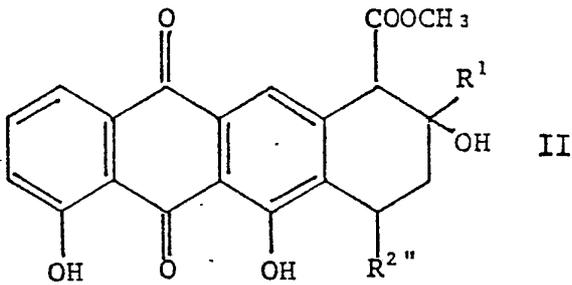
- a) eine Mutante von *Streptomyces galilaeus* /OBB-111, die zur Produktion von Verbindungen der Formel I befähigt ist, in einem wässrigen Nährmedium unter aeroben Bedingungen kultiviert und die genannten Verbindungen aus der Fermentationslösung isoliert,
- b) eine Verbindung der allgemeinen Formel



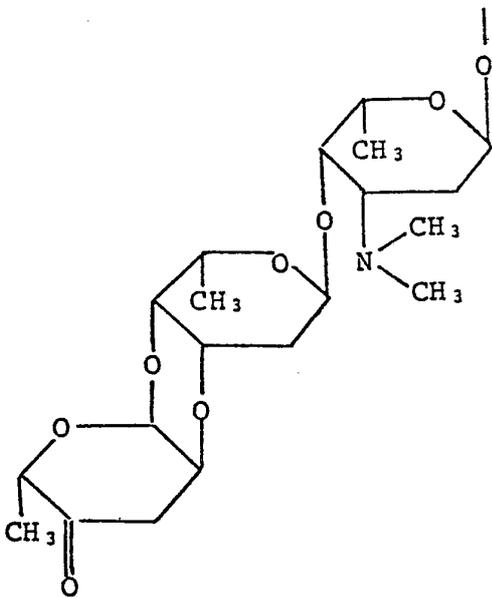
worin R¹ die obige Bedeutung hat und R² eine Gruppe der oben genannten Formel E oder F oder der Formel



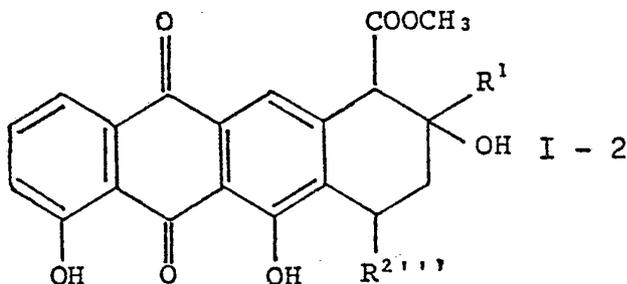
darstellt, unter sauren Bedingungen unter Umwandlung der Gruppe R^2 in eine Gruppe der Formel C hydrolysiert, oder
c) eine Verbindung der allgemeinen Formel



worin R^1 die obige Bedeutung hat und $R^{2''}$ eine Gruppe der oben genannten Formeln A, C, E, F oder G oder der Formel

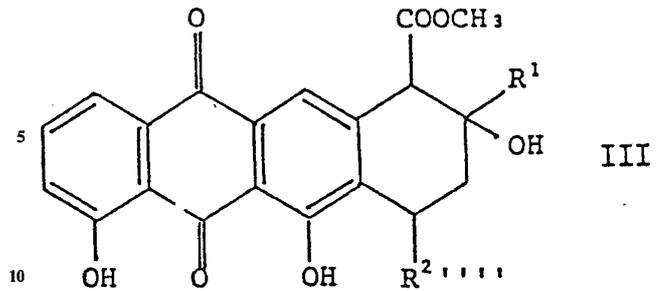


darstellt, unter sauren Bedingungen unter Umwandlung der Gruppe R^2 in eine Gruppe der Formel D hydrolysiert, oder
d) eine Verbindung der allgemeinen Formel



worin R^1 die obige Bedeutung hat und $R^{2'''}$ eine Gruppe der obigen Formel G darstellt, unter sauren Bedingungen unter Umwandlung der Gruppe $R^{2'''}$ in eine Gruppe der Formel H hydrolysiert, oder
e) eine Verbindung der allgemeinen Formel

6



15

worin R^1 die obige Bedeutung hat und $R^{2''''}$ eine Gruppe der obigen genannten Formel A darstellt, unter Umwandlung der Gruppe $R^{2''''}$ in eine Gruppe der Formeln E oder F reduziert.

Als Mikroorganismen in der Verfahrensstufe a) können alle Mutanten von *Streptomyces galilaeus* OBB-111 verwendet werden, die in der Lage sind, die Verbindungen der Formel I zu erzeugen. Der Stamm *Streptomyces galilaeus* OBB-111 wurde aus Bodenproben von Neuschwanstein, Oberbayern, Bundesrepublik Deutschland, isoliert und bei der Agency of Industrial Science and Technology, Fermentation Research Institute, Japan, unter der Nr. FERM-P Nr. 4780 am 29.1.1979, und bei der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA, unter der Nr. ATCC Nr. 31533 hinterlegt. Mutanten von *Streptomyces galilaeus* OBB-111 (FERM-P Nr. 4780, ATCC Nr. 31533) können durch konventionelle Mutationsmethoden erhalten werden, beispielsweise durch Bestrahlung mit UV-Licht, Röntgen- oder Gamma-Strahlen oder durch Behandlung mit geeigneten Mutagenen.

Der erfindungsgemäss für das Verfahren a) bevorzugte Stamm ist *Streptomyces galilaeus* OBB-111-610, der durch Behandlung von *Streptomyces galilaeus* OBB-111 mit N-Methyl-N'-nitro-N-notrosoguanidin erhalten wird. Der Stamm *S. galilaeus* OBB-111-610 wurde bei der Agency of Industrial Science and Technology, Fermentation Research Institute, 1-3, Higashi 1-chome, Yatabe-machi Tsukuba-gun, Ibaraki-ken 305, Japan, unter der Nr. FERM-P Nr. 4883 am 22.3.1979 und bei der American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852 USA unter der ATCC-Nr. 31534 am 22.6.1979 hinterlegt.

Die mykologischen Charakteristiken von *S. galilaeus* OBB-111-610 (FERM-P Nr. 4883, ATCC Nr. 31534) sind die folgenden:

1. Morphologische Eigenschaften

Der Stamm OBB-111-610 bildet mässig langes Luftmycel aus Substratmycel. An der Apex des Luftmycels wurde die Entwicklung von Haken und Spiralen beobachtet, jedoch bildeten sich keine quirlständigen Formen. Gewöhnlich werden reife Sporenketten mit mehr als 10 Sporen pro Kette gebildet. Die Sporen sind zylindrisch von den Massen $0,5$ bis $0,6 \mu \times 0,8$ bis $1,0 \mu$, ihre Oberfläche ist glatt.

60

2. Kulturcharakteristiken auf verschiedenen Medien

Die Kulturcharakteristiken des Stammes OBB-111-610 sind in Tabelle I angegeben.

Die Farbe des Wachstums des Stammes OBB-111-610 auf Sucrose-Nitrat-Agar, Glucose-Asparagin-Agar, Glycerin-Asparagin-Agar, Stärke-anorganische Salze-Agar und Hafermehl-Agar verändert sich in rosa-violett auf tropfenweise Zugabe von 0,05N Natronlauge.

Tabelle 1

Kulturcharakteristiken des Stammes OBB-111-610

Medium	Charakteristik für OBB-111-610
Sucrose-Nitrat-Agar Wachstum Luftmycel diffusionsfähiges Pigment	hellgelb bis hellgelblich-braun (3gc, Light Tan) bräunlich-grau (3cb, Sand) bis hellorange (5cb) gelblich
Glucose-Asparagin-Agar Wachstum Luftmycel diffusionsfähiges Pigment	stumpfes orange (3pe, Topaz bis 3ne, Topaz) hellbräunlich-grau (3dc, Natural) bis hellgrau (2fe, Covert Gray) bräunlich
Glycerin-Asparagin-Agar (ISP Medium Nr. 5) Wachstum Luftmycel diffusionsfähiges Pigment	hellgelb (3gc, Light Tan) bis hellgelblich-braun (31c, Amber) hellgrau (2fe, Covert Gray) gelb
Stärke-anorganische Salze-Agar (ISP Medium Nr. 4) Wachstum Luftmycel diffusionsfähiges Pigment	hellgelb (2pc, Bright Gold) bis stumpfes gelb (2pe, Mustard Gold) hellbräunlich-grau (2dc, Natural) bis hellgrau (2fe, Covert Gray) gelb
Tyrosin-Agar (ISP Medium Nr. 7) Wachstum Luftmycel diffusionsfähiges Pigment	dunkelbräunlich-grau (3ni, Clove Brown) keines schwarz
Nähragar Wachstum Luftmycel diffusionsfähiges Pigment	durchsichtiges hellbraun keines braun
Hefeextrakt-Malzextrakt-Agar (ISP Medium Nr. 2) Wachstum Luftmycel diffusionsfähiges Pigment	gelbliches braun (3ng, Yellow Maple) hellgrau (2fe, Covert Gray) keines
Hafermehl-Agar (ISP Medium Nr. 3) Wachstum Luftmycel diffusionsfähiges Pigment	hellgelblich-braun (2gc, Bamboo) bis hellbraun (3ie, Camel) hellgrau (2fe, Covert Gray bis 3fe, Silver Gray) braun
Magermilch (37°C) Wachstum Luftmycel diffusionsfähiges Pigment	braun bis dunkelbraun weiss bis bräunlich-grau dunkelbraun
Glucose-Pepton-Gelatine-Agar Wachstum Luftmycel diffusionsfähiges Pigment	hellgelb keines braun

3. Physiologische Eigenschaften

Die physiologischen Eigenschaften und die Kohlenhydrat-
verwertung des Stammes OBB-111-610 ist in den Tabellen 2

bzw. 3 angegeben. Die Wachstumstemperatur wurde auf
Hefeextrakt-Malzextrakt-Agar (ISP Medium Nr. 2) bei 20,
27, 32, 37, 40 und 45°C geprüft. Optimales Wachstum tritt bei
27 bis 32°C ein, bei 45°C tritt kein Wachstum ein.

Tabelle 2

Physiologische Charakteristiken des Stammes OBB-111-610

Test	Reaktion	Methoden und Materialien
Gelatineverflüssigung	schwach bis mässige Verflüssigung	Glucose-Pepton-Gelatine Medium 27°C
Stärkehydrolyse	schwach bis mässige Hydrolyse	Stärke-anorganische Salze-Agar

Tabelle 2 (Fortsetzung)
 Physiologische Charakteristiken des Stammes OBB-111-610

Test	Reaktion	Methoden und Materialien
Peptonisierung und Koagulation von Magermilch	mässig bis starke Peptonisierung und keine Koagulation	10% Magermilch 37°C
Nitrat-Reduktion	positiv	ISP Medium Nr. 8, 27°C
Melaninbildung	positiv	ISP Medium Nr. 1 ISP Medium Nr. 6 ISP Medium Nr. 7

Tabelle 3

Kohlenhydrat-Verwertung des Stammes OBB-111-610

L-Arabinose	positiv
D-Xylose	positiv
Glucose	positiv
D-Fructose	positiv
Sucrose	positiv
Inosit	positiv
L-Rhamnose	positiv
Raffinose	positiv
D-Mannit	negativ

Basalmedium: Pridham-Gottlieb-Medium (ISP Nr. 9)
 Temperatur: 27°C

Die mykologischen Charakteristiken von *S. galilaeus* OBB-111-610 sind fast identisch mit denen des älteren Stammes, d.h. *S. galilaeus* OBB-111.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens (a) der vorliegenden Erfindung können die Verbindungen der Formel I durch Kultivierung von *Streptomyces galilaeus* OBB-111-610 in wässrigem Nährmedium unter aeroben Bedingungen hergestellt werden.

Die Kultivierung kann in einem Kulturmedium durchgeführt werden, das die üblichen Nährsubstanzen enthält. Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Glucose, Sucrose, Stärke, Lactose, Maltose, Fructose, Glycerin, Dextrin oder Gemische davon; Stickstoffquellen sind beispielsweise Sojabohnenmehl, Baumwollsaamenmehl, Fleischextrakt, Fischmehl, Pepton, Trockenhefe, Cornsteep-Liquor, vorzugsweise Weizenkeime oder Gemische davon. Weiterhin kann das Kulturmedium erforderlichenfalls geeignete anorganische Substanzen wie Phosphate, Sulfate, Chloride, Bromide, Nitrate und Carbonate von Natrium, Kalium, Ammonium und Calcium enthalten.

Die Kultivierung kann in wässrigem Medium unter aeroben Bedingungen ausgeführt werden, insbesondere mittels eines Submersfermentationsprozesses. Die bevorzugten Temperatur für die Kultivierung liegt im Bereich von 20–37°C, insbesondere von 25–30°C. Das pH des Mediums kann variieren, liegt aber generell im Bereich 5–8.

Nach einer Kultivierungszeit von 2–10 Tagen unter den obenwähnten Bedingungen können die Verbindungen der Formel I aus der Fermentationsbrühe erhalten werden. Die so erhaltenen Verbindungen der Formel I, d.h. Auramycin C, D, E, F und G und Sulfurmycin C, D, E, F und G können aus der Fermentationsbrühe beispielsweise durch Extraktion mit einem mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel wie Äthylacetat, Chloroform, Methylenchlorid, Methylisobutylketon oder Gemischen von Chloroform und Me-

thanol, vorzugsweise einem Chloroform/Methanol-Gemisch (1:1, V/V) erhalten werden. Die organische Phase wird abgetrennt und getrocknet, wobei man ein öliges Material erhält. Ein nicht polares organisches Lösungsmittel wie n-Hexan wird diesem öligen Material zugesetzt, wobei die rohen Verbindungen in Pulverform erhalten werden.

Die erhaltenen Verbindungen können durch Säulenchromatographie an Adsorbentien wie Silicagel oder Dextrangel wie Sephadex LH-20 voneinander getrennt werden. Die Fraktionen werden dünn-schichtchromatographisch oder mittels Hochdruckflüssigchromatographie analysiert und die passenden Fraktionen werden vereinigt und eingedampft, wobei die Komponente in mehr oder weniger reiner Form erhalten wird. Weitere Reinigung kann durch wiederholte Säulenchromatographie und/oder Hochdruckflüssigchromatographie vorgenommen werden.

Die Säurehydrolyse von Auramycin A, B, C, E, F oder G oder Sulfurmycin A, B, C, E, F oder G gemäss Verfahrensvariante (b), (c) oder (d) kann in an sich bekannter Weise mit einer Säure wie Salzsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure oder methanolischer Salzsäure (0,1 bis 3N) vorgenommen werden. Die Hydrolyse kann bei Temperaturen von 0°C bis Rückflusstemperatur des Hydrolysegemisches, vorzugsweise bei erhöhter Temperatur ausgeführt werden. Durch die Säurehydrolyse können die Auramycine C, D und H und die Sulfurmycine C, D und H hergestellt werden.

Die Reduktion der Carbonylgruppe des Zuckerrestes von Auramycin A oder Sulfurmycin A gemäss Verfahrensvariante (e) kann ebenfalls in an sich bekannter Weise mit einem Reduktionsmittel wie Natriumborhydrid, Lithiumaluminiumhydrid oder einem Enzym, beispielsweise aus Rattenleberhomogenat oder Zellen von anthracyclinantibiotika-herstellenden Mikroorganismen. Durch diese Reduktionsmethode können Auramycin und Sulfurmycin E und F hergestellt werden.

Die erfindungsgemässen Anthracyclinantibiotika besitzen antibakterielle und Anti-Tumor-Aktivität.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch antibakterielle und Antitumormittel, die als aktiven Inhaltsstoff eine Anthracyclinverbindung der Formel I enthalten. Vorzugsweise enthalten die antibakteriellen Mittel Auramycin oder Sulfurmycin C, D, E, F und/oder G und die Antitumormittel enthalten Auramycin oder Sulfurmycin C, D, E und/oder G.

Die biologische Wirksamkeit der erfindungsgemässen Anthracycline wird aus den nachstehenden Daten ersichtlich:

Tabelle 4 zeigt die minimale Hemmkonzentration in vitro (MIC) von Auramycin C, D, E, F und G und Sulfurmycin C, D, E, F und G in bezug auf verschiedene Mikroorganismen, bestimmt nach der Agarstrichmethode.

Tabelle 4

Stamm		MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
		Auramycin C	Auramycin D	Sulfurmycin C	Sulfurmycin D
Staphylococcus aureus 209P IAM-1011	(1)	6.25	12.5	6.25	25.0
Staphylococcus aureus 209P Stf	(1)	6.25	12.5	6.25	25.0
Sarcina lutea IAM1009	(1)	6.25	6.25	6.25	25.0
Micrococcus flavus ATCC-10240	(1)	6.25	12.5	6.25	25.0
Bacillus subtilis IAM-1027	(1)	6.25	12.5	12.5	12.5
Mycobacterium smegmatis IFO-13167	(1)	6.25	3.13	3.13	6.25
Pseudomonas aeruginosa IFO-12689	(1)	>50	>50	>50	>50
Escherichia coli K-12 IAM-1264	(1)	>50	>50	>50	>50
Escherichia coli NIHJ IFO-12734	(1)	>50	>50	>50	>50
Candida albicans ATCC-10231	(2)	>50	>50	>50	>50
Candida tropicalis ATCC-13803	(2)	>50	>50	>50	>50

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Stamm		MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
		Auramycin E	Auramycin F	Auramycin G	Sulfurmycin E	Sulfurmycin F	Sulfurmycin G
Staphylococcus aureus 209P IAM-1011	(1)	1.56	3.12	6.25	3.12	3.12	6.25
Staphylococcus epidermidis IFO-12993	(1)	3.12	3.12	6.25	1.56	12.5	12.5
Sarcina lutea IAM-1009	(1)	3.12	3.12	6.25	3.12	1.56	12.5
Micrococcus flavus ATCC-10240	(1)	3.12	3.12	6.25	3.12	1.56	12.5
Bacillus subtilis IAM-1027	(1)	3.12	3.12	12.5	3.12	3.12	6.25
Bacillus cereus Rol 79B	(1)	0.39	0.39	0.78	0.39	0.39	0.39
Escherichia coli K-12 IAM-1264	(1)	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Escherichia coli NIHJ IFO-12734	(1)	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Candida albicans ATCC-10231	(2)	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Candida tropicalis ATCC-13803	(2)	>50	>50	>50	>50	>50	>50

(1); Heart-Infusionsagar (2); Sabourand-Dextrose-Agar

2. Akute Toxizität

Die akute intraperitoneale LD₅₀ bei Mäusen, bestimmt 72 Stunden nach einer einmaligen Injektion der Antibiotika, beträgt etwa 90 mg/kg für Auramycin C, Auramycin D, Sulfurmycin C und Sulfurmycin D; 40–80 mg/kg für Auramycin G und Sulfurmycin G und 20–40 mg/kg für Auramycin E und Sulfurmycin E.

3. Antitumor-Effekt

Die erfindungsgemässen Anthracyclinglycoside wurden gegen P388-Leukämie bei Mäusen geprüft. CDF₁-Mäuse wurden mit 1×10^6 Zellen von P388 intraperitoneal infiziert und jedes der Antibiotika intraperitoneal am Tag 1, 5 und 9 verabreicht. Tabelle 5 zeigt, wie die Überlebenszeit der behandelten Mäuse verlängert wurde.

Tabelle 5

Antibiotikum	Dosis (mg/kg/Tag)	Mittlere Überlebenszeit (behandelt/Kontrolltiere, %)
Auramycin C	15.0	128
	7.5	141
	3.75	130
	1.88	135
Auramycin D	15.0	141
	7.5	149
	3.75	103
	1.88	-

Antibiotikum	Dosis (mg/kg/Tag)	Mittlere Überlebenszeit (behandelt/Kontrolltiere, %)
Auramycin E	12.0	165
	6.0	158
	3.0	139
Auramycin G	1.5	131
	12.0	119
	6.0	105
Sulfurmycin C	3.0	109
	1.5	102
	15.0	141
	7.5	138
	3.75	141
Sulfurmycin D	1.88	131
	15.0	152
	7.5	128
Sulfurmycin E	3.75	135
	1.88	106
	12.0	165
Sulfurmycin G	6.0	150
	3.0	140
	1.5	133
Sulfurmycin D	24.0	144
	12.0	123
	6.0	113
Sulfurmycin E	3.0	112
	1.5	104

Wie oben erwähnt, können die Anthracycline der Formel I als Medikament in Form pharmazeutischer Präparate Verwendung finden. Die Verbindungen der Formel I können auch in diesen Präparaten in Form pharmazeutisch anwendbarer Salze vorliegen.

Die erfindungsgemässen pharmazeutischen Präparate enthalten den aktiven Wirkstoff zusammen mit einem verträglichen pharmazeutischen Träger. Der Träger kann ein organisches oder anorganisches Material sein, das für die enterale perkutane oder parenterale Verabreichung geeignet ist, beispielsweise Wasser, Gelatine, Gummi arabicum, Lactose, Stärke, Magnesiumstearat, Talk, vegetabile Öle, Polyalkylenglykole, Vaseline. Die pharmazeutischen Präparate können auch andere therapeutisch wertvolle Stoffe enthalten. Sie können in fester Form, z.B. als Tabletten, Dragées oder Kapseln oder in flüssiger Form, z.B. als Lösung, Suspension oder Emulsion vorliegen. Sie können sterilisiert sein und/oder Hilfsstoffe wie Konservierungsmittel, Stabilisatoren, Netzmittel, Emulgatoren, Salze zur Veränderung des osmotischen Druckes oder Puffer enthalten.

Die Dosierung für die Verabreichung der aktiven Inhaltsstoffe hängt von der Art der Verabreichung, dem Alter, Gewicht und dem Zustand des Patienten und der zu behandelnden Krankheitsart ab. Eine typische Dosierung für Erwachsene liegt im Bereich von 20 mg bis 30 mg pro Tag, bei oraler oder parenteraler Verabreichung, vorzugsweise intravenöser Injektion.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter.

Beispiel 1

Sporen von einer Schrägagarkultur von *Streptomyces galilaeus* OBB-111-610 wurden in einen 500-ml-Erlenmeyerkolben gebracht, der 100 ml eines sterilisierten Mediums enthielt, das pro Liter Leitungswasser 20 g D-Glukose, 20 g lösliche Stärke, 5 g S-3-Fleisch (Ajinomoto Co., Ltd.), 2,5 g Hefeextrakt (Daigo Eiyokagaku Co., Ltd.), 1 g Dikaliumhydrogenphosphat, 1 g Magnesiumsulfat heptahydrat, 3 g Natriumchlorid und 3 g Calciumcarbonat enthielt. Diese Kultur wurde auf einer Rotationsschüttelmaschine bei 27°C mit 180 Bewegungen pro Minute inkubiert. Nach 72 Stunden wurden 2 ml Kultur in einen 500-ml-Erlenmeyerkolben gebracht, der 100 ml eines sterilen Mediums enthielt, das pro Liter Leitungswasser 20 g D-Glukose, 20 g lösliche Stärke, 10 g Pharmamedia (Traders Oil Mill Co., USA), 1 g Dikaliumhydrogensulfat, 1 g Magnesiumsulfat heptahydrat, 3 g Natriumchlorid und 3 g Calciumcarbonat enthielt. Diese Kultur wurde 72 bis 96 Stunden bei 27°C auf einer Rotationsschüttelmaschine mit 180 Bewegungen pro Minute inkubiert. Zu dieser Zeit war die antibiotische Aktivität des Kulturfiltrats und des Mycelextraktes, gemessen nach der Papierscheibenagardiffusionsmethode mit *Sarcina lutea* IAM-1009 als Testmicroorganismus, 22 bzw. 20 mm im Durchmesser.

Der oben erwähnte Stamm *Streptomyces galilaeus* OBB-111-610 wurde wie folgt erhalten:

Sporen einer Schrägagarkultur von *Streptomyces galilaeus* OBB-111 wurden in 10 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und durch ein Glasfilter Nr. 3 filtriert. Die Sporensuspension wurde mit der zweifachen Menge 0,2M Tris-Puffer (pH 9,0), der 2 mg/ml N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin enthielt, verdünnt und 60 Minuten bei 27°C inkubiert. Die Sporen wurden dann auf einem Nucleoporefilter (0,2 µm Porengrösse) gesammelt, mit 30 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und erneut in 10 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Die so erhaltene Sporensuspension wurde auf ISP-Nr. 2 Medium in einer Petrischale aufgebracht und 4 bis 6 Tage bei 27°C inkubi-

ert. Die Kolonien wurden abgenommen, auf Schrägagar transferiert und 10 bis 14 Tage inkubiert.

Beispiel 2

600 ml der analog Beispiel 1 hergestellten vegetativen Kultur wurden in ein 50-l-Fermentationsgefäss gebracht, das 30 l eines sterilen Produktionsmediums enthielt, das die gleiche Zusammensetzung wie in Beispiel 1 hatte und zusätzlich 0,1% Nissan Disfoam (Nippon Yushi Co., Ltd.) enthielt. Die Kultivierung wurde bei 27°C durchgeführt, wobei die Rührgeschwindigkeit 350 Umdrehungen pro Minute und die Belüftungsrate 1:1 Volumenteile betrug. Nach etwa 90 Stunden erreichte die Antibiotikaproduktion den Höhepunkt.

Beispiel 3

(a) 240 l Kultur wurden gemäss Beispiel 2 unter Verwendung von 8 50-l-Fermentationsgefässen hergestellt. Die Kultur wurde zentrifugiert, das Filtrat und der Filterkuchen separat extrahiert. Der Filterkuchen wurde in 60 l Methanol suspendiert, 3 Stunden gerührt und filtriert und danach noch einmal mit Methanol extrahiert. Der so erhaltene Extrakt wurde mit 120 l Chloroform und 120 l Wasser versetzt und die Chloroformschicht wurde abgetrennt. Andererseits wurde das Kulturfiltrat mit 480 l eines Lösungsmittelgemisches von Chloroform und Methanol (1:1) extrahiert und die Chloroformschicht abgetrennt. Die Chloroformextrakte des Filterkuchens und des Kulturfiltrats wurden vereinigt und auf ein kleines Volumen (300-400 ml) eingengt. Das Konzentrat wurde mit n-Hexan verdünnt, wobei sich ein gelber Feststoff abschied, der unter vermindertem Druck getrocknet wurde und 37 g eines Gemisches von Auramycin C, D, E, F und G und Sulfurmycin C, D, E, F und G lieferte.

(b) Das vorstehend erhaltene Gemisch wurde wie folgt fraktioniert. Sephadex LG-20 wurde 15 Stunden lang in einem Lösungsmittelgemisch von Chloroform und Methanol (2:1) belassen und dann in eine Säule von 80 cm Länge und 80 cm Durchmesser gebracht. Das im vorstehenden Abschnitt erhaltene Stoffgemisch (37 g) wurde in 50 ml eines Gemisches von Chloroform und Methanol (2:1) gelöst und auf die Säule gegeben. Die Säule wurde mit einem Gemisch von Chloroform und Methanol (2:1) eluiert. Die Fraktionen, die Anthracyclinglycoside enthielten, wurden dünnschichtchromatographisch (Silicagel, Chloroform : Methanol, 10:1) ermittelt, unter vermindertem Druck zur Trockene gebracht und lieferten 16,8 g eines gelben Feststoffes. Dieser gelbe Feststoff enthielt die Auramycine C und G und die Sulfurmycine C und G und kleinere Mengen von Auramycin D, E, F und Sulfurmycin E, E und F.

(c) Der gelbe Feststoff (16,8 g) wurde in 20 ml Chloroform gelöst und auf eine Silicagelsäule von 50 cm Länge und 5 cm Durchmesser gegeben. Nach Waschen mit einem Lösungsmittelgemisch von Chloroform und Methanol (97:3) wurden die Auramycine C und G und die Sulfurmycine C und G mit einem Gemisch von Chloroform und Äthanol (95:5 bis 92:8) eluiert. Diese Eluate wurden unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft, wobei 3,8 g gelber Feststoff erhalten wurde.

(d) Der gemäss Abschnitt (c) erhaltene gelbe Feststoff wurde in 10 ml Dichlormethan gelöst und auf eine Silicagelsäule von 40 cm Länge und 3 cm Durchmesser gegeben. Die Säule wurde mit einem Gemisch von Chlormethan und Methanol (93:8) entwickelt. Zunächst wurde Sulfurmycin G eluiert, sodann Auramycin G, E, F, Sulfurmycin E, F, C, Auramycin C, D und Sulfurmycin D. Die Eluate wurden in 5 Fraktionen (I, II, III, IV und V) aufgeteilt.

Fraktion Nr.	Hauptkomponente
Fraktion I	Sulfurmycin G
Fraktion II	Sulfurmycin G, Auramycin G, Auramycin E, Auramycin F, Sulfurmycin E, Sulfurmycin F, Sulfurmycin C
Fraktion III	Sulfurmycin C, Auramycin C
Fraktion IV	Auramycin C
Fraktion V	Auramycin C, Sulfurmycin D

Jede dieser Fraktionen wurden unter vermindertem Druck zur Trockene eingeengt, wobei 595 mg Fraktion I, 890 mg Fraktion II, 914 mg Fraktion III, 448 mg Fraktion IV und 200 mg Fraktion V in Form gelber Pulver erhalten wurden.

(e) Fraktion I (595 mg) wurde weiter durch präparative Flüssigchromatographie gereinigt. Die Probe wurde in 10 ml eines Lösungsmittelgemisches von Dichlormethan und Methanol (96:4) gelöst und auf Prep PAK-500/SILICA (Waters Associates, Inc.) chromatographiert. Die Mobilphase war ein 96:4-Gemisch von Dichlormethan und Methanol bei einer Flussgeschwindigkeit von 50 ml/Minute. Die Elution wurde mit einem Refraktionsindexmonitor überwacht. Die Fraktionen, die nur Sulfurmycin G enthielten, wurden gesammelt und unter vermindertem Druck auf ein kleines Volumen eingeengt. Zusatz von etwas n-Hexan bewirkte die Ausfällung von 123 mg reinem Sulfurmycin G.

(f) Die Fraktion II (890 mg) wurde nach der Methode Abschnitt (e) gereinigt. Die mobile Phase war ein Dichlormethan: Methanolgemisch (96:4) bei einer Flussgeschwindigkeit von 50 ml/Minute. Zunächst wurde Sulfurmycin G eluiert, dann Auramycin G, E, F und Sulfurmycin E, F, C. Die Fraktionen, die reines Sulfurmycin G, Auramycin G, E, F und Sulfurmycin F, C enthielten, wurden unter vermindertem Druck auf kleine Volumina eingeengt. Zusatz von n-Hexan zu den Konzentraten lieferte 54 mg reines Sulfurmycin G, 25 mg reines Auramycin G, 12 mg reines Auramycin E, 13 mg reines Auramycin F, 13 mg reines Sulfurmycin E, 18 mg reines Sulfurmycin F und 95 mg reines Sulfurmycin C.

(g) Fraktion III (914 mg) wurde nach der Methode von Abschnitt (e) gereinigt. Die mobile Phase war Dichlormethan: Methanol (95:5) bei einer Flussgeschwindigkeit von 50 ml/Minute. Zuerst wurde Sulfurmycin C, dann Auramycin C eluiert. Die Fraktionen, die reines Sulfurmycin C und Auramycin C enthielten, wurden auf kleine Volumina unter vermindertem Druck eingeengt. Zusatz von n-Hexan zu den Konzentraten lieferte 95 mg reines Sulfurmycin C und 15 mg reines Auramycin C.

(h) Fraktion IV (448 mg) wurde durch Dünnschichtchromatographie (Chloroform: Methanol, 7:1) gereinigt. Die Auramycin C enthaltende Bande wurde abgetragen und mit einem Lösungsmittelgemisch von Chloroform und Methanol (10:1) extrahiert und auf ein kleines Volumen eingeengt. Zusatz von n-Hexan lieferte 57 mg reines Auramycin C.

(i) Fraktion V (200 mg) wurde durch Dünnschichtchromatographie (Chloroform: Methanol, 4:1) gereinigt. Die nur Auramycin E oder Sulfurmycin E enthaltende Bande wurde abgetragen und mit Chloroform: Methanol (8:1) extrahiert und auf ein kleines Volumen eingeengt. Zusatz von n-Hexan zu den Konzentraten lieferte 7 mg Auramycin D und 11 mg Sulfurmycin D.

Beispiel 4

Eine Lösung von 100 mg Auramycin E in 25 ml 0,5%iger Salzsäure wurde bei Raumtemperatur 25 Minuten hydrolysiert. Das Reaktionsgemisch wurde mit verdünnter Natronlauge neutralisiert und zweimal mit 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden auf ein kleines Volumen eingeengt und dünnschichtchromatographiert (Chloroform: Methanol, 5:1). Die Auramycin C enthaltende Bande wurde abgetragen und mit Chloroform: Methanol (4:1) extrahiert und der Extrakt auf ein kleines Volumen eingeengt. Zusatz von n-Hexan fällte 54 mg reines Auramycin C.

Beispiel 5

In Analogie zu Beispiel 4 wurden aus 100 mg Auramycin F 48 mg Auramycin C erhalten.

Beispiel 6

In Analogie zu Beispiel 4 wurden aus 100 mg Sulfurmycin E 51 mg Sulfurmycin C erhalten.

Beispiel 7

In Analogie zu Beispiel 4 wurden aus 100 mg Sulfurmycin F 45 mg Sulfurmycin C erhalten.

Beispiel 8

Eine Lösung von 100 mg Auramycin A in 50 ml 0,5%iger Salzsäure wurde 40 Minuten bei Raumtemperatur hydrolysiert. Das Reaktionsgemisch wurde durch Zusatz von verdünnter Natronlauge neutralisiert und mit zweimal 100 ml Chloroform extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und auf ein kleines Volumen eingeengt. Das Konzentrat wurde auf Dünnschichtplatten chromatographiert (Chloroform: Methanol, 5:1). Die Auramycin C und D enthaltenden Banden wurden abgenommen, mit einem Gemisch von Chloroform und Methanol (4:1) extrahiert und eingeengt, wobei 12 mg reines Auramycin C und 25 mg Auramycin D erhalten wurden.

Beispiel 9

In Analogie zu Beispiel 8 wurden aus 100 mg Sulfurmycin A 13 mg Sulfurmycin C und 33 mg Sulfurmycin D erhalten.

Beispiel 10

Eine Lösung von 100 mg Auramycin A in 20 ml Aceton und 1 ml Methanol wurde mit 1 ml 0,2N methanolischer Salzsäure unter Rühren versetzt und bei Raumtemperatur 40 Minuten stehengelassen. Das Reaktionsgemisch wurde durch Zusatz von verdünnter Natronlauge neutralisiert, mit 20 ml Wasser versetzt und mit zweimal 20 ml Chloroform extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt, eingeengt und auf einer Silicagelsäule chromatographiert (Chloroform: Methanol, 95:5). Die das Auramycin D enthaltenden Fraktionen wurden unter vermindertem Druck eingedampft und lieferten 43 mg Auramycin D.

Beispiel 11

In Analogie zu Beispiel 10 wurden aus 100 mg Auramycin E 41 mg Auramycin D erhalten.

Beispiel 12

Zu einer Lösung von 100 mg Auramycin B in 15 ml Aceton wurden 0,2 ml konzentrierte Salzsäure gegeben. Nach 120 Minuten Hydrolyse bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch mit verdünnter Natronlauge neutralisiert, mit 20 ml Wasser versetzt und mit zweimal 20 ml Chloroform extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und auf ein kleines Volumen eingedampft. Das Konzentrat wurde auf einer Silicagelsäule chromatographiert (Chloroform: Methanol, 95:5)

und die Fraktionen, die Auramycin D enthielten, unter vermindertem Druck eingengt. Man erhielt 38 ml Auramycin D.

Beispiel 13

Eine Lösung von 100 mg Auramycin C in 50 ml 0,5%iger Salzsäure wurde 60 Minuten bei Raumtemperatur hydrolysiert. Das Reaktionsgemisch wurde mit verdünnter Natronlauge neutralisiert, mit zweimal 100 ml Chloroform extrahiert und der Extrakt auf ein kleines Volumen eingengt. Das Konzentrat wurde auf Dünnschichtplatten chromatographiert (Chloroform:Methanol, 5:1). Die Auramycin D enthaltende Bande wurde abgetragen und mit Chloroform und Methanol (4:1) extrahiert. Man erhielt 72 mg Auramycin D.

Beispiel 14

Eine Lösung von 80 mg Auramycin G in 4 ml 0,1N Salzsäure wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur hydrolysiert. Das Reaktionsgemisch wurde mit verdünnter Natronlauge neutralisiert, mit zweimal 4 ml Äthylacetat extrahiert und der Extrakt auf ein kleines Volumen eingedampft. Das Konzentrat wurde auf Dünnschichtplatten chromatographiert (Chloroform:Methanol, 5:1). Die Auramycin H und D enthaltenden Banden wurden abgetragen und mit einem Gemisch von Chloroform und Methanol (10:1) extrahiert. Jeder Extrakt wurde auf ein kleines Volumen eingengt. Durch Zusatz von n-Hexan wurden 16 mg Auramycin H bzw. 12 mg Auramycin D gefällt.

Beispiel 15

In Analogie zu Beispiel 10 wurden aus 100 mg Sulfurmycin A 47 mg Sulfurmycin D erhalten.

Beispiel 16

In Analogie zu Beispiel 11 wurden aus 100 mg Sulfurmycin F 44 mg Sulfurmycin D erhalten.

Beispiel 17

In Analogie zu Beispiel 12 wurden aus 100 mg Sulfurmycin B 39 mg Sulfurmycin D erhalten.

Beispiel 18

In Analogie zu Beispiel 13 wurden aus 100 mg Sulfurmycin C 68 mg Sulfurmycin D erhalten.

Beispiel 19

In Analogie zu Beispiel 14 wurden aus 80 mg Sulfurmycin G 19 mg Sulfurmycin H und 13 mg Sulfurmycin D erhalten.

Beispiel 20

Zu einer Lösung von 500 mg Auramycin H in 20 ml Äthylacetat wurden 50 mg Natriumborhydrid in 50 ml Wasser unter Rühren gegeben. Die Reduktion wurde bei Raumtemperatur unter Rühren während 20 Minuten durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde zweimal mit 20 ml Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck auf ein kleines Volumen eingengt. Das Konzentrat wurde an Dünnschichtplatten chromatographiert

12

(Chloroform:Methanol:Ammoniumhydroxid, 400:30:3). Die Auramycin E und F enthaltenden Banden wurden abgetragen und mit einem Gemisch von Chloroform und Methanol (5:1) extrahiert. Jeder der Extrakte wurde auf ein kleines Volumen eingengt und durch Zusatz von n-Hexan gefällt. Man erhielt 200 mg Auramycin E und 50 mg Auramycin F.

Beispiel 21

In Analogie zu Beispiel 20 wurden aus 500 mg Sulfurmycin A 162,5 mg Sulfurmycin E und 30,5 mg Sulfurmycin F erhalten.

Beispiel 22

Eine Lösung von 200 mg eines Gemisches von Auramycin A und Sulfurmycin A in 50 ml 0,5%iger Salzsäure wurde 60 Minuten bei Raumtemperatur hydrolysiert. Das Reaktionsgemisch wurde mit verdünnter Natronlauge neutralisiert und mit zweimal 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden auf ein kleines Volumen eingengt und auf Dünnschichtplatten chromatographiert (Chloroform:Methanol, 5:1). Die Auramycin C, Auramycin D, Sulfurmycin C und Sulfurmycin D enthaltenden Banden wurden abgetragen und mit einem Gemisch von Chloroform und Methanol (4:1) extrahiert. Jeder der Extrakte wurde unter vermindertem Druck auf ein kleines Volumen eingengt und durch Zusatz von etwas n-Hexan gefällt. Man erhielt 10 mg Auramycin C, 25 mg Auramycin D, 11 mg Sulfurmycin C und 27 mg Sulfurmycin D.

Beispiel 23

In Analogie zu Beispiel 22 wurden aus 200 mg Auramycin B und Sulfurmycin B 25 mg Auramycin D und 35 mg Sulfurmycin D erhalten.

Beispiel 24

Die Lebern von männlichen Wistar-Ratten wurden in 9,15M Kaliumchloridlösung homogenisiert und 10 Minuten mit 9000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Herstellung des Enzympräparates verwendet. Ein Gemisch von 40 ml Enzympräparat, 2 ml einer Lösung von Auramycin A (10 mg/ml) 30 mg NADP und 5 ml 0,1M Tris-HCl-Puffer (pH 7,8) wurde 60 Minuten aerob bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz eines Gemisches von Chloroform und Methanol (1:1) beendet. Die Chloroformschicht wurde abgetrennt, unter vermindertem Druck auf ein kleines Volumen eingengt und das Konzentrat auf Dünnschichtplatten chromatographiert (Chloroform:Methanol:Ammoniumhydroxid, 400:30:3). Der Vergleich mit authentischen Proben von Auramycin E und F bestätigte die Bildung von Auramycin E und F aus Auramycin A durch Rattenleberenzym.

Beispiel 25

In Analogie zu Beispiel 24 wurde unter Verwendung von Sulfurmycin A als Substrat die Bildung von Sulfurmycin E und Sulfurmycin F aus Sulfurmycin A mittels Rattenleberenzym bestätigt.