



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

87803

C (40) Patentti myönnetty
Patent beviljat 26 02 1993

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 12P 17/18, C 07D 491/18

| | |
|---|-----------------------|
| (21) Patentihakemus - Patentansökning | 854731 |
| (22) Hakemispäivä - Ansökningsdag | 29.11.85 |
| (24) Alkupäivä - Löpdag | 29.11.85 |
| (41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig | 04.06.86 |
| (44) Nähtävöksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad | 13.11.92 |
| (32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet | |
| 03.12.84 GB 8430455 P | 05.02.85 GB 8502869 P |
| 01.04.85 GB 8508420 P | |

(71) Hakija - Sökande

1. Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd., No. 3, Doshomachi 4-chome, Higashi-ku, Osaka-shi, Osaka, Japan, (JP)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Okuhara, Masakuni, No. 14-10, Umezono 2-chome, Sakuramura, Niihari-gun, Ibaraki, Japan, (JP)
2. Tanaka, Hirokazu, No. 15-1-502, Namiki 4-chome, Sakuramura, Niihari-gun, Ibaraki, Japan, (JP)
3. Goto, Toshio, No. 14-20, Sengen 1-chome, Sakuramura, Niihari-gun, Ibaraki, Japan, (JP)
4. Kino, Tohru, No.11-11, Nakamura Minami 6-chome, Tsuchiura-shi, Ibaraki, Japan, (JP)
5. Hatanaka, Hiroshi, No. 15-1-205, Namiki 4-chome, Sakuramura, Niihari-gun, Ibaraki, Japan, (JP)

(74) Asiamies - Ombud: Leitzinger Oy

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä valmistaa farmakologisesti arvokkaita trisyklisiä yhdisteitä
Förfarande för framställning av farmakologiskt värdefulla tricykliska föreningar

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: BP-927 FRI
BP-928 FRI

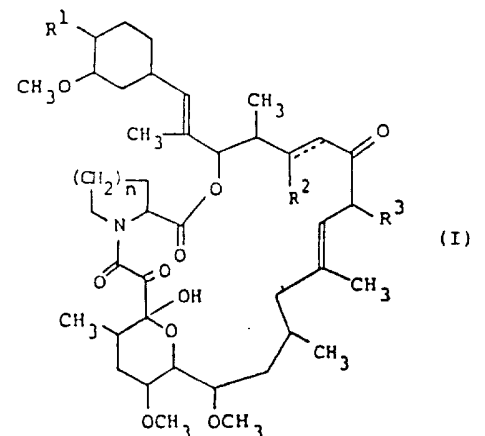
(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Can. J. Chem. 56 (1978) 2491-2492 (Swindells et al),
Can. J. Chem. 60 (1982) 2046-2047 (Findlay et al.)

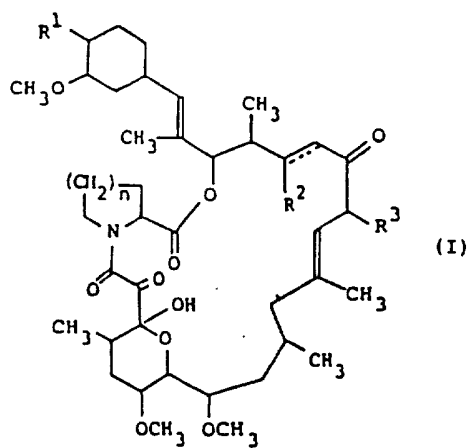
(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Tämän keksinnön kohteena ovat trisykloyhdisteet, jotka ovat hyödyllisiä hoidettaessa ja estettäessä vastareaktiota, joka johtuu transplantaatiosta, medulla ossium-transplantaation aiheuttamista graft-versus-host-taudeista, autoimmuunitaudeista, infektiotaudeista ja vastaavista. Nämä yhdisteet voidaan esittää seuraavalla kaavalla

Keksinnön kohteena on myös näiden yhdisteiden valmistaminen, näitä sisältävä farmaseuttinen seos ja näiden käyttö.

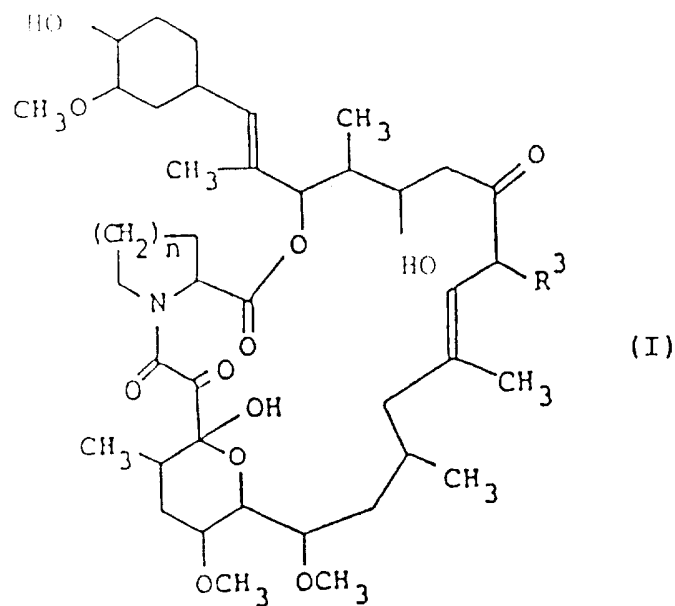


Uppfinningen avser tricykloföreningar nyttiga för behandling och förebyggande av motreaktion vid transplantation, graft-versus-host-sjukdomar vid medulla ossium-transplantation, autoimmunsjukdomar, infektionssjukdomar och liknande. Dessa föreningar kan representeras med formeln (I); föremålet för uppfinningen är även framställning av dessa, en farmaceutisk blandning av dessa och användning därav.



Menetelmä valmistaa farmakologisesti arvokkaita trisyklisiä yhdisteitä - Förfarande för framställning av farmakologiskt värdefulla tricykliska föreningar

Tämän keksinnön kohteena on menetelmä valmistaa farmakologisesti arvokkaita trisyklisiä yhdisteitä, joiden kaava on



jossa

R^3 on allyyli, kun $n = 1$ ja

R^3 on metyyli tai allyyli, kun $n = 2$.

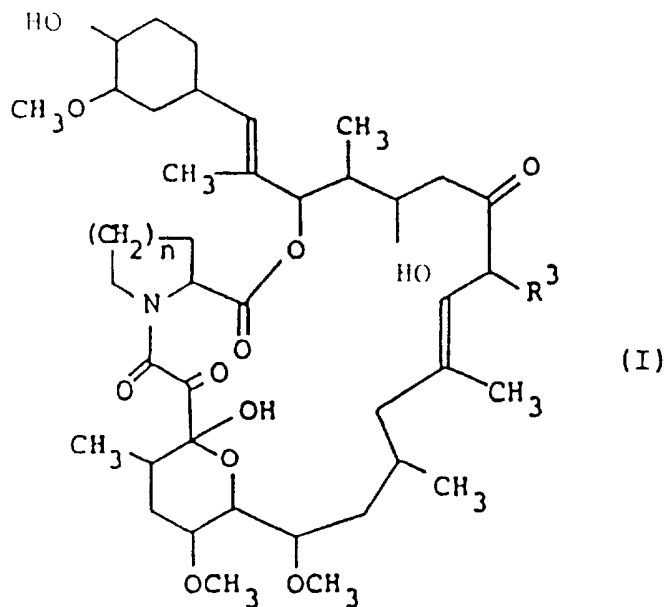
Keksinnön mukaan saaduilla trisykloyhdisteillä on farmakologisia aktiivisuuksia kuten immunosuppressiivinen aktiivisuus, antimikrobiaalinen aktiivisuus ja vastaavia, näiden valmistusmenetelmä, näitä sisältävä farmaseuttinen seos ja näiden käyttö.

Käsillä olevasta keksinnöstä huomattakoon, että tämä keksintö saa alkunsa ja perustuu eräiden uusien spesifisten yhdistei-

den, so. FR-900506, FR-900523 ja FR-900525 -aineiden ensimmäiseen ja uuteen löytämiseen. Tarkemmin sanoen FR-900506, FR-900523 ja FR-900525 -aineet eristettiin ensimmäisen kerran puhtaassa muodossa kasvatusliuoksista, jotka saatiin fermentoimalla uusia streptomyces-sukuun kuuluvia lajeja.

FR-900506, FR-900523 ja FR-900525 -aineiden kemiallisia rakenteita koskevien laajojen selvitystutkimusten seurauksena tämän keksinnön keksijät ovat onnistuneet määrittämään näiden yhdisteiden kemialliset rakenteet ja valmistamaan tämän keksinnön mukaisia trisykloyhdisteitä.

Tämän keksinnön mukaiset uudet trisykloyhdisteet voidaan esittää seuraavalla yleiskaavalla (I)



jossa

R^1 on hydroksi tai suojattu hydroksi,

R^2 on vety, hydroksi tai suojattu hydroksi,

R^3 on metyyli, etyyli, propyyli tai allyyli,

n on kokonaisluku 1 tai 2, ja

viiva- ja katkoviivasymboli on yksinkertainen sidos tai kaksoissidos,

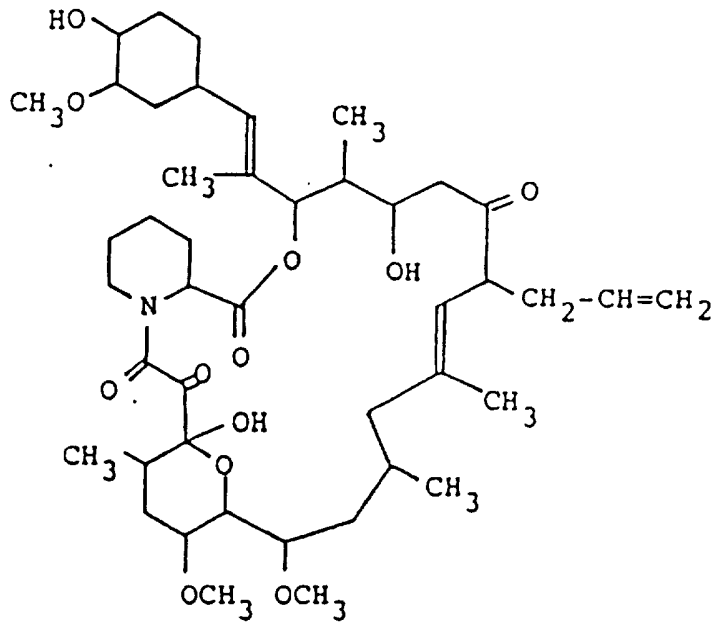
ja niiden suolat.

Kohdeyhdisteistä (I) havaittiin seuraavien yhdisteiden muodostuvan fermentaation avulla.

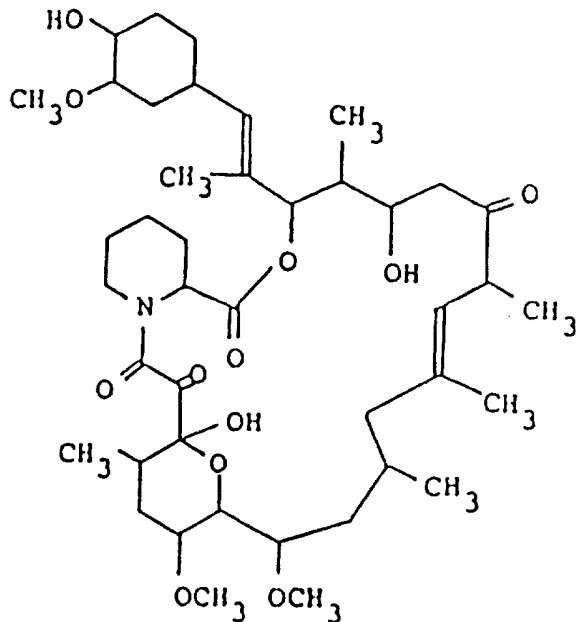
- (1) Yhdiste (I), R^3 on allyyli ja n on kokonaisluku 2; tälle yhdisteelle on annettu nimeksi FR-900506;
- (2) Yhdiste (I), R^3 on metyyli ja n on kokonaisluku 2; tälle yhdisteelle on annettu nimeksi FR-900523 (toinen nimi: WS 723B); ja
- (3) Yhdiste (I), R^3 on allyyli ja n on kokonaisluku 1; tälle yhdisteelle on annettu nimeksi FR-900525.

Tämän keksinnön mukaisesta trisykloyhdisteestä (I) huomattakoon, että ne voivat esiintyä yhtenä tai useampana konformeerina tai stereoisomeerisena parina kuten optisina ja geometrisina isomeereina johtuen asymmetrisestä hiiliatomista (atomeista) ja kaksoissidoksesta (sidoksista). Myös tällaiset isomeerit sisältyvät tämän keksinnön piiriin.

Tämän keksinnön mukaisesti kohteena olevat trisykloyhdisteet (I) voidaan valmistaa siten, että viljellään mikro-organismia Streptomyces tsukubaensis (FERM BP-927) tai Streptomyces hygroscopicus subsp. yakushimaensis (FERM BP-928) ravintoalustassa ja otetaan talteen yhdiste FR-900506, jonka kaava on

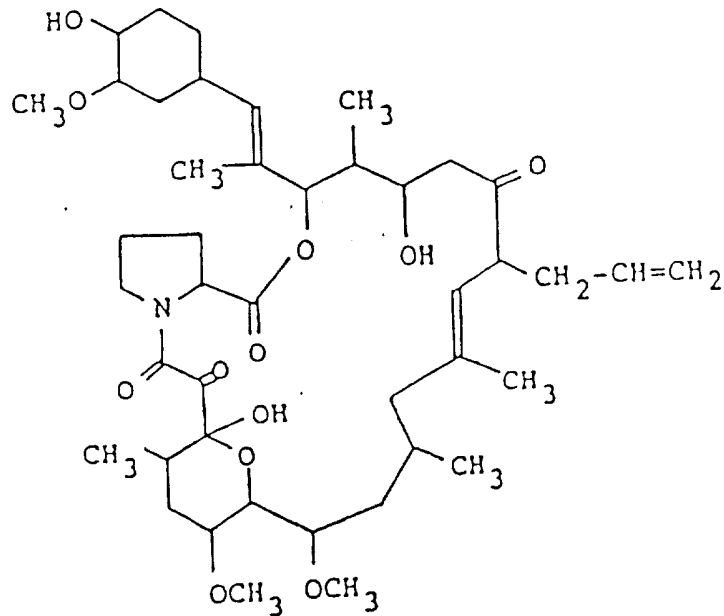


ja/tai yhdiste FR-900523, jonka kaava on



ja/tai yhdiste FR 900525, jonka kaava on





Seuraavassa on yksityiskohtaisesti esitetty tämän keksinnön mukaisten trisyklohydisteiden (I) valmistusmenetelmiä.

(I) Fermentaatioprosessit:

Tämän keksinnön mukaiset aineet FR-900506, FR-900523 ja FR-900525 voidaan siis valmistaa fermentoimalla ravintoalustassa yhdisteitä FR-900506, FR-900523 ja/tai FR-900525 tuottavia kantoja, jotka kuuluvat streptomyces-sukuun kuten Streptomyces tsukubaensis no. 9993 ja Streptomyces hygrosopicus subsp. yakushimaensis no. 7238 - kantaja.

Seuraavassa on esitetty yksityiskohtia mikro-organismeista, joita käytetään aineiden FR-900506, FR-900523 ja FR-900525 tuottamiseen.

[A] Tämän keksinnön mukaiset aineet FR-900506, FR-900523 ja FR-900525 voidaan valmistaa fermentoimalla ravintoalustassa

aineita FR-900506 ja/tai FR-900525 tuottavaa kantaa joka kuuluu streptomyces-sukuun kuten Streptomyces tsukubaensis no. 9993 kantaa.

MIKRO-ORGANISMI

Mikro-organismi, jota voidaan käyttää aineiden FR-900506 ja/tai FR-900525 tuottamiseen, on streptomyces-sukuun kuuluva, ainetta (aineita) FR-900506 ja/tai FR-900525 tuottava kanta. Näistä Streptomyces tsukubaensis no. 9993 kanta on äskettäin eristetty Japanissa, Toyosato-cho, Tsukuba-gun, Ibaraki Prefecture, kerätystä maanäytteestä. Tämän eristetyn Streptomyces tsukubaensis no. 9993 kannan lyofilisoitu näyte on talletettu Fermentation Research Institute -laitokseen, Agency of Industrial Science and Technology (No. 1-3, Higashi 1-chome, Yatabemachi Tsukuba-gun, Ibaraki Prefecture, Japan) talletusnumerolla FERM-P-7886 (talletuspäivä: 5.10.1984) ja sen jälkeen siirretty Budapestin sopimuksen mukaisesti samaan talletuslaitokseen 19.10.1985 uudella talletusnumerolla FERM BP-927.

Huomattakoon, että uuden yhdisteen (yhdisteiden) FR-900506 ja/tai FR-900525 tuotto ei ole rajoitettu nimenomaan tässä yhteydessä kuvatun organismin käyttöön, vaan tämän organismin käyttö on annettu ainoastaan havainnollisuuden vuoksi. Tämä keksintö sisältää myös minkä tahansa mutantin, joka kykenee tuottamaan aineita FR-900506 ja/tai FR-900525 käytön, mukaan lukien luonnon mutantit sekä keinotekoiset mutantit, jotka voidaan valmistaa kuvatusta organismista tavanomaisin keinoin kuten säteilyttämällä röntgensäteillä, ultraviolettisäteilytyksellä, käsittelemällä N-metyyli-N'-nitro-N-nitrosoguanidilla, 2-aminopuriinilla ja vastaavilla.

Streptomyces tsukubaensis no. 9993 kannalla on seuraavat morfologiset, biologiset, fysiologiset ominaisuudet ja viljelyominaisuudet.

(1) Morfologiset ominaisuudet:

Tässä taksonomisessa tutkimuksessa käytettiin pääasiallisesti Shirlingin ja Gottlieb'in kuvaamia menetelmiä (Shirling, E.B. ja D. Gottlieb: Methods for characterization of Streptomyces species. International Journal of Systematic Bacteriology, 16, 313 - 340, 1966).

Morfologiset havainnot tehtiin valo- ja elektronimikroskoopeilla viljelmillä, joita oli kasvatettu 30°C:ssa 14 päivää ohrajauhoagarilla, hiivamallasuuteagarilla ja epäorgaaniset suolat - tärkkelysagarilla. Kypsät sporoforit muodostivat Rectiflexibiles-rakenteita, jolloin jokaisessa ketjussa oli 10 - 50 tai yli 50 itiötä. Elektronimikroskoopilla havainnoitaessa itiöt olivat pitkänomaisia tai sylinterimäisiä ja kooltaan 0,5 - 0,7 x 0,7 - 0,8 µm. Itiöiden pinnat olivat sileitä.

(2) Viljelyominaisuudet:

Viljelyominaisuudet tutkittiin Shirlingin ja Gottlieb'in edellä kuvaamalla ja Waksmanin kuvaamalla kymmenellä eri alustalla (Waksman, S.A.: The actinomycetes, vol. 2: Classification, identification and description of genera and species. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1961).

Inkubointi suoritettiin 14 päivän aikana 30°C:ssa. Tässä tutkimuksessa käytetyt värien nimet perustuivat Guide to Color-standardiin (käsikirjan julkaisija Nippon Shikisai Kenkyusho, Tokio). Pesäkkeet kuuluivat harmaaseen värisarjaan kasvatettaessa ohrajauhoagarilla, hiivamallasuuteagarilla ja epäorgaaniset suola - tärkkelysagarilla. Liukoista pigmenttiä muodostui hiivamallasuuteagarilla mutta ei muilla alustoilla. Tulokset on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1

Kannan no. 9993 ja *Streptomyces misakiensis* IFO 12891 kannan viljelyominaisuudet.

| Alusta | Viljelyominaisuudet | | |
|--|---------------------|----------------------------------|------------------------------|
| | | no. 9993 | IFO 12891 |
| ohrajauhoagar | G | kohtalainen | kohtalainen |
| | A | harmaa | harmahtavan valkoinen |
| | R | vaalean punertava | väritön |
| | S | ei | ei |
| hiiva-mallas- uuteagar | G | kohtalainen | kohtalainen |
| | A | vaalean harmaa | harmaan valkoinen |
| | R | himmeä punertava oranssi | vaalean ruskea |
| | S | himmeä punertava oranssi | ei |
| epäorgaaniset suolat - tärkke- lysagar | G | kohtalainen | kohtalainen |
| | A | vaalea keltaisen oranssi | harmahtavan valkoinen |
| | R | vaalea harmaa tumma oranssi | vaalea kellertävän ruskea |
| | S | ei | ei |
| Glukoosiaspara- giiniagar | G | heikko | kohtalainen |
| | A | valkoinen | harmahtavan valkoinen |
| | R | vaalean ruskea | vaalea kellertävän ruskea |
| | S | ei | vaalean ruskea |
| Glyseriini-aspa- ragiiniagar | G | kohtalainen | kohtalainen |
| | A | vaalean punerta- va-valkoinen | harmahtavan valkoinen |
| | R | vaalean punertava | vaalea kellertävän ruskea |
| | S | ei | vaalean ruskea |

| Alusta | no. 9993 | IFO 12891 | |
|-----------------------------|----------|--------------------------|---|
| Czapekagar | G | heikko | runsas |
| | A | ei | harmahtavan valkoinen |
| | R | vaalean punertava | tumma oranssi - tumma ruskea |
| | S | ei | ei |
| Ravintoagar | G | heikko | heikko |
| | A | valkoinen, heikko | valkoinen |
| | R | väritön | väritön |
| | S | ei | ei |
| perunadekstroosiagar | G | heikko | kohtalainen |
| | A | ei | kellertävän harmaa |
| | R | vaalean punainen | ruskea |
| | S | ei | ei |
| tyrosiiniagar | G | kohtalainen | kohtalainen |
| | A | valkoinen | harmahtavan valkoinen |
| | R | himmeä punertava oranssi | - vaalean harmaa tumma oranssi - musta |
| | S | ei | ei |
| peptonihiiva-uuterauta-agar | G | heikko | heikko |
| | A | ei | ei |
| | R | väritön | väritön |
| | S | ei | ei |

Lyhennykset:

G = kasvu,
 A = ilmassa väri
 R = väri kääntöpuolella
 S = liukoinen pigmentti

Soluseinämän analyysi suoritettiin Becker et al. (Becker, B., M.P. Lechevalier, R.E. Gordon ja H.A. Lechevalier: Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole cell hydrolysates: Appl. Microbiol., 12, 421 - 423, 1964) ja Yamagutsin (Yamaguchi, T.: Comparison of the cell wall composition of morphologically distinct actinomycetes: J. Bacteriol., 89, 444-453, 1965) menetelmillä.

Kannan no. 9993 koko seinämän hydrolysaatin analyysi osoitti, että mukana oli LL-diaminopimeliinihappoa. Tämän kannan soluseinämän uskotaan siten olevan tyyppiä I.

(3) Biologiset ja fysiologiset ominaisuudet:

Kannan no. 9993 fysiologiset ominaisuudet määritettiin Shir-ling ja Gottliebin kuvaamalla edellä mainituilla menetelmillä. Tulokset on esitetty taulukossa 2. Kasvun lämpötila-alue ja optimaalinen lämpötila määritettiin hiiva-mallasuuteagarilla käyttämällä lämpötilagradientilla varustettua inkubaattoria (valmistaja Toyo Kagaku Sangyo Co., Ltd.). Kasvun lämpötila-alue oli 18 - 35°C ja optimaalinen lämpötila 28°C. Maidon peptonisoituminen ja gelatiinin nesteytyminen olivat positiivisia. Melanoidipigmentin tuotto oli negatiivinen.

Taulukko 2

Kannan no. 9993 ja *Streptomyces misakiensis* IFO 12891 fysiologiset ominaisuudet.

| Fysiologiset ominaisuudet | no. 9993 | IFO 12891 |
|---------------------------|--------------|-----------------------|
| Kasvun lämpötila-alue | 18 - 35°C | 12 - 35°C |
| Optimilämpötila | 28°C | 28°C |
| Nitraatin pelkistäminen | negatiivinen | negatiivinen |
| Tärkkelyksen hydrolyysi | negatiivinen | positiivinen |
| Maidon koagulointi | negatiivinen | negatiivinen |
| Maidon peptonisointi | positiivinen | heikosti positiivinen |
| Melaniinin tuotto | negatiivinen | negatiivinen |
| Gelatiinin nesteytyminen | positiivinen | negatiivinen |
| H ₂ S:n tuotto | negatiivinen | negatiivinen |
| NaCl:n sietokyky (%) | ≤ 3 % | 3 % <, < 5 % |

Hiililähteen käyttö tutkittiin Pridhamin ja Gottliebin menetelmillä (Pridham, T.G. ja D. Gottlieb: The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination: J. Bacteriol., 56, 107-114, 1947). 14 päivän 30°C:ssa tapahtuneen inkuboinnin jälkeen kasvu havainnoitiin.

Yhteenvedo tämän kannan hiililähteiden käytöstä on esitetty taulukossa 3. Kanta no. 9993 kykeni käyttämään glyseriiniä, malto-osia ja natriumsukkinaattia. Lisäksi havaittiin epävarma D-glukoosin, sakkaroosin, D-mannoosin ja salisiinin käyttö.

Taulukko 3

Kannan no. 9993 ja *Streptomyces misakiensis* IFO 12891 hiililähteiden käyttö.

| <u>Hiililähteet</u> | <u>no. 9993</u> | <u>IFO 12891</u> |
|---------------------|-----------------|------------------|
| D-glukoosi | ± | - |
| Sakkaroosi | ± | - |
| Glyseriini | + | - |
| D-ksyloosi | - | - |
| D-fruktoosi | - | - |
| Laktoosi | - | - |
| Maltoosi | + | - |
| Ramnoosi | - | - |
| Raffinoosi | - | - |
| D-Galaktoosi | - | - |
| L-arabinoosi | - | - |
| D-mannoosi | ± | - |
| D-trehaloosi | - | - |
| Inositoli | - | - |
| D-mannitoli | - | - |
| Inuliini | - | + |
| Selluloosa | - | - |
| Salisiini | ± | - |
| Kitiini | - | - |
| Natriumsitraatti | - | - |
| Natriumsukkinaatti | + | - |
| Natriumasetaatti | - | - |

Symbolit: + : käyttää ± : käyttää mahdollisesti - : ei käytä

Kannan no. 9993 mikroskooppiset tutkimukset ja soluseinämän koostumuksen analyysi osoittavat, että tämä kanta kuuluu sukuun *Streptomyces* Waksman ja Henrici 1943.

Tätä kantaa verrattiin sen vuoksi eri streptomyces-lajeihin julkaistujen kuvausten valossa. [International Journal of Systematic Bacteriology, 18, 69 - 189, 279 - 392 (1968) ja 19, 391 - 512 (1969), ja Bergy's Manual of Determinative Bacteriology 8th Edition (1974)].

Vertailun tuloksena katsotaan kannan no. 9993 muistuttavan *Streptomyces aburaviensis* Nishimura et. al., *Streptomyces avellaneus* Baldacci ja Grein ja *Streptomyces misakiensis* Nakamura -kantaja. Sen vuoksi verrattiin kannan no. 9993 viljelyominaisuuksia vastaaviin *Streptomyces aburaviensis* IFO 12830, *Streptomyces avellaneus* IFO 13451 ja *Streptomyces misakiensis* IFO 12891 -kantoihin. Tämän seurauksena kanta no. 9993 muistutti eniten *Streptomyces misakiensis* IFO 12891 kantaa. Sen vuoksi kantaa no. 9993 verrattiin edelleen *Streptomyces misakiensis* IFO 12891 kantaan, kuten on esitetty edellä taulukoissa 1, 2 ja 3. Jatkovertailujen perusteella kanta no. 9993 voitiin erottaa *Streptomyces misakiensis* IFO 12891 kannasta jäljempänä esitetyissä kohdissa. Sen vuoksi kantaa no. 9993 pidetään uutena streptomyces-lajina ja sille on annettu nimeksi *Streptomyces tsukubaensis* sp. nov., joka viittaa Tsukuba-gun seudulta kerättyyn maahan, josta organismi eristettiin.

....: Erot *Streptomyces misakiensis* IFO 12891 kannasta

Kannan no. 9993 viljelyominaisuudet ovat erilaiset *Streptomyces misakiensis* IFO 12891 kantaan verrattuna ohrajauhoagarilla, hiiva-mallasuuteagarilla, glukoosi-asparatiiniagarilla, ctsapek-agarilla ja peruna-dekstroosiagarilla.

Kannan no. 9993 tärkkelyshydrolyysi on negatiivinen, mutta *Streptomyces misakiensis* IFO 12891 kannalla tämä on positiivinen.

Kannan no. 9993 gelatiinin nesteyttäminen on positiivinen, mutta *Streptomyces misakiensis* IFO 12891 kannalla tämän on negatiivinen.

Kanta no. 9993 on hiililähteistä käyttää glyseriiniä, maltoosia ja natriumsukkinaattia, kun taas *Streptomyces misakiensis* IFO 12891 ei voi niitä käyttää. Kanta no. 9993 ei voi taas käyttää D-galaktoosia ja inuliinia, kun taas *Streptomyces misakiensis* IFO 12891 voi niitä käyttää.

AINEIDEN FR-900506, JA FR-900525 TUOTTAMINEN

Uudet tämän keksinnön mukaiset aineet FR-900506 ja FR-900525 voidaan tuottaa viljelemällä ravintoalustassa ainetta (aineita) FR-900506 ja/tai FR-900525 tuottavaa kantaa, joka kuuluu streptomyces-sukuun (esim. *Streptomyces tsukubaensis* no. 9993, FERM BP-927).

Yleisesti sanoen voidaan ainetta (aineita) FR-900506 ja/tai FR-900525 tuottaa viljelemällä ainetta (aineita) FR-900506 ja/tai FR-900525 tuottavaa kantaa vesipitoisessa ravintoalustassa, joka sisältää assimiloituvia hiili- ja typpilähteitä, parhaiten aerobisissa olosuhteissa (esim. ravisteluviljely, pinnanalaisviljely jne.).

Parhaana pidetyt hiililähteet ravintoalustassa ovat hiilihydraatteja kuten glukoosi, ksyloosi, galaktoosi, glyseriini, tärkkelys, dekstriini ja vastaavat. Muita lähteitä, joita voidaan käyttää, ovat maltoosi, ramnoosi, raffinoosi, arabiinööri, mannoosi, salisiini, natriumsukkinaatti ja vastaavat.

Parhaana pidettyjä typpilähteitä ovat hiivauute, peptoni, gluteenijauho, pellavansiemenjauho, soiapavunjauho, maissin liotusvesi, kuivahiiva, vehnänalkio, höyhenjauho, maapähkinäjauho jne., sekä epäorgaaniset ja orgaaniset typpiyhdisteet kuten ammoniumsuolat, (esim. ammoniumnitraatti, ammoniumsulfatti, ammoniumfosfaatti jne.), urea aminohappo ja vastaavat.

Hiili- ja typpilähteitä, joita tosin käytetään edullisesti yhdistelmänä, ei tarvitse käyttää puhtaissa muodoissaan, koska käyttöön sopivat myös vähemmän puhtaat materiaalit, jotka sisältävät hivenmäärinä kasvutekijöitä ja huomattavia määriä mineraaliravinteita. Haluttaessa alustaan voidaan lisätä mineraalisuoloja kuten natrium- tai kalsiumkarbonaattia, natrium- tai kaliumfosfaatti, natrium- tai kaliumkloridia, natrium- tai kaliumjodidia, magnesiumsuoloja, kuparisuoloja, kobolttisuolaa ja vastaavia. Tarvittaessa, erityisesti kun viljelyalusta vaahtoa voimakkaasti, voidaan lisätä vaahtonestoainetta kuten nestemäistä parafiinia, rasvaöljyä, kasviöljyä, mineraaliöljyä tai silikonia.

Jos aineita FR-900506 ja FR-900525 tuottaa suuria määriä, pidetään parhaana pinnanalaisia aerobisia viljelyolosuhteita. Pienten määrien tuottamista varten käytetään ravistelu- tai pintaviljelmää pullossa. Jos kasvu tapahtuu suurissa tankeissa, on suositeltavaa käyttää organismin vegetatiivista muotoa siirrostamiseen tuotantotankeissa, että vältettäisiin kasvun lag-vaihe aineiden FR-900506 ja FR-900525 tuottoa. Siten on toivottavaa tuottaa ensin organismin vegetatiivinen siirrostete siirrostamalla suhteellisen pieni määrä viljelyalustaa organismin itiöille tai rihmastolla ja viljelemällä mainittua siirrostettua alustaa, minkä jälkeen vegetatiivinen siirrostete siirretään aseptisesti suuriin tankkeihin. Alusta, jossa vegetatiivinen siirrostete tuotetaan, on oleellisesti sama tai erilainen kuin alusta, jota käytetään aineiden FR-900506 ja FR-900525 tuottoon.

Viljelyseoksen sekoittaminen ja ilmastus voidaan suorittaa monilla eri tavoilla. Sekoitus voidaan saada aikaan potkurilla tai samantapaisella mekaanisella sekoituslaitteistolla, pyörittämällä tai ravistelemalla fermentoria, erilaisten pumppulaitteistojen avulla tai johtamalla steriiliä ilmaa alustan läpi. Ilmastus voidaan suorittaa johtamalla steriiliä ilmaa fermentaatioseoksen läpi.

(3) Värireaktio:

Positiivinen: seriumsulfaattireaktio, rikkihapporeaktio, Ehrlichin reaktio, Dragendorffin reaktio ja jodihöyry-reaktio

Negatiivinen: ferrikloridireaktio, ninhydiiriinireaktio ja Molishin reaktio

(4) Liukoisuus:

Liukenee: metanoli, etanoli, asetoni, etyyliasetaat-
ti, kloroformi, dietyylieetteri ja bent-
seeni

Liukenee niukasti: heksaani, petrolieetteri

Ei liukene: vesi

(5) Sulamispiste: 85 - 90°C(6) Ominaiskiertokyky: $[\alpha]_D^{23}$: -73° (c = 0,8 CHCl₃)(7) UV-absorptiospektri: loppuabsorptio(8) IR-absorptiospektri:

νCHCl₃: 3680, 3580, 3520, 2930, 2870, 2830,
max 1745, 1720, 1700, 1645, 1450, 1380,
1350, 1330, 1310, 1285, 1170, 1135,
1090, 1050, 1030, 1000, 990, 960(sh),
918 cm⁻¹

(9) ¹³C NMR-spektri:

δ(ppm, CDCl₃):

| | | |
|---------------|---------------|---------------|
| { 212,59 (s) | { 196,18 (s) | { 169,07 (s) |
| { 212,45 (s), | { 192,87 (s), | { 168,90 (s), |
| { 164,90 (s) | { 138,89 (s) | { 135,73 (d) |
| { 166,01 (s), | { 139,67 (s), | { 135,60 (d), |
| { 132,52 (s) | { 130,27 (d) | { 122,87 (d) |
| { 131,99 (s), | { 130,21 (d), | { 123,01 (d), |
| { 116,57 (t) | { 97,35 (s) | 84,42 (d), |
| { 116,56 (t) | { 98,76 (s), | |
| { 77,79 (d) | { 75,54 (d) | { 73,93 (d) |
| { 78,22 (d), | { 76,97 (d), | { 73,09 (d), |

| | | |
|--------------|--------------|--------------|
| { 73,72 (d) | { 70,05 (d) | 56,75 (d), |
| { 75,57 (d), | { 69,15 (d), | |
| { 53,03 (d) | { 48,85 (t) | { 40,33 (d) |
| { 53,13 (d), | { 48,62 (t), | { 40,84 (d) |
| 39,40 (t) | | |
| 31,58 (t), | 30,79 (t), | { 27,72 (t) |
| | | { 26,34 (t), |
| 26,46 (d), | 24,65 (t), | { 20,45 (q) |
| | | { 19,73 (q), |
| { 14,06 (q) | { 9,69 (q) | |
| { 14,23 (q), | { 9,98 (q), | |

spektri on esitetty taulukossa 1.

(10) ^1H NMR-spektri: spektri on esitetty taulukossa 2.

(11) Ohutkerroskromatografia:

| <u>Stationäärifaasi</u> | <u>Kehitysliuotin</u> | <u>Rf-arvot</u> |
|-------------------------|--------------------------------------|-----------------|
| silikageelilevy | kloroformi : metanoli (10:1, v/v) | 0,58 |
| | etyyliasettaatti | 0,52 |

(12) Aineen ominaisuus: neutraali aine.

Aineen FR-900506 suhteen on huomattava, että ^{13}C - ja ^1H -NMR-spektrien mittauksissa tällä yhdistellä oli signaalipareja eri kemiallisilla siirtymillä.

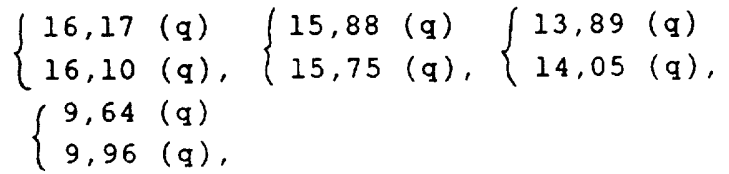
Näin karakterisoidulla FR-900506 yhdisteellä on edelleen seuraavat ominaisuudet.

(i) ^{12}C NMR-spektrien mittaukset 25°C ja 60°C :ssa osoittivat että eri signaalien kunkin parin intensiteetit olivat muuttuneet.

- (ii) Ohutlevykromatografia- ja suuren suorituskyvyn nestekromatografia- mittaukset osoittivat, että FR-900506 esiintyy yhtenä ainoana täplänä ohutlevykromatografiassa ja yhtenä ainoana piikkinä suuren suorituskyvyn nestekromatografiassa.

Tämä valkoinen FR-900506 aine voitiin muuntaa kiteiseen muotoon kiteyttämällä uudelleen asetonitriilistä. Sillä on seuraavat fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet.

- (1) Muoto ja väri: värittömiä prismoja
- (2) Alkuaineanalyysi: C: 64,30 %, H: 8,92 %, N: 1,77 %
64,20 %, 8,86 %, 1,72 %
- (3) Sulamispiste: 127 - 129°C
- (4) Ominaiskiertokyky: $[\alpha]_D^{23}$: -84,4° (c = 1,02 CHCl₃)
- (5) ¹³C NMR-spektti:
δ(ppm, CDCl₃):
- | | | |
|---------------|---------------|---------------|
| { 211,98 (s) | { 196,28 (s) | { 168,97 (s) |
| { 211,74 (s), | { 193,56 (s), | { 168,81 (s), |
| { 164,85 (s) | { 138,76 (s) | { 135,73 (d) |
| { 165,97 (s), | { 139,51 (s), | { 135,63 (d), |
| { 132,38 (s) | { 130,39 (d) | { 122,82 (d) |
| { 131,90 (s), | { 130,17 (d), | { 122,96 (d), |
| 116,43 (t) | { 97,19 (s) | 84,29 (d), |
| | { 98,63 (s), | |
| { 77,84 (d) | { 77,52 (d) | { 69,89 (d) |
| { 78,21 (d), | { 76,97 (d), | { 69,00 (d), |
| { 56,63 (d) | { 52,97 (d) | { 48,76 (t) |
| { 54,87 (d), | { 52,82 (d), | { 48,31 (t), |
| { 40,21 (d) | 31,62 (t), | 30,72 (t), |
| { 40,54 (d), | | |
| 24,56 (t), | { 21,12 (t) | { 20,33 (q) |
| | { 20,86 (t), | { 19,74 (q), |

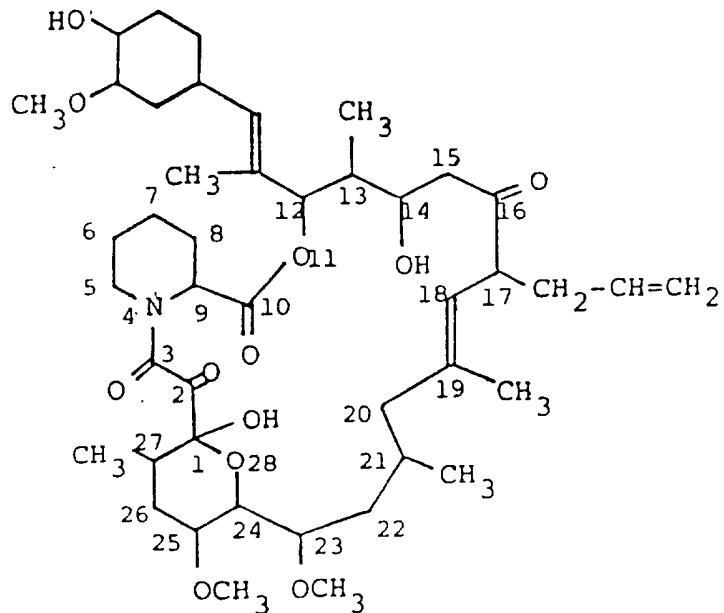


spektri on esitetty kuviossa 3.

(6) ^1H NMR-spektri: Spektri on esitetty kuviossa 4.

Muut fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet, so. värittömien FR-900506 prismojen värireaktio, liukoisuus, ultraviolettiabsorptiospektri, infrapuna-absorptiospektri, ohutlevykromatografia ja paino-ominaisuudet olivat samat kuin saman aineen valkoisella jauheella identtisissä olosuhteissa.

Edellä olevista fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista ja röntgendifraktioanalyysistä voitiin päätellä FR-900506 yhdisteellä olevan seuraava kemiallinen rakenne



17-Allyyli-1,14-dihydroksi-12-[1-(4-hydroksi-3-metoksisykloheksyyli)-1-metyylivinyyli]-23,25-dimetoksi-13,19,21,27-tetrametyyli-11,28-dioksi-4-atsatrisyklo[22.3.1.0^{4,9}]oktakos-18-eeeni-2,3,10,16-tetraoni.

FR-900525

- (1) Muoto ja väri: valkoinen jauhe
- (2) Alkuaineanalyysi: C: 65,17 %, H: 8,53 %, N: 1,76 %
- (3) Värireaktio:
Positiivinen: seriumsulfaattireaktio, rikkihapporeaktio, Ehrlichin reaktio, Dragendorffin reaktio ja jodihöyry-reaktio
Negatiivinen: ferrikloridireaktio, ninhydriinireaktio ja Molishin reaktio
- (4) Liukoisuus:
Liukenee: metanoli, etanoli, asetoni, etyyliasetaatti, kloroformi, dietyylieetteri ja bentseeni
Liukenee niukasti: heksaani, petrolieetteri
Ei liukene: vesi
- (5) Sulamispiste: 85 - 89°C
- (6) Ominaiskiertokyky: $[\alpha]_D^{23}$: -88° (c = 1,0 CHCl₃)
- (7) UV-absorptiospektri: loppuabsorptio
- (8) IR-absorptiospektri:
νCHCl₃: 3680, 3580, 3475, 3340, 2940, 2880,
max 2830, 1755, 1705, 1635, 1455, 1382,
1370, 1330, 1310, 1273, 1170, 1135,
1093, 1050, 1020, 995, 970, 920,
876 cm⁻¹

(9) ^{13}C NMR-spektri:(ppm, CDCl_3):

| | | |
|---------------|---------------|---------------|
| { 212,61 (s) | { 188,57 (s) | { 168,76 (s) |
| { 211,87 (s), | { 191,12 (s), | { 170,18 (s), |
| { 163,11 (s) | { 140,28 (s) | { 135,63 (d) |
| { 161,39 (s), | { 139,37 (s), | { 135,70 (d), |
| { 132,28 (s) | { 130,09 (d) | { 122,50 (d) |
| { 131,34 (s), | { 130,00 (d), | { 123,23 (d), |
| 116,48 (t) | { 99,16 (s) | { 84,42 (d), |
| | { 99,11 (s) | { 84,48 (d), |
| { 78,60 (d) | { 76,73 (d) | { 59,97 (d) |
| { 79,86 (d), | { 77,33 (d), | { 60,45 (d), |
| 57,52 (q) | { 56,56 (q) | { 56,14 (q), |
| | { 56,48 (q), | { 55,97 (q), |
| { 53,45 (d) | { 49,15 (t) | { 48,46 (t) |
| { 53,26 (d), | { 49,73 (t), | { 47,62 (t), |
| { 44,47 (t) | { 41,40 (d) | { 35,19 (d) |
| { 45,23 (t), | { 40,40 (d), | { 35,11 (d), |
| { 33,10 (d) | { 32,81 (t) | { 31,53 (t) |
| { 34,17 (d), | { 32,29 (t), | { 31,33 (t), |
| { 30,80 (t) | 28,60 (t), | { 26,03 (d) |
| { 30,66 (t), | | { 26,98 (d), |
| { 25,43 (t) | { 18,93 (q) | { 14,09 (q) |
| { 24,40 (t) | { 20,57 (q), | { 13,95 (q), |
| { 9,85 (q) | | |
| { 10,00 (q) | | |

spektri on esitetty taulukossa 5.

(10) ^1H NMR-spektri: spektri on esitetty taulukossa 6.

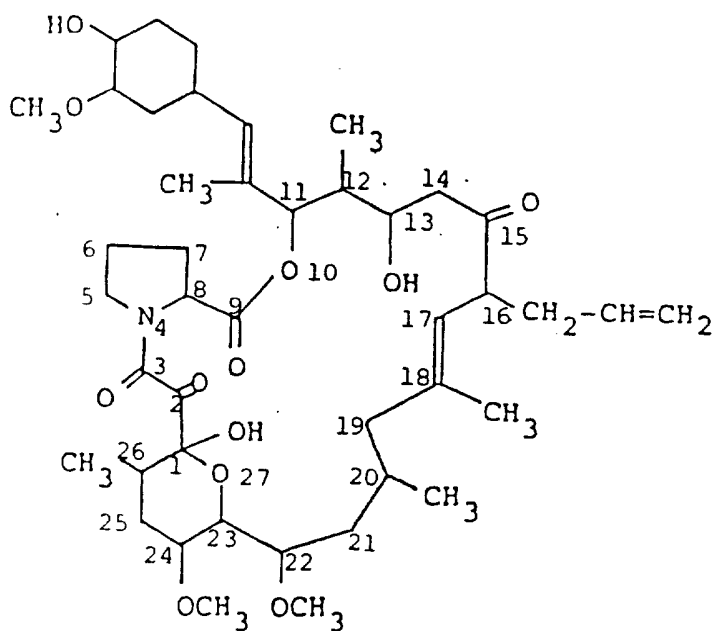
(11) Ohutkerroskromatografia:

| <u>Stationäärifaasi</u> | <u>Kehitysliuotin</u> | <u>Rf-arvo</u> |
|-------------------------|-----------------------|----------------|
| silikageelifevy | etyyliasetatti | 0,34 |

(12) Aineen ominaisuus: neutraali aine.

FR-900525 yhdisteestä on huomattava, että ^{13}C ja ^1H NMR-spektrien mittauksissa tällä yhdistellä esiintyi signaalipareja eri kemiallisilla siirtymillä. Kuitenkin ohutlevykromatografia- ja suuren suorituskyvyn nestekromatografia-mittauksissa FR-900525 yhdisteellä oli yksi ainoa täplä ohutlevykromatografiassa ja yksi ainoa piikki suuren suorituskyvyn nestekromatografiassa.

Esillä olevista fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista ja FR-900506 yhdisteen kemiallisen rakenteen onnistuneen määrittämisen perusteella voitiin FR-900525 yhdisteellä päätellä olevan seuraava kemiallinen rakenne.



16-Allyyli-1,13-dihydroksi-11-[2-(4-hydroksi-3-metoksisykloheksyyli)-1-metyylivinyyli]-22,24-dimetoksi-12,18,20,26-tetrametyyli-10,27-dioksi-4-atsatrisyklo[21.3.1.0^{4,8}]oktakos-18-eeni-2,3,9,15-tetraoni.

[B] Tämän keksinnön mukainen FR-900523 voidaan valmistaa fermentoimalla yhdistettä FR-900523 tuottavaa, streptomyces-sukuun kuuluvaa kantaa kuten *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *yakushimaensis* no. 7238 ravintoalustaa.

MIKRO-ORGANISMI

Mikro-organismi, jota voidaan käyttää FR-900523 yhdisteen tuottamiseen on FR-900523 yhdistettä tuottava kanta, joka kuuluu streptomyces-sukuun. Näistä *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *yakushimaensis* no. 7238 on äskettäin eristetty maanäytteestä, jonka keräämiskohta oli Yakushima, Kagoshima Prefecture, Japani.

Juuri eristetyn *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *yakushimaensis* no. 7238 kannan lyofilisoitu näyte on talletettu Fermentation Research Institute laitokseen, Agency of Industrial Science and Technology (No. 1-3, Higashi 1-chome, Yatabemachi, Tsukuba-gun, Ibaraki Prefecture, Japani) numerolla FERM p-8043 (talletuspäivä: 12.1.1985) ja sen jälkeen muutettu samassa talletuslaitoksessa Budapestin sopimuksen alaiseksi 19.10.1985 uudella talletusnumerolla FERM BP-928.

Huomattakoon, että uuden FR-900523 yhdisteen tuottaminen ei rajoitu nimenomaan tässä yhteydessä kuvatun organismin käyttämiseen, joka on annettu ainoastaan havainnollisuuden vuoksi. Tämä keksintö käsittää siten myös kaikkien mahdollisten mutanttien käytön, jotka kykenevät tuottamaan FR-900523 ainetta, mukaan lukien luonnonmutantit sekä keinotekoiset mutantit, jotka voidaan valmistaa kuvatusta organismista tavanomaisin keinoin kuten säteilyttämällä röntgensäteillä, ultraviolettisäteilyttämällä, käsittelemällä M-metyyli-N'-nitro-N-nitrosoguanidiinilla, 2-aminopuriinilla ja vastaavilla.

Streptomyces hygrosopicus subsp. *yakushimaensis* no. 7238 kannalla on seuraavat morfologiset, biologiset ja fysiologiset ominaisuudet sekä viljelyominaisuudet.

[1] Morfologiset ominaisuudet:

Tässä taksonomisessa tutkimuksessa käytettiin pääasiallisesti Shirlingin ja Gottlieb'in kuvaamia menetelmiä (Shirling, E.B. ja D. Gottlieb: Methods for characterization of Streptomyces species. International Journal of Systematic Bacteriology 16, 313 - 340, 1966).

Morfologiset havainnot tehtiin valo- ja elektronimikroskoopeilla viljelmillä, joita oli kasvatettu 30°C:ssa 14 päivää ohrajauhoagarilla, hiiva-mallasuuteagarilla ja epäorgaaniset suolat - tärkkelysagarilla. Kypsät sporoforit olivat kohtalaisen lyhyitä ja muodostivat Retinaculiaperti ja Spirales-ketjuja, joissa oli noin 20 itiötä kussakin ketjussa. Ilmarihmassa havaittiin hygroskooppista itiömassaa ohrajauhoagarilla ja epäorgaaniset suolat - tärkkelysagarilla. Itiöiden pinnan epäsäännöllisyydet olivat hyvin lyhyiden, paksujen harjanteiden ja nystyröiden välillä.

[2] Viljelyominaisuudet:

Viljelyominaisuudet tutkittiin Shirlingin ja Gottlieb'in edellä kuvaamalla ja Waksmanin (Waksman, S.A.: The actinomycetes vol. 2: Classification, identification and description of genera and species. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1961) kuvaamalla kymmenellä alustalla.

Inkubointi tehtiin 30°C:ssa 14 päivän aikana. Tässä tutkimuksessa käytetyt värien nimet perustuivat Guide to Color Standardiin (käsikirjan julkaisija Nippon Shikisai Kenkyusho, Tokio). Pesäkkeet kuuluivat harmaaseen värisarjaan kasvatettaessa ohrajauhoagarilla, hiiva-mallasuuteagarilla ja epäorgaaniset suolat - tärkkelysagarilla. Tutkituilla alustoilla ei muodostunut liukoista pigmenttiä. Tulokset on esitetty taulukossa 4.

| Alusta | No. 7238 | IFO 12839 | IFO 13786 |
|--------------------------------|------------------|---|--|
| Glukoosi- asparagiiniagar | G A R S | kohtalainen harmahtavan valkoinen harmaa harmahtavan keltaisen harmahtavan keltaisen oranssi ei | kohtalainen valkoinen harmahtavan keltaisen oranssi ei |
| Glyseriini- asparagiiniagar | G A R S | kohtalainen valkoinen kellertävän harmaa | kohtalainen vaalean harmaa harmahtavan keltaisen ruskea |
| Czapek-agar | G A R S | kohtalainen harmahtavan valkoinen harmahtavan valkoinen vaaalea kellertävän ruskea ei | kohtalainen valkoinen vaaalea kellertävän ruskea ei |
| ravintoagari | G A R S | kohtalainen harmahtavan valkoinen harmahtavan valkoinen vaalean keltainen ei | kohtalainen ei vaalean keltainen ei |



| Alusta | No. 7238 | IFO 12839 | IFO 13786 |
|----------------------------------|----------|-----------------------------|--------------------------------------|
| peruna-dekstroosi- | G | kohtalainen | kohtalainen |
| agar | A | vaalean punertavan ruskea | vaalean punainen- valkoinen |
| | R | vaalea keltaisen oranssi | vaalea keltaisen ruskea |
| | S | ei | ei |
| Tyrosiiniagar | G | kohtalainen | kohtalainen |
| | A | valkoinen | harmahtavan valkoinen harmaa - musta |
| | R | vaalea keltaisen ruskea | vaalea keltaisen ruskea |
| | S | ei | ei |
| Peptoni-hiivauuta- rauta-agar | G | kohtalainen | kohtalainen |
| | A | ei | harmahtavan valkoinen ei |
| | R | vaalea keltainen | väritön |
| | S | ei | ei |

Lyhennykset: G = kasvu, A = ilmassan väri
R = väri kääntöpuolella S = liukoinen pigmentti

Soluseinämän analyysi suoritettiin Becker et al. (Becker, B., M.P. Lechevalier, R.E. Gordon ja H.A. Lechevalier: Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole cell hydrolysates: *Appl. Microbiol.*, 12, 421 - 423, 1964) ja Yamaguchin (Yamaguchi, T.: Comparison of the cell wall composition of morphologically distinct actinomycetes: *J. Bacteriol.*, 89, 444 - 453, 1965) menetelmillä. Kannan no. 7238 koko seinämän hydrolysaatin analyysi osoitti, että mukana oli LL-diaminopimeliinihappoa. Tämän kannan soluseinämän uskotaan siten olevan tyyppiä I.

[3] Biologiset ja fysiologiset ominaisuudet:

Kannan no. 7238 fysiologiset ominaisuudet määritettiin Shir-lingin ja Gottlieb'in kuvaamalla edellä mainituilla menetelmillä. Tulokset on esitetty taulukossa 5. Kasvun lämpötila-alue ja optimaalinen lämpötila määritettiin hiiva-mallasuuteagarilla käyttämällä lämpötilagradientilla varustettua inkubaattoria (valmistaja Toyo Kagaku Sangyo Co., Ltd.). Kasvun lämpötila-alue oli 18 - 36°C ja optimaalinen lämpötila 28°C. Tärkkelyksen hydrolyysi ja gelatiinin nesteytyminen olivat positiivisia. Melanoidipigmentin tuotto oli negatiivinen.

Taulukko 5 Kannan no. 7238, Streptomyces antimycoticus IFO 12839 ja Streptomyces hygrosopicus subsp. glebosus IFO 13786

| Fysiologiset ominaisuudet | No. 7238 | IRO 12839 | IFO 13786 |
|---------------------------|--------------|--------------|--------------|
| kasvun lämpötila-alue | 18°C - 36°C | 18°C - 38°C | 16°C - 35°C |
| optimilämpötila | 28°C | 28°C | 27°C |
| nitraatin pelkistyminen | negatiivinen | negatiivinen | negatiivinen |
| tärkkelyksen hydrolyysi | positiivinen | positiivinen | positiivinen |
| maidon koagulointi | negatiivinen | negatiivinen | negatiivinen |
| maidon peptonisointi | negatiivinen | negatiivinen | negatiivinen |
| melaniinin tuotto | negatiivinen | negatiivinen | negatiivinen |
| gelatiinin nesteytyminen | positiivinen | positiivinen | positiivinen |
| H ₂ S - tuotto | negatiivinen | negatiivinen | negatiivinen |
| ureaasiaktiivisuus | negatiivinen | negatiivinen | negatiivinen |
| MaCl:n sietokyky (%) | 7 %, 10 % | 7 %, 10 % | 5 %, 7 % |

Hiililähteiden hyväksikäyttöä tutkittiin Pridhamin ja Gottlieb-
 liebin menetelmällä (Pridham, T.G. ja D. Gottlieb: The utili-
 zation of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid
 for species determination: J. Bacteriol., 56, 107-114, 1946).
 Kasvu määritettiin 14 päivän inkuboinnin jälkeen 30°C:ssa.

Taulukkoon 6 on koottu tämän kannan hiililähteiden käyttö.
 Kanta no. 7238 voi käyttää D-glukoosia, sakkaroosia, laktoosia,
 maltoosia, D-trehaloosia, inositolia, inuliinia ja salisiinia.

Taulukko 6

Kannan no. 7238, *Streptomyces antimycoticus* IFO 12893 ja
Streptomyces hygrosopicus subsp. *glebosus* IFO 13786 hiili-
 lähteiden käyttö.

| <u>Hiililähteet</u> | <u>no. 7238</u> | <u>IFO 12839</u> | <u>IFO 13786</u> |
|---------------------|-----------------|------------------|------------------|
| D-glukoosi | + | + | + |
| Sakkaroosi | + | + | + |
| Glyseriini | - | + | + |
| D-ksyloosi | - | ± | + |
| D-fruktoosi | - | + | + |
| Laktoosi | + | + | - |
| Maltoosi | + | - | + |
| Ramnoosi | - | + | - |
| Raffinoosi | - | + | + |
| D-Galaktoosi | - | + | + |
| L-arabinoosi | - | ± | ± |
| D-mannoosi | - | + | + |
| D-trehaloosi | + | ± | + |
| Inositoli | + | + | + |
| D-mannitoli | - | + | + |
| Inuliini | + | + | - |
| Selluloosa | ± | - | - |
| Salisiini | + | + | - |
| Kitiini | ± | - | - |
| Natriumsitraatti | - | - | ± |
| Natriumsukkinaatti | - | + | + |
| Natriumasettaatti | - | - | - |

Symbolit: + : käyttää ± : käyttää mahdollisesti - : ei käytä

Kannan no 7238 mikroskooppiset tutkimukset ja soluseinämän koostumuksen analyysi osoittavat, että tämä kanta kuuluu *Streptomyces Waksman ja Henrici* 1943 sukuun.

Sen vuoksi tätä kantaa verrattiin eri *streptomyces*-lajeihin julkaistujen kuvausten valossa. [International Journal of Systematic Bacteriology, 18, 69 - 189, 279 - 392 (1968) ja 19, 391 - 512 (1969), ja Bergy's Manual of Determinative Bacteriology 8th Edition (1974)].

Vertailun tuloksena kannan no. 7238 katsotaan muistuttavan kantoja *Streptomyces antimycoticus* Waksman 1957 ja *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *glebosus* Ohmori, et. al. 1962. Kannan no. 7238 viljelyominaisuuksia verrattiin sen vuoksi vielä vastaavien *Streptomyces antimycoticus* IFO 12839 ja *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *glebosus* IFO 13786 kantojen ominaisuuksiin, kuten on esitetty edellä taulukoissa 4, 5 ja 6. Tämän jatkovertailun perusteella kanta no. 7238 voidaan erottaa kannoista *Streptomyces antimycoticus* IFO 12839 ja *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *glebosus* IFO 13786 seuraavissa suhteissa.

(i) Ero kantaan *Streptomyces antimycoticus* IFO 12839 verrattuna

Kannan no. 7238 viljelyominaisuudet eroavat *Streptomyces antimycoticus* IFO 12839 kannasta hiiva-mallasuuteagarilla, glukoosi-asparagiiniagarilla, glyseriini-asparagiiniagarilla, peruna-dekstroosiagarilla ja tyrosiiniagarilla.

Mitä taas tulee hiililähteiden käyttöön, niin kanta no. 7238 voi käyttää maltoosia, kun taas *Streptomyces antimycoticus* IFO 12839 ei voi sitä käyttää. Kanta no. 7238 ei myöskään voi käyttää glyseriiniä, D-fruktoosia, ramnoosia, raffinoosia, D-galaktoosia, D-mannoosia, mannitolia ja natriumsukkinaattia, kun taas *Streptomyces antimycoticus* IFO 12839 voi näitä käyttää.

(ii) Ero Streptomyces hygrosopicus subsp. glebosus IFO 13786 kantaan verrattuna

Kannan no. 7238 viljelyominaisuudet eroavat Streptomyces hygrosopicus subsp. glebosus IFO 13786 kannasta hiiva-mallasuuteagarilla, peruna-dekstroosiagarilla ja tyrosiiniagarilla.

Kannan no. 7238 maidon peptonisointi on negatiivinen, kun taas Streptomyces hygrosopicus subsp. glebosus IFO 13786 kannalla se on positiivinen. Kanta no. 7238 voi kasvaa 7 %:sen natriumkloridin läsnäollessa, kun taas Streptomyces hygrosopicus subsp. glebosus IFO 13786 ei voi kasvaa samoissa olosuhteissa.

Mitä taas tulee hiililähteiden käyttöön, niin kanta no. 7238 voi käyttää laktoosia, inuliinia ja salisiinia, kun taas Streptomyces hygrosopicus subsp. glebosus IFO 12786 ei voi niitä käyttää. Kanta no. 7238 ei voi käyttää glyseriiniä, D-ksyloosia, D-fruktoosia, raffinoosia, D-galaktoosia, D-mannoosia, mannitolia ja natriumsukkinaattia, kun taas Streptomyces hygrosopicus subsp. glebosus IFO 13786 voi niitä käyttää.

Kanta no. 7238 kuitenkin muodostaa hygroskoopista itiömassaa kaurajauhoagarilla ja epäorgaaniset suolat - tärkkelysagarilla, ja muut kannan no. 7238 morfologiset ja viljelyominaisuudet ovat samanlaiset kuin Streptomyces hygrosopicus subsp. glebosus IFO 13786 kannalla. Kannan no. 7238 katsotaan sen vuoksi kuuluvan Streptomyces hygrosopicus lajiin, mutta kanta no. 7238 on erilainen kuin Streptomyces hygrosopicus subsp. glebosus IFO 13786, vaikka tämä tunnettu kanta on kaikkein samankaltaisin kannan no. 7238 kanssa Streptomyces hygrosopicus alalajeista. Edellä olevan perusteella pidetään kantaan no. 7238 uutena Streptomyces hygrosopicus lajina ja sille on annettu nimeksi Streptomyces hygrosopicus subsp. yakushimaensis subsp. nov., viitaten Yakashimassa kerättyyn maahan, josta organismi eristettiin.

FR-900523 AINEEN TUOTTAMINEN

Uusi FR-900523 aine voidaan tuottaa viljelemällä ravintoalustassa FR-900523 ainetta tuottavaa kantaa, joka kuuluu *Streptomyces*-sukuun (esim. *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *yakushimaensis* no. 7238, FERM BP-928).

FR-900523 ainetta voidaan yleisesti valmistaa viljelemällä FR-900523 ainetta tuottavaa kantaa vesipitoisessa ravintoalustassa, joka sisältää assimiloituvan hiilen ja typhen lähteitä, parhaiten aerobisissa olosuhteissa (esim. ravisteluviljely, pinnanalaisviljely jne.).

Parhaina hiililähteinä ravintoalustassa pidetään hiilihydraatteja kun glukoosia sakkaroosia, laktoosia, glyseriiniä, tärkkelystä dekstriiniä ja vastaavia. Muita lähteitä, joita voidaan käyttää ovat maltoosi, D-trehaloosi, inositoli, inuliini, salisiini ja vastaavat.

Suositteluja typpilähteitä ovat hiivauute, peptoni, glutteenijauho, puuvillasiemenjauho, soijapapujauho, maissinliotusvesi, kuivahiiva, vehnänalkio, höyhenjauho, maapähkinäjauho jne., sekä epäorgaaniset ja orgaaniset typpiyhdisteet, kuten ammoniumsuolat (esim. ammoniumnitraatti, ammoniumsulfaatti, ammoniumfosfaatti jne.), urea, aminohappo ja vastaavat.

Hiili- ja typpilähteitä, joita tosin käytetään edullisesti yhdistelmänä, ei tarvitse käyttää puhtaissa muodoissaan, koska käyttöön sopivat myös vähemmän puhtaat materiaalit, jotka sisältävät hivenmäärinä kasvutekijöitä ja huomattavia määriä mineraaliravinteita. Haluttaessa alustaan voidaan lisätä mineraalisuoloja kuten natrium- tai kalsiumkarbonaattia, natrium- tai kaliumfosfaattia, natrium- tai kaliumkloridia, natrium- tai kaliumjodidia, magnesiumsuoloja, kuparisuoloja, kobolttisuolaa ja vastaavia. Tarvittaessa, erityisesti kun viljelyalusta vaahtoa voimakkaasti, voidaan lisätä vaahton-

estoainetta kuten nestemäistä parafiinia, rasvaöljyä, kasviöljyä, mineraaliöljyä tai silikonia.

Jos ainetta FR-900523 tuottaa suuria määriä, pidetään parhaana pinnanalaisia aerobisia viljelyolosuhteita. Pienten määrien tuottamista varten käytetään ravistelutai pintaviljelmää pullossa. Jos kasvu tapahtuu suurissa tankeissa, on suositeltavaa käyttää organismin vegetatiivista muotoa siirrostamiseen tuotantotankeissa, että vältettäisiin kasvun lag-vaihe aineen FR-900523 tuotto-prosessissa. Siten on toivottavaa tuottaa ensin organismin vegetatiivinen siirrostesuuraste siirrostamalla suhteellisen pieni määrä viljelyalustaa organismin itiöille tai rihmastolla ja viljelemällä mainittua siirrostettua alustaa, minkä jälkeen viljelty vegetatiivinen siirrostesuuraste siirretään aseptisesti suuriin tankkeihin. Alusta, jossa vegetatiivinen siirrostesuuraste tuotetaan, on oleellisesti sama tai erilainen kuin alusta, jota käytetään aineen FR-900523 tuottoon.

Viljelyseoksen sekoittaminen ja ilmastus voidaan suorittaa monilla eri tavoilla. Sekoitus voidaan saada aikaan potkurilla tai samantapaisella mekaanisella sekoituslaitteistolla, pyörittämällä tai ravistelemällä fermentoria, erilaisten pumpauslaitteistojen avulla tai johtamalla steriiliä ilmaa alustan läpi. Ilmastus voidaan suorittaa johtamalla steriiliä ilmaan fermentaatioseoksen läpi.

Fermentaatio suoritetaan tavallisesti lämpötilassa välillä noin 20 - 30°C, parhaiten 25 - 35°C:ssa, noin 50 - 150 tunnin aikana, joka voi vaihdella riippuen fermentaatioolosuhteista ja mittakaavasta.

Näin tuotettu aine FR-900523 voidaan ottaa talteen viljelyalustasta tavanomaisin keinoin, jota yleisesti käytetään muiden tunnettujen biologisesti aktiivisten aineiden talteenottamiseen. Tuotettu aine FR-900523 on viljelyssä rihmastossa ja siten aine FR-900523 voidaan eristää ja puhdistaa rihmastosta, joka saadaan suodattamalla tai sentrifugoimalla

viljelyliemi, tavanomaisilla menetelmillä kuten väkevöimällä alipaineessa, lyofilisoimalla, uuttamalla tavanomaisilla liuottimilla, pH-säädön avulla, käsittelemällä tavanomaisella hartsilla (esim. anioni- tai kationi-ioninvaihtohartsit, ei ionillinen adsorptiohartsit jne.), käsittelemällä tavanomaisilla adsorbenteilla (esim. aktivoitu hiili, piihappo, silikageeli, selluloosa, alumiinioksidi jne.), kiteyttämällä, kiteyttämällä uudelleen jne..

Erityisesti voidaan FR-900523 erottaa liuottamalla kumpaakin tuotetta sisältävä, fermentaatiolla tuotetut aineet sopivaan liuottimeen kuten etyyliasetattiin, n-heksaaniin ja vastaavaan ja kromatografoimalla sen jälkeen liuos esim. silikageelipylväessä sopivalla orgaanisella liuottimella kuten etyyliasetaatilla ja n-heksaanilla tai niiden seoksella. Näin erotettu FR-900523 aine voidaan sen jälkeen puhdistaa tavanomaisilla menetelmillä, esim. kiteyttämällä uudelleen, kromatografoimalla uudelleen, suuren suorituskyvyn nestekromatografialla ja vastaavalla.

FR-900523 AINEEN FYSIOLOGISET JA KEMIALLISET OMINAISUUDET

FR-900523

- (1) Muoto ja väri: värittömiä neulasia
- (2) Alkuaineanalyysi: C: 64,57 %, H: 8,84 %, N: 1,81 %
- (3) Värireaktio:
Positiivinen: seriumsulfaattireaktio, rikkihapporeaktio, Ehrlichin reaktio, Dragendorffin reaktio ja jodihöyry-reaktio
Negatiivinen: ferrikloridireaktio, ninhydriinireaktio ja Molishin reaktio

(4) Liukoisuus:

Liukenee: metanoli, etanoli, asetoni, etyyliasetaat-
ti, kloroformi, dietyylieetteri ja bent-
seeni

Liukenee niukasti: n-heksaani, petrolieetteri

Ei liukene: vesi

(5) Sulamispiste: 152 - 154°C(6) Ominaiskiertokyky: $[\alpha]_D^{23}$: -73,0° (c = 0,65 CH₁₃)(7) UV-absorptiospektri: loppuabsorptio(8) IR-absorptiospektri:

νCHCl₃: 3670, 3580, 3510, 2930, 2875, 2825,
max 1745, 1722, 1700, 1647, 1450, 1380,
1350, 1330, 1307, 1285, 1170, 1135,
1090, 1050, 1030, 1000, 990, 978,
960, 930, 915, 888, 870,
850 cm⁻¹

(9) ¹³C NMR-spektri:

δ(ppm, CDCl₃):

| | | |
|---------------|---------------|---------------|
| { 213,82 (s) | { 196,31 (s) | { 168,96 (s) |
| { 213,32 (s), | { 193,34 (s), | { 168,85 (s), |
| { 164,84 (s) | { 137,80 (s) | { 132,89 (s) |
| { 165,98 (s), | { 138,41 (s), | { 131,96 (s), |
| { 129,62 (d) | { 124,51 (d) | { 97,13 (s) |
| { 130,03 (s), | { 124,84 (d), | { 98,67 (s), |
| 84,38 (d) | { 76,69 (d) | { 75,45 (d), |
| | { 78,06 (d), | { 76,91 (d), |
| { 73,89 (d) | 73,70 (d), | { 73,09 (d) |
| { 73,40 (d) | | { 72,84 (d), |
| { 70,40 (d) | { 56,75 (d) | { 56,93 (q) |
| { 69,24 (d), | { 52,89 (d), | { 57,43 (q), |
| { 56,61 (q) | { 56,24 (q) | { 48,58 (t) |
| { 56,56 (q), | { 55,94 (q), | { 48,32 (t), |

| | | |
|--------------|--------------|--------------|
| { 47,14 (d) | { 40,23 (d) | { 27,85 (t) |
| { 47,38 (d), | { 40,65 (d), | { 26,32 (t), |
| { 25,48 (d) | 24,68 (t), | { 21,33 (t) |
| { 26,64 (d), | | { 20,83 (t), |
| { 20,63 (q) | { 16,24 (q) | { 15,70 (q) |
| { 19,77 (q), | { 16,34 (q), | { 15,96 (q), |
| { 15,51 (q) | { 14,31 (q) | { 9,64 (q) |
| { 15,96 (q) | { 14,18 (q), | { 10,04 (q), |

spektri on esitetty taulukossa 9.

(10) ^1H NMR-spektri: spektri on esitetty taulukossa 10.

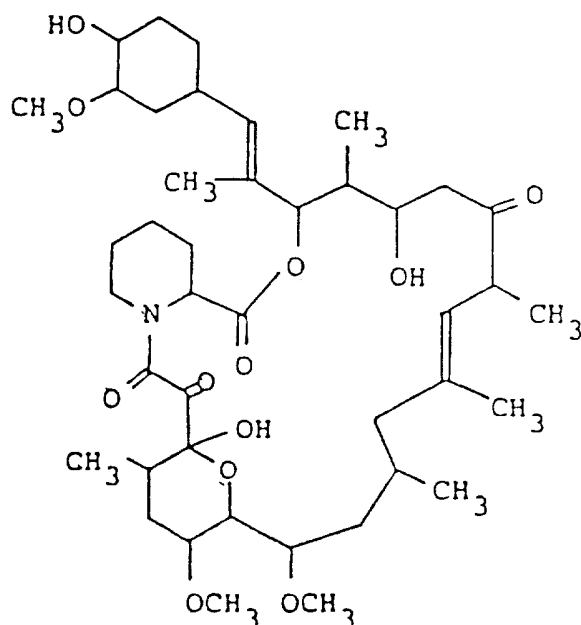
(11) Ohutkerroskromatografia:

| <u>Stationäärifaasi</u> | <u>Kehitysliuotin</u> | <u>Rf-arvo</u> |
|-------------------------|--------------------------------------|----------------|
| silikageelilevy | kloroformi : metanoli (20:1, v/v) | 0,38 |
| | etyyliasettaatti | 0,51 |

(12) Aineen ominaisuus: neutraali aine.

FR-900523 yhdisteestä on huomattava, että ^{13}C ja ^1H - NMR-spektrien mittauksissa tällä yhdisteellä esiintyi signaalipareja eri kemiallisilla siirtymillä. Kuitenkin ohutlevykromatografia- ja suuren suorituskyvyn nestekromatografia-mittauksissa FR-900523 yhdisteellä oli yksi ainoa täplä ohutlevykromatografiassa ja yksi ainoa piikki suuren suorituskyvyn nestekromatografiassa.

Edellä olevista fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista ja FR-900506 yhdisteen kemiallisen rakenteen onnistuneen määrittämisen perusteella voitiin FR-900523 yhdisteellä päätellä olevan seuraava kemiallinen rakenne.



1,14-Dihydroksi-12-[2-(4-hydroksi-3-metoksisykloheksyyli)-1-metyylivinyyli]-23,25-dimetoksi-13,19,17,21,27-pentametyyli-11,28-dioksa-4-atsatrisyklo[22.3.1.0^{4,9}]-oktakos-18-eeni-2,3,10,16-tetraoni.

Esimerkkinä tällaisista farmakologisista aktiivisuuksista seuraavassa on havainnollistettu trisykloyhdisteiden eräitä farmakologisia testiarvoja.

Testi 1

Trisykloyhdisteiden (I) aiheuttama suppressio in vitro MLR-reaktiossa (Mixed Lymphocyte Reaction).

MLR-testi suoritettiin mikrotiitterilevyillä, joiden jokainen kalvo sisälsi 5×10^5 C57BL/6 reaktiosolua (H-2^b), 5×10^5 mitomysiini C:llä käsiteltyjä (25 µg/ml mitomysiini C 37°C:ssa 30 minuuttia, pesu kolme kertaa RPMI 1640 mediumilla (BALB/C stimulaattorisoluja (H-2^d) 0,2 ml RPMI 1640 mediumissa, joka oli täydennetty 10 %:lla vasikansikiöseerumia, 2 mM natriumve-tykarbonaatilla, penisilliinillä (50 yksikköä/ml) ja strepto-

mysiinillä (50 µm/ml). Soluja inkuboitiin 37°C:ssa 68 tuntia kostutetussa kaasukehässä, joka sisälsi 5 % hiilidioksidia ja 95 % ilmaa, ja pulssitettiin ³H-tymidiinillä (0,5 µCi) 4 tuntia ennen solujen talteenottamista. Tämän keksinnön mukainen kohdeyhdiste liuotettiin etanoliin, laimennettiin edelleen RPMI 1640 mediumilla ja lisättiin viljelmiin niin, että loppukonsentraatioksi saatiin 0,1 µm/ml tai vähemmän.

Tulokset on esitetty taulukossa 7 - 10. Käsillä olevan keksinnön mukaiset trisykloyhdisteet suppressoivat hiiren MLR-reaktiota.

Taulukko 7

FR-900506:n vaikutus MLR-reaktioon

| FR-900506:n konsentraatio (ng/ml) | Radioaktiivisuudet (keskim. C.P.M. ± S.E.) | Suppressio (%) | IC ₅₀ (ng/ml) |
|---|---|-------------------|-----------------------------|
| 2,5 | 54 ± 4 | 99,5 | |
| 1,25 | 168 ± 23 | 98,3 | |
| 0,625 | 614 ± 57 | 93,8 | |
| 0,313 | 3880 ± 222 | 60,9 | 0,26 |
| 0,156 | 5490 ± 431 | 44,7 | |
| 0,078 | 7189 ± 365 | 27,6 | |
| 0 | 9935 ± 428 | | |

Taulukko 9

FR-900523:n vaikutus MLR-reaktioon

| FR-900523:n konsentraatio (ng/ml) | Radioaktiivisuudet (keskim. C.P.M. ± S.E.) | Suppressio (%) | IC ₅₀ (ng/ml) |
|---|---|-------------------|-----------------------------|
| 100 | 25 ± 12 | 99,9 | |
| 10 | 156 ± 37 | 99,3 | |
| 1 | 5600 ± 399 | 75,8 | 0,5 |
| 0,500 | 11624 ± 395 | 49,7 | |
| 0,250 | 17721 ± 1083 | 23,3 | |
| 0 | 23106 ± 1052 | 0 | |

Taulukko 10

FR-900525:n vaikutus MLR-reaktioon

| FR-900525:n konsentraatio (ng/ml) | Radioaktiivisuudet (keskim. C.P.M. \pm S.E.) | Suppressio (%) | IC ₅₀ (ng/ml) |
|---|---|-------------------|-----------------------------|
| 100 | 469 \pm 56 | 97,0 | |
| 10 | 372 \pm 32 | 97,6 | |
| 5 | 878 \pm 369 | 94,87 | 1,55 |
| 2,5 | 3564 \pm 512 | 77,4 | |
| 1,2 | 10103 \pm 421 | 35,8 | |
| 0 | 15741 \pm 411 | | |

Testi 2

Trisykloyhdisteiden (I) antimikrobiaaliset aktiivisuudet.

Trisykloyhdisteiden (I) antimikrobiaaliset aktiivisuudet eri sieniä vastaan määritettiin sarja laimennusmenetelmällä Sabouraud-agarilla. Pienimmät kestokonsentraatiot (MIC) ilmoitettiin $\mu\text{m/ml}$:na sen jälkeen kun oli inkuboitu 24 tuntia 30°C:ssa.

Käsillä olevan keksinnön mukaisilla trisykloyhdisteillä oli antimikrobiaaliset aktiivisuudet sieniä, esim. *Aspergillus fumigatus* IFO 5840 ja *Fusarium oxysporum* IFO 5942 sieniä vastaan, kuten on kuvattu seuraavissa taulukoissa 11 ja 12.

Taulukko 11Trisykloyhdisteiden (I) MIC-arvot ($\mu\text{m/ml}$) *Aspergillus fumigatus* IFO 5840 sientä vastaan

| Aineet | MIC ($\mu\text{m/ml}$) |
|-----------|--------------------------|
| FR-900506 | 0,025 |
| FR-900523 | 0,3 |
| FR-900525 | 0,5 |

Taulukko 12

Trisykloyhdisteiden (I) MIC-arvot ($\mu\text{g/ml}$) *Fusarium oxysporum* sientä vastaan

| <u>Aineet</u> | <u>MIC ($\mu\text{m/ml}$)</u> |
|---------------|--|
| FR-900560 | 0,05 |
| FR-900525 | 1 |

Testi 3

Trisykloyhdisteiden (I) vaikutus ihon allograftin eloonjääntiin rotilla.

Ventaaliset allografit lahjoittajarotilta (Fischer) siirrotettiin vastaanottavien rottien (WKA) lateraaliselle rinnan alueella. Siteet poistettiin päivänä 5. Siirrosteet tutkittiin päivittäin hylkimiseen asti, joksi määritettiin siirrosteen epiteriumin yli 90 % nekroosi.

FR-900506 liuotettiin oliiviöljyyn ja annettiin intramuskulaarisesti 14 peräkkäisenä päivänä alkaen siirrostimispäivästä.

Kuten taulukossa 13 on esitetty kaikki ihon allograftit tulivat hyljityksi 8 päivän sisällä rotilla, jotka oli käsitelty intramuskulaarisesti oliiviöljyllä 14 peräkkäisenä päivänä, mutta päivittäinen käsittely FR-900506 aineella selvästi pidensi ihon allograftin eloonjääntiä.

Taulukko 13

FR-900506 aineen vaikutus ihon allograftin eloonjäantiin

| | Annos (mg/kg) | Eläinten määrä | Ihon allograftin eloonjäantipäivä |
|---------------------------|------------------|-------------------|--------------------------------------|
| Kontrolli (oliiviöljy) | - | 11 | 7,7,7,7,7,7,8,8,8,8,8 |
| FR-900506 | 1 | 8 | 19,19,19,20,21,21,22,22 |
| | 3,2 | 6 | 22,23,23,26,27,35 |
| | 10 | 5 | 56,61,82,85,89 |

Testi 4

Trisykloyhdisteen (I) vaikutus II-tyyppiseen kollageenilla indusoituun artriittiin rotilla.

Kollageenia liuotettiin 2 mg/ml kylmään 0,01 M etikkahappoon. Liuos emulgoitiin yhtä suurella tilavuudella epätäydellistä Freundin apuainetta. Kylmää emulsiota injisoitiin yhteensä 0,5 ml intradermaalisesti Lewis-naarasrottien selkään useaan kohtaan ja yhteen tai kahteen kohtaan hännässä. FR-900506 liuotettiin oliiviöljyyn ja annettiin suun kautta. Kontrollirotat, jotka oli immunisoitu samalla määrällä II-tyypin kollageenia, saivat suun kautta vain oliiviöljyä. Artriitin esiintymistapaukset merkittiin muistiin. Testin tulokset on esitetty taulukossa 14. Tulehduksellinen polyartriitti indusoitui kaikissa rotissa, jotka oli käsitelty oliiviöljyllä 14 päivää alkaen samana päivänä kuin suoritettiin immunisointi II-tyypin kollageenilla.

Päivittäinen käsittely FR-900506 aineella 14 päivän ajan tukahdutti täydellisesti artriitin indusoitumisen 3 viikon havaintojakson aikana.

Taulukko 14

FR-900506 aineen vaikutus II-tyypin kollageenilla indusoituun artriittiin rotilla

| | <u>Annos (mg/kg per päivä)</u> | <u>Artriitin esiintyminen</u> |
|---------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Kontrolli (oliiviöljy) | - | 5/5 |
| FR-900506 | 3,2 | 0/5 |

Testi 5

Trisykloyhdisteiden (I) vaikutus kokeelliseen allergeeniseen Enkefalomyelyttiin (EAE) SLJ/J-hiirellä.

SJL/L-hiiristä valmistettiin selkäydinhomogenaatti. Selkäytimet poistettiin isufflatoimalla (imemällä), sekoitettiin suurin piirtein yhtä suuren tilavuuden kanssa vettä ja homogenisoitiin 4°C:ssa. Yhtä suuri tilavuus tätä kylmää homogenaattia (10 mg/ml) emulgoitiin täydellisen Freundin apuaineen (CFA) kanssa, joka sisälsi 0,6 ml/ml Mycobacterium tuberculosis H37RA-bakteeria.

EAE indusoiitiin injisoimalla kaksi kertaa 0,2 ml selkäydin-CFA-emulsiota SLJ/J-hiiriin päivänä 0 ja päivänä 13. Kaikki näissä testeissä käytetyt hiiret arvioitiin ja pisteitettiin päivittäin EAE kliinisten merkkien suhteen.

EAE:n voimakkuus arvioitiin seuraavien kriteerioiden mukaisesti: aste 1 pienentynyt hännän jänteisyys: aste 2 kömpelö kulku: aste 3 heikkous yhdessä tai useammassa jäsenessä: aste 4 paraplegia tai hemiplegia.

FR-900506 ainetta liuotettiin oliiviöljyyn ja annettiin suun kautta 19 päivää alkaen 0 (ensimmäisen immunisoinnin päivä).

Taulukko 15 osoittaa, että FR-900506 selvästi esti EAE:n kliinisten merkkien kehittymisen.

Taulukko 15

| | Annos (mg/kg) | Tautisten eläinten määrä päivänä 24 |
|---------------------------|---------------|-------------------------------------|
| Kontrolli (oliiviöljy) | - | 10/10 |
| FR-900506 | 32 | 0/5 |

Testi 6

Trisykloyhdisteiden (I) vaikutus GvHR-reaktioon (Local Graft-versus-Host-reaktion) hiirillä.

Eläviä pernasoluja (1×10^7 solua) C57BL/6 lahjoittajilta injisoitiin ihonalaisesti BDF₁-hiirten oikean takakäpälän jalkapohjaan paikallisen GvHR-reaktion indusoimiseksi. Hiiret tapettiin 7 päivää myöhemmin ja punnittiin sekä oikeat (injisoitu käpälä) että vasemmat (injisoimaton käpälä) (PLN:t popliteal lymph nodes). GvHR ilmoitettiin painoerona oikean ja vasemman PLN:n välillä.

FR-900506 ainetta liuotettiin oliiviöljyyn ja annettiin suun kautta viisi päivää alkaen samana päivänä kun herkistäminen suoritettiin.

FR-900506 aineen ED₅₀-arvo, joka koski GvHR-reaktion estymistä, oli 19 mg/kg.

Testi 7

Trisykloyhdisteiden (I) akuutit toksisuudet.

FR-900506, FR-900523 ja FR-900525 aineiden akuutit toksisuudet tutkittiin ddY-hiirillä injisoimalla intraperitoneaalisesti.

Missään tapauksessa ei voitu havaita kuolleita 100 mg/kg annoksella.

Tämän keksinnön mukaista farmaseuttista seosta voidaan käyttää farmaseuttisena valmisteena esim. kiinteässä, puolikiinteässä tai nestemäisessä muodossa, joka sisältää käsillä olevan keksinnön mukaista trisykloyhdistettä (I) aktiivisena ainesosana seoksena ulkoiseen, enteraaliseen tai parenteraaliseen antamiseen sopivan orgaanisen tai epäorgaanisen kantajan tai apuaineen kanssa. Aktiivinen ainesosa voi olla työstetty esim. tavanomaisten tabletteihin, pelletteihin, kapseleihin, lääkepuikkoihin, liuoksiin, emulsioihin, puikkoihin tarkoitettujen toksittomien farmaseuttisesti hyväksyttävien kantajien kanssa tai minkä tahansa muun käyttökelpoisen muodon kanssa. Kantajia, joita voidaan käyttää, ovat vesi, glukoosi, laktoosi, agaasiakumi, kelatiini, mannitoli, tärkkelystahna, magnesiumtrisilikaatti, talkki, maissitärkkelys, keratiini, kolloidiallinen piidioksidi, perunatärkkelys, urea ja muut kantajat, jotka sopivat käytettäväksi valmistettaessa preparaatteja kiinteässä, puolikiinteässä tai nestemäisessä muodossa. Lisäksi voidaan käyttää apuaineita, stabilointiaineita, sakeutusaineita ja värjäysaineita ja parfyymejä. Aktiivista yhdistettä laitetaan farmaseuttiseen seokseen niin paljon, että saadaan aikaan haluttu vaikutus tautien etenemiseen tai tilaan.

Kun tätä seosta annetaan ihmiselle on suositeltavaa, että antaminen tapahtuu parenteraalisesti tai enteraalisesti. Vaikkakin trisykloyhdisteiden (I) terapeuttisesti tehokkaan määrän annostus vaihtelee ja myös riippuu kunkin hoidettavan potilasyksilön iästä ja tilasta, tautien hoitamiseen annetaan yleensä aktiivista ainetta päiväannoksena n. 0,01 - 1000 mg, parhaiten 0,1 - 500 mg ja kaikkein parhaiten 0,5 - 100 mg. Yleensä annetaan keskimääräisenä yksittäisannoksena noin 0,5 g, 1 mg, 5 mg, 10 mg, 50 mg, 100 mg, 250 mg ja 500 mg.

Seuraavat esimerkit on annettu käsillä olevan keksinnön havainnollistamiseksi.

Esimerkki 1Streptomyces tsukubaensis no. 9993 kannan eristäminen

Streptomyces tsukubaensis no. 9993 eristettiin käyttämällä laimennusmaljatekniikkaa seuraavassa esitetyllä tavalla.

Noin 1 g maata, jonka keräyspaikka oli Toyosato-cho, Tsukuba Gun, Ibaraki Prefecture, Japani, lisättiin steriiliin koeputkeen ja tilavuus säädettiin 5 ml steriilillä vedellä. Sen jälkeen seosta sekoitettiin 10 sekuntia koeputkisekoittimella ja annettiin olla 10 minuuttia. Supernatantti sarjalaimennettiin 100 kertaaisesti steriilillä vedellä. Laimennettu liuos (0,01 ml) levitettiin petrimaljalla Czapekin agarille, joka oli täydennetty tiamiinihydrokloridilla (sakkaroosi 30 g, natriumnitraatti 3 g, dikaliumfosfaatti 1 g, magnesiumsulfaatti 0,5 g, kaliumkloridi 0,5 g, ferrosulfaatti 0,01 g, tiamiinihydrokloridi 0,1 g, agar 20 g, vesijohtovesi 1000 ml; pH 7,2). Kasvavat pesäkkeet, joita muodostui maljoille 21 päivän inkuboinnin jälkeen 30°C:ssa, siirrettiin vinopinnoille [hiiva-mallasuuteagar (ISP-alusta 21)] ja viljeltiin 10 päivää 30°C:ssa. Eristettyjen pesäkkeiden joukosta voitiin löytää Streptomyces tsukubaensis no. 9993 kanta.

Fermentaatio

Viljelyalustaa (160 ml), joka sisälsi glyseriiniä (1 %), liukoista tärkkelystä (1 %), glukoosia (0,5 %), pellavan-siemenjauhoa (0,5 %), kuivahiivaa (0,2 %) säädetty pH-arvoon 6,5), kaadettiin 20 Erlenmeyer-pulloon (500 ml) ja steriloidiin 120°C:ssa 30 minuuttia. Kuhunkin alustaan siirrostettiin silmukallinen Streptomyces tsukubaensis no. 9993, FERM BP-927 kannan vinopintaviljelmää ja viljeltiin 4 päivää 30°C:ssa ravistelulaitteessa. Saatu seos siirrostettiin alustaan, joka sisälsi liukoista tärkkelystä (4,5 %), maissinliotusvettä (1 %), kuivahiivaa (1 %), kalsiumkarbonaattia (0,1 %) ja adekanolia (vaahdonestoaine, tavaramerkki, valmistaja: Asahi

Denka Co.) (0,1 %) (150 litraa), 200 litran fermentorissa, joka oli steriloitu 20 minuuttia 120°C:ssa, ja viljeltiin 4 päivää 30°C:ssa ilmastolla 150 litra/minuutti ja sekoittamalla 250 kierrosta minuutissa.

Eristäminen ja puhdistaminen

Näin saatu viljelyliuos suodatettiin piimaa (5 kg) avulla. Rihmastokakku uutettiin metanolilla (50 litraa) jolloin saatiin 50 litraa uutetta. Metanoliuute rihmastosta ja suodos yhdistettiin ja johdettiin ei-ionillisen adsorptiohartsin "Diaion HP20" (tavaramerkki, valmistaja Mitsubishi Chemical Industries Ltd.) (10 litraa) pylvään läpi. Pestiin vedellä (30 ml) ja vesipitoisella metanolilla (30 litraa), minkä jälkeen eluointiin metanolilla. Eluaatti haihdutettiin alipaineessa, jolloin saatiin jäille jäänyttä vettä (2 l). Tämä jäännös uutettiin etyyliasetaatilla (2 l). Etyyliasetaattiuute väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin öljymäistä jäännöstä. Öljymäinen jäännös sekoitettiin kaksinkertaisen painomäärän kanssa hapanta piihappogeeliä (silikageelin erikoislaatu 12. valmistaja Fuji Devison Co.) ja tämä seos lietettiin etyyliasetaatin kanssa. Liuottimen haihduttamisen jälkeen saatu kuiva jauhe pylväskromatografoitiin samalla happamalla silikageelillä (800 ml), joka pakattiin n-heksaanin avulla. Pylväs ajettiin n-heksaanilla (3 l), n-heksaanin ja etyyliasetaatin seoksella (9:1 v/v, 3 litraa ja 4:1 v/v, 3 litraa) ja etyyliasetaatilta (3 litraa). Kohdeyhdistettä sisältävät jakeet otettiin talteen ja väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin öljymäistä jäännöstä. Öljymäinen jäännös liuotettiin n-heksaanin ja etyyliasetaatin seokseen (1:1, v/v 30 ml) ja pylväskromatografoitiin silikageelillä (valmistaja Merck Co., Ltd. 230 - 400 mesh) (500 ml), joka oli pakattu samalla liuotinsysteemillä.

Eluointi suoritettiin n-heksaanin ja etyyliasetaatin seoksella (1:1 v/v, 2 litraa ja 1:2 v/v, 1,5 litraa). Ensimmäistä kohdeyhdistettä sisältävät jakeet otettiin talteen ja väkevöitiin

alipaineessa, jolloin saatiin kellertävää öljyä. Öljymäinen jäännös sekoitettiin kaksinkertaisen painomäärän kanssa hapan-ta silikageeliä ja tämä seos lietettiin etyyliasetaattiin. Liuottimen haihduttamisen jälkeen saatu kuivajauhe kromatografoitiin happamalla silikageelillä, joka pakattiin ja keitetiin n-heksaanilla. Kohdeyhdistettä sisältävät jakeet otettiin talteen ja väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin puhdistamatonta FR-900506 ainetta (1054 mg) valkoisena jauheena.

100 mg tätä puhdistamatonta tuotetta käsiteltiin suuren suorituskyvyn nestekromatografialla. Eluointi suoritettiin käyttämällä kolumnia (80 x 500 mm), jossa kantajana oli Lichrosorb SI 60 (tavaramerkki, valmistaja Merck & Co.). Tätä kromatografiaa seurattiin UV-detektorilla aallonpituudella 230 nm, ja liikkuva faasi oli metyleenikloridin ja dioksaanin seos (85:15 v/v) virtausnopeudella 5 ml/minuutti. Aktiiviset jakeet otettiin talteen ja haihdutettiin. Tämä suuren suorituskyvyn kromatografia toistettiin uudelleen, jolloin saatiin 14 mg puhdistettua FR-900506 ainetta valkoisena jauheena.

Eluointi suoritettiin edelleen jatkuvana etyyliasetaatilla (1,5 l). Toista kohdeyhdistettä sisältävät jakeet otettiin talteen ja väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin puhdistamatonta FR-900525 ainetta (30 mg) kellertävänä öljynä.

Esimerkki 2

Fermentaatio

Esiviljelmän alustaa (100 ml) joka sisälsi glyseriiniä (1 %), maissitärkkelystä (1 %), glukoosia (0,5 %), maissinsiemenjauhoa (1 %), maissinliotusvettä (0,5 %), kuivahiivaa (0,5 %), ja kalsiumkarbonaattia (0,2 %) pH-arvossa 6,5, kaadettiin 5004 ml:n Erlenmeyer-pulloihin ja steriloidiin 120°C:ssa 30 minuuttia. Alustaan siirrostettiin silmukallinen *Streptomyces tsukubaensis* no. 9993 kannan vinopintaviljelmää ja viljeltiin 30°C:ssa 4 päivää. Saatu viljelämä siirrettiin samaan esivilje-

lyalustaan (20 l) 30 litran fermentorissa, joka oli steriloitu 30 minuuttia 120°C:ssa. Viljelmää inkuboitiin 30°C:ssa 2 päivää, minkä jälkeen 16 litraa esiviljelmää siirrostettiin fermentaatioalustaan (1600 litraa), joka sisälsi liukoista tärkkelystä (4,5 %), maissinliotusvettä (1 %), kuivahiivaa (1 %), kalsiumkarbonaattia (0,1 %) ja Adekanolia (vaahdonestoaine, tavaramerkki, valmistaja Asahi Denka Co.) (0,1 %) pH-arvossa 6,8, 2 tunnin säiliössä, joka oli steriloitu 30 minuuttia 120°C:ssa. Tämän jälkeen viljeltiin 4 päivää 30°C:ssa.

Eristäminen ja puhdistaminen

Näin saatu viljelyliuos suodatettiin piimaan avulla (25 kg). Rihmastokakku uutettiin asetonilla (500 l), jolloin saatiin 500 litraa uutetta. Asetoniute rihmastosta ja suodos (1350 l) yhdistettiin ja johdettiin pylvään läpi, joka sisälsi ei-ionillista absorptiohartsia "Diaion HP-20" (tavaramerkki, valmistaja Mitsubishi Chemical Industries Ltd.) (100 litraa). Pestiin vedellä (300 l) ja 50 %:lla vesipitoisella asetonilla (300 l), minkä jälkeen eluoiitiin 75 % vesipitoisella asetonilla. Eluaatti haihdutettiin alipaineessa, jolloin jäljelle jäi vettä (300 l). Tämä jäännös uutettiin etyyliasetaatilla (2 l) kolme kertaa. Etyyliasetaattiute väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin öljymäistä jäännöstä. Öljymäinen jäännös sekoitettiin kaksinkertaisen painomäärän kanssa hapanta silikageeliä (silikageelin erikoislaatu 12, valmistaja Fuji Devision Co.) ja tämä seos lietettiin etyyliasetaattiin. Liuotin haihdutettiin ja saatu kuiva jauhe pylväskromatografoitiin samalla happamalla silikageelillä (8 litraa), joka oli pakattu n-heksaanilla. Pylväs kehitettiin n-heksaanilla (30 l), n-heksaanin ja etyyliasetaatin seoksella (4:1, v/v, 30 litraa) ja etyyliasetaatilla (30 litraa). Kohdeyhdistettä sisältävät jakeet otettiin talteen ja väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin öljymäinen jäännös. Tämä jäännös sekoitettiin kaksinkertaisen painomäärän kanssa hapanta silikageeliä ja tämä seos lietettiin etyyliasetaattiin. Liuottimen haihduttamisen jälkeen saatu kuiva jauhe kromatografoitiin uudelleen happamalla

silikageelillä (3,5 l), joka oli pakattu n-heksaanilla. Pylväs kehitettiin n-heksaanilla (10 l), n-heksaanin ja etyyliasetaat-
tin seoksella (4:1 v/v, 10 l), n-heksaanin ja etyyliasetaat-
in seoksella (4:1 v/v, 10 l) ja etyyliasetaatilla (10 l). Kohde-
yhdistettä sisältävät jakeet otettiin talteen ja väkevöitiin
alipaineessa, jolloin saatiin kellertävää öljyä. Öljymäinen
jäännös liuotettiin n-heksaanin ja etyyliasetaatin seokseen
(1:1 v/v, 300 ml) ja pylväskromatografoitiin silikageelillä
(valmistaja Merck Co., Ltd. 230 - 4300 mesh) (2 litraa), joka
oli pakattu samalla liuotinjärjestelmällä. Eluointi suoritet-
tiin n-heksaanin ja etyyliasetaatin seoksella (1:1 v/v, 10 l
ja 1:2 v/v, 6 litraa) ja etyyliasetaatilla (6 litraa).

Ensimmäistä kohdeyhdistettä sisältävät jakeet otettiin talteen
ja väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin FR-900506 ainetta
valkoisena jauheena (34 g). Tämä valkoinen jauhe liuotettiin
asetonitriiliin ja väkevöitiin alipaineessa. Tätä konsentraat-
tia pidettiin 5°C:ssa yön yli, jolloin saatiin prismoja
(22,7 g). Kiteyttämällä uudelleen samasta liuottimesta saatiin
puhdistettua FR-900506 ainetta (13,6 g) värittöminä prismoina.

Jakeet, jotka sisälsivät toista kohdeyhdistettä, otettiin
talteen ja väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin puhdistatonta
FR-900525 ainetta (314 g) kellertävänä jauheena.

Esimerkki 3

Fermentaatio

Viljelyalustaan (160 ml), joka sisälsi glyseriiniä (1 %),
maissitärkkelystä (1 %), glukoosia (0,5 %), pellavansiemen-
jauhoa (1 %), kuivahiivaa (0,5 %), maissinliotusvettä (0,5 %)
ja kalsiumkarbonaattia (0,2 %) (säädetty pH-arvoon 6,5),
kaadettiin kymmeneen 500 l Erlenmeyer-pulloon ja steriloidiin
120°C:ssa 30 minuuttia. Jokaiseen alustaan siirrostettiin
silmukallinen *Streptomyces tsukubaensis* nro 9993 kannan vino-
pintaviljelmää ja viljeltiin 30°C:ssa 4 päivää ravistelijassa.

Saatu viljelmä siirrostettiin alustaan, joka sisälsi liukoista tärkkelystä (5 %), maapähkinäjauhoa (0,5 %), kuivahiivaa (0,5 %), gluteenijauhoa (0,5 %), kalsiumkarbonaattia (0,1 %) ja Adekanolia (vaahdonestoaine, tavaramerkki, valmistaja Asahi Denka Co.) (0,1 %), 150 litraa) 200 litran fermentoris- sa, joka oli steriloitu 120°C:ssa 20 minuutin ajan, ja viljel- tiin 30°C:ssa 4 päivää ilmastamalla 150 litraa/minuutti ja sekoittamalla 250 kierrosta minuutissa.

Eristäminen ja puhdistaminen

Näin saatu viljelyliuos suodatettiin piimaan avulla (5 kg). Rihmastokakku uutettiin asetonilla (50 l), jolloin saatiin 50 litraa uutetta. Asetoniute rihmastosta ja suodos (135 l) yhdistettiin ja johdettiin pylvään läpi, joka sisälsi ei-io- nillista adsorptiohartsia "Diaion HP20" (tavaramerkki, valmis- taja Mitsubishi Chemical Industries Ltd.) (10 l). Pestiin vedellä (30 l) ja 50 %:lla vesipitoisella asetonilla (30 l), minkä jälkeen eluointi 75 % vesipitoisella asetonilla. Elu- aatti (30 l) haihdutettiin alipaineessa, jolloin jäljelle jäi vettä (2 l). Tämä jäännös uutettiin etyyliasetaatilla (2 l) kolme kertaa. Etyyliasetaattiute väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin öljymäistä jäännöstä. Öljymäinen jäännös se- koitettiin kaksinkertaisen painomäärän kanssa hapanta silika- geeliä (silikageelin erikoislaatu 12, valmistaja Fuji Devison Co.) ja tämä seos lietettiin etyyliasetaattiin. Liuottimen haihduttamisen jälkeen saatu kuiva jauhe pylväskromatografoi- tiin samalla happamalla silikageelillä (800 ml), joka oli pakattu n-heksaanilla. Pylväs kehitettiin n-heksaanilla (3 l), n-heksaanin ja etyyliasetaatin seoksella (4:1 v/v, 3 litraa) ja etyyliasetaatilla (3 l). Kohdeyhdistettä sisältävät jakeet otettiin talteen ja väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin öljymäinen jäännös. Tämä öljymäinen jäännös liuotettiin n-hek- saanin ja etyyliasetaatin seokseen (1:1 v/v, 30 ml) ja pylväs- kromatografoitiin silikageelillä (valmistaja Merck Co., Ltd. 230 - 400 mesh) (500 ml), joka oli pakattu samalla liuotinjär- jestelmällä. Eluointi suoritettiin n-heksaanin ja etyyliase-

taatin seoksella (1:1 v/v, 2 litraa ja 1:2 v/v, 1,5 litraa) ja etyyliasetaatilla (1,5 litraa).

Ensimmäistä kohdeyhdistettä sisältävät jakeet otettiin talteen ja väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin puhdistamatonta FR-900506 ainetta (3 g) kellertävänä jauheena.

Toista kohdeyhdistettä sisältävät jakeet otettiin talteen ja väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin öljymäinen jäännös. Tämä öljymäinen jäännös kromatografoitiin uudelleen silikageelillä, jolloin saatiin keltainen öljy. Tämä öljymäinen jäännös sekoitettiin kaksinkertaisen painomäärän kanssa hapanta silikageeliä ja tämä seos lietetettiin etyyliasetaattiin. Liuottimen haihduttamisen jälkeen saatu kuiva jauhe kromatografoitiin happamalla silikageelillä (100 ml), joka pakattiin ja keitettiin n-heksaanilla. Kohdeyhdistettä sisältävät jakeet otettiin talteen ja vaalean kellertävänä jauheena (380 mg). Tämä jauhe liuotettiin n-heksaaniin ja etyyliasetaatin seokseen (1:2 v/v, 5 ml) ja käsiteltiin happamalla silikageelillä (silikageelin erikoislaatu 922, valmistaja Fuji Davison Co.) (100 ml), joka pakattiin ja pestiin samalla liuotinjärjestelmällä. Eluaatti suoritettiin etyyliasetaatilla. Aktiiviset tiet otettiin talteen ja haihdutettiin alipaineessa, jolloin saatiin puhdistettua FR-900525 ainetta (230 mg) valkoisena jauheena.

Esimerkki 4

Streptomyces hygroscopicus subsp. yakushimaensis no. 7238 kannan eristäminen

Noin 1 g maata, jonka keräyspaikka oli Yakushima, Kagoshima Prefecture, Japani, lisättiin steriilin koeputkeen ja tilavuus säädettiin 5 ml:ksi steriilillä vedellä. Seosta sekoitettiin sen jälkeen 10 sekuntia koeputkisekoittimella ja pidettiin 10 minuuttia. Supernatantti sarjalaimennettiin 100 kertaisesti steriilillä vedellä. Laimennettu liuos (0,1 ml) levitettiin Czapek-agarille, joka oli täydennetty tiamiinihydrokloridilla,

(sakkarooosi 30 g, natriumnitraatti 3 g, dikaliumfosfaatti 1 g, magnesiumsulfaatti 0,5 g, kaliumkloridi 0,5 g, ferrosulfaatti 0,01 g, diamiinihydrokloridi 0,1 g, agar 20 g, vesijoh- tovesi 1000 ml; pH 7,2) petrimaljalla. Kasvavat pesäkkeet, jotka muodostuivat maljoille 21 päivän inkuboinnin jälkeen 30°C:ssa, siirrettiin vinopinnoille [hiiva-mallasuuteagar (ISP-alusta 2)], ja viljeltiin 10 päivää 30°C:ssa. Strepto- myces hygroscopicus subsp. yakushimaensis no. 7238 voitiin löytää eristettyjen pesäkkeiden joukosta.

Fermentaatio

Jokaiseen 20:neen 50 ml:n Erlenmeyer-pulloon kaadettiin vilje- lyalustaa (160 ml), joka sisälsi glyseriiniä (1 %), liukoista tärkkelystä (1 %), glukoosia (0,5 %), pellavansiemenjauhoa (0,5 %), kuivahiivaa (0,5 %), maissinliotusvettä (0,5 %) ja kalsiumkarbonaattia (0,2 %) (säädetty pH-arvoon 5), ja steri- loitiin 120°C:ssa 30 minuuttia. Jokaiseen alustaan siirros- tettiin silmukallinen Streptomyces hygroscopicus subsp. yakushimaensis no. 7238, FERM BP-928 kannan vinopintaviljelmää ja viljeltiin 4 päivää 30°C:ssa ravistelijassa. Saatu seos siirrostettiin alustaan, joka sisälsi glukoosia (4,5 %), maissinliotusvettä (1 %), kuivahiivaa (1 %), gluteenijauhoa (1 %), vehnänydintä (0,5 %), kalsiumkarbonaattia (0,1 %) ja Adekanolia (vaahdonestoaine, tavaramerkki, valmistaja Asahi Denka Co.) (0,1 %) (150 litraa), 200 litran fermentorissa, joka oli steriloitu 120°C:ssa 20 minuutin aikana, ja viljel- tiin 30°C:ssa 4 päivää ilmastamalla 150 litraa/minuutti ja sekoittamalla 250 kierrosta minuutissa.

Eristäminen ja puhdistaminen

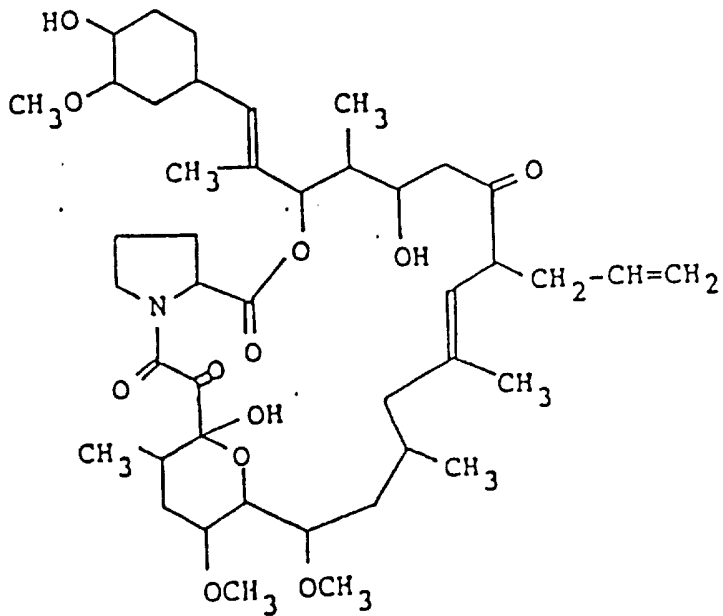
Näin saatu viljelyliuos suodatettiin piimaan avulla (5 kg). Rihmastokakku muutettiin asetonilla (50 litraa), jolloin saatiin 50 litraa uutetta. Asetoniute rihmastosta ja suodos (135 litraa) yhdistettiin ja johdettiin pylvään läpi, joka sisälsi ei-ionillista absorptiohartsia "Diaion HP-20" (tava-

ramerkki, valmistaja Mitsubishi Chemical Industries Ltd.) (10 litraa). Pestiin vedellä (30 litraa) ja vesipitoisella asetonilla (30 litraa), minkä jälkeen eluoitiin asetonilla. Eluaatti haihdutettiin alipaineessa, jolloin jäljelle jäi vettä (2 litraa). Jäännös uutettiin etyyliasetaatilla (4 l). Etyyliasetaatuuete väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin öljymäinen jäännös. Tämä öljymäinen jäännös sekoitettiin kaksinkertaisen painomäärän kanssa hapanta silikageeliä (silikageelin erikoislaatu 12, valmistaja Fuji Devison Co.), ja tämä seos lietettiin etyyliasetaatiiin. Liuottimen haihduttamisen jälkeen saatu kuiva jauhe pylväskromatografoitiin samalla happamalla silikageelillä (800 ml) joka oli pakattu n-heksaanilla. Pylväs keitettiin n-heksaanilla (3 l), n-heksaanin ja etyyliasetaatiiin seoksella (4:1 v/v, 3 litraa) ja etyyliasetaatilla (3 litraa). FR-900523 pitoiset jakeet otettiin talteen ja väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin öljymäinen jäännös. Tämä öljymäinen jäännös liuotettiin n-heksaaniiin ja etyyliasetaatiiin seokseen (1:1 v/v, 50 ml) ja pylväskromatografoitiin silikageelillä (valmistaja Merck Co., Ltd. 70-230 mesh) (1000 ml), joka oli pakattu samalla liuotinjärjestelmällä. Eluointi suoritettiin n-heksaanin ja etyyliasetaatiiin seoksella (1:1 v/v, 3 litraa ja 1:2 v/v, 3 litraa) ja etyyliasetaatilla (3 litraa). Kohdeyhdistettä sisältävät jakeet otettiin talteen ja väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin kellertävää jauhetta (4,5 g). Tämä jauhe liuotettiin metanoliin (2 ml) ja sekoitettiin veden kanssa (10 ml). Seos kromatografoitiin käänteisfaasi-silikageelillä "YMC" (60-200 mesh) (500 ml) (tavaramerkki, valmistaja Yamamura Chemical Institute), joka pakattiin ja keitettiin metanolin ja veden seoksella (4:1 v/v).

Käänteisfaasi-silikageeli-kromatografia suoritettiin samalla liuotinjärjestelmällä. FR-900523 ainetta sisältävät jakeet otettiin talteen ja sen jälkeen väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin puhdistamatonta FR-900523 tuotetta (0,51 g) vaalean kellertävänä jauheena. Tämä puhdistamaton tuote liuotettiin asetonitriiliin (3 ml) ja käsiteltiin käänteisfaasi-

silikageelillä "YMC" (70 ml), joka pakattiin ja keitettiin asetonitriilin, tetrahydrofuraanin ja 50 mM fosfaattipuskuriliuoksen (pH 2,0) seoksella (3:2:5 v/v). Kohdeyhdistettä sisältävät jakeet otettiin talteen ja uutettiin etyyliasetaatilla. Tämä uute väkevöitiin alipaineessa, jolloin saatiin kellertävän valkoista jauhetta (190 mg). Tämä kellertävän valkoinen jauhe kromatografoitiin jälleen käänteisfaasi-silikageelillä "YMC", jolloin saatiin valkoista jauhetta (80 mg). Tämä valkoinen jauhe liuotettiin pieneen määrään dietyylieetteriä ja annettiin seistä yön yli huoneen lämpötilassa, jolloin saatiin 56 mg kiteitä. Kiteyttämällä uudelleen dietyylieetteristä saatiin 34 mg FR-900523 ainetta värittöminä neulasina.

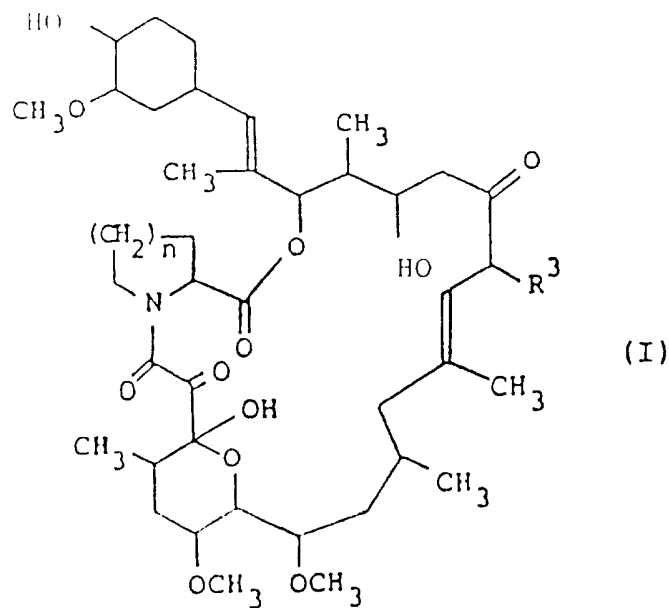
FR-900523



2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että viljellään yhdistettä FR-900506 tuottavaa Streptomyces tsukubaensis-kantaa [No 9993 (FERM BP-927)] ravintoalustassa ja otetaan talteen yhdiste FR-900506.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av farmakologiskt värdefulla tricykliska föreningar med formeln



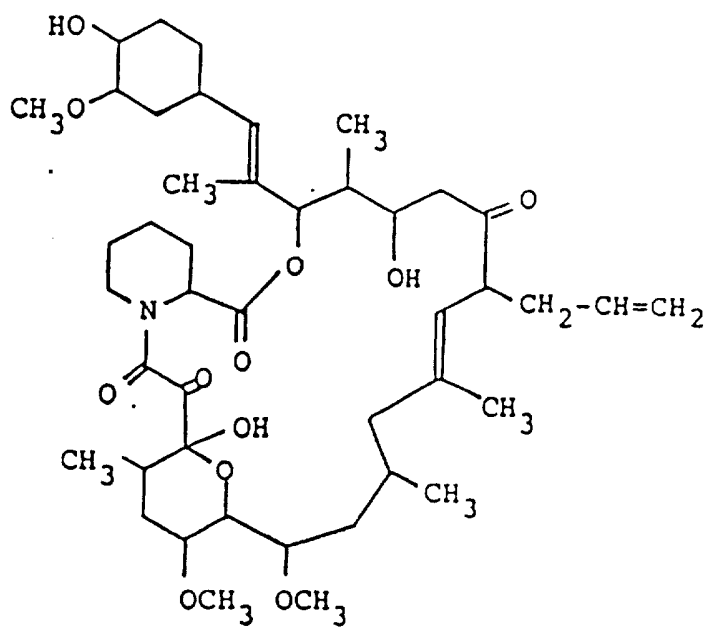
där

R^3 är allyl, då $n = 1$ och

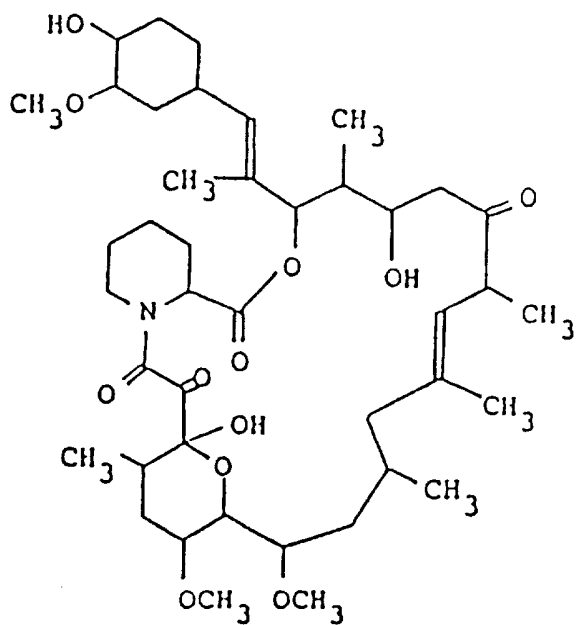
R^3 är metyl eller allyl, då $n = 2$,

k ä n n e t e c k n a t därav, att

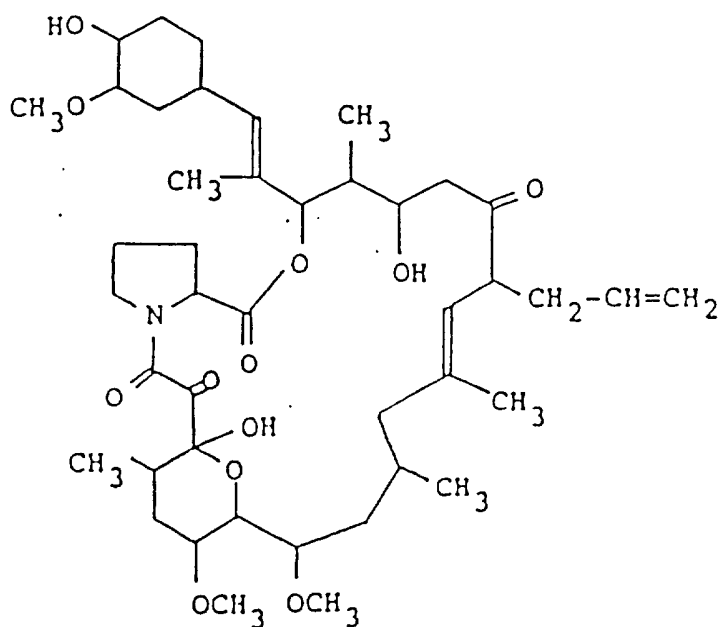
mikro-organismen Streptomyces tsukubaensis (FERM BP-927) eller Streptomyces hygrosopicus subsp. yakushimaensis (FERM BP-928) odlas i ett näringsmedium och en förening FR-900506 med formeln



och/eller en förening FR-900523 med formeln



och/eller en förening FR 900525 med formeln



tillvaratas.

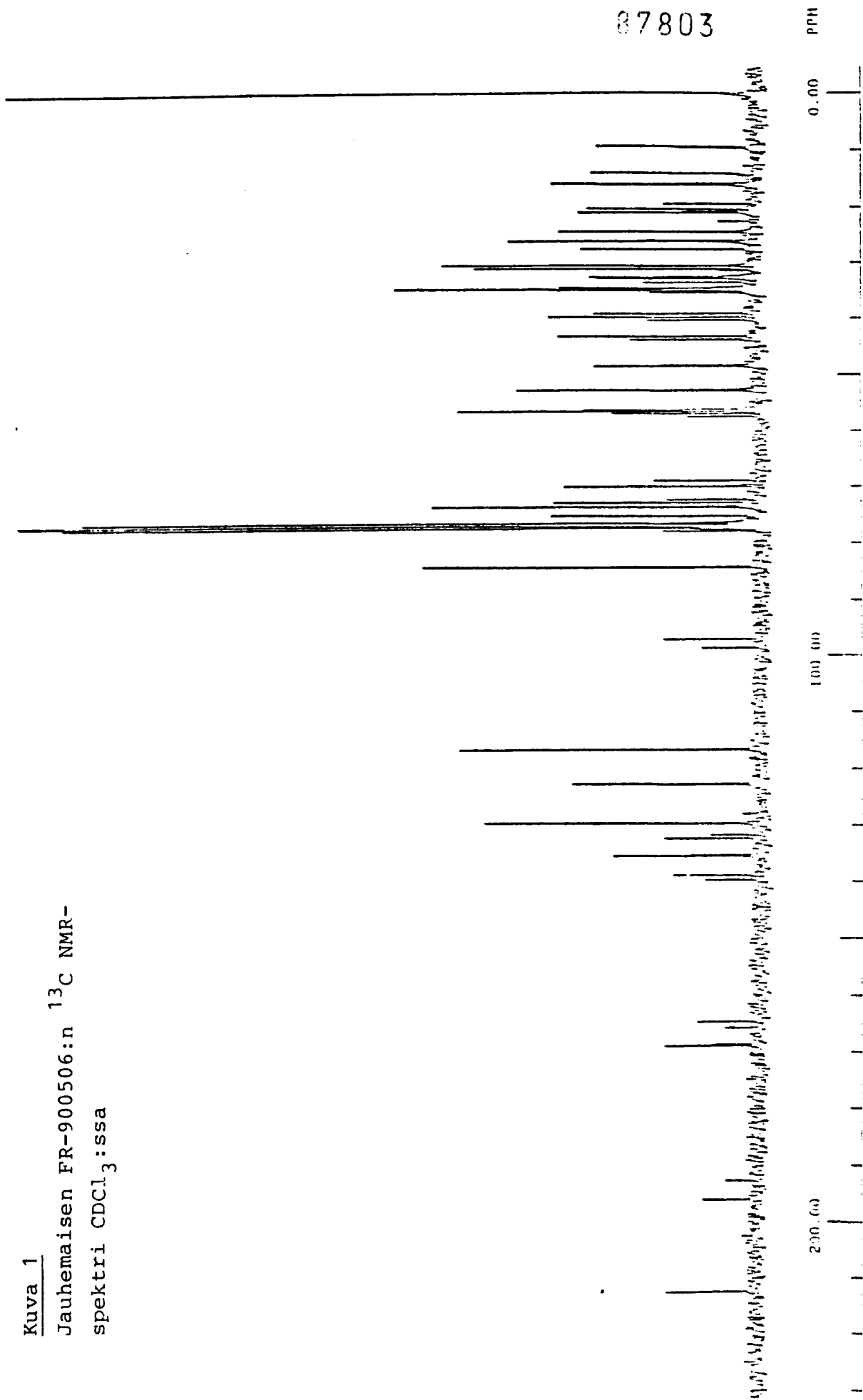
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att föreningen FR-900506 producerande stammen av Streptomyces tsukubaensis [No 9993 (FERM BP-927)] odlas i ett näringsmedium och föreningen FR-900506 tillvaratas.

4
P
B
O
N
S
O
O

000033 030704

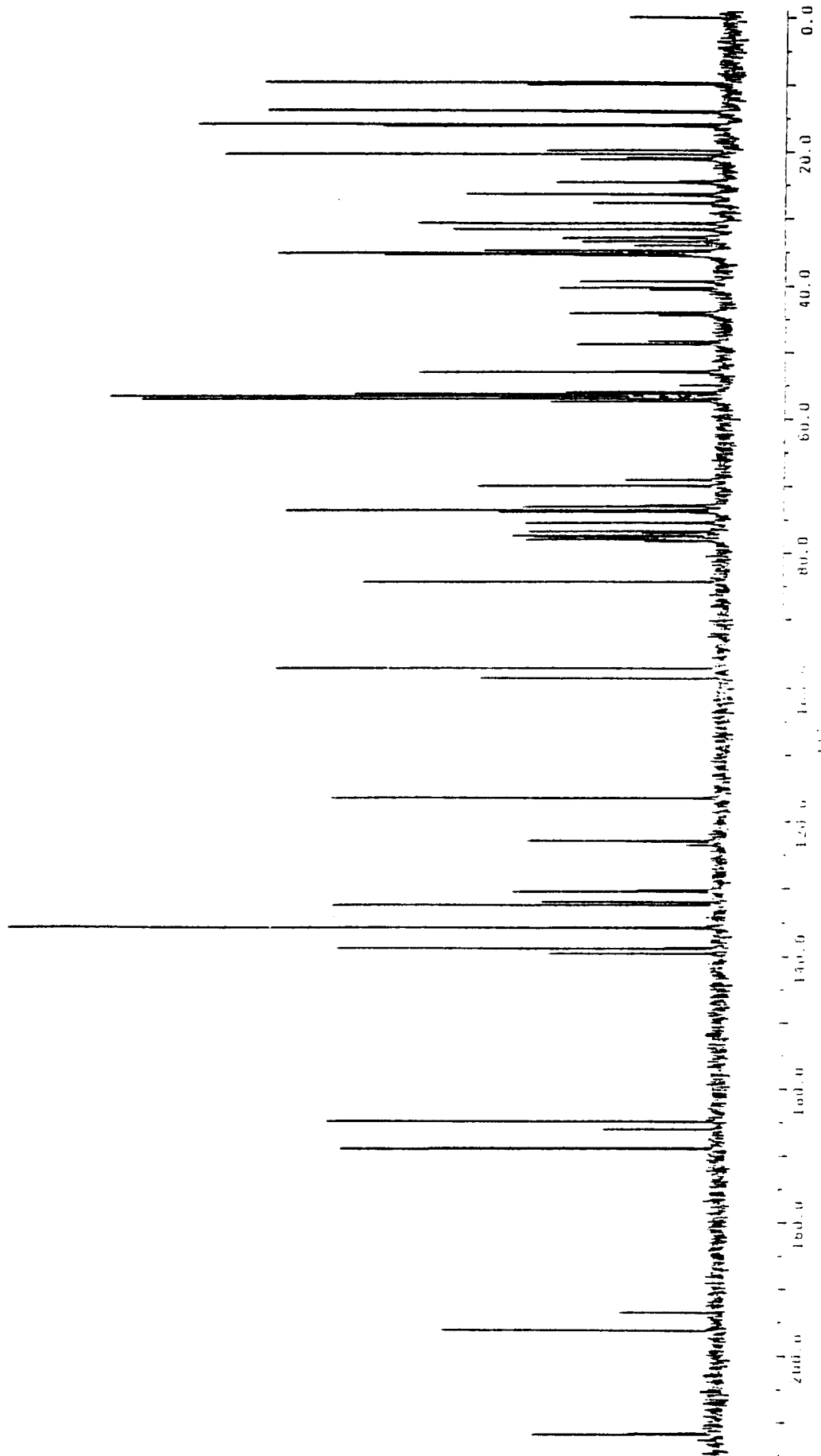
Kuva 1

Jauhemaisen FR-900506:n ^{13}C NMR-
spektri CDCl_3 :ssa



09.03.82 87803

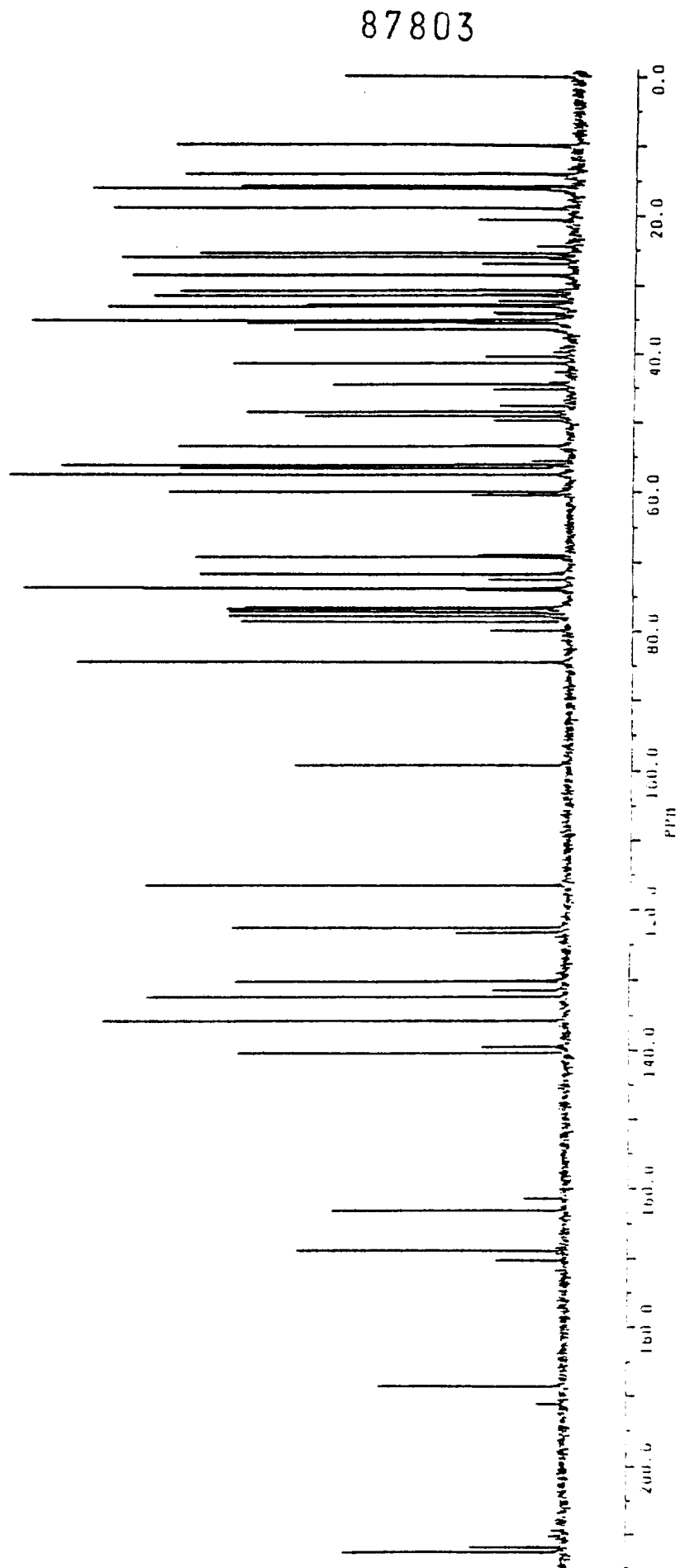
Kuva 3 Kiteisen FR-900506:n ^{13}C NMR-spektri CDCl_3 :ssa



090933 87803

Kuva 5

FR-900525:n ^{13}C NMR-spektri CDCl_3 :ssa



090902 084701

Kuva 8 FR-900520:n ^1H NMR-spektri CDCl_3 :ssa

