

SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤ Int. Cl.³: C 07 H 15/24
C 12 P 19/56

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

634 079

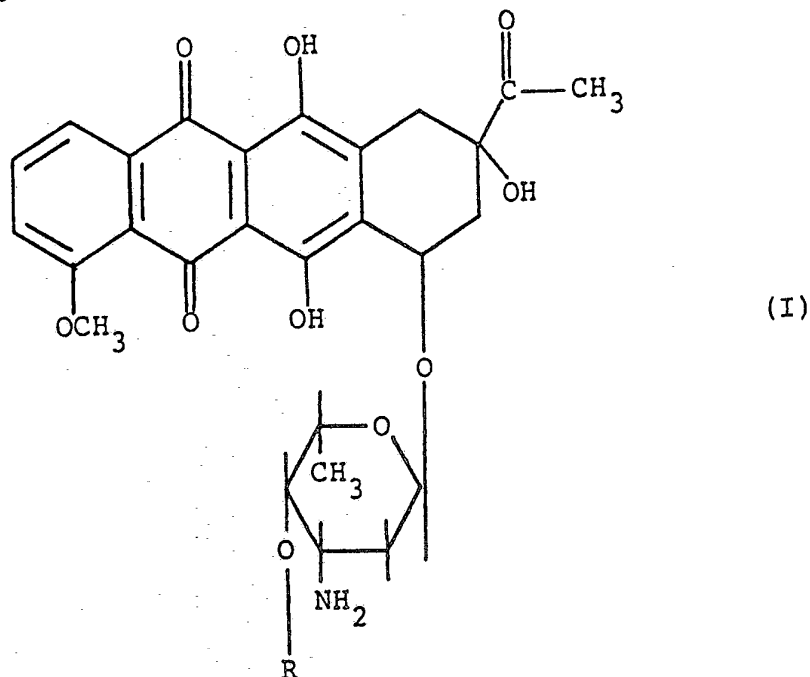
<p>⑲ Gesuchsnummer: 6658/77</p> <p>⑳ Anmeldungsdatum: 31.05.1977</p> <p>⑳ Priorität(en): 31.05.1976 JP 51-63810</p> <p>㉔ Patent erteilt: 14.01.1983</p> <p>④⑤ Patentschrift veröffentlicht: 14.01.1983</p>	<p>⑦③ Inhaber: Zaidan Hojin Biseibutsu Kagaku Kenkyukai, Shinagawa-ku/Tokyo (JP)</p> <p>⑦② Erfinder: Hamao Umezawa, Nerima-ku/Tokyo (JP) Masaaki Ishizuka, Ohta-ku/Tokyo (JP) Taiji Inui, Chigasaki-shi/Kanagawa-ken (JP) Tomio Takeuchi, Shinagawa-ku/Tokyo (JP) Hirosho Naganawa, Ohta-ku/Tokyo (JP) Masa Hamada, Tokyo (JP) Toshikazu Oki, Kamakura-shi/Kanagawa-ken (JP)</p> <p>⑦④ Vertreter: Bovard & Cie., Bern</p>
--	---

⑤④ **Verfahren zur Herstellung eines neuen Anthracyclinglycosids.**

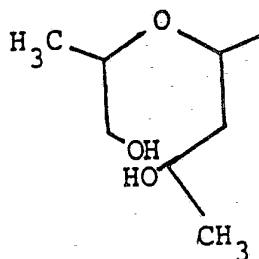
⑤⑦ Es wird ein neues Antibiotikum vom Typ der Anthracyclin-glycoside, das als Baumycin bezeichnet wird, durch Fermentation eines Streptomycin-Stammes, Streptomyces coeruleorubidus ME 130-A4, ATCC 31276 und anderer im Anspruch 1 genannter Stämme hergestellt. Das Antibiotikum und vier bioaktive Komponenten desselben, bezeichnet als Baumycin A₁, A₂, B₁ und B₂, sind geeignet als bakterizides Mittel und als Antitumormittel.

PATENTANSPRÜCHE

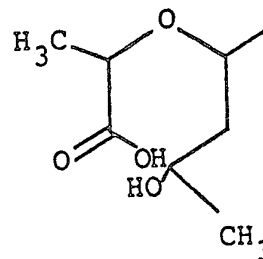
1. Verfahren zur Herstellung eines neuen Anthracyclinglycosids der Formel



worin R



oder



bedeutet, sowie eines nicht-toxischen Säureadditionssalzes davon, dadurch gekennzeichnet, dass einer der folgenden Streptomycin-Stämme in einem wässrigen Nährmedium unter submersen, aeroben Bedingungen kultiviert wird: *Streptomyces coeruleorubidus* ME 130-A4 (ATCC 31276), *Streptomyces peuceticus* subspecies *carneus* ATCC 21354, *Streptomyces coeruleorubidus* ATCC 13740, *Streptomyces peuceticus* subspecies *caestus* NRRL B-5337, *Streptomyces peuceticus* NRRL B-3826 oder *Streptomyces coeruleorubidus* NRRL B-3045, und die Verbindung daraus isoliert wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Verbindung der Formel I A) gewonnen wird, die die folgenden Eigenschaften aufweist:

- Schmelzpunkt 182 bis 185°C,
- spezifische Rotation $[\alpha]_D^{20} + 150^\circ$, $c = 0,1$ CHCl₃,
- die folgenden R_f-Werte, bestimmt durch Kieselsäure-Dünnschicht-Chromatographie:

- Im Lösungsmittelsystem Chloroform:Methanol im Volumenverhältnis 10:1, R_f = 0,25;
- im Lösungsmittelsystem Chloroform:Methanol:Benzol im

Volumenverhältnis 7:3:3, R_f = 0,39;

- im Lösungsmittelsystem Chloroform:Methanol:Ameisensäure im Volumenverhältnis 90:10:1, R_f = 0,26 und
- im Lösungsmittelsystem Chloroform:Methanol:Essigsäure im Volumenverhältnis 80:20:40, R_f = 0,74; und

d) eine charakteristische C¹³ NMR-Absorptionsspitze bei 106,7 ppm, entsprechend CDCl₃, wenn eine Lösung in CDCl₃ bei einer Konzentration von 27 mg der Substanz / 0,5 ml CDCl₃ vorliegt, bestimmt mittels Varian XL-100 Instrument bei 25,2 MHz.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Verbindung der Formel I A) hergestellt wird mit den folgenden Merkmalen:

- Schmelzpunkt 185 bis 189°C
- spezifische Rotation $[\alpha]_D^{20} + 135^\circ$, $c = 0,1$, CHCl₃,
- die folgenden R_f-Werte, bestimmt durch Kieselsäure-Dünnschicht-Chromatographie:

- Im Lösungsmittelsystem Chloroform:Methanol im Volumenverhältnis 10:1, R_f = 0,08;

2. im Lösungsmittelsystem Chloroform:Methanol:Benzol im Volumenverhältnis 7:3:3, $R_f = 0,28$;

3. im Lösungsmittelsystem Chloroform:Methanol:Ameisensäure im Volumenverhältnis 90:10:1, $R_f = 0,17$ und

4. im Lösungsmittelsystem Chloroform:Methanol:Essigsäure im Volumenverhältnis 80:20:4, $R_f = 0,64$; und

d) eine charakteristische $C^{13}NMR$ -Absorptionsspitze bei 101,6 ppm, entsprechend $CDCl_3$, wenn eine Lösung in $CDCl_3$ bei einer Konzentration von 44 mg der Substanz Baumycin / 0,6 ml $CDCl_3$ vorliegt, bestimmt mittels Varian XL-100 Instrument bei 25,2 MHz.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Verbindung der Formel I B) hergestellt wird, die die folgenden Merkmale hat:

a) Schmelzpunkt 181 bis 189°C,

b) die folgenden R_f -Werte, bestimmt durch Kieselsäure-Dünnschicht-Chromatographie:

1. Im Lösungsmittelsystem Chloroform:Methanol im Volumenverhältnis 10:1, $R_f = 0,07$;

2. im Lösungsmittelsystem Chloroform:Methanol:Benzol im Volumenverhältnis 7:3:3, $R_f = 0,39$;

3. im Lösungsmittelsystem Chloroform:Methanol:Ameisensäure im Volumenverhältnis 90:10:1, $R_f = 0,18$ und

4. im Lösungsmittelsystem Chloroform:Methanol:Essigsäure im Volumenverhältnis 80:20:4, $R_f = 0,64$; und

c) eine charakteristische $C^{13}NMR$ -Absorptionsspitze bei 107,1 ppm, entsprechend Tetramethylsilan, wenn eine Lösung in $CDCl_3$:Methanol im Volumenverhältnis 5:1 bei einer Konzentration von 45 mg Baumycin B1/0,6 ml, bestimmt mittels Varian XL-100 Instrument bei 25,2 MHz, vorliegt.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Verbindung der Formel I B) hergestellt wird, die die folgenden Merkmale aufweist:

a) Schmelzpunkt 197 bis 201°C

b) die folgenden R_f -Werte, bestimmt durch Kieselsäure-Dünnschicht-Chromatographie:

5 1. Im Lösungsmittelsystem Chloroform:Methanol im Volumenverhältnis 10:1, $R_f = 0,01$;

2. im Lösungsmittelsystem Chloroform:Methanol:Benzol im Volumenverhältnis 7:3:3, $R_f = 0,14$;

3. im Lösungsmittelsystem Chloroform:Methanol:Ameisensäure im Volumenverhältnis 90:10:1, $R_f = 0,10$ und

4. im Lösungsmittelsystem Chloroform:Methanol:Essigsäure im Volumenverhältnis 80:20:4, $R_f = 0,30$; und

c) eine charakteristische $C^{13}NMR$ -Absorptionsspitze bei 102,1 ppm, entsprechend Tetramethylsilan, wenn eine Lösung in $CDCl_3$:Methanol im Volumenverhältnis 1:1 bei einer Konzentration von 30 mg der Substanz Baumycin B2/0,6 ml vorliegt, bestimmt mittels Varian XL-100 Instrument bei 25,2 MHz.

20

6. Verfahren zur Herstellung eines Deoxyribonukleinsäurekomplexes einer Verbindung der Formel I, definiert im Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Verfahren des Anspruchs 1 eine Verbindung der Formel I

25

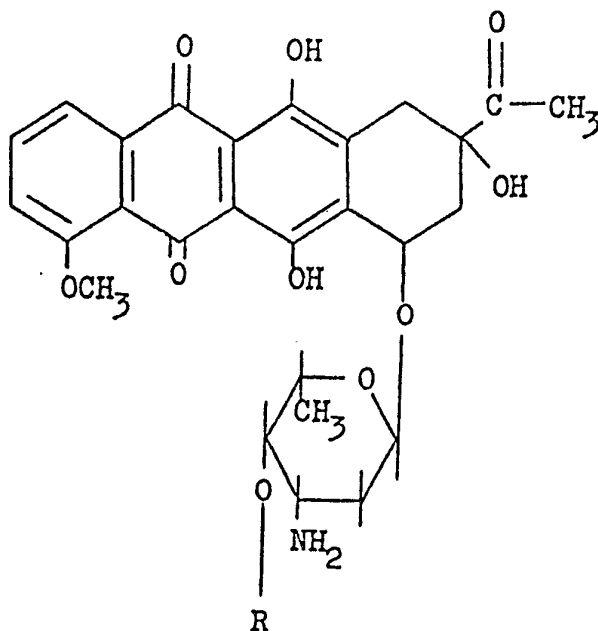
30

35

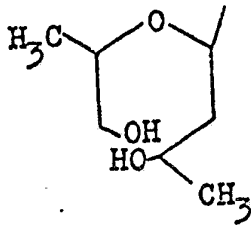
40

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines neuen Anthracyclinglycosids, das im folgenden auch Baumycin genannt wird und das vorteilhafte antibiotische Eigenschaften zur Behandlung von bakteriellen Infektionen und zur Verhinderung von Tumoren bei Säugetieren aufweist. Von diesem Baumycin-Komplex wurden vier spezielle bioaktive Komponenten isoliert, die im folgenden bezeichnet werden als Baumycin A₁, A₂, B₁ und B₂.

Das neue Anthracyclinglycosid hat die Formel

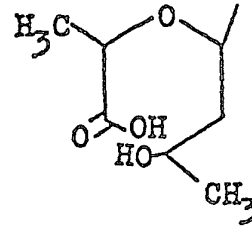


worin R darstellt



A)

oder



B)

oder ein nicht-toxisches Additionssalz derselben.

Das erfindungsgemässe Verfahren zur Herstellung des neuen Anthracyclinglycosids der Formel I A) bzw. I B) ist dadurch gekennzeichnet, dass einer der folgenden Streptomycin-Stämme in einem wässrigen Nährmedium unter submersen, aeroben Bedingungen kultiviert wird: *Streptomyces coeruleorubidus* ME 130-A4 ATCC 31276), *Streptomyces peuceticus* subspecies *carneus* ATCC 21354, *Streptomyces coeruleorubidus* ATCC 13740, *Streptomyces peuceticus* subspecies *caestus* NRRL B-5337, *Streptomyces peuceticus* NRRL B-3826 oder *Streptomyces coeruleorubidus* NRRL B-3045, und die Verbindung daraus isoliert wird. Ausser ATCC 31276 und NRRL B-3045 waren die vorgenannten Mikroorganismen vor dem 31. Mai 1976 der Öffentlichkeit zugänglich und gehören somit zum Stand der Technik.

Wie weiterhin gefunden wurde, kann jedes der beiden Baumycin A und B aufgetrennt werden in zwei bioaktive Stereoisomere und daher werden durch die obige Formel I A) die isomeren Baumycin A₁ und A₂ und durch die Formel I B) die Isomeren B₁ und B₂ dargestellt. Wenn im folgenden daher die Bezeichnung Baumycin verwendet wird, soll darunter mindestens eines der vorgenannten Baumycin A₁, A₂, B₁ und B₂ verstanden werden.

Gemäss der vorliegenden Erfindung wurde ein besonders bevorzugter Baumycin produzierender Stamm isoliert, aus einer Bodenprobe, die beim Institute of Microbial Chemistry, Osaki, Tokyo, Japan, gefunden wurde und der bezeichnet wurde als Stamm ME 130-A4. Kulturen dieses Stammes sind am 27. April 1976 deponiert worden beim American Type Culture Collection, 12301 Parklawn-Drive, Rockville, Maryland unter der Bezeichnung ATCC 31276. Der Mikroorganismus NRRL B-3045 wurde am 18. Nov. 1976 beim Northern Regional Research Center of the US Dept. of Agriculture deponiert und war der Öffentlichkeit von diesem Datum an zugänglich.

Der Stamm ME 130-A4 hat die folgenden Eigenschaften:

1. Morphologische Eigenschaften:

Unter dem Mikroskop werden offene Spiralen und Haken beobachtet, die sich gut von dem verzweigten Substrat Mycelium entwickeln.

Keine Wirbel und Reifensporenkette ist mässig lang mit mehr als 10 Sporen. Die Sporen messen 0,6 bis 0,8 $\mu \times$ 1,0 bis 1,2 μ und ihre Oberfläche ist stachelig.

2. Wachstum auf verschiedenen Medien:

Die Beschreibung in Klammern entspricht dem Farbstandard «Color Harmony Manual», veröffentlicht von Container Corporation of America, USA.

a) Auf Glycerin-Asparagin Agar (ISP Medium Nr. 5), bebrütet bei 27°C: hellrötlich-gelbes bis schwarzrotes Wachstum (4 ic, Pastellorange bis 6 ½ nc, Catchup); hellgrau (17 ge, staubiges Was-

15 serblau bis 19 fe, Wassergrau) Luftmycelium; hellrötlich-gelbes lösliches Pigment.

b) Auf Sucrosenitrat Agar, bebrütet bei 27°C: hellrötlich-gelbes, hellgelbes bis schwarz-rotes Wachstum (6 ½ le, Cedar) hellweisses Luftmycelium; hell-dunkelrotes lösliches Pigment.

c) Auf Glucose-Asparagin Agar, bebrütet bei 27°C: farbloses, blass-gelbes bis blass-oranges Wachstum; leicht weisses bis hellgraues Luftmycelium, das nach 14 Tagen Bebrütung reichlich wird; kein lösliches Pigment.

d) Auf Stärke-anorganischem Salzagar (ISP Medium Nr. 4), bebrütet bei 27°C: hellgelblich-braunes bis hellrötlich-gelbes Wachstum; leicht graues (19 dc, Wassergrau) Luftmycelium; kein lösliches Pigment.

e) Auf Tyrosin Agar (ISP Medium Nr. 7), bebrütet bei 27°C: gräulich-rotbraunes bis braunes Wachstum (4 ni, Chestnut Braun); blauweisses bis hellblaues Luftmycelium (19 dc, Wassergrau); dunkelbraunes lösliches Pigment.

f) Auf Nähr-Agar, bebrütet bei 27°C: gelblich-braunes Wachstum; weisses Luftmycelium; braunes lösliches Pigment.

g) Auf Hefeextrakt-Malzextrakt Agar (ISP Medium Nr. 2), bebrütet bei 27°C: trüb-oranges Wachstum (5 ne, Tile Red); hellgraues (19 fe, Aqua Gray) Luftmycelium; hellbraunes lösliches Pigment.

h) Auf Hafermehl Agar (ISP Medium Nr. 3), bebrütet bei 27°C: farbloses bis helloranges Wachstum; hellgraues (19 fe, Aqua Gray); Luftmycelium; kein lösliches Pigment.

i) Auf Glycerol-Nitrat Agar, bebrütet bei 27°C: farbloses bis helloranges Wachstum; weisses bis hellgraues Luftmycelium, kein lösliches Pigment.

j) Auf Stärkeagar, bebrütet bei 27°C: helloranges Wachstum, weisses bis hellgraues Luftmycelium, das bei 14tägiger Bebrütung schwach ist, leicht helloranges lösliches Pigment.

k) Auf Kalziummaleat Agar, bebrütet bei 27°C: farbloses, schwach oranges bis trüb oranges Wachstum, weisses bis hellgraues Luftmycelium (17 ge, Dusty Aqua Blue); leicht rosa; lösliches Pigment.

l) Auf Cellulose, bebrütet bei 27°C: farbloses Wachstum, weisses bis trüb blaugrünes Wachstum, kein Luftmycelium.

m) Auf Gelatine, bebrütet bei 20°C: leicht gelblich-braunes Wachstum, kein Luftmycelium, leicht braunes lösliches Pigment.

n) Auf Glucose-Pepton-Gelatine, bebrütet bei 27°C: hellgelblich-braunes bis gelblich-braunes Wachstum, leicht weisses Luftmycelium, dunkelbraunes, lösliches Pigment.

o) Auf entrahmter Milch, bebrütet bei 27°C: fahl-gelblich-braunes, gelblich-braunes bis hellgelbliches Wachstum, leicht weisses Luftmycelium, braunes lösliches Pigment.

3. Physiologische Eigenschaften:

- a) Die Wachstumstemperatur wurde auf Glucose-Asparagin Agar bei 20, 24, 27, 30, 37 und 50°C geprüft, wobei die optimale Temperatur bei ca. 30 bis 37°C liegt.
- b) Gelatine-Verflüssigung auf 15%iger Gelatine bei 20°C und auf Glucose-Keton-Gelatine bei 27°C: auf dem letzteren Medium wurde eine schwache Gelatineverflüssigung nach 20 Tagen Bebrütung beobachtet, auf dem letzteren begann die Verflüssigung schwach oder mittelmässig nach 14 Tagen der Bebrütung.
- c) Stärkehydrolyse auf Stärke-anorganischem Salz-Agar und auf Stärkeagar bei 27°C: nach dreitägiger Bebrütung wurde auf dem ersten Medium eine starke Hydrolyse und nach fünftägiger Bebrütung auf dem letztgenannten Medium beobachtet.
- d) Peptonisierung und Koagulation von entrahmter Milch bei 37°C: Nach siebentägiger Bebrütung begann eine schwache Peptonisierung und die Koagulation war beendet nach ungefähr 10 bis 14 Tagen.
- e) Melanin-Bildung auf Trypton-Hefeextraktbrühe (ISP Medium Nr. 1) auf Keton-Hefeextrakt, eisenhaltigem Agar (ISP Medium Nr. 6) und auf Tyrosin-Agar (ISP Medium Nr. 7) bei 27°C: positiv in allen Medien.
- f) Verwendung von Carbohydraten des Pridham-Gottlieb Grundmediums (ISP Medium Nr. 9), bebrütet bei 27°C: reichliches Wachstum mit Glucose, L-Arabinose, D-Xylose, Sucrose, Raffinose.
- g) Verflüssigung von Kalziummaleat auf Kalziummaleat-Agar bei 27°C: nach dreitägiger Bebrütung wurde um das Wachstum eine starke bis mittlere Verflüssigung beobachtet.
- h) Nitratreduktion auf Pepton-Wasser enthaltend 1% Natriumnitrat (ISP Medium Nr. 9), bebrütet bei 27°C: negativ.

Aus den vorstehenden Charakteristiken ergibt sich für den Stamm Nr. ME 130-A4, dass er zu der Gattung Streptomyces gehört. Das Luftmycelium bildet offene Spiralen, aber keine Wirbel. Die Sporenoberfläche ist stachelig. Das Wachstum auf verschiedenen Medien kann hellorange bis dunkelrot sein, und das Luftmycelium ist leicht grau. Es wird ein leicht helloranges lösliches Pigment produziert. Die Melaninbildung ist positiv. Die proteolytische Wirkung ist schwach bis mittelmässig und die Stärkehydrolyse ist stark. Unter bekannten Species von Streptomyces ähnelt der Stamm Nr. ME 130-A4 Actinomyces coeruleorubidus, unter Berücksichtigung der oben aufgeführten Eigenschaften. (Referenz 1: International Journal of Systematic Bacteriology, 18, 312, 1968; Referenz 2: G.F. Gause, Zur Klassifizierung der Actinomyceten, Seite 98 Veb. Guotab Fischer Verlag Jena, 1958.)

Der Stamm ME 130-A4 und Act. coeruleorubidus ISP 5145 wurden durch Parallelkulturen verglichen. Die folgenden Ergebnisse wurden erhalten:

	ME 130-A4	Act. coeruleorubidus ISP 5145
Spiralen	positiv	positiv
Sporenoberfläche	stachelig	stachelig
Luftmycelium	leicht grau	leicht grau
Wachstum	fahl orange dunkelrot	fahl gelblich braun bis dunkelrot

	ME 130-A4	Act. coeruleorubidus ISP 5145
Melaninbildung		
5 ISP Medium Nr. 1	positiv	positiv
ISP Medium Nr. 6	positiv	positiv
ISP Medium Nr. 7	positiv	positiv
Stärkehydrolyse	positiv	positiv
Koagulation von Milch	positiv	positiv
10 Peptonisierung von Milch	positiv	positiv
Verflüssigung von Gelatine	positiv	positiv
Nitratreduktion	negativ	positiv
15 Verwendung von Kohlehydraten		
Glucose	positiv	positiv
L-Arabinose	positiv	positiv
20 D-Xylose	positiv	positiv
D-Fructose	positiv	positiv
Sucrose	positiv	positiv
Inositol	positiv	positiv
L-Rhamnose	positiv	positiv
25 Raffinose	positiv	positiv
D-Mannitol	positiv	positiv
optimale Temperatur für das Wachstum	um 37°C	um 37
produzierte Antibiotika	Baumycin Daunomycin	Rubidomycin (Daunomycin)*
30		

* (Reference Journal of Pharmaceutical Science, 56, 1691 p, 1967.

35 Aus diesen Ergebnissen ergibt sich, dass der vorliegende Stamm ME 130-A4 sehr eng übereinstimmt mit Actinomyces coeruleorubidus in seinen morphologischen und physiologischen Eigenschaften. Es besteht nur ein kleiner Unterschied in der Farbe des Wachstums, wobei der Stamm ME 130-A4 ein wenig mehr rot ist als Act. coeruleorubidus.

40 Entsprechend der Referenz 2 ist die Reduktion durch St. coeruleorubidus variabel, in Abhängigkeit von dem Stamm dieser Species. So kann der Stamm Nr. ME 130-A4 identifiziert werden als neuer Stamm von Streptomyces coeruleorubidus.

45 Da die Streptomyces leicht, natürlich oder künstlich mutierbar sind, schliessen die S. coeruleorubidus Nr. ME 130-A4 und die anderen Baumycin produzierenden Streptomyces der vorliegenden Erfindung die typischen oben beschriebenen Stämme und alle natürlichen und künstlichen Baumycin produzierenden Varianten und Mutanten derselben ein.

Die erfindungsgemässe Herstellung der Verbindungen der Formel I wird durchgeführt durch die Kultivierung eines 50 Baumycin produzierenden Stammes von Streptomyces in einem üblichen wässrigen Nährmedium, enthaltend bekannte Nährquellen für Actinomyces, d.h. Quellen für Kohlenstoff, Stickstoff und anorganische Salze. Für die Herstellung von Baumycin werden bevorzugt submerse, aerobe 55 Kulturen verwendet, ebenso wie für andere Antibiotika. Auch die allgemeinen Verfahren, die für die Kultivierung von anderen Actinomycetes verwendet werden, sind beim Verfahren der vorliegenden Erfindung anwendbar. Das Medium enthält vorzugsweise im Handel verfügbare Kohlenstoffquellen wie Glycerin, Glucose, Stärke, Dextrin, Sucrose, 60 Maltose, Öle, Fette und dergleichen, in entweder gereinigtem oder rohem Zustand und im Handel verfügbare Stickstoffquellen wie Soyabohnenpulver, Hefeextrakt, Peptone,

Baumwollsaamenpulver, getrocknete Hefe, gequollene Getreideflüssigkeit und anorganische Salze wie Ammoniumsulfat, Natriumnitrat oder Ammoniumchlorid. Anorganische Salze wie Natriumchlorid, Kaliumchlorid oder Phosphate werden bevorzugt verwendet und falls erforderlich, können auch Spuren, Metalle, Entschäumungsmittel, wie Adekanol (Warenzeichen Asahi Denka Ind. Co.) oder Silicone (Warenzeichen der Shinetsu Chem. Ind. Co.) verwendet werden. Die Kultivierungstemperatur sollte im Bereich von etwa 20 bis 35°C, vorzugsweise 25 bis 30°C liegen. Die Produktion von Baumycyn in der Kulturbrühe, entweder in einer Schüttelflasche oder bei submerser, aerober Fermentation mit Belüftung und Rühren, erreicht ein Maximum nach 3 bis 7 Tagen, wie dies in den unten aufgeführten Beispielen gezeigt wird.

Die nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten Baumycyn-Verbindungen können aus der Kulturbrühe abgetrennt und nach einem der folgenden Verfahren gewonnen werden.

Das durch Fermentation erfolgte Baumycyn kommt sowohl intrazellulär als auch extrazellulär vor, wird jedoch hauptsächlich im Mycelium gefunden. Für Gewinnung des Baumycyn-Komplexes aus der Kulturbrühe kann die Brühe filtriert werden und das Filtrat dann mit einem mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel, wie Äthylacetat, Butylacetat, Chloroform oder n-Butanol extrahiert werden. Das Baumycyn im Mycelium kann durch Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel wie Chloroform, Aceton, n-Butanol, Methanol, Äthanol, Äthylacetat oder Methyläthylketon oder einer wässrigen Lösung einer organischen oder anorganischen Säure wie Salzsäure, Schwefelsäure oder Essigsäure gewonnen werden. Andererseits kann Baumycyn direkt aus der Kulturbrühe durch die oben erwähnte Extraktion mit oder ohne Abtrennung des Myceliums gewonnen werden. Nach dem Einengen in dem Vakuum kann der Baumycyn-Extrakt nochmals extrahiert werden mit einem mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel bei einem pH von 7 bis 9 und das dann in einer sauren wässrigen Lösung mit einem pH von kleiner als 4 gelöste Baumycyn wird dann wieder extrahiert mit einem organischen Lösungsmittel, nachdem auf ein schwach basisches pH eingestellt wurde. Durch Wiederholen der vorgenannten Verfahren nach Bedarf, kann der Baumycyn-Komplex in gereinigter Form hergestellt werden. Als Alternative zu dieser Lösungsmittel-Extraktion oder in Kombination mit diesem Verfahren kann Baumycyn aus einer Kulturbrühe durch Kolonnen-Chromatographie unter Verwendung von Adsorbentien wie aktivierte Kohle, Aluminiumoxid, Kieselsäure oder einem modifizierten Dextran wie das im Handel erhältliche Produkt unter dem Warenzeichen Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemical Co., New York, New York) durch gegenseitige Verteilung oder Flüssigchromatographie unter Verwendung von geeigneten Lösungsmitteln gewonnen werden. Die nach diesen Verfahren erhaltenen aktiven Extrakte werden unter vermindertem Druck eingeeengt und es wird ein rohes, rotes Pulver des Baumycyn-Komplexes erhalten.

Um die einzelnen Baumycyn-Komponenten A₁, A₂, B₁ und B₂ aus dem Baumycyn-Komplex zu erhalten, kann eine wei-

tere Reinigung und Abtrennung durchgeführt werden unter Verwendung üblicher Trenntechniken wie Kolonnenchromatographie unter Verwendung von verschiedenen Adsorbentien wie Kieselsäure, modifiziertes Dextran (z.B. Sephadex LH-20), schwach sauren Ionenaustauschharzen oder aktivierter Kohle, gegenseitige Verteilung oder flüssige Chromatographie unter Verwendung von geeigneten Lösungsmitteln oder eine Kombination von einem oder mehr der vorgenannten Verfahren. Nach dem geeigneten Trennverfahren kann beispielsweise der Baumycyn-Komplex in einer kleinen Menge Chloroform gelöst werden, einer Kolonnenchromatographie über Kieselsäure unterworfen und dann einem geeigneten organischen Lösungsmittel wie Chloroform-Methanol unterworfen werden, wobei die Baumycyn-Komponenten A₁, A₂, B₁ und B₂ erhalten werden. Die aktiven Eluate werden getrennt, unter vermindertem Druck eingeeengt und die einzelnen Baumycyn-Komponenten chromatographisch oder über Sephadex LH-20 gereinigt. Nach Konzentrierung der aktiven Eluate kann das Baumycyn A₁, A₂, B₁ und B₂ in geeigneter kristalliner Form durch Umkristallisation aus einem geeigneten organischen Lösungsmittel gewonnen werden.

Im folgenden werden die physiochemischen Eigenschaften von Baumycyn A₁, A₂, B₁ und B₂ beschrieben.

25 Beschreibung der Zeichnungen:

Fig. 1 Absorptionsspektrum im Ultraviolett- und sichtbaren Licht von Baumycyn A₁ in Methanol

Fig. 2 Infrarotspektrum von Baumycyn A₁, wenn es in Kaliumbromid pelletiert wird.

Fig. 3 NMR-Spektrum von Baumycyn A₁ in CDCl₃ (100 MHz).

Fig. 4 Absorptionsspektrum im Ultraviolett- und sichtbaren Licht von Baumycyn A₂ in Methanol.

Fig. 5 Infrarotspektrum von Baumycyn A₂, pelletiert in Kaliumbromid.

Fig. 6 NMR-Spektrum von Baumycyn A₂ in CDCl₃ (100 MHz).

Fig. 7 Absorptionsspektrum im Ultraviolett- und sichtbaren Licht von Baumycyn B₁ in Methanol.

Fig. 8 Infrarotspektrum von Baumycyn B₁, pelletiert in Kaliumbromid.

Fig. 9 NMR-Spektrum von Baumycyn B₁ in einer Mischung von CDCl₃ und CD₃OD (100 MHz).

Fig. 10 Absorptionsspektrum im Ultraviolett- und sichtbaren Licht von Baumycyn B₂ in Methanol.

Fig. 11 Infrarotabsorptionsspektrum von Baumycyn B₂, pelletiert in Kaliumbromid.

Fig. 12 NMR-Spektrum von Baumycyn B₂ in einer Mischung von CDCl₃ und CD₃OD (100 MHz).

Fig. 13 Feld-Desorptionsmassenspektrum von Baumycyn A₁ (Emitter Strom: 11 mA).

Fig. 14 Feld-Desorptionsmassenspektrum von Baumycyn A₂ (Emitter Strom: 12 mA).

Fig. 15 Feld-Desorptionsmassenspektrum von Baumycyn B₁ Methylester-Derivat (Emitter Strom: 14 mA).

Fig. 16 Feld-Desorptionsmassenspektrum von Baumycyn B₂ Methylester-Derivat (Emitter Strom: 14 mA).

Baumycyn	A ₁				A ₂			
Erscheinungsform	schwach basisches amorphes Pulver							
Elementaranalyse	C	H	N	O	C	H	N	O
gefunden	59.85	6.65	2.04	29.83	60.27	6.72	2.31	29.52
berechnet	60.61	6.43	2.08	30.88	60.61	6.43	2.08	30.88

Baumycin	A ₁	A ₂
Empirische Formel	C ₃₄ H ₄₃ NO ₁₃	
Molekulargewicht	673.7	
Schmelzpunkt (°C)	182-185	185-189
spezifische Rotation [α] _D ²⁰	+ 150°	+ 135°
	(CHCl ₃ , C = 0.1)	
Löslichkeit	Löslich in angesäuertem Wasser, DMSO, Methylcellulose, Methanol, Äthanol, n-Propanol, n-Butanol, Äthylacetat, Butylacetat, Aceton, Methyläthylketon, Methylenchlorid und Chloroform. Unlöslich in Wasser, n-Hexan, Cyclohexan und Petroläther.	
R _f -Werte**		
*C:M = 10:1	0.25	0.08
C:M:B = 7:3:3	0.39	0.28
C:M:F = 90:10:1	0.26	0.17
C:M:A = 80:20:4	0.74	0.64
Reaktion	saure wässrige und Methanollösung ist rot und schlägt im alkanischen Medium nach rötlich-purpur um. Baumycin A ₁ und A ₂ ergibt eine positive Ninhydrinreaktion und reduziert Fehling'sche Lösung nicht.	
UV und Absorptionsspektrum in sichtbarem Licht und max. (E _{1cm} ^{1%}) in MeOH (Kurve 1)	Fig. 1 234.5 (452), 252.5 (327), 289 (120), 478 (127), 497 (128), 532 (76)	Fig. 4 234.5 (427), 252.5 (311), 289 (108), 478 (125), 497 (128), 532 (84)
in 0.1N HCl-MeOH (Kurve 2)	234.5 (459), 252.5 (326), 289 (121), 479 (133), 497 (133), 532 (78)	234.5 (447), 252.5 (311), 289 (111), 478 (131), 497 (131), 532 (70)
in 0.1N NaOH-MeOH (Kurve 3)	250.5 (416), 350 (83), 558 (164), 597 (152)	250.5 (421), 350 (80), 558 (170), 596 (164)
Infrarotabsorptionsspektrum (KBr)	Fig. 2	Fig. 5
NMR-Spektrum (PMR)	Fig. 3 (100 MHz, in CDCl ₃)	Fig. 6
***C ¹³ NMR-Spektrum	Charakteristik C-1" peak at 106.7 ppm	Charakteristik C-1" peak at 101.6 ppm

* Chloroform, Methanol, Benzol, F = Ameisensäure, A = Essigsäure

** TLC-Bedingung: Kieselsäure-Dünnschicht 60F₂₅₄ (Merck CO.) 23°C

*** Spektrum gemessen im Varian XL-100 Instrument bei 25,2 MHz. Innere Referenz ist CDCl₃ für Baumycin und TMS für Baumycin A₂.
Proben: A₁ = 27 mg/0,5 ml, CDCl₃; A₂ = 44 mg/0,6 ml CDCl₃.

Baumycin	B ₁				B ₂			
Erscheinungsform	schwach basisches amorphes Pulver							
Elementaranalyse	C	H	N	O	C	H	N	O
gefunden	57.32	6.45	2.01	32.58	56.59	5.96	1.92	31.91
berechnet	59.38	6.01	2.04	32.57	59.38	6.01	2.04	32.57
Empirische Formel	C ₃₄ H ₄₁ NO ₁₄							
Molekulargewicht	687.7							
Schmelzpunkt (°C.)	181–189				197–201			
spezifische Rotation [α] _D ²⁰	+170°				+170°			
	(CHCl ₃ :MeOH = 1:1, C = 0.1)							
Löslichkeit	löslich in angesäuertem Wasser, Methylcellulose mit Methanol, Äthanol, n-Propanol, und n-Butanol, unlöslich in Wasser, Äthylacetat, Aceton, Methylenchlorid, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Benzol, Toluol, Äthyläther und Hexan, n-Hexan, mit der Ausnahme, dass Baumycin B ₂ löslich in Wasser ist.							
R _f -Werte**								
*C:M = 10:1	0.07				0.01			
C:M:B = 7:3:3	0.39				0.14			
C:M:F = 90:10:1	0.18				0.10			
C:M:A = 80:20:4	0.64				0.30			
Reaktion	saure wässrige und Methanollösung ist rot und schlägt im alkalischen Medium nach rötlich-purpur um. Baumycin B ₁ und B ₂ ergibt eine positive Ninhydrinreaktion und reduziert Fehling'sche Lösung nicht.							
UV- und Absorptions spektrum in sicht- barem Licht und max. (E ₁ ^{1%} _{1cm}) in MeOH (Kurve 1)	Fig. 7 234.5 (552), 253 (385), 290 (132), 476 (179), 495 (181), 530 (101)				Fig. 10 234 (575), 252 (414), 290 (130), 478 (176), 495 (183), 530 (120)			
in 0.1N HCl-MeOH (Kurve 2)	234 (580), 253 (397), 290 (140), 476 (182), 495 (184), 530 (100)				234 (616), 253 (419), 290 (145), 476 (195), 494 (191), 529 (105)			
in 0.1N NaOH-MeOH (Kurve 3)	251 (453), 350 (65), 556 (206), 594 (195)				251 (499), 350 (74), 556 (231), 594 (218)			
Infrarotabsorptions- spektrum (KBr)	Fig. 8				Fig. 11			
NMR-Spektrum (PMR)	Fig. 9				Fig. 12 (100 MHz, in CDCl ₃ und CD ₃ OD Gemische)			
***C ¹³ NMR- Spektrum	Charakteristik C-1" peak at 107.1 ppm				Charakteristik C-1" peak at 102.1 ppm			

* Chloroform, Methanol, Benzol, F = Ameisensäure, A = Essigsäure

** TLC-Bedingung: Kieselsäure-Dünnschicht 60F₂₅₄ (Merck Co.) 23°C

*** Spektrum gemessen im Varian XL-100 Instrument bei 25,2 MHz. Innere Referenz ist CDCl₃ für Baumycin und TMS für Baumycin A₂.

Proben: B₁ = 45 mg/0,6 ml CDCl₃:Methanol (5:1); B₂ = 30 mg/0,6 ml CDCl₃:Methanol (1:1).

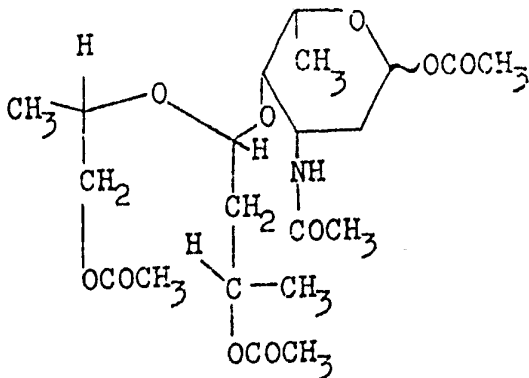
Die Strukturen der nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten Baumycin-Komponenten A₂, A₁, B₁ und B₂ wurden wie folgt bestimmt:

Durch Hydrolyse mit 0,1N Salzsäure während 30 Minuten

bei 85°C wurde aus Baumycin A₁, A₂, B₁ und B₂ Daunomycin und Daunosamin erhalten, durch teilweise Hydrolyse mit 1%iger Schwefelsäure während 15 Minuten bei 32°C Daunomycin. Die physikochemischen Eigenschaften, wie NMR, Massen- und Infrarot-Absorptionsspektren, Schmelz-

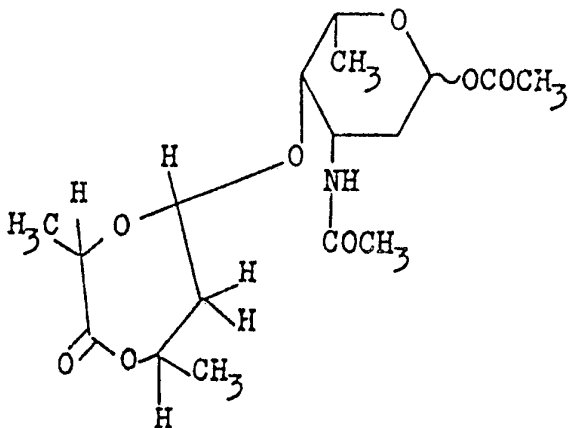
punkt und R_f -Werte von dünnen Schichten von Daunomycin, Daunosamin und Daunomycin aus Baumycin A und B durch Säurehydrolyse stimmen vollständig mit denen von authentischem Daunomycin überein. (Journal of American Chemical Society, 86, 5334-5335, 5335-5336 (1964)).

Eine weitere Aufklärung der Strukturen von Baumycin A₁ und A₂ wurden gemäss der vorliegenden Erfindung wie folgt durchgeführt: Die Hydrogenolyse von Baumycin A₂ mit Pd/BaSO₄ in Methanol ergab einen Aglycon-Anteil und einen Zuckeranteil. Durch Analyse von PMR und Massenspektrum-Daten wurde das Aglycon identifiziert als 7-Deoxydaunomycinon. Hinsichtlich des Zuckeranteils von Baumycin A₁ und A₂ wurde das Tetracetyl-Derivat, das erhalten wird durch Behandlung des Anteils (d.h. desjenigen von A₁ oder A₂) mit Essigsäureanhydrid in Pyridin, analysiert durch PMR und CI (chemische Ionisierung), Massenspektren, und es wird die folgende Struktur vorgeschlagen:



Zu weiteren Bestätigung der Strukturen vom Baumycin A₁ und A₂ wurde die Molekular-Ionenspitze bestimmt durch das kürzlich erfundene FD (Felddesorption) - Massenspektrum, und es wurde gefunden zu $m/e = 674 (M + 1)$, wie in Fig. 13 und Fig. 14 angegeben. Dementsprechend ist die Molekularformel für die beiden Baumycin A₁ und A₂ C₃₄H₃₄NO₁₃. In Anbetracht der Differenzen der Schmelzpunkte, der spezifischen Rotationen, der Dünnschichtchromatographie- R_f -Werte und der C¹³NMR-Spitzen wurde festgestellt, dass Baumycin A₁ und A₂ Stereoisomere sind.

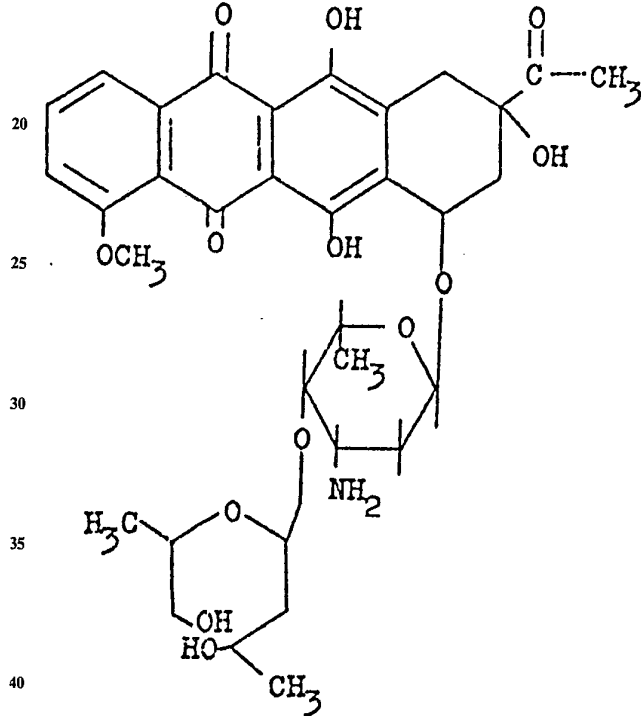
Die Strukturen von Baumycin B₁ und B₂ wurden wie folgt bestimmt: Hydrogenolyse von Baumycin B₁ mit Pd/BaSO₄ in Methanol ergab einen Aglycolanteil und einen Zuckeranteil. Aus der Analyse der PMR- und Massenspektrum-Daten, wurde der Aglycolanteil als 7-Deoxydaunomycinon identifiziert. Hinsichtlich des Zuckeranteils wurde das Diacetylderivat desselben, das durch Behandlung des Zuckeranteils mit Essigsäureanhydrid in Pyridin erhalten wird, analysiert durch PMR- und CI-Massenspektrum, und es wird die folgende Struktur vorgeschlagen:



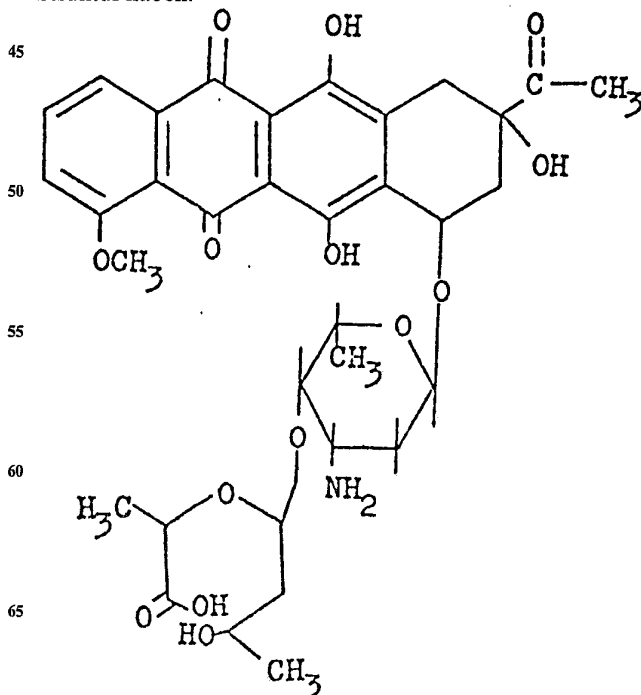
Zur weiteren Bestätigung der Strukturen von Baumycin B₁ und B₂ wurde die molekulare Ionenspitze durch FD-Massenspektrum bestimmt. Da die Ionenspitze nicht aus Baumycin B₁ und B₂ per se erhalten werden konnte, wurden ihre Methyl-esterderivate, erhalten durch Behandlung mit Diazomethan analysiert und zeigten eine molekulare Ionenspitze bei $m/e = 702 (M + 1)$, wie dies in den Fig. 15 und 16 angegeben ist. Die Spitzen bei $m/e = 716, 730$ und 744 in den Fig. 15 und 16 geben die Methylierung der Aminoreste im Daunosamin an.

Da Baumycin B₁ und B₂ dieselbe Molekularformel haben, wurde aus den Differenzen ihrer Schmelzpunkte, den Dünnschichtchromatographie- R_f -Werten und den C¹³NMR-Spitzen geschlossen, dass sie Stereoisomere sind.

Aus dem Vorstehenden ergibt sich, dass Baumycin A₁ und A₂ die folgende allgemeine Struktur aufweisen:



Während Baumycin B₁ und B₂ die folgende allgemeine Struktur haben:



Wie oben erwähnt, sind die Baumycine A₁ und A₂ sowie B₁ und B₂ Stereoisomere und können leicht unterschieden werden durch die Abweichungen ihrer physikalischen Eigenschaften, wie Schmelzpunkt, spezifische Rotation (A₁ und A₂), Dünnschicht-R_f-Werte und C¹³NMR-Spitze.

Aus den obigen Strukturformeln kann entnommen werden, dass Baumycin A₁, A₂, B₁ und B₂ neue Anthracyclin-glycosid-Antibiotika sind, die denselben Aglycon und denselben Aminosucker (d.h. Daunosamin) wie Daunomycin enthalten, die jedoch von Daunomycin darin abweichen, dass sie zusätzliche neue Zuckerreste enthalten, wie oben gezeigt. Die Baumycin-Antibiotika der vorliegenden Erfindung können auch von bekannten Anthracyclinantibiotika unterschieden werden durch Vergleich des R_f-Wertes unter Verwendung der Silicagel-Dünnschichtchromatographie mit verschiedenen Lösungsmitteln.

Baumycin A₁, A₂, B₁ und B₂ zeigen antimikrobielle Aktivität gegen verschiedene Arten von Mikroorganismen. Die minimale Hemmkonzentration der vorliegenden Antibiotika, bestimmt durch das Verfahren zur Verdünnung der Brühe, sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1

Antimikrobielles Spektrum von Baumycin A₁, A₂, B₁ und B₂

Testorganismen	minimale Hemmkonzentration (mcg/ml)			
	BM-A ₁	BM-A ₂	BM-B ₁	BM-B ₂
Staph. aureus FDA209P	1.56	3.12	50	100
Staph. aureus Smith	0.78	1.56	50	50
B. subtilis ATCC 6633	0.78	3.12	100	>100
B. cereus ATCC 9634	1.56	3.12	100	>100
B. megaterium NRRL B-938	1.56	6.25	100	>100
Sarcina lutea ATCC 9341	0.78	3.12	50	25
Micrococcus flavus	0.78	1.56	50	50
Coryne. bovis 1810	1.56	6.25	50	50
Ps. fluorescens NIHJB-254	>100	100	100	>100
Proteus morgani	>100	>100	>100	>100
Mycobacterium smegmatis ATCC 607	6.25	12.5	100	>100
Candida albicans IAM 4905	100	100	100	>100
Candida tropicalis	100	100	100	>100

BM: Baumycin

Wie aus der vorstehenden Tabelle hervorgeht, hat das nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellte Baumycin A₁, A₂, B₁ und B₂ antimikrobielle Aktivität, insbesondere gegen gram-positive Bakterien und ist daher therapeutisch wertvoll zur Behandlung von Tieren, einschliesslich des Menschen gegen Diphtherie, Tuberkulose, Pneumoniae, Tetanus und andere Infektionskrankheiten, die von gram-positiven Bakterien verursacht werden.

Das nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellte Baumycin A₁, A₂, B₁ und B₂ zeigt ausgeprägte Antitumoraktivität bei niedriger Toxizität im Tierversuch und ist daher therapeutisch wertvoll zur Hemmung des Wachstums von Tumoren bei Säugetieren. Insbesondere zeigen Baumycin A₁, A₂, B₁ und B₂ ausgeprägte Hemmwirkungen bei der Maus gegen L-1210 Leukämia. Beispielsweise wurden BDF₁-Mäuse intraperitoneal mit einmal 10⁶ L-1210 Zellen/Maus und 24 Stunden geimpft und nach der Impfung wurde das Medikament intraperitoneal einmal täglich zehn aufeinanderfol-

gende Tage geimpft. Am Tag 30 war die prozentuale Verlängerung der Überlebenszeit gegenüber der Kontrolle wie folgt:

Dosis mg/kg/Tag	Verlängerung der Überlebenszeit T/C (%)			
	BM-A ₁	BM-A ₂	BM-B ₁	BM-B ₂
8			147	155
6			165	135
4			136	111
2			117	99
1		167	105	99
0,5		173	99	
0,25		163	99	
0,125		151	93	
0,06	>300	141		
0,03	187			
0,015	155			
0,008	131			
0,004	131			

Akute Toxizität

Die LD₅₀-Werte nach intraperitonealer Injektion des nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten Antibiotikas sind in der folgenden Tabelle angegeben.

	LD ₅₀ (mg/kg)
BM-A ₁	1,5- 2,5
BM-A ₂	15-20
BM-B ₁	40-60
BM-B ₂	75-100

BM: Baumycin

Wie oben erwähnt, sind die nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten Verbindungen Baumycin A₁, A₂, B₁ und B₂ neue Antibiotika, die sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin wertvoll sind und die ausgesprochene Hemmwirkungen gegen malignante Tumoren bei Säugetieren besitzen, insbesondere ascitische und solide Tumoren.

Die Verbindungen der Formel I bilden nicht-toxische Säureadditionssalze mit einer Anzahl von organischen und anorganischen salzbildenden Mitteln und bilden nicht-toxische Komplexe mit Deoxyribonucleinsäure. Daher können in derselben Weise wie die Baumycinverbindungen selbst die folgenden sauren Additionssalze mit den pharmazeutisch annehmbaren Säuren verwendet werden: Schwefelsäure, Phosphorsäure, Salzsäure, Essigsäure, Propionsäure, Oleinsäure, Palmitinsäure, Zitronensäure, Succinsäure, Weinsäure, Glutaminsäure, Pantothersäure usw., und nicht-toxische Komplexe mit Deoxyribonucleinsäure. Die Salze werden gebildet, isoliert, gereinigt und formuliert nach Verfahren die allgemein bei der Salzbildung für Antibiotika bekannt sind. Für den Fall der DNA-Komplexe wird das DNA aus Tieren und Nitroorganismen wie dem Kalkthymus, Helazellen, menschlichen und tierischen embryonalen Zellen, Hefen usw., extrahiert, verwendet werden. Die Herstellung des Baumycin-DNA-Komplexes kann nach Verfahren durchgeführt werden, wie sie in der Literatur zur Herstellung von DNA-Komplexen von anderen Anthracyclinantibiotika beschrieben sind, wie z.B. Adriamycin, Daunorubicin, usw. (siehe beispielsweise Nature, New Biol. 239: 110 (1973) und Europ. J. Cancer 10: 399 (1974)). Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung sind die Baumycinverbindungen in Form der freien Base äquivalent ihren nicht-toxischen Additionssalzen.

Das nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellte Baumycin A₁, A₂, B₁ und B₂, Mischungen derselben oder ein nicht-toxisches Säureadditionssalz oder ein DNA-Komplex derselben ist geeignet zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen die durch gram-positive Erreger verursacht werden oder zur Bekämpfung von bösartigen Tumoren (d.h. einen Tumor vom festen oder ascitischen Typ wie z.B. L-1210 Leukämia). Pharmazeutische Zubereitungen enthalten beispielsweise eine antibakteriell wirksame oder eine Tumor-verhindernde Menge von Baumycin A₁, A₂, B₁ oder B₂, oder eine Mischung derselben oder ein nicht-toxisches Säureadditionssalz derselben in Kombination mit einem inerten pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Verdünnungsmittel. Diese Präparate können in jeder beliebigen pharmazeutischen Form, die geeignet ist für eine parenterale Anwendung, formuliert werden.

Präparate für die parenterale Verabreichung sind beispielsweise sterile wässrige oder nicht-wässrige Lösungen, Suspensionen oder Emulsionen. Sie können auch hergestellt werden in Form von sterilen festen Präparaten, die in sterilem Wasser, physiologischer Kochsalzlösung oder anderen sterilen injizierbaren Medien unmittelbar vor Gebrauch gemischt werden können.

Bevorzugte zu verwendende Mengen des Baumycin-Antibiotikums variieren entsprechend der speziell verwendeten Verbindung, der Formulierung der speziellen Zubereitung, der Art der Anwendung und der speziellen Situation des Patienten und der zur behandelnden Erkrankung. Im allgemeinen werden die Baumycin-Antibiotika intraperitoneal, intravenös, subkutan oder örtlich bei Tieren injiziert und intravenös oder lokal beim Menschen. Vom Fachmann sind viele Faktoren, die die Wirkung des Arzneimittels modifizieren, in Betracht zu ziehen, z.B. das Alter, das Körpergewicht, das Geschlecht, die Diät, die Zeit der Verabreichung, der Weg der Verabreichung, die Ausscheidungsrate, die Bedingung des Patienten, die Arzneimittelkombination, Empfindlichkeitsreaktionen und die Schwere der Erkrankung. Die Anwendung kann kontinuierlich oder periodisch innerhalb der maximal verträglichen Dosis vorgenommen werden. Optimale Anwendungsraten für eine gegebene Gruppe von Bedingungen können vom Fachmann unter Verwendung der üblichen Tests zur Bestimmung der Dosierung aufgrund der oben gegebenen Richtlinien leicht ermittelt werden.

Bei der Verwendung als antibakterielles Hemmmittel werden die Baumycin-Verabreichungen im allgemeinen so angeordnet, dass die Konzentration der Aktivsubstanz grösser ist als die minimale Hemmkonzentration für den zu behandelnden speziellen Organismus.

Im Folgenden werden einige Beispiele zur weiteren Erläuterung der Erfindung angegeben.

Beispiel 1

Es wurde ein Nährmedium der folgenden Zusammensetzung hergestellt.

Kartoffelstärke	1%
Glucose	1%
«Prorich» (Soyabohnenpulver)	1,5%
K ₂ HPO ₄	0,1%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1%
NaCl	0,3%
Mineralien *	0,125% (pH 7,4)

* Mineralien	CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,8 g
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,4 g
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	3,2 g
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,8 g
	in 500 ml Wasser.	

50 ml dieses Mediums wurden 15 Minuten bei 120°C in einer 500 ml - Flasche sterilisiert, und dann mit einer Agar-Schräggkultur von *Streptomyces coeruleorubidus* ME 130-A4 mit einer Platinöse geimpft.

- 5 Die Bebrütung wurde 72 Stunden bei 28°C in einem rotierenden Schüttelbehälter (230 upm) durchgeführt. Es wurden 7 Liter des folgenden Mediums hergestellt, 50 ml des Mediums verteilt und in einer 500 ml - Flasche aseptisch geimpft mit 1 ml der oben genannten Saatkultur. Die Fermentation wurde 7 Tage bei 28°C in einem rotierenden Schüttelbehälter (230 upm) durchgeführt.

Sucrose	4%
«Priorich» (Soyabohnenmehl, Ajinomoto Co.)	2,5%
NaCl	0,25%
Kalziumcarbonat	0,32%
Mineralien*	0,125% (pH 7,4)

- 20 *Mineralien CuSO₄·5H₂O 1,25 g
MnCl₂·4H₂O 1,25 g
ZnSO₄·7H₂O 12,50 g
in 500 ml Wasser

- 25 Die aktivierte Brühe wurde dann zur Abtrennung des Kulturfiltrates vom Mycelium filtriert. Das Filtrat wurde dreimal mit 1/3 Volumen Chloroform extrahiert. Das Mycelium wurde dreimal mit 2 Liter Aceton pro kg Kuchen extrahiert und der erhaltene Acetonextrakt unter vermindertem Druck auf das halbe Volumen eingengt. Das Konzentrat wurde dreimal mit 2 Liter Chloroform extrahiert, vereinigt mit der Chloroformlösung, die aus dem Kulturfiltrat erhalten wurde und unter vermindertem Druck zur Trockene eingengt. 10 g der erhaltenen öligen Substanz wurden in 500 ml Chloroform gelöst und die durch Zugabe von 300 ml n-Hexan erhaltene Ausfällung wurde 5 Minuten bei 3000 upm zentrifugiert, um die in n-Hexan unlöslichen Substanzen abzutrennen. Die erhaltene Ausfällung (1,4 g) wurde in 100 ml Chloroform gelöst und dreimal mit 150 ml 0,01M Essigsäure extrahiert, wobei säurelösliche Substanzen erhalten wurden. Zur Einstellung des pH-Wertes auf 8,5 wurden zu dem Extrakt zwei M tris-Hydroxyaminomethanol-Lösung zugefügt und dann dreimal mit 100 ml Chloroform extrahiert. Aus der Chloroformschicht wurde durch Einengen zur Trockene unter vermindertem Druck 230 mg eines rohen roten Pulvers (Baumycin-Komplex) erhalten.

Beispiel 2

- 50 Das nach Beispiel 1 erhaltene rohe Pulver (230 mg) wurde in zwei ml einer Chloroform-Methanol-Mischung (10:1) gelöst und in eine Kolonne von 65 cm Länge und 8 cm Durchmesser, gefüllt mit 80 g Kieselsäure, eingebracht und 55 mit einer Chloroform-Methanol-Mischung (10:1) gewaschen. Die Baumycin A₁ - Fraktion wurde zuerst eluiert, sodann Baumycin A₂, B₁ und B₂ unter Verwendung der entsprechenden Eluierungsmittel 8:1, 5:1 und 2:1 Mischungen von Chloroform-Methanol.
- 60 Nachdem jede der aktiven Fraktionen getrennt gesammelt und unter reduziertem Druck zur Trockene eingengt wurden, wurde jede dieser Fraktionen einer Kolonne von 25 cm Höhe und 1,8 cm Durchmesser, gefüllt mit Sephadex LH-20, zugeführt und mit einer Toluol-Methanol-Mischung 3:1 gewaschen. Nach Einengen jeder der oben erhaltenen Fraktionen 65 wurden rote Pulver von 10 mg Baumycin A₁, 18 mg Baumycin A₂, 3 mg Baumycin B₁ und 1 mg Baumycin B₂ durch Zugabe von n-Hexan zu dem Konzentrat erhalten.

Beispiel 3

Es wurde ein Nährmedium mit der folgenden Zusammensetzung hergestellt.

Kartoffelstärke	2%
Glucose	2%
Hefeextrakt (Daigo Eyo Co.)	0,5%
NaCl	0,25%
Kalziumcarbonat	0,32%
Soyamehl (Nishin Oil KK)	2%
Mineralien*	0,2% (pH 7,4)

*Mineralien sind dieselben wie in Beispiel 1.

8 Liter des obigen Mediums wurden hergestellt und 50 ml davon in 500 ml Behältern bei 120°C 15 Minuten sterilisiert, und mit einem ml der Saatkultur von *Streptomyces peuceticus* subsp. *carneus* ATCC 21354 hergestellt nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 geimpft. Die Fermentation wurde in einem rotierenden Behälter 6 Tage lang bei 28°C durchgeführt. Zur Abtrennung des Myceliums aus dem Kulturfiltrat wurde die kultivierte Brühe filtriert. Die Extraktion mit Chloroform und Acetat wurde wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt und es wurden 10 g der öligen Substanz erhalten. Die ölige Substanz wurde in 100 ml Methanol gelöst und nach Entfernung der n-Hexan-löslichen Substanz durch Zugabe von 100 ml n-Hexan wurden 1,2 g einer festen Substanz erhalten. Die rote Substanz wurde in 100 ml Chloroform gelöst und mit 600 ml eines Natriumacetatpuffers (pH 3,0) extrahiert, wobei eine säurelösliche Substanz erhalten wurde. Nach Zugabe von 0,5 M Aethylendiamintetraessigsäure zu dem Extrakt (0,01M) wurde der pH-Wert mit 4M Natriumhydrochlorid auf 8 eingestellt.

Die aktiven Komponenten in dieser wässrigen Lösung wurden viermal mit 200 ml Chloroform und dann zweimal mit 500 ml n-Butanol extrahiert. Die erhaltenen Chloroform- und n-Butanol-Schichten wurden getrennt unter vermindertem Druck konzentriert und es wurden 200 mg eines roten Pulvers, das hauptsächlich aus Baumycin B₂ bestand,

erhalten. Dieses rohe Pulver wurde in 5 ml Chloroform-Methanol gelöst und einer Kolonne von 23 cm Höhe und 3 cm Durchmesser, gefüllt mit 80 g Kieselsäure, zugeführt und mit der 20:1-Mischung von Chloroform und Methanol gewaschen. Baumycin B₁ und B₂ wurden nacheinander eluiert mit 5:1 und 2:1 Mischungen von Chloroform und Methanol. Die Fraktionen von Baumycin B₁ und B₂ wurden getrennt, unter vermindertem Druck, konzentriert, wobei 50 mg Baumycin B₁ und 8 mg Baumycin B₂ erhalten wurden. Das erhaltene Baumycin B₁ und B₂ wurde umkristallisiert aus Methanol, wobei 21 mg bzw. 6,5 mg des kristallinen Materials erhalten wurden. Nach diesem Verfahren wird sehr wenig Baumycin A₁ und A₂ produziert.

Beispiel 4

Nach dem allgemeinen Verfahren beschrieben in den Beispielen 1 und 2 wurde Baumycin A₁, A₂, B₁ und B₂ unter Verwendung der folgenden *Streptomyces*-Stämme erhalten.

Stämme	Baumycin erhalten (mg)			
	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂
25 <i>Streptomyces peuceticus</i> subsp. <i>carneus</i> ATCC 21354	8	12	4	2
<i>Streptomyces coeruleorubidus</i> ATCC 13740	16	21	8	3
30 <i>Streptomyces peuceticus</i> subsp. <i>caestis</i> NRRL B-5337	11	10	7	3
<i>Streptomyces peuceticus</i> NRRL B-3826	10	5	1	3
35 <i>Streptomyces coeruleorubidus</i> NRRL B-3045	26	17	5	6

FIG. 1

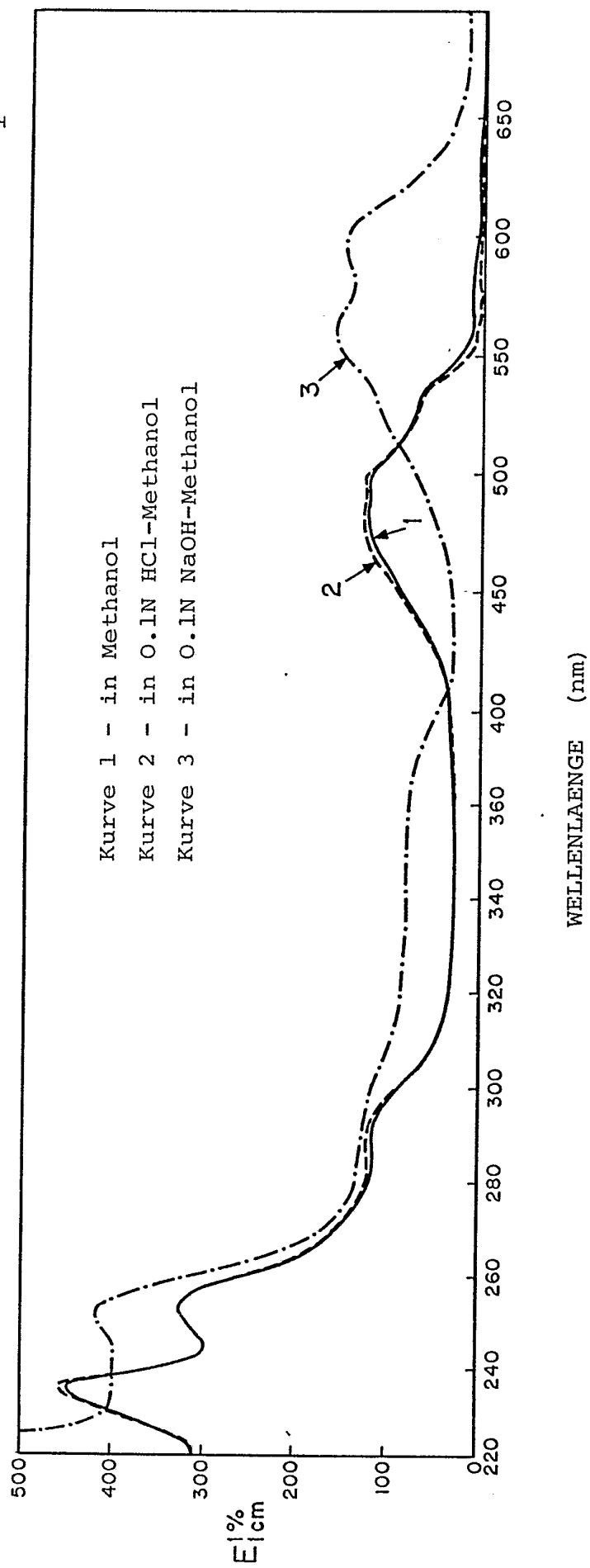
ABSORPTIONSSPEKTREN IM UV- UND SICHTBAREN LICHT VON BAUMYCIN A₁

FIG. 2

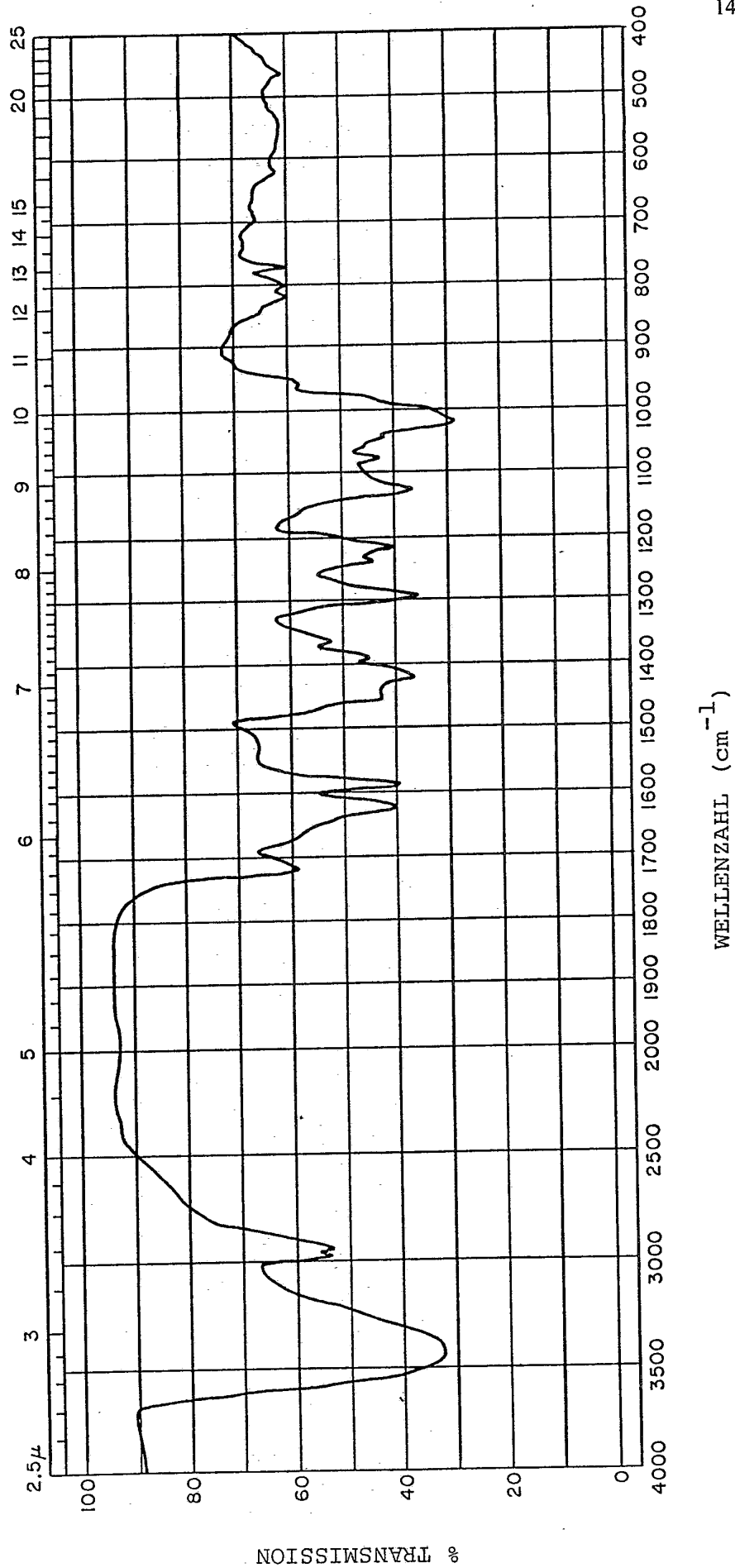
INFRAROT-ABSORPTIONSPEKTRUM VON BAUMYCIN A₁ IN KBr

FIG. 3

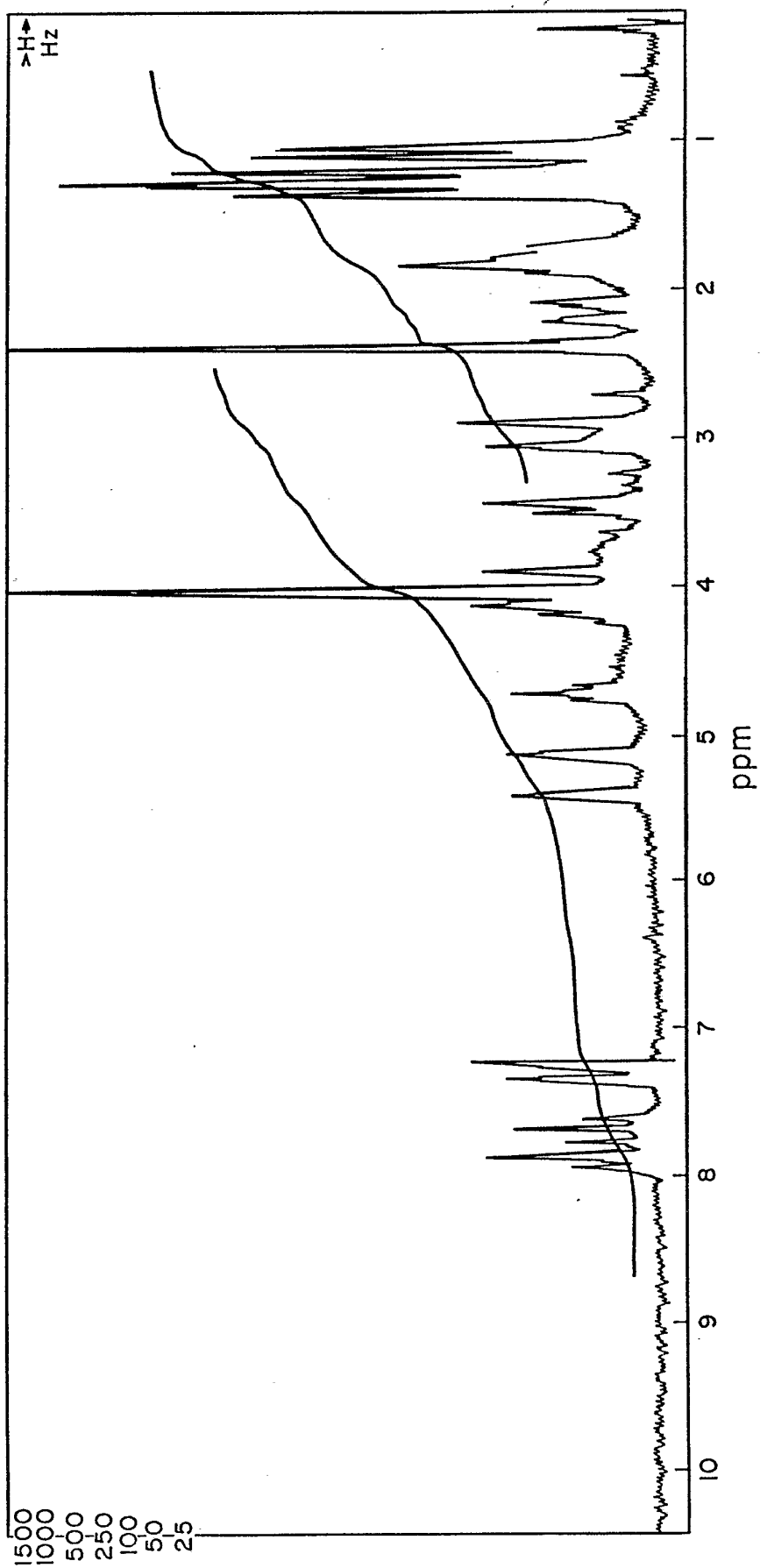
NMR SPEKTRUM VON BAUMYCIN A₁ (100 MHz IN CDCl₃, INNERE REFERENZ: TMS)

FIG. 4

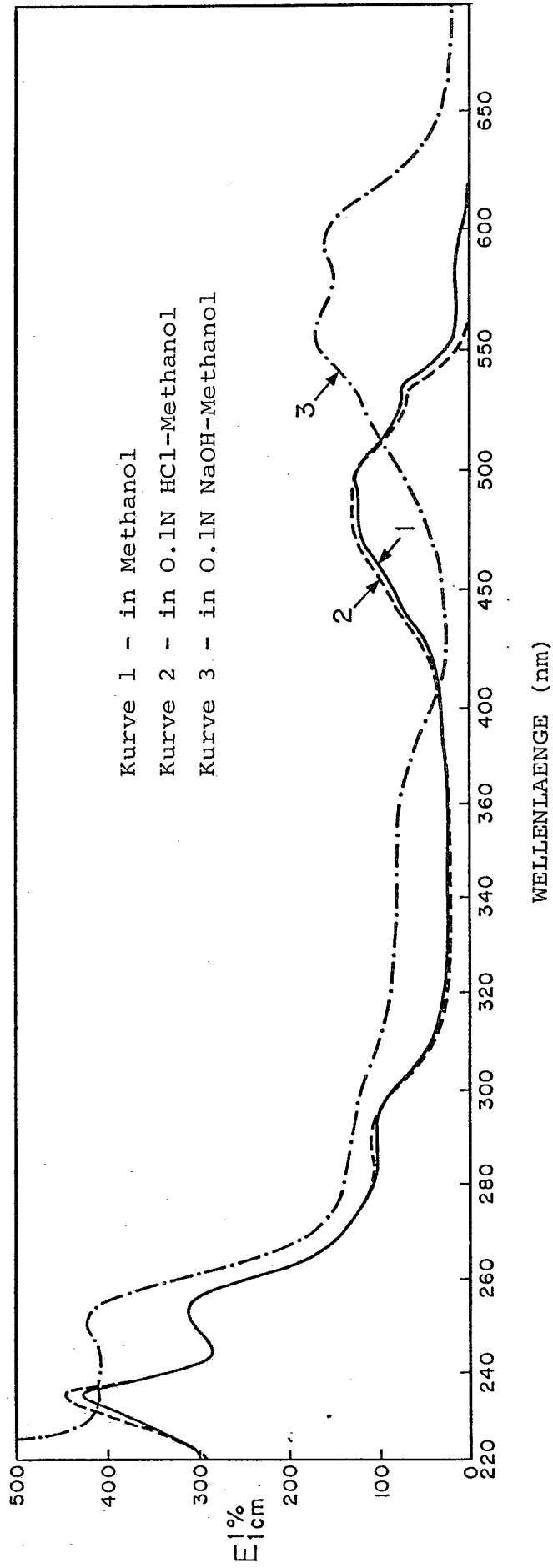
ABSORPTIONSSPEKTREN IM UV- UND SICHTBAREN LICHT VON BAUMYCIN A₂

FIG. 5

INFRAROT-ABSORPTIONSSPEKTRUM VON BAUMYCIN A₂ IN KBr

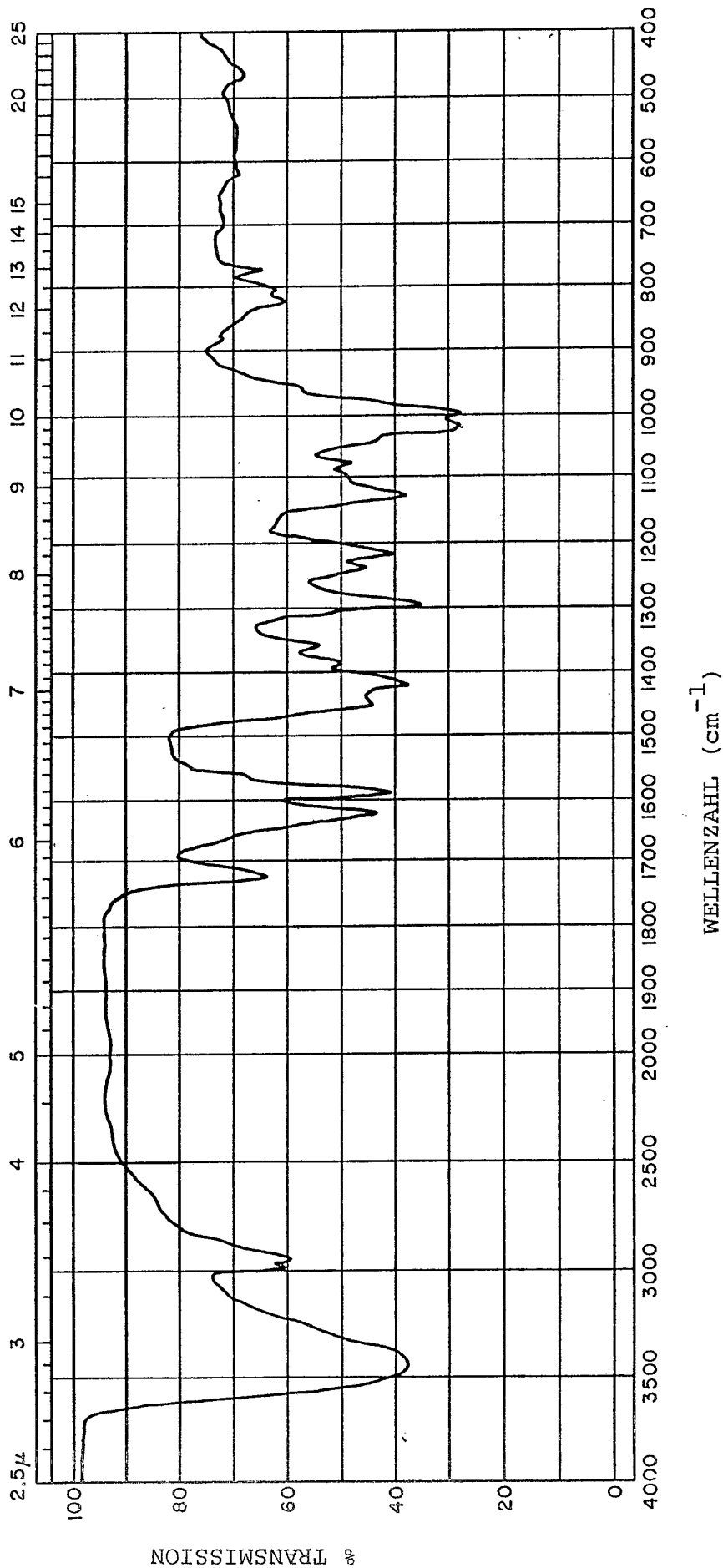


FIG. 6

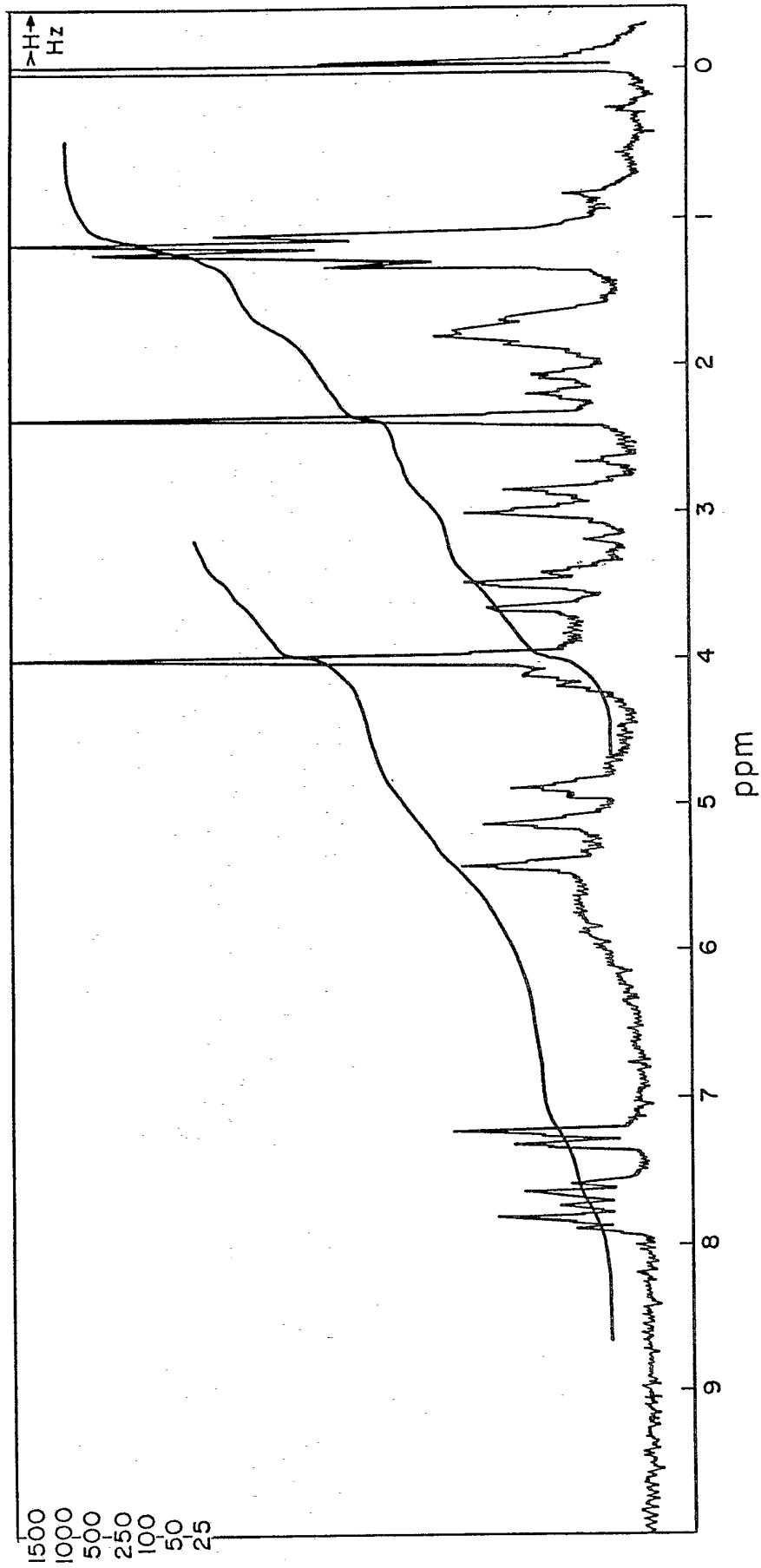
NMR SPEKTRUM VON BAUMYCIN A₂ (100 MHz IN CDCl₃, INNERE REFERENZ: TMS)

FIG. 7

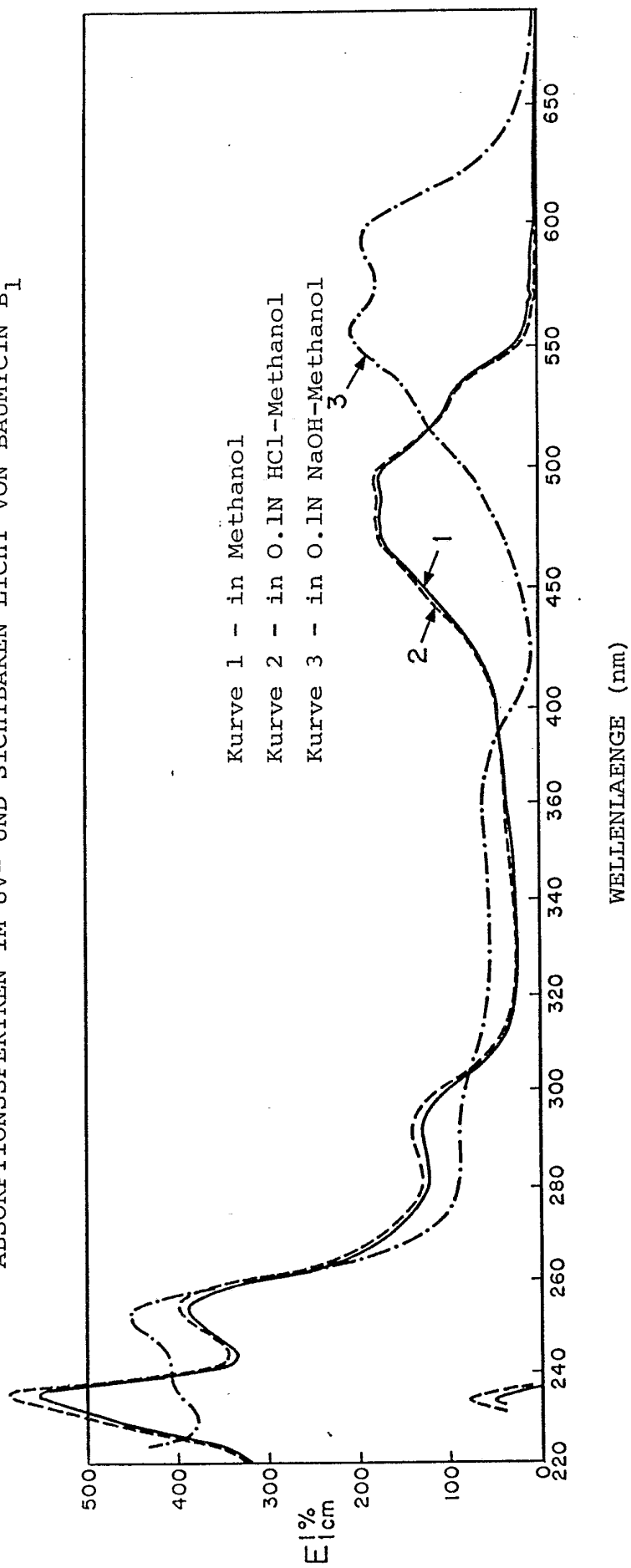
ABSORPTIONSSPEKTREN IM UV- UND SICHTBAREN LICHT VON BAUMYCIN B₁

FIG. 8

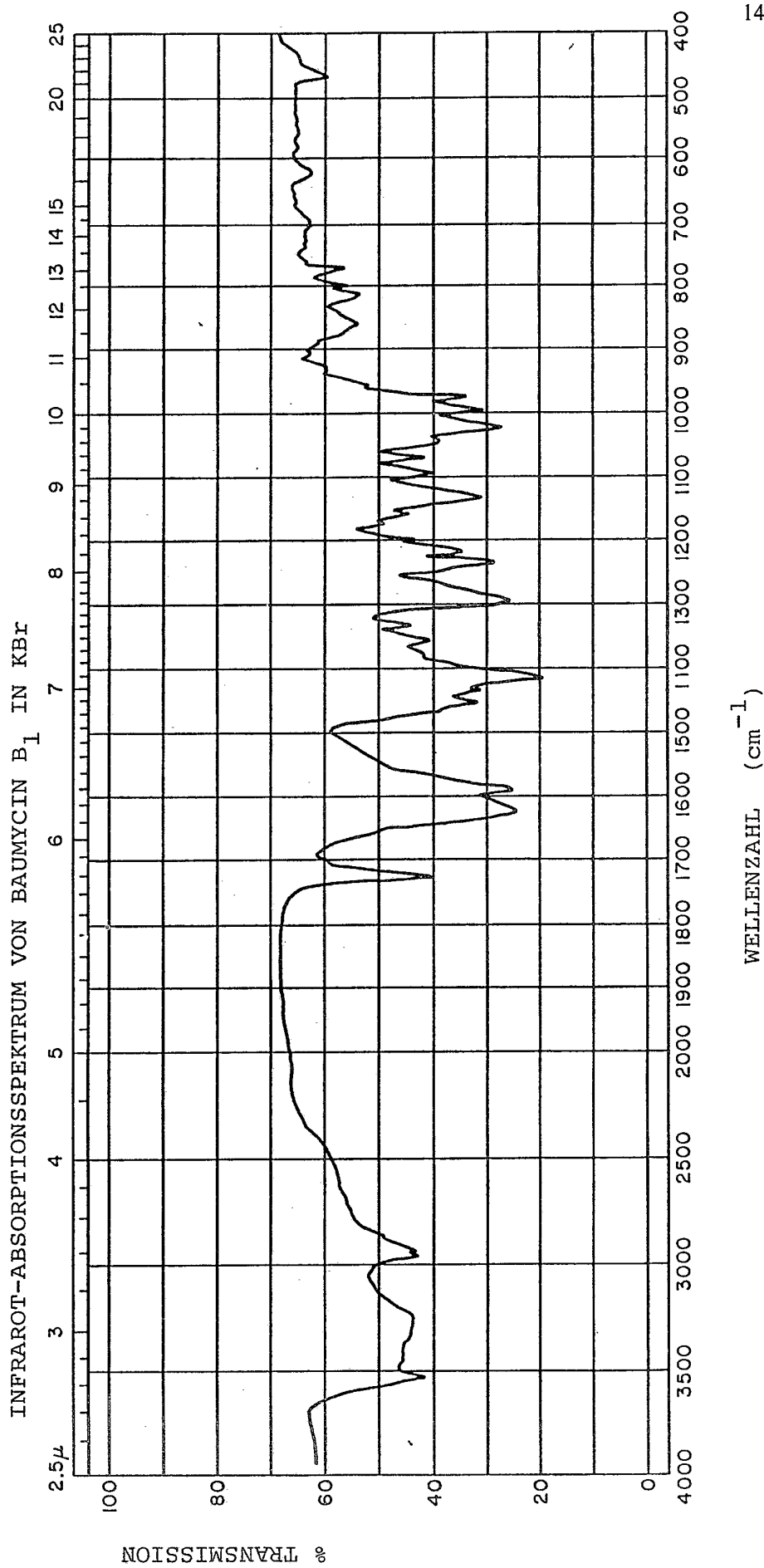


FIG. 9

NMR SPEKTRUM VON BAUMYCIN B₁
(100 MHz IN CDCl₃ + CD₃OD, INNERER REFERENZ-STANDARD: TMS)

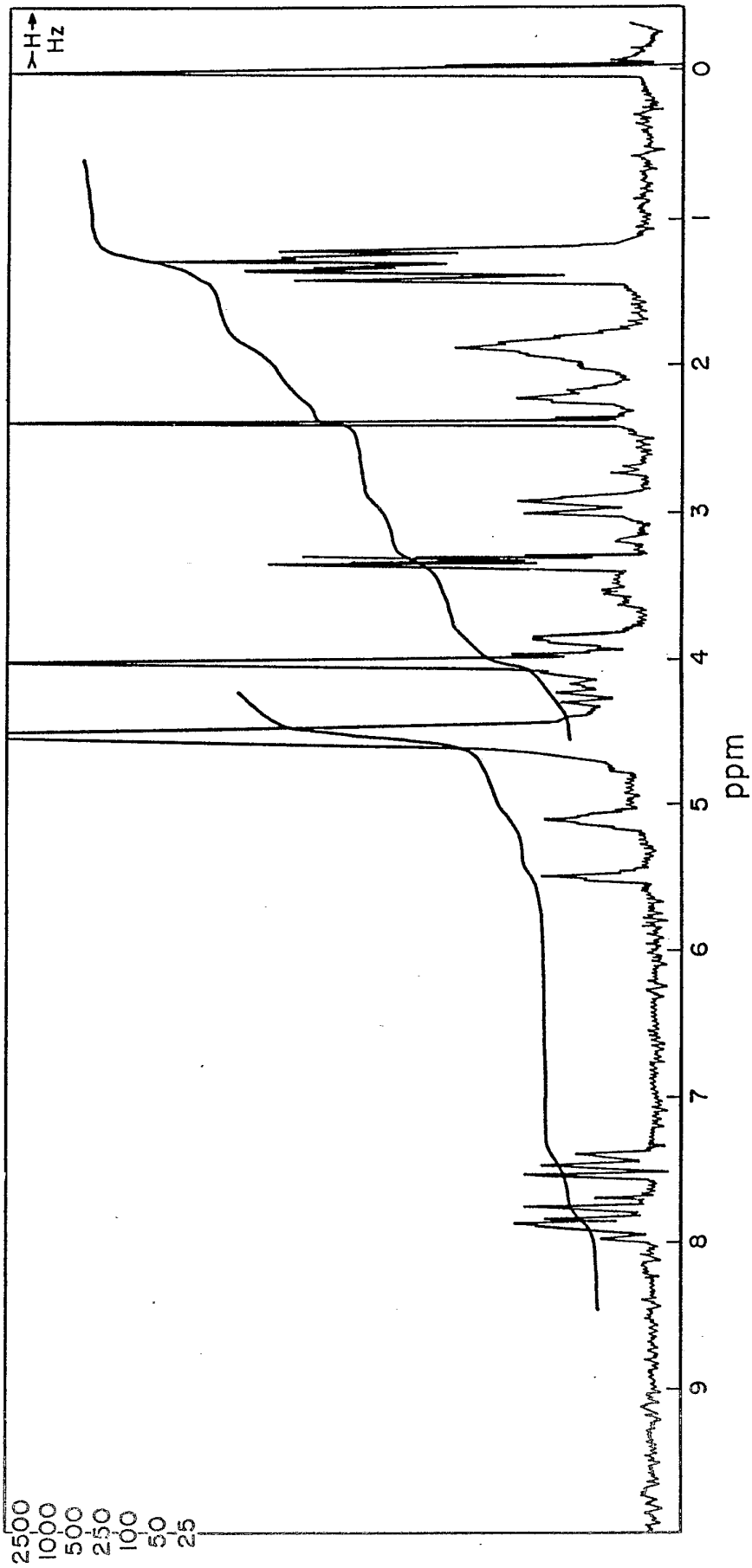


FIG. 10

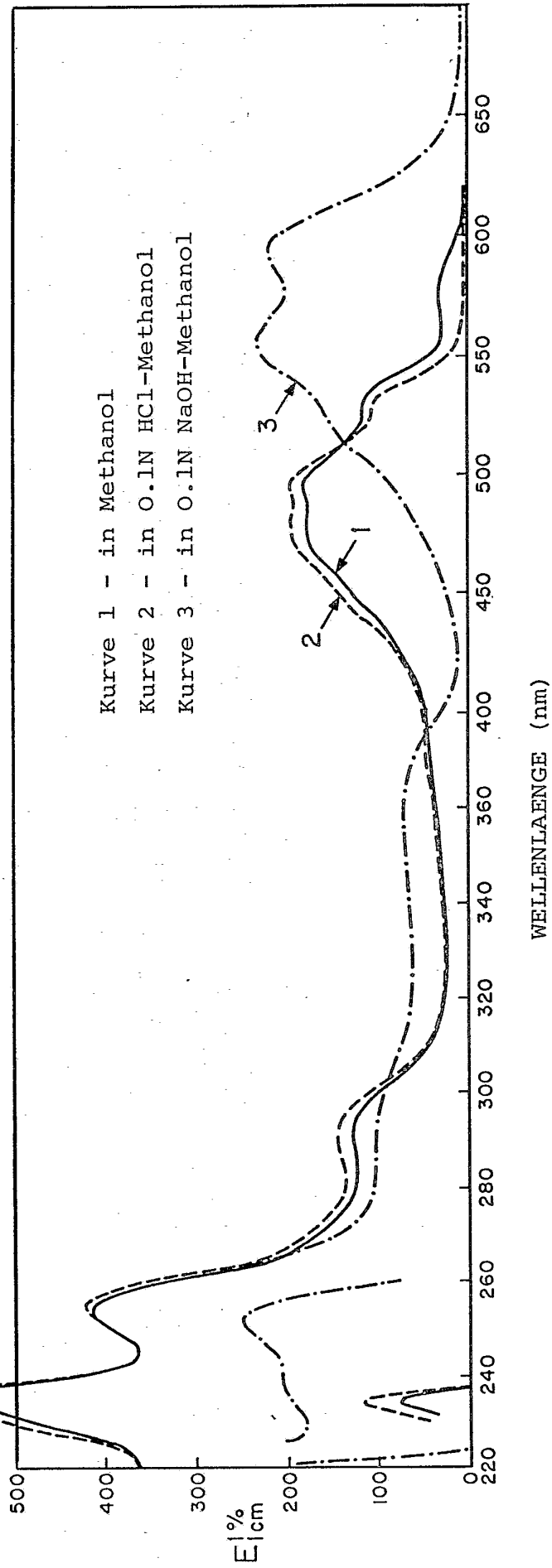
ABSORPTIONSSPEKTREN IM UV- UND SICHTBAREN LICHT VON BAUMYCIN B₂

FIG. 11

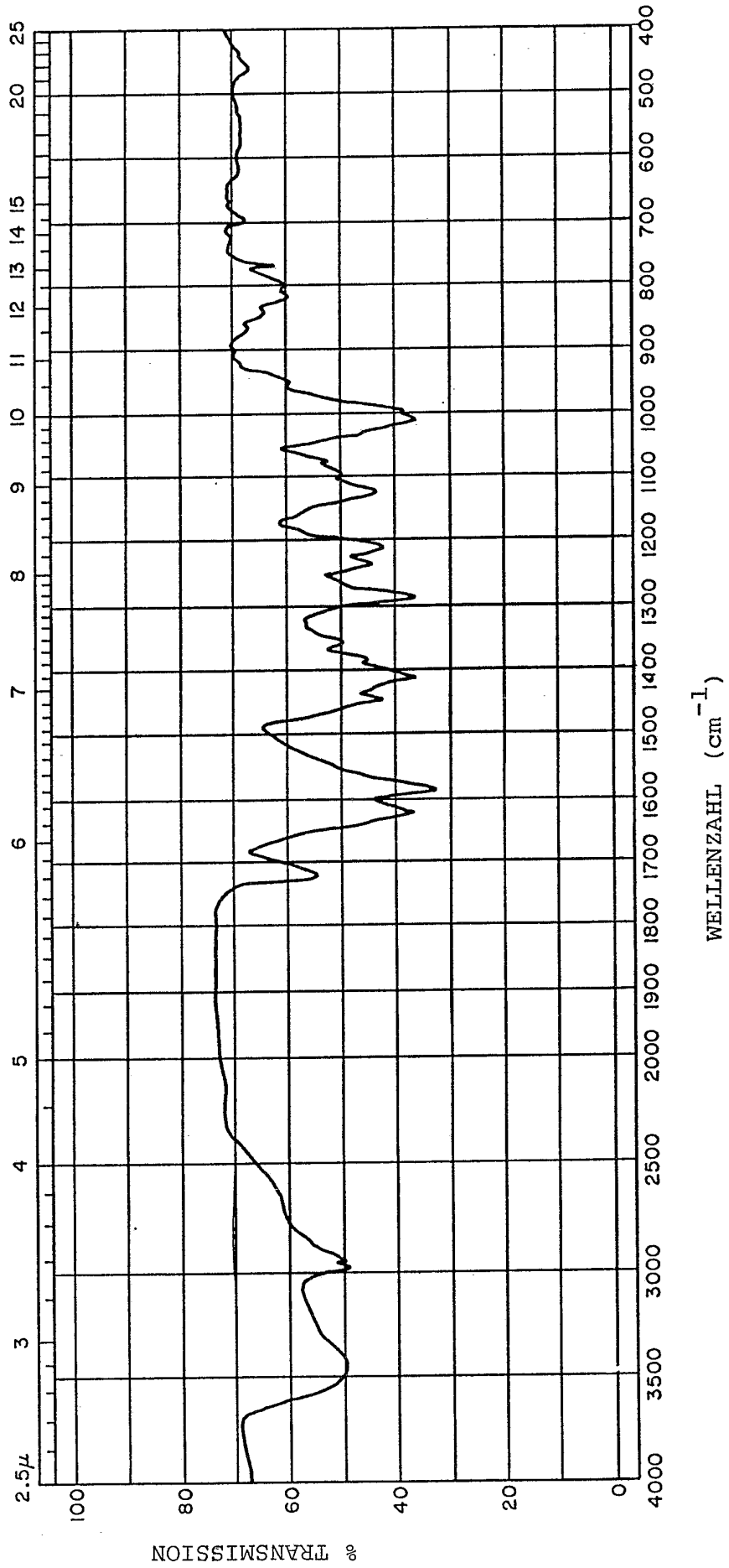
INFRAROT-ABSORPTIONSSPEKTREN VON BAUMYCIN B₂ IN KBr

FIG. 12

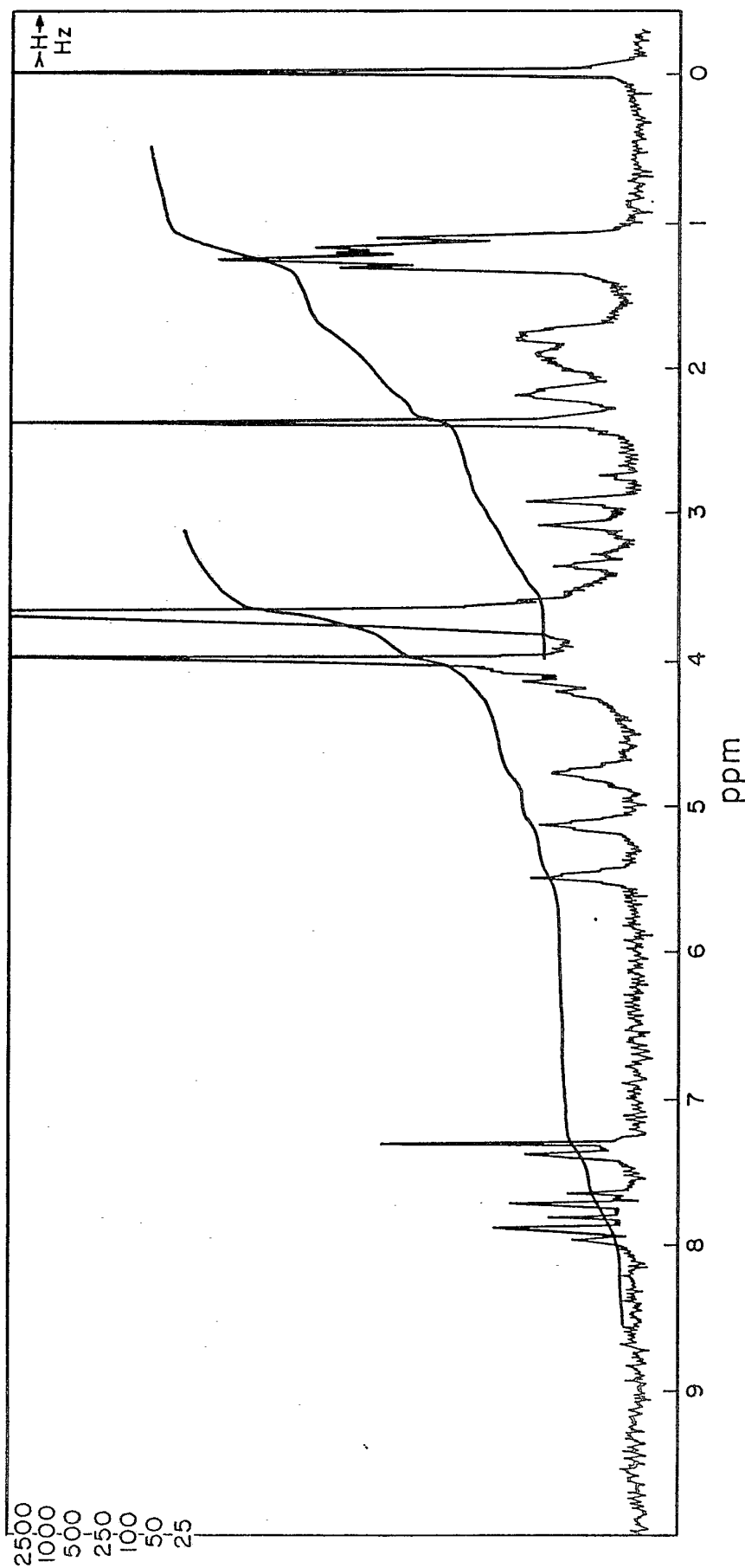
NMR SPEKTRUM VON BAUMYCIN B₂(100 MHz IN CDCl₃ + CD₃OD, INNERER REFERENZ-STANDARD: TMS)

FIG. 13

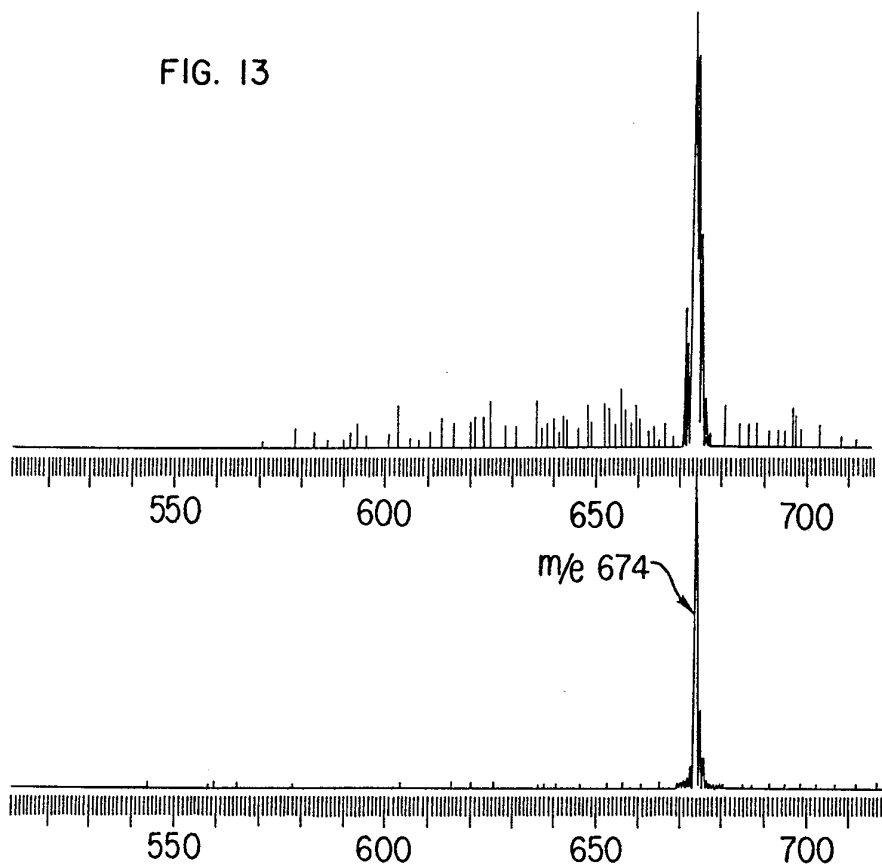


FIG. 14

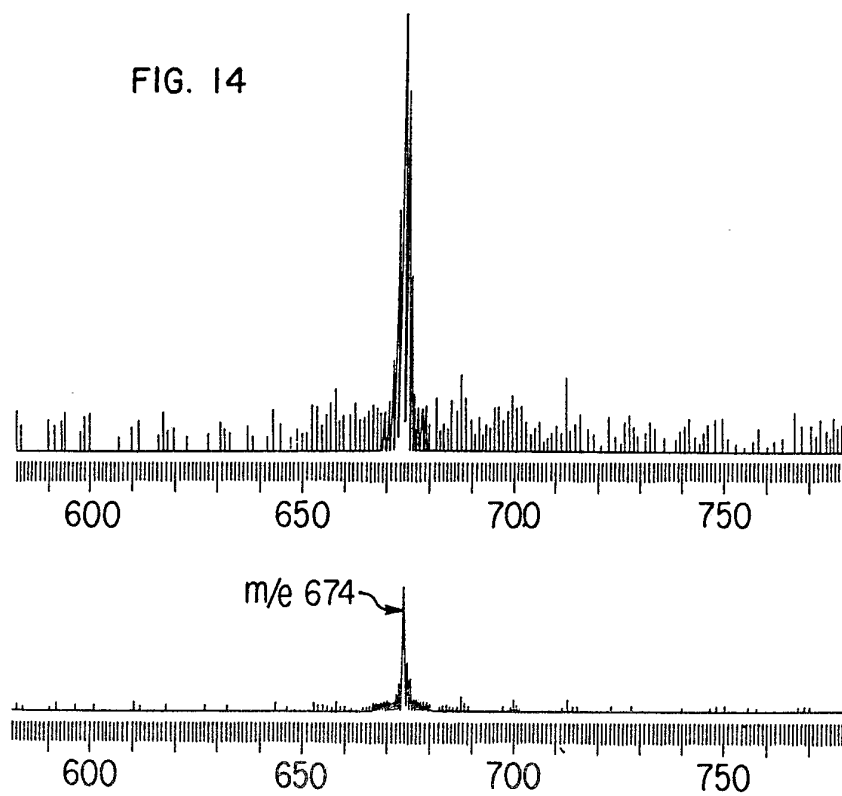


FIG. 15

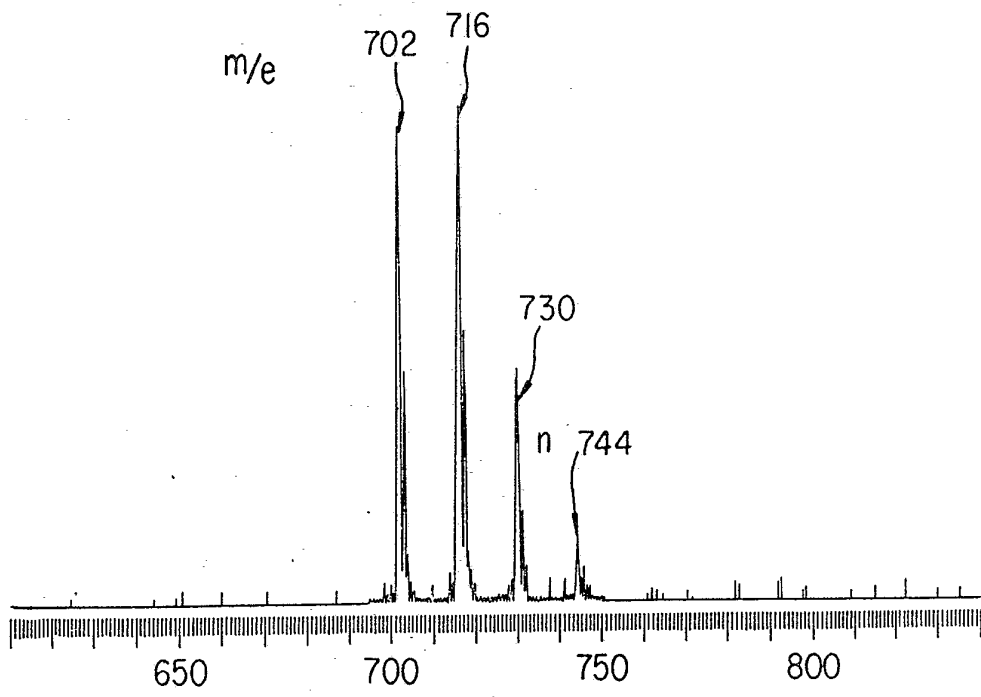


FIG. 16

