

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 144569 B

- (21) Ansøgning nr. 2334/77 (51) Int.Cl.³ C 12 P 19/56
(22) Indleveringsdag 26. maj 1977 C 07 H 15/24
(24) Løbedag 26. maj 1977
(41) Alm. tilgængelig 1. dec. 1977
(44) Fremlagt 29. mar. 1982
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 31. maj 1976, 51/63810, JP

(71) Ansøger ZAIDANHOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYUKAI, Tokyo, JP.

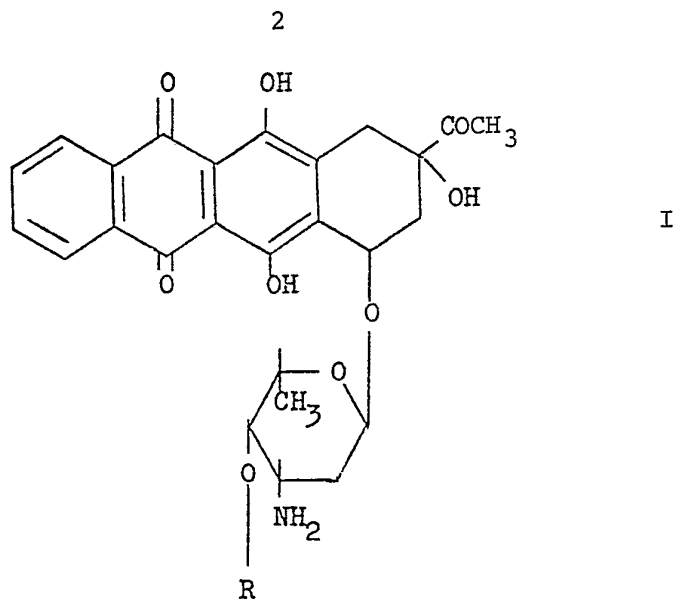
(72) Opfinder Hamao Umezawa, JP: Tomio Takeuchi, JP: Masa Hamada,
JP: Masaaki Ishizuka, JP: Hiroshi Naganawa, JP: m. fl.

(74) Fuldmægtig Th. Ostenfeld Patentbureau A/S.

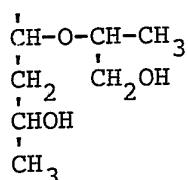
(54) Fremgangsmåde til fremstilling af et antibiotisk anthracyclin-glycosid-kompleks kaldet baumycin-kompleks eller komponenter, syreadditionssalte eller deoxyribonukleinsyrekomplekser deraf.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af et hidtil ukendt anthracyclin-glycosid-kompleks, kaldet baumycin-kompleks eller dets komponenter baumycin A₁, A₂, B₁ og B₂, hvor baumycin A₁ og A₂ er stereoisomere med formlen:

DK 144569 B

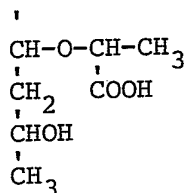


hvor R betegner



og

baumycin B₁ og B₂ er stereoisomere med formelen I, hvor R betegner



eller syreadditionssalte eller deoxyribonukleinsyrekomplekser deraf.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at man dyrker en stamme af *Streptomyces* udvalgt fra gruppen bestående af *Streptomyces coeruleorubidus* ME 130-A4 (FERM-P3540, ATCC 31276), *Streptomyces peuceticus* subsp. *carneus* ATCC 21354, *Streptomyces coeruleorubidus* ATCC 13740, *Streptomyces peuceticus* subsp. *caestus* NRRL B-5337, *Streptomyces peuceticus* NRRL B-3826 og *Streptomyces coeruleorubidus* NRRL B-3045 i et vandigt næringsmedium under submerse aerobe betingelser og udvinder det dannede baumycin-kompleks fra dyrkningsmediet og, om ønsket, opdeler det i sine bestanddele og/eller overfører dem i syreadditionssalte eller deoxyribonukleinsyrekomplekser.

En særlig foretrukket af nævnte baumycin-producerende stammer er isoleret af opfinderne til den foreliggende opfindelse fra en jordprøve opsamlet ved The Institute of Microbial Chemistry, Osaki,

Tokyo, Japan, og betegnet stamme ME 130-A4. Kulturer af denne stamme er deponeret i The American Type Culture Collection, Rockville, Maryland og i The Fermentation Research Institute, Japan, og føjet til deres permanente samlinger af mikroorganismer som hhv. ATCC 31276 og FERM P-3540.

Stamme ME 130-A4 har de følgende egenskaber:

1) Morphologiske egenskaber:

Under mikroskop iagttages det, at åbne spiraler og kroge udvikles godt fra forgrenede substrat-mycelier. Ingen krans er til stede, og den modne sporekæde er af moderat længde med mere end 10 sporer. Sporerne måler 0,6 til 0,8 μ x 1,0 til 1,2 μ , og deres overflade er pigget.

2) Vækst på forskellige medier:

Beskrivelsen i parentes følger farvestandarden "Color Harmony Manual", udgivet af Container Corporation of America, U.S.A.

a) På glycerol-asparagin-agar (ISP medium nr. 5), inkuberet ved 27 °C:

Blegrøddlig gul til mørkerød (4ic, "Pastel orange" til 6 l/2 nc, "Catchup") vækst; lysegråt (17 ge, "Dusty Aqua Blue" til 19 fe, "Aqua Gray") luftmycelium; lyst røddligt gul opløseligt pigment.

b) På saccharose-nitrat-agar, inkuberet ved 27 °C:

Blegrøddigt gul, bleg rød til mørkerød (6 l/2 le, "Cedar") vækst; svagt hvidt luftmycelium; svagt mørkerødt opløseligt pigment.

c) På glucose-asparagin-agar, inkuberet ved 27 °C:

Farveløs, bleggul til bleg orange vækst; svagt hvidt til lysegråt luftmycelium, som bliver stærkt udbredt efter 14 dages inkubation; intet opløseligt pigment.

d) På stivelse-uorganiske salte-agar (ISP medium nr. 4), inkuberet ved 27 °C:

Bleg gulligt brun til bleg røddigt gul vækst; lysegråt (19 dc, "Aqua Gray") luftmycelium; intet opløseligt pigment.

e) På tyrosin-agar (ISP medium nr. 7), inkuberet ved 27 °C:

Grålig rødbrunt til brun (4 ni, "Chestnut Brown") vækst; blåhvidt til lyseblåt (19 dc, "Aqua Gray") luftmycelium; mørkebrunt opløseligt pigment.

f) På nærings-agar, inkuberet ved 27 °C:

Gullig brun vækst; hvidt luftmycelium; brunt opløseligt pigment.

g) På gærekstrakt-maltekstrakt-agar (ISP medium nr. 2), inkuberet ved 27 °C:

Mat orange (5 ne, "Tile Red) vækst; lysegråt (19 fe, "Aqua Gray") luftmycelium; svagt brun opløseligt pigment.

h) På havremels-agar (ISP medium nr. 3), inkuberet ved 27 °C:

Farveløs til bleg orange vækst; lysegråt (19 fe, "Aqua Gray") luftmycelium; intet opløseligt pigment.

i) På glycerol-nitrat-agar, inkuberet ved 27 °C:

Farveløs til bleg orange vækst; hvidt til lysegråt luftmycelium; intet opløseligt pigment.

j) På stivelses-agar, inkuberet ved 27 °C:

Lys orange vækst; hvidt til lysegråt luftmycelium, som er svagt under 14 dages inkubation; svagt bleg orange opløseligt pigment.

k) På calciummalat-agar, inkuberet ved 27 °C:

Farveløs, bleg orange til mat orange vækst; hvidt til lysegråt (17 ge, "Dusty Aqua Blue") luftmycelium; svagt lyserødt opløseligt pigment.

l) På cellulose, inkuberet ved 27 °C:

Farveløs vækst; hvidt til mat blågrønt luftmycelium; intet opløseligt pigment.

m) På gelatine-stik, inkuberet ved 20 °C:

Svag gullig brun vækst; intet luftmycelium; svagt brunt opløseligt pigment.

n) På glucose-pepton-gelatine-stik, inkuberet ved 27 °C:

Bleg gulligtbrunt til gulligtbrun vækst; svagt hvidt luftmycelium; mørkebrunt opløseligt pigment.

o) På skummetmælk, inkuberet ved 27 °C:

Bleg gulligt brun, gulligt brun til bleg rød vækst; svagt hvidt luftmycelium; brunt opløseligt pigment.

3) Fysiologiske egenskaber:

a) Væksttemperatur undersøgtes på glucose-asparagin-agar ved

20, 24, 27, 30, 37 og 50 °C, og den optimale temperatur er ca. 30-37 °C.

b) Gelatinesmeltning på 15% gelatine-stik ved 20 °C og på glucose-pepton-gelatine-stik ved 27 °C:

På det førstnævnte medium iagttoges gelatinesmeltning i svag grad efter 20 dages inkubation, men på det sidstnævnte begyndte smeltning i svag eller moderat grad efter 14 dages inkubation.

c) Stivelseshydrolyse på stivelse-uorganiske salte-agar og på stivelses-agar ved 27 °C:

Stærk hydrolyse iagttoges efter 3 dages inkubation på det førstnævnte medium og efter 5 dages inkubation på det sidstnævnte medium.

d) Peptonisering og koagulering af skummetmælk ved 37 °C:

Svagt til moderat peptonisering begyndte efter 7 dages inkubation, og koagulering var afsluttet på ca. 10 til 14 dage.

e) Melanindannelse på trypton-gærekstrakt-substrat (ISP medium nr. 1), på pepton-gærekstrakt-jernagar (ISP medium nr. 6) og på tyrosin-agar (ISP medium nr. 7) ved 27 °C:

Positivt på alle medier.

f) Carbonhydratudnyttelse fra Pridham-Gottlieb basal medium (ISP medium nr. 9), inkuberet ved 27 °C:

Udbredt vækst med glucose, L-arabinose, D-xylose, saccharose, raffinose.

g) Smeltning af calciummalat på calciummalat-agar ved 27 °C:

Stærk til moderat smeltning omkring væksten iagttoges efter 3 dages inkubation.

h) Nitratreduktion på pepton-vand indeholdende 1% natriumnitrat (ISP medium nr. 9), inkuberet ved 27 °C:

Negativ.

Ved opsummering af de ovenfor anførte kendetegn for stamme nr. ME 130-A4, kan det afgøres, at stammen tilhører slægten *Streptomyces*. Luftmyceliet danner åbne spiraler, men ingen kranse. Sporeoverfladen er pigget. Det viser sig, at væksten på forskellige medier er blegorange til mat rød, og at luftmyceliet er lysegråt. Svagt blegt orange opløseligt pigment dannes. Melanindannelse er positiv. Pro-

teolytisk virkning er svag til moderat, og stivelseshydrolyse er stærk. Blandt kendte arter af *Streptomyces* ligner stamme nr. ME 130-A4 *Actinomyces coeruleorubidus* på basis af de ovennævnte egenskaber. (Reference 1: International Journal of Systematic Bacteriology, 18, 312, 1968; Ref. 2: G.F. Gause, Zur Klassifizierung der Actinomyceten, p. 98 Veb. Guotab Fischer Verlag Jena, 1958).

Stamme ME 130-A4 og *Act. coeruleobidus* ISP 5145 sammenlignedes ved parallelle dyrkninger. Resultaterne er som følger:

	ME 130-A4	<i>Act. coeruleorubidus</i> ISP 5145
Spiraler	positiv	positiv
sporeoverflade	pigget	pigget
luftmycelium	lysegråt	lysegråt
vækst	bleg orange mat rød	bleg gulligt brun til mat rød
Melanindannelse:		
ISP medium nr. 1	positiv	positiv
ISP medium nr. 6	positiv	positiv
ISP medium nr. 7	positiv	positiv
stivelseshydrolyse	positiv	positiv
koagulering af mælk	positiv	positiv
peptonisering af mælk	positiv	positiv
gelatinesmeltning	positiv	positiv
nitratreduktion	negativ	positiv
carbonhydratudnyttelse:		
glucose	positiv	positiv
L-Arabinose	positiv	positiv
D-Xylose	positiv	positiv
D-Fructose	positiv	positiv
saccharose	positiv	positiv
inositol	positiv	positiv
L-Rhamnose	positiv	positiv
raffinose	positiv	positiv
D-Mannitol	positiv	positiv
optimal temperatur for vækst	ca. 37 °C	ca. 37 °C
antibiotica dannet	baumycin daunomycin	rubidomycin (daunomycin) *

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

Af resultaterne fremgår det, at den omhandlede stamme ME 130-A4 er i meget nær overensstemmelse med *Actinomyces coeruleorubidus* med hensyn til morfologiske og fysiologiske egenskaber. Der er kun en lille forskel i farven af væksten, idet ME 130-A4 stammen er lidt mere rød end *Act. coeruleorubidus*.

Ifølge reference 2 er nitratreduktion af *St. coeruleorubidus* variabel, alt afhængig af stammen af denne art. Således kan stamme nr. ME 130-A4 identificeres som en ny stamme af *Streptomyces coeruleorubidus*.

Fremstilling af de omhandlede forbindelser udføres ved dyrkning af en af de nævnte baumycin-producerende stammer af *Streptomyces* i et konventionelt vædligt næringsmedium indeholdende kendte næringskilder for *Actinomycetes*, dvs. carbon-, nitrogen- og uorganiske salte-kilder. Submers aerob dyrkning anvendes fortrinsvis ved fremstilling af væsentlige mængder baumycin, ligesom ved andre antibiotica. De til dyrkning af andre *Actinomycetes*' anvendte generelle fremgangsmåder er anvendelige til den her omhandlede dyrkning. Mediet indeholder fortrinsvis, kommercielt tilgængelige carbonkilder, såsom glycerol, glucose, stivelse, dextrin, saccharose, maltose, olier, fedtarter og så videre i enten rensat eller rå tilstand og kommercielt tilgængelige nitrogenkilder, såsom soyabønnepulver, gærekstrakt, pepton, bomuldsfrøpulver, tørret gær, majsstøbevand eller uorganiske salte, såsom ammoniumsulfat, natriumnitrat eller ammoniumchlorid. Uorganiske salte, såsom natriumchlorid, kaliumchlorid eller phosphater anvendes fortrinsvis, og der kan også om nødvendigt tilsættes spor-metaller og skumdæpningsmidler, såsom "Adekanol" (varemærke, Asahi Denka Ind. CO.) eller "silicone" (varemærke, Shinetsu Chem. Ind. Co.). Dyrkningstemperaturen bør ligge i området på ca. 20-35 °C, fortrinsvis ca. 25-30 °C. Produktion af baumycin i dyrkningssubstratet når et maksimum efter 3 til 7 dages forløb i enten rystekolbe-fermentering eller submers aerob fermentering med beluftning og omrystning eller -røring, tilvejebragt som i de senere anførte eksempler.

De omhandlede forbindelser, baumycin, kan udvindes fra dyrk-

ningssubstratet og adskilles fra hverandre ved de følgende fremgangsmåder.

Baumycin fremstillet ved fermentering er tilstede intracellulært såvel som ekstracellulært, men findes hovedsageligt i myceliet. Til udvinding af baumycin-kompleks fra dyrkningssubstratet kan substratet filtreres og filtratet derefter ekstraheres med et med vand ublandbart organisk opløsningsmiddel, såsom ethylacetat, butylacetat, chloroform eller n-butanol. Baumycin i myceliet kan udvindes ved ekstraktion med et organisk opløsningsmiddel, såsom chloroform, acetone, n-butanol, methanol, ethanol, ethylacetat eller methylethylketon, eller en vandig opløsning af en organisk eller uorganisk syre, såsom saltsyre, svovlsyre eller eddikesyre. Alternativt kan baumycin ekstraheres direkte fra dyrkningssubstratet ved hjælp af de ovennævnte ekstraktionsfremgangsmåder uden forudgående fraskillelse af myceliet. Efter koncentreret i vakuum kan baumycin-ekstrakterne genekstraheres med et med vand ublandbart organisk opløsningsmiddel ved en pH-værdi på mellem 7 og 9 og baumycinet derefter opløses i en sur vandig opløsning med en pH-værdi mindre end 4. Baumycin i denne sure vandige opløsning genekstraheres derefter med et organisk opløsningsmiddel efter indstilling til en svag basisk pH-værdi. Ved gentagelse af de ovenfor beskrevne fremgangsmåder efter behov kan baumycin-kompleks fremstilles i rensset form. Som et alternativ til anvendelse af en opløsningsmiddelekstraktion-udvindingsmetode eller i kombination med en sådan metode kan baumycin udvindes fra dyrkningssubstratet ved søjlekromatografi under anvendelse af adsorptionsmidler, såsom aktiveret carbon, aluminiumoxid, kiselsyre, eller en modificeret dextran, såsom den under varemærket "Sephadex LH-20" (Pharmacia Fine Chemical Co., New York, New York) kommercielt tilgængelige dextran, modstrømsfordelings- eller væske-kromatografi ved anvendelse af velegnede organiske opløsningsmidler. Aktive ekstrakter opnået ved sådanne metoder koncentrerer under formindsket tryk og opnås som et råt rødt pulver af baumycin-kompleks.

Til opnåelse af de enkelte baumycin-bestanddele A_1 , A_2 , B_1 og B_2 fra baumycin-komplekset kan yderligere rensning og adskillelse udføres ved anvendelse af standardadskillelseteknikker, såsom søjlekromatografi under anvendelse af forskellige adsorptionsmidler, såsom kiselsyre, modificerede dextraner (f.eks. "Sephadex LH-20"), svagt sure ionbytter-harpikser eller aktiveret carbon, modstrøms-

fordelings- eller væske-kromatografi under anvendelse af velegnede organiske opløsningsmidler, eller en kombination af en eller flere af de ovennævnte fremgangsmåder. Som et eksempel på en velegnet adskillelsmetode kan baumycin-kompleks opløses i en lille mængde chloroform, udsættes for søjlekromatografi over kiselsyre og derefter elueres med et velegnet organisk opløsningsmiddel, f.eks. chloroform-methanol, til dannelse af baumycin-bestanddelene A_1 , A_2 , B_1 og B_2 . De aktive eluater adskilles og koncentrerer under formindsket tryk, og baumycin-bestanddelene renses hver for sig ved kromatografi over "Sephadex LH-20". Efter koncentreret af de aktive eluater kan baumycin A_1 , A_2 , B_1 og B_2 opnås i rensede krystallinske form ved omkrystallisation fra et velegnet organisk opløsningsmiddel.

De fysicokemiske egenskaber af baumycin A_1 , A_2 , B_1 og B_2 er anført nedenfor, idet der henvises til tegningen, hvori:

Figur 1 viser det ultraviolette og synlige lys absorptionspektrum af baumycin A_1 i methanol,

figur 2 det infrarøde absorptionspektrum af baumycin A_1 , pelleteret i kaliumbromid,

figur 3 NMR-spektret af baumycin A_1 i $CDCl_3$ (100 MHz),

figur 4 det ultraviolette og synlige lys absorptionspektrum af baumycin A_2 i methanol,

figur 5 det infrarøde absorptionspektrum af baumycin A_2 , pelleteret i kaliumbromid,

figur 6 NMR-spektret af baumycin A_2 i $CDCl_3$ (100 MHz),

figur 7 det ultraviolette og synlige lys absorptionspektrum af baumycin B_1 i methanol,

figur 8 det infrarøde absorptionspektrum af baumycin B_1 , pelleteret i kaliumbromid,

figur 9 NMR-spektret af baumycin B_1 i en blanding af $CDCl_3$ og CD_3OD (100 MHz),

figur 10 det ultraviolette og synlige lys absorptionspektrum af baumycin B_2 i methanol,

figur 11 det infrarøde absorptionspektrum af baumycin B_2 , pelleteret i kaliumbromid,

figur 12 NMR-spektret af baumycin B_2 i en blanding af $CDCl_3$ og CD_3OD (100 MHz),

figur 13 felt-desorptionsmasse-spektret af baumycin A₁
(emitter-strøm 11 mA),

figur 14 felt-desorptionsmasse-spektret af baumycin A₂
(emitter-strøm 12 mA),

figur 15 felt-desorptionsmasse-spektret af baumycin B₁-
methylester-derivat (emitter-strøm 14 mA),

figur 16 felt-desorptionsmasse-spektret af baumycin B₂-
methylester-derivat (emitter-strøm 14 mA).

Baumycin	A ₁				A ₂			
Fremtræden	Svagt basisk amorft rødt pulver							
Grundstof- analyse	C	H	N	O	C	H	N	O
Fundet	59,85	6,65	2,04	29,83	60,27	6,72	2,31	29,52
Beregnet	60,61	6,43	2,08	30,88	60,61	6,43	2,08	30,88
Empirisk formel	C ₃₄ H ₄₃ N ₁₃ O							
Molekylvægt	673,7							
Smeltepunkt (°C)	182 - 185				185 - 189			
Specifik rotation [α] _D ²⁰	+ 150° (CHCl ₃ , C = 0,1)				+ 135°			
Opløselighed	Opløselig i surt vand, DMSO, methylcello- solv, methanol, ethanol, n-propanol, n-butanol, ethylacetat, butylacetat, acetone, methylethylketon, methylen- chlorid og chloroform. Uopløselig i vand, n-hexan, cyclohexan og petroleums- ether.							
R _f værdier **								
*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	Sur vandig opløsning og methanolopløsning er rød og bliver rødlig violet i basisk tilstand. Baumycin A ₁ og A ₂ giver positiv ninhydrinreaktion og reducerer ikke Fehlings væske.							

Baumycin	A ₁	A ₂
UV og synligt absorptionsspek- trum og (E _{1cm} ^{1%}) maks.: i 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)
i 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)
i 0,1N NaOH-MeOH (kurve 3)	250,5 (416), 350 (83), 558 (164), 597 (152)	250,5 (421), 350 (80), 558 (170), 596 (164)
Infrarødtabsorp- tionsspektrum (KBr)	Fig. 2	Fig. 5
NMR spektrum (PMR)	Fig. 3 (100 MHz, i CDCl ₃)	Fig. 6
***C ¹³ NMR spektrum	Karakteristisk C-1" top ved 106,7 ppm	karakteristisk C-1" top ved 101,6 ppm

* C = chloroform, M = methanol, B = benzen, F = myresyre,
A = eddikesyre.

** TLC-betingelse: kiselsyre-tyndtlag 60F₂₅₄ (Merck Co.),
23 °C.

*** Spektrum målt på "Varian XL 100"-instrument ved 25,2 MHz.
Indre reference er CDCl₃ for baumycin A₁ og TMS for
baumycin A₂. Prøver: A₁ = 27 mg/0,5 ml CDCl₃; A₂ =
44 mg/0,6 ml CDCl₃.

Baumycin	B ₁				B ₂			
Fremtræden	Svagt basisk amorft rødt pulver							
Grundstof-analyse	C	H	N	O	C	H	N	O
Fundet	57,32	6,45	2,01	32,58	56,59	5,96	1,92	31,91
Beregnet	59,38	6,01	2,04	32,57	59,38	6,01	2,04	32,57
Empirisk formel	C ₃₄ H ₄₁ NO ₁₄							
Molekylvægt	687,7							
Smeltepunkt (°C)	181 - 189				197 - 201			
Specifik rotation [α] _D ²⁰	+ 170°				+ 170°			
	(CHCl ₃ : MeOH = 1 : 1, c = 0,1)							
Opløselighed	Opløselig i surt vand, methylcellosolv, methanol, ethanol, n-propanol og n-butanol. Uopløselig i vand, ethylacetat, acetone, methylenchlorid, chloroform, carbontetrachlorid, benzen, toluen, ethylether og n-hexan, bortset fra, at baumycin B ₂ er opløselig i vand.							
R _f værdier **								
*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	Sur vandig opløsning og methanolopløsning er rød og bliver rødlig violet i basisk tilstand. Baumycin B ₁ og B ₂ giver positiv ninhydrinreaktion og reducerer ikke Fehlings væske.							

Baumycin	B ₁	B ₂
UV og synligt absorption spek- trum (E _{1cm} ^{1%} maks. i 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)
i 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)
i 0,1N NaOH-MeOH (kurve 3)	251 (453), 350 (65), 556 (206), 594 (195)	251 (499), 350 (74), 556 (231), 594 (218)
Infrarødt absorp- tionsspektrum (KBr)	Fig. 8	Fig. 11
NMR spektrum (PMR)	Fig. 9 (100 MHz, i CDCl ₃ og CD ₃ OD blanding)	Fig. 12
***C ¹³ NMR spektrum	Karakteristisk C-1" top ved 107,1 ppm	karakteristisk C-1" top ved 102,1 ppm

* C = chloroform, M = methanol, B = benzen, F = myresyre,
A = eddikesyre.

** TLC-betingelse: kiselsyre-tyndtlag 60F₂₅₄ (Merck Co.),
23 °C.

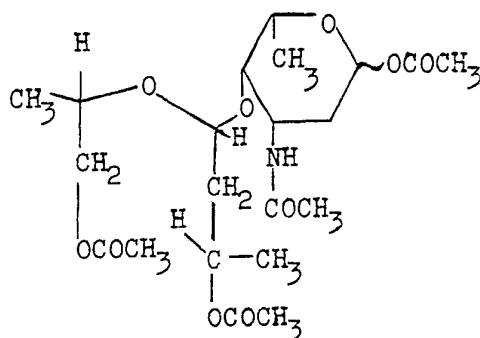
*** Spektrum målt på "Varian XL 100"-instrument ved 25,2 MHz.
Indre reference er TMS. Prøver: B₁ = 45 mg/0,6 ml CDCl₃:
methanol(5:1); B₂ = 30 mg/0,6 ml CDCl₃:methanol (1:1).

Strukturerne af de omhandlede baumycin A₁, A₂, B₁ og B₂ bestemtes som følger:

Ved hydrolyse med 0,1N saltsyre i 30 minutter ved 85 °C giver baumycin A₁, A₂, B₁ og B₂ daunomycinon og daunosamin, og daunomycin opnås fra de ovennævnte baumycin-bestanddele ved partiel hydrolyse med 1% svovlsyre i 15 minutter ved 32 °C. Fysicokemiske egenskaber, såsom NMR-, masse- og infrarødt absorptions-spektrum, smeltepunkt og R_f-værdier på tyndlag af daunomycinon, daunosamin og daunomycin opnået ud fra baumycin A og B ved sur hydrolyse falder ind sammen med de tilsvarende værdier for autentisk daunomycin. (Journal of American Chemical Society, 86, 5334-5335, 5335-5336 (1964)).

Yderligere klarlæggelse af strukturerne af de omhandlede baumycin A₁ og A₂ udførtes som følger:

Hydrogenolyse af baumycin A₂ med Pd/BaSO₄ i methanol gav en aglycon-del og en sukker-del. Fra analyse af PMR- og masse-spektrale data bestemtes aglyconen at være 7-deoxydaunomycinon. Med hensyn til sukkerenheden i baumycin A₁ og A₂ analyseredes tetracetylderivatet, som opnås ved behandling af hver del (dvs. delen fra A₁ eller A₂) med eddikesyreanhydrid i pyridin, ved PMR- og CI- (kemisk ionisering) massespektrum, og den følgende struktur foresloges:

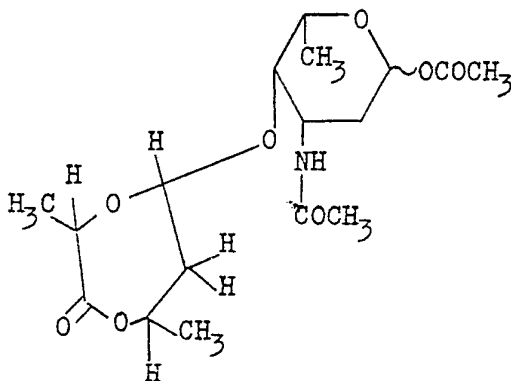


Til yderligere bekræftelse af strukturerne af baumycin A₁ og A₂ bestemtes molekyliontoppen for hver af dem ved den fornyligt udviklede FD (felt-desorptions) massespektrumanalyse og viste sig at være: $m/e = 674 (M + 1)$, som vist i fig. 13 og fig. 14. Følgelig er molekylformlen for både baumycin A₁ og A₂ C₃₄H₄₃NO₁₃. I lyset af forskellene i smeltepunkter, specifikke rotationer, tyndlags-kromatografi-R_f-værdier og C¹³NMR-toppe er det afgjort, at baumycin A₁

og A₂ er indbyrdes stereoisomere.

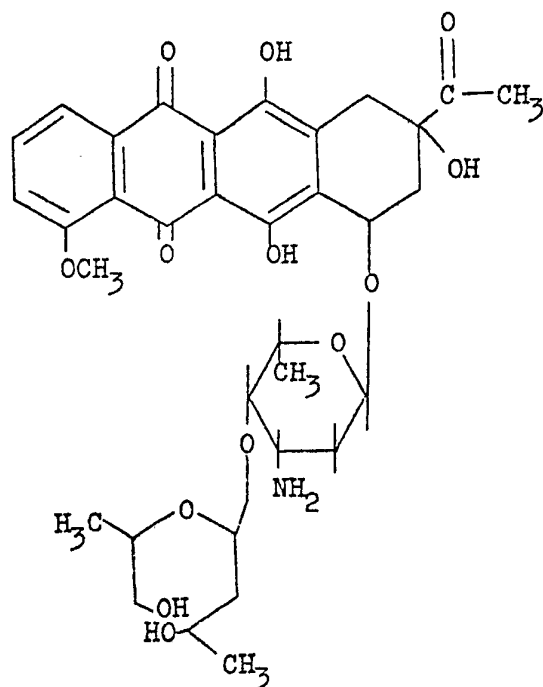
Strukturerne af baumycin B₁ og B₂ bestemtes som følger:

Hydrogenolyse af baumycin B₁ med Pd/BaSO₄ i methanol gav en aglycon-del og en sukker-del. Fra analyse af PMR- og masse-spektrale data bestemtes aglycon-delen at være 7-deoxydaunomycinon. Med hensyn til sukkerdelen analyseredes diacetylderivatet deraf, som opnås ved behandling af hver sukkerdel med eddikesyreanhydrid i pyridin, ved PMR- og CI-massespektrum, og den følgende struktur foresloges:

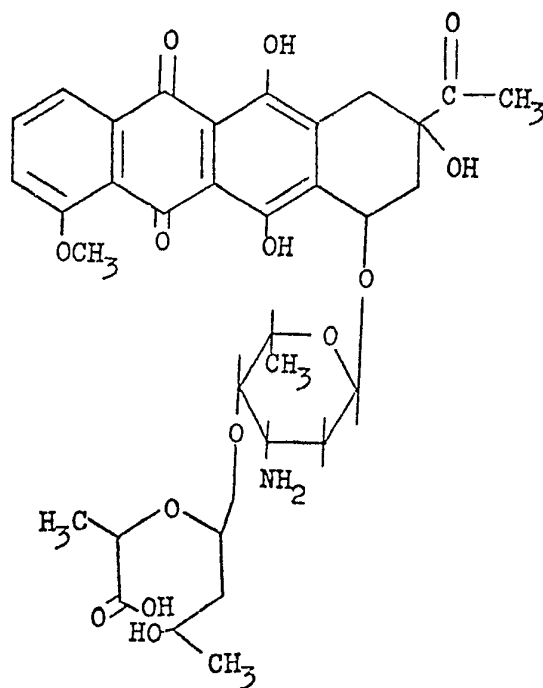


Til yderligere bekræftelse af strukturerne af baumycin B₁ og B₂ bestemtes molekyliiontoppen for hver enkelt ved FD-massespektrum. Eftersom iontoppen ikke kunne opnås fra baumycin B₁ og B₂ hver for sig, analyseredes deres methylesterderivat opnået ved behandling med diazomethan, og dette derivat viste en molekyliiontop ved $m/e = 702 (M + 1)$, som vist i fig. 15 og fig. 16. Toppene ved $m/e = 716$, 730 og 744, vist i fig. 15 og 16 indicerer methylering af amino-grupperne i daunosamin. Skønt baumycin B₁ og B₂ således har samme molekylformel, er det påvist fra forskelle i deres smeltepunkter, tyndtlagskromatografi-R_f-værdier og C¹³NMR-toppe, at de er indbyrdes stereoisomere.

Ved opsummering af resultaterne fra det ovennævnte arbejde kan det afgøres, at baumycin A₁ og A₂ har den fælles struktur:



medens baumycin B₁ og B₂ har den fælles struktur:



Som ovenfor anført er henholdsvis baumycin A₁ og A₂ og baumycin B₁ og B₂ indbyrdes stereoisomere og kan let skelnes fra hinanden ved hjælp af forskelle i fysiske egenskaber, såsom smeltepunkter, specifik rotation (A₁ og A₂), tyndtlags-R_f-værdier eller C¹³NMR-toppe.

Det fremgår klart af de ovenfor anførte formler, at baumycin A₁, A₂, B₁ og B₂ er hidtil ukendte anthracyclin-glycosid-antibiotica, som indeholder den samme aglycon og den samme aminosukker (nemlig daunosamin) som daunomycin, men som afviger fra daunomycin ved at have de yderligere hidtil ukendte sukkerdele, som er vist ovenfor. De omhandlede baumycin-antibiotica er også differentieret af opfinde-derne af den foreliggende opfindelse fra kendte anthracyclin-antibiotica ved hjælp af R_f-værdisammenligninger under anvendelse af silicageltyndtlagskromatografi med forskellige opløsningsmiddel-systemer.

Baumycin A₁, A₂, B₁ og B₂ udviser antimikrobielle aktiviteter mod forskellige typer af mikroorganismer. Den mindste inhiberende koncentration af de foreliggende antibiotica, bestemt ved substratfortyndingsmetoden, er vist i Tabel I.

TABEL I

Antimikrobiel spektrum af baumycin A₁, A₂, B₁ og B₂

Testorganisme	mindste inhiberende koncentration (mcg/ml)			
	BM-A ₁	BM-A ₂	BM-B ₁	BM-B ₂
<u>Staph. aureus</u> FDA209P	1,56	3,12	50	100
<u>Staph. aureus</u> Smith	0,78	1,56	50	50
<u>B. subtilis</u> ATCC 6633	0,78	3,12	100	>100
<u>B. cereus</u> ATCC 9634	1,56	3,12	100	>100
<u>B. megaterium</u> NRRL B-938	1,56	6,25	100	>100
<u>Sarcina lutea</u> ATCC 9341	0,78	3,12	50	25
<u>Micrococcus flavus</u>	0,78	1,56	50	50
<u>Coryne. bovis</u> 1810	1,56	6,25	50	50
<u>Ps. fluorescens</u> NIHJB-254	>100	100	100	>100
<u>Proteus morganii</u>	>100	>100	>100	>100
<u>Mycobacterium</u> <u>smegmatis</u> ATCC 607	6,25	12,5	100	>100
<u>Candida albicans</u> IAM 4905	100	100	100	>100
<u>Candida tropicalis</u>	100	100	100	>100

BM: baumycin

Som vist ovenfor har de omhandlede baumycin A₁, A₂, B₁ og B₂ antimikrobiel aktivitet, især mod gram-positive bakterier, og de er således terapeutisk nyttige ved behandling af dyr, indbefattet mennesker, mod diphtheria, tuberculosis, pneumonia, tetanus og andre infektionssygdomme, som er forårsaget af gram-positive bakterier.

De omhandlede baumycin A₁, A₂, B₁ og B₂ udviser en udpræget antitumor-aktivitet med lav toksicitet i eksperimentelle dyretests og er således terapeutisk nyttige ved hæmning af væksten af tumorer i pattedyr, indbefattet mennesker. Især udviste baumycin A₁, A₂, B₁ og B₂ udpræget inhiberende virkninger på muse-L-1210-leukemia. F.eks. podedes BDF₁-mus intraperitonealt med 1×10^6 L-1210 celler/mus, og 24 timer efter podning injiceredes medikamentet intraperitonealt én gang daglig i 10 dage efter hinanden. På dag 30 var den procentvise forlængelse af overlevelsestiden i forhold til kontrollen som følger:

Dosis (mg/kg/dag)	Forlængelse af overlevelsestid 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			

BM = Baumycin

Akut toksicitet.

LD₅₀-værdierne bestemt efter intraperitonealt injektion af de omhandlede antibiotica er vist i den følgende tabel.

	<u>LD₅₀ (mg/kg)</u>
BM-A ₁	1,5 - 2,5
BM-A ₂	15 - 20
BM-B ₁	40 - 60
BM-B ₂	75 - 100

BM = baumycin.

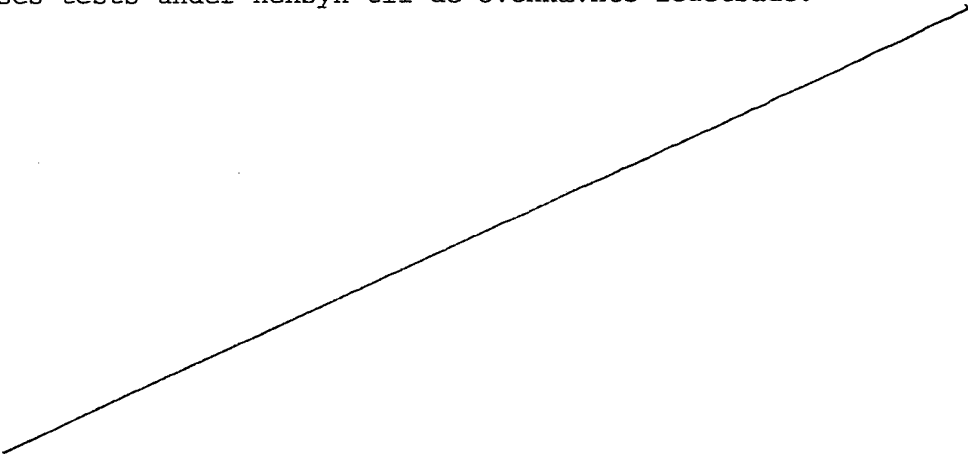
Som ovenfor anført er de omhandlede forbindelser baumycin A₁, A₂, B₁ og B₂ hidtil ukendte antibiotica, som er nyttige til både human og veterinær medicinsk brug, og som også har udpræget inhiberende virkning mod ondartede tumorer i pattedyr, indbefattet mennesker, især ascitiske og faste tumorer.

De omhandlede forbindelser danner ikke-toksiske syreadditions-salte med forskellige organiske og uorganiske salt-dannende reagenser og danner ikke-toksiske komplekser med deoxyribonucleinsyre. Således kan syreadditionssalte, dannet med farmaceutisk acceptable syrer, såsom svovl-, phosphor-, salt-, eddike-, propion-, olie-, palmitin-, citron-, rav-, vin-, glutamin-, pantothen-syre osv., og ikke-toksiske komplekser med deoxyribonucleinsyre anvendes på samme måde som baumycin-forbindelserne i sig selv. Saltene dannes, isoleres, renses og formuleres ved metoder, som sædvanligvis anvendes ved saltdannelse for antibiotica. I tilfælde af DNA-komplekser kan DNA, som er ekstraheret fra dyr og mikroorganismer, såsom kalvethymus, hela-celler, menneske- og dyre-embryo-celler, gærarter osv., anvendes. Fremstilling af baumycin-DNA-komplekser kan udføres ved metoder, som er beskrevet i litteraturen for fremstilling af DNA-komplekser af andre anthracyclin-antibiotica, såsom adriamycin, daunorubicin osv. [se f.eks. Nature, New Biol. 239:110 (1973) og Europ. J. Cancer 10:399 (1974)].

Farmaceutiske præparater, som indeholder en effektiv antibakteriel eller tumor-inhiberende mængde af baumycin A₁, A₂, B₁ eller B₂ eller en blanding deraf eller af et ikke-toksisk syreadditionssalt eller DNA-kompleks deraf i kombination med en inert farmaceutisk acceptabel bærer eller fortynder, kan fremstilles i en hvilken som helst farmaceutisk form, som er passende til parenteral administrering.

Sådanne præparater til parenteral administrering omfatter sterile vandige eller ikke-vandige opløsninger, suspensioner eller emulsioner. De kan også fremstilles i form af sterile faste præparater, som kan opløses i sterilt vand, fysiologisk saltvandsopløsning eller et andet sterilt injicerbart medium umiddelbart før brug.

Det er indlysende, at de aktuelle foretrukne mængder af de anvendte baumycin-antibiotica vil variere alt efter den anvendte bestemte forbindelse, det formulerede bestemte præparat, anbringelsesmånen og det bestemte udspring, den bestemte værtsorganisme og den bestemte sygdom, som skal behandles. Sædvanligvis injiceres baumycin-antibioticaene intraperitonealt, intravenøst, subcutant eller lokalt i dyr og intravenøst eller lokalt i mennesker. Mange faktorer, som modificerer medikamentets virkning, skal tages i betragtning af fagmanden, f.eks. alder, legemsvægt, køn, diæt, administreringstid, administreringsvej, ekskretionshastighed, patientens tilstand, medikamentkombinationer, reaktionsoverfølsomheds-tilfælde og sygdommens alvor. Administrering kan udføres kontinuert eller periodisk indenfor den størst tålte dosis. Optimale anbringelseshastigheder for et givet sæt betingelser kan fagmanden skaffe sig kendskab til under anvendelse af konventionelle doseringsbestemmelser-tests under hensyn til de ovennævnte ledetråde.



Med henblik på anvendelse som et antibakterielt middel administreres baumycín-præparaterne sædvanligvis således, at koncentrationen af aktiv bestanddel er større end den mindste inhiberende koncentration for den bestemte organisme, som behandles.

De følgende eksempler skal nærmere belyse opfindelsen yderligere.

Eksempel 1.

Et næringsmedium med den følgende sammensætning foruden vand fremstilledes:

Kartoffelstivelse	1	%
glucose	1	-
"Prorich" (soyabønnepulver)	1,5	-
K_2HPO_4	0,1	-
$MgSO_4, 7H_2O$	0,1	-
NaCl	0,3	-
mineraller *	(pH-værdi 7,4)	0,125 -

* mineraller	$CuSO_4, 5H_2O$	2,8 g
	$FeSO_4, 7H_2O$	0,4 -
	$MnCl_2, 4H_2O$	3,2 -
	$ZnSO_4, 7H_2O$	0,8 -

i 500 ml vand.

50 ml af dette medium steriliseredes ved 120 °C i 15 minutter i en 500 ml kolbe, som podedes fra en agar-skråglaskultur af *Streptomyces coeruleorubidus* ME 130-A4 ved hjælp af en platinøjel.

Inkubering fortsatte i 72 timer ved 28 °C på en rotationsryster (230 omdr./min.). Dette var pødekulturen. 7 l af det følgende medium fremstilledes, og 50 ml portioner af mediet fordelt og steriliseret i 500 ml kolber podedes aseptisk med 1 ml af den ovennævnte pødekultur. Fermentering udførtes ved 28 °C i 7 dage på en rotationsryster (130 omdr./min.).

Saccharose	4	%
"Prorich" (soyabønneprotein, Ajinomoto Co.)	2,5	-
NaCl	0,25	-
calciumcarbonat	0,32	-
mineraller *	(pH-værdi 7,4)	0,125 -

+ mineraler	CuSO ₄ , 5H ₂ O	1,25 g
	MnCl ₂ , 4H ₂ O	1,25 -
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	12,5 -

i 500 ml vand.

Det opnåede dyrkede substrat filtreredes til adskillelse af dyrkningsfiltratet og myceliet. Filtratet ekstraheredes 3 gange med 1/5 volumen chloroform. Myceliet ekstraheredes 3 gange med 2 l acetone pr. 1 kg kage, og den resulterende acetoneekstrakt koncentreret til halvt volumen under formindsket tryk.

Koncentratet ekstraheredes 3 gange med 2 l chloroform, kombineredes med den fra dyrkningsfiltratet opnåede chloroformopløsning og koncentreret til tørhed under formindsket tryk. 10 g opnået olieagtigt stof opløstes i 50 ml chloroform, og det ved tilsætning af 300 ml n-hexan dannede bundfald centrifugeret i 5 minutter ved 3000 omdr./min. til fjernelse af urene, i n-hexaner opløselige stoffer. Det resulterende bundfald (1,4 g) opløstes i 100 ml chloroform og ekstraheredes 3 gange med 150 ml 0,01M eddikesyre til opnåelse af syre-opløselige stoffer. Til denne ekstrakt sættes 2M tris-hydroxyamino-methanopløsning til indstilling af pH-værdien på 8,5, og opløsningen ekstraheredes derefter 3 gange med 100 ml chloroform. Der opnåedes 230 mg rødt rå pulver (baumycin-kompleks) fra chloroformlaget ved koncentreret til tørhed under formindsket tryk.

Eksempel 2.

Det rå pulver opnået ifølge Eksempel 1 (230 mg) opløstes i 2 ml chloroform-methanol-blanding (10:1), overførtes til en søjle med 65 cm længde og 8 cm diameter fyldt med 80 g kiselsyre og udvaskedes med chloroform-methanol-blanding (10:1). Baumycin A₁-fraktionen elueredes først, efterfulgt i rækkefølge af baumycin A₂, B₁ og B₂ under anvendelse som det respektive elueringsmiddel af 8:1, 5:1 og 2:1 blandinger af chloroform-methanol.

Efter at hver aktiv fraktion var forenet hver for sig og koncentreret til tørhed under formindsket tryk, overførtes hver fraktion til en søjle med 25 cm længde og 1,8 cm diameter fyldt med "Sephadex LH-20" og udvaskedes med 3:1 toluen-methanol-blanding. Efter koncentreret af de ovenfor opnåede fraktioner opnåedes røde pulvere af 10 mg baumycin A₁, 18 mg baumycin A₂, 3 mg baumycin B₁ og 1 mg baumycin B₂ ved tilsætning af n-hexan til koncentratet.

Eksempel 3.

Et næringsmedium med den følgende sammensætning foruden vand fremstilledes:

Kartoffelstivelse	2	%	
glucose	2	-	
gærekstrakt (Daigo Eyo Co.)	0,5	-	
NaCl	0,25-		
calciumcarbonat	0,32-		
soyamel ("Nishin Oil KK")	2	-	
mineraler +	0,2	-	(pH-værdi 7,4)
+ mineraler, som i Eksempel 1.			

8 l af det ovennævnte medium fremstilledes, hvoraf 50 ml portioner fordeltes i 500 ml kolber, steriliseredes ved 120 °C i 15 minutter og podedes med 1 ml podekultur af *Streptomyces peuceticus* subsp. *carneus* ATCC 21354 fremstillet ved den i Eksempel 1 beskrevne metode. Fermentering udførtes på en rotation-ryster ved 28 °C i 6 dage. Det dyrkede substrat filtreredes til adskillelse af myceliet fra dyrkningsfiltratet. Ekstraktion med chloroform og acetone foregik som i Eksempel 1, og 10 g olieagtigt stof opnåedes. Det olieagtige stof opløstes i 100 ml methanol, og 1,2 g bundfald opnåedes efter fjernelse af n-hexan-opløselige stoffer ved tilsætning af 100 ml n-hexan. Det røde bundfald opløstes i 100 ml chloroform og ekstraheredes med 600 ml natriumacetat-puffer (pH-værdi 3,0) til opnåelse af et syre-opløseligt stof. Efter tilsætning af 0,5 M ethylendiamintetraeddikesyre til ekstrakten, indtil denne var 0,01M, indstilledes pH-værdien til 8 med 4M natriumhydroxid.

De aktive bestanddele i denne vandige opløsning ekstraheredes 4 gange med 200 ml chloroform og ekstraheredes derefter 2 gange med 500 ml n-butanol. De resulterende chloroform- og n-butanol-lag koncentreredes hver for sig under formindsket tryk, og 200 mg rødt pulver, som hovedsageligt bestod af baumycin B₂, opnåedes. Dette rå pulver opløstes i 5 ml chloroform-methanol, overførtes til en søjle med 23 cm længde og 3,0 cm diameter fyldt med 80 g kiselsyre og udvaskedes med en 20:1 blanding af chloroform og methanol. Baumycin B₁ og B₂ elueredes i rækkefølge med 5:1 og 2:1 blandinger af chloroform og methanol. Fraktioner af baumycin B₁ og B₂ koncentreredes hver for

sig under formindsket tryk, og 50 mg baumycin B₁ og 8 mg baumycin B₂ opnåedes. De resulterende baumycin B₁ og B₂ omkrystalliseredes fra methanol, og henholdsvis 31 mg og 6,5 mg krystallinsk materiale opnåedes. Ved denne metode fremstilles meget lidt baumycin A₁ og A₂.

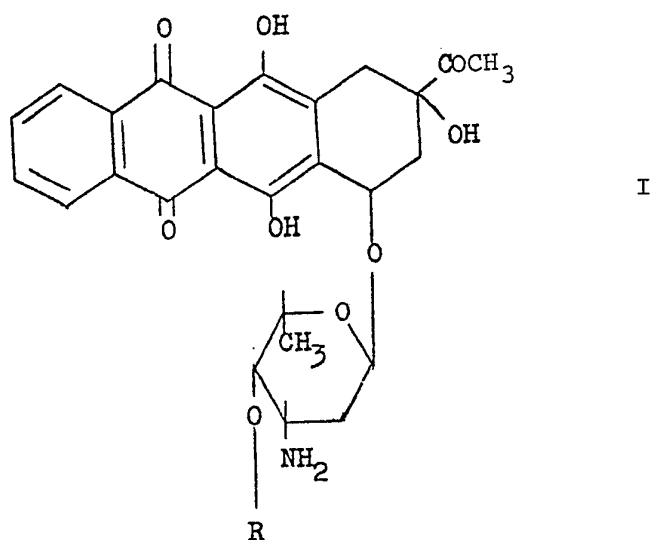
Eksempel 4.

I overensstemmelse med de almene metoder beskrevet i Eksempel 1 og 2 opnåedes baumycin A₁, A₂, B₁ og B₂ som følger ved anvendelse af de anførte Streptomyces-stammer:

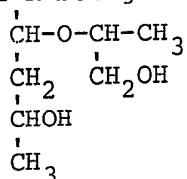
Stamme	baumycin opnået (mg)			
	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂
Streptomyces peuceticus subsp. carneus ATCC 21354	8	12	4	2
Streptomyces coeruleorubidus ATCC 13740	16	21	8	3
Streptomyces peuceticus subsp. caestus NRRL B-5337	11	10	7	3
Streptomyces peuceticus NRRL B-3826	10	5	1	3
Streptomyces coeruleorubidus NRRL B-3045	26	17	5	6

PATENTKRAV

Fremgangsmåde til fremstilling af et antibiotisk anthracyclin-glycosid-kompleks kaldet baumycin-kompleks eller dets komponenter baumycin A₁, A₂, B₁ og B₂, hvor baumycin A₁ og A₂ er stereoisomere med formelen

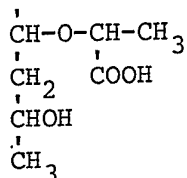


hvor i R betegner



og

baumycin B₁ og B₂ er stereoisomere med formelen I, hvor i R betegner



eller syreadditionssalte eller deoxyribonukleinsyrekomplekser deraf, KENDETEGNET ved, at man dyrker en stamme af Streptomyces udvalgt fra gruppen bestående af Streptomyces coeruleorubidus ME 130-A4 (FERM-P3540, ATCC 31276), Streptomyces peuceticus subsp. carneus ATCC 21354, Streptomyces coeruleorubidus ATCC 13740, Streptomyces

peuceticus subsp. caestus NRRL B-5337, *Streptomyces peuceticus* NRRL B-3826 og *Streptomyces coeruleorubidus* NRRL B-3045 i et vandigt næringsmedium under submerse aerobe betingelser og udvinder det dannede baumycin-kompleks fra dyrkningsmediet og, om ønsket, opdeler det i sine bestanddele og/eller overfører dem i syreadditionssalte eller deoxyribonukleinsyrekomplekser.

Fremdragne publikationer:

FIG. 1

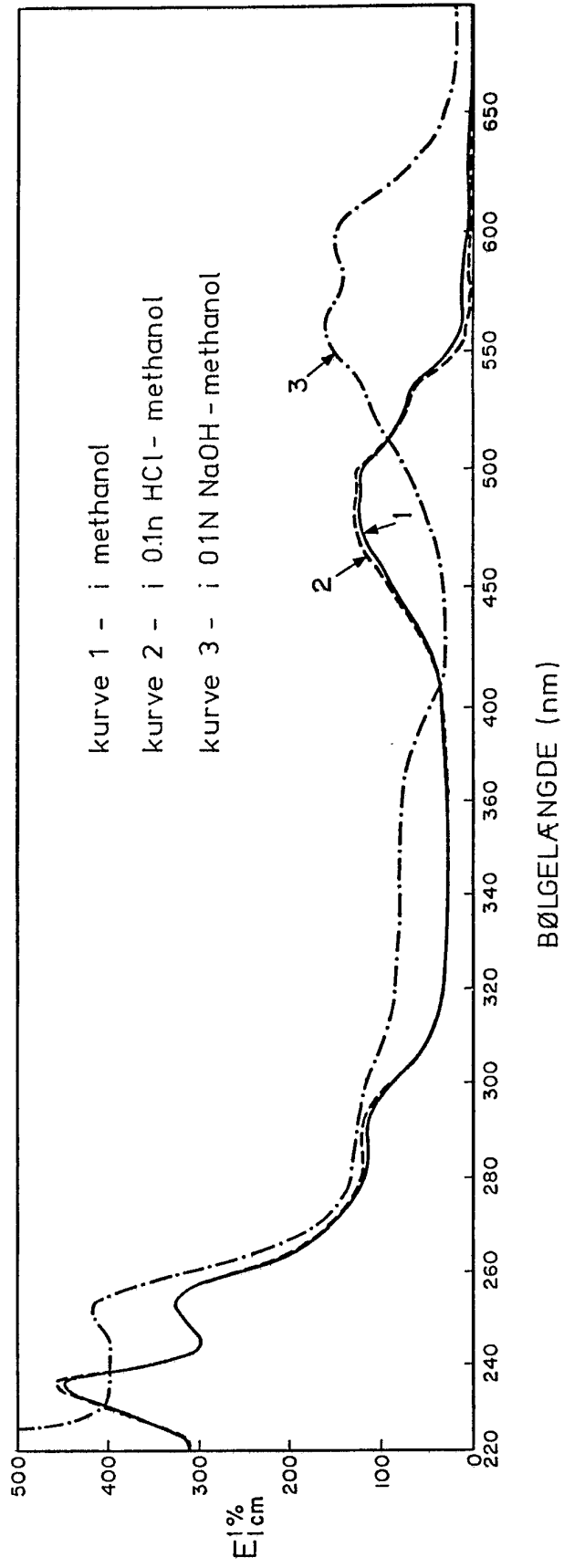
ULTRAVIOLET OG SYNLIGT ABSORPTIONSSPEKTRUM AF BAUMYCIN A₁

FIG. 2

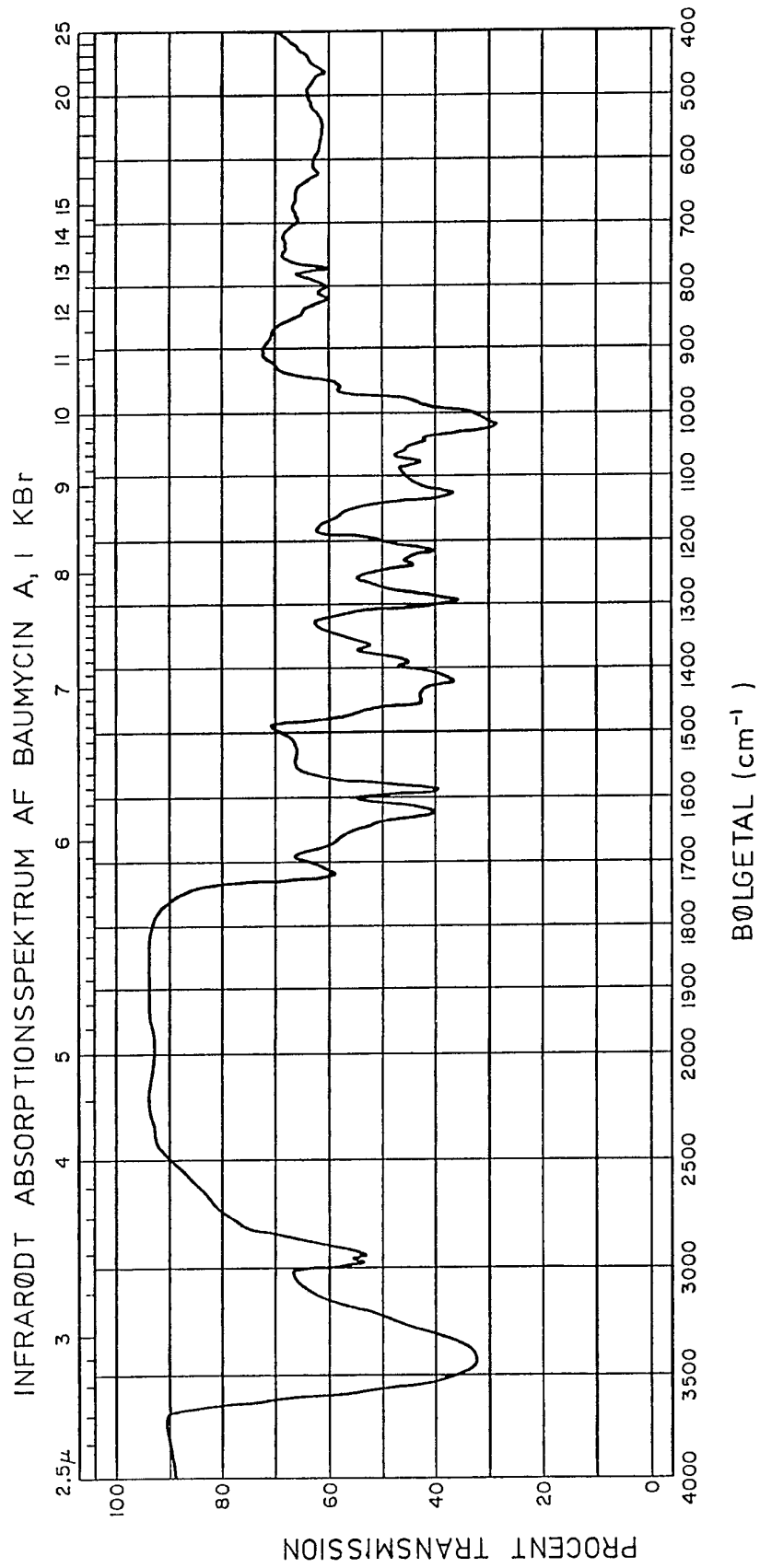


FIG. 3

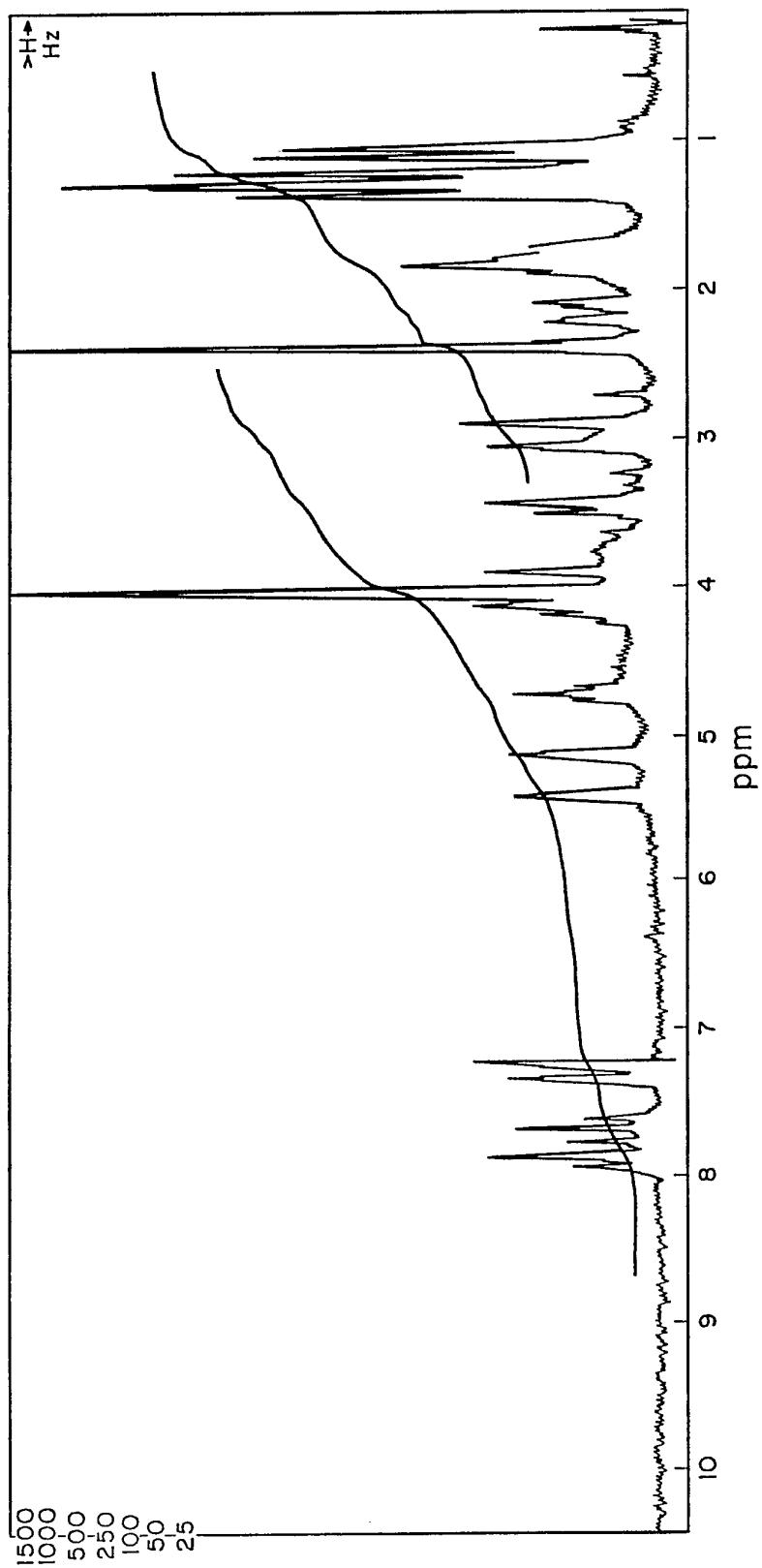
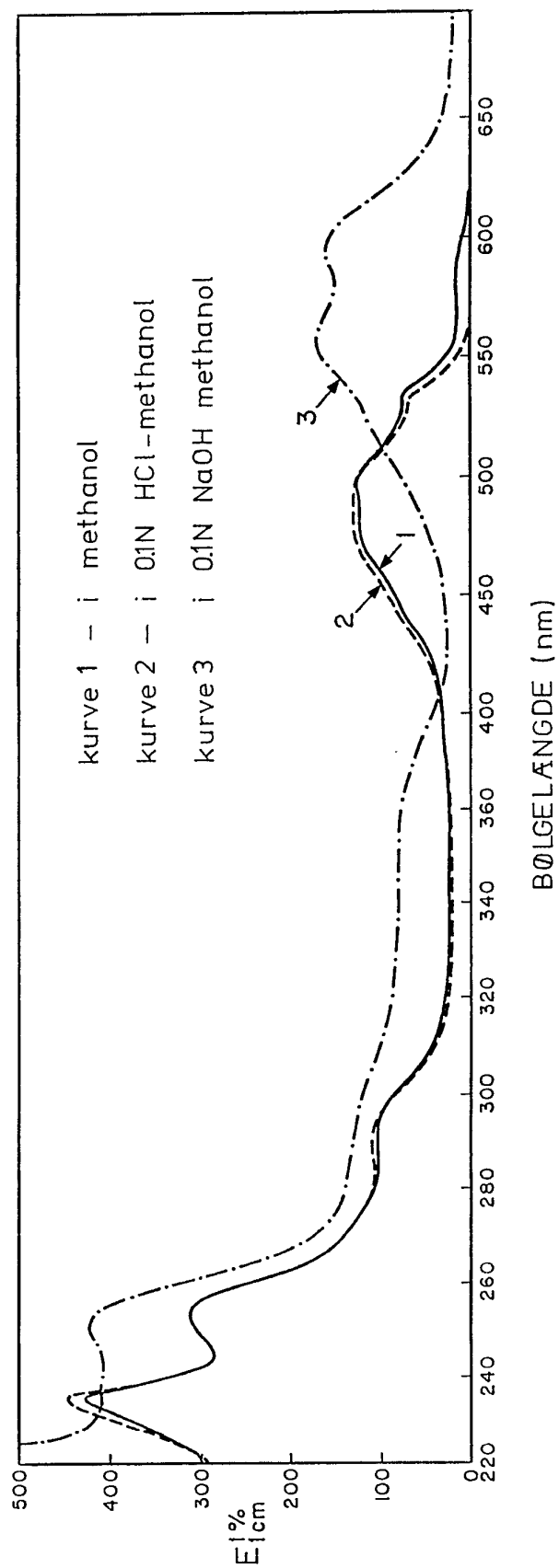
NMR-SPEKTRUM AF BAUMYCIN A₁ (100 MHz I CDCl₃, INDREREFERENCE: TMS)

FIG. 4
ULTRAVIOLET OG SYNLIGT ABSORPTIONSSPEKTRUM AF BAUMYCIN A₂



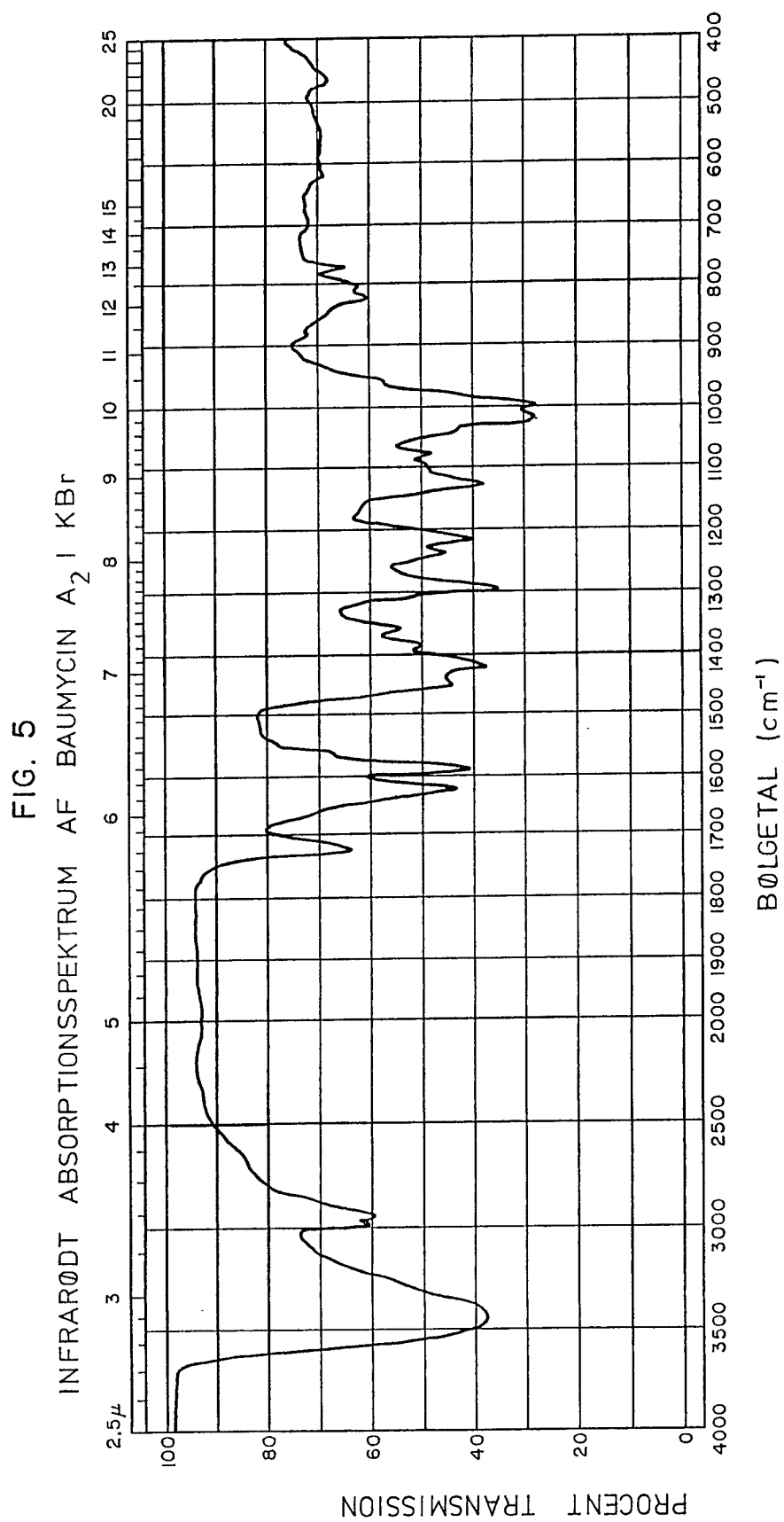


FIG. 6
NMR SPEKTRUM AF BAUMYCIN A₂ (100MHz | CDCl₃/INDRE REFERENCE:TMS)

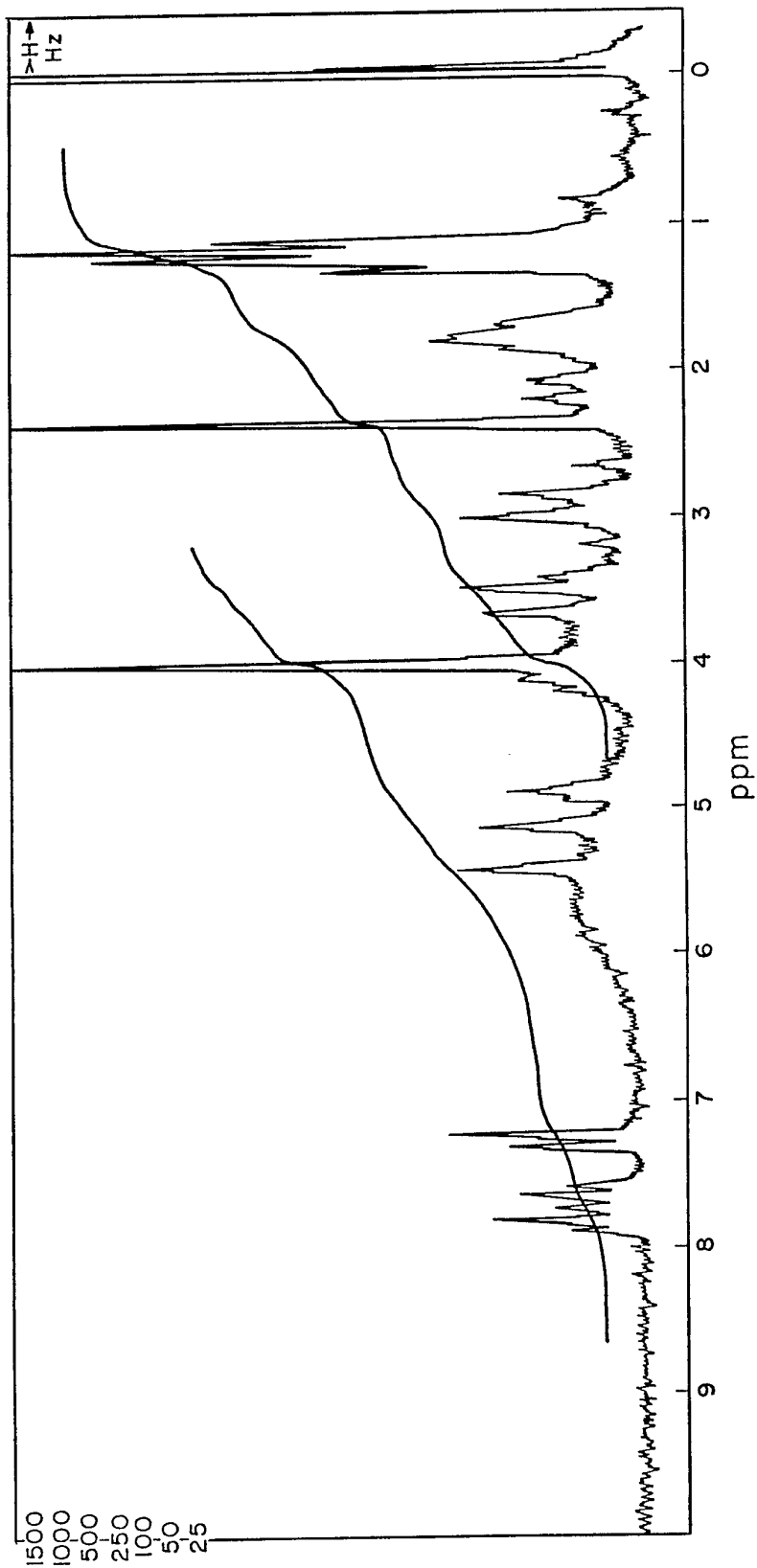
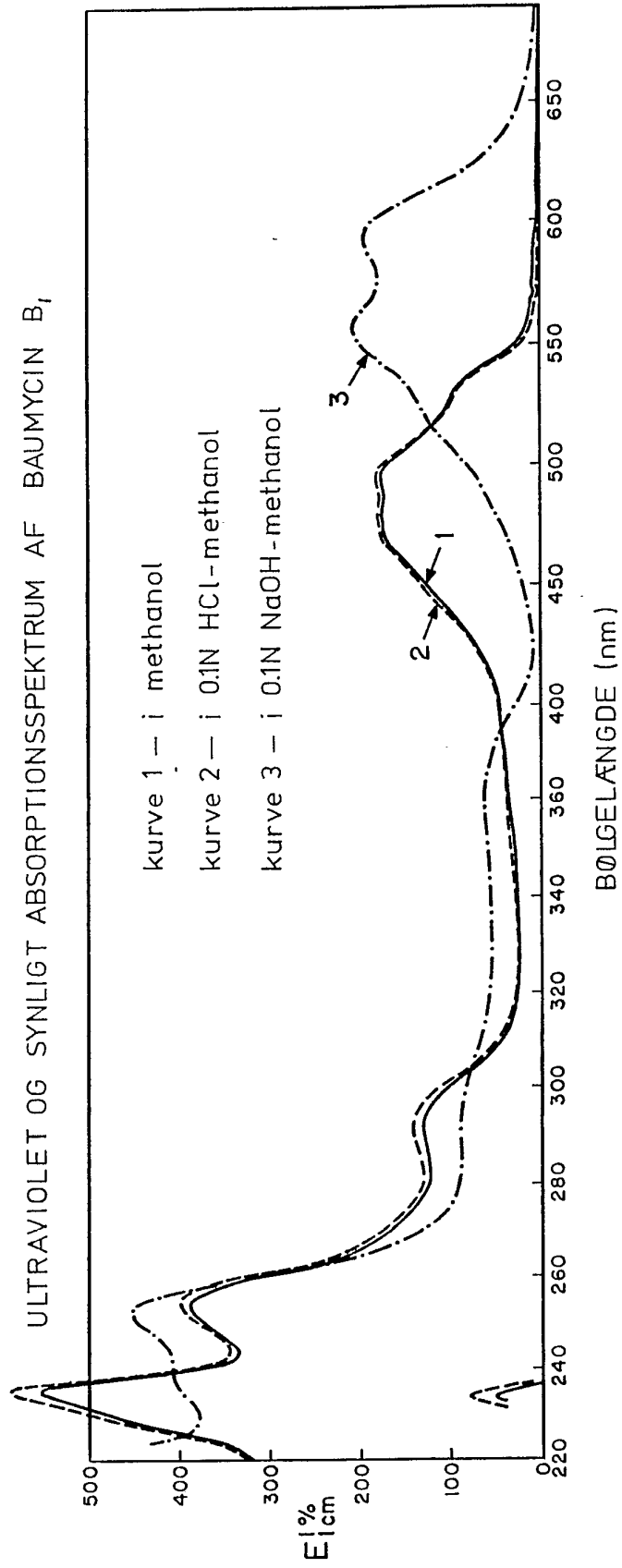


FIG. 7



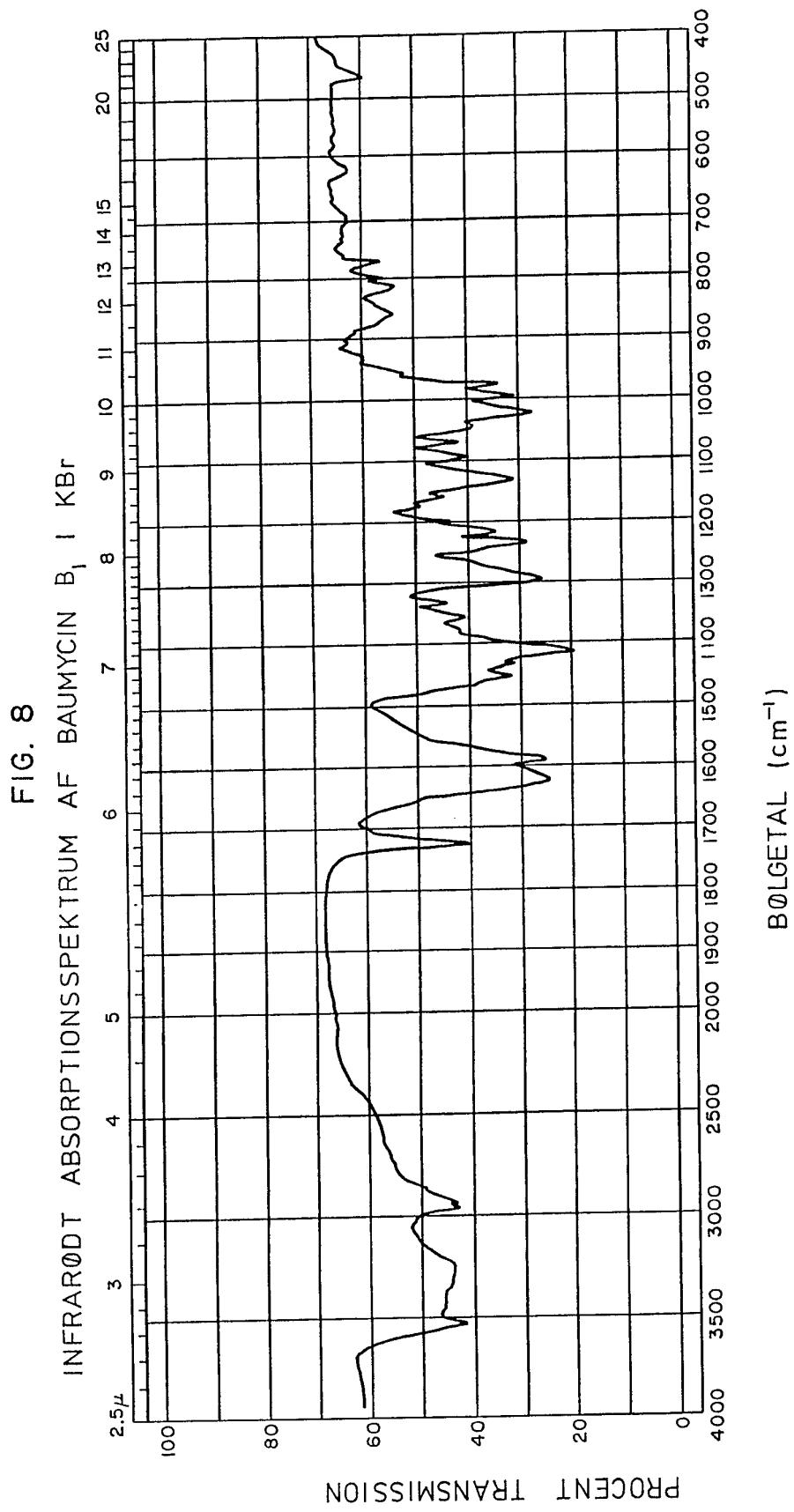


FIG. 9
NMR SPEKTRUM AF BAUMYCIN B₁
(100 MHz I CDCl₃ + CD₃OD, INDRE STANDARD: TMS)

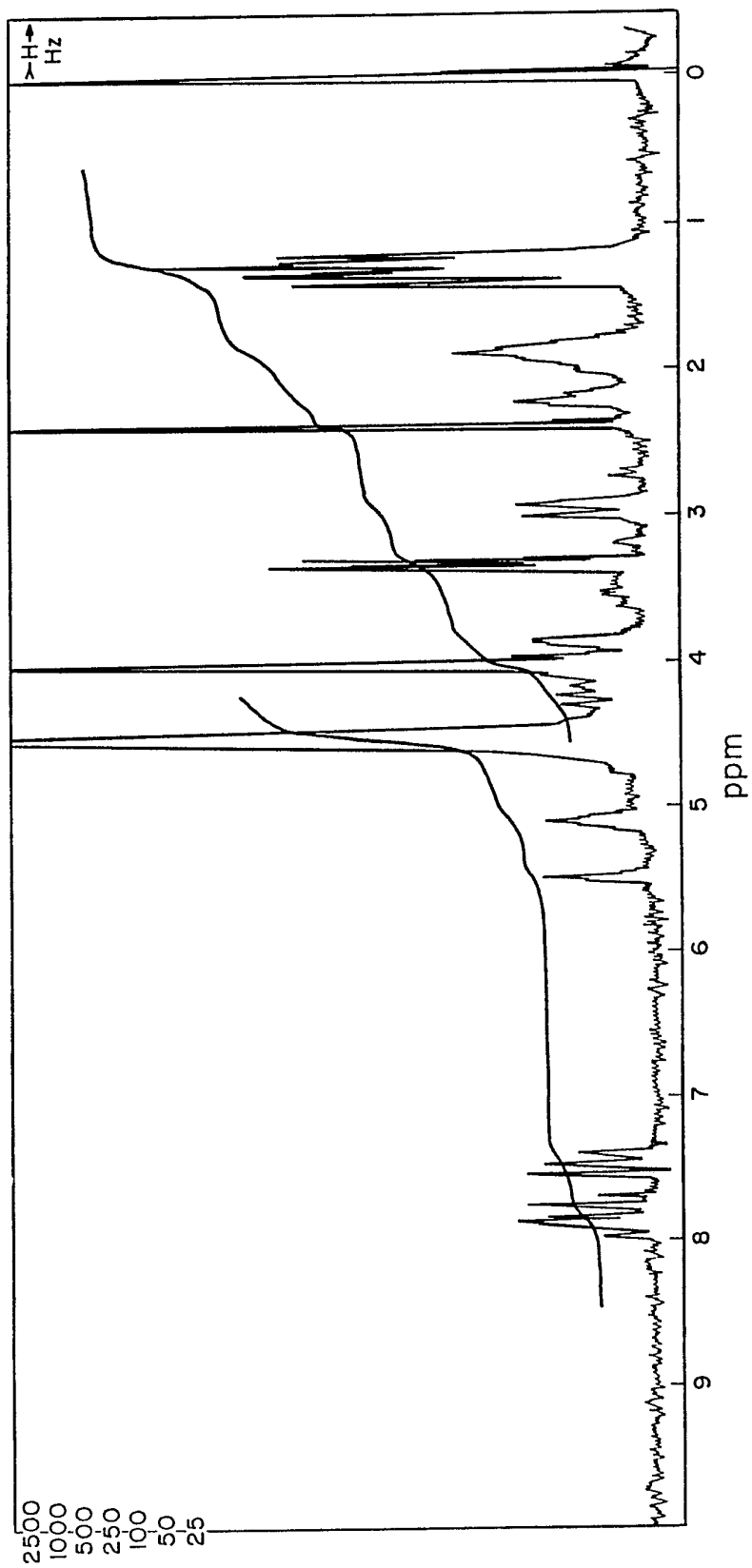


FIG. 10

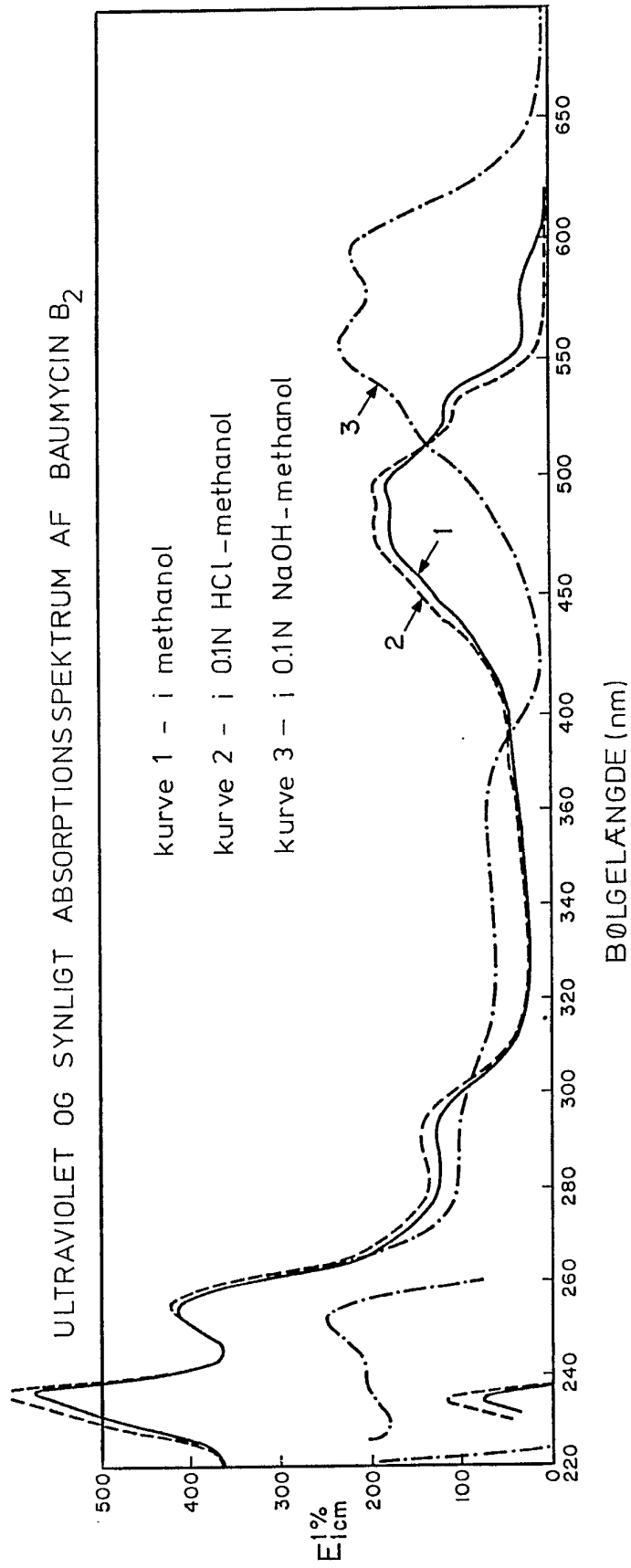


FIG. 11

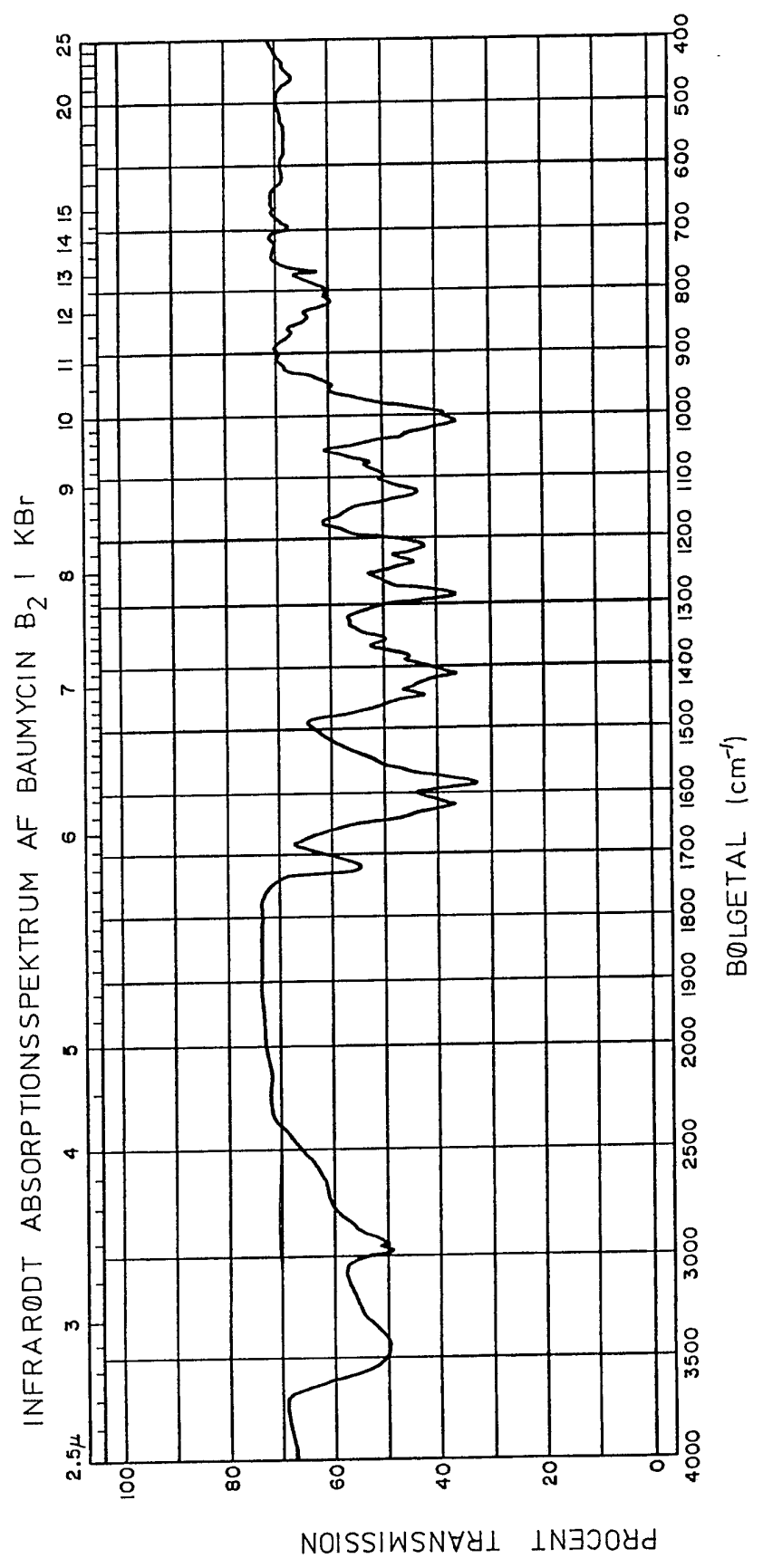


FIG. I2
NMR SPEKTRUM AF BAUMYCIN B₂
(100 MHz I CDCl₃ + CD₃OD, INDRE STANDARD: TMS)

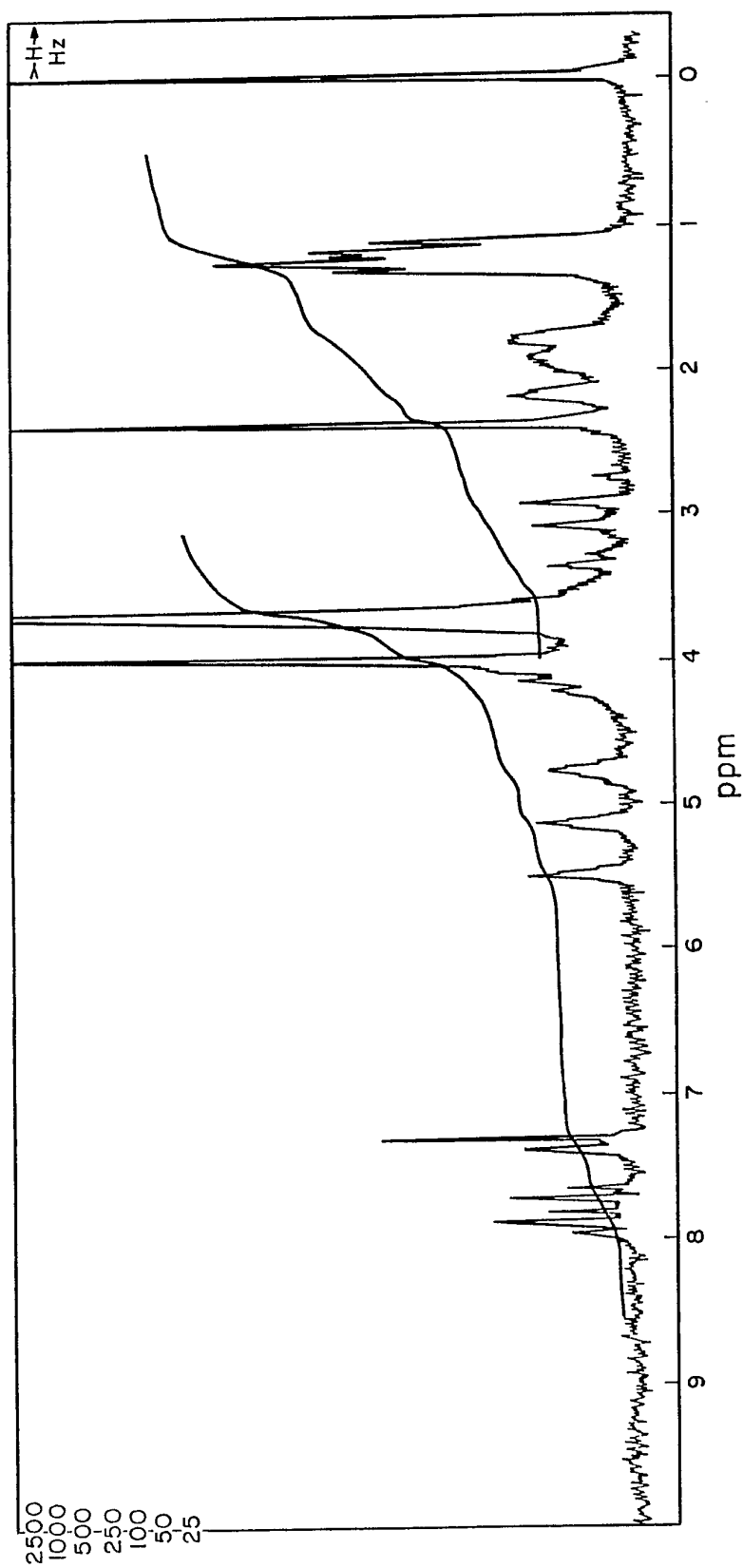


FIG. 13

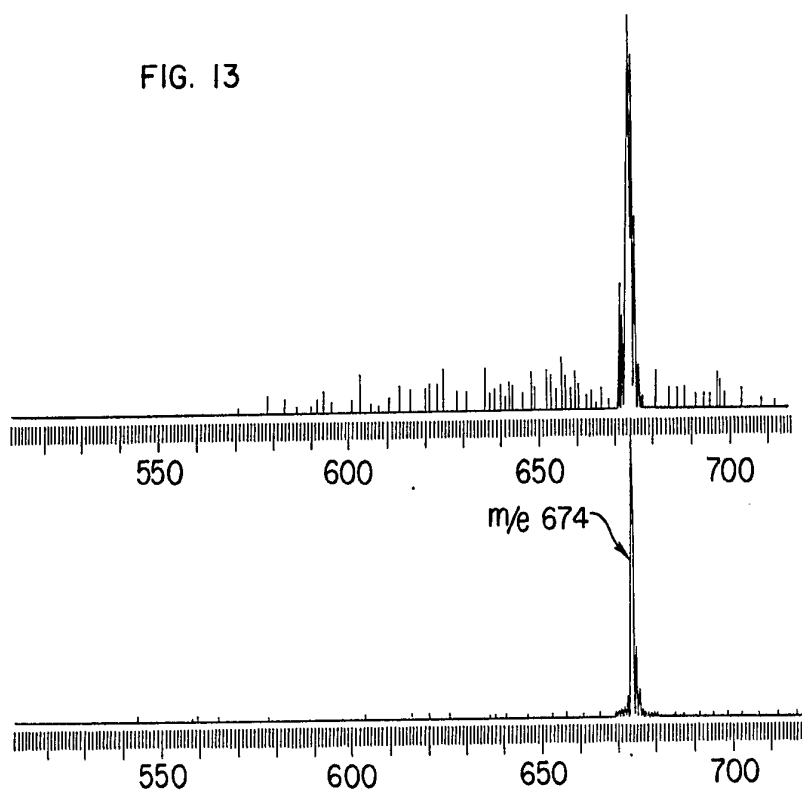


FIG. 14

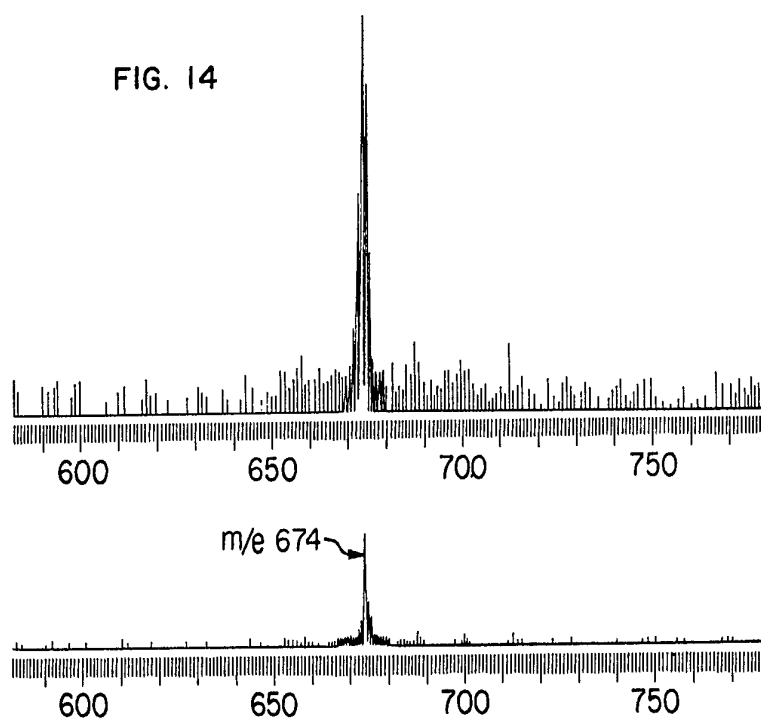


FIG. 15

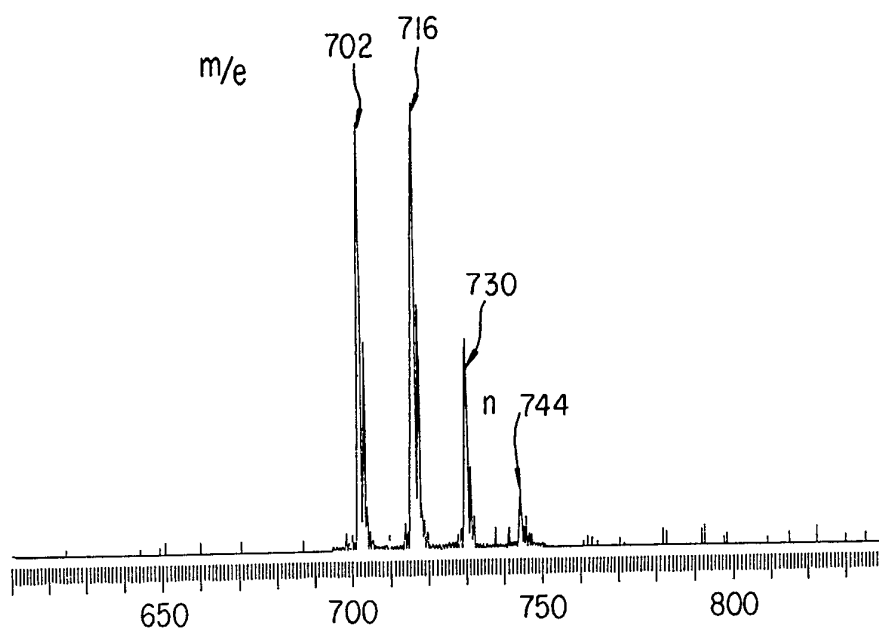


FIG. 16

