



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: C 12 P 19/56
C 07 H 15/24
C 07 H 21/02
// C 12 R 1/465



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

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

630 958

<p>⑰ Gesuchsnummer: 10002/77</p> <p>⑳ Anmeldungsdatum: 16.08.1977</p> <p>㉓ Priorität(en): 16.08.1976 JP 51-98113</p> <p>㉔ Patent erteilt: 15.07.1982</p> <p>④⑤ Patentschrift veröffentlicht: 15.07.1982</p>	<p>⑦③ Inhaber: Zaidanhojin Biseibutsukagaku Kenkyukai, Tokyo (JP)</p> <p>⑦② Erfinder: Hamao Umezawa, Nerima-ku/Tokyo (JP) Tomio Takeuchi, Shinagawa-ku/Tokyo (JP) Masa Hamada, Hoya-shi/Tokyo (JP) Masaaki Ishizuka, Ota-ku/Tokyo (JP) Hiroshi Naganawa, Ota-ku/Tokyo (JP) Taiji Inui, Chigasaki-shi/Kanagawa-ken (JP) Toshikazu Oki, Tebiro/Kanagawa-ken (JP)</p> <p>⑦④ Vertreter: Bovard & Cie., Bern</p>
---	---

⑤④ **Verfahren zur Herstellung von Rhodirubin A und Rhodirubin B.**

⑤⑦ Die neuen Antitumor-Mittel der Bezeichnung Rhodirubin A und Rhodirubin B sind Anthracyclin-Glycoside und hemmen das Wachstum von gram-positiven Bakterien und das Wachstum von weiblichen Brusttumoren. Die Herstellung erfolgt durch Züchtung von Rhodirubin erzeugenden Stämmen von Streptomyces, z.B. Streptomyces sp. ME 505-HEI (ATCC 31273). Rhodirubin A und B können in Form eines Gemisches oder voneinander getrennt, im rohen oder gereinigten Zustand erhalten und verwendet oder gewünschtenfalls zu Säureadditionssalzen, oder DNA-Komplexen umgesetzt werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung eines Gemisches von rohem Rhodirubin A und Rhodirubin B oder einem Säureadditionssalz davon dadurch gekennzeichnet, dass man einen Rhodirubin A und Rhodirubin B erzeugenden Stamm von Streptomyces aus der Gruppe von Streptomyces sp. ME 505-HEI (ATCC 31273, FERM P-3667), Streptomyces galilaeus MA 144-M (ATCC 31133, FERM 2455), Streptomyces galilaeus (ATCC 14969), Streptomyces cinereoruber (ATCC 19740), Streptomyces niveoruber (ATCC 14971), Streptomyces antibioticus (ATCC 8663) und Streptomyces purpurascens (ATCC 25489) in einem wässrigen Nährmedium unter submersen aeroben Bedingungen züchtet und danach ein Gemisch von rohem Rhodirubin A und Rhodirubin B gewinnt, und gegebenenfalls zu einem Säureadditionssalz umsetzt.

2. Verfahren zur Herstellung von Rhodirubin A oder B oder einem Säureadditionssalz davon, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Verfahren nach Anspruch 1 ein Gemisch von Rhodirubin A und B herstellt und in Rhodirubin A und B trennt und gegebenenfalls zu einem Säureadditionssalz umsetzt.

3. Verfahren zur Herstellung eines DNA-Komplexes von Rhodirubin A oder Rhodirubin B, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Verfahren nach Anspruch 2 Rhodirubin A oder B herstellt und dann mittels Deoxyribonukleinsäure zu einem DNA-Komplex umsetzt.

4. Nach dem Verfahren nach Anspruch 1 hergestelltes Gemisch von rohem Rhodirubin A und Rhodirubin B oder ein Säureadditionssalz davon.

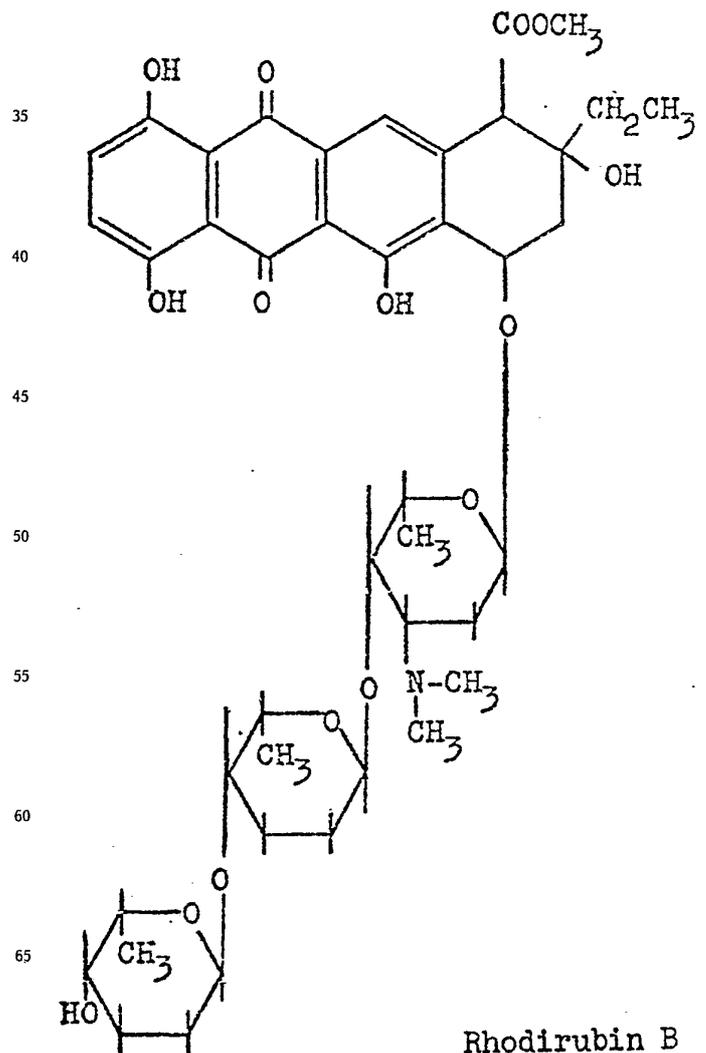
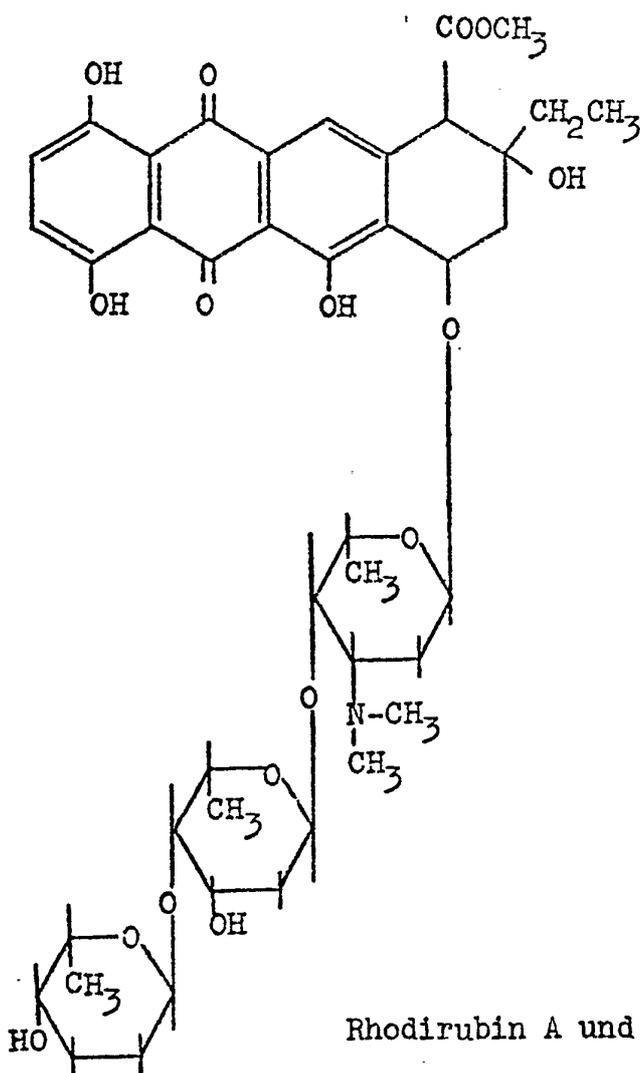
5. Nach dem Verfahren nach Anspruch 2 hergestelltes Rhodirubin A oder B oder ein Säureadditionssalz davon.

6. Nach dem Verfahren nach Anspruch 3 hergestellter DNA-Komplex von Rhodirubin A oder B.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von neuen Antitumor-Antibiotika vom Typus Anthracyclin-glykosiden in Form eines Gemischs von rohem Rhodirubin A und B oder der voneinander getrennten Rhodirubinen A und B in rohem oder gereinigtem Zustand, gegebenenfalls in Form ihrer Säureadditionssalze oder DNA-Komplexe.

Die neuen Anthracyclin-glykosid-Antibiotika sind hier als Rhodirubin A und B bezeichnet. Diese Antibiotika werden durch Züchtung eines Rhodirubin erzeugenden Stammes von Streptomyces in einem wässrigen Nährmedium unter submersen aeroben Bedingungen erhalten, bis eine entsprechende Menge an Rhodirubin durch genannte Mikroorganismen in genanntem Kulturmedium erzeugt ist und gegebenenfalls werden diese Rhodirubine aus dem Kulturmedium gewonnen. Rhodirubin A und B kann aus dem Kulturmedium gewonnen und durch Extrahieren der Brühe, mit oder ohne vorangehende Separierung der Mycellen gewonnen werden oder durch Extraktion aus den Mycellen und anschließender Separierung und Gewinnung der einzelnen Antibiotika mittels Standardverfahren, welche verwendet werden, um andere wasserunlösliche Antibiotika zu isolieren und zu reinigen.

Mittels der vorliegenden Erfindung werden somit die Antitumor-Antibiotika-Rhodirubin A und B der Formel



und die nicht-toxischen Säureadditionssalze und Komplexe derselben mit Deoxyribonukleinsäure gewonnen.

Es wurde gefunden, dass Rhodirubin A und B sowohl eine antimikrobielle als auch eine Antitumor-Wirksamkeit besitzt. Insbesondere weisen die beschriebenen Verbindungen antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber gram-positive Bakterien, hemmen das Wachstum von Feststoffen und aszitischen Formen von bösartigen Tumoren in der weiblichen Brust, z. B. Mäuse-Leukämie L1210, besitzt eine hohe cytotoxische Wirksamkeit und hemmt auf diese Weise das Wachstum der weiblichen Brust-Tumorzellen in der Kultur und weist eine Toxizität auf.

Die Bezeichnung Rhodirubin bezieht sich auf das Antibiotikum, welches mindestens ein Antibiotikum gewählt aus Rhodirubin A und Rhodirubin B umfasst.

Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung werden erzeugt durch Züchten von verschiedenen Rhodirubin erzeugenden Stämmen von *Streptomyces*, einschliesslich mehrere bekannte Pyromycin, Cinerubin, Aclacinomycin und Galirubin-erzeugenden Stämmen, wie *Streptomyces galilaeus* MA 144-M (ATCC 31133, FERM P-2455), *Streptomyces galilaeus* (ATCC 14969), *Streptomyces cinereoruber* (ATCC 19740), *Streptomyces antibioticus* (ATCC 8663), *Streptomyces pupurasceus* (ATCC 25489) und *Streptomyces niveoruber* (ATCC 14971). Der Mikroorganismus *Streptomyces galilaeus* MA 144-M ist in der US-PS 3 988 315 vom 26. Oktober 1976 offenbart. Die weiteren, vorstehend genannten Mikroorganismen ATCC 14969, 19740, 8663, 25489 und 14971 wurden bei der nachstehend identifizierten Sammelstelle am 21. Juli 1977 hinterlegt.

Ein bevorzugter Rhodirubin erzeugender Stamm von *Streptomyces* wurde isoliert aus einer Erdprobe, gesammelt am Campus des Institute of Microbial Chemistry at Osaki, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan, und Kulturen dieses Stammes, bezeichnet als Stamm ME 505-HEI wurden in American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, am 2. März 1977 und in der Fermentation Research Institute, Japan, hinterlegt und zugefügt zu ihrer permanenten Sammlung von Mikroorganismen (ATCC 31273 resp. FERM P-3667).

Die Charakteristiken von *Streptomyces* sp. ME 505-HEI werden im einzelnen untersucht. Der Stamm Nr. ME 505-HEI hat gegenwärtig die folgenden Charakteristiken: unter dem Mikroskop hat das aerale Mycelium keinen senkrechten Zweig und keine spirale Struktur. Es wurde gefunden, dass das Wachstum der verschiedenen Medien farblos, hellrotbraun bis dunkelbraunpurper ist und das aerale Mycelium wird nicht gebildet oder wird mit weisser bis rötlich-weisser Farbe gebildet. Es bildet sich ferner ein schwach rotes lösliches Pigment. Melaninbildung ist positiv. Auf Grund der obigen Charakteristiken gehört der Stamm ME 505-HEI zum Genus *Streptomyces*.

Da das *Streptomyces* leicht natürlich oder künstlich mutiert bzw. variiert werden kann, umfasst das genannte *Streptomyces* ME 505-HEI und die anderen Rhodirubin erzeugenden *Streptomyces* die oben beschriebenen typischen Stämme und sämtliche natürlichen und künstlichen Rhodirubin erzeugenden Varianten und Mutanten derselben.

Die erfindungsgemässe Erzeugung der beschriebenen neuen Verbindungen wird durchgeführt unter Züchtung eines Rhodirubin erzeugenden Stammes von *Streptomyces* in einem üblichen wässrigen Nährmedium, welches bekannte Nährquellen für Actinomycetes enthält, z. B. assimilierbare Quellen von Kohlenstoff und Stickstoff und gegebenenfalls anorganische Salze und andere bekannte Wachstumsfaktoren. Die submerse aerobe Kultur wird vorzugsweise verwendet für die Erzeugung von grossen Mengen der Antibiotika, obschon für die Erzeugung von begrenzten Mengen Oberflächenkulturen und Kulturen in Flaschen gleichfalls verwendet werden können. Die Medien bestehend aus bekannten Arten von Nährquellen für Actinomycetes sind nützlich und die allgemeinen verwendeten

Verfahren zur Züchtung anderer Actinomycetes sind gleichfalls in vorliegender Erfindung anwendbar. Das bevorzugte Medium enthält kommerziell erhältliche Produkte, wie Glukose, Glycerin, Stärke, Dextrin, Succrose, Maltose und ähnliche, als Kohlenstoffquelle mit anderen Kohlenhydraten, und es können Alkohole organischer Säuren Öle und Fette in entweder gereinigtem oder rohem Zustande zu diesem Zwecke, in Abhängigkeit von der Assimilierbarkeit des Stammes, angewendet werden. Kommerziell erhältliche Produkte, wie Sojabohnenmehl, Baumwollsaamenmehl, Fleischextrakt, Pepton, getrocknete Hefe, Hefeextrakt, Maisquellwasser und ähnliche werden mit Vorteil als organische Stickstoffquellen und anorganische Salze wie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , NH_4Cl und ähnliche können als anorganische Stickstoffquellen eingesetzt werden. Es können auch, falls notwendig, anorganische Salze, wie Chloride (NaCl oder KCl) oder Phosphate, Spurenmetalle (z. B. Zink, Magnesium, Mangan, Kobalt, Eisen und ähnliche) oder schaumverhütende Mittel, wie «Adekanol» (Handelsmarke von Asahi Denka Ind. Co.), «Silicon» (Handelsmarke von Shinetsu Chem. Ind. Co.), flüssiges Paraffin, Sojabohnenöl oder Fett benützt werden. Die Züchtungstemperatur soll zweckmässig im Bereiche von 20–37 °C, vorzugsweise 25–30 °C, liegen. Der pH-Wert des Kulturmediums liegt normalerweise im Bereiche von 5–8. Die Erzeugung von Rhodirubin in der Kulturbrühe erreicht gewöhnlich eine maximale Dauer von 3–7 Tagen nach der Impfung.

Eine Vielfalt von bekannten Verfahren kann bei der Isolierung und Reinigung der Rhodirubin-Verbindungen aus dem Fermentationsmedium verwendet werden, beispielsweise durch Lösungsmittelextraktion, Lösungsmittelfällung, Konzentration, Gelfiltrieren, Gegenstromverteilung, Chelatbildung mit Metallionen, Adsorption und anschliessend Eluieren aus einem Ionenaustauscherharz, mit Hilfe von Adsorptions-Kieselerde-Material oder mittels synthetischen Adsorbens, oder unter Verwendung einer Kombination einer oder mehrere oben genannter Verfahren.

In einem bevorzugten Gewinnungsverfahren wird das Rhodirubin A und B aus dem Kulturmedium durch Lösungsmittelextraktion gewonnen. Die Rhodirubin-Antibiotika sind ebenso intrazellulär als auch extracellulär vorhanden, sie werden aber hauptsächlich im Mycel gefunden. Mit Vorteil wird zuerst das Mycel vom Filtrat der Kulturbrühe mittels üblicher Mittel, wie Filtrieren oder Zentrifugieren, abgetrennt, obschon die Antibiotika auch direkt aus der Kulturbrühe durch weiter unter angeführte Verfahren, ohne Separierung des Mycels, extrahiert werden können. Das Rhodirubin A und B kann aus dem Filtrat bei neutralem oder schwach basischem pH, z. B. pH-Wert 7–9, mit einem wasser-nichtmischbaren organischen Lösungsmittel, wie Äthylacetat, Butylacetat, Chloroform, n-Butanol usw. extrahiert werden. Das Rhodirubin A und B im Mycel kann mit einem organischen Lösungsmittel, wie Chloroform, Äthylacetat, n-Butanol, Methanol, Aceton, Methyläthylketon, oder einer wässrigen Lösung einer organischen oder anorganischen Säure, wie Chlorwasserstoffsäure, oder Essigsäure, extrahiert werden. Die aktiven Rhodirubin-Extrakte können dann konzentriert und im Vakuum getrocknet werden, wobei ein rötliches oder rötlich-purpurfarbiges Pulver erhalten wird, welches ein Gemisch von rohem Rhodirubin A und B ist.

Zwecks Separierung der einzelnen Rhodirubin-A- und B-Komponenten aus dem rohen Gemisch, wird zweckmässig eine weitere Reinigung und Separierung eingeschaltet, wie eine Kolonnenchromatographie mit Adsorbentien, wie Silicagel, modifiziertem Dextran (z. B. «Sephadex» LH-20, Handelsmarke von Pharmacia Fine Chemicals, Schweden), durch schwach saure Ionenaustauscherharze, aktivierte Kohle oder Tonerde, Gegenstromverteilung oder mittels flüssiger Chromatographie geeigneter organischen Lösungsmitteln. Als ein Beispiel eines geeigneten Separierungsverfahrens kann das rohe

Rhodirubinpulver, das ist das Gemisch von A- und B-Komponenten, zuerst in Toluol-Methanol gelöst, dann einer Kolonnenchromatographie über Silicagel unterworfen und dann mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel, wie Toluol-Methanol, eluiert werden, wobei denn die individuellen Rhodirubin A- und B-Komponenten erhalten werden. Die das Rhodirubin A und B enthaltenden aktiven Eluate können unter vermindertem Druck eingengt und die individuellen Komponenten dann mittels Chromatographie über «Sephadex» LH-20 gereinigt werden.

Lösungen von gereinigten Rhodirubin A und B können gleichfalls nach Zugabe von einem oder mehreren Substanzen, wie Deoxyribonukleinsäure, Glycerin, Zucker, Aminosäuren oder organische oder anorganische Säuren, lyophilisiert werden.

Die physicochemischen Eigenschaften von Rhodirubin A und B sind die folgenden:

Rhodirubin A: rotes Pulver mit F 141–143 °C, Elementaranalyse zeigte die folgenden Werte:

Gefunden %	Berechnet für C ₄₂ H ₅₅ NO ₁₆ %
C = 60,39	C = 60,77
H = 6,63	H = 6,68
O = 30,72	O = 30,81
N = 1,71	N = 1,69

Molekulargewicht: 829,9

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} + 120$ (C = 0,1, CHCl₃).

Löslichkeit: Rhodirubin A ist löslich in Methanol, n-Butanol, Aceton, Äthylacetat, Chloroform, Toluol, Benzol und Dimethylsulfoxid, unlöslich in Wasser, n-Hexan und Petroleumäther und leicht löslich in Diäthyläther.

Farbe und Reaktion: Die Methanollösung von Rhodirubin A ist rot, aber schlägt im alkalischen Zustand auf rötlichpurpur um. Sie gibt eine negative Ninhydrin-Reaktion und reduziert nicht die Fehlingsche Lösung.

Absorptionsspektrum: UV und sichtbare Absorptionsmaxima werden gesehen bei 235 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 507$; 258 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 267$; 295 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 100$; 457 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 127$; 490 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 153$; 510 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 117$; 522 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 100$ (in Methanol bei einer Konzentration von 15 µg/ml).

Absorptionsspektrum: IR - Das IR-Spektrum in KBr zeigt Spitzen bei den folgenden Wellenlängen in cm⁻¹: 3430, 2950, 2930, 2810, 2750, 1735, 1640, 1600, 1450, 1320, 1300, 1220, 1160, 1120, 1040, 1000, 970, 960, 920, 800 und 760.

NMR: Das PMR-Spektrum von Rhodirubin A in CDCl₃ (100 MHz) zeigt die folgende chemischen Verschiebungen (ppm): 7,6, s; 7,24, s; 5,50, m; 5,62, m; 5,02, m; 4,84, m; 4,52, q; 4,7 ~ 3,90, Überlappung m; 3,72, s; 3,60 ~ 0,09, Überlappung m und 2,18.

Rhodirubin B: Rotes Pulver mit F 135–137 °C.

Elementaranalyse zeigt die folgenden Werte:

Gefunden %	Berechnet für C ₄₂ H ₅₅ NO ₁₅ %
C = 61,23	C = 61,99
H = 6,80	H = 6,77
O = 28,77	O = 29,52
N = 1,94	N = 1,72

Molekulargewicht = 813,9

Spezifische Drehung ist $[\alpha]_D^{20} + 190$ (C = 0,1, CHCl₃).

Löslichkeit: Rhodirubin B ist löslich in Methanol, n-Butanol, Aceton, Chloroform, Äthylacetat, Toluol, Benzol und Dimethylsulfoxid, unlöslich in Wasser, Petroleumäther und n-Hexan und leicht löslich in Diäthyläther.

Farbe und Reaktion: Die Methanollösung von Rhodirubin B ist rot aber schlägt gegen rötlichpurpur im alkalischen Zustand um. Sie gibt eine negative Ninhydrin-Reaktion und reduziert nicht Fehlingsche Lösung.

Absorptionsspektrum: UV und sichtbares Absorptionsmaxima wird gesehen bei 235 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 593$; 257 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 307$; 295 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 113$; 457 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 153$; 490 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 187$; 510 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 147$; 522 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 120$.

Absorptionsspektrum: IR - Das IR-Spektrum in KBr zeigt 10 Spitzen bei folgenden Wellenlänge in cm⁻¹: 3470, 2960, 2940, 2820, 2790, 1740, 1640, 1600, 1450, 1300, 1220, 1160, 1120, 1040, 1000, 980, 960, 920, 800, 790 und 760.

NMR: Das PMR-Spektrum von Rhodirubin B in CDCl₃ (100 MHz) zeigt die folgenden chemischen Verschiebungen (ppm): 7,6, s; 7,24, s; 5,50, m; 5,02, m; 4,84, m; 4,52, q; 4,7 ~ 3,90, Überlappung m; 3,72, s; 3,6 ~ 0,09, Überlappung m und 2,18, s.

Das Rhodirubin A und B weisen die folgenden R_F-Werte auf einen Silicagel-Dünnschicht-Chromatogramm unter Verwendung der angezeigten Lösungsmittelsysteme:

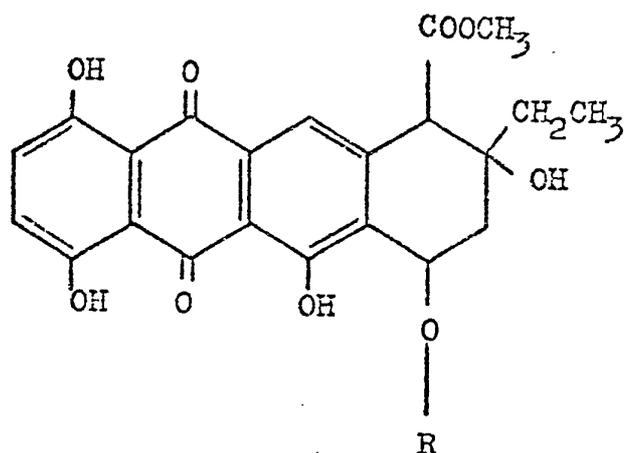
Lösungsmittelsystem	R _F -Werte	
	Rhodirubin A	Rhodirubin B
Äthyl:Acetat:Benzol:		
Methanol (5:5:1) (V/V)	0,37	0,42
Chloroform:Methanol (10:1) (V/V)	0,19	0,28
Chloroform:Methanol (20:1) (V/V)	0,17	0,20

Die Strukturen von Rhodirubin A und B wurden wie folgt bestimmt. Aglykone von Rhodirubin A und B wurden erhalten durch Säurehydrolyse mit verdünnter Chlorwasserstoffsäure von 0,1N bei 85 °C während 30 min. Physico-chemische Eigenschaften, z. B. IR, UV, NMR, Schmelzpunkt und R_F-Werte auf Dünnschichtchromatographie des erhaltenen Aglykons stimmen voll mit dem in der Literatur beschriebenen ε-Pyrromycin (Chem. Ber., 92, 1904 (1959)).

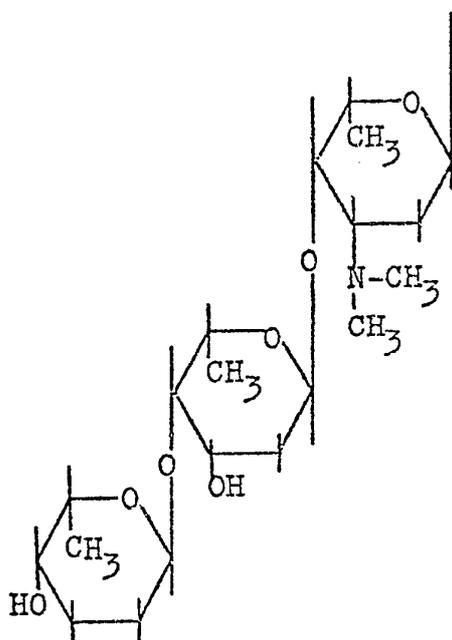
Nach Neutralisieren und Konzentrieren der wässrigen Schicht des Rhodirubins-A- und B-Hydrolysats wird der Zuckerteil mittels Dünnschichtchromatographie (Silicagel TLC, Merck F254; Lösungsmittel: Butanol:Essigsäure:Wasser = 4:1:1 Vol./Vol.) entwickelt und separiert. Drei Zuckerteile (R_F = 0,14:0,53:0,67) wurden aus dem Rhodirubin A und zwei Zuckerteile (R_F = 0,14:0,67) aus dem Rhodirubin B erhalten. Durch Vergleichen dieser aus Aclacinomycin (J. Antibiotics, 28, S.830–834 (1975)) erhaltenen Zuckersubstanzen und des Streptolydizins (J. Am. Chem. Soc., 86, S.3592–3594 (1964)), verschiedenen Farbreaktionen (Pharmazie, 27, H12, S.782–789 (1972)), der spezifischen Rotationen und von NMR, wurden die Zuckersubstanzen mit R_F von 0,14, 0,53 und 0,67 als Rhodosamin, 2-Deoxyfucose und Rhodiose identifiziert.

Die Methanolyse von Rhodirubin A und B liefert Pyrromycin (Rhodosaminyl-ε-pyrromycinon). Überdies wurde Rhodiose aus Rhodirubin A und B mittels milder Hydrolyse und zwar bei 0,5% HCl, 20 °C und 10 min, gemäss der in «Naturwiese», 50, S.43–44 (1963) offenbarten Methode, in Freiheit gesetzt.

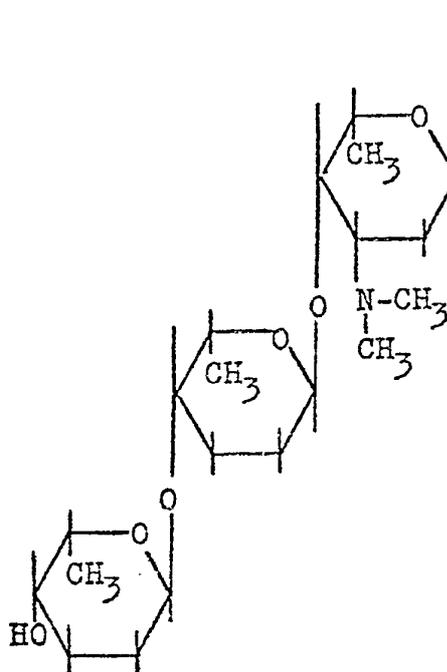
Aus den oben beschriebenen Ergebnissen wurden die Strukturen von Rhodirubin A und B bestimmt und sind die folgenden:



worin R Rhodirubin A R ist



Rhodirubin B R ist



Es ist bekannt, dass unter den in der Literatur beschriebenen Anthracyclin-Antibiotika Cinerubin, Aclacinomycin, Viola-

mycin und Rhodomycin aus Aglycon und drei Zuckerteilen zusammengesetzt sind. Ihre Konstituenten sind die folgenden:

Antibiotika	Aglycon	Stellung der Bindung von Zucker und Aglycon	Erste Zucker	Zweite Zucker	Dritte Zucker
Cinerubin A	ϵ -Pyrromycinon	7	Rhodosamine	2-Deoxyfucose	Cinerulose
Aclacinomycin A	Alkavinon	7	Rhodosamine	2-Deoxyfucose	Cinerulose
Violamycin	verschiedene Rhodomycinone	unbekannt	Rhodosamine	2-Deoxyfucose	Rhodonose
Rhodomycin X	-Rhodomycinon -Rhodomycinon 10-Deoxy-r-rhodomycinon	9- oder 10-	Rhodosamine	2-Deoxyfucose	Rhodonose

Es ist somit ersichtlich, dass die Rhodirubin-Antibiotika können leicht von den oben Anthracyclinen unterschieden werden.

Rhodirubin A und B weisen antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Mikroorganismen auf. Die minimale Hemmkonzentration von Rhodirubin A und B wurde bestimmt durch die Brühe-Verdünnungsmethode und ist in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Minimale Hemmkonzentration von (MHC) von Rhodirubin A und B

Test-Mikroorganismus	MHC ($\mu\text{g/ml}$)	
	Rhodirubin A	Rhodirubin B
Staph. aureus FDA 209P	1,56	1,56
Staph. aureus Smith	0,4	0,78
B. subtilis ATCC 6633	0,78	1,56
B. cereus ATCC 9634	0,2	0,4
B. megaterium NRRL-938	0,78	1,56
Sarcina lutea ATCC 9341	0,4	0,78
Micrococcus flavus	0,2	0,2
Coryne. bovis	0,2	0,4
Ps. fluorescens NIHJB-254	100	100
Proteus morgani	>100	>100
Mycobacterium smegmatis ATCC 607	6,25	3,1
Candida albicans IAM 4905	>100	>100
Candida tropicalis IAM 4942	>100	>100

Wie oben angeführt, besitzt Rhodirubin A und B eine antimikrobielle Wirksamkeit, insbesondere gegenüber gram-positive Bakterien; deshalb sind diese Substanzen bei der Behandlung von Menschen und Tieren bei hervorgerufen durch solche Mikroorganismen infektiösen Leiden therapeutisch nützlich.

Rhodirubin A und B zeigen bei experimentellen Tiertesten eine bemerkenswerte Antitumor-Wirksamkeit mit niedriger Toxizität und deshalb sind sie bei der Hemmung des Wachstums von weiblichen Brusttumoren therapeutisch nützlich. Rhodirubin A und B zeigen aber insbesondere eine bemerkenswerte hemmende Wirkung bei Maus-L1210-Leukämie. Eine CDF₁-Maus wurde beispielsweise intraperitoneal mit 1×10^6 L1210-Zellen pro Maus geimpft und es wurde dann 0,1–0,2 ml der Wirkstofflösung intraperitoneal während 10 aneinander folgenden Tagen verabreicht. Die Beobachtung erfolgte während 30 Tagen und die prozentuale Verlängerung der Überlebenszeit gegenüber der intraperitoneal verabreichten Kontrollmaus mit physiologischer Sole war die folgende:

Dosierung (mg/kg/Tag)	Verlängerung der Überlebenszeit T/C (%)	
	Rhodirubin A (HCl-Salz)	Rhodirubin B (HCl-Salz)
10	87	104
8,5	121	160
5	195	179
2,5	167	215
1,25	117	126
0,6	102	107

Akute Toxizität

Die LD₅₀-Werte nach intraperitonealer Injektion einer Maus von Rhodirubin A und B sind die folgenden:

	LD ₅₀ (mg/kg)
Rhodirubin A	7,5–10
Rhodirubin B	10–12,5

Wie oben angeführt, sind die beschriebenen Verbindungen Rhodirubin A und B neue Antibiotika, welche sowohl in der Human- als auch der Veterinär-Medizin nützlich sind und als Antitumor-Mittel weisen sie eine bemerkenswerte Hemmwirkung gegenüber weiblichen bösartigen Brusttumoren, einschliesslich sowohl des Bauchwassersucht- als auch des festen Typus.

Die beschriebenen Verbindungen bilden nicht-toxische Säureadditionssalze mit einer Vielfalt von organischen und anorganischen salzbildenden Reagenzien und bilden auch nicht-toxische Komplexe mit Deoxyribonukleinsäure. Solche Säureadditionssalze gebildet mit solchen pharmazeutisch annehmbaren Säuren, wie Schwefel-, Phosphor-, Chlorwasserstoff-, Essig-, Propion-, Olein-, Palmitin-, Zitronen-, Bernstein-, Weinstein-, Glutamin-, Pantothen-Säuren und so weiter und nicht-toxische Komplexe mit Deoxyribonukleinsäure können auf dieselbe Weise wie oben genannten Rhodirubin-Verbindungen als solche, verwendet werden. Die Salze können gebildet, isoliert, gereinigt und mittels Methoden, die im allgemeinen bei der Salzbildung für Antibiotika verwendet werden, formuliert werden. Im Falle der DNA-Komplexe kann DNA aus Tieren und Mikroorganismen, wie aus der Kalbthymusdrüse, aus Hela-Zellen, aus menschlichen und tierischen Embryo-Zellen, aus Hefe usw., extrahiert und verwendet werden. Die Rhodirubin-DNA-Komplexe können mittels der in der Literatur zur Herstellung von DNA-Komplexen von anderen Anthracyclin-Antibiotika, wie Adriamycin, Daunorubicin usw. beschriebenen Methoden präpariert werden, siehe beispielsweise Nature, New Biol., 239, S.110 (1973) und Europ. J. Cancer, 10, S.399 (1974). Zum Zwecke der Verwendung sind die Rhodirubin-Verbindungen in Form von freien Basen äquivalent zu ihren pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalzen und DNA-Komplexen.

Die beschriebenen Verbindungen eignen sich insbesondere zur therapeutischen Behandlung einer weiblichen Brust, die durch eine gram-positive bakterielle Infektion oder durch einen bösartigen Tumor, z. B. eines festen oder ascitischen Typustumor, wie L1210-Leukämie, befallen ist, und welche Behandlung darin besteht, dass man an eine leidende Stelle eine wirksame antibakterielle oder Tumor-Hemmdosis von Rhodirubin A oder B oder ein Gemisch derselben oder ein nicht-toxisches Säureadditionssalz oder einen DNA-Komplex derselben verabreicht.

Pharmazeutische Zusammensetzungen enthalten z. B. wirksame antibakterielle oder tumorhemmende Menge von Rhodirubin A oder B oder eines Gemisches derselben, oder eines nicht-toxischen Säureadditionssalzes oder eines DNA-Komplexes genannter Verbindung, in Kombination mit einem inerten pharmazeutischen annehmbaren Träger oder Verdünnungsmittel. Diese Zusammensetzungen können in jeglicher pharmazeutischer Form, die sich für eine parenterale Verabreichung eignet, zubereitet werden.

Präparate für parenterale Verabreichung umfassen beispielsweise sterile, wässrige oder nicht-wässrige Lösungen, Suspensionen oder Emulsionen. Sie können gleichfalls in Form von sterilen festen Zusammensetzungen zubereitet werden, welche in sterilem Wasser, einer physiologischen Sole oder einigen anderen sterilen injizierbaren Medien, unmittelbar vor Verwendung, gelöst werden können. Es soll bemerkt werden, dass die tatsächlich bevorzugten Mengen des verwendeten Rhodirubin-Antibiotikums variieren werden entsprechend der besonderen verwendeten Verbindung, der besonderen formulierten Zusammensetzungen, der Art der Anwendung und der besonderen Stelle, und des zu behandelnden Leidens. Im allgemeinen werden die Rhodirubin-Antibiotika intraperitoneal, intravenös, subkutan oder lokal Tieren und intravenös oder lokal menschlichen Wesen, injiziert. Es können zahlreiche Faktoren, die die Wirkung des Wirkstoffes modifizieren können, durch den Spezialisten in Betracht gezogen werden, beispiels-

weise das Alter, das Körpergewicht, der Sex, die Diät, die Verabreichungszeit, der Verabreichungsweg, die Menge der Ausscheidung, spezifische Bedingungen des Patienten, Wirkstoffkombinationen, Empfindlichkeit auf Reaktionen und Stärke des Leidens. Die Verabreichung kann kontinuierlich oder periodisch innerhalb der maximalen tolerierten Dosismenge erfolgen. Optimale Anwendungsverhältnisse für einen gegebenen Fall von Bedingungen können durch den Fachmann gesichert werden, unter Verwendung üblicher Dosierungsbestimmungsteste im Hinblick auf oben angeführte Richtlinien.

Für die Verwendung eines antibakteriellen Mittels werden die Rhodirubin-Zusammensetzungen im allgemeinen so verabreicht werden, dass die Konzentration eines aktiven Bestandteils grösser ist, als die minimale Hemmkonzentration für den besonderen zu behandelnden Organismus.

Die Erfindung wird im weiteren durch einige Beispiele näher dargelegt.

Beispiel 1

Es wurde ein Nährmedium der folgenden Zusammensetzung präpariert:

Kartoffelstärke	1 % (Gew./Vol.%)
Glukose	1 %
«Prorich» (Sojabohnenpulver)	1,5 %
K ₂ HPO ₄	0,1 %
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 %
NaCl	0,3 %
Mineral*	0,125 % (pH-Wert 7,4)

*Das Mineral ist wie folgt zusammengesetzt:

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 in einem 500-ml-Kolben sterilisiert, mit einer Schleife aus einer Agarschräggkultur von *Streptomyces galilaeus* (ATCC 31133) geimpft und bei 28 °C während 48 h auf einer Rotationsschüttelvorrichtung mit 230 upm inkubiert, wobei die Sammelkultur erhalten wird.

Es wurde ferner das folgende Medium präpariert:

Kartoffelstärke	2 % (Gew./Vol.%)
Glukose	2 %
«Nisshin toast» (entfettete Sojabohnen)	2 %
Hefe-Extrakt	0,5 %
NaCl	0,25 %
CaCO ₃	0,3 %
Mineral*	0,125 % (pH-Wert 7,4)

*Das Mineral ist wie folgt zusammengesetzt:

CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,25 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,25 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,25 g

in 500 ml Wasser

2 ml genannter Samenkultur wurden dann in 100 ml des genannten oben beschriebenen sterilisierten Mediums in einem 500-ml-Kolben geimpft. Die Fermentation erfolgte bei 28 °C auf einer Rotationsschüttelvorrichtung mit 230 min und die Erzeugung von Rhodirubin erreichte ein Maximum nach 4 Tagen. Die Brühe wurde dann filtriert, um den Mycelkuchen und das Filtrat abzutrennen. Es wurde zum Filtrat ein halbes Volumen Chloroform zugefügt und die Extraktion erfolgte zweimal.

Es wurde dann Aceton zum Mycelkuchen zugegeben, und zwar 2 l Aceton per kg feuchten Kuchens, und die Extraktion erfolgte zweimal, wonach das Aceton durch Abdampfen unter vermindertem Druck entfernt wurde. Ein halbes Volumen Chloroform wurde dann zum Rückstand zugefügt und die Extraktion wurde zweimal durchgeführt. Die erhaltenen Chloroformextrakte wurden dann mit den Chloroformextrakten aus dem Filtrat vereinigt und unter vermindertem Druck konzentriert, wobei eine teerähnliche Substanz erhalten wurde.

Genannte Substanz wurde dann in einer kleinen Menge Äthylacetat gelöst und es bildete sich ein Niederschlag durch tropfenweise Zugabe dieser Lösung in 10 Volumen von n-Hexan; man erhielt 4,5 g an rotem rohem Pulver. Dieses rohe Pulver wurde in 30 ml eines Gemisches von Toluol und Methanol 50:1 Vol./Vol. gelöst, durch eine Säule von dreimal 50 cm durchflossenen gelassen, welche Säule mit 100 g Silicagel gefüllt war und mit demselben Gemisch äquilibriert wurde, und es wurden Rhodirubin B und dann Rhodirubin A eluiert. Jedes Eluat wurde unter vermindertem Druck getrocknet und man erhielt 27 mg an rohem Rhodirubin A 60 mg an rohem Rhodirubin B.

Beispiel 2

27 mg von gemäss Verfahren von Beispiel 1 erhaltenem rohem Rhodirubin A wurden auf einer Dünnschichtplatte (Merck F₂₅₄, Lösungsmittel: Chloroform:Methanol 10:1 Vol./Vol.) nach Auflösen in 2 ml Methanol chromatographiert, um Verunreinigungen einschliesslich Rhodirubin B zu entfernen, und die aktive Fraktion wurde dann auf einer «Sephadex»-LH-20-Säule von 1×70 cm chromatographiert. Das so erhaltene Eluat wurde eingengt und mit n-Hexan ausgefällt, wobei 16,5 mg an gereinigtem Rhodirubin A als rotes Pulver erhalten wurden. 10 mg dieses roten Pulvers wurden dann in einem Gemisch von 200 µl trockenem Aceton und 70 µl trockenem Methanol gelöst und dann wurden 10 µl 3N HCl-Methanol-Lösung zugefügt. Nach Rühren während 1 h bildete sich nach Zugabe von 10 Volumen Diäthyläther ein Niederschlag. Dieser Niederschlag wurde durch Filtrieren gesammelt und getrocknet, und man erhielt 7,2 mg Rhodirubin A HCl-Salz.

Beispiel 3

80 mg an gemäss Verfahren von Beispiel 1 erhaltenem rohem Rhodirubin wurden gemäss der in Beispiel 2 beschriebenen Methode gereinigt und man erhielt 63,4 mg an Rhodirubin B als rotes Pulver.

Gemäss der in Beispielen 1, 2 und 3 beschriebenen allgemeinen Methoden wurden die folgenden Mikroorganismen gezüchtet, wobei die in folgender Tabelle angeführten Erträge an Rhodirubin A und B erhalten wurden.

50

Mikroorganismus	Ertrag an Rhodirubin (mg)	
	A	B
<i>Streptomyces galilaeus</i> ATCC 14949	23	14
<i>Streptomyces cineroruber</i> ATCC 19740	16	5
<i>Streptomyces purpurascens</i> ATCC 25489	11	7
<i>Streptomyces antibioticus</i> ATCC 8663	8	10
<i>Streptomyces</i> sp. ME 505-HEI ATCC 3127321		48

60