



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU** 79141
UTLÄGNINGSSKRIFT

C (45) Patentti myönnetty
Patent määrittämis 10 11 1980

(51) Kvk*Int Cl⁸ C 12 P 19/60, C 07 H 15/24

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patenttihakemus - Patentansöknin	843823
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	28.09.84
(24) Alkupaivä - Giltighetsdag	28.09.84
(41) Tulit julkiseksi - Blivit offentlig	04.04.85
(44) Nähtäväksipanon ja kuuliulkaisun pvm - Ansökan utlagd och utskriften publicerad	31.07.89
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus - Begärd prioritet	03.10.83
USA(US) 538453 Toteennäytetty-Styrkt	

(71) Bristol-Myers Company, 345 Park Avenue, New York, N.Y., USA(US)

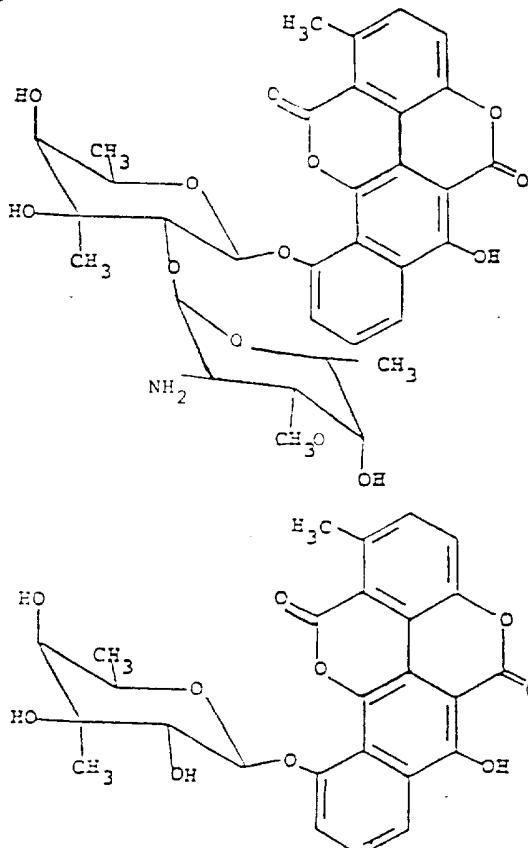
(72) Masataka Konishi, Kawasaki, Takeo Miyaki, Yokohama, Hiroshi Kawaguchi, Tokyo, Japani-Japan(JP) Koko Sugawara, Bozeman, Mont., USA(US)

(74) Oy Kolster Ab

(54) Menetelmä antibioottien BBM-2478A ja BBM-2478B valmistamiseksi -
Förfarande för framställning av antibiotika BBM-2478A och BBM-2478B

(57) Tiivistelmä

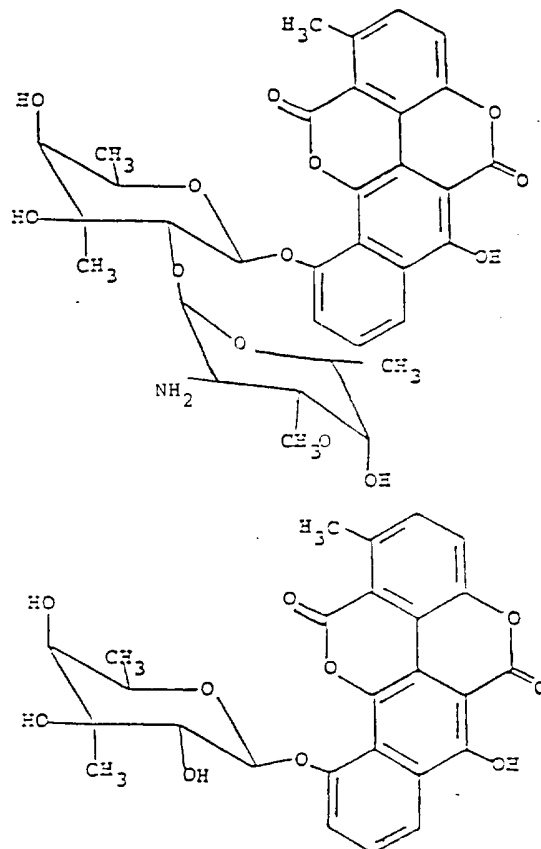
Uutta antibioottikompleksia, jota nimitetään BBM-2478:ksi, tuotetaan fermentoimalla aktinomykeettikantaa J907-21 (ATCC 39417). Kompleksi voidaan jakaa kromatografisesti kahdeksi bioaktiiviseksi komponentiksi, BBM-2478A ja BBM-2478B, joiden kaavat ovat



BBM-2478A-komponentti on sekä antibakteerisesti että kasvaintenvastaisesti aktiivinen ja BBM-2478B on antibakteerisesti aktiivinen.

(57) Sammandrag

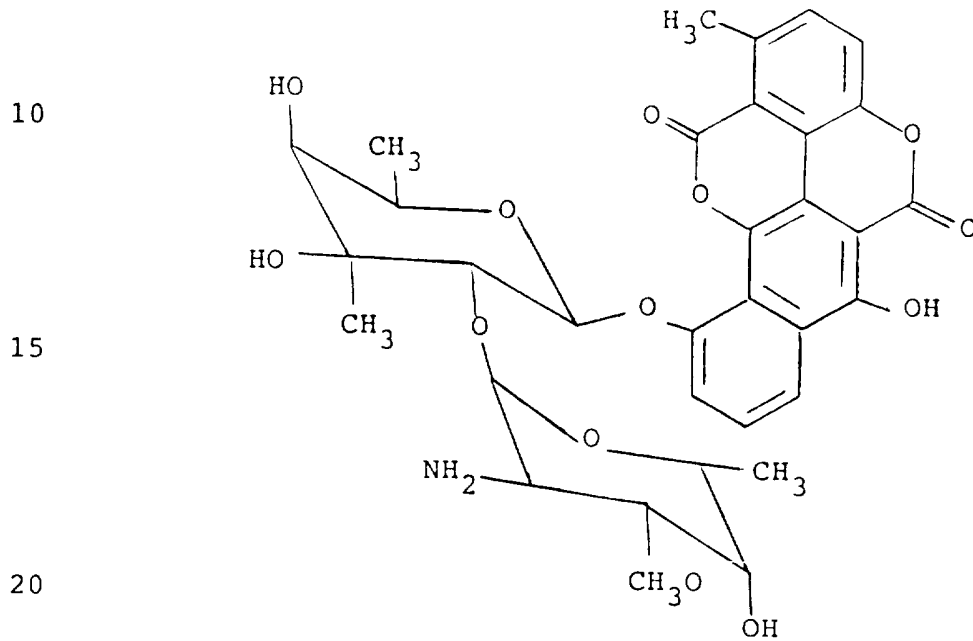
Ett nytt antibiotikumkomplex, med benämningen BBM-2478, produceras genom fermentation av aktinomyces-stammen J907-21 (ATCC 39417). Komplexet kan kromatografiskt separeras i två bioaktiva komponenter BBM-2478A och BBM-2478B, med formlerna



Komponenten ~~BBM-2478~~ **BBM-2478A** har både antibakteriell aktivitet och anti-tumöraktivitet och komponenten ~~BBM-2478~~ **BBM-2478B** har antibakteriell aktivitet.

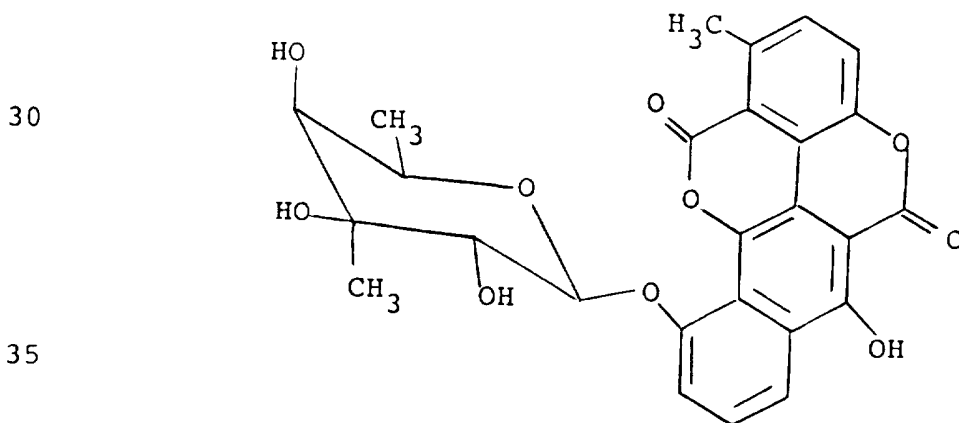
Menetelmä antibioottien BBM-2478A ja BBM-2478B valmistamiseksi

Keksinnön kohteena on menetelmä antibiootin
5 BBM-2478A, jonka kaava on



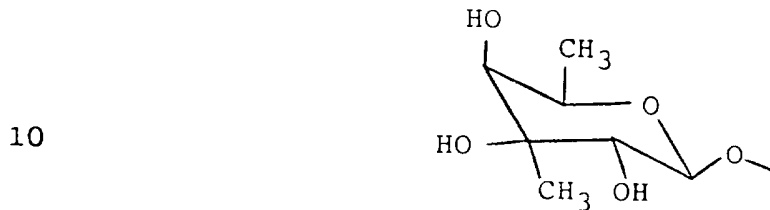
ja antibiootin BBM-2478B, jonka kaava on

25

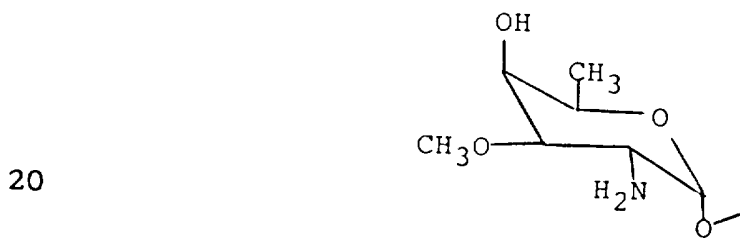


valmistamiseksi.

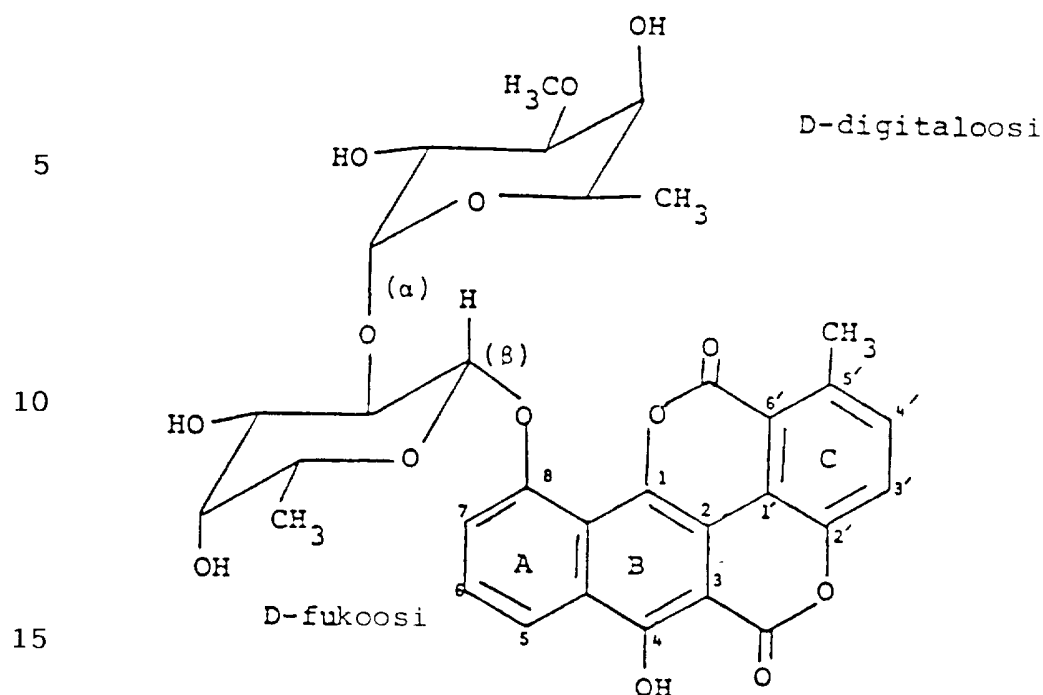
Keksinnön mukaiset kaksi antibioottiyhdistettä ovat glykosidejä, jotka koostuvat aglykonista, chartariinista, joka on chartreusiinin aglykoni, ja yhdestä tai kahdesta sokeriosasta. BBM-2478B sisältää yhden sokeriosan, jonka kaava on



liittyneenä aglykoniin, ja toinen keksinnön mukainen antibiootti BBM-2478A sisältää lisäksi aminosokerin, jonka kaava on



Chartresiini-antibiootissa, joka on esitetty esimerkiksi julkaisuissa J. Am. Chem. Soc. 75: 4011-4012 (1953) ja Helv. Chim. Acta 47: 1459-1484 (1964), on sama aglykoniosa kuin esillä olevissa antibiooteissa, mutta se sisältää kaksi erilaista sokeria, nimittäin D-fukoosin ja D-digitaloosin. Chartresiinin rakenne on seuraava



ja sitä valmistetaan fermentoimalla mikro-organismeja
 20 *Streptomyces chartreusis*, *Streptomyces* Sp. no. 747 (*S. vi-*
ridis), *Streptomyces* Sp. 6A36 (*S. viridochromogenes*) ja
 kahta aktinomykeetteihin kuuluvaa kantaa, joita merkitään
Streptomyces Sp. X-3988 ja S-465. Chartresiini on ilmei-
 sesti sama kuin antibiootti 747 ja antibiootti X-465A.

25 Keksinnön mukaisesti uutta antibioottikompleksia
 BBM-2478 tuotetaan viljelemällä aktinomykeettikantaa
 J907-21 (ATCC 39417) vesipitoisessa ravintoalustassa, joka
 sisältää assimiloituvia hiilen ja typen lähteitä, pinnan-
 alaisviljelmänä aerobisissa olosuhteissa, kunnes organismi
 30 on tuottanut viljelyalustaan olennaisen määrän BBM-2478-
 kompleksia, ja ottamalla talteen BBM-2478-kompleksi vil-
 jelyalustasta. BBM-2478 kompleksi sisältää kaksi bioaktii-
 vistä antibioottikomponenttia, BBM-2478A ja BBM-2478B,
 jotka erotetaan toisistaan uuttamalla ja puhdistetaan ta-
 35 vanomaisin kromatografisin menetelmin.

BBM-2478A ja B ovat antibakteerisesti aktiivisia aerobisia gram-positiivisia bakteereja ja anaerobisia bakteereja vastaan. BBM-2478A estää myös eläimillä kokeellisesti aikaansaatuisten pahanlaatuisten kasvainten kasvua.

5 Kuvio 1 esittää BBM-2478A:n infrapuna-absorptiospektrin.

Kuvio 2 esittää BBM-2478B:n infrapuna-absorptiospektrin.

10 Kuvio 3 esittää BBM-2478A:n protoni-magneettisen resonanssispektrin (80 MHz) CD_3OD :ssä.

Kuvio 4 esittää BBM-2478A:n ^{13}C -ydinmagneettisen resonanssispektrin (20 MHz) d_6 -DMSO:ssa.

15 Antibioottia tuottava aktinomykeettikanta J907-21 eristettiin maanäytteestä El Salvadorissa, ja se on nykyisin luokiteltu ainoastaan ei-Streptomyces-aktinomykeetikannaksi. Tämän organismin biologisesti puhdas viljelämä on valmistettu tavanomaisilla menetelmillä ja tallennettu laitokseen the American Type Culture Collection, Washington, D.C. tunnuksella ATCC 39417.

20 Kanta J907-21 muodostaa hyvin haarautuneita, ei-fragmentoituvia vegetatiivisia rihmastoja, mutta siltä puuttuu kyky muodostaa todellisia ilmarihmastoja. Nykyisen tutkimuksen mukaan se ei muodosta itiöitä. Koska kanta J907-21 sisältää soluseinämässä meso-diaminopimeliinihap-
25 poa ja koko solun hydrolysaatissa maduroosia, se sijoitetaan soluseinämätyyppiin III_b. Kanta J907-21 ei muodosta mitään morfologisesti tärkeitä osia, kuten itiöketjuja ja itiöpesäkkeitä. Näin ollen tällä hetkellä kanta J907-21 voidaan luokitella ainoastaan aktinomykeettikannaksi, joka
30 ei ole Streptomyces.

Kanta J907-21 muodostaa pitkiä hyvin haarautuvia vegetatiivisia rihmastoja (paksuus 0,4 μm), jotka eivät fragmentoidu sauva- tai kokkoidisoluksi. Joillakin agar-
35 alustoilla muodostuu toisinaan surkastuneita lyhyitä ilmarihmastoja, mutta todellista ilmarihmastoa ei muodostu millään kuvatuista kasvualustoista.

Kuten taulukosta 1 nähdään, kanta kasvaa kohtalaisesti luonnollisilla orgaanisilla alustoilla, mutta heikosti useimmilla kemiallisesti määritellyillä alustoilla. Vaikka kanta J907-21 ei muodosta todellista ilmarihmastoa, 5 niin surkastuneita lyhyitä ilmarihmastoja muodostuu osittain alustoilla ISP no 2 ja no 4 ja Bennett'in agarilla. Surkastunutta ilmarihmastoa muodostuu myös alustalla ISP no 7, johon on lisätty kobalamiinia tai vitamiinikompleksia. Vegetatiivisen rihmaston kääntöpuoli on useimmilla 10 agaralustoilla vaaleankeltaisesta erilaisiin ruskean sävyihin. Alustoilla ISP no 2 ja VDYA (V8-mehu-dekstroosihiivauute-agar) muodostuu syvän punertavaa rihmastopigmenttiä. Alustoilla ISP no 1, no 6 ja no 7 ei muodostu melanoidipigmenttiä. Alustoilla ISP no 2 pesäkkeet ovat 15 erittäin kohollaan, jäykkiä ja poimuuntuneita.

Maksimikasvu havaitaan 28°C:ssa ja 37°C:ssa. 7°C:ssa ja 45°C:ssa ei havaita kasvua. Kasvuarvo on 15-43°C. L-3,4-dihydroksifenyylialaniinista (L-dopa) ei muodostu melaniinia. Kanta J907-21 kestää natriumkloridipitoisuutta 4 % ja sen alle, mutta ei 5 %, ja on herkkä ly- 20 sotsyymille. Kanta J907-21 pystyy käyttämään hyväkseen lähes kaikkia pentooseja ja heksooseja. Fysiologiset tunnusmerkit on esitetty taulukossa 2 ja hiilihydraattien hyväksikäyttö taulukossa 3.

25 Soluseinämän aminohappokoostumus tutkittiin menetelmällä, jonka ovat kuvanneet Becker et al., Appl. Microbiol. 13: 236-243 (1965), ja Yamaguchi, J. Bacteriol. 89: 444-453 (1965), sekä myös aminohappoanalysointorilla (Hitachi 0342U malli). Koko solun hydrolysaatin sokerikomponentit identifioitiin menetelmällä, jonka ovat esittäneet 30 Lechevalier ja Lechevalier, Chemical Methods as Criteria for Separation of Nocardiae from Other Actinomycetes. Biology of Actinomycetes and Related Organisms 11: 78-92 (1976). Kannan J907-21 soluseinäjä sisältää mesodiaminopimeliinihappoa ja vähäisen määrän glysiiniä. Koko solun 35 hydrolysaatissa on todettu glukoosia, mannoosia, maduroo-

sia ja riboosia. Yllä mainittu soluseinämän koostumus ja koko solun sokerikomponentit osoittavat kannan J907-21 kuuluvan soluseinämätyyppiin III_b.

Kanta J907-21, joka on mesofiilinen, gram-positiivinen aktinomykeetti, muodostaa toisinaan surkastuneita lyhyitä ilmarihmastoja, jolloin siltä kuitenkin puuttuu kyky muodostaa todellista ilmarihmastoa, itiöpesäkkeitä ja itiöitä. Kannan J907-21 soluseinämä on tyyppiä III_b. Tunnettuja aktinomykeettejä, joiden soluseinämä on tyyppiä III_b, ovat sukuihin Actinomadura, Microbispora, Streptosporangium, Spirillospora, Planomonospora, Planobispora ja Dermatophilus kuuluvat lajit. Luonteeltaan aina eläinpatogeenisen suvun Dermatophilus vegetatiivisessa rihmastossa on sekä poikittaisia että pitkittäisiä väliseiniä. Kanta J907-21 eroaa siten selvästi suvusta Dermatophilus. Jäljellä oleville kuudelle suvulle on tyypillistä, että niiden ilmarihmastossa on itiörakkula (sporangium) tai artrospori. Streptomyces-lajeista poiketen useiden näiden 6 suvun kantojen ilmoitetaan olevan enemmän tai vähemmän niukasti itiöitä muodostavia. Siten kanta J907-21 kuuluu todennäköisesti johonkin näistä edellä mainituista kuudesta suvusta. Näistä 6 suvusta suvun Actinomadura on ilmoitettu olevan maailmassa laajalle levinnyt mullassa esiintyvä suku. Gordon, J. Gen. Microbiol. 109: 69-78 (1978) luetteli Nocardiaen 14 fysiologista taksonomista tunnusmerkkiä, jotka johtivat lajiin Actinomadura madurae. Perustuen Gordon'in fysiologisiin tutkimuksiin kantaa J907-21 verrattiin lajiin A. madurae (taulukko 4). Kanta J907-21 muistutti lähemmin lajia Actinomadura madurae (samankaltaisuus 85,7 %) kuin muita soluseinämätyypin III_c ja IV omaavia lajeja (samankaltaisuus 54,8 - 76,9 %). Fysiologista sukulaisuutta kuuteen soluseinämätyypin III_b omaavaan sukuun ei ole kuitenkaan todettu, koska nämä eroavat täysin morfologisesti kannasta J907-21. Kanta J907-21 voidaan siten luokitella ainoastaan itiöitä muodostamattomaksi ei-Streptomyces-kannaksi.

Taulukko 1Kannan no J907-21 viljelyominaisuudet*

5	Tryptoni-hiivauuteliemi (ISP no 1)	G** : heikko; hyötäleisiä, vaaleankeltaisia pellettejä D : ei ole
10	Sakkaroosi-nitraattiagar (Czapek'in agar)	G : heikko R : kellertävän valkeasta (92)*** vaalean oliivinruskeaan (94) A : ei ole D : ei ole
15	Glukoosi-asparagiiniagar	G : heikko R : kellertävän valkeasta (92) kohtalaisen oliivinruskeaan (95) A : ei ole D : ei ole
20	Glyseroli-asparagiiniagar (ISP no 5)	G : heikko R : vaaleanharmahtavan kellertävän ruskeasta (79) tumman harmahtavan keller- tävänruskeaan (81) A : ei ole
25		D : kohtalaisen kellertävän ruskea (77)
30	Epäorgaaniset suolat - tärkkelysagar (ISP no 4)	G : heikko R : harmahtavan kellertävän ruskea (80) A : hyvin vähän tai ei lainkaan; jos muodostuu, se on surkastunutta, kellertävän valkoista (92)
35		D : tumman harmahtavan kellertävän ruskea (81)

	Tyrosiiniagar (ISP no 7)	G : kohtalainen R : harmahtavan keltaisesta (90) syvän kellertävän ruskeaan (75)
5		A : ei ole D : ei ole
	Ravintoagar	G : heikko R : syvän keltaisesta (85) tumman oliivin ruskeaan (96)
10		A : ei ole D : ei ole
	Hiivauute-mallasuute- agar (ISP no 2)	G : kohtalainen R : tumman harmahtavan keltaisesta (91) tumman oliivinruskeaan (96)
15		A : hyvin vähän tai ei lainkaan; jos muodostuu, se on surkastunutta, vaalean harmahtavan kellertävän ruskeata (79)
20		D : tummankellertävän ruskea (78)
	Kaurajauhoagar (ISP no 3)	G : kohtalainen R : kellertävän valkoisesta (92) harmahtavan keltaiseen (90)
25		A : ei ole D : ei ole
	Bennett'in agar	G : kohtalainen R : tumman harmahtavan keltaisesta (91) tumman oliivinruskeaan (96)
30		A : hyvin vähän tai lainkaan; jos muodostuu se on surkastunutta, kellertävän valkoista (92)
35		D : syvän keltainen (85)

	Peptoni-hiivauute- rauta-agar (ISP no 6)	G : kohtalainen R : vaalean oliivinuskeasta (94) syvän kellertävän ruskeaan (75)
5		A : ei ole D : loistavan oranssinkeltainen (67)
	VDYA-agar (Papavizas, 1964)	G : runsas R : kirkkaan syvänpunaisesta (14) mustanpunaiseen (21)
10		A : ei ole D : tummanpunainen (16)
	Maissijauhoagar (Riker & Riker, 1936)	G : runsas R : syvän kellertävän ruskeasta (75) tumman kellertävän ruskeaan (78)
15		A : ei ole D : vahvan ruskea (55)
	C-2-agar (Nonomura, 1971)	G : heikko R : vaalean kellertävän ruskeasta (76) syvän kellertävän ruskeaan (75)
20		A : hyvin vähän tai ei lainkaan; jos muodostuu, se on surkastunutta, valkoista (263)
25		D : ei ole
	Peruna-porkkana-agar (Cross et. al., 1963)	G : heikosta kohtalaiseen R : harmahtavan keltaisesta (90) tumman kellertävän ruskeaan (78)
30		A : ei ole D : tumman kellertävän vaaleanpunainen (30)

Pesäkealustalla ISP no 2: hyvä kasvu, erittäin kohonnut,
kova poimuuntunut läpimitta 3-5
mm, punertavan musta (24) pinnan
väri, ilmarihmastoa ei muodostu
tai se on surkastunutta

* havaittu 3 viikon inkuboinnin jälkeen 28°C:ssa

** lyhenteet: G = kasvu; R = kääntöpuolen väri;

A = ilmarihmasto; D = diffundoituva
pigmentti

*** väri ja suluissa oleva numero noudattavat väristandar-
dia "Kelly, K.L. & D.B. Judd: ISCC-NBS color-name charts
illustrated with Centroid Colors. U.S. Dept. of Comm. Cir.
553, Washington, D.C., Nov., 1975".

Taulukko 2

15 Kannan no J907-21 fysiologiset ominaisuudet

<u>Koe</u>	<u>Tulos</u>	<u>Menetelmä tai alusta</u>
Kasvun läm- pötila-alue	Maksimikasvu 28-37°C. Kasvualue 15-43°C. 7°C:ssa ja 45°C:ssa ei kasvua.	Bennett'in agar
Gelatiinin nesteytys	nesteytyy	1 % mallasuutetta, 0,4 % hiivauutetta, 0,4 % glukoosia 20 % gelatiinia
25 Tärkkelyk- sen hydro- lyysi	hydrolysoituu	Tärkkelysagarlevy
Reaktio rasvatto- massa mai- dossa	ei koaguloidu ja peptonisoituu täydellisesti	Difco rasvaton maito
30 Melanoidi- pigmentin muodostus	negatiivinen	Tyrosiiniagar, peptoni- hiivauute-rauta-agar ja tryptoni-hiivauuteliemi

	Tyrosinaa-	negatiivinen	Arai'n menetelmä*
	sireaktio		
	Nitraatin	negatiivinen	0,5 % hiivauutetta, 1 %
	pelkistys		glukoosia, 0,5 % KNO ₃ ,
5			0,1 % CaCO ₃
	pH-tole-	kasvaa pH-alueella	Hiivauute-mallasuuteagar
	ranssi	5,0-11,0. Ei kasva	
		pH 4,5:ssä.	
	NaCl-to-	kasvaa NaCl-pitoi-	Perusalusta: 1 % hiiva-
10	leranssi	suudessa 4 % tai	uutetta, 2 % liukoista
		alle. Ei kasva NaCl-	tärkkelystä, 1,5 % agaria
		pitoisuudessa 5 %.	
	Lysot-	herkkä. Ei kasva	Tryptikaasi-soijaliemi+
	syymi-	lysotsyymipitoisuu-	1,5 % agar.
15	tolerans-	suudessa 0,001 %.	
	si		

* Arai, T. and Y. Mikami: Chromogenicity of Streptomyces. Appl. Microbiol. 23: 402-406, 1972.

Taulukko 3

Kannan no J907-21 hiilihydraattien hyväksikäyttö

	glyseroli	+
	d(-)-arabinoosi	+
5	l(+)-arabinoosi	+
	d-ksyloosi	+
	d-riboosi	+
	l-ramroosi	+
	d-glukoosi	+
10	d-galaktoosi	+
	d-fruktoosi	+
	d-mannoosi	+
	l(-)-sorboosi	-
	sakkaroosi	-
15	laktoosi	-
	sellobioosi	+
	melibioosi	-
	trehaloosi	+
	raffinoosi	-
20	d(+)-meletsitoosi	-
	liukoinen tärkkelys	+
	selluloosa	-
	dulsitoli	-
	inositoli	+
25	d-mannitoli	+
	d-sorbitoli	-
	salisiini	+

Havainnot tehty 3 viikon inkuboinnin jälkeen 37°C:ssa.

Peruskasvatusalusta: Pridham-Gottlieb+epäorgaaninen kasvatusalusta

30

lyhenteet: +: positiivinen hyväksikäyttö

-: negatiivinen hyväksikäyttö

Taulukko 4

Kannan J907-21 ja Actinomadura madurae-organismin diagnostis-
fysiologisten ominaisuuksien vertailu

	<u>Pilkkomistuotteet:</u>	Kanta J907-21	Actinomadura* madurae (47)**
5			
	Adeniini	+	-
	Kaseiini	+	+
	Hypoksantiini	+	+
	Tyrosiini	+	+
10	Urea	-	-
	Ksantiini	-	-
	<u>Kestää:</u>		
	Lysotsyymia	-	-
	Rifampiinia	+	V
15	<u>Hydrolyysituotteet:</u>		
	Eskuliini	+	+
	Hippuraatti	+	-
	Tärkkelys	+	+
	<u>Hapon muodostus:</u>		
20	Arabinoosi	+	+
	Sellobioosi	+	+
	Glukoosi	+	+
	Glyseroli	+	+
	Inositoli	+	V
25	Laktoosi	-	V
	Mannitoli	+	+
	Mannoosi	+	+
	Meletsitoosi	-	-
	Melibioosi	-	-
30	Raffinoosi	-	-
	Ramnoosi	+	+
	Sorbitoli	-	-
	Trehaloosi	+	+
	Ksyloosi	+	+

		Actinomadura*
<u>Hyväksikäyttö:</u>	<u>Kanta J907-21</u>	<u>madurae (47)**</u>
	Bentsoaatti	-
	Sitraatti	V
5	Mukaatti	-
	Sukkinaatti	V
	Tartraatti	-
	Nitriittiä nitraatista	+
10	Kestää 8h 50°C:ssa	+

+: positiivinen, -:negatiivinen, V: 15-84 % kannoista positiivisia

* Gordonin et al. tiedot

15 ** Tutkittujen kantojen lukumäärä

Keksinnön mukaisia BBM-2478 antibiootteja tuotetaan viljelemällä kantaa J907-21 (ATCC 39417) pinnanalaisissa aerobisissa olosuhteissa vesipitoisessa ravintoalustassa. Organismia kasvatetaan ravintoalustassa, joka sisältää assimiloituvaa hiilen lähdettä, esimerkiksi assimiloituvaa hiilihydraattia. Esimerkkejä sopivista hiilen lähteistä ovat glyseroli, arabinoosi, ksyloosi, glukoosi, fruktoosi, mannoosi, liukoinen tärkkelys, mannitoli ja sellobioosi. Ravintoalustan tulisi sisältää myös assimiloituvaa tyypen lähdettä, kuten kalajauhoa, soijapapujauhoa, maissin liotuslientä, peptoneja, lihautetta, maa-pähkinäjauhoa, hii-
 25 vauutetta tai ammoniumsuoloja. Tarvittaessa on lisättävä epäorgaanisia suoloja, kuten natriumkloridia, kaliumkloridia, magnesiumsulfaattia, kalsiumkarbonaattia, fosfaatteja
 30 ym. Alustaan lisätään haluttaessa hivenaineita, kuten kuparia, mangaania, rautaa, sinkkiä ym., tai niitä joutuu ravintoväliaineeseen muiden aineosien epäpuhtauksina. Inkubointilämpötila voi olla mikä tahansa lämpötila, jossa

tuottava kanta pystyy kasvamaan, esim. 15-43°C, mutta edullisesti fermentointi suoritetaan 25-35°C:ssa, erityisesti 27-32°C:ssa. Alustan pH on edullisesti neutraali tai lähes neutraali ja antibioottia tuotetaan yleensä noin 5 6-10 vuorokauden ajan. Tavallisesti optimituotto saadaan noin 6-7 vuorokaudessa. Suhteellisesti pienten määrien valmistukseen voidaan käyttää ravistuspulloja ja pintaviljelmiä, mutta suurempien määrien valmistuksessa on edullisempaa käyttää pinnanalaista aerobista viljelmää steriilissä tankissa. Tankkifermentoinnin suorittamista varten 10 tuotetaan edullisesti vegetatiivinen ympäri ravintoliemessä ympäriämällä liemiviljelmä organismin itiöllä, ja kun on saatu tuore vegetatiivinen ympäri, siirtämällä ympäri aseptisesti fermentointitankin alustaan. Tankkien ja pullojen 15 ilmastointi voidaan suorittaa puhaltamalla steriiliä ilmaa fermentointialustan lävitse tai pinnalle. Lisäsekoitukseen voidaan käyttää mekaanista sekoitinta. Tarvittaessa voidaan myös lisätä vaahdonestoainetta, kuten laardiöljyä.

BBM-2478:n muodostumista fermentointialustassa voidaan 20 helposti seurata fermentoinnin kuluessa paperikiekkoagar-diffuusiokokeella käyttäen koeorganismia *Micrococcus luteus* PCI 1001.

Kun viljelyliemen optimipitoisuus on saavutettu, huovasto ja liukenemattomat jäännökset erotetaan fermentointiliemestä tavanomaisin menetelmin, kuten suodattamalla tai linkoamalla. Huovastokakun sisältämä antibiootti voidaan ottaa talteen uuttamalla huovastokakku metanolilla, suodattamalla pois liukenematon aines ja konsentroidamalla metanoliuute vesiliuokseksi. Viljelyliemen aktiivis- 25 aine voidaan ottaa talteen uuttamalla n-butanolilla ja konsentroidamalla butanoliutteet vesiliuokseksi. BBM-2478A ja B antibiootteja sisältäville vesipitoisille metanoli- ja butanoliutteille suoritetaan sitten tavanomaisia kromatografisia puhdistustoimenpiteitä puhtaan BBM-2478-A:n 30

matografisia puhdistustoimenpiteitä puhtaan BBM-2478-A:n ja B:n saamiseksi. Edullinen puhdistusmenetelmä on kuvattu jäljempänä esimerkissä 2.

BBM-2478 A ja B saatiin kellertävän oranssinvärisinä kiteisinä kiinteinä aineina. Molemmat BBM-2478-komponentit eroavat chartresiinista ohutkerroskromatografiassa (TLC), kuten taulukosta 5 voidaan nähdä. BBM-2478A on helppoliukoinen dimetyylisulfoksiidiin, dimetyyliformamiidiin, dioksaaniin ja happopitoiseen veteen, jonkin verran liukoinen metanoliin, etanoliin ja kloroformiin ja liukenematon muihin orgaanisiin liuottimiin. BBM-2478B:n liukoisuus on muuten samanlainen kuin BBM-2478A:n, mutta se on liukenematon happopitoiseen veteen. BBM-2478A ja B antavat positiivisen reaktion ferrikloridi- ja antronireagenssien kanssa. BBM-2478A:lla on positiivinen ninhydriinireaktio, kun sensijaan BBM-2478B:n reaktio samassa kohteessa on negatiivinen. Molempien komponenttien Tollen- ja Sakaguchireaktiot ovat negatiivisia. BBM-2478A:n ja B:n fysikaaliskemialliset ominaisuudet on koottu taulukkoon 6. Molempien komponenttien UV-spektrit ovat samankaltaiset: niissä on maksimit 236, 266, 398 ja 422 nm neutraalissa ja happamassa liuoksessa ja maksimit 240, 268 ja 435 nm alkalisessa liuoksessa. Nämä spektrit muistuttavat läheisesti chartresiinin spektriä. BBM-2478A:n ja B:n IR-spektrit on esitetty kuvioissa 1 ja 2. BBM-2478A:n protoni- (PMR) ja ^{13}C -NMR- (CMR) spektrit on vastaavasti esitetty kuvioissa 3 ja 4.

Taulukko 5

BBM-2478A:n ja B:n ja chartresiinin TLC

	SiO_2 <u>CHCl_3 -MeOH (7:3)</u>	SiO_2 <u>EtOAc-MeOH (1:1)</u>
BBM-2478A	Rf 0,37	0,16
BBM-2478B	0,78	0,57
Chartresiini	0,65	0,48

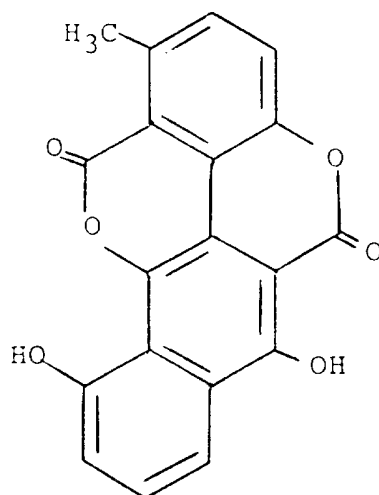
Taulukko 6

BBM-2478A:n ja B:n fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

	<u>BBM-2478A</u>	<u>BBM-2478B</u>
Luonne	Keltainen amorfinen jauhe	Keltainen amorfinen jauhe
5	Sp. 225 - 226°C	271 - 272°C (haj.)
	$[\alpha]_D^{26}$ (c, 0,5, pyrididini) + 124°C	- 8°C
	UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm ($E_1^{1\%}$ c_m)	
10	236 (590)	236 (740)
	266 (550)	266 (700)
	333 (100)	333 (118)
	378 (132)	378 (169)
	398 (205)	398 (255)
15	422 (225)	422 (290)
	Analyysi Saatu: C 59,28	C 63,07
	H 5,40	H 4,51
	N 2,06	
	Laskettu kaavalle:	
20	$C_{33}H_{35}NO_{13} \cdot H_2O$	$C_{26}H_{22}O_{10}$
	C 59,01	C 63,16
	H 5,55	H 4,48
	N 2,09	

BBM-2478A:n CMR-spektri osoittaa rakenteessa olevan
 25 33 hiiliatomia, joihin sisältyy 4 C-CH₃, 1-OCH₃, 9 >CH-,
 1 >C<, 5 -CH= ja 13 >C= -ryhmää. Näistä CMR-spektrin tu-
 loksista yhdessä mikroanalyysitulosten kanssa saatiin an-
 tibiootin BBM-2478A:n molekyylikaavaksi C₃₃H₃₅NO₁₃. BBM-
 2478A hydrolysoitiin 0,4-M HCl-metanoliliuoksella kuumen-
 30 taen palautusjäähdyttään tunnin ajan. Saostuneet keltaiset
 kiteet suodatettiin ja suodos konsentroidiin vakuuissa
 siirapiksi, joka sisälsi ninhydiini-positiivisia sokeri-
 fragmentteja. Kiteinen aine identifioitiin chartariiniksi,
 chartresiinin aglykoniksi vertaamalla sen ja autenttisen
 35 näytteen spektrianalyysijä.

Chartariini

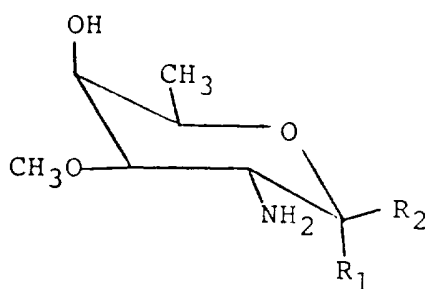


5
 10
 15
 20
 25
 30
 35

Vesipitoisen konsentraatin sisältämä sokerifrag-
 mentti oli disakkaridin (yhdiste I) anomeerinen seos, jos-
 ta erotettiin kromatografisesti Amberlite CG-50:llä (NH_4^+ -
 muoto) α - ja β -metyyliglykosidit suunnilleen yhtä suurina
 määrinä. Massaspektrin $M^+1:m/z$ 352) ja CMR-spektrin mu-
 kaan yhdisteiden Ia ja Ib molekyylikaavat olivat kumpikin
 $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{NO}_8$. Yhdisteiden Ia ja Ib fysikaalis-kemialliset
 ominaisuudet on koottu taulukkoon 7. Yhdisteiden Ia ja Ib
 edelleen hydrolysoiminen hapon avulla ei onnistunut, vaan
 aiheutti muodostuneiden sokerifragmenttien laajaa hajoa-
 mista, kun käytettiin niin vahvaa happokäsittelyä, että
 glykosidisidos katkesi. Kaavojen Ia ja Ib seos (370 mg)
 asetyloitiin metanolissa, jolloin saatiin mono-N-asetyyli-
 johdannainen (460 mg, $M^+1:m/z$ 394), joka hydrolysoitiin
 4,5-m HCl-metanoliliuoksella. Tuote kromatografoitiin si-
 likageelikolonissa CHCl_3 -MeOH-väkevä NH_4OH -seoksen
 (6:1:1) alemmalla faasilla, jolloin saatiin N-asetyyliami-
 nosokerin α - ja β -anomeerit (yhdiste N-Ac-IIa, 140 mg ja
 N-Ac-IIb, 22 mg) ja neutraalin sokerin α - ja β -anomeerit
 (yhdiste IIIa, 85 mg ja IIIb 79 mg). Käsiteltäessä yhdis-
 tettä N-Ac-IIa kyllästetyllä $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -liuoksella yhdiste
 muuttui kvantitatiivisesti vapaaksi aminoyhdisteeksi (yh-
 diste IIa). Yhdisteiden IIa, IIIa ja IIIb fysikaalis-ke-

mialliset tunnuksat on esitetty taulukossa 8. Analyysin ja NMR-spektrin perusteella IIa määritettiin metyyli-2-amino-2,6-dideoksi-3-O-metyyli- α -D-galaktopyranosidiksi. Kuten taulukosta 8 nähdään, IIa sisältää 5 rengasprotonia, 2 OCH₃-signaalia ja yhden C-CH₃-signaalin. Rengasprotonien ensimmäisen kertaluvun analyysi osoitti kytkentävakiot $J_{1-2}=23,8$, $J_{2-3}=10,5$, $J_{3-4}=3,0$, $J_{4-5}<1,0$ ja $J_{5-6}=6,4$ Hz, jotka ovat yhtäpitäviä esitetyn rakenteen kanssa. Lisäksi N,O-diasetyyli-IIa:n fysikaalis-kemialliset tunnuksat (mp. 163-164°C ja $[\alpha]_D^{23}:+154^\circ$ (c, 0,3, CHCl₃)) ovat samankaltaiset kuin M.B. Perryn (Can. J. Chem. 52: 3251-3255 (1974) metyyli-2-asetamido-4-O-asetyyli-2,6-dideoksi-3-O-metyyli- α -D-galaktopyranosidille ilmoittamat.

15

IIa: R₁ = OCH₃, R₂ = HIIb: R₁ = H, R₂ = OCH₃

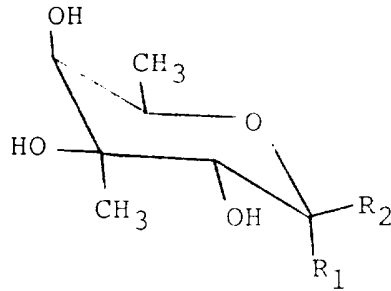
20

IIIa:n PMR-spektri osoitti kytkentävakioiden olevan $J_{1-2}=4,5$, $J_{4-5}<1,0$ ja $J_{5-6}=6,7$ Hz, ja IIIb:n kytkentävakioiden olevan $J_{1-2}=7,8$, $J_{4-5}<1,0$ ja $J_{5-6}=6,5$ Hz. Kummankin spektri osoitti C₃:n rengasprotonin puuttuvan. Spektrianalyysi osoitti IIIa:n ja IIIb:n olevan 6-deoksi-3-C-metyyligulopyranosidin (metyylivirenosidi) tai 6-deoksi-3-C-metyyli-galaktopyranosidin α - ja vastaavasti β -metyyliglykosidi. Metyyli- β -D-virenosidin autenttisen näytteen osoitettiin TLC-analyysillä ja NMR-spektrillä olevan eri yhdiste kuin IIIb: metyylivirenosidin H₁- ja H₆-signaalit havaittiin huomattavasti alemmassa kentässä kuin vastaavat IIIb:n signaalit, mikä osoittaa, että metyylivirenosidin C₃-OH on orientoitunut aksiaalisesti kun sensijaan IIIb:n C₃-OH on orientoitunut ekvatoriaalisesti. IIIa:n ja IIIb:n

35

optisen kiertokyvyn ja IIIa:n $\Delta[M]^{c_{uA}m}$ -arvon (1309°) perusteella yhdisteen III konfiguraatio on D-konfiguraatio. Siten IIIa ja IIIb määritettiin metyyli-6-deoksi-3-C-metyyli- α - ja β -galaktopyranosideiksi.

5



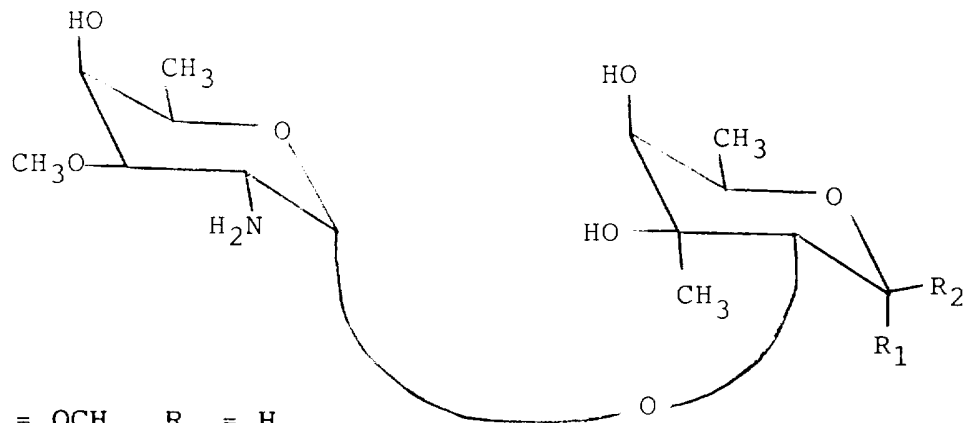
IIIa: $R_1 = OCH_3$, $R_2 = H$

IIIb: $R_1 = H$, $R_2 = OCH_3$

10

Molempien sokerien sidoskohdat määritettiin Ia:n ja Ib:n ja niiden asetaattien massaspektrien avulla, joissa todettiin disakkaridisekvenssistä II \rightarrow III johtuvia fragmentti-ioneja. N,O-triasetyyli-Ia:n 200 MHz PMR-spekttri ja suoritettu pilkkominen osoittivat, että sokeri II liittyi III:n C_2 -OH-ryhmään α -glykosididoksella, joten yhdisteiden Ia ja Ib kaavoiksi määritettiin seuraavat:

20



25

Ia: $R_1 = OCH_3$, $R_2 = H$

Ib: $R_1 = H$, $R_2 = OCH_3$

30

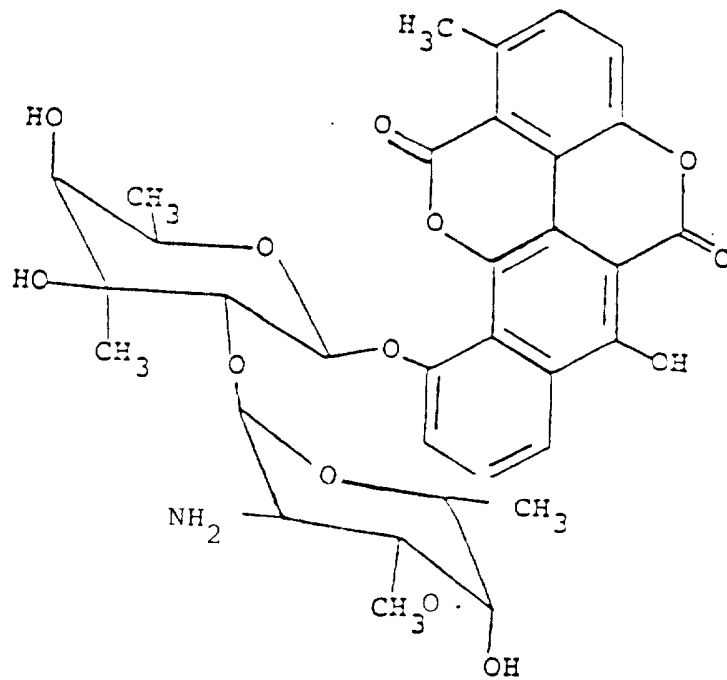
Eri pH-arvoissa mitatut BBM-2478A:n UV-spektrit ovat hyvin samankaltaisia kuin chartresiinilla. Tämän perusteella oletetaan, että BBM-2478A:n disakkaridiosa on liittynyt samaan chartariinin hydroksyyliiniryhmään kuin chartresiinissa. BBM-2478A:n ja chartresiinin IR-spektrit kloroformissa osoittivat karbonyyliabsorption samaa mal-

35

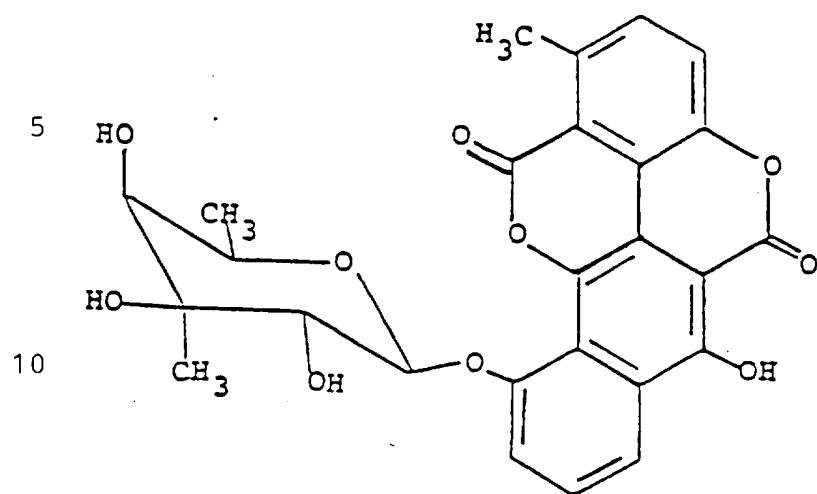
lia, mikä tukee edellä olevaa johtopäätöstä. N-asetyyli-BBM-2478A:n NMR-spektrissä III:n anomeerinen protoni aiheutti dubletin, jonka tilavakio $J=8,0$ Hz, jonka perusteella antibiootin pääteltiin olevan konformaatioltaan

5 III:n β -pyranosidi.

Mikroanalyysin perusteella BBM-2478B:n molekyylikaavaksi määritettiin $C_{26}H_{22}O_{10}$. Lievällä happamalla metanolyysillä BBM-2478B:stä saatiin chartariinia ja neutraaleja sokereita (IIIa ja IIIb), jotka olivat identtisiä
10 BBM-2478A:sta saatujen kanssa. BBM-2478B on siten ilmeisesti BBM-2478A:n analogi, jossa ei ole aminosokeriosaa (II). BBM-2478A:n ja B:n rakenteiksi määrättiin siten seuraavat:



BBM-2478A



BBM-2478B

Taulukko 7

Yhdisteiden Ia ja Ib fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

	Yhdiste Ia	Yhdiste Ib
5	Luonne	valkea jauhe
	S.p.	79 - 82°C
	$[\alpha]_D$ (c 1,0, H ₂ O)	+211°
10	TLC n-BuOH-AcOH-H ₂ O (63:10:27)	Rf 0,19
	Molekyylikaava	C ₁₅ H ₂₉ NO ₈
	Massa spektri (m/z)	352 (M ⁺ +1)
15		319
		235
		160
	PMR (60 MHz D ₂ O:ssa) δ (ppm)	1,25 (3H, d)
		1,28 (3H, d)
		1,37 (3H, s)
20		3,03 (1H, d-d)
		3,41 (3H, s)
		3,46 (3H, s)
		3,6 - 4,5 (6H, m)
		4,90 (1H, d, J=4,3 Hz)
		4,98 (1H, d, J=3,5 Hz)
25		1,23 (3H, d)
		1,26 (3H, d)
		1,29 (3H, s)
		3,07 (1H, d-d)
		3,44 (3H, s)
		3,54 (3H, s)
		3,4-4,4 (6H, m)
		4,50 (1H, d, J=8,0 Hz)
		5,09 (1H, d, J=3,5 Hz)

Taulukko 8

Yhdisteiden IIa, IIIa ja IIIb fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

	<u>IIa</u>	<u>IIIa</u>	<u>IIIb</u>
5			
Luonne	vaaleankeltainen siirappi	vaaleankeltainen siirappi	vaaleankeltainen siirappi
$[\alpha]_D$	+106° (c 0,2, MeOH)	+152° (c 0,5, CHCl ₃)	-33° (c 0,5, CHCl ₃)
10			
TLC : Rf			
CHCl ₃ -MeOH-NH ₄ OH (2:1:1) alempi faasi	0,67	0,35	0,32
n-BuOH-AcOH-H ₂ O (63:10:27)	0,20	0,47	0,40
15			
Molekyylikaava	C ₈ H ₁₇ NO ₄	C ₈ H ₁₆ O ₅	C ₈ H ₁₆ O ₅
PMR, 60 MHz D ₂ O:ssa			
δ (ppm)	1,26 (d, 3H, 6, 4)* 2,97 (d-d, 1H, 3, 8 & 10, 5) 3,41 (s, 3H) 3,43 (s, 3H) 3,45 (d-d, 1H, 3, 0 & 10, 5) 4,00 (q, 1H, 6, 4) 4,02 (br-d, 1H, 3, 0) 4,72 (d, 1H, 3, 8)	1,27 (d, 3H, 6, 7) 1,34 (s, 3H) 3,38 (s, 3H) 3,48 (br-s, 1H) 3,83 (d, 1H, 4, 5) 4,18 (q, 1H, 6, 7) 4,75 (d, 1H, 4, 5)	1,27 (s, 3H) 1,28 (d, 3H, 6, 5) 3,45 (br-s, 1H) 3,52 (d, 1H, 7, 8) 3,60 (s, 3H) 4,00 (q, 1H, 6, 5) 4,39 (d, 1H, 7, 8)
20			

*kerrannaisuus, protoni, J(Hz)

BBM-2478:n minimiestokonsentraatio (MIC) määritettiin useita erilaisia gram-positiivisia ja gram-negatiivisia bakteereja ja sieniä vastaan sekä joitakin anaerobisia organismeja vastaan kaksinkertaisella agarlaimennus-
 5 sarjamenetelmällä käyttäen vertailuun chartresiinia. Gram-positiivisten ja gram-negatiivisten bakteerien kokeissa käytettiin ravintoagar-alustaa, anaerobisten organismien kokeissa GAM-agar-alustaa ja sienten kokeissa Sabouraud-agar-alustaa. Kuten taulukosta 9 voidaan nähdä,
 10 BBM-2478A:lla ja B:llä ja chartresiinilla on samankaltainen antibakteerinen spektri gram-positiivisia bakteereja ja anaerobisia organismeja vastaan, jolloin ne olivat inaktiivisia gram-negatiivisia bakteereja ja sieniä vastaan. BBM-2478A:n anti-stafylokokki-aktiivisuus oli 2-4 kertainen
 15 BBM-2478B:n tai chartresiinin vastaavaan aktiivisuuteen verrattuna.

Taulukko 9

BBM-2478A:n ja B:n antibakteerinen aktiivisuus

	<u>Koeorganismi</u>	<u>MIC (µg/ml)</u>		
		<u>BBM-2478A</u>	<u>BBM-2478B</u>	<u>Chartresiini</u>
20	<u>Staphylococcus aureus</u> 209P	1,6	3,1	3,1
	<u>Staphylococcus aureus</u> Smith	0,8	6,3	6,3
25	<u>Bacillus subtilis</u> PCI 219	0,8	0,8	0,4
	<u>Micrococcus luteus</u> PCI 1001	0,8	3,1	0,8
	<u>Micrococcus flavus</u> D12	0,8	1,6	0,4
30	<u>Escherichia coli</u> NIHJ	100	>100	>100
	<u>Klebsiella pneumoniae</u> D11	100	>100	>100
35	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> D15	100	>100	>100

	<u>Koeorganismi</u>	<u>BBM-2478A</u>	<u>BBM-2478B</u>	<u>Chartresiini</u>
	<u>Candida albicans</u>			
	IAM 4888	>100	>100	>100
5	<u>Cryptococcus neoformans</u> D49	>100	>100	>100
	<u>Aspergillus fumigatus</u>			
	IAM 2530	>100	>100	>100
	<u>Trichophyton mentagrophytes</u> D155	>100	>100	>100
10	<u>Bacteroides fragilis</u>	12,5		6,3
	<u>Clostridium difficile</u>	12,5		25
	<u>Clostridium perfringens</u>	6,3		1,6
15	<u>Propionibacterium acnes</u>	6,3		3,1

BBM-2478A:n kasvaintenvastainen aktiivisuus määritettiin lymfosyyttistä leukemiaa P388, lymfoidileukemiaa L1210 ja melanoottista melanoomaa B16 vastaan hiirillä käyttäen vertailuun chartresiinia. Kasvaimet istutettiin intraperitoneaalisesti BDF₁-hiiriin vastaavina määrinä 10⁶, 10⁵ ja 10⁶ solua hiirtä kohti. Koe yhdisteet liuotettiin 0,9-%:iseen suolaliuokseen, joka sisälsi 10 % dime-tyylisulfoksidia, ja antibioottia annostettiin asteittain alenevina annoksina intraperitoneaalisesti 24 tuntia kasvaimen istuttamisen jälkeen. Käsittelyjä annettiin kerran päivässä 9 vrk ajan (qd 1→9). Tulokset nähdään taulukoissa 10, 11 ja 12. BBM-2478A:n aktiivisuus oli noin 10-30-kertainen chartresiinin aktiivisuuteen verrattuna, kun vertailuun käytettiin minimi-teho-arvoja, ja kaikkia kokeiltuja kasvaimia vastaan saadut T/C-arvot olivat parempia kuin chartresiinilla. BBM-2478B:llä ei havaittu kasvaintenvastaista aktiivisuutta. BBM-2478A:n akuutti myrkyllisyys määritettiin hiirillä (ddY-kanta) yhdellä ainoalla intraperitoneaalisella annoksella, LD₅₀ oli 38 mg/kg.

Taulukko 10

BBM-2478A:n vaikutus P388-leukemiaan

	Annos, ip. (mg/kg/vrk*)	MST (päiviä)	T/C (%)	Keskim.pai-Hengissä olevia non muutos päivänä			
				päivänä 5(g)	5	45	
5	BBM-2478A	3	20,0	222*	-1,0	5/5	0/5
		1	21,5	239	+0,8	6/6	0/5
		0,3	17,0	189	+1,8	6/6	0/6
		0,1	14,5	161	+1,2	6/6	0/6
		0,03	10,0	111	+2,3	6/6	0/6
		0,01	10,0	111	+2,0	6/6	0/6
10	Chartresiini	10	19,5	217	+1,3	6/6	0/6
		3	15,0	167	+1,5	6/6	0/6
		1	14,0	156	+1,3	6/6	0/6
		0,3	10,5	117	+2,0	6/6	0/6
		0,1	9,0	100	+2,8	6/6	0/6
15	Väliaine	-	9,0	-	+2,4	12/12	0/12

* qd 1 → 9

**Ympäröidyt tulokset osoittavat merkitsevää kasvainten-
taista vaikutusta

Taulukko 11

BBM-2478A:n vaikutus L1210-leukemiaan

	Annos, ip. (mg/kg/vrk*)	MST (päiviä)	T/C (%)	Keskim.pai- nonmuutos päivänä 5(g)	Hençissä olevia päivänä		
					5	45	
5	BBM-2478A	3	12,0	150**	-0,1	6/6	0/6
		1	11,0	138	+0,8	6/6	0/6
		0,3	10,5	131	+1,3	6/6	0/6
		0,1	8,0	100	+2,6	6/6	0/6
		0,03	8,0	100	+2,9	6/6	0/6
		0,01	8,0	100	+3,2	6/6	0/6
10	Chartresiini	10	11,5	144	+1,3	6/6	0/6
		3	9,0	113	+1,4	6/6	0/6
		1	9,0	113	+1,9	6/6	0/6
		0,3	8,0	100	+3,2	6/6	0/6
		0,1	8,0	100	+3,1	6/6	0/6
15	Väliaine	-	8,0	-	+2,8	12/12	0/12

* qd 1 + 9

** Ympäröidyt tulokset osoittavat merkitsevää kasvainten-
vastaista vaikutusta.

Taulukko 12

BBM-2478A:n vaikutus B16-melanomaan

	Annos, ip. (mg/kg/vrk*)	MST (päiviä)	Keskim.painon		Hengissä olevia		
			T/C (%)	muutos päivä- nä 5 (q)	5	45	
5	BBM-2478A	3	41,5	296**	+1,5	6/6	0/6
		1	34,5	246	+2,2	6/6	0/6
		0,3	25,5	182	+2,5	6/6	0/6
		0,1	18,5	132	+2,5	6/6	0/6
		0,03	16,0	114	+2,0	6/6	0/6
10	Chartresiini	10	25,0	179	+1,7	6/6	0/6
		3	20,5	146	+2,3	6/6	0/6
		1	16,0	114	+2,3	6/6	1/6
		0,3	14,0	100	+1,8	6/6	0/6
15	Väliaine	-	14,0	-	+2,3	10/10	0/10

* qd + 9

** Ympäröidyt tulokset osoittavat merkitsevää kasvaintenvastaista vaikutusta.

Kuten edellä olevasta nähdään, BBM-2478A:lla ja B:llä on vahva antibakteerinen aktiivisuus aerobisia grampositiivisia bakteereja ja anaerobisia bakteereja vastaan, joten ne ovat käyttökelpoisia tällaisten bakteerien aiheuttamien tartuntatautien käsittelyssä nisäkkäillä ja muilla eläimillä. Lisäksi nämä yhdisteet sopivat muihin antibakteeristen aineiden tavanomaisiin käyttötarkoituksiin, kuten desinfiointiaineisiin ja hampaiden hoitovälineisiin.

10 BBM-2478A:n merkitsevä kasvaintenvastainen aktiivisuus hiirillä kokeellisesti aikaansaaduissa kasvainsysteemissä osoittaa BBM-2478A:n olevan myös terapeuttisesti käyttökelpoinen nisäkkäiden kasvainten kasvua estävänä aineena.

15 Antibiootteja voidaan käyttää farmaseuttisina koostumuksina, jotka sisältävät antibakteerisesti vaikuttavan määrän BBM-2478A:ta tai BBM-2478B:tä yhdessä inertin, farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan tai laimentimen kanssa. Tällaiset koostumukset voidaan valmistaa mihin tahansa farmaseuttiseen muotoon, joka sopii parenteraaliseen lääkeantoon.

20 Parenteraaliseen lääkeantoon käytettävät valmisteet käsittävät steriilejä, vesipitoisia tai vedettömiä liuoksia, suspensioita ja emulsioita. Ne voidaan valmistaa myös steriilien kiinteiden koostumusten muotoon, jotka ennen käyttöä voidaan liuottaa steriiliin veteen, fysiologiseen suolaliuokseen tai muuhun steriiliin injektoitavaan väliaineeseen.

25 On huomattava, että käytetty edullinen määrä BBM-30 2478 antibiootteja riippuu käytetystä komponentista, koostumuksen formulaatiosta, lääkkeenantotavasta ja käsiteltävän potilaan tilanteesta, potilaasta ja taudista. Alan asiantuntija ottaa tällöin huomioon monet lääkintään vaikuttavat tekijät, esimerkiksi potilaan iän, kehon painon, 35 sukupuolen, ravintovalion, lääkkeen annostuksen ajankohdan, annostustavan, lääkkeen erittymisen, muiden lääkkei-

den vaikutuksen, potilaan herkkyyden ja taudin vakavuuden. Lääkeanto voidaan suorittaa jatkuvana tai jaksottain siedettävän maksimiannoksen määräämissä rajoissa. Alan asiantuntija voi varmistaa optimaalisen annostusmäärän tietyissä olosuhteissa käyttäen tavanomaisia annoksen määrityskokeita, joissa otetaan huomioon edellä esitetyt ohjeet.

Seuraavat esimerkit esitetään keksinnön valaisemiseksi, eikä niiden tarkoituksena ole rajoittaa keksinnön suojapiiriä. Kaikki lämpötilat ovat Celcius-asteina, jollei muuta mainita. Amberlite CG-50 on firman Rohm & Haas, Philadelphia, Pa., USA, tavaramerkki, ja se on heikosti hapan kationinen karboksyylihappotyyppiä oleva ionin vaihtoharts. Diaion HP-20 on firman Mitsubishi Chemical Industries, Japani, tavaramerkki, ja se on ei-ioninen makroretikulaarinen polymeeriharts.

Esimerkki 1

BBM-2478A:n ja B:n fermentointi

Hyvin kasvanutta aktinomykeettikannan nro J907-21 vinoviljelmää käytettiin ympäämään vegetatiivista alustaa, joka sisälsi 3 % liukoista tärkkelystä, 1 % Bactomaksautetta (Difco), 0,5 % kalajauhetta, 0,3 % NaCl, 0,1 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ja 0,6 % CaCO_3 ja jonka pH ennen sterilointia oli säädetty arvoon 7,0. Vegetatiivista alustaa inkuboitiin 28°C:ssa kiertoravistimessa (250 r/min) 72 tuntia, sitten 5 ml kasvustoa siirrettiin 500 ml:n erlenmeyeriin, joka sisälsi 100 ml fermentointialustaa, jonka koostumus oli sama kuin vegetatiivisella alustalla. Fermentointi suoritettiin kiertoravistimessa 28°C:ssa 7-10 vuorokauden ajan. Fermentointiliemen antibioottiaktiivisuus määritettiin paperikiekko-agardiffuusiomenetelmällä käyttäen koeorganismia *Micrococcus luteus* PCI 1001. 6-7 vuorokauden fermentoinnin jälkeen antibiootin tuotto saavutti maksimiarvon 150 µg/ml.

Esimerkki 2BBM-2478A:n ja B:n eristäminen ja puhdistaminen

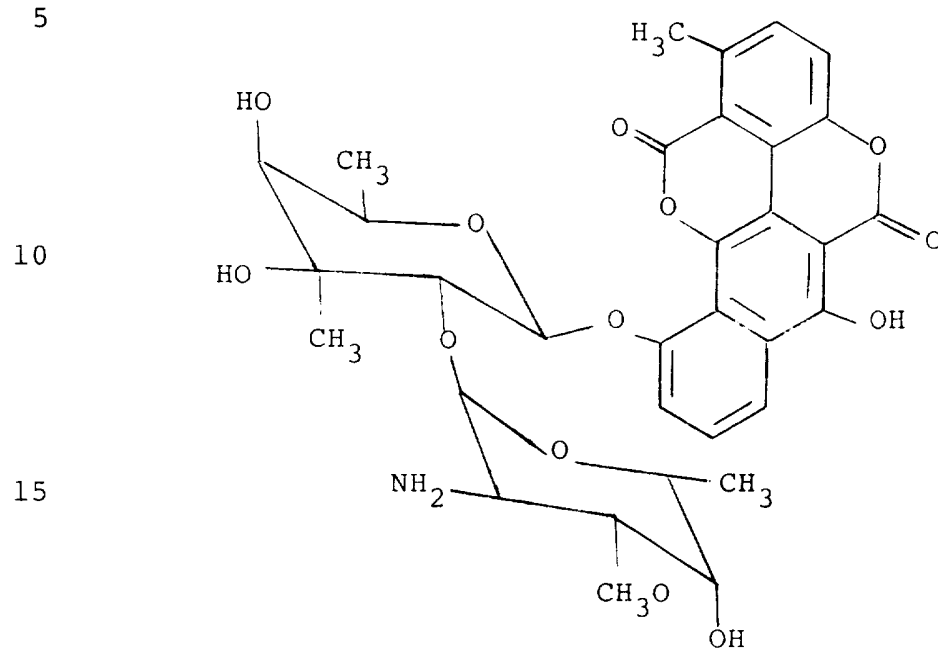
Esimerkissä 1 valmistettu talteenotettu liemi

(20 l, pH 6,8) jaettiin huovastokakkuksi ja supernatantiksi
5 Sharplesstyyppin lingossa (Kokusan nro 4A). Huovastokakku
uutettiin metanolissa (3 x 5 l). Liukenematon aines pois-
tettiin metanoliuutteista ja yhdistetyt uutteen konsent-
roitettiin vakuuissa vesiliuokseksi. Fermentointiliemen su-
pernatantti uutettiin n-butanolilla (20 l), ja uute haih-
10 dutettiin vakuuissa vesiliuokseksi. Molemmat vesipitoiset
konsentraatit yhdistettiin ja vietiin Diaion HP-20 hartsia
(Mitsubishi Chem. Industries, Tokio) sisältävään kolonniin
(ϕ 5,5 cm, korkeus 60 cm), joka kehitettiin peräkkäin ve-
dellä (5 l), 50 %:isella vesipitoisella metanolilla (5 l)
15 ja 80-%:isella vesipitoisella metanolilla (6 l). BBM-
2478:aa sisältävät fraktiot määritettiin paperikiekkomen-
telmällä käyttäen koeorganismia B. subtilis M45 (Rec⁻).
Aktiiviset fraktiot eluoutuivat 80-%:isella vesipitoisella
metanolilla, ne yhdistettiin, haihdutettiin alennetussa
20 paineessa ja kylmäkuivattiin, jolloin saatiin 4,5 g kel-
taista kiinteätä raakaa BBM-2478-kompleksia. Raakakomplek-
si vietiin silikageelikolonniin (ϕ 3,5, korkeus 55 cm),
joka oli esipesty kloroformilla, ja aktiivinen aine eluoi-
ttiin kloroformimetanoliseoksella, jonka metanolikonsent-
25 raatiota suurennettiin asteittain (5 10 tilav./tilav-%).
Ensimmäiset aktiiviset fraktiot eluoutuivat 5-%:isellä
metanolilla, ne koottiin, konsentroidtiin vakuuissa ja
lyofilisoitiin, jolloin saatiin 72 mg BBM-2478B:tä. Seu-
raavat aktiiviset fraktiot eluoutuivat 10-%:isellä metano-
30 liseoksella, eluaattia käsiteltiin samalla tavalla, jol-
loin saatiin puolipuhdasta kiinteätä BBM-2478A:ta
(2,51 g). Se puhdistettiin edelleen kromatografioimalla
silikageelillä käyttäen keskipaineista nestekromatografiaa
(kolonni: Kiriyma ϕ 11, korkeus 500 mm; pumppu: FMI Lab
35 pump, paine: 551 621 kPa). Eluoimalla kloroformi-metano-
li-seoksella (97:3 tilavuusosia) saatiin aktiiviset frak-

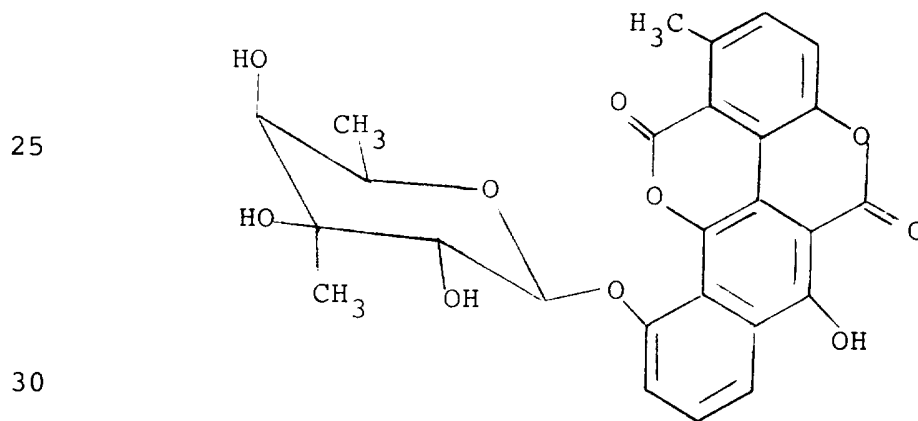
tiot, joista konsentroimalla vakuuissa saatiin homogeeninen kiinteä BBM2478A (1,30 g). Se kiteytettiin metanolista, jolloin saatiin kellertävän oranssinvärisiä sauvoimaisia BBM-2478A-monohydraatti kiteitä.

Patenttivaatimus

Menetelmä antibiootin BBM-2478A, jonka kaava on



20 ja antibiootin BBM-2478B, jonka kaava on



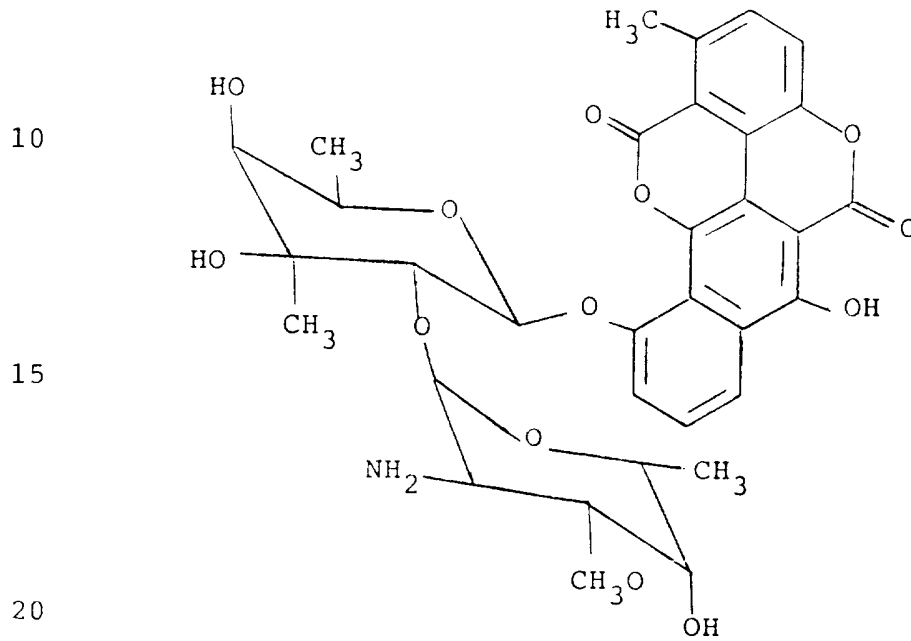
valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että viljellään
 aktinomykeettikantaa J907-21 (ATCC 39417) vesipitoisessa
 35 ravintoalustassa, joka sisältää assimiloituvia hiilen ja

typen lähteitä, pinnanalaisissa aerobisissa olosuhteissa, kunnes mainittu organismi on tuottanut viljelyalustaan olennaisen määrän BBM-2478-antibioottikompleksia, minkä jälkeen BBM-2478-antibioottikompleksi otetaan talteen vil-
5 jelyalustasta, ja antibioottikomponentit BBM-2478A ja BBM-2478B erotetaan uuttamalla ja puhdistetaan kromatografisin menetelmin.

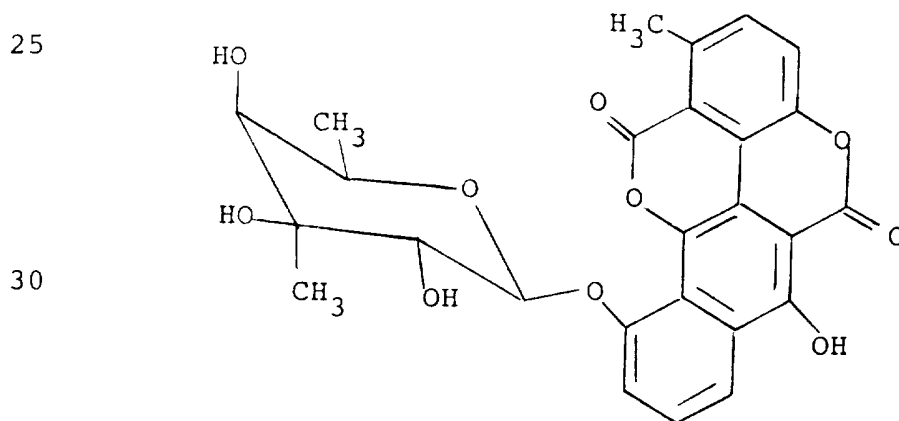
Patentkrav

Förfarande för framställning av antibiotikumet
BBM-2478A med formeln

5



och antibiotikumet BBM-2478B med formeln



35 k ä n n e t e c k n a t därav, att actinomycesstammen
J907-21 (ATCC 39417) odlas i ett vattenhaltigt näringsme-

dium, som innehåller assimilerbara kol- och kvävekällor, under submersa aerobiska förhållanden, tills en väsentlig mängd av BBM-2478-antibiotikumkomplex har producerats av nämnda organism i odlingsmediet, varefter BBM-2478-antibiotikumkomplexet utvinns ur odlingsmediet och antibiotikumkomponenterna BBM-2478A och BBM-2478B separeras medelst extraktion och renas medelst kromatografiska metoder.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

-

FIG. 1

BBM-2478A:n infrapuna-absorptiospektri

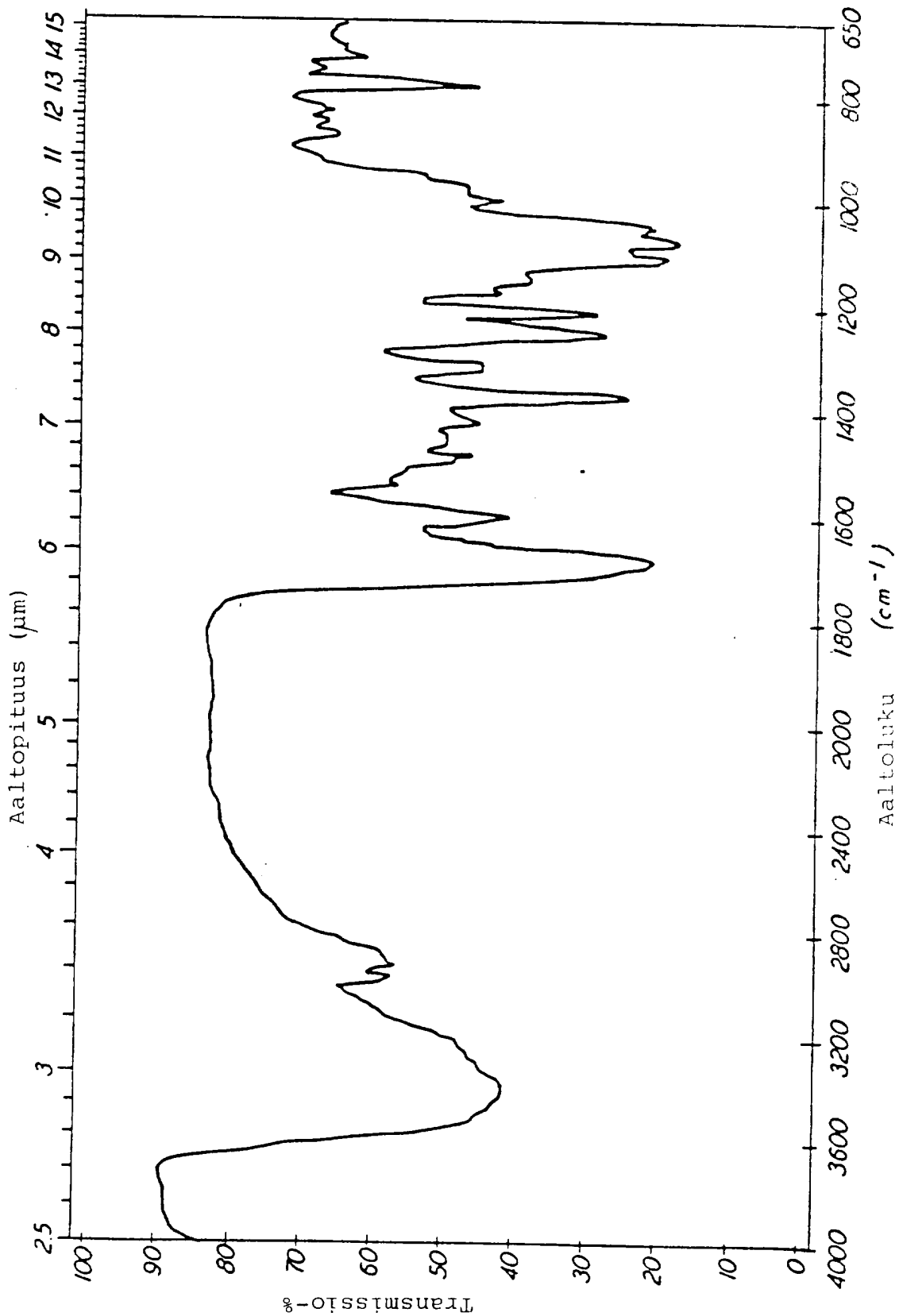
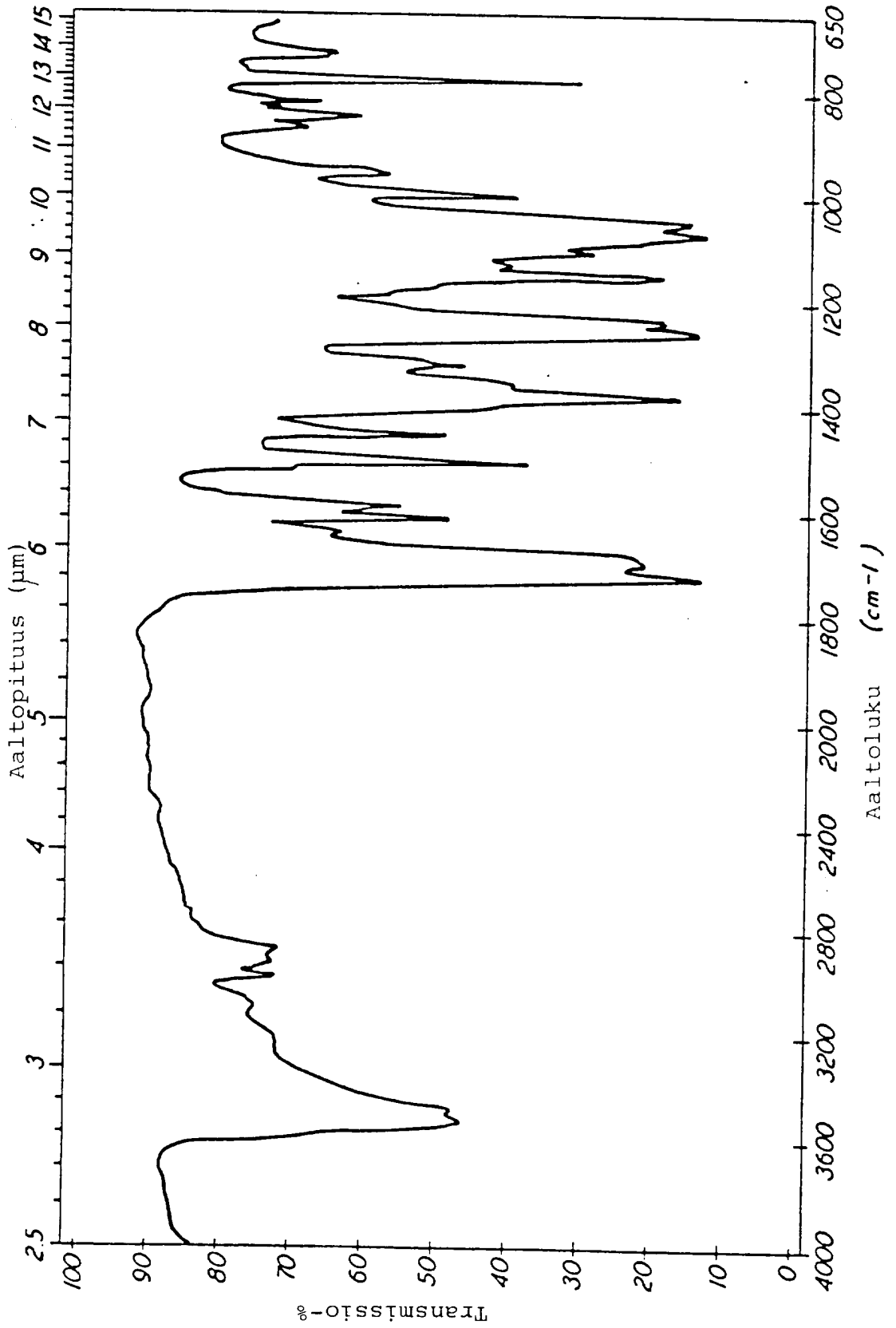


FIG. 2

BBM-2478B:n infrapuna-absorptiospektri



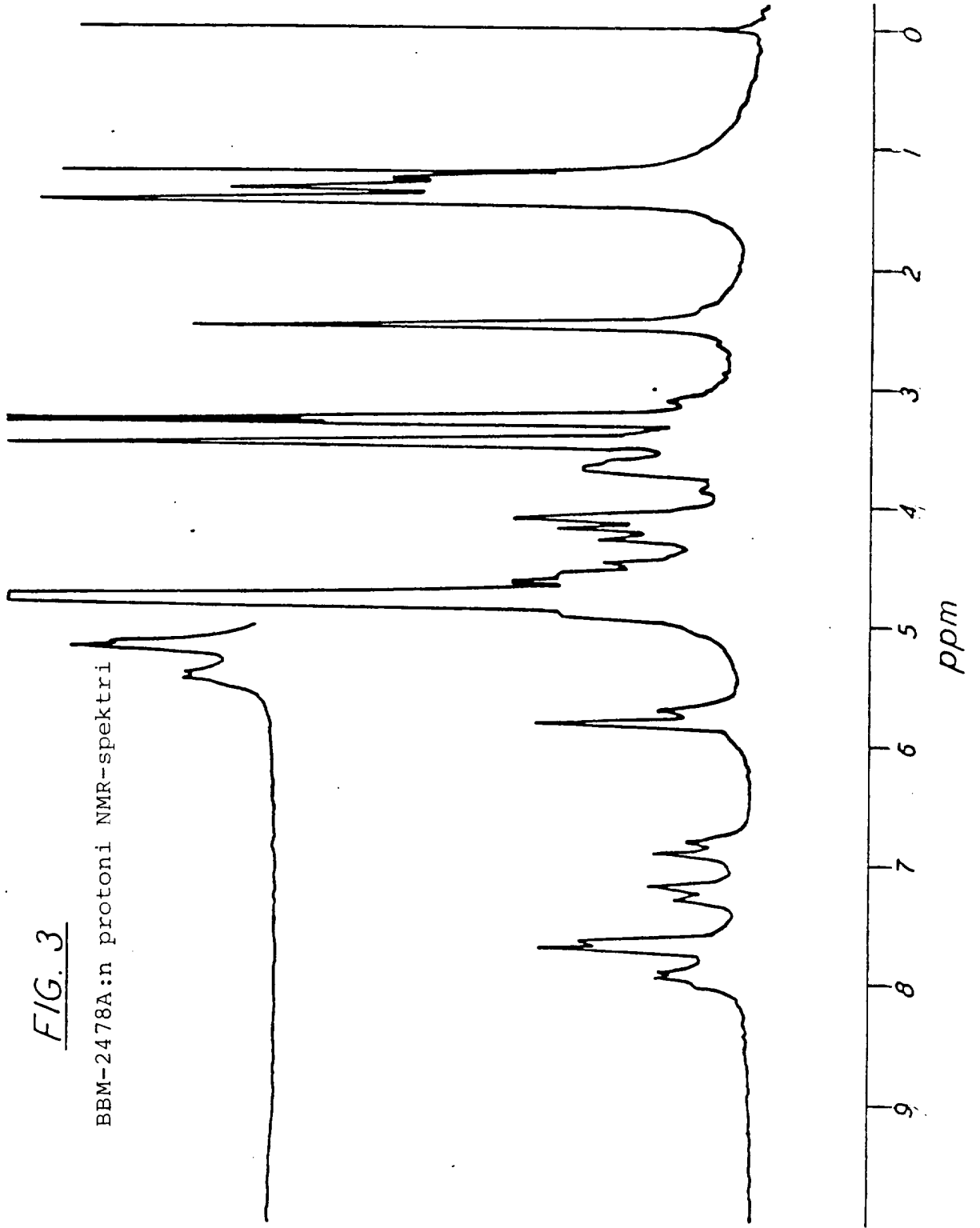


FIG. 4

BBM-2478A:n ^{13}C NMR-spektri

