

NORGE



**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

Utlegningskrift nr. 127918

Int. Cl. C 07 d 7/06 Kl. 12q-24

Patentsøknad nr. 1101/70 Inngitt 24.3.1970

Løpedag -

Søknaden alment tilgjengelig fra 1.10.1970

Søknaden utlagt og utlegningskrift utgitt 3.9.1973

Prioritet begjært fra: 31.3.1969 Japan
nr. 25096/69

Takeda Chemical Industries Ltd.,
27 Doshomachi 2-chome, Higashi-ku, Osaka,
Japan.

Oppfinnere: Hiroichi Yamamoto, 1426 Mikage-aza-shironomae,
Mikage-cho, Higashinada-ku, Kobe,
Takashi Suzuki, 37-11, 4-chome, Tsukaguchi-cho,
Amagasaki, Hyogo,
Eiji Higashide, 2-137, asa-Mykogawa-dori, Kawano,
Takarazuka, Hyogo,
Takeshi Fugono, 10-7, 5-chome, Daiwanishi, Kawanishi,
Hyogo og Komei Mizuno, 8-4, Senriokahigashi 4-chome,
Settsu, Osaka, alle Japan.

Fullmektig: Bryns Patentkontor A/S

Fremgangsmåte for fremstilling av 14-monoacylderivater av
antibiotikum T-2636C.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstilling av farmasøytisk nyttige acylderivater av antibiotikum T-2636C.

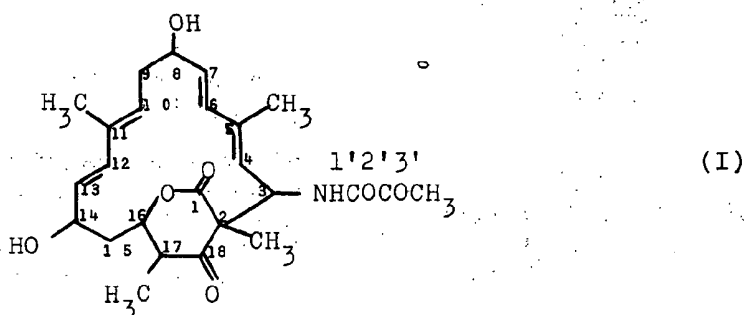
Det er kjent at et nytt antibiotikum kalt "antibiotikum T-2636C" kan fremstilles i et kulturmedium ved hjelp av en ny stamme av slekten Streptomyces, nemlig Streptomyces rochei var. volubilis, og at det kan utvinnes i godt utbytte fra kulturmediet (konferer belgisk patent nr. 715 356).

Antibiotikumet T-2636C (i det etterfølgende ofte betegnet bare "C") er et fargeløst, krystallinsk, fettløselig stoff som er aktivt overfor gram-positive bakterier og som har to hydroksygrupper i stillingene 8 og 14 slik det er vist i den følgende formel.

Kfr.kl. 30h-7

127918

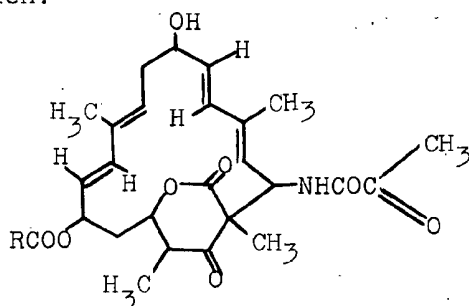
2



I et forsøk på å fremstille nye og brukbare derivater av C ved en industriell anvendbar fremgangsmåte, har man oppnådd følgende resultater:

- (1) C kan acyleres i nærvær av en kultur av visse mikroorganismer eller en enzymholdig fraksjon oppnådd av en slik kultur,
- (2) acyleringen skjer spesifikt i stilling 14, således at reaksjonsutbyttet er meget høyt, og
- (3) det resulterende T-2636C-14 monoacylderivat kan oppnås i en meget høy renhet ved kromatografi eller ved i seg selv andre kjente fremgangsmåter.

Ifølge foreliggende oppfinnelse er det således tilveiebragt en fremgangsmåte til fremstilling av 14-monoacylderivater av antibiotikum T-2636C med formelen:



hvor R er hydrogen eller laverealkyl, kjennetegnet ved at man i et vandig medium omsetter antibiotikum T-2636C med en ester av en organisk syre med en acylgruppe med formelen R-CO- hvor R har den ovenfor angitte betydning, i nærvær av en kultur av en mikroorganisme valgt fra artene *Streptomyces rochei* var. *volubilis*, *Streptomyces tolypophorus*, *Streptomyces hygroscopicus*, *Aspergillus sojae* og *Trametes sanguinea*, eller i nærvær av en enzymholdig fraksjon erholdt fra disse kulturer, ved en temperatur på 20° - 40°C og en pH på mellom 4 og 9, hvorefter man utvinner det resulterende T-2636C-14-monoacylderivat.

Nevnte organiske syreester innbefatter estere av fettsyrer, f.eks. maurusyre, eddiksyre, propionsyre, etc., med lavere alko-

holer som metanol, etanol, propanol, etylenglykol, glycerol, etc. Mer spesielt kan man nevne metylformiat, etylacetat, etylpropionat, monoacetin, triacetin, etc., og man oppnår i hvert enkelt tilfelle et C-14-monoacylderivat som tilsvarer den organiske syreester man har anvendt.

I foreliggende oppfinnelse anvender man en kultur av de ovennevnte mikroorganismer eller en enzymholdig fraksjon oppnådd fra nevnte kulturer. Fraksjonen kan oppnås ved å rense kulturen ved hjelp av oppløsningsmiddelekstraksjon, eller ved hjelp av et absorpsjonsmiddel eller ved hjelp av en ioneutbytningsharpiks.

Typiske eksempler på nevnte mikroorganismer er *Streptomyces rochei* var. *volubilis* (IFO 12507), *Streptomyces tolypophorus* (IFO 12554), *Streptomyces hygroscopicus* (IFO 12703), *Aspergillus sojae* (IFO 4200), *Trametes sanguinea* (IFO 7045). IFO-tallene i parentes indikerer registreringsnummerne ved Institute for Fermentation, Osaka. Av disse stammer er *Streptomyces rochei* var. *volubilis* den mest foretrukne, fordi denne stamme i seg selv akkumulerer store mengder C, og følgelig gjør det mulig å fremstille det ønskede C-14-monoacylderivat ved kun å kontakte kulturen med en egnet organisk syreester.

Den enzymholdige fraksjon oppnådd fra kulturene omfatter f.eks. råenzymer fremstilt fra kulturer av *Streptomyces rochei* var. *volubilis*, *Streptomyces tolypophorus*, *Streptomyces hygroscopicus*, råesterasesystemer fremstilt fra en kultur av *Aspergillus sojae* (Journal of Fermentation Technology, vol. 40, P610, 1962), og et råcellulase-system fremstilt fra en kultur av *Trametes sanguinea* (japansk patent nr. 217 45/66). De respektive råenzymer har vært anvendt for forskjellige formål alt avhengig av enzymenes egne karakteristika, og det er en ny oppdagelse at disse enzymer også kan anvendes i foreliggende fremgangsmåte.

Man oppnår en høyere omdannelse til det ønskede produkt når estermengden økes og etterhvert som reaksjonstiden forlenges. Reaksjonstiden varierer med de spesielle anvendte reaksjonsbetingelser, og mer enn 30 minutter er vanligvis nødvendig. Hvis man anvender en organisk syreester som er ublandbar med vann, så bør reaksjonssystemet blandes inntil man får dannet en emulsjon. Reaksjonstemperaturen og pH kan variere innen de forskjellige typer kulturer eller enzymer, og reaksjonen utføres ved temperaturer fra 20° til 40°C og ved en pH mellom 4 og 9.

Som oppløsningsmiddel for å ekstrahere det resulterende C-14-monoacylderivat, kan man anvende den gjenværende del av den

127918

organiske syre-ester i kulturmediet, foruten andre tilsatte organiske oppløsningsmidler, såsom metylisobutylketon, benzen, kloroform, etc. Den organiske fase vaskes med en vandig oppløsning av et svakt alkalisk salt, f.eks. natriumhydrogenkarbonat, og deretter med vann, hvorefter det hele tørkes over vannfri natriumsulfat og konsentreres under redusert trykk. Det resulterende konsentrat vil inneholde et C-14-monoacylderivat samt en ureagert del av C. For å isolere det forønskede produkt fra konsentratet, kan man pakke en kromatografisk kolonne med et absorpsjonsmiddel såsom siliciumdioksydgel (kromatografisk kvalitet, 0,05-0,2. Det ovennevnte konsentrat for-
tynnes først med en egnet mengde av et oppløsningsmiddel med lav polaritet, f.eks. benzen eller kloroform, hvorefter det hele kromatograferes. Det absorberte produkt på kolonnen skilles så ved en eluering med et egnet organisk oppløsningsmiddelsystem, f.eks. en blanding av benzen og etylacetat. Den resulterende fraksjonen som inneholder den ønskede forbindelse konsentreres deretter under redusert trykk. Derivatet vil da skille seg ut som krystaller uten ytterligere behandling, eller ved at konsentratet hensettes etter at man har tilsatt en egnet mengde av en eter eller petroleter.

Fysiske og kjemiske egenskaper for forskjellige C-14-acylderivater er følgende:

(a) C-14-monoformiat.

Farveløse plater ved omkrystallisasjon fra etylacetat-dietyleter, smeltepunkt 175 til 177°C, $[\alpha]_D^{22} = -2760^\circ$ (C=1,0 i etanol), elementæranalyse: beregnet for $C_{26}H_{33}NO_8$: C, 64,04%; H, 6,82%; N 2,87%; funnet: C, 63,90%; H, 6,72%; N, 3,06%.

Ultrafiolet absorpsjonsspektrum $\lambda_{\max}^{EtOH} 227$ (E $\frac{1\%}{1cm} = 1010$).

(b) C-14-monoacetat (T-2636A).

Farveløse plater ved omkrystallisasjon fra etylacetat, smeltepunkt 200 til 202°C; $[\alpha]_D^{22} = -235^\circ$ (C= 1,0 i etanol), elementæranalyse: beregnet for $C_{27}H_{35}NO_8$, C, 64,67%; H, 6,99%; N, 2,79%; funnet: C, 64,59%; H, 7,05%; N, 2,99%.

(c) C-14-monopropionat.

Farveløse plater ved omkrystallisasjon fra etylacetat-dietyleter, smeltepunkt 198 til 199°C $[\alpha]_D^{22} = -254,3^\circ$ (C=1,0 i kloroform), elementæranalyse: beregnet for $C_{28}H_{37}NO_8$: C, 65,23%; H, 7,23%; N, 2,72%; funnet C, 65,17%; H, 7,24%; N, 2,94%.

C-14-monoacylderivatene har lavere toksisitet i pattedyr og er mer effektiv sammenlignet med det rene antibiotikum C, noe

127918

som f.eks. vises i følgende prøve:

Forbindelse	Akutt toksisitet* (LD ₅₀) mg/kg kroppsvekt	Effektiv dose ** (ED ₅₀) mg/kg kroppsvekt
C	4100	50
C-14-monoformiat	5000 til 10000	40
C-14-monoacetat	8000 til 10000	32,5
C-14-monopropionat	> 10000	38,5

* En emulsjon av prøveforbindelsen i 5% gummi arabicum ble administrert intraperitonealt til grupper på 4 uker gamle hunnuser (ICR-JCL/T type) og den midlere letale dose (LD₅₀) ble beregnet etter 7 døgn.

** 4 uker gamle hunnuser ble først infisert intraperitonealt med *Staphylococcus aureus* 308A-1, hvorefter en emulsjon av prøveforbindelsen i 0,2% karboksymetylcellulose ble administrert per os direkte, og den midlere effektive dose ED₅₀ ble så observert.

Det følgende er et referanse-eksempel for fremstilling av startantibiotikumet C samt arbeidseksempler på fremstillingen av C-14-monoacylderivater. I disse eksempler har vektdelel samme forhold til volumdelel som gram til milliliter.

Referanse-eksempel.

1,5 volumdelel av et medium sammensatt av 1% løselig stivelse, 2% maisvæske, 0,3% pepton og 1% utfelt kalsiumkarbonat ble tilsatt en fermenteringstank hvis kapasitet var 3 volumdelel, og denne ble sterilisert ved et trykk på 1,5 kg pr. cm² i 15 minutter. Tanken ble så inokulert med en kultur av *Streptomyces rochei* var. volubilis T-2636 (IFO 12507) fra agarkulturer og inkubert i 42 timer ved 28°C. Kulturmediet ble så overført til en sterilisert fermenteringstank hvis kapasitet var 200 volumdelel og som på forhånd inneholdt 100 volumdelel av samme medium som nevnt ovenfor.

Submers dyrking ble utført ved en temperatur på 28°C og ved en gjennomluftning på 50% pr. minutt med hensyn til mediets volum, og omrøringen ble utført med 200 omdreininger pr. minutt. 60 volumdelel av den resulterende inokuleringskultur ble overført til en større fermenteringstank. Denne tank ble tilsatt 4000 volum-

127918

deler av et medium sammensatt av 3% glycerol, 2% maisvæske, 1% bomullsfrømel, 0,2% pepton og 0,5% natriumklorid (pH 6,8), og tankens kapasitet var 6000 volumdeler og det hele ble så sterilisert. Tanken ble så inkulert med ovennevnte inkuleringskultur og inkubert ved en temperatur på 28°C og ved en gjennomluftning på 50% pr. minutt pr. volum av mediet ved en omrøring på 150 omdreininger pr. minutt i 44 timer. Akkumuleringen av C i mediet utgjorde 200 γ /ml ved slutten av inkuberingen.

Fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse er illustrert ved de følgende eksempler.

Eksempel 1.

2000 volumdeler av mediet fremstilt som angitt i ovennevnte referanse-eksempel ble filtrert sammen med 60 vektdeler av et filtreringsmiddel, hvoretter cellene ble ytterligere vasket med 400 volumdeler vann. Filtratet ble slått sammen med vaskeoppløsningene, hvoretter det hele ble tilsatt 1000 deler etylacetat. Blandingen ble rørt i 30 minutter og så hensatt i 2 timer. Den organiske fase ble vasket med 200 volumdeler vann og konsentrert til 20 volumdeler under redusert trykk. Konsentratet ble vasket 2 ganger med 5 volumdeler 2% vandig oppløsning av natriumbikarbonat og deretter med 5 volumdeler vann fulgt av ytterligere konsentrasjon inntil mengden var ca. 2 volumdeler. Dette konsentrat ble fortynnet med 6 volumdeler benzen og absorbert på en kolonne bestående av 2 vektdeler silisiumdioksydgel som var på forhånd suspendert i benzen. Deretter ble en blanding av benzen og etylacetat (1:1) ført gjennom kolonnen, hvoretter C-14-monoacetatet først kommer ut av kolonnen fulgt av det rene antibiotikum C. Monoacetatfraksjonen ble konsentrert under redusert trykk, hvorved man fikk staver av C-14-monoacetatet som ved en omkrystallisasjon fra etylacetat utgjorde 0,15 vektdeler rene krystaller.

Eksempel 2.

3000 volumdeler av filtratet fremstilt som angitt i referanse-eksemplet ble tilsatt 600 volumdeler metylacetat, og blandingen ble inkubert i 4 timer.

Den ble deretter hensatt i et par timer, og den vandige fase ble ekstrahert med 1000 volumdeler metylisobutylketon. De samlede organiske faser ble vasket 2 ganger med 400 volumdeler av en 2% vandig natriumbikarbonatoppløsning og deretter med vann fulgt av konsentrasjon under redusert trykk.

127918

5 volumdeler av konsentratet ble tilsatt 20 volumdeler kloroform, og blandingen behandlet med ca. 20 vektdeler silisiumdioksydgel på samme måte som angitt i eksempel 1. Den effektive fraksjonen ble konsentrert, hvorved man oppnådde 0,05 vektdeler av C-14-monoacetatet.

Eksempel 3.

Fremgangsmåten var som i eksempel 2 bortsett fra at propylacetat ble anvendt i stedet for metylacetat, hvorved man fikk fremstilt 0,15 vektdeler av C-14-monoacetatet.

Eksempel 4.

Fremgangsmåten var som i eksempel 2, bortsett fra at etylformiat ble anvendt i stedet for metylacetat, og etylacetat-dietyleter ble brukt som utkrystallisasjonsoppløsning, hvorved man fikk fremstilt 0,23 vektdeler av C-14-monoformiatet.

Eksempel 5.

Fremgangsmåten var som i eksempel 4, bortsett fra at etylpropionat ble anvendt i stedet for etylformiat, hvorved man fikk fremstilt 0,23 vektdeler av C-14-monopropionatet.

Eksempel 6.

Streptomyces tolypophorus (IFO 12554) ble brukt for å inokulere et medium (pH 7,0) sammensatt av 2,0% glukose, 3,0% løselig stivelse, 1,0% maiskonsentrat, 1,0% rått soyabønneemel, 0,5% pepton, 0,3% natriumklorid og 0,5% utfelt kalsiumkarbonat.

Inkubering ble utført ved 28°C i 42 timer, og det resulterende medium ble filtrert sammen med 3% filterhjelpemiddel. Etter å ha fjernet tolypomycin (et antibiotikum fremstilt av *St. tolypophorus*) ved ekstraksjon, ble 100 volumdeler av filtratet tilsatt en oppløsning av 2 vektdeler C i 10 volumdeler metanol foruten 100 volumdeler monoacetin, og blandingen ble omsatt ved 37°C i 3 timer. Etter at reaksjonen var ferdig ble blandingen øyeblikkelig ekstrahert med etylacetat, og ekstraktet renses på samme måte som angitt i eksempel 1. Den ovennevnte fremgangsmåte gir 0,1 vektdel av C-14-monoacetatet.

Eksempel 7.

1000 fosfatbuffer, pH 7,0, 0,1M ble tilsatt en vektdel av et råenzympreparat fremstilt fra en kultur av *Streptomyces rochei* var. *volubilis* (IFO 12507). Oppløsningen ble så tilsatt 2 vektdeler av C oppløst i 1000 volumdeler etylacetat, og blandingen ble rørt ved 37°C i 3 timer. Reaksjonsblandingen ble så skilt på samme måte som beskrevet i eksempel 1 i 2 faser, hvorefter etylacetatfasen ble

127918

renset, noe som ga ca. 1.8 volumdeler av C-14-monoacetat.

Eksempel 8

1000 volumdeler trisbuffer (pH 7.0, 0.1 M) ble tilsatt 10 vektdeler av et råesterasepreparat fremstilt fra en kultur av *Aspergillus sojae* (IFO 4200), hvoretter oppløsningen ble tilsatt 2 vektdeler av C i 10 volumdeler metanol og 100 volumdeler monoacetin. Blandingen ble omsatt ved 37°C i 3 timer, og deretter ekstrahert med etylacetat. Ekstraktet ble renset som angitt i eksempel 1, hvorved man fikk fremstilt 0.055 vektdeler av C-14-monoacetatet.

Eksempel 9

1000 volumdeler trisbuffer (pH 7.0, 0.1 M) ble tilsatt 10 vektdeler av et råcellulasepreparat fremstilt fra en kultur av *Trametes sanguinea* (IFO 7045), og oppløsningen ble tilsatt 2 vektdeler av C i 10 vektdeler metanol foruten 130 volumdeler monoacetin. Blandingen ble omsatt ved 37°C i 3 timer og deretter ekstrahert med etylacetat. Ekstraktet ble renset som angitt i eksempel 1, hvorved man fikk fremstilt 0.075 vektdeler av C-14-monoacetat.

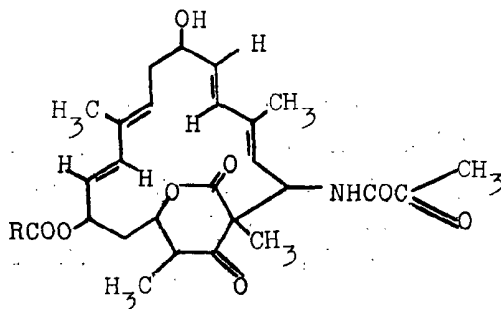
Eksempel 10

Streptomyces hygroscopicus (IFO 12703) ble inokulert i et medium (pH 7.0) bestående av 3.0 % glukose, 2.2 % rått soyabønneemel, 0.3 % pepton og 0.4 % utfelt kalsiumkarbonat.

Inkuberingen ble foretatt ved 28°C i 42 timer og det resulterende medium ble filtrert under anvendelse av 3 % filterhjelpemiddel. En oppløsning av 2 vektdeler C i 10 volumdeler metanol og 100 volumdeler monoacetin, ble tilsatt til 1000 volumdeler av filtratet og den resulterende blanding ble omsatt ved 37°C i 3 timer. Etter at reaksjonen var ferdig ble blandingen øyeblikkelig ekstrahert med etylacetat og ekstraktet renset på samme måte som angitt i eksempel 1. Dette ga 0.08 vektdeler av C-14-monoacetat.

P a t e n t k r a v

Fremgangsmåte til fremstilling av 14-monoacylderivater av antibiotikum T-2636C med formelen:



127918

hvor R er hydrogen eller laverealkyl, k a r a k t e r i s e r t
v e d at man i et vandig medium omsetter antibiotikum T-2636C med en
ester av en organisk syre med en acylgruppe med formelen R-CO- hvor
R har den ovenfor angitte betydning, i nærvær av en kultur av en
mikroorganisme valgt fra artene *Streptomyces rochei* var. *volubilis*,
Streptomyces tolypophorus, *Streptomyces hygroscopicus*, *Aspergillus*
sojae og *Trametes sanguinea*, eller i nærvær av en enzymholdig frak-
sjon erholdt fra disse kulturer, ved en temperatur på 20° - 40°C og
en pH på mellom 4 og 9, hvorefter man utvinner det resulterende
T-2636C-14-monoacylderivat.

Anførte publikasjoner: -