

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 803872 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **803872**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12P

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **12.12.1980**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **12.12.1980**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **14.06.1981**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

13.12.1979	US	103,017	13.12.1979	US	103,121
13.12.1979	US	103,268	13.12.1979	US	103,016
13.12.1979	US	103,313	25.08.1980	US	181,036
25.08.1980	US	181,029	25.08.1980	US	181,437
25.08.1980	US	181,443	25.08.1980	US	181,449

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Eli Lilly and Company, 307 East McCarty Street, Indianapolis, Ind. 46206, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Abbott, Bernard John, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Fukuda, David Shuichi, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Syklinen peptidi.

Cyklisk peptid.

Syklinen peptidi

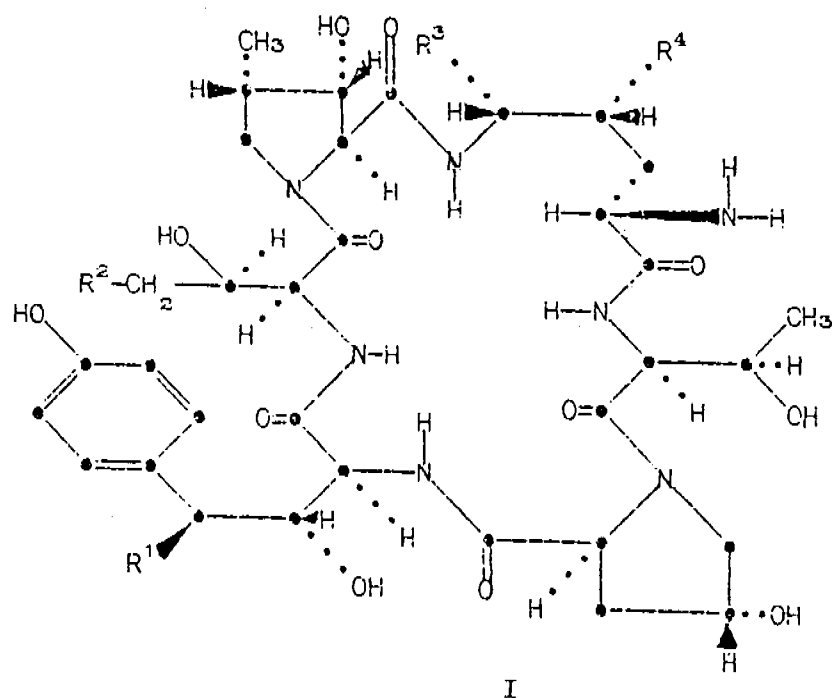
Keksinnön kohteena on syklisiä peptidi-renkaita, joilla on yleinen kaava:

5

10

15

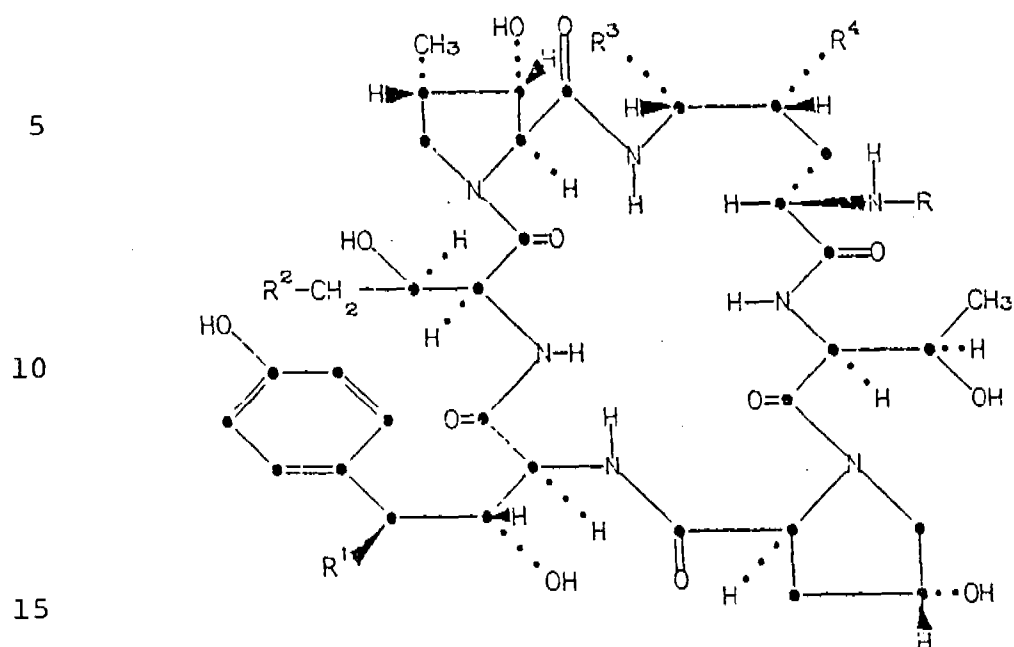
20



25

sekä niiden happoadditiosuoloja. Nämä renkaat ja niiden suolat ovat käyttökelpoisia välituotteina valmistettaessa puolisynteettisiä sienenestoaineita.

Näitä renkaita valmistetaan deasyloimalla syklisen peptidi-antibiootti, jolla on yleinen kaava:



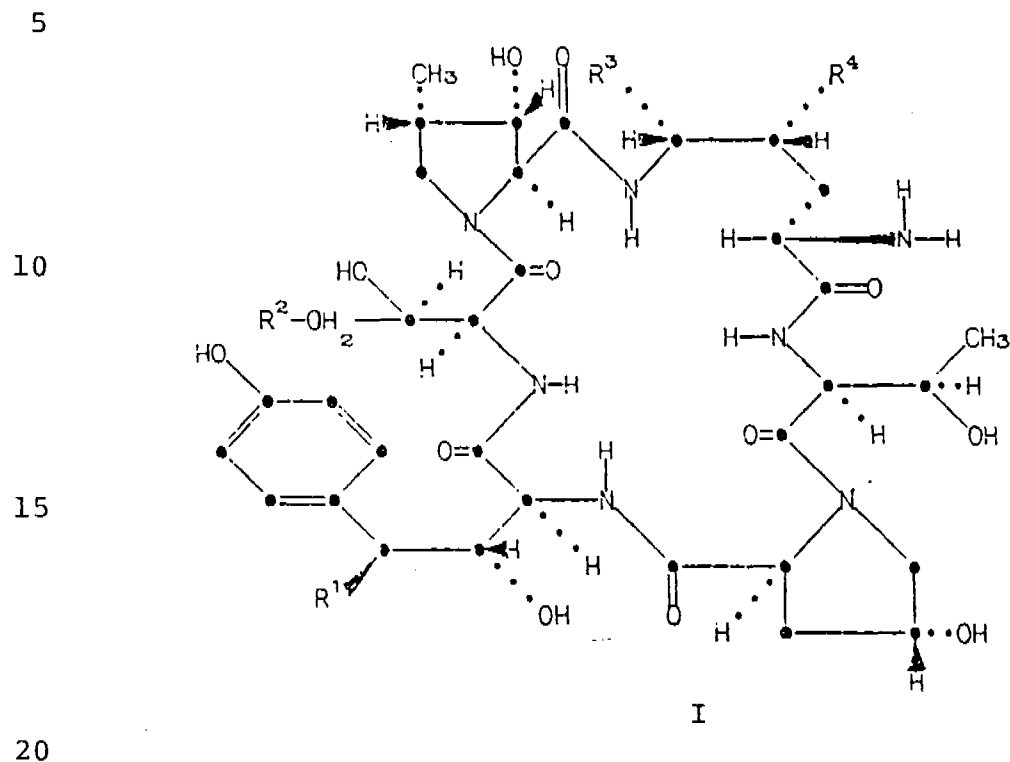
jossa R on tyydytetty tai tyydyttämätön rasvahapposivu-
 20 ketju ja R¹, R², R³ ja R⁴ ovat seuraavassa määriteltäviä
 substituentteja.

On keksitty menetelmä rasvahapposivuketjun, R, pois-
 tamiseksi entsyymaattisesti antamaan syklinen peptidi-
 rengas. Menetelmä käsittää antibiootin altistamisen vesi-
 25 pitoisessa väliaineessa entsyymille, jota tuottaa
 Actinoplanaceae-suvun eräs mikro-organismi, kunnes pää-
 asiallinen deasyloituminen on tapahtunut.

Tämän keksinnön eräs edullinen menetelmä käsittää
 entsyymien, joka on tuotettu mikro-organismilla
 30 Actinoplanes utahensis NRRL 12052, käytön rasvahapposivu-
 ketjun lohkaistavaksi. Deasylointi suoritetaan tavallisesti
 lisäämällä sopiva antibiootti A. utahensiksen viljelyyn
 ja inkuboimalla viljelyä kunnes deasyloituminen on täydell-
 linen. Täten saadut renkaat erotetaan käymisliemestä alalla
 35 tunnetuin menetelmin. Nämä renkaat ovat käyttökelpoisia
 sikäli, että ne voidaan asyloida uudelleen antamaan uusia

antibioottisia aineita.

Erityisesti keksintö antaa syklisen peptidi-renkaan, jolla on kaava:



jossa R^1 on H tai OH ja; kun R^1 on H, on R^2 H ja R^3 ja R^4 ovat kumpikin H tai kumpikin OH, ja kun R^1 on OH, on R^2 H, R^3 on OH tai C_1-C_6 alkyylioksi ja R^4 on OH, tai R^2 on

25

O
||
-C-NH₂

ja R^3 ja R^4 ovat kumpikin OH, sekä sen happo-additiosuoloja.

30 Tämän keksinnön renkaiden eräässä suoritusmuodossa R^1 , R^3 ja R^4 ovat OH ja R^2 on H. Tämän suoritusmuodon rengas tunnetaan A-309123A-renkaana. A-30912A-rengas valmistetaan deasyloimalla syklinen peptidi-antibiootti, jolla on kaava II, jossa R on linoleoyyli, stearoyyli tai palmitoyyli ja R^1 , R^2 , R^3 ja R^4 ovat samat kuin A-30912A-renkaassa.

35

Kun R kaavan II syklisessä peptidi-antibiootissa on linoleoyyli, tunnetaan antibiootti A-30912 tekijä A:na, A:na, kun R on stearoyyli, tunnetaan antibiootti tetrahydro-A-30912 tekijä A:na ja kun R on palmitoyyli

5 tunnetaan antibiootti akuleasiini A:na.

A-30912 tekijä A

A-30912 tekijä A on A-30912-seoksen, joka sisältää myös tekijät B, C, D, E, F ja G, tekijä. A-30912-seos ja yksittäiset tekijät A:sta G:hen ovat esittäneet Marvin

10 M. Hoehn ja Karl H. Michel U.S. patentissa 4 024 245. A-30912-tekijä A on sama kuin antibiootti A-22082, jota ovat kuvanneet Calvin E. Higgins ja Karl H. Michel U.S. patentissa 4 024 246.

U.S. patenttien 4 024 245 ja 4 024 246 julkaisemisen

15 jälkeen on havaittu, että A-30912 tekijä A on sama kuin antibiootti ekinokandiini B [ks. F. Benz et al., Helv. Chim. Acta 57, 2459-2477 (1974) ja sveitsiläinen patentti 568 386]. Antibiootti SL 7810/F on myös tunnistettu ekino-

20 kandiiniksi B [C. Keller-Juslen, et al., Tetrahedron Letters 1976 (46), 4147-4150 ja belgialainen patentti 834 289].

Keller-Juslen, et al., ehdottivat kaavan II rakennetta, jossa R=linoleoyyli, R^1 , R^3 ja R^4 ovat OH ja R^2 on H antibiootille A-30912 tekijä A.

25 Tetrahydro-A-30912 tekijä A:lla (tetrahydro-SL 7810/F; tetrahydroekinokandiini B), jota on kuvattu belgialaisessa patentissa 834 289 ja jota on kuvannut F. Benz et al., Helv. Chim. Acta 57, 2459-2477 (1974), on kaavan II rakenne, jossa R on stearoyyli, R^1 , R^3 ja R^4

30 ovat OH ja R^2 on H. Mukavuussyistä tätä ainetta tässä nimitetään tetrahydro-A-30912A:ksi.

Akuleasiini A

Akuleasiini A on akuleasiiniseoksen, joka koostuu yhdestä pääkomponentista (akuleasiini A) ja kuudesta al-

35 komponentista (akuleasiinit B, C, D, E, F ja G), komponentti. Näitä akuleasiini-komponentteja on kuvannut K. Mizuno,

et al., U.S. patentissa 3 978 210. Kuten belgialaisessa patentissa 859 067 on esitetty, on akuleasiini A:lla todennäköisesti sama syklinen peptidi-rakenne kuin tetrahydro-A-30912A:lla, paitsi että stearoyyli-sivuketju on korvattu palmitoyylillä.

A-30912A-rengas

Tämän suoritusmuodon uudella syklisellä peptidi-renkaalla, ts. A-30912 tekijä A:n (ekinokandiini B:n, SL 7810/F:n), tetrahydro-A-30912 tekijä A:n ja akuleasiini A:n renkaalla on sama kaavan I rakenne, jossa R^1 , R^3 ja R^4 ovat OH ja R^2 on H.

Tämä rengas (A-30912A-rengas) on valkoinen amorfinen aine, joka on liukoinen liuottimiin, kuten veteen, dime-tyyliformamidiin, dimetyylisulfoksidiin ja metanoliin, ja liukenematon sellaisiin liuottimiin kuin kloroformi, tolueeni ja dietyylieetteri.

A-30912A-renkaalla on empiirinen kaava $C_{34}H_{51}N_7O_{15}$ ja molekyylipaino 797,83.

A-30912A-renkaan infrapuna-absorptiokirjo KBr-levyllä on esitetty kuvassa I. Havaitaan seuraavat absorptiomaksimit: 3340 leveä (OH, H-sidottu), 2970, 2930 ja 2890 (CH väli, alifaattinen CH_3 -, CH_2 - ja CH-ryhmissä), 1660 ja 1625 (useita karbonyylejä C=O), 1510-1550, 1430-1450 (CH liikkuva), 1310-1340, 1230-1260, 1080, 835, 650 leveä ja 550 leveä cm^{-1} .

A-30912A-renkaan potentiometrinen titraus 66-%:sessa vesipitoisessa dimetyyliformamidissa osoittaa titrattavan ryhmän läsnäolon, jonka pK_a -arvo on n. 7,35 (alku-pH 7,32).

A-30912A-rengas voidaan erottaa suurteho-nestekromatografisesti (HPLC). A-30912A-renkaan likimääräinen pidätysaika (k') on 11,52 minuuttia, kun se erotetaan HPLC:lla käyttäen seuraavia olosuhteita:

pylväs: 4 x 300 mm
 täyte: piihappogeeli/C₁₈
 liuotin: ammoniumasetatti: asetonitriili:
 vesi (1:2:97)
 virtausnopeus: 3 ml/min.
 paine: 2500 psi
 ilmaisin: aaltopituudeltaan vaihdeltava
 UV 230 nm:ssa
 herkkyys: 0-0,4 A.U.F.S.

10 A-30912A-renkaan valmistus
Substraatin valmistus

Tämän keksinnön A-30912A-rengas valmistetaan
 A-30912 tekijä A:sta, tetrahydro-A-30912 tekijä A:sta
 tai akuleasiini A:sta. Näitä substraatteja voidaan syöttää
 15 puhdistettuina aineina, mutta ei ole olennaista, että ne
 ovat puhdistettuja. Siten esimerkiksi A-30912-seosta, jos-
 sa A-30912 tekijä A on pääkomponentti, voidaan käyttää
 substraattina A-30912 A-renkaan valmistamiseksi.

A-30912 tekijä A

20 A-30912 tekijä A:ta voidaan tuottaa upoksissa aero-
 bisesti fermentoimalla: 1) Aspergillus rugulosus
 NRRL 8113-kantaa; 2) Aspergillus nidulans NRRL 8112-kan-
 taa; 3) Aspergillus nidulans-var. echinulatus A-32204,
 NRRL 3860-kantaa; 4) Aspergillus rugulosus NRRL 8039-kan-
 25 taa; tai 5) Aspergillus nidulans var. roseus, NRRL
 11440-kantaa.

Kun A. nidulans var. roseus NRRL 11440-kantaa
 käytetään tuottamaan A-30912 tekijä A:ta, saadaan tekijöi-
 den seos, jota mukavuussyistä nimitetään A-42355 anti-
 30 biootti-seokseksi. A-30912 tekijä A on A-42355 antibiootti-
 seoksen päätekijä. A-30912 tekijät B, D ja H ovat A-42355-
 seoksen vähäisiä tekijäitä.

Tetrahydro-A-30912A

Tetrahydro-A-30912A valmistetaan A-30912 tekijä
 35 A:sta standardi-hydrausmenetelmin, jatkaen pelkistämistä

kunnes linoleoyyli-sivuketjun kummatkin kaksoissidokset ovat pelkistyneet.

Akuleasiini A

Akuleasiini A:ta valmistetaan käyttämällä

- 5 Aspergillus aculeatus NRRL 8075-kantaa, kuten on kuvattu U.S. patentissa 3 978 210, johon tässä viitataan.

Tämän keksinnön renkaiden eräässä muussa suoritusmuodossa R^1 ja R^2 ovat kumpikin H ja R^3 sekä R^4 ovat kumpikin OH. Tämän suoritusmuodon rengas tunnetaan A-30912B-
10 renkaana. A-30912B-rengas valmistetaan deasyloimalla syklinen peptidi-antibiootti, jolla on kaava II, jossa R on linoleoyyli tai stearoyyli ja R^1 , R^2 , R^3 ja R^4 ovat samoja kuin A-30912B-renkaassa.

- Kun R kaavan II syklisessä peptidi-antibiootissa
15 on linoleoyyli, tunnetaan antibiootti A-30912 tekijä B:nä, ja kun R on stearoyyli tunnetaan antibiootti tetrahydro-A-30912 tekijä B:nä.

A-30912 tekijä B

- A-30912 tekijä B on A-30912-seoksen, joka sisältää
20 myös tekijät A, C, D, E, F ja G, tekijä. A-30912-seosta ovat kuvanneet Marvin M. Hoehn ja Karl H. Michel U.S. patentissa 4 024 245.

- On havaittu, että A-30912 tekijä B on sama kuin antibioottiekinokandiini C /ks. R. Traber et al., Helv.
25 Chim. Acta 62, 1252-1267 (1979)/ ja sama kuin antibiootti SL 7810/F-II (belgialainen patentti 834 289).

- Traber, et al., ehdottivat kaavan II rakennetta, jossa R^1 ja R^2 kumpikin ovat H, R^3 sekä R^4 ovat kumpikin OH ja R on linoleoyyli antibiootille ekinokandiini C.
30 Antibiootille tetrahydro-ekinokandiini C Traber, et al., ehdottivat kaavan II rakennetta, jossa R^1 ja R^2 ovat kumpikin H, R^3 sekä R^4 ovat kumpikin OH ja R on stearoyyli.

Tetrahydro-A-30912 tekijä B

- Tetrahydro-A-30912 tekijä B:llä (tetrahydro-SL
35 7810/F-II; tetrahydroekinokandiini C), jota on kuvattu

belgialaisessa patentissa 834 289 ja jota ovat kuvanneet R. Traber et al., Helv. Chim. Acta 62, 1252-1267 (1979), on kaavan II rakenne, jossa R^1 ja R^2 ovat kumpikin H, R^3 sekä R^4 ovat kumpikin OH ja R on stearoyyli.

- 5 Mukavuussyistä tätä ainetta nimitetään tässä tetrahydro-A-30912B:ksi.

A-30912B-rengas

- Tämän suoritusmuodon uudella syklisellä peptidirenkaalla, ts. A-30912 tekijä B:n (ekinokandiini C,
10 SL 7810/F-II) renkaalla ja tetrahydro-A-30912B:n renkaalla on kaavassa I esitetty rakenne, jossa R^1 ja R^2 ovat kumpikin H ja R^3 sekä R^4 ovat kumpikin OH.

A-30912B-renkaalla on empiirinen kaava $C_{34}H_{51}N_7O_{14}$ ja molekyylipaino 781,83.

- 15 A-30912B-renkaan valmistus

Substraatin valmistus

- A-30912B-rengas voidaan valmistaa A-30912 tekijä B:stä tai tetrahydro-A30912B:stä. Koska A-30912 tekijä B ei ole antibiootti-seosten, joissa sitä tuotetaan,
20 pääkomponentti, se tulisi puhdistaa määrään, jossa muut myötätuotetut tekijät poistuvat, ennen sen käyttöä substraattina.

A-30912 tekijä B

- A-30912 tekijä B:tä voidaan tuottaa upoksissa aerobisesti fermentoimalla: 1) Aspergillus rugulosus NRRL
25 8113-kantaa; 2) Aspergillus nidulans var. echinulatus A 32204, NRRL 3860-kantaa; 3) Aspergillus rugulosus NRRL 8039-kantaa; tai 4) Aspergillus nidulans var. roseus, NRRL 11440-kantaa.

- 30 Kun A-30912 tekijä B:n tuottamiseen käytetään A. nudulans var. roseus NRRL 11440-kantaa, saadaan tekijöiden seos, jota mukavuussyistä nimitetään A-42355 antibiootti-seokseksi. A-30912 tekijä A on A-42355 antibiootti-seoksen päätekijä. A-30912 tekijät B, D ja H ovat A-42355-
35 seoksen vähäisiä tekijöitä.

Tetrahydro-A-30912B

Tetrahydro-A-30912B valmistetaan A-30912 tekijä B:stä standardi-hydrausmenetelmin jatkaen pelkistämistä kunnes linoleoyyli-sivuketjun kummatkin kaksoissidokset
 5 ovat pelkistyneet.

Tämän keksinnön renkaiden eräässä muussa suoritusmuodossa R^1 , R^2 , R^3 ja R^4 ovat kukin H. Tämän suoritusmuodon rengas tunnetaan A-30912D-renkaana. A-30912D-rengas valmistetaan deasyloimalla syklinen peptidi-antibiootti,
 10 jolla on kaava II, jos R on linoleoyyli tai stearoyyli ja R^1 , R^2 , R^3 ja R^4 ovat samoja kuin A-30912D-renkaassa.

Kun R kaavan II syklisessä peptidi-antibiootissa on linoleoyyli, tunnetaan antibiootti A-30912 tekijä D:nä, ja kun R on stearoyyli, tunnetaan antibiootti tetra-
 15 hydro-A-30912 tekijä D:nä.

A-30912 tekijä D

A-30912 tekijä D on A-30912-seoksen, joka sisältää myös tekijät A, B, C, E, F ja G, tekijä. A-30912-seosta ovat kuvanneet Marvin M. Hoehn ja Karl H. Michel U.S.
 20 patentissa 4 024 245.

On havaittu, että A-30912 tekijä D on sama kuin antibiootti ekinokandiini D [ks. R. Traber et al., Helv. Chim. Acta 62, 1252-1267 (1979)] ja sama kuin antibiootti SL 7810/F-II (belgialainen patentti 834 289).

Traber, et al., ehdottivat kaavan II rakennetta, jossa R^1 , R^2 , R^3 ja R^4 ovat kukin H ja R on linoleoyyli, antibiootille ekinokandiini D. Antibiootille tetrahydroekinokandiini D Traber, et al., ehdottivat kaavan II rakennetta, jossa R^1 , R^2 , R^3 ja R^4 ovat kukin H ja R on stea-
 30 royyli.

Mukavuussyistä nimitetään tetrahydro-A-30912 tekijä D:tä (tetrahydro-SL 7810/F-III; tetrahydroekinokandiini D) tässä tetrahydro-A-30912D:ksi.

A-30912D-rengas

35 Tämän suoritusmuodon uudella syklisellä peptidi-

renkaalla, ts. A-30912 tekijä D:n (ekinokandiini D, SL 7810/F-III) ja tetrahydro-A-30912D:n renkaalla on kaavassa I esitetty rakenne, jossa R^1 , R^2 , R^3 ja R^4 ovat kukin H.

5 A-30912D-renkaalla on empiirinen kaava

$C_{34}H_{51}N_7O_{12}$ ja molekyylipaino 749,83.

A-30912D-renkaan valmistus

Substraatin valmistus

10 A-30912D-rengas valmistetaan A-30912 tekijä D:stä tai tetrahydro-A-30912D:stä. Koska A-30912 tekijä D ei ole antibiootti-seosten, joissa sitä tuotetaan, pääkomponentti, se tulisi puhdistaa määrään asti, jolla muut myötätuotetut tekijät poistuvat, ennen sen käyttöä substraattina.

A-30912 tekijä D

15 A-30912 tekijä D:tä voidaan tuottaa upoksissa aerobisesti fermentoimalla: 1) *Aspergillus rugulosus* NRRL 8113-kantaa; 2) *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus* A 32204, NRRL 3860-kantaa; 3) *Aspergillus rugulosus* NRRL 8039-kantaa; tai 4) *Aspergillus nidulans* var. *roseus*,
20 NRRL 11440-kantaa.

Kun A. *nidulans* var. *roseus* NRRL 11440-kantaa käytetään tuottamaan A-30912 tekijä D:tä, saadaan tekijöiden seos, jota mukavuussyistä nimitetään A-42355 antibiootti-seokseksi. A-30912 tekijä A on A-42355 antibiootti-seoksen
25 päätekijä. A-30912 tekijät B, D ja H ovat A-42355-seoksen vähäisiä tekijöitä.

Tetrahydro-A-30912D

Tetrahydro-A-30912D valmistetaan A-30912 tekijä D:stä standardi-hydrausmenetelmin, jatkaen pelkistämistä
30 kunnes linoleoyyli-sivuketjun kummatkin kaksoissidokset ovat pelkistyneet.

Tämän keksinnön renkaiden vielä eräässä suoritusmuodossa ovat R^1 ja R^4 kumpikin OH, R^2 on H ja R^3 on C_1-C_6 alkyylioksi. Tämän suoritusmuodon renkaat tunnetaan
35 A-30912H-tyyppisinä renkaina. A-30912H-tyyppiset renkaat valmistetaan deasyloimalla syklinen peptidi-antibiootti,

jolla on kaava II, jossa R on lineleoyyli tai stearoyyli ja R^1 , R^2 , R^3 ja R^4 ovat samat kuin A-30912H-tyyppisissä renkaissa.

5 Kun R kaavan II syklisessä peptidi-antibiootissa on linoleoyyli ja R^3 on metoksi, tunnetaan antibiootti A-30912 tekijä H:na, ja kun R on stearoyyli ja R^3 on metoksi, tunnetaan antibiootti tetrahydro-A-30912 tekijä H:na.

10 Kun R kaavan II syklisessä peptidi-antibiootissa on linoleoyyli ja R^3 on C_2-C_6 alkyylioksi, tunnetaan antibiootit A-30912 tekijä H:n alemmina alkyylioksi-homologeina, ja kun R on stearoyyli ja R^3 on C_2-C_6 alkyylioksi, tunnetaan antibiootit tetrahydro-A-30912 tekijä H:n alemmina alkyylioksi-homologeina.

15 A-30912 tekijä H

A-30912 tekijä H on A-30912-seoksen, joka myös sisältää tekijät A, C, D, E, F ja G, tekijä. A-30912-seosta ovat kuvanneet Marvin M. Hoehn ja Karl H. Michel U.S. patentissa 4 024 245. A-30912 tekijä H oli myöhemmin löydetty A-30912-tekijä. A-30912 tekijä H:ta on selostettu Karl H. Michel'in käsittelyn alaisessa patenttihakemuksessa, jonka otsikkona on ANTIBIOTIC A-30912 FACTOR H, patenttihakemus nro 117 739, jätetty 1.2.1980, ja se on osittainen jatko patenttihakemukselle nro 46 875, jätetty 25 8.6.1979 (josta nyt on luovuttu).

A-30912 tekijä H:n homologit

A-30912 tekijä H:n rakenteen keksimisen jälkeen tuli selväksi tosiasia, että A-30912 tekijä H:n alemmat alkyylioksi-homologit olisivat käyttökelpoisia tuotteita. Ennen tätä ajankohtaa ei valmistetuilla alkyylioksi-johdannaisilla todettu olevan käyttökelpoista tarkoitusta ja niitä valmistettiin ainoastaan työkaluiksi rakenteen määrittäystä varten. A-30912 tekijä H:n alempia C_2-C_6 alkyylioksi-homologeja valmistetaan A-30912 tekijä A:sta.

35 A-30912 tekijä A:ta valmistetaan fermentoimalla:

- 1) *Aspergillus rugulosus* NRRL 8113-kantaa; 2) *Aspergillus nidulans* NRRL 8112-kantaa; 3) *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus* A-32204, NRRL 3860-kantaa; 4) *Aspergillus rugulosus* NRRL 8039-kantaa kuten on kuvattu belgialaisessa patentissa 834 289; tai 5) *Aspergillus nidulans* var. *roseus*, NRRL 11440-kantaa.

Koska jokainen A-30912H-rengas sisältää amino-osan, se voi olla suolojen muodossa. Tällaiset suolat ovat myös käyttökelpoisia välituotteina ja puhdistustarkoituksia varten. A-30912H-renkaiden farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat ovat erityisen käyttökelpoisia, koska lopputuotteiden puhdistaminen vähenee. "Farmaseuttisesti hyväksyttävät" suolat tarkoittavat suoloja, joissa tuotteen myrkyllisyys kokonaisuutena lämminverisille eläimille ei lisäänty.

A-30912H-renkaiden happoadditiosuoloja voidaan muodostaa standardireaktiomenetelmin epäorgaanisen tai orgaanisen hapon kanssa. Edustavia epäorgaanisia ja orgaanisia happoja ovat kloorivety-, bromivety-, jodivety-, rikki-, fosfori-, etikka-, bentsoe-, sulfamidi-, viini-, sitruuna-, maleiini-, sukkiini-, askorbiini-, glykoli-, maito-, fumaari-, palmitiini-, koliini-, pamoiini-, lima-, D-glutamiini-, d-kamferi-, glutaari-, ftaali-, lauriini-, steariini-, salisyyl-, metaanisulfoni-, bentseenisulfoni-, sorbiini-, pikriini-, kaneli- ja muut sopivat hapot.

A-30912H-renkaiden valmistus

Substraatin valmistus

A-30912H-rengas, ts. kaavan I yhdiste, jossa R^1 ja R^4 kumpikin ovat OH, R^2 on H ja R^3 on metoksi, voidaan valmistaa A-30912 tekijä H:sta tai tetrahydro-A-30912H:sta. Koska A-30912 tekijä H ei ole antibiootti-seosten, joissa sitä tuotetaan, pääkomponentti, se tulisi puhdistaa määrään, jossa muut myötätuotetut antibiootti-tekijät poistuvat, ennen sen käyttämistä substraattina.

Substraatit kaavan I, jossa R^1 ja R^4 kumpikin ovat

OH, R^2 on H ja R^3 on C_2-C_6 alkyylioksi, A-30912H-renkaiden (A-30912H-homologien) valmistamiseksi valmistetaan saattamalla A-30912 tekijä A tai tetrahydro-A-30912A reagoimaan sopivan alkoholin kanssa vastaavan C_2-C_6 alkyylioksi-johdannaisen valmistamiseksi. Koska A-30912 tekijä A on antibiootti-seosten, joissa sitä tuotetaan, pääkomponentti, tämä menetelmä on myös edullinen tapa A-30912 tekijä H:n ja tetrahydro-A-30912H:n valmistamiseksi.

A-30912 tekijä H

10 A-30912 tekijä H:ta voidaan tuottaa upoksissa aerobisesti fermentoimalla *Aspergillus rugulosus* NRRL 8113-kantaa tai *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440-kantaa.

Kun A. *nidulans* var. *roseus* NRRL 11440-kantaa
15 käytetään A-30912 tekijä H:n tuottamiseksi, saadaan tekijöiden seos, jota mukavuussyistä nimitetään A-42355 antibiootti-seokseksi. A-30912 tekijä A on A-42355 antibiootti-seoksen päätekijä. A-30912 tekijät B, D ja H ovat A-42355-seoksen vähäisiä tekijöitä.

20 A-30912H-homologit

A-30912H-homologit valmistetaan saattamalla A-30912 tekijä A tai tetrahydro-A-30912A reagoimaan sopivan vastaavan alkoholin kanssa muodostamaan haluttu alkyylioksi-johdannainen, jolla on kaavan II rakenne, jossa R^1 ja R^4
25 ovat kumpikin OH, R^2 on H ja R^3 on C_2-C_6 -alkyylioksi. Tämä on edullinen menetelmä A-30912 tekijä H:n ja tetrahydro-A-30912H:n valmistamiseksi. Kaavan II, jossa R on stearoyyli ja R^3 on C_2-C_6 alkyylioksi, A-30912H homologeja voidaan valmistaa a) valmistamalla tetrahydro-A-30912A ja saattamalla se reagoimaan sopivan alkoholin kanssa alkyylioksi-johdannaisen muodostamiseksi tai b) saattamalla A-30912 tekijä A reagoimaan sopivan alkoholin kanssa alkyylioksi-johdannaisen muodostamiseksi ja pelkistämällä sitten linoleoyyli-sivuketjun kaksoissidokset.

35 Tetrahydro-johdannaiset

Tetrahydro-A-30912A, tetrahydro-A-30912H ja kaavan

II, jossa R^3 on C_2-C_6 alkyylioksi ja R on stearoyyli, yhdisteet valmistetaan A-30912 tekijöistä A ja H ja kaavan II, jossa R^3 on C_2-C_6 alkyylioksi ja R on linoleoyyli, yhdisteet standardi-hydrausmenetelmin, jatkaen pelkistämistä kunnes linoleoyyli-sivuketjun kumpikin kaksoissidos on pelkistynyt.

Tämän keksinnön renkaiden vielä eräässä suoritusmuodossa R^1 , R^3 ja R^4 ovat OH ja R^2 on karboksiamidi.

Tämän suoritusmuodon rengas tunnetaan S 31794/F-1-renkaana.

10 S 31794/F-1-rengas valmistetaan deasyloimalla syklinen peptidi-antibiootti, jolla on kaava II, jossa R on myristoyyli ja R^1 , R^2 , R^3 ja R^4 ovat samat kuin S 31794/F-1-renkaassa.

S 31794/F-1

15 Tämän keksinnön S 31794/F-1-rengas saadaan deasyloimalla syklinen peptidi-antibiootti S 31794/F-1.

Antibiootti S 31794/F-1, joka on esitetty saksalaisessa julkiseksitulojulkaisussa 2 628 965 ja U.S. patentissa 4 173 629, on sienenestoyhdiste, jota tuottaa

20 *Acrophialophora limonisporea* nov. spec. Dreyfuss et Muller NRRL 8095. S 31794/F-1:llä on seuraavat tunnusarvot: sp. 178-180°C (hajoaa) (amorfinen) tai 181-183°C (hajcaa) (kiteinen); $[\alpha]_D^{20} - 24^\circ$ (c 0,5, CH_3OH) tai $+37^\circ$ (c 0,5, metanoli (kiteinen)); UV absorptio-maksimit metanolissa

25 194 nm:ssä ($E_{1cm}^{1\%} = 807$), 225 nm:ssä (olake) ($E_{1cm}^{1\%} = 132$), 276 nm:ssä ($E_{1cm}^{1\%} = 12,8$) 284 nm:ssä (olake) ($E_{1cm}^{1\%} = 10,5$);

^{13}C -NMR-kirjo deuterometanolissa (190 mg 1,5 ml:ssa deuterometanolia, tetrametyylisilaani sisäisenä standardina) seura-

30 raavin tunnusarvoin (kiteinen):

	<u>PPM</u>	<u>PPM</u>	<u>PPM</u>
	176,2	75,5	51,2
	175,0	74,0	39,7
	173,7	71,0	38,8
5	172,6	70,5	36,6
	172,0	69,7	34,8
	171,8	68,0	32,8
	171,7	62,2	30,6
	168,6	58,3	26,7
10	157,7	57,0	23,5
	132,5	56,2	19,7
	129,0	55,4	14,3
	115,9	52,9	11,1
	76,6		

15

seuraava likimääräinen alkuaineanalyysi (kiteisen aineen 2-tuntisen kuivaamisen jälkeen suurtyhjössä 100°C:ssa):
 55,5-56,5 % hiiltä, 7,5-7,7 % vetyä, 10,5-10,8 % typpeä ja 25,5-26,0 % happea. S 31794/F-1 liukenee helposti meta-
 20 noliin, etanoliin, pyridiiniin, dimetyylisulfoksidiin ja on niukkaliukoinen veteen, kloroformiin, etyyliasetaattiin, dietyylieetteriin, bentseeniin ja heksaaniin; ja sillä on sienenestovaikutus, erityisesti Candida albicans'ia vastaan.

25 Antibiootilla S 31794/F-1 uskotaan olevan kaavan II rakenne, jossa R on yhtäkuin myristoyyli, R¹, R³ ja R⁴ ovat OH ja R² on karboksiamidi.

S 31794/F-1-rengas

Tämän keksinnön uudella syklisellä peptidi-renkaalla,
 30 ts. antibiootin S 31794/F-1 renkaalla, uskotaan olevan kaavassa I esitetty rakenne, jossa R¹, R³ ja R⁴ ovat OH ja R² on karboksiamidi.

S 31794/F-1-renkaalla on empiirinen kaava C₃₅H₅₂N₈O₁₆ ja molekyylipaino 840,87.

S 31794/F-1-renkaan valmistusSubtraatin valmistus

Tämän keksinnön S 31794/F-1-rengas valmistetaan antibiootista S 31794/F-1.

- 5 Antibioottia S 31794/F-1 valmistetaan upoksissa aerobisesti viljelemällä *Acrophialophora limonispora* NRRL 8095:tä. Tämä mikro-organismi on osa pysyvistä viljelykokoelmasta keskuksessa Northern Regional Research Center, U.S. Department of Agriculture, Agricultural
10 Research Culture Collection, North Central Region, Peoria, Illinois 61604, josta sitä on yleisön saatavissa merkityllä NRRL-numerolla.

- Koska jokainen rengas sisältää amino-osan, ne voivat esiintyä suolojen muodossa. Tällaiset suolat ovat myös
15 käyttökelpoisia välituotteina ja puhdistustarkoituksia varten. Näiden reunkaiden farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat ovat erityisen käyttökelpoisia, koska lopputuotteiden puhdistus vähenee. "Farmaseuttisesti hyväksyttävät" suolat tarkoittavat suoloja, joissa tuotteen myrkyllisyys
20 kokonaisuutena lämminverisille eläimille ei lisäännä.

- Näiden renkaiden happoadditiosuoloja voidaan muodostaa standardi-reaktiomenetelmin epäorgaanisten ja orgaanisten happojen kanssa. Edustavia epäorgaanisia ja orgaanisia happoja ovat kloorivety-, bromivety-, jodivety-, rikki-,
25 fosfori-, etikka-, bentsoe-, sulfamidi-, viini-, sitruuna-, maleiini-, sukkiini-, askorbiini-, glykoli-, maito-, fumaari-, palmitiini-, koliini-, pamoini-, lima-, D-glutamiini-, d-kamferi-, glutaari-, ftaali-, lauriini-, stea-
riini-, salisyyl-, metaanisulfoni-, bentseenisulfoni-,
30 sorbiini-, pikriini-, kaneli- ja muut sopivat hapot.

- Käänteis-faasi suurteho, pienpaineneste-kromatografia (HPLPLC), käyttäen piihappogeeli/C₁₈-adsorbenttiä, on edullinen menetelmä yksittäisten antibioottien lopullista puhdistamista varten. Tässä menetelmässä raaka anti-
35 biootti-seos, liuotettuna liuottimeen, pannaan pylvääseen,

joka on tasapainoitettu samalla liuottimella. Pylväs eluoidaan sitten liuottimella. Koottuja jakeita tarkkailaan Candida albicans-bioautografialla ja/tai UV:lla (perustuu suhteellisiin pidätysaikoihin). Jakeet, jotka
 5 sisältävät samoja yksittäisiä antibiootti-tekijöitä, yhdistetään. Joskus on tarpeen suorittaa kromatografinen lisäerotus yksittäisten tekijöiden saamiseksi puhdistetussa muodossa.

A-30912:n tai A-42355:n raaka antibiootti-seos
 10 saadaan, esimerkiksi, uuttamalla koko lientä tai huovastoa metanolilla ja kloroformilla. Metanoli : vesi: asetonitriili (7:2:1) on edullinen liuotinsysteemi näiden antibioottien kromatografiaa varten.

Raaka S 31794/F-1-antibiootti saadaan uuttamalla
 15 koko lientä etyyliasetaatti:isopropanolilla (4:1) ja kromatografoimalla uute.

Yksittäiset tekijät voidaan tunnistaa käyttämällä ohutlevykromatografiaa (TLC). Piihappogeeli on edullinen adsorbentti.

20 A-30912 tekijöiden A-G R_f -arvot, käyttäen runsaasti hiiltä sisältävää piihappogeeli-TLC:aa, bentseeni:metanoli (7:3)-liuotinsysteemiä ja Candida albicans-bioautografiaa, on annettu taulukossa I.

Taulukko I

25	A-30912 tekijä	R_f -arvo
	A	0,35
	B	0,45
	C	0,54
30	D	0,59
	E	0,27
	F	0,18
	G	0,13

A-30912 tekijöiden A, B, C, D ja H likimääräiset
 35 R_f -arvot eri liuotinsysteemeissä, käyttäen runsaasti hiiltä sisältävää piihappogeeli-TLC:aa ja Candida albicans-bioautografiaa, on annettu taulukossa II.

Taulukko II

<u>A-30912 tekijä</u>		<u>R_f-arvot - liuotinsysteemit</u>			
		<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>	<u>d</u>
Tekijä A		0,28	0,14	0,28	0,43
Tekijä B		0,39	0,21	0,42	0,47
Tekijä C		0,46	0,31	0,51	0,58
Tekijä D		0,50	0,38	0,57	0,61
Tekijä H		0,42	0,27	0,36	0,53

Liuotinsysteemit

- a: etyyliasettaatti:metanoli (3:2)
 b: etyyliasettaatti:metanoli (7:3)
 c: asetonitriili:vesi (95:5)
 d: etyyliasettaatti:etanoli:etikkahappo (40:60:0,25)

A-30912 tekijät A, B, D ja H voidaan tunnistaa myös analyyttisellä HPLPLC:lla käyttäen seuraavia olosuhteita:

5	pylväs:	lasia, 0,8 x 15,0 cm
	täyte:	Nucleosil ^R 10-C ₁₈ (Machery-Nagel and Company); pakattu käyttäen esimerkin 7 liete-pakkausmenetelmää
10	liuotin:	metanoli:vesi:asetonitriili (7:2:1)
	näytteen tilavuus:	8 mcl
	näytteen koko:	8 mcg
	pylvään lämpötila:	ympäristön lämpötila
	virtausnopeus:	1,8 ml/min.
15	paine:	n. 200 psi
	ilmaisin:	UV 222 nm:ssä (ISCO Model 1800 Variable Wavelength UV-Visible Absorbance Monitor)
	pumppu:	LDC Duplex Minipump
20	ruiskutus:	vaihtosuuntainen ruiskutus.

Likimääräiset pidätysajat A-30912 tekijöille A, B, D ja H näissä olosuhteissa on koottu taulukkoon III.

Taulukko III

25	<u>A-30912 tekijä</u>	<u>Pidätysaika</u> (sekuntia)
	A	792
	B	870
	H	990
	D	1,140

30 Entsyymien valmistus

1. Tuottava mikro-organismi

Entsyymiä, joka on käyttökelpoinen tämän keksinnön antibioottien deasylointiin, tuottavat tietyt Actinoplanaceae-heimon mikro-organismit, edullisesti mikro-
35 organismi Actinoplanes utahensis NRRL 12052.

Entsyymi voi olla sama entsyymi, jota on käytetty

penisilliinien deasylointiin; tätä työtä ovat selostaneet Walter J. Keinschmidt, Walter E. Wright, Frederick W. Kavanagh ja William M. Stark U.S. patentissa 3 150 059. Vaikkakin edullinen menetelmä A. utahensis NRRL 12052:n viljelemiseksi tämän entsyymin tuottamiseksi on kuvattu valmistuksessa 1, havaitsevat alaan perehtyneet, että myös muita menetelmiä voidaan käyttää.

Actinoplanaceae ovat Actinomycetales-lohkon mikro-organismien verraten uusi heimo. Ensimmäisenä Dr. John N. Couch'in kuvaama tämä heimo vahvistettiin 1965 [J. Elisha Mitchell Sci. Soc. 71, 148-155 (1955)]. Tämän heimon ja monien yksittäisten sukujen ominaisuuksia löytyy käsikirjasta "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 8. painos, E. E. Buchanan ja N. E. Gibbons, toimittajia, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md., 1974, sivut 706-723. Tähän asti on erotettu 10 sukua:

I. Actinoplanes (tyyppi-suku ja siten kaikkein yleisin suku); II. Spirillospora; III. Streptosporangium; IV. Amorphosporangium; V. Ampullariella; VI. Pilimelia; VII. Planomonospora; VIII. Planobispora; IX. Dactylosporangium; ja X. Kitasatoa.

Joitakin lajeja ja muunnoksia, jotka tähän asti on eristetty ja luonnehdittu ovat: Actinoplanes philippinensis, Actinoplanes armeniacus, Actinoplanes utahensis ja Actinoplanes missouriensis; Spirillospora albida; Streptosporangium roseum, Streptosporangium vulgare, Streptosporangium roseum var. hollandensis, Streptosporangium album, Streptosporangium viridialbum, Amorphosporangium auranticolor, Ampullariella regularis, Ampullariella campanulata, Ampullariella lobata, Ampullariella digitata, Pilimelia terevasa, Pilimelia anulata, Planomonospora parantospora, Planomonospora venezuelensis, Planobispora langispora, Planobispora rosea, Dactylosporangium aurantiacum ja Dactylosporangium thailandense.

Actinoplanes-suku on edullinen lähde entsyymille,

joka on käyttökelpoinen tätä keksintöä varten.

Actinoplanes-suvusta laji Actinoplanes utahensis on erityisen edullinen entsyymin lähde.

Edustavien lajien viljelyjä on yleisön saatavissa
5 keskuksista Northern Regional Research Center, osoite
kuten edellä, seuraavilla saantinumeroilla:

	Actinoplanes utahensis	NRRL 12052
	Actinoplanes missouriensis	NRRL 12053
	Actinoplanes sp.	NRRL 8122
10	Actinoplanes sp.	NRRL 12065
	Streptosporangium roseum	
	var. hollandensis	NRRL 12064

A. utahensis NRRL 12052 johdettiin emäviljelystä,
joka oli talletettu kokoelmaan American Type Culture
15 Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville,
Md. 20852 (A. utahensis ATCC 14539). A. utahensis ATCC
14539-viljelyä voidaan käyttää myös entsyymin lähteenä.

A. missouriensis NRRL 12053 johdettiin viljelystä,
joka myös oli talletettu ATCC:hen (A. missouriensis
20 ATCC 14538) ja joka on toinen entsyymin lähde.

Actinoplanaceae-heimoon kuuluvan mikro-organismin
jonkun annetun kannan tehokkuus tämän keksinnön deasyloin-
nin toteuttamiseksi määritetään seuraavalla menetelmällä.
Sopiva kasvuväliaine ympätään mikro-organismeilla. Viljelyä
25 inkuboidaan n. 28^oC:ssa kaksi tai kolme päivää pyörivällä
ravistimella. Yhtä substraatti-antibiooteista lisätään
sitten viljelyyn. Käymisväliaineen pH pidetään n.
6,5:ssä. Viljelyä tarkkaillaan aktiivisuuden suhteen käyt-
tämällä Candida albicans-määrittystä. Tämä menettelytapa on
30 selostettu osassa E. Antibioottisen aktiivisuuden häviämi-
nen on osoitus siitä, että mikro-organismi tuottaa deasy-
lointiin tarvittavaa entsyymiä. Tämä täytyy kuitenkin
vahvistaa käyttämällä jotakin seuraavista menetelmistä:
1) analyysi HPLC:lla vahingoittumattoman renkaan läsnäolon
35 toteamiseksi; tai 2) takaisin-asylointi sopivalle sivu-

ketjulla aktiivisuuden palauttamiseksi.

2. Olosuhteet entsyymin tuottamista varten

Entsyymin tuottaminen tapahtuu olosuhteissa, jotka ovat tyydyttäviä Actinoplanaceae'n kasvulle, ts. lämpötilassa väliltä n. 25 - n. 30°C ja pH:ssa väliltä n. 5,0 - n. 8,0 sekoittaen ja ilmastaen. Viljelyväliaineen tulisi sisältää a) assimiloituva hiililähde, kuten sakkarosia, glukoosia, glyserolia jne.; b) typpilähde, kuten peptonia, ureaa, ammoniumsulfaattia jne.; c) fosfaattilähde, kuten liukoista fosfaatti-suolaa; ja d) epäorgaanisia suoloja, joiden on yleisesti havaittu olevan tehokkaita edistämään mikro-organismien kasvua. Tehokas määrä entsyymiä saadaan yleensä n. 40 - n. 60 tunnissa kasvusyklin alkamisen jälkeen ja jatkuu jonkun aikaa tehokkaan kasvun saavuttamisen jälkeen. Tuotetun entsyymin määrä vaihtelee organismin lajista toiseen ja riippuen eri kasvuolosuhteista.

Kuten alalla työskenteleville on selvää, mikro-organismit, kuten Actinoplanes utahensis NRRL 12052, jotka tuottavat entsyymiä, ovat taipuvaisia muuntelulle. Esimerkiksi, näiden kantojen keinotekoisia muunnoksia ja mutantteja saadaan käsittelemällä tunnetuilla eri mutageeneilla, kuten ultraviolettisäteillä, röntgensäteillä, suurtaajuusaalloilla, radioaktiivisilla säteillä ja kemikaaleilla. Kaikkia luonnollisia ja keinotekoisia muunnoksia ja mutantteja, joita saadaan Actinoplanaceae:sta ja jotka tuottavat entsyymiä, voidaan käyttää tässä keksinnössä.

C. Deasylointi-olosuhteet

Substraatti lisätään edullisesti Actinoplanaceae-viljelyyn sen jälkeen kun viljelyä on inkuboitu ainakin n. 48 tuntia. Substraatin pitoisuus konversio-väliaineessa voi vaihdella laajasti. Entsyymin maksimikäyttöä varten ja pääasiallisesti täydellistä deasylointia varten 24 tunnin jaksossa, on substraatin pitoisuus kuitenkin yleensä väliltä n. 0,5 - n. 1,0 mg/ml. Alempia pitoisuuksia voidaan käyttää, mutta tällöin entsyymille ei saada maksimi-

käyttöä; voidaan käyttää myös suurempia pitoisuuksia, mutta saattaa olla, että substraatti ei deasyloidu täydellisesti ellei käymisaikaa pidennetä.

Substraatti-antibioottien konversio tämän keksinnön
 5 vastaaviksi renkaiksi etenee parhaiten, kun käymisväli-
 aineen pH pidetään välillä n. 6,0 - n. 7,0 pH:ssa 6 tai
 sen alapuolella deasylointi etenee hitaasti; kun pH-arvot
 liikkuvat pH 6,0:n yläpuolella, sekä substraatin että muo-
 dostuneen renkaan pysyvyys vähenee lisääntyvästi. Maksimi-
 10 pysyvyyttä varten pH 6,0 on edullinen; mutta pH 6,0:ssa
 deasylointi tapahtuu hitaammin (n. 30-36 tuntia). Nopeam-
 paa deasylointia (n. 24 tuntia) varten ilman suuria häviöi-
 tä on pH n. 6,5 edullinen. Sekoituksenalaisissa käymis-
 laitteissa pH:ta voidaan säätää anturi-säätimillä. Kun tämä
 15 on epäkäytännöllistä, kuten käymispullossa, pH:ta voidaan
 hallita lisäämällä 0,1 moolista fosfaatti-puskuria väli-
 aineeseen ennen substraatin lisäämistä.

Substraatin lisäämisen jälkeen viljelyn inkubointia
 tulisi jatkaa n. 24 tunnin ajan tai pidempään. Substraatin
 20 puhtaus vaikuttaa deasylointinopeuteen. Esimerkiksi subst-
 raatti, jonka puhtaus on suurempi kuin 50 %, deasyloituu
 nopeudella n. 0,8-1,2 mg/ml antibioottia 24 tunnissa. Kun
 käytetään substraattia, jolla on alempi puhtaus, deasyloin-
 ti etenee hitaammalla nopeudella.

25 Voidaan tehdä moninkertaisia substraatti-syöttöjä.
 Esimerkiksi pienissä säiliöissä 0,3-0,5 mg/ml:ssa anti-
 bioottia voidaan syöttää 12 tunnin välein ainakin viiden
 lisäyksen ajan, ja suuremmissa säiliöissä 0,7 mg/ml voidaan
 syöttää kahdesti.

30 Deasylointi voidaan toteuttaa laajalla lämpötila-
 alueella, esim. n. 20^o:sta n. 45^oC:een. On kuitenkin edul-
 lista saattaa deasylointi tapahtumaan lämpötiloissa n.
 25 - n. 30^oC, erityisen edullinen on n. 26^oC:n lämpötila
 optimideasylointia ja substraatin sekä renkaan pysyvyyttä
 35 varten.

D. Substraatti

On edullista käyttää puhdistettuja antibiootteja substraatteina. Substraatti-antibiooteilla on sienenvastainen, mutta ei bakteerinvastainen vaikutus. Siten
 5 substraatti-aineissa voi olla bakteeri-soluja tai -itiötä, jotka voisivat kasvaa deasylointi-käymisväliaineessa. Tällaiset saasteet voivat vaikuttaa deasylointireaktioon tai lähtö-antibioottien tai tuorerenkaiden pysyvyyteen. Sentähden on tärkeätä, että substraatit ovat steriilejä.
 10 Koska autoklaavi-käsittely tuhoaa useimmat substraatti-antibiooteista, on edullista steriloida valmisteet etyleenioksidikäsittelyllä paineistetussa systeemissä.

E. Deasyloinnin tarkkailu

Lähtöaineet ovat sienenvastaisia antibiootteja,
 15 jotka ovat erityisen aktiivisia *Candida albicans*'ia vastaan. Tästä syystä määrittäminen käyttäen *C. albicans*'ia on edullinen läsnäolevien substraattien määrien määrittämiseksi. Muodostuneet renkaat ovat vesiliukoisia, mutta biologisesti inaktiivisia. Vähennys biologisessa aktiivisuudessa on siten nopea, todennäköinen testi deasyloinnille.
 20 Sekä lieminäytteet että kiinteiden käymisaineiden alkoholiuutteet tulisi analysoida, koska substraatit ovat ainoastaan niukasti liemeen liukenevia.

F. Jäljellejääneiden solujen käyttö

Eräs vaihtoehtoinen menetelmä deasyloinnille käsittää *Actinoplanaceae*-solujen poistamisen viljelyväliaineesta, solujen uudelleen suspendoimisen puskuriliuokseen ja deasyloinnin suorittamisen kuten osassa C kuvattiin. Kun käytetään tätä menetelmää, voidaan entsymaattisesti aktiiviset huovastot käyttää uudelleen. Esimerkiksi *A. utahensis* NRRL 12052-huovastot säilyttävät deasylaasi-aktiivisuuden yhden kuukauden tai pidemmän ajan varastoinnin jälkeen
 30 jäädytyksen alaisena (4-8°C) tai jäädytetyssä tilassa (-20°C). Edullinen puskuriliuos on 0,1-moolinen fosfaattipuskuri.
 35

Liikkumattomiksi tehdyt entsyymit

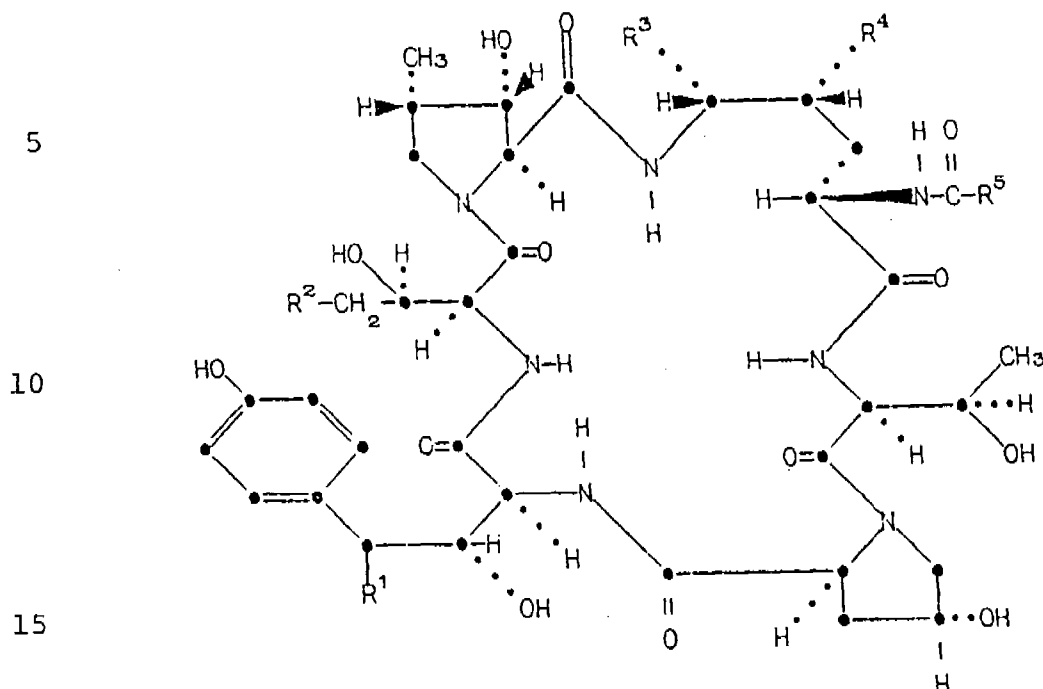
Vielä eräs menetelmä deasyloinnin toteuttamiseksi on tehdä entsyymit liikkumattomiksi alalla tunnetuin menetelmin. (Ks. esimerkiksi "Biomedical Applications
 5 of Immobilized Enzymes and Proteins", Thomas Ming Swi Shang, Shang, toim., Plenum Press, New York, 1977; nide 1). Liikkumattomaksi tehtyä entsyymiä voidaan sitten käyttää pylväässä (tai muuntyyppisessä sopivassa reaktorissa) deasyloinnin suorittamiseksi.

- 10 Lisäksi itse mikro-organismi voidaan tehdä liikkumattomaksi ja käyttää katalysoimaan deasylointireaktiota.

Renkaiden käyttö

- Renkaat ja niiden happoadditiosuolat ovat käyttökel-
 15 kelpoisia välituotteita valmistettaessa synteettisiä sienenvastaisia yhdisteitä. Näistä renkaista valmistettuja käyttökelpoisia sienenvastaisia yhdisteitä on kuvattu Bernard J. Abbott'in ja David S. Fukuda'n käsittelynalaisessa patenttihakemuksessa, rekisterinnumero X-5396, ja Manuel Debono'n kahdessa käsittelynalaisessa patenttihakemuksessa rekisterinumerot X-5595 ja X-5564, joilla kaikilla
 20 on otsikkona DERIVATIVES OF CYCLIC PEPTIDE NUCLEI ja jotka kaikki on jätetty samalla päivämäärällä kuin tämä hakemus.

- Edellä mainittuihin ehtoihin kuuluvana tarkoittaa
 25 käsite "alkyyli" yksivalenssista, tyydytettyä, suoraketjuista tai haaraketjuista hiilivetyradikaalia. Käsite "alkeenyyli" tarkoittaa yksivalenssista, tyydyttämätöntä, suoraketjuista tai haaraketjuista hiilivetyradikaalia, joka sisältää korkeintaan kolme kaksoissidosta. Tyydyttämättömän
 30 hiilivetyketjun kaksoissidokset voivat olla joko cis- tai trans-asemassa. " C_6-C_{24} ":llä tarkoitetaan hiilivetyä (suorat ja haarautuneet ketjut mukaanlukien), joka sisältää 6-24 hiiliatomia.



III

20 Kaavan III yhdisteitä valmistetaan asyloimalla sopiva rengas sen ornitiini-osan α -amino-ryhmässä sopivalla asyyli-sivuketjulla käyttäen alalla tavanomaisia menetelmiä amidi-sidoksen muodostamiseksi. Asylointi toteutetaan yleensä saattamalla rengas reagoimaan hapon, joka vastaa haluttua asyyli-sivuketjuryhmää, aktivoidun johdannaisen kanssa.

Käsite "aktivoitu johdannainen" tarkoittaa johdannais-
ta, joka tekee asyloimisaineen karboksyyli-funktion reaktiokykyiseksi kytkeytymään primääriseen amino-ryhmän kanssa muodostamaan amidi-sidos, joka sitoo asyyli-sivuketjun sopivaan renkaaseen. Alaan perehtyneet tuntevat sopivia aktivoituja johdannaisia, niiden valmistusmenetelmiä ja niiden käyttömenetelmiä asyloimisaineina primääristä amiinia varten. Edullisia aktivoituja johdannaisia ovat: (a) happopohalidi (esim. happokloridi), (b) happoanhydridi (esim. alkoksimuurahaishappoanhydridi tai aryylioksimuurahaishappoanhydridi) tai (c) aktivoitu esteri (esim. 2,4,5-trikloori-

fenyyliesteri). Muita menetelmiä karboksyylifunktion akti-
voimiseksi ovat karbonihapon saattaminen reagoimaan kar-
bonyylidi-imidin (esim. N,N'-disykloheksyylikarbodi-imidin
tai N,N'-di-isopropyylikarbodi-imidin) kanssa antamaan
5 reaktiokykyinen välituote, jota, pysymättömyytensä takia,
ei eristetä, jolloin reaktio primäärisen amiinin kanssa
saatetaan tapahtumaan in situ.

Jos nimenomainen aminohappo sisältää asyloituvan
funktionaalisen ryhmän, muun kuin aminoryhmän, on alaan
10 perehtyneille selvää, että tällainen ryhmä täytyy suojata
ennen aminohapon reaktiota käytetyn reagoivan aineen kans-
sa N-alkanoyyli- tai N-alkenoyyli-ryhmän liittämiseksi.
Sopivia suojaryhmiä voivat olla mikä tahansa ryhmä, jonka
alalla tiedetään olevan käyttökelpoinen sivuketju-toimin-
15 nallisen ryhmän suojaamiseen peptidisynteesissä. Tällaiset
ryhmät ovat hyvin tunnettuja ja nimenomaisen suojaryhmän
valinta ja sen käyttötapa on helposti alaan perehtyneen
tiedossa [ks. esimerkiksi "Protective Groups in Organic
Chemistry", M. McOmie, toimittaja, Plenum Press, N.Y.,
20 1973].

Kaavan III yhdisteet estävät tautiasynnyttävien
sienten kasvun ja ovat siten käyttökelpoisia sienten kasvun
hillitsemiseksi ympäröivillä pinnoilla, (antiseptinen aine)
tai käsiteltäessä sienten aiheuttamia infektioita. Erityi-
25 sesti nämä yhdisteet ovat vaikuttavia *Candida albicans*'ia
vastaan ja ovat siten erityisen käyttökelpoisia *Candida*-
sienitartunnan hoitoon. Yhdisteiden aktiivisuus voidaan
määrittää mikrobiologisilla standardi-testimenetelmillä,
kuten in vitro agar -levy-diffuusioteesteissä tai agari-
30 laimennustesteissä, tai in vivo testeissä hiirillä, jotka
on tartutettu *C. albicans*'illa. Nämä yhdisteet ovat aktii-
visia myös *Trichophyton mentagrophytes*'tä (dermatofyytti-
nen organismi), *Saccaromyces pastorianus*'ta ja *Neurospora*
crassa'a vastaan.

35 Tietyt yhdisteet (kuten on esitetty vertailuesi-

merkissä 19, taulukko VIII) antavat edullisia veriarvoja suun kautta antamisen jälkeen hiirille.

Annettuna koiralle laskimonsisäisesti annosmäärässä 100 mg/kg päivässä viiden päivän ajan kaavan III, jossa R^5 on p-(n-oktyylioksi)bentsoyyli, yhdiste ei osoittanut ulkoisia myrkyllisyyden merkkejä, vaikkakin tilapäisesti havaittiin lisääntyneitä seerymi-glutamiinipalorypälehappo-transaminaasi (SGPT)-määriä.

Systemaattisesti käytettynä kaavan III yhdisteiden annos vaihtelee riippuen käytetystä nimenomaisesta yhdisteestä, infektion vakavuudesta ja luonteesta ja hoidettavan kohteen fyysisestä tilasta. Hoito tulisi aloittaa pienin annoksin ja annosta tulisi lisätä kunnes haluttu sienen-
vastainen vaikutus saavutetaan. Yhdisteitä voidaan antaa laskimonsisäisesti tai lihaksensisäisesti ruiskeena steriilin vesipitoisen liuoksen tai suspension muodossa, johon haluttaessa voidaan lisätä erilaisia tavanomaisia farmaseuttisesti hyväksyttäviä säilöntä-, puskuri-, liuotinta- tai suspendoimisaineita. Muita lisäaineita, kuten suolaliuosta tai glukoosia voidaan lisätä liuosten tekemiseksi isotoonisiksi. Tällaisten lisäaineiden suhteet ja luonne ovat alaan perehtyneelle selviä.

Tietyt kaavan III yhdisteet antavat merkittäviä veriarvoja suun kautta antamisen jälkeen (ks. vertailuesimerkki 19, taulukko VIII) ja niitä voidaan antaa systemaattisesti suun kautta. Suun kautta käytettyinä näitä yhdisteitä voidaan antaa yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävien kantimien tai apuaineiden kanssa kapsелеiden, tablettien tai jauheiden muodossa. Tällaisten kantimien tai lisäaineiden luonne ja suhde on alaan perehtyneiden tiedossa.

Kun kaavan III yhdisteitä käytetään emätin-Candida-infektioiden hoitoon, niitä voidaan antaa yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävien tavanomaisten lisäaineiden kanssa, jotka sopivat emättimensisäiseen käyttöön. Emättimensisäistä käyttöä varten sovitettut valmisteet ovat alaan perehtyneiden tuntemia.

Tämän keksinnön käyttöä täydellisemmin valaisemiseksi annetaan seuraavat esimerkit.

Valmistus 1

Actinoplanes utahensis fermentointi

- 5 Actinoplanes utahensis NRRL 12052:n peruskanta valmistetaan ja ylläpidetään agar-viilloksella. Väliaine, jota käytettiin viilloksen valmistukseen valitaan jostakin seuraavista:

Väliaine A

10	<u>Aineosa</u>	<u>Määrä</u>
	esikeitetty kaurajauho	60,0 g
	hiiva	2,5 g
	K ₂ HPO ₄	1,0 g
	Czapek'in mineraali-varastoliuos *	5,0 ml
15	agar	25,0 g
	deionoitua vettä lisätty	1 litraksi

pH on ennen autoklaavi-käsittelyä n. 5,9; pH säädetään 7,2:een lisäämällä NaOH; autoklaavi-käsittelyn jälkeen

- 20 pH on n. 6,7.

* Czapek'in mineraali-varastoseoksella on seuraava koostumus:

	<u>Aineosa</u>	<u>Määrä</u>
25	FeSO ₄ ·7H ₂ O (liuotettuna 2 ml:aan väkevää HCl)	2 g
	KCl	100 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	100 g
	deionoitua vettä lisätty	1 litraksi

Väliaine B

	<u>Aineosa</u>	<u>Määrä</u>
	peruna-dekstriini	5,0 g
	hiivauute	0,5 g
5	kaseiinin entsymaattinen hydrolysaatti x	3,0 g
	naudanlihauute	0,5 g
	glukoosi	12,5 g
	maissitärkkelys	5,0 g
10	liha-peptoni	5,0 g
	sokeriruokomelassi	2,5 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
	CaCO ₃	1,0 g
	Czapek'in mineraali-varastoseos	2,0 ml
15	agar	20,0 g
	deionoitua vettä lisätty	1 litraksi
	x N-Z-Amine A, Humko Sheffield Chemical, Lyndhurst, N.J.	

- Viillos ympätään Actinoplanes utahensis NRRL 12052:lla ja ympättyä viillosta inkuboidaan 30°C:ssa n. 8-10 päivää. N. puolet viilloksen kasvusta käytetään ymppäämään 50 ml kasvuväliainetta, jolla on seuraava koostumus:

	<u>Aineosa</u>	<u>Määrä</u>
25	esikeitetty kaurajauho	20,0 g
	sakkaroosi	20,0 g
	hiiva	2,5 g
	Distiller's Dried Grain x	5,0 g
	K ₂ HPO ₄	1,0 g
30	Czapek'in mineraali-varastoseos	5,0 ml
	deionoitua vettä lisätty	1 litraksi;

asetetaan pH 7,4:ään NaOH:lla; autoklaavi-käsittelyn jälkeen pH on n. 6,8.

- 35 x National Distillers Products Co., 99 Park Ave., Ner York, N.Y.

Ympättyä kasvuväliainetta inkuboidaan 150 ml:n laajasuisessa Erlenmeyer-pullossa 30°C:ssa n. 72 tuntia ravistimella, joka pyörii kaarta pitkin, jonka läpimitta on 2 tuumaa, kierrosnopeudella 250 r/min.

- 5 Tätä inkuboitua kasvuväliainetta voidaan käyttää suoraan ymppäämään toisen vaiheen kasvuväliaine. Vaihtoehtoisesti ja edullisesti se voidaan varastoida myöhempää käyttöä varten pitämällä viljelyä nestemäisen typen höyryfaasissa. Viljely valmistetaan tällaista varastointia varten sarjaan ampulleja seuraavasti: jokaiseen ampulliin pannaan 2 ml inkuboitua kasvuväliainetta ja 2 ml glyserolilaktoosi-liuosta [ks. W.A. Dailey ja C.E. Higgins, "Preservation and Storage of Microorganisms in the Gas Phase of Liquid Nitrogen", Cryobiol 10, 364-367 (1973)
- 10 yksityiskohtia varten]. Valmistetut suspensiot varastoidaan nestemäisen typen höyryfaasiin.

- Näin valmistettua varastoitua suspensiota (1 ml) käytetään ymppäämään 50 ml ensimmäisen vaiheen kasvuväliainetta (jolla on edellä kuvattu koostumus). Ympättyä
- 20 ensimmäisen vaiheen kasvuväliainetta inkuboidaan kuten edellä kuvattiin.

- Suuremman määrän ymppiä saamiseksi käytetään 10 ml inkuboitua ensimmäisen vaiheen kasvuväliainetta ymppäämään 400 ml toisen vaiheen kasvuväliainetta, jolla on sama
- 25 koostumus kuin ensimmäisen vaiheen kasvuväliaineella. Toisen vaiheen väliainetta inkuboidaan 2 l:n laajasuisessa Erlenmeyer-pullossa 30°C:ssa n. 48 tuntia ravistimella, joka pyörii 2 tuuman läpimittaista kaarta pitkin kierrosnopeudella 250 r/min.

- 30 Inkuboitua toisen vaiheen kasvuväliainetta (800 ml), joka on valmistettu kuten edellä kuvattiin, käytetään ymppäämään 100 l steriiliä tuotantoväliainetta, joka on valittu jostakin seuraavista:

Väliaine I

	<u>Aineosa</u>	<u>Määrä (g/l)</u>
	maapähkinäjauho	10,0
	liukoinen liha-peptoni	5,0
5	sakkaroosi	20,0
	KH_2PO_4	0,5
	K_2HPO_4	1,2
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25
	vesijohtovettä lisätty	1 litraksi.
10	Väliaineen pH on n. 6,9 steriloinnin jälkeen 45 minuutin autoklaavikäsittelyllä 121°C :ssa n. 16-18 psi:n paineessa.	

Väliaine II

	<u>Aineosa</u>	<u>Määrä(g/l)</u>
15	sakkaroosi	30,0
	peptoni	5,0
	K_2HPO_4	1,0
	KCl	0,5
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
20	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,002
	deionoitua vettä lisätty	1 litraksi
	Asetetaan pH 7,0:aan HCl:lla, autoklaavi-käsittelyn jälkeen pH on n. 7,0.	

Väliaine III

	<u>Aineosa</u>	<u>Määrä (g/l)</u>
25	glukoosi	20,0
	NH_4Cl	3,0
	Na_2SO_4	2,0
	ZnCl_2	0,019
30	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,304
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,062
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,035
	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,005
	CaCO_3	6,0
35	KH_2PO_4 *	0,67
	vesijohtovettä lisätty	1 litraksi

* Steriloitu erikseen ja lisätty aseptisesti. Loppu-pH on 6,6.

Ympätyn tuotantoväliaineen annetaan käydä 165 l:n käymissäiliössä n. 30°C:n lämpötilassa n. 42 tuntia. Käymisväliainetta sekoitetaan tavanomaisilla sekoittimilla n. kierrosluvulla 200 r/min ja ilmastetaan steriilillä
 5 ilmalla liuenneen hapen määrän pitämiseksi n. 30 %:n yläpuolella ilman kyllästyksestä ilmakehän paineessa.

Valmistus 2

A-42355 antibiootti-kompleksin valmistus

A. Ravistuspullo-fermentointi

- 10 Valmistetaan *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440:n viljely ja pidetään agar-viilloksessa, joka on valmistettu väliaineella, jolla on seuraava koostumus:

	<u>Aineosa</u>	<u>Määrä</u>
	glukoosi	5 g
15	hiivauute	2 g
	CaCO ₃	3 g
	kasvi-mehu *	200 ml
	agar **	20 g
	deionoitua vettä lisätty	1 litraksi

- 20 (Alku-pH 6,1)

* V-8 Juice, Campbell Soup Co., Camden, N.J.

** Meer Corp.

- 25 Viillos ympätään *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440:lla ja ympättyä viillosta inkuboidaan 25°C:ssa n. 7 päivää. Kypsä viillosviljely peitetään vedellä ja kaavitaan steriilillä silmukalla itiöiden irrottamiseksi. Saatu suspensio suspendoidaan edelleen 10 ml:aan steriiliä deionoitua vettä.

- 30 Yksi millilitra suspendoitua viilloskasvua käytetään 55 ml:n kasvuväliainetta ympäämiseen 250 ml:n pullossa. Kasvuväliaineella on seuraava koostumus:

- | | <u>Aineosa</u> | <u>Määrä</u> |
|---|--|--------------|
| | sakkaroosi | 25 g |
| | sokeriruokomelassi | 36 g |
| | maissin liuotusneste | 6 g |
| 5 | mallasuute | 10 g |
| | K ₂ HPO ₄ | 2 g |
| | kaseiinin entsymaattinen hydrolysaatti * | 10 g |
| | vesijohtovesi | 1100 ml |
- 10 (Alku-pH 6,5-6,7)
- * N-Z Case, Humko Sheffield Chemical, Lyndhurst, N.J.
- Ympättyä kasvuväliainetta inkuboidaan 25°C:ssa 48 tuntia kierrosnopeudella 250 r/min. pyörivätyyppisessä ravistimessa. 24 tunnin kuluttua väliainetta homogenoidaan
- 15 yksi minuutti pienellä nopeudella sekoittimessa (Waring-tyyppisessä) ja palautetaan inkubointiin jäljelläolevaksi 24 tunniksi. Vaihtoehtoisesti ympättyä kasvuväliainetta voidaan inkuboida 48 tuntia ja homogenoida sitten 15 sekuntia alhaisella nopeudella.
- 20 Tätä inkuboitua kasvuväliainetta käytetään ymppäämään ravistuspullon käymiskasvuväliaine tai ymppäämään toisen vaiheen kasvuväliaine. Vaihtoehtoisesti se voidaan varastoida myöhempää käyttöä varten pitämällä viljely nestemäisen typen höyryfaasissa. Viljely valmistetaan tällais-
- 25 ta varastointia varten sarjaan ampulleja seuraavasti:
- Kasvuväliaineet sekoitetaan tilavuus/tilavuus suspendoimisliuoksen kanssa, jolla on seuraava koostumus:
- | | <u>Aineosa</u> | <u>Määrä</u> |
|----|---------------------------|--------------|
| | glyseroli | 20 ml |
| 30 | laktoosi | 10 g |
| | deionoitua vettä lisätään | 100 ml:ksi. |
- Valmistetut suspensiot jaetaan pieniin steriileihin kierretulppaputkiin (4 ml/putki). Näitä putkia varastoidaan nestemäisen typen höyryfaasissa.
- 35 Näin valmistettua varastoitua suspensiota voidaan

käyttää ymppäämään joko agar-viilloksia tai nestemäisiä ymppiväliaineita. Viilloksia inkuboidaan 25°C:ssa valossa 7 päivään.

B. Säiliö-fermentointi

- 5 Suuremman määrän ymppiä saamiseksi käytetään 10 ml inkuboitua ensimmäisen vaiheen kasvuviljelyä ymppäämään 400 ml toisen vaiheen kasvuväliainetta, jolla on sama koostumus kuin kasvuväliaineella. Toisen vaiheen väliainetta inkuboidaan 2 l:n laajasuisessa Erlenmeyer-
10 pullossa 25°C:ssa 24 tuntia ravistimella, joka pyörii läpimitaltaan 2 tuuman kaarta pitkin kierrosnopeudella 250 r/min.

- Inkuboitua toisen vaiheen väliainetta (800 ml), joka on valmistettu kuten edellä selostettiin, käytetään
15 ymppäämään 100 l steriiliä tuotantoväliainetta, joka on valittu jostakin seuraavista:

Väliaine IV

	<u>Aineosa</u>	<u>Määrä</u>
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,00455 g/l
20	liukoinen liha-peptoni *	30,5 g/l
	soijapapujauho	15,5 g/l
	tapioka-dekstriini **	2,0 g/l
	sokeririuokomelassi	10,5 g/l
25	kaseiinin entsyymaattinen hydrolysaatti ***	8,5 g/l
	Na ₂ HPO ₄	4,5 g/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5,5 g/l
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g/l
	puuvillansiemenöljy	40,0 ml
30	(vaahdonestoaine) ****	1,0 ml
	vesijohtovesi	1000,0 ml

(Alku-pH 6,8-7,0)

* O.M. Peptone, Amber Laboratories, Juneau, Wisc.

** Stadex 11, A.E. Staley Co., Decatur, III.

- 35 *** N-Z-Amine A, Humko Sheffield Chemical, Lyndhurst, N.J.

**** P2000, Dow Corning, Midland, Michigan.

Väliaine V

	<u>Aineosa</u>	<u>Määrä</u>
	glukoosi	2,5 %
	tärkkelys	1,0 %
5	liukoinen liha-peptoni *	1,0 %
	sokeriruokomelassi	1,0 %
	CaCO ₃	0,2 %
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 %
10	kaseiinin entsymaattinen hydrolysaatti **	0,4 %
	(vaahdonestoaine)***	0,02 %
	vesijohtovesi	riittävä määrä tilavuutta varten

* O.M. Peptone

15 ** N-Z-Amine A

*** Antifoam "A", Dow Corning

Ympätyn tuotantoväliaineen annetaan käydä 165 l:n käymissäiliössä 25°C:n lämpötilassa n. 7 päivää. Käymisväliainetta ilmastetaan steriilillä ilmalla pitäen

20 liuenneen hapen määrä n. 50 % ilmakyllästykseen yläpuolella.

C. Kolmannen vaiheen kasvuväliaine

Aina kun käyminen saatetaan tapahtumaan säiliössä, jotka ovat suurempia kuin ne, joita käytetään 100 l:n fermentointiin, on suositeltavaa, että käytetään kolmannen

25 vaiheen kasvuviljelyä suuremman säiliön ymppäämiseen. Eräällä edullisella kolmannen vaiheen kasvuväliaineella on seuraava koostumus:

	<u>Aineosa</u>	<u>Määrä</u>
	sakkaroosi	25 g
30	sokeriruokomelassi	25 g
	maissin liuotusneste	6 g
	Kaseiinin entsymaattinen hydrolysaatti *	10 g
	mallasuute	10 g
35	K ₂ HPO ₄	2 g
	vesijohtovesi	1000 ml

(Alku-pH 6,1)

* N-Z-Case.

Valmistus 3A-42355 antibiootti-kompleksin erottaminen

Koko käymislientä (4127 l), joka on saatu valmistuksessa 2 kuvatulla menetelmällä käyttäen tuotantoväli-

5 ainetta V, sekoitetaan perusteellisesti metanolin kanssa (4280 l) 1 tunnin ajan ja suodatetaan sitten käyttäen suodatusapuainetta (Hyflo Super-cel, erästä piimaata, Johns-Manville Profucts Corp.). Suodoksen pH asetetaan pH 4,0:aan lisäämällä 5 N HCl. Happameksi tehtyä suodosta

10 uutetaan kahdesti yhtä suurella tilavuusmäärällä kloroformia. Kloroformi-uutteet yhdistetään ja haihdutetaan tyhjössä n. 20 l:n tilavuuteen. Tämä väkevöite lisätään n. 200 l:aan dietyylieetteriä A-42355-kompleksin saostamiseksi. Sakka erotetaan suodattamalla antamaan 2775 g

15 A-42355-kompleksia harmaan valkoisena jauheena.

Valmistus 4A-30912 tekijä A:n eristäminen

A-42355 antibiootti-kompleksia (1 g), joka on valmistettu kuten esimerkissä 3 kuvattiin, liuotetaan 7 ml:aan

20 metanoli/vesi/asetonitriili-seosta (7:2:1). Tämä liuos suodatetaan ja tuodaan 3,7 cm:n sisäläpimittaiseen 35 cm:n lasipylvääseen [Michel-Miller High Performance Low Pressure (HPLPLC) Chromatography Column, Ace Glass Incorporated, Vineland, NJ 08360], joka on täytetty LP-1/C₁₈-pi-

25 happogeeli-kääntöfaasihartsilla (10-20 mikronia), joka on valmistettu kuten valmistuksessa 10 selostetaan, silmukan läpi venttiilijärjestelmän avulla. Pylväs täytetään metanoli/vesi/asetonitriili-seoksessa (7:2:1) lietetäyttö-

30 menetelmällä, joka on kuvattu valmistuksessa 11. F.M.I.-pumppua, jolla on venttiilitön mäntärakenne (maksimivirtaus 19,5 ml/min.) käytetään liuottimen kuljettamiseksi pylvään läpi virtausnopeudella 9 ml/min n. 100 psi:ssa keräten jakeet joka minuutti. Antibiootin eluointia tarkkaillaan 280 nm:ssä käyttäen UV-tarkkailulaitetta (ISCO Model UA-5,

35 Instrument Specialist Co., 4700 Superior Ave., Lincoln, Nebraska 68504), jossa on optinen yksikkö (ISCO Type 6).

Jakeet (n. 112-140) yhdistetään ja lisätään 20 ml:aan vettä. Tämän liuoksen pH asetetaan pH 4,0:aan N HCl:lla. Saatua liuosta uutetaan kahdesti yhtä suurilla tilavuusmäärillä kloroformia. Nämä kaksi kloroformiuutetta yhdistetään ja haihdutetaan tyhjöissä antamaan öljy. Öljy liuotetaan tertiääriseen butanoliin ja tämä liuos lyofiloidaan antamaan 524 mg A-42355 tekijä A:ta (A-30912 tekijä A; A-22082).

Valmistus 5

10 A-30912 tekijä B:n eristäminen

A-42355-kompleksi erotetaan kuten valmistuksessa 3 selostettiin, paitsi että väkevöidyt kloroformi-uutteet (285 l) kromatografoidaan piihappogeelipylväässä (150 l Grace-piihappogeeliä, aste 62) virtausnopeudella 2 l/min. Pylväs pestään kloroformilla (200 l), eluoidaan asetonitriilillä (500 l) ja eluoidaan sitten jatkuvasti asetonitriili/vesi-seoksella (98:2) virtausnopeudella 1 l/min. Jakeita, joiden tilavuus on n. 200 l, kootaan ja analysoidaan yksittäin biologisen aktiivisuuden suhteen. Bioanalyysi suoritetaan paperilevy-määrityksellä agar-levyillä, jotka on ympätty *Candida albicans*'illa. Jakeet 77-103 (1365 l) yhdistetään ja väkevöidään tyhjöissä. Väkevöity liuos (4,5 l) sisältää sakan, joka poistetaan suodattamalla antamaan 119 g tekijä B:llä rikastunutta A-42355-kompleksia. Suodos haihdutetaan kuiviin; saatu jäännös liuotetaan uudelleen sopivaan määrään metanolia. Metanoli-liuos lisätään dietyylieetteriin (10 tilavuusosaa) tekijä-B:tä sisältävän antibioottikompleksin saostamiseksi. Tämä sakka erotetaan myös suodattamalla ja kuivataan antamaan vielä 24 g tekijä-B:llä rikastunutta A-42355-kompleksia harmaana jauheena. Näin saatu tekijä-B:llä rikastunut A-42355-kompleksi (1,0 g) liuotetaan 8 ml:aan metanoli/vesi/asetonitriili-seosta (7:2:1). Tämä liuos suodatetaan ja pannaan piihappogeeli-pylvääseen (3,7 cm, sisäläpimitta, x 33 cm, Michel-Miller-pylväs) silmukan läpi venttiilijärjestelmän avulla. Pylväs on täytetty LP-1/C₁₈ piihappogeeli-kääntö-

faasihartsilla (10-20 mikronia), valmistettu kuten valmistuksessa 10 kuvataan, metanoli/vesi/asetonitriili-seoksessa (7:2:1) silmukan läpi venttiilijärjestelmän avulla. Käytetään valmistuksessa 11 kuvattu lietetäyttömenetelmää. Liuotinta kuljetetaan kolonnin läpi virtausnopeudella 10 ml/min. n. 100 psi:ssa käyttäen F.M.I.-pumppua, jolla on venttiilitön mäntärakenne. Joka minuutti kootaan yksi jae. Antibiootin eluointia tarkkaillaan UV-tarkkailulaitteella 280 nm:ssä kuten esimerkissä 1. Jakeet 102-110 yhdistetään ja väkevöidään tyhjössä antamaan öljy. Öljy liuotetaan pieneen tilavuusmäärään tert.-butanolia ja lyofiloidaan antamaan 22 mg A-30912 tekijä B:tä.

Valmistus 6

A-30912 tekijä D:n eristäminen

15 Väkevöidyt kloformi-uutteet kahdesta käymisprosessista (3800 l ja 4007 l), jotka on saatu valmistuksessa 3 kuvatulla menetelmällä, yhdistettiin ja kromatografoitiin piihappogeeli-pylväässä (Grace, aste 62). Pylväs pestiin kloroformilla ja eluointiin sitten asetonitriilillä ja asetonitriilin ja veden seoksella (98:2). Jakeet, joiden 20 tilavuus oli n. 200 l, koottiin ja analysoitiin biologisen aktiivisuuden suhteen paperi-levymäärityksellä agarilla, joka oli ympätty *Candida albicans*'illa. Aktiiviset jakeet (850 l) yhdistettiin ja väkevöitiin tyhjössä. Väkevöity 25 liuos (0,7 l) lisättiin dietyylieetteriin (10 tilavuusosaa) tekijä D:llä rikastuneen A-42355-kompleksin saostamiseksi. Sakka poistettiin suodattamalla ja kuivattiin antamaan 32 g tekijä D:llä rikastunutta A-42355-kompleksia harmaana jauheena.

30 Näin saatu tekijä D:llä rikastunut A-42355-kompleksi (1,0 g) liuotettiin 5 ml:aan metanoli/vesi/asetonitriili-seosta (7:2:1). Tämä liuos suodatettiin ja tuotiin piihappogeeli-pylväaseen (3,7 cm, sisäläpimitta, x 30 cm, Michel-Miller-pylväs) silmukan läpi venttiilijärjestelmän 35 avulla. Pylväs täytettiin LP-1/C₁₈ piihappogeeli-kääntöfaasihartsilla (10-20 mikronia; valmistettu kuten valmis-

tuksessa 10 on kuvattu). Täyttäminen suoritettiin metanoli/vesi/asetonitriili-seoksessa (7:2:1) lietettyttömene-
telmällä, joka on selostettu valmistuksessa 11. Liuotinta
kuljetettiin pylvään läpi virtausnopeudella 8 ml/min.

- 5 n. 45 psi:ssa käyttäen F.M.I.-pumppua, jolla oli venttiili-
litön mäntärakenne. Yksi jae koottiin 2 minuutin välein.
Antibiootin eluointia tarkkailtiin 280 nm:ssä käyttäen
UV-tarkkailulaitetta (ISCO Model UA-5), jossa oli optinen
yksikkö (ISCO Type 6). Jakeet 96-108 yhdistettiin ja väke-
10 vöitiin tyhjässä antamaan öljy. Tämä öljy liuotettiin
pieneen tilavuusmäärään tert.-butanolia ja lyofiloitiin
antamaan 89 mg A-30912 tekijä D:tä.

Valmistus 7

A-30912 tekijä H:n eristäminen

- 15 A-42355 antibiootti-kompleksia (5,0 g), joka oli
valmistettu kuten valmistuksessa 3 selostetaan, liuotet-
tiin 35 ml:aan metanoli/vesi/asetonitriiliseosta (7:2:1);
saatu liuos suodatettiin ja tuotiin sisäläpimitaltaan
3,7 cm:n ja 42 cm korkeaan lasipylvääseen (Michel-Miller-
20 pylväs) silmukan läpi venttiilijärjestelmän avulla. Pylväs
täytettiin LP-1/C₁₈ piihappogeeli-kääntöfaasihartsilla
(10-20 mikronia) metanoli/vesi/asetonitriili-seoksessa
(7:1:1) kuten on selostettu valmistuksessa 11. Liuotinta
kuljetettiin pylvään läpi virtausnopeudella 13 ml/min.
25 n. 120 psi:ssa käyttäen F.M.I.-pumppua, jolla oli venttiili-
tön mäntärakenne, ja kokoamalla yksi jae kahden minuutin
välein. Antibiootin eluointia tarkkailtiin UV:llä 280 nm:ssä.
Jakeet 112-132 yhdistettiin jakeiden 106-117 kanssa toises-
ta samanlaisesta puhdistuksesta. Yhdistetyt jakeet väkevöi-
30 tiin tyhjässä öljyksi. Öljy liuotettiin pieneen tilavuus-
määrään tert.-butanolia ja lyofiloitiin antamaan 173 mg
raakaa A-30912 tekijä H:ta.

- Raaka A-30912 tekijä H (150 mg) liuotettiin 8 ml:aan
metanoli/vesi/asetonitriili-seosta (7:2:1); saatu liuos
35 suodatettiin ja pantiin 2,0 cm:n sisäläpimittaiseen 32 cm:n

lasipylvääseen, kuten edellä selostettiin. Liuotinta kuljetettiin pylvään läpi virtausnopeudella 8 ml/min. n. 80 psi:ssa keräten jakeet 3 minuutin välein. Antibiootin eluointia tarkkailtiin 280 nm:ssä. Jakeet 17 ja 18 yhdistettiin ja väkevöitiin tyhjössä antamaan öljy. Öljy liuotettiin pieneen määrään tert.-butanolia ja lyofiloitiin antamaan 29 mg A-30912 tekijä H:ta.

Valmistus 8

Antibiootin S 31794/F-1 valmistus

- 10 Antibioottia S 31794/F-1 tuotetaan viljelemällä upoksissa *Acrophialophora limonispora* NRRL 8095:tä sekoittaen, ravistaen ja/tai ilmastamalla pH 3-8:ssa, edullisesti pH 5-7:ssä ja 15-30°C:ssa, edullisesti 18-27°C:ssa, 48-360 tuntia, edullisesti 120-288 tuntia.
- 15 Antibiootti S 31794/F-1 eristetään käsittelemällä viljelylientä (90 l) etyyliasetaatti/isopropanolilla (4:1, 90 l) ja homogenoimalla 30 minuuttia huoneen lämpötilassa. Orgaaninen faasi erotetaan ja haihdutetaan tyhjössä n. 40°C:ssa. Näin saatu jäännös kromatografoidaan 20 10-kertaisella määrällä piihappogeeliä käyttäen $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5 - 60:40). Jakeet, joilla on sienenestovaikutus, yhdistetään ja kromatografoidaan 100-kertaisella määrällä "Sephadex LH-20" käyttäen metanolia. Sephadex-pylväästä saadut jakeet, joilla on sienenestovaikutus, 25 yhdistetään ja kromatografoidaan uudelleen 100-kertaisella määrällä piihappogeeliä (0,05-0,2 mm) käyttäen $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (71:25:4)-liuotinjärjestelmää. Eluoidut jakeet, joilla on sienenestovaikutus, yhdistetään ja haihdutetaan tyhjössä antamaan raaka antibiootti S 31794/F-1.
- 30 Tämä tuote liuotetaan pieniin määriin metanolia ja saostetaan dietyylieetterillä antamaan S 31794/F-1 valkoisena amorfisena jauheena, sp. 178-180°C (hajoaa) kuivaamisen jälkeen suurtyhjössä 25-30°C:ssa. Kiteyttäminen 10-kertaisesta määrästä etyyliasetaatti/metanoli/vesi-seosta 35 (80:12:8) antaa kiteisen S 31794/F-1, sp. 181-183°C

(hajoaa) kuivaamisen jälkeen suurtyhjössä 20°C:ssa.

Valmistus 9

Antibiootin S 31794/F-1 eristäminen

Raaka antibiootti S 31794/F-1, joka on saatu
 5 kuten valmistuksessa 8 selostettiin, kromatografoinnin
 jälkeen Sephadex'illa, pannaan piihappogeelipylvääseen
 (Michel-Miller-pylvääseen) silmukan kautta venttiilijär-
 jestelmän avulla. Pylväs täytetään LP-1/C₁₈-piihappogeeli-
 kääntöfaasihartsilla (10-20 mikronia), joka on valmistettu
 10 kuten valmistuksessa 10 kuvataan, kloroformi/metanoli/vesi-
 seoksessa (71:25:4) silmukan läpi venttiilijärjestelmän
 avulla. Käytetään valmistuksessa 11 kuvattua lietetäyttö-
 menetelmää. Liuotinta kuljetetaan pylvään läpi käyttäen
 F.M.I.-pumppua, jolla on venttiilitön mäntärakenne. Anti-
 15 biootin eluointia tarkkaillaan käyttäen UV-tarkkailulaitet-
 ta 280 nm:ssä. Jakeet, joilla on sienenestovaikutus, yhdis-
 tetään ja väkevöidään tyhjössä antamaan antibiootti
 S 31794/F-1.

Valmistus 10

20 Piihappogeeli)C₁₈-kääntöfaasihartsin valmistus

Vaihe 1: Hydrolyysi

LP-1-piihappogeeliä (1000 g firmasta Quantum Corp.,
 nykyään Whatman) lisätään seokseen, jossa on väkevää
 rikkihappoa (1650 ml) ja väkevää typpihappoa (1650 ml)
 25 5 l:n pyöreäpohjaisessa pullossa ja ravistellaan sopivaa
 suspendoitumista varten. Seosta kuumennetaan höyryhauteel-
 la yli yön (16 tuntia), jolloin pulloon on liitetty vesi-
 vaipalla varustettu lauhdutin.

Seos jäähdytetään jäähauteella ja suodatetaan varo-
 30 vasti käyttäen sintrattua lasisuppilaa. Piihappogeeliä
 pestään deionoidulla vedellä kunnes pH on neutraali. Pii-
 happogeeli pestään sitten asetonilla (4 l) ja kuivataan
 tyhjössä 100°C:ssa 2 päivää.

Vaihe 2: Ensimmäinen silylointi

35 Kuiva piihappogeeli vaiheesta 1 siirrettiin pyöreä-

pohjaiseen pulloon ja suspendoitiin tolueeniin (3,5 l). Pulloa kuumennettiin höyryhauteella 2 tuntia mahdollisen jäämaveden aseotrooppisesti poistamiseksi. Lisätään oktadekyylitrikloorisilaania (321 ml, Aldrich Chemical Company) ja reaktioseosta kuumennetaan palautusjäähdyttämällä yli yön (16 tuntia) hitaasti mekaanisesti sekoittaen n. 60°C:ssa. Pidetään huolta siitä, että sekoitin ei joudu lähelle pullon pohjaa. Tämä senvuoksi, että estetään piihappogeeli-osasten jauhaantuminen.

- 10 Seoksen annetaan jäähtyä. Silanoitu piihappogeeli kootaan, pestään tolueenilla (3 l) ja asetonilla (3 l) ja ilmakuivataan sitten yli yön (16-20 tuntia). Kuivattu piihappogeeli suspendoidaan 3,5 l:aan asetonitriili/vesi-seosta (1:1) 5 l:n pullossa, sekoitetaan varovasti huoneen lämpötilassa 2 tuntia, suodatetaan, pestään asetonilla 15 (3 l) ja ilmakuivataan yli yön.

Vaihe 3: Toinen silylointi

- Ensimmäisen silyloinnin menettely toistetaan käyttäen 200 ml oktadekyylitrikloorisilaania. Suspensiota kuumennetaan palautusjäähdyttämällä 60°C:ssa 2 tuntia samalla 20 varovasti sekoittaen. Lopputuote otetaan talteen suodattamalla, pestään tolueenilla (3 l) ja metanolilla (6 l) ja kuivataan sitten tyhjiössä 50°C:ssa yli yön (16-20 tuntia).

25 Valmistus 11

Lietetäyttömenetelmä Michel-Miller-kolonneja varten Yleistietoja

- A. Analyysi- tai valmistus-kolonneja voidaan täyttää tällä menetelmällä.
- 30 B. Piihappogeeli- ja piihappogeeli-käänteisfaasi-täytteet (esim. Quantum LP-1, osaskoko 10-20 mikronia; LiChroprep RP-8 ja RP-18, osaskoko 25-40 mikronia) ovat suositeltavia. Kuitenkin myös muita piihappogeelieja (esim. Shandons ODS Hypersil, osaskoko 5 mikronia) sekä myös muun- 35 tyyppisiä hartseja on täytetty menestyksellisesti tällä menetelmällä.

C. Yleensä tätä lietetäyttömenetelmää varten tarvitaan alle 200 psi'n painetta ja virtausnopeuksia väliltä 5-40 ml/min.; tämä riippuu pylvään tilavuudesta ja koosta. Täyttöpaineen tulisi ylittää paine, jota käytetään varsinaisen erottamisen aikana, 30-50 psi:lla; tämä takaa, että adsorbentti ei enempää puristu erotustyövaiheiden aikana. Pylväitä, jotka on täytetty tällä menetelmällä kääntöfaasipiihappogeelillä, voidaan käyttää useita vuosia ilman tehokkuuden häviötä.

10 D. Äkillinen paineen alentuminen saattaa aiheuttaa murtumien tai kanavien muodostumista täyteaineeseen, mikä suuresti vähentäisi pylvään tehokkuutta. Sentähden on tärkeätä antaa paineen laskea hitaasti 0:aan aina kun pumpu on pysäytetty.

15 E. Pylväiden likimääräinen tilavuus (Ace Glass Cat. nro., täyttämätön): 5795-04, 12 ml; 5795-10, 110 ml; 5795-16, 300 ml; 5795-24, 635 ml ja 5796-34, 34 ml.

20 F. Aika, joka tarvitaan lasipylvään täyttämiseen, vaihtelee minuuteista useisiin tunteihin riippuen pylvään koosta ja tieteenharjoittajan kokemuksesta.

Spesifiset ohjeet

25 1. Lasipylväs kytketään säiliöpylvääseen kytkimen kautta (säiliöpylvään tilavuuden tulisi olla kaksinkertainen pylvään tilavuuteen nähden). Kumpikin pylväs sijoitetaan pystyasentoihin (säiliöpylväs päällä).

2. Täyteaine punnitaan (n. 100 g 200 ml:n pylvästä varten).

30 3. Lisätään n. viisinkertainen tilavuusmäärä liuotinta täyteaineeseen; käytetään seosta, jossa on 70-80 % metanolia ja 20-30 % vettä.

4. Ravistellaan hyvin kunnes kaikki osaset ovat kostuneet, annetaan seistä yli yön tai pidempään osasten täydellisen imeytymisen liuottimella takaamiseksi. Sakan päällä oleva neste dekantoidaan.

35 5. Hartsi lietetään riittävällä liuotinmäärällä

säiliöpylvään täyttämiseksi. Kaadetaan nopeasti säiliöön. On huomattava, että kolonni täytyy esitäyttää samalla liuottimella ja varastopylvään tulisi olla osittain täytetty liuottimella ennen lietteen kaatamista. Suurempien
 5 lietemäärien käyttö voi myös antaa hyviä tuloksia; tämä vaatii kuitenkin (a) suuremman säiliön tai (b) useita säiliön täyttöjä täyttövaiheen aikana.

6. Säiliö suljetaan teflon-tulpalla kolonnin alapuolella (ks. U.S. patentin 4 131 547 kuva 1, tulppa nro
 10 3); pumppu yhdistetään; ja liuottimen pumppaaminen systeemin läpi aloitetaan välittömästi suurimmalla virtausnopeudella, jos käytetään Ace Cat. nro 13265-25-pumppua tai samankaltaista liuottimen syöttöjärjestelmää (n. 20 ml/min.).

15 7. Jatketaan kunnes kolonni on täysin täyttynyt adsoebentilla. Paine ei saa ylittää kolonnin maksimisietorajaa tämän työvaiheen aikana (n. 200 psi suurille kolonneille ja 300 psi analyysi-kolonneille). Useimmissa tapauksissa alle 200 psi:n paineet ovat riittäviä.

20 8. Jos paine ylittäisi maksimi-arvot, vähennetään virtausnopeutta, jolloin paine laskee.

9. Senjälkeen kun kolonni on täytetty adsoebentilla pumppu pysäytetään; paineen annetaan pudota nolnaan; säiliö kytketään irti; säiliö korvataan esikolonnilla;
 25 esikolonni täytetään liuottimella ja pienellä määrällä adsoebenttia; ja pumpataan maksimipaineella kunnes kolonni on täydellisesti täytetty. Lisätietoja varten, ks. yleis-
 menetelmä.

Paineen on annettava aina alentua hitaasti pumpun
 30 pysäyttämisen jälkeen - tämä estää säröjen tai kanavien muodostumisen täyttöaineeseen.

10. Paine päästetään ja esikolonnikytketään varovasti irti. Pienellä lastalla poistetaan muutama mm (2-4) täytettä kolonnin yläpäästä; kolonnin yläpäähän pannaan
 35 1 tai 2 suodatinta; puristetaan lievästi täyteaineen pin-

nalle ja kolonnin yläpäähän pannaan teflon-tulppa kunnes sulku on varmistunut. Kolonni yhdistetään pumppuun, yhdistetään paineeseen (tavallisesti pienempi kuin 200 psi) ja tarkkaillaan lasiseinän läpi kolonnin yläpäässä pakkautuuko hartsi vielä edelleen. Jos täyteaine jatkaisi laskeutumistaan (näin voi käydä suuremmilla kolonneilla), ilmaantuu jonkinverran kuollutta tilaa tai kanavia ja vaihe 9 tulisi toistaa.

Valmistus 12

10 Tetrahydro-A-30912A:n valmistus

A-30912 tekijä A:ta liuotetaan etanoliin. PtO_2 pelkistetään absoluuttisessa etanolissa Pt:n muodostamiseksi, jota puolestaan käytetään pelkistämään A-30912 tekijä A katalyyttisesti käyttäen hydrausta positiivisessa paineessa kunnes reaktio on täydellinen (n. 2-3 tuntia). Reaktioseos suodatetaan ja haihdutetaan tyhjiössä. Jäännös liuotetaan pieneen määrään tert.-butanolia ja lyofiloidaan antamaan tetrahydro-A-30912A.

Valmistus 13

20 Tetrahydro-A-30912B:n valmistus

A-30912 tekijä B:tä liuotetaan etanoliin. PtO_2 pelkistetään absoluuttisessa etanolissa muodostamaan Pt, jota vuorostaan käytetään pelkistämään A-30912 tekijä B katalyyttisesti käyttäen hydrausta positiivisessa paineessa kunnes reaktio on täydellinen (n. 2-3 tuntia). Reaktioseos suodatetaan ja haihdutetaan tyhjiössä. Jäännös liuotetaan pieneen määrään tert.-butanolia ja lyofiloidaan antamaan tetrahydro-A-30912B.

Valmistus 14

30 Tetrahydro-A-30912D:n valmistus

A-30912 tekijä D:tä liuotetaan etanoliin. PtO_2 pelkistetään absoluuttisessa etanolissa muodostamaan Pt, jota vuorostaan käytetään pelkistämään A-30912 tekijä D katalyyttisesti käyttäen hydrausta positiivisessa paineessa kunnes reaktio on täydellinen (n. 2-3 tuntia). Reaktioseos suodatetaan ja haihdutetaan tyhjiössä. Jäännös liuotetaan

pieneen määrään tert.-butanolia ja lyofiloidaan antamaan tetrahydro-A-30912D.

Valmistus 15

Tetrahydro-A-30912H:n valmistus

- 5 A-30912 tekijä H:ta liuotetaan etanoliin. PtO_2 pelkistetään absoluuttisessa etanolissa muodostamaan Pt, jota vuorostaan käytetään pelkistämään A-30912 tekijä H katalyyttisesti käyttäen hydrausta positiivisessa paineessa kunnes reaktio on täydellinen (n. 2-3 tuntia). Reaktio-
- 10 seos suodatetaan ja haihdutetaan tyhjöissä. Jäännös liuotetaan pieneen määrään tert.-butanolia ja lyofiloidaan antamaan tetrahydro-A-30912H.

Esimerkki 1

A. A-30912 tekijä A:n deasylointi

- 15 A. utahensiksen fermentointi suoritetaan kuten valmistuksessa 1 kuvattiin, käyttäen viillosväliainetta A ja tuotantoväliainetta I ja inkuboimalla tuotantoväliainetta n. 42 tuntia. A-30912 tekijä A:ta (340 g raaka-substraattia, joka sisälsi n. 19,7 g A-30912 tekijä A, liuotettuna
- 20 1,5 l:aan etanolia) lisätään käymisväliaineeseen.

A-30912 tekijä A:n deasylointia tarkkaillaan määrityksellä *Candida albicans*'ia. Vastaan käymisen annetaan jatkaa kunnes deasylointi on täydellinen, mikä osoitetaan aktiivisuuden katoamisella *C. albicans*'ia vastaan.

- 25 B. A-30912A-renkaan eristäminen

- Koko käymisliete (100 ml), joka oli saatu kuten osassa B kuvattiin ja joka sisälsi rengasyhdistettä n. 20 g:sta A-30912 tekijä A, suodatetaan. Huovastokakku heitetään pois. Näin saatu kirkas suodos (n. 93 l) viedään kolonnin läpi, joka sisältää 4,5 l HP-20-hartsia (DIAION High Porous Polymer, HP-Series, Mitsubishi Chemical Industries Limited, Tokio, Japani) nopeudella 200 ml/min. Näin saatu poistovirtaus hylätään. Kolonni pestään sitten n. kahdeksalla kolonnin tilavuudella deionoitua vettä
- 35 pH 6,5-7,5:ssä jäljellejääneen suodatetun liemen poistami-

seksi. Tämä pesuvesi hylätään. Kolonni eluoidaan sitten vesi/metanoli-liuoksella (7:3) (85 l) nopeudella 200-300 ml/min.

Eluointia tarkkailaan käyttäen seuraavaa menettely-
 5 tapaa: kustakin eluoidusta jakeesta otetaan kaksi tasa-
 osaa. Toinen tasaosa väkevöidään pieneen tilavuuteen ja
 sitä käsitellään happokloridilla, kuten myristoyyliklo-
 ridilla, käyttäen menetelmää, jollainen on kuvattu vertai-
 luesimerkissä 1. Tämä tuote ja toinen (käsittelemätön)
 10 tasaosa analysoidaan aktiivisuuden suhteen Candida
 albicans'ia vastaan. Jos käsittelemättömällä tasaosalla
 ei ole aktiivisuutta ja asyloidulla tasaosalla on aktiivi-
 suus, sisältää jae A-30912A-renkaan. Eluaatti, joka sisäl-
 tää A-30912A-renkaan, väkevöidään tyhjössä pieneen tilavuu-
 15 teen ja lyofiloidaan antamaan n. 97 g raakaa rengasyhdis-
 tettä.

C. A-30912A-renkaan puhdistaminen kääntö-faasi-nes-
 tekromatografialla

Raaka A-30912A-rengasyhdiste (25 g), joka on saatu
 20 kuten osassa B selostettiin, liuotetaan 300 ml:aan
 vesi/asetonitriili/etikkahappo/pyridiiniseosta (96:2:1:1).
 Tämä liuos kromatografoidaan 4 l:n ruostumattomassa teräs-
 kolonnissa (8 cm x 80 cm), joka on täytetty Lichroprep
 RP-18:lla, osaskoko 25-40 mikronia (MC/B Manufacturing
 25 Chemists, Inc. E/M, Cincinnati OH). Kolonni on
 Chromatospac Prep 100-yksikön osa (Jobin Yvon, 16-18,
 16-18 Rue du Canal 91160 Longjumeau, Ranska). Kolonnia käy-
 tetään 90-100 psi:n paineella, mikä antaa virtausnopeu-
 deksi n. 60 ml/min., käyttäen samaa liuotinta. Erottamista
 30 tarkkaillaan 280 nm:ssä käyttäen UV-tarkkailulaitetta
 (ISCO Absorption Monitor Model UA-5, Instrumentation
 Specialties Co., 4700 Superior Ave., Lincoln, Nebraska
 68504), jossa on optinen yksikkö (ISCO Type 6). Jakeita,
 joiden tilavuus on n. 500 ml, kootaan joka minuutti.
 35 Absorption perusteella 280 nm:ssä jakeet, jotka

sisältävät A-30912A-renkaan, yhdistetään, haihdutetaan tyhjöissä ja lyofiloidaan antamaan 2,6 g rengasyhdistettä. Liuotinmäärä, joka tarvitaan tämän kromatografisen erotusprosessin loppuunsaattamiseksi, vaihtelee 7:stä 8 l:aan.

5 D. A-30912A-renkaan ominaisuudet

(a) Empiirinen kaava: $C_{34}H_{51}N_7O_{15}$.

(b) Molekyylipaino: 797,83.

(c) Valkoinen amorfinen kiinteä aine, liukoinen veteen, dimetyyliformamidiin, dimetyylisulfoksidiin ja metanoliin; liukenematon kloroformiin, tolueeniin ja dietyylieetteriin.

(d) Infrapuna-absorptiokirjo (KBr-levy) antaa absorptio-maksimit seuraavasti:

3340 leveä (OH, H-sidottu); 2970, 2930 ja 2890 (CH väli, alifaattiset CH_3 -, CH_2 - ja CH-ryhmät) 1660 ja 1625 (useita karbonyylejä C=O); 1510-1550: 1430-1450 (CH liikkuva); 1310-1340; 1230-1260; 1080; 835, 650 leveä ja 550 leveä cm^{-1} .

(e) Potentiometrinen titraus 66-%:ssä vesipitoisessa dimetyyliformamidissa osoittaa titrattavan ryhmän, jonka pK_a -arvo on n. 7,35 (alku-pH 7,32), läsnäolon.

(f) HPLC-pidätysaika (K'): 11,52 min. seuraavissa olosuhteissa.

Kolonne: 4 x 300 mm

25 täyte: piihappogeeli/ C_{18}

liuotin: ammoniumasetaatti/asetonitriili/vesi (1:2:97)

virtausnopeus: 3 ml/min.

paine: 2500 psi

30 ilmaisin: vaihdeltava aallonpituus UV230 nm:ssä

herkkyys: 0-0,4 A.U.F.S.

Esimerkki 2

A-30912A-rengas valmistetaan ja puhdistetaan esimerkin 1 menetelmällä, paitsi että substraattina käytetään tetrahydro-A-30912A:ta.

Esimerkki 3

A-30912A-rengas valmistetaan ja puhdistetaan esimerkin 1 menetelmällä, paitsi että substraattina käytetään akuleasiini A:ta.

5

Esimerkki 4A. A-30912 tekijä B:n deasylointi

A. utahensiksen fermentointi suoritetaan kuten valmistuksessa 1 selostetaan, käyttäen tuotantoväliainetta I. Sen jälkeen kun viljelyä on inkuboitu n. 48 tuntia
10 lisätään käymisväliaineeseen A-30912 tekijä B:tä, liuotettuna pieneen määrään metanolia.

A-30912 tekijä B:n deasylointia tarkkaillaan paperilevymäärityksellä *Candida Albicans*'ia tai *Neurospora crassa*'a vastaan. Käymisen annetaan jatkua kunnes deasy-
15 loituminen on täydellinen, mikä osoitetaan aktiivisuuden häviämällä.

B. A-30912B-renkaan eristäminen

Koko käymisliemi, joka on saatu kuten osassa B selostetaan, suodatetaan. Huovastokakku heitetään pois.
20 Näin saatu kirkas suodos viedään pylvään läpi, joka sisältää HP-20-hartsia (DIAION High Porous Polymer HP-Series, Mitsubishi Chemical Industries Limited Tokio, Japani). Näin saatu poistovirtaus hylätään. Kolonni pestään sitten kahdeksan-kertaisella kolonnin tilavuusmäärällä deionoitua vettä pH 6,5-7,5:ssä jäljellejääneen suodatetun liemen
25 poistamiseksi. Tämä pesuvesi hylätään. Kolonni eluoidaan sitten vesi/metanoli-liuoksella (7:3). Eluointia tarkkaillaan käyttäen seuraavaa menettelytapaa: kustakin eluoidusta jakeesta otetaan kaksi tasaosaa. Toinen tasaosista
30 väkevöidään pieneen tilavuuteen ja sitä käsitellään happokloridilla, kuten myristoyylikloridilla, käyttäen valmistuksessa 11 kuvattua menettelyä. Tämä tuote ja toinen (käsittelemätön) tasaosa analysoidaan aktiivisuuden suhteen *Candida albicans*'ia vastaan. Jos käsittelemättömällä tasa-
35 osalla ei ole aktiivisuutta ja asyloidulla tasaosalla on

aktiivisuus, sisältää jae A-30912B-renkaan. Eluaatti, joka sisältää A-30912B-renkaan, väkevöidään tyhjöissä pieneen tilavuuteen ja lyofiloidaan antamaan raaka rengastuote.

5 C. A-30912B-renkaan puhdistaminen kääntö-faasinestekromatografialla

10 Raaka A-30912B-rengastuote, joka on saatu kuten osassa B kuvataan, liuotetaan vesi/asetonitriili/etikkahappo/pyridiini-seokseen (96:2:1:1). Tämä liuos kromatografoidaan kolonnissa, joka on täytetty Lichroprep RP-18:lle, osaskoko 25-40 mikronia (MC/B Manufacturing Chemists, Inc. E/M, Cincinnati, OH). Tämä kolonni on Chromatospac Prep 100-yksikön osa (Jobin Yvon, 16-18 Rue Du Canal 91160 Longjumeau, Ranska). Kolonnia käytetään 15 90-100 psi:n paineella, mikä antaa virtausnopeudeksi n. 60 ml/min., käyttäen samaa liuotinta.

20 Erottamista tarkkailaan 280 nm:ssä käyttäen UV-tarkkailulaitetta (ISCO Absorption Monitor Model UA-5, Instrumentation Specialties Co., 4700 Superior Ave., Lincoln, Nebraska 68504), jossa on optinen yksikkö (ISCO Type 6).

25 Absorption perusteella 280 nm:ssä jakeet, jotka sisältävät A-30912B-renkaan, yhdistetään, haihdutetaan tyhjöissä ja lyofiloidaan antamaan puhdistettu A-30912B-rengasyhdiste.

Esimerkki 5

 A-30912B-rengas valmistetaan ja puhdistetaan esimerkin 4 menetelmällä, paitsi että substraattina käytetään tetrahydro-A-30912B:tä.

30 Esimerkki 6

A. A-30912 tekijä D:n deasylointi

 A. utahensiksen fermentointi suoritetaan kuten valmistuksessa 1 kuvattiin, käyttäen tuotantoväliainetta I. Senjälkeen kun viljelyä on inkuboitu n. 48 tuntia, käymisväliaineeseen lisätään A-30912 tekijä D:tä, liuotettuna 35 pieneen määrään metanolia.

A-30912 tekijä D:n deasylointia tarkkaillaan paperi-levymäärityksellä *Candida albicans*'ia tai *Neurospora crassa*'a vastaan. Käymisen annetaan jatkua kunnes deasylointi on täydellinen, mikä osoitetaan aktiivisuuden häviämällä.

B. A-30912D-renkaan eristäminen

Koko käymisliemi, joka on saatu kuten osassa A selostettiin, suodatetaan. Huovastokakku heitetään pois. Näin saatu kirkas suodos viedään kolonnin läpi, joka sisältää HP-20-hartsia (DIAION High Porous Polymer, HP-Series, Mitsubishi Chemical Industries Limited, Tokio-Japani). Näin saatu poistoliuos hylätään. Kolonni pestään sitten kolonnin 8-kertaisella tilavuusmäärällä deionoitua vettä pH 6,5-7,5:ssä jäljellejääneen suodatetun liemen poistamiseksi. Tämä pesuvesi hylätään. Kolonni eluoidaan sitten vesi/metanoli-liuoksella (7:3). Eluointia tarkkaillaan käyttäen seuraavaa menettelyä: otetaan kustakin eluoidusta jakeesta kaksi tasaosaa. Toinen tasaosista väkevöidään pieneen tilavuuteen ja sitä käsitellään happokloridilla, kuten myristoyylikloridilla, käyttäen vertailuesimerkissä 1 kuvattua menettelyä. Tämä tuote ja toinen (käsittelemätön) tasaosa analysoidaan aktiivisuuden suhteen *Candida albicans*'ia vastaan. Jos käsittelemättömällä tasaosalla ei ole aktiivisuutta ja asyloidulla tasaosalla on aktiivisuus, sisältää jae A-30912D-renkaan. Eluaatti, joka sisältää A-30912D-renkaan, väkevöidään tyhjössä pieneen tilavuuteen ja lyofiloidaan antamaan raaka rengastuote.

C. A-30912D-renkaan puhdistaminen kääntö-faasinestekromatografialla

Raaka A-30912D-rengastuote, joka on saatu kuten osassa B selostettiin, puhdistetaan esimerkin 4 osan C menetelmän mukaisesti.

Absorption perusteella 280 nm:ssä, jakeet, jotka sisältävät A-30912D-renkaan, yhdistetään, haihdutetaan tyhjössä ja lyofiloidaan antamaan puhdistettu A-30912D-rengas.

Esimerkki 7

A-30912D-rengas valmistetaan ja puhdistetaan esi-
merkin 6 menetelmällä, paitsi että substraattina käyte-
tään tetrahydro-A-30912D:tä.

5

Esimerkki 8A. A-30912 tekijä H:n deasylointi

A. utahensiksen fermentointi suoritetaan kuten
valmistuksessa 1 selostettiin käyttäen tuotantoväliainetta
I. Senjälkeen kun viljelyä on inkuboitu n. 48 tuntia fer-
mentointi-väliaineeseen lisätään A-30912 tekijä H:ta, liuo-
tettuna pieneen määrään metanolia.

A-30912 tekijä H:n deasylointia tarkkaillaan paperi-
levymäärityksellä *Candida albicans*'ia tai *Neurospora*
crassa'a vastaan. Käymisen annetaan jatkua kunnes deasy-
lointi on täydellinen, mikä osoitetaan aktiivisuuden ka-
toamisella.

B. A-30912H-renkaan eristäminen

Koko käymisliemi, joka on saatu kuten osassa A
selostettiin, suodatetaan. Huovastokakku heitetään pois.
Näin saatu kirkas suodos viedään kolonnin läpi, joka sisäl-
tää HP-20-hartsia (DIAION High Porous Polymer, HP-Series,
Mitsubishi Chemical Industries Limited, Tokio, Japani).
Näin saatu poistovirtaus hylätään. Kolonni pestään sitten
enintään 8-kertaisella kolonnin tilavuusmäärällä deionoi-
tua vettä pH 6,5-7,5:ssä jäljellejääneen suodatetun liemen
poistamiseksi. Tämä pesuvesi hylätään. Kolonni eluoidaan
sitten vesi/metanoliliuoksella (7:3). Eluointia tarkkail-
laan käyttäen seuraavaa menettelyä: kustakin eluoidusta
jakeesta otetaan kaksi tasaosaa. Toinen tasaosista väkevöi-
dään pieneen tilavuuteen ja sitä käsitellään happokloridil-
la, kuten myristoyylikloridilla, käyttäen menetelmää, jol-
lainen on kuvattu vertailuesimerkissä 1. Tämä tuote ja
toinen (käsittelemätön) tasaosa analysoidaan aktiivisuuden
suhteen *Candida albicans*'ia vastaan. Jos käsittelemättömällä
tasaosalla ei ole aktiivisuutta ja asyloidulla tasaosalla

on aktiivisuus, sisältää jae A-30912H-renkaan. Eluaatti, joka sisältää A-30912H-renkaan, väkevöidään tyhjössä pieneen tilavuuteen ja lyofiloidaan antamaan raaka rengasyhdiste.

5 C. A-30912H:n puhdistaminen kääntö-faasi-neste-kromatografialla

Raaka A-30912H-rengas, joka on saatu kuten osassa B selostettiin, puhdistetaan esimerkin 4 osan C menetelmän mukaisesti.

10 Absorption perusteella 280 nm:ssä jakeet, jotka sisältävät A-30912H-renkaan, yhdistetään, haihdutetaan tyhjössä ja lyofiloidaan antamaan puhdistettu A-30912H-rengas.

Esimerkki 9

15 A-30912H-rengas valmistetaan ja puhdistetaan esimerkin 8 menetelmällä, paitsi että substraattina käytetään tetrahydro-A-30912H:ta.

Esimerkki 10

20 A-30912H-rengas valmistetaan ja puhdistetaan esimerkin 8 menetelmällä, paitsi että A-30912 tekijä H valmistetaan A-30912 tekijä A:sta käyttäen seuraavaa menettelyä:

25 Antibioottista A-30912 tekijä A:ta (19,6 mg) liuotetaan dimetyyliformamidiin (1 ml). Tähän liuokseen lisätään hapanta metanolia (3 % HCl, 0,06 ml). Syntynyttä liuosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa yli yön ja haihdutetaan sitten kuiviin tyhjössä. Saatu jäännös kromatografoidaan HPLPLC:lla, kuten valmistuksessa 7 kuvattiin, käyttäen kääntö-faasi-piihappogeeliä (LP-1/C₁₈, joka oli valmistettu 30 kuten valmistuksessa 10 kuvattiin) sekä eluointi-liuottimena CH₃OH/H₂O/CH₃CN-seosta (7:2:1) antamaan 1,4 mg A-30912 tekijä H:ta (kaavan II yhdistettä, jossa R¹ ja R⁴ ovat kumpikin hydroksi, R² on vety, R³ on metoksi ja R on linoleoyyli).

Esimerkki 11

Kaavan I, jossa R^3 on etoksi, A-30912H-tyyppinen rengas valmistetaan ja puhdistetaan esimerkin 8 menetelmällä, paitsi että substraattina käytetään kaavan II, jossa R^3 on etoksi ja R on linoleoyyli, yhdistettä. Substraatti valmistetaan esimerkissä 10 käytetyllä menetelmällä.

Esimerkki 12

A-30912H-tyyppinen rengas, jolla on rakenne I, jossa R^3 on n-propoksi, valmistetaan ja puhdistetaan esimerkin 8 menetelmällä, paitsi että substraattina käytetään kaavan II, jossa R^3 on n-propoksi ja R on linoleoyyli, yhdistettä. Substraatti valmistetaan kuten esimerkissä 10 kuvattiin.

Esimerkki 13

A-30912H-rengas, jolla on rakenne I, jossa R^3 on isobutoksi, valmistetaan ja puhdistetaan esimerkin 8 menetelmällä, paitsi että substraattina käytetään kaavan II, jossa R^3 on isobutoksi ja R on linoleoyyli, yhdistettä.

Esimerkki 14

Kaavan I, jossa R^3 on n-pentyylioksi, A-30912H-rengas valmistetaan ja puhdistetaan esimerkin 8 menetelmällä, paitsi että substraattina käytetään kaavan II, jossa R^3 on n-pentyylioksi ja R on linoleoyyli, yhdistettä.

Esimerkki 15

Kaavan I, jossa R^3 on n-heksyylioksi, A-30912H-tyyppinen rengas valmistetaan ja puhdistetaan esimerkin 8 menetelmällä, paitsi että substraattina käytetään kaavan II, jossa R^3 on n-heksyylioksi ja R on linoleoyyli, yhdistettä.

Esimerkki 16

A-30912H-tyyppinen rengas, jolla on rakenne I, jossa R^3 on etoksi, valmistetaan ja puhdistetaan esimerkin 8 menetelmällä, paitsi että substraattina käytetään kaavan II, jossa R^3 on etoksi ja R on stearoyyli, yhdistettä.

Esimerkki 17

A-30912H-tyyppinen rengas, jolla on rakenne I, jossa R^3 on 2-etyyli-1-butoksi, valmistetaan ja puhdistetaan esimerkin 8 menetelmällä, paitsi että substraattina
 5 käytetään kaavan II, jossa R^3 on etyyli-1-butoksi ja R on linoleoyyli, yhdistettä.

Esimerkki 18

A-30912H-tyyppinen rengas, jolla on rakenne I, jossa R^3 on 3-metyyli-1-butoksi, valmistetaan ja puhdistetaan
 10 taan esimerkin 8 menetelmällä, paitsi että substraattina käytetään kaavan II, jossa R^3 on 3-metyyli-1-butoksi ja R on linoleoyyli, yhdistettä.

Esimerkki 19A. Antibiootin S 31794/F-1 deasylointi

15 A. utahensiksen fermentointi suoritetaan kuten valmistuksessa l kuvattiin, käyttäen tuotantoväliainetta I. Senjälkeen kun viljelyä on inkuboitu n. 48 tuntia käymisväliaineeseen lisätään antibioottia S 31794/F-1, liuotettuna pieneen määrään metanolia.

20 S 31794/F-1:n deasylointia tarkkaillaan paperilevymäärityksellä Candida albicans'ia vastaan. Käymisen annetaan jatkua kunnes deasylointi on täydellinen, mikä osoitetaan aktiivisuuden häviämisellä.

B. S 31794/F-1-renkaan eristäminen

25 Koko käymisliemi, joka on saatu kuten osassa A selostettiin, suodatetaan. Huovastokakku heitetään pois. Näin saatu kirkas suodos viedään kolonnin läpi, joka sisältää HP-20-hartsia (DIAION High Porous Polymer, HO-Series, Mitsubishi Chemical Industries Limited, Tokio,
 30 Japani). Näin saatu poistovirtaus hylätään. Kolonni pestään sitten kolonnin 8-kertaisella tilavuudella deionoitua vettä pH 6,5-7,5:ssä jäljellejääneen suodatetun liemen poistamiseksi. Tämä pesuvesi hylätään. Kolonni eluoidaan sitten vesi/metanoli-liuoksella (7:3). Eluointia tarkkail-
 35 laan käyttäen seuraavaa menettelyä: kustakin eluoidusta

jakeesta otetaan kaksi tasaosaa. Toinen tasaosista väkevöidään pieneen tilavuuteen ja sitä käsitellään happokloridilla, kuten myristoyylikloridilla, käyttäen vertailuesimerkissä 1 selostettua menetelmää. Tämä tuote ja toinen (käsittelemätön) tasaosa analysoidaan aktiivisuuden suhteen *Candida albicans*-ia vastaan. Jos käsittelemättömällä tasaosalla ei ole aktiivisuutta ja asyloidulla tasaosalla on aktiivisuus, sisältää jae S 31794/F-1-renkaan. Eluaatti, joka sisältää S 31794/F-1-renkaan, väkevöidään tyhjöissä pieneen tilavuuteen ja lyofiloidaan antamaan raaka rengasyhdiste.

C. S 31794/F-1-renkaan puhdistus kääntö-faasi-nes-tekromatografiolla

Raaka S 31794/F-1-rengasyhdiste, joka on saatu kuten osassa B kuvattiin, puhdistetaan esimerkin 4 osan C menetelmän mukaisesti.

Absorption perusteella 280 nm:ssä jakeet, jotka sisältävät S 31794/F-1-renkaan, yhdistetään, haihdutetaan tyhjöissä ja lyofiloidaan antamaan puhdistettu S 31794/F-1-rengas.

Abbott- ja Fukuda-johdannaisen valmistus

Seuraava menetelmä kuvaa kaavan III yhdisteiden valmistusta "aktiivisen esterin" menetelmällä. Tällä menetelmällä valmistetut spesifiset yhdisteet ovat kaavan III, jossa R^5 on $CH_3(CH_2)_{11}-$, ja R^1 , R^2 , R^3 ja R^4 ovat samoja kuin vastaavissa renkaissa, yhdisteitä.

Vertailuvalmistus 1

2,4,5-trikloorifenyyli-tridekanoaatin valmistus

Liuosta, jossa on n-tridekanoiinihappoa (Sigma Chemical Co., 12,5 g), 2,4,5-trikloorifenolia (11,5 g) ja N,N'-disykloheksyylikarbodi-imidiä (12,0 g) metyleenikloridissa (650 ml), sekoitetaan huoneen lämpötilassa 16 tuntia.

Reaktioseos suodatetaan sitten ja kuivataan tyhjöissä antamaan 2,4,5-trikloorifenyyli-tridekanoaattia (22 g).

Tämä aine puhdistetaan pylväskromatografisesti piihappo-geelillä (Woelm) käyttäen eluenttina tolueenia. Jakeita tarkkaillaan TLC:lla käyttäen lyhytaaltoista UV-valoa havaitsemista varten. Jakeet, jotka sisältävät puhdistetun

5 tuotteen, yhdistetään ja haihdutetaan tyhjöissä kuiviin.

Vertailuesimerkki 1

A-30912A-renkaan asylointi 2,4,5-trikloorifenyyli-n-tridekanoaatilla

Liuosta, jossa on 2,4,5-trikloorifenyyli-tridekanoaattia (6,0 g) ja A-30912A-rengasyhdistettä (4,5 g)

10 dimetyyliformamidissa (DMF) (600 ml), sekoitetaan huoneen lämpötilassa 16 tuntia. Liuottimen poistaminen tyhjöissä antaa jäännöksen (12 g). Jäännöstä lietetään metyleenikloridilla (500 ml) 45 minuuttia ja seos suodatetaan. Suodos

15 heitetään pois. Jäljellejäänyttä kiinteätä ainetta uuteetaan metanolilla (500 ml). Metanoli-uute suodatetaan ja väkevöidään tyhjöissä antamaan raakatuote (5,0 g).

Raakatuote puhdistetaan kääntö-faasi-HPLC:lla seuraavasti:

20 Raakatuotteen näyte (1 g), liuotettuna metanoliin (5 ml), ruiskutetaan 1" x 32" ruostumattomaan teräskoloniin, joka on täytetty LP-1/C₁₈-hartsilla (ks. valmistukset 10 ja 11). Kolonni eluoidaan liuotinsysteemillä H₂O/CH₃OH/CH₃CN (3:3:4). Eluointi suoritetaan 1000-

25 1500 psi:n paineessa virtausnopeudella 11-12 ml/min. käyttäen LDC Duplex-pumppua (Milton-Roy). Poistovirtausta tarkkaillaan ultravioletti-ilmaisimella (ISCO-UA-5) 280 nm:ssä. Jakeita kootaan kahden minuutin välein (21-24 ml). Jakeet, jotka sisältävät halutun tuotteen,

30 yhdistetään ja kuivataan tyhjöissä. Tuotteen saalis: 500 mg. Edellä kuvattu kromatografia toistetaan neljä kertaa antamaan tuotteen puhdistettuja lisänäytteitä seuraavasti: 620 mg, 520 mg, 670 mg ja 490 mg antamaan kokonaispainoksi 2,8 g.

35 Seuraten edellä esitettyä menettelyä saatetaan

49 g A-30912A-rengasyhdistettä reagoimaan 2,4,5-trikloorifenyyli-n-tridekanoaatin kanssa antamaan 2,6 g puhdistettua otsikkotuotetta. Aineet kummastakin valmistuksesta (5,4 g) yhdistetään. Massa-ioni FDMS:lla ($M^+ + Na^+$):

5 1016. (teoreettinen: $M^+ + Na^+ = 1016$). Analyytinen HPLC (C_{18} Micro Bondapak, Waters Co.) eluenttisysteemillä $H_2O/CH_3OH/CH_3CN$ (2:1:2) antaa vain yhden huipun.

Vertailuesimerkki 2

10 A-30912B-renkaan asylointi 2,4,5-trikloorifenyyli-n-tridekanoaatilla

Liuosta, jossa on 2,4,5-trikloorifenyyli-n-tridekanoaattia (3,3 mmoolia) ja A-30912B-rengasyhdistettä (m mmoolia) dimetyyliformamidissa (DMF) (200 ml), sekoitetaan huoneen lämpötilassa 16 tuntia. Liuottimen poistaminen tyhjössä antaa jäännöksen. Jäännöstä lietetään metyleenikloridilla (300 ml) 45 minuuttia ja seos suodatetaan. Suodos heitetään pois. Jäljellejäänyttä kiinteätä ainetta uutetaan metanolilla (300 ml) ja metanoli-uute suodatetaan ja väkevöidään tyhjössä antamaan raakatuote.

20 Raakatuote puhdistetaan kääntö-faasi-HPLC:lla seuraavasti:

Raakatuotteen näyte (1 g), liuotettuna metanoliin (5 ml), ruiskutetaan 1" x 32" ruostumattomaan teräskoloniin, joka on täytetty LP-1/ C_{18} -hartsilla (ks. valmistukset 10 ja 11). Kolonni eluoidaan liuotinsysteemillä 3:3:4 $H_2O/CH_3OH/CH_3CN$. Eluointi suoritetaan 1000-1500 psi:n paineessa virtausnopeudella 11-12 ml/min. käyttäen LDC-Suplex-pumppua (Milton-Roy). Poistovirtausta tarkkaillaan UV-ilmaisimella (ISCO-UA-5) 280 nm:ssä. Jakeita kootaan kahden minuutin välein (21-24 ml). Jakeet, jotka sisältävät halutun tuotteen, yhdistetään ja kuivataan tyhjössä antamaan otsikkotuote. Puhdistettu tuote analysoidaan TLC:lla käyttäen kääntö-faasi C_{18} -levyjä (Whatman KC_{18}) ja liuotinsysteemiä 1:2:2 (tilav./tilav.) $H_2O/CH_3OH/CH_3CN$. Kehittämisen jälkeen levyjä tarkastellaan UV-valossa tuotteen löytämiseksi.

35

Vertailuesimerkki 3A-30912D-renkaan asylointi 2,4,5-trikloorifenyyli-n-tridekanoaatilla

5 Liuosta, jossa on 2,4,5-trikloorifenyyli-n-tri-
 dekanoaattia (3,3 mmoolia) ja +-30912D-rengasyhdistettä
 (1 mmoolia) dimetyyliformamidissa (DMF) (200 ml) sekoite-
 taan huoneen lämpötilassa 16 tuntia. Liuottimen poistami-
 nen tyhjöissä antaa jäännöksen. Jäännöstä lietetään mety-
 leenikloridilla (300 ml) 45 minuuttia ja seos suodatetaan.
 10 Suodos heitetään pois. Jäljellejäänyttä kiinteätä ainetta
 uutetaan metanolilla (300 ml), ja metanoli-uute suodatetaan
 ja väkevöidään tyhjöissä antamaan raakatuote.

Raakatuote puhdistetaan kääntö-faasi-HPLC:lla, ku-
 ten vertailuesimerkissä 2 kuvattiin.

15 Vertailuesimerkki 4A-30912H-renkaan asylointi 2,4,5-trikloorifenyyli-n-tridekanoaatilla

Liuosta, jossa on 2,4,5-trikloorifenyyli-n-tride-
 kanoaattia (3,3 mmoolia) ja A-30912H-rengasyhdistettä
 20 (1 mmooli) dimetyylidormamidissa (DMF) (200 ml), sekoite-
 taan huoneen lämpötilassa 16 tuntia. Liuottimen poista-
 minen tyhjöissä antaa jäännöksen. Jäännöstä lietetään
 metyleenikloridilla (300 ml) 45 minuuttia ja seos suodate-
 taan. Suodos heitetään pois. Jäljellejäänyttä kiinteätä
 25 ainetta uutetaan metanolilla (300 ml) ja metanoliuute
 suodatetaan ja väkevöidään tyhjöissä antamaan raakatuote.

Raakatuote puhdistetaan kääntö-faasi-HIPL:lla
 kuten vertailuesimerkissä 2 kuvattiin.

Vertailuesimerkki 5

30 Kaavan III, jossa R^3 on n-propoksi ja R^5 on
 $CH_3-(CH_3-(CH_2)_{11}-$, yhdiste, joka on valmistettu vertailu-
 esimerkin 4 menetelmän mukaisesti, mutta käyttäen lähtö-
 aineena kaavan I, jossa R^3 on n-propoksi, yhdistettä
 (valmistettu esimerkin 12 menetelmällä).

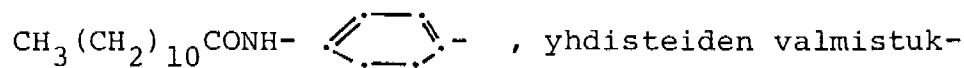
Vertailuesimerkki 6S 31794/F-1-renkaan asylointi 2,4,5-trikloorifenyyli-n-tridekanoaatilla

Liuosta, jossa on 2,4,5-trikloorifenyyli-n-tridekanoaattia (3,3 mmoolia) ja S 31794/F-1-rengasyhdistettä (1 mmooli) dimetyyliformamidissa (DMF) (200 ml), sekoitetaan huoneen lämpötilassa 16 tuntia. Liuottimen poistaminen tyhjöissä antaa jäännöksen. Jäännöstä lietetään metyleeinikloridilla (300 ml) 45 minuuttia ja seos suodatetaan. Suodos heitetään pois. Jäljellejäänyttä kiinteätä ainetta uutetaan metanolilla (300 ml) ja metanoli-uute suodatetaan ja väkevöidään tyhjöissä antamaan raakatuote.

Raakatuote puhdistetaan kääntö-faasi-HPLC:lla, kuten vertailuesimerkissä 2 kuvattiin.

15 Debono ryhmän I-johdannaisten valmistus

Seuraava menettely, joka antaa kaavan III, jossa R^5 on



20 sen, kuvaa kaavan III Debono I-yhdisteiden valmistusmenetelmää.

Vertailuvalmistus 2N-(n-dodekanoyyli)-p-aminobentsoehapon valmistus

n-dodekanoyylikloridia (8,74 g; 40 mmoolia) lisätään tiputtaen p-aminobentsoehapon (5,5 g; 40 mmoolia) pyridiini (100 ml)-liuokseen. Seosta sekoitetaan 3 tuntia ja kaadetaan veteen (3 l). Muodostunut sakka suodatetaan ja kuivataan tyhjöissä antamaan N-(n-dodekanoyyli)p-aminobentsoehappo (11,01 g).

30 Vertailuvalmistus 3N-(n-dodekanoyyli)-p-aminobentsoehapon 2,4,5-trikloorifenyyli-esterin valmistus

N-(n-dodekanoyyli)-p-aminobentsoehappoa (11,01 g; 34,5 mmoolia), 2,4,5-trikloorifenolia (7,5 g; 38 mmoolia) ja N,N'-disykloheksyylikarbodi-imidiä (6,94 g; 34,5 mmoo-

lia) liuotetaan metyleenikloridiin (250 ml). Seosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa 3,5 tuntia ja suodatetaan sitten. Suodos haihdutetaan tyhjössä antamaan jäännös, joka kiteytetään asetonitriili/vedestä antamaan N-(n-dodekanoyyli)-p-aminobentsoehapon 2,4,5-trikloorifenyyli-
 5 esterä (12,84 g).

Vertailuesimerkki 7

A-30912A-renkaan asylointi

A-30912A-rengasyhdistettä (8,16 g; 10,2 mmoolia)
 10 ja N-(n-dodekanoyyli)-p-aminobentsoehapon 2,4,5-trikloorifenyyli-esteriä (4,72 g; 10,2 mmoolia) liuotetaan dimetyyli-formamidiin (100 ml). Liuosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa 15 tuntia. Liuotin poistetaan tyhjössä antamaan jäännös, joka pestään kahdesti dietyylieetterillä. Pesu-
 15 nesteet hylätään. Pesty jäännös liuotetaan metanoliin (50 ml) ja puhdistetaan kääntö-faasi-HPLC:lla "Prep LC/System 500"-yksikön avulla (Waters Associates, Inc., Milford, Mass.) käyttäen Prep Pak-500/C₁₈-kolonnia (Waters Associates, Inc.), kiinteänä faasina. Kolonni elu-
 20 oidaan isokraattisesti H₂O/CH₃OH/CH₃CN-seoksella (25:65:10 tilav./tilav.) 500 psi:ssa. Jakeet analysoidaan RLC:lla käyttäen piihappogeeli-levyjä ja H₂O/CH₃OH/CH₃CN-seosta (25:65:10 tilav./tilav.) liuotinsysteeminä. Jakeet, jotka sisältävät halutun tuotteen, yhdistetään ja lyofi-
 25 loidaan antamaan A-30912A-renkaan N-(n-dodekanoyyli)-p-aminobentsoeyyli-johdannainen (3,5 g).

Vertailuesimerkki 8

A-30912B-renkaan asylointi

A-30912B-rengasyhdistettä (10,2 mmoolia) ja N-(n-dodekanoyyli)-p-aminobentsoehapon 2,4,5-trikloorifenyyli-
 30 esterä (10,2 mmoolia) liuotetaan dimetyyli-formamidiin (100 ml). Liuosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa 15 tuntia. Liuotin poistetaan tyhjössä antamaan jäännös, joka pestään kahdesti dietyylieetterillä. Pesunesteet hylätään.
 35 Pesty jäännös liuotetaan metanoliin (50 ml) ja puhdistetaan

kääntö-faasi-HP:C:lla "Prep LC/System 500"-yksikön avulla (Waters Associates, Inc., Milford, Massachusetts) käyttäen Prep Pak-500/C₁₈-kolonnia (Waters Associates, Inc.) kiinteänä faasina. Pylväs eluoidaan isokraattisesti
 5 H₂O/CH₃OH/CH₃CN-seoksella (25:65:10, tilav./tilav.) 500 psi:ssa. Jakeet analysoidaan TLC:lla käyttäen pihappogeeli-levyjä ja liuotinsysteeminä H₂O/CH₃OH/CH₃CN-seosta (25:65:10, tilav./tilav.). Jakeet, jotka sisältävät halutun tuotteen, yhdistetään ja lyofiloidaan antamaan
 10 A-30912B-renkaan N-(n-dodekanoyyli)-p-aminobentsoyyli-johdannainen.

Vertailuesimerkki 9

A-30912D-renkaan asylointi

A-30912D-rengasyhdistettä (10,2 mmoolia) ja N-(n-dodekanoyyli)-p-aminobentsoehapon 2,4,5-trikloorifenyyli-
 15 esterä (10,2 mmoolia) liuotetaan dimetyyliformamidiin (100 ml). Liuosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa 15 tuntia. Liuotin poistetaan tyhjössä antamaan jäännös, joka pestään kahdesti dietyylieetterillä. Pesunesteet hylätään.
 20 Pesty jäännös liuotetaan metanoliin (50 ml) ja puhdistetaan kääntö-faasi-HPLC:lla "Prep LC/System 500"-yksikön avulla (Waters Associates, Inc., Milford, Massachusetts) käyttäen Prep Pak-500/C₁₈-pylvästä (Waters Associates, Inc.) kiinteänä faasina. Pylväs eluoidaan isokraattisesti
 25 H₂O/CH₃OH/CH₃CN-seoksella (25:65:10 tilav./tilav.) 500 psi:ssa. Jakeet analysoidaan TLC:lla käyttäen pihappogeeli-levyjä ja H₂O/CH₃OH/CH₃CN-seosta (25:65:10 tilav./tilav.) liuotinsysteeminä. Jakeet, jotka sisältävät halutun tuotteen, yhdistetään ja lyofiloidaan antamaan
 30 A-30912D-renkaan N-(n-dodekanoyyli)-p-aminobentsoyyli-johdannainen.

Vertailuesimerkki 10

A-30912H-renkaan asylointi

A-30912H-rengasyhdistettä (10,2 mmoolia) ja N-(n-dodekanoyyli)-p-aminobentsoehapon 2,4,5-trikloorifenyyli-

esteriä (10,2 mmoolia) liuotetaan dimetyyliformamidiin (100 ml). Liuosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa 15 tuntia. Liuotin poistetaan tyhjössä antamaan jäännös, joka pestään kahdesti dietyylieetterillä. Pesunesteet hylätään. Pesty jäännös liuotetaan metanoliin (50 ml) ja puhdistetaan kääntö-faasi-HPLC:lla "Prep LC/System 500"-yksikön avulla (Waters Associates Inc., Milford, Massachusetts) käyttäen Prep Pak-500/C18-kolonnia (Water Associates, Inc.) kiinteänä faasina. Kolonni eluoidaan isokraattisesti $H_2O/CH_3OH/CH_3CN$ -seoksella (25:65:10, tilav./tilav.) 500 psi:ssa. Jakeet analysoidaan TLC:lla käyttäen pihappogeeli-levyjä ja $H_2O/CH_3OH/CH_3CN$ -seosta (25:65:10, tilav./tilav.) liuotinsysteeminä. Jakeet, jotka sisältävät halutun tuotteen, yhdistetään ja lyofiloidaan antamaan A-30912H-renkaan N-(n-dodekanoyyli)-p-aminobentsoyyli-johdannainen.

Vertailuesimerkki 11

Kaavan III, jossa R^3 on isobutoksi ja R^5 on

20 $CH_3(CH_2)_{10}CONH - \text{C}_6\text{H}_4 -$, yhdiste, joka on valmistettu

vertailuesimerkin 9 menetelmän mukaisesti, mutta käyttäen lähtöaineena kaavan I yhdistettä, jossa R^3 on isobutoksi, (valmistettu esimerkin 13 menetelmän mukaisesti).

25 Vertailuesimerkki 12

S 31794/F-1-renkaan asylointi

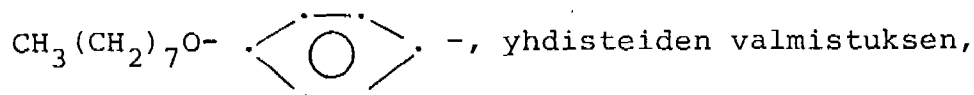
S 31794/F-1-rengasyhdistettä (10,2 mmoolia) ja N-(n-dodekanoyyli)-p-aminobentsoehapon 2,4,5-trikloorifenyyli-esteriä (10,2 mmoolia) liuotetaan dimetyyliformamidiin (100 ml). Liuosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa 15 tuntia. Liuotin poistetaan tyhjössä antamaan jäännös, joka pestään kahdesti dietyylieetterillä. Pesunesteet hylätään. Pesty jäännös liuotetaan metanoliin (50 ml) ja puhdistetaan kääntö-faasi-HPLC:lla "Prep LC/System 500"-yksikön avulla (Waters Associates, Inc., Milford,

Massachusetts) käyttäen Prep Pak-500/C18-kolonnia (Water Associates, Inc.) kiinteänä faasina. Kolonni eluoidaan isokraattisesti $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{CN}$ -seoksella (25:65:10, tilav./tilav.) 500 psi:ssa. Jakeet analysoidaan TLC:lla käyttäen piihappogeeli-levyjä ja liuotinsysteeminä $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{CN}$ -seosta (25:65:10, tilav./tilav.). Jakeet, jotka sisältävät halutun tuotteen, yhdistetään ja lyofiloidaan antamaan S 31794/F-1-renkaan-N-(n-dodekanoyyli)-p-aminobentsoyyli-johdannainen.

10 Debono-ryhmän II-johdannaisen valmistus

Seuraava menetelmä, joka antaa kaavan III, jossa

R^5 on



15 valaisee menetelmää kaavan III Debono II-yhdisteiden valmistamiseksi.

Vertailuvalmistus 4

p-(n-oktyylioksi)bentsoehapon valmistus

Liuos, jossa on p-hydroksibentsoehapon (19,2 g, 150 mmoolia) 10-%:ssa vesipitoisessa natriumhydroksidissa (120 ml), lisätään dimetyylisulfoksiiniin (DMSO) (480 ml), joka on sitä ennen kuumennettu 80°C :een. Liuokseen lisätään tiputtaen n-oktyylibromidia (28,95 g, 150 mmoolia). Reaktioseosta sekoitetaan 4 tuntia huoneen lämpötilassa, minkä jälkeen se kaadetaan jääveteen (1200 ml). Lisätään väkevää kloorivetyhappoa (30 ml) ja seoksen annetaan seistä kunnes saostuminen on täydellinen. Sakka kootaan, kuivataan ja kiteytetään asetonitriili-vedestä. Sp. $97-99^\circ\text{C}$.

Analyysi $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3$:lle

30 Laskettu: C, 71,97; H, 8,86

Löydetty: C, 71,72; H, 9,10.

Vertailuvalmistus 5p-(n-oktyylioksi)bentsoehapon 2,4,5-trikloorifenyyli-esterin valmistus

- p-(n-oktayylioksi)bentsoehappoa (6,18 g, 24,7 mmoolia), 2,4,5-trikloorifenolia (5,39 g, 27,2 mmoolia) ja N,N'-disykloheksyylikarbodi-imidiä (4,94 g, 24,7 mmoolia) liuotetaan metyleenikloridiin (200 ml). Seosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa 18 tuntia ja suodatetaan sitten. Suodos haihdutetaan antamaan öljy, joka kiteytetään
- 10 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$:sta antamaan p-(n-oktyylioksi)-bentsoehapon 2,4,5-trikloorifenyyli-esteri.
- BMR-analyysi: δ 4,02 (2H, t, J = 3Hz), δ 7,0 (1H, d, J = 4Hz), 7,23 (s, 1H), 7,3 (s, 1H), 8,08 (d, 1H, J = 3Hz).

Vertailuesimerkki 1315 A-30912A-renkaan asylointi

- A-30912A-rengasyhdistettä (14,2 g, 17,8 mmoolia) ja p-(n-oktyylioksi)-bentsoehapon 2,4,5-trikloorifenyyli-esteriä (15,32 g, 35,7 mmoolia) liuotetaan dimetyyli-formamidiin (150 ml). Liuosta sekoitetaan huoneen lämpö-
- 20 tilassa 16-20 tuntia. Liuotin poistetaan tyhjössä ja jäännös pestään kahdesti dietyylieetterillä ja kahdesti metyleenikloridilla. Pesunesteet hylätään. Pesty jäännös liuotetaan etyyliasetaatti/metanoliin (1:3, 80 ml) ja puhdistetaan HPLC:lla käyttäen "Prep LC/System 500"-yksikköä
- 25 pihappogeeli kiinteänä faasina. Kolonnia eluoidaan vaiheittain metanoli/etyyliasetaatti (1:4 - 2:3)-liuotinsysteemeillä. Jakeet analysoidaan pihappogeeli (Merck)-TLC:lla käyttäen liuotinsysteeminä etyyliasetaatti/metanolia (3:2, tilav./tilav.). Jakeet, joista A-30912A-rengas
- 30 puuttuu, yhdistetään ja lyofiloidaan antamaan A-30912A-renkaan p-(n-oktyylioksi)bentsoeyyli-johdannainen. Saalis: 7,13 g; $M^+ + 23$: 1052 (FDMS:lla).

Vertailuesimerkki 14A-30912B-renkaan asylointi

A-30912B-rengasyhdistettä (17,8 mmoolia) ja p-(n-oktyylioksi)bentsoehapon 2,4,5-trikloorifenyyli-esteriä (35,7 mmoolia) liuotetaan dimetyyliformamidiin (150 ml). Liuosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa 16-20 tuntia. Liuotin poistetaan tyhjössä ja jäännös pestään kahdesti dietyylieetterillä ja kahdesti metyleenikloridilla. Pesunesteet hylätään. Pesty jäännös liuotetaan etyyliasetaatti/metanoliin (1:3) (80 ml) ja puhdistetaan HPLC:lla käyttäen "Prep LC/System 500"-yksikköä ja piihappogeeliä kiinteänä faasina. Kolonnia eluoidaan vaihteittain metanoli/etyyliasetaatti (1:4 - 2:3)-liuotinsysteemeillä. Jakeet analysoidaan TLC:lla käyttäen piihappogeeliä (Merck) ja etyyliasetaatti/metanolia (3:2 tilav./tilav.) liuotinsysteeminä. Jakeet, joista A-30912B-rengas puuttuu, yhdistetään ja lyofiloidaan antamaan A-30912B-renkaan p-(n-oktyylioksi)bentsoyyli-johdannainen.

Vertailuesimerkki 1520 A-30912D-renkaan asylointi

A-30912D-rengasyhdistettä (17,8 mmoolia) ja p-(n-oktyylioksi)bentsoehapon 2,4,5-trikloorifenyyli-esteriä (35,7 mmoolia) liuotetaan dimetyyliformamidiin (150 ml). Liuosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa 16-20 tuntia. Liuotin poistetaan tyhjössä ja jäännös pestään kahdesti dietyylieetterillä ja kahdesti metyleenikloridilla. Pesunesteet hylätään. Pesty jäännös liuotetaan etyyliasetaatti/metanoliin (1:3) (80 ml) ja puhdistetaan HPLC:lla käyttäen "Prep LC/System 500"-yksikköä ja piihappogeeliä kiinteänä faasina. Kolonnia eluoidaan vaihteittain metanoli/etyyliasetaatti (1:4 - 2:3)-liuotinsysteemeillä. Jakeet analysoidaan TLC:lla käyttäen piihappogeeliä (Merck) ja etyyliasetaatti/metanolia (3:2, tilav./tilav.) liuotinsysteeminä. Jakeet, joista A-30912B-rengas puuttuu, yhdistetään ja lyofiloidaan antamaan A-30912D-renkaan p-(n-ok-

tyylioksi)bentsoyyli-johdannainen.

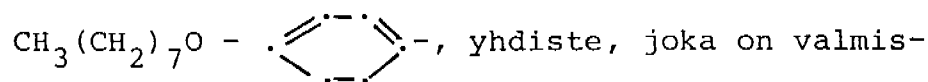
Vertailuesimerkki 16

A-30912H-renkaan asylointi

- A-30912H-rengasyhdistettä (17,8 mmoolia) ja p-
- 5 (n-oktyylioksi)bentsoehapon 2,4,5-trikloorifenyyli-esteriä (35,7 mmoolia) liuotetaan dimetyyliformamidiin (150 ml). Liuosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa 16-20 tuntia. Liuotin poistetaan tyhjössä ja jäännös pestään kahdesti dietyylieetterillä ja kahdesti metyleenikloridilla. Pesu-
- 10 nesteet hylätään. Pesty jäännös liuotetaan etyyliasetaatti/metanoliiin (1:3) (80 ml) ja puhdistetaan HPLC:lla käyttäen "Prep LC/System 500"-yksikköä ja piihappogeeliä kiinteänä faasina. Kolonnia eluoidaan vaihteittain metanoli/etyyliasetaatti (1:4 - 2:3)-liuotinsysteemeillä. Jakeet ana-
- 15 lysoidaan TLC:lla käyttäen piihappogeeliä (Merck) ja etyyliasetaatti/metanolia (3:2, tilav./tilav.) liuotinsysteeminä. Jakeet, joista A-30912H-rengas puuttuu, yhdistetään ja lyifiloidaan antamaan A-30912H-renkaan p-(n-oktyylioksi)-bentsoyyli-johdannainen.

20 Vertailuesimerkki 17

Kaavan III, jossa R^3 on n-heksyylioksi ja R^5 on



- 25 tettu vertailuesimerkin 16 menetelmän mukaisesti, mutta käyttäen lähtöaineena kaavan I, jossa R^3 on n-heksyylioksi, yhdistettä (valmistettu esimerkin 15 menetelmällä).

Vertailuesimerkki 18

S 31794/F-1-renkaan asylointi

- 30 S 31794/F-1-rengasyhdistettä (17,8 mmoolia) ja p-(n-oktyylioksi)bentsoehapon 2,4,5-trikloorifenyyli-esteriä (35,7 mmoolia) liuotetaan dimetyyliformamidiin (150 ml). Liuosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa 16-20 tuntia. Liuotin poistetaan tyhjössä ja jäännös pestään
- 35 kahdesti dietyylieetterillä ja kahdesti metyleenikloridilla.

Pesunesteet hylätään. Pesty jäännös liuotetaan etyyli-
 asetaatti/metanoliin (1:3) (80 ml) ja puhdistetaan
 HPLC:lla käyttäen "Prep LC/System 500"-yksikköä sekä pii-
 happogeeliä kiinteänä faasina. Kolonnia eluoidaan vaiheit-
 5 tain metanoli/etyyliasetatti (1:4 - 2:3)-liuotinsys-
 teemillä. Jakeet analysoidaan TLC:lla käyttäen piihappo-
 geeliä (Merck/ ja etyyliasetatti/metanolia (3:2, tilav./ti-
 lav.) liuotinsysteeminä. Jakeet, joista S 31794/F-1-ren-
 gas puuttuu, yhdistetään ja lyofiloidaan antamaan
 10 S 31794/F-1-renkaan p-(n-oktyylioksi)bentsoyyli-johdan-
 nainen.

Vertailuesimerkki 19

Kaavan III yhdisteiden sienenesto vaikutus voidaan
 osoittaa in vitro standardi-levy-diffuusioteesteissä ja
 15 agar-laimennustesteissä sekä in vivo standardi-testeissä
 hiirillä, joilla testeillä arvioidaan tehokkuus systemaat-
 tista sieni-infektiota vastaan. Kaavan III edustavien
 yhdisteiden sienenestotestien tulokset on esitetty taulu-
 koissa IV-VIII.

20 Taulukot IV ja V antavat vertailuesimerkkien 1, 7
 ja 13 yhdisteiden tulokset in vitro-testeistä agar-levy-
 diffuusiomenetelmin. Taulukossa IV aktiivisuus mitataan
 mikro-organismin havaitun estovyöhykkeen, jonka testiyhdis-
 te on saanut aikaan, koolla (läpimitta millimetreissä).
 25 Taulukossa V aktiivisuus mitataan aineen (mg/levy) vähim-
 mäisestoväkevyydellä (MIC), joka vaaditaan estämään testi-
 organismin kasvu. Taulukko VI antaa tulokset A-30912A-
 renkaan p-(n-oktyylioksi)bentsoyyli-johdannaisen testauk-
 sesta in vitro viittä *Candida albicans*-kantaa vastaan
 30 agar-laimennusmenetelmällä. Taulukossa VI aktiivisuus mi-
 tataan aineen (mg/ml) vähimmäisestoväkevyydellä (MIC),
 joka tarvitaan estämään testi-organismi.

Tulokset in vivo-testeistä näiden johdannaisten
 tehokkuuden arvioimiseksi *Candida albicans* A-26:n hiirissä
 35 aiheuttamaa tartuntaa vastaan on annettu taulukossa VII.

- Näissä testeissä aktiivisuus mitataan ED_{50} -arvolla (annos mg/kg:ssa, joka tarvitaan parantamaan 50 % testi-eläimistä). Kun ED_{50} -arvoa ei saatu, aktiivisuus osoitetaan pienemmällä annoksella, jolla havaitaan merkittävä sienenestovaikutus. Näissä testeissä urospuolisten albinohiirien (spesifisesti patogeeni-vapaita), jotka painavat 18-20 g, ryhmiä tartutetaan laskimonsisäisesti *Candida albicans* A-26:lla. Hiiriä säteilytetään röntgensäteillä 24 tuntia ennen tartuttamista n. 50 röntgen'illä/min.
- 8 minuutin ajan (yhteensä 400 annosta) immuunireaktioiden vähentämiseksi tartuttavaa organismia vastaan. 0, 4 ja 24 tuntia tartuttamisen jälkeen kullekin hiiriryhmälle annetaan ihonalaisesti asteittaisia annoksia testiyhdistettä suspensiona 33-%:ssa polyetyleeniglykoli(PEG)-vedessä.
- Kuolinpäivä merkitään muistiin jokaiselle eläimelle. Student'in testin tilastollinen vertailu keskimääräisestä kuolinpäivästä tehdään tartutettujen käsiteltyjen eläinten, jollakin nimenomaisella annostasolla, ryhmän ja 10 tartutetun käsittelemättömän eläimen välillä sen määrittämiseksi pidentääkö käsittely merkittävästi eloonjäämisaikaa.

- Taulukko VIII antaa tulokset vertailuesimerkkien 1, 7 ja 13 yhdisteiden testauksesta absorption suhteen suun kautta antamisen jälkeen. Näissä testeissä hiirille annetaan letkuruokinnalla 416 mg/kg:n annos testiyhdistettä suspendoituna 33-%:seen PEG 400-veteen. Aika-ajoin otetaan verinäytteitä silmäkuopan pohjukasta ja analysoidaan antibioottisen aktiivisuuden suhteen seuraavasti: 7 mm:n levy, joka sisältää 20 ml täysverta, pannaan agarille, johon on ympätty *Aspergillus montivindicis*-A35137. 40 tunnin inkuboinnin jälkeen 30°C :ssa estovyöhykkeitä verinäytteistä verrataan standardiin, joka on saatu testiyhdisteestä, ja yhdisteen määrä verinäytteessä lasketaan.

Taulukko IV
A-30912A-renkaan johdannaisia
Sienenestovaikutus agar-levy-diffuusiotestillä

Kaavan III yhdisteet Estovyöhykkeen koko (mm)^a

Vertailu- esimerkki nro	R ⁵ =	Saccharomyces pastorianus X-52	Neurospora crassa 846	Trichophyton . Candida mentagrophytes albicans	
				A-23	A-26
1	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ -	21	32	60*	30
7	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CONH- 	21 17	33* 35*	55* 56*	23 19
13	CH ₃ (CH ₂) ₇ O- 	18	23*	--	28

* Selvä mitattava estovyöhyke, jossa organismin uudelleenkasvua levyn ympärillä.

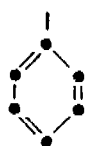
^aYhdisteet testattiin metanoli-suspensioina pitoisuudessa 1 mg/ml kastamalla

7 mm:n levy suspensioon ja panemalla se agar-pinnalle.

Inkubointi: 24-48 tuntia 25-37°C:ssa.

Taulukko V

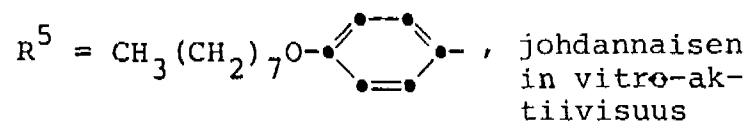
A-30912A-renkaat johdannaisia
Sienenestovaikutus agar-levy-diffuusioteistillä

Vertailu- esimerkki- nro	Kaavan III yhdisteet		MIC (mg/levy) *	
	R ⁵ =	Candida albicans A-26	Trichophyton mentagrophytes #6	
1	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ -	0.625	0.039	
7	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CONH- 	0.625 1.25	>0.039 0.678	
13	CH ₃ (CH ₂) ₇ O- 	0.156 >0.302(0.312)**		

* Yhdisteet oli suspendoitu 0,01M natriumboraatti-liuokseen, pH 7,5. Yhdistettä testattiin huipputasolla 20 mg/levy ja kaksinkertaisissa laimennuksissa, kunnes päätepisteet saavutettiin. Inkubointi: 24 h; 30°C.

** 5 eristettyä tuotetta vastaan.

Taulukko VI
A-30912A-renkaan, jossa



Candida albicans-kantoja vastaan

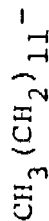
MIC (ug/ml)				
<u>A26</u>	<u>SBH 16</u>	<u>SBH 31</u>	<u>SBH 28</u>	<u>SBH 29</u>
0,312	0,312	0,312	0,312	0,312

Taulukko VII

A-30912A-renkaan johdannaisia

Terapeuttinen vaikutus *C.albicansia* vastaan hiirillä

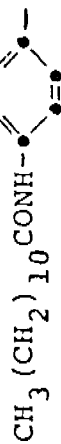
Vertailu- esimerkki nro	<u>Kaavan III yhdisteitä</u>	Annos- ohjel- ma x	ED ₅₀ (mg/kg)	Pienin vaikuttava annos	(mg/kg)
		R ⁵ =			



B

34

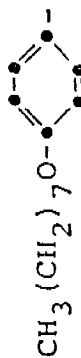
20



A

15
15

10
>5



A

13
22.2

10
>12.5

x Annosohjelmat: A = 40, 20, 15 ja 10 mg/kg; B = 80, 40, 20 ja 10 mg/kg.

Annos, joka on annettu 0, 4 ja 24 tuntia injektioonin jälkeen testiyhdisteen suspensiona 30 %:ssa PEG-H₂O:ssa. Hiirien lukumäärä, jotka saivat testi-yhdisteitä jokaisella annostasolla: 6 hiirtä/ryhmä. Hiirien lukumäärä vertailu- (käsittelemättömässä) ryhmässä: 10 hiirtä/ryhmä.

xx Mitattuna käsiteltyjen eläinten eloonjäämisajan lisäksi verrattuna vertailuryhmään, laskettu L.J. Reed:iin ja H. Muench'in menetelmällä, Amer. J. Hygiene, 27, 493-497 (1938).

Taulukko VIII

A-30912A-renkaan johdannaisia

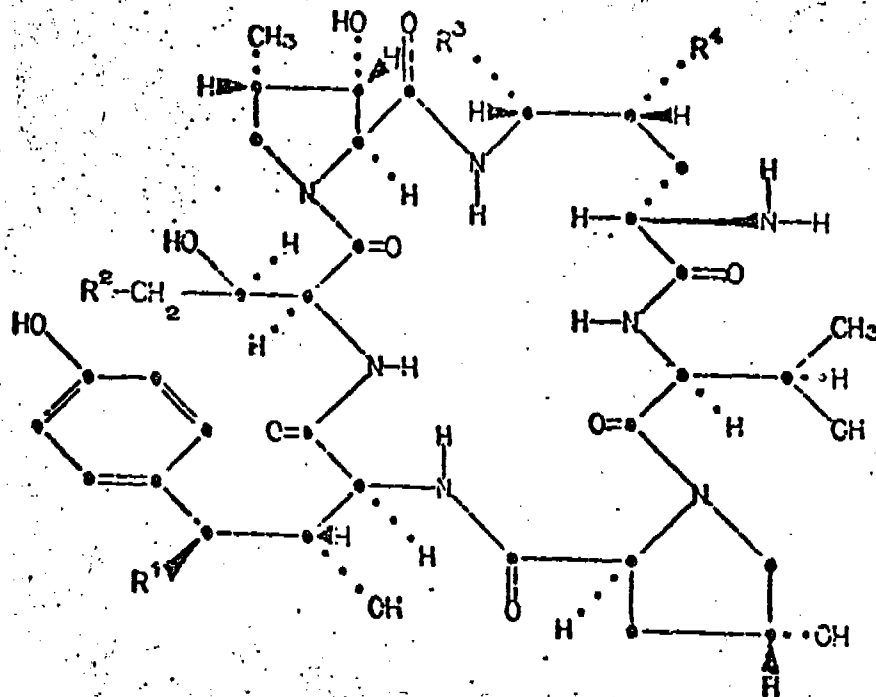
Veriarvot suun kautta antamisen jälkeen hiirille

Vertailu- esimerkki nro	Kaavan III yhdisteet	
	$R^5 =$	Veriarvot * (mg/ml)
1	$CH_3(CH_2)_{11}-$	0.10
7	$CH_3(CH_2)_{10}CONH-$ 	0.83
13	$CH_3(CH_2)_7O-$ 	23.

* Neljä tuntia testi-yhdisteen antamisen jälkeen annoksella 416 mg/kg antamalla yhdisteen suspensiona 30-%:ssa PEG 400-H₂O:ssa. Yhdiste määritetty bioanalyyysillä Aspergillus montevidensis A-35137:ää vastaan.

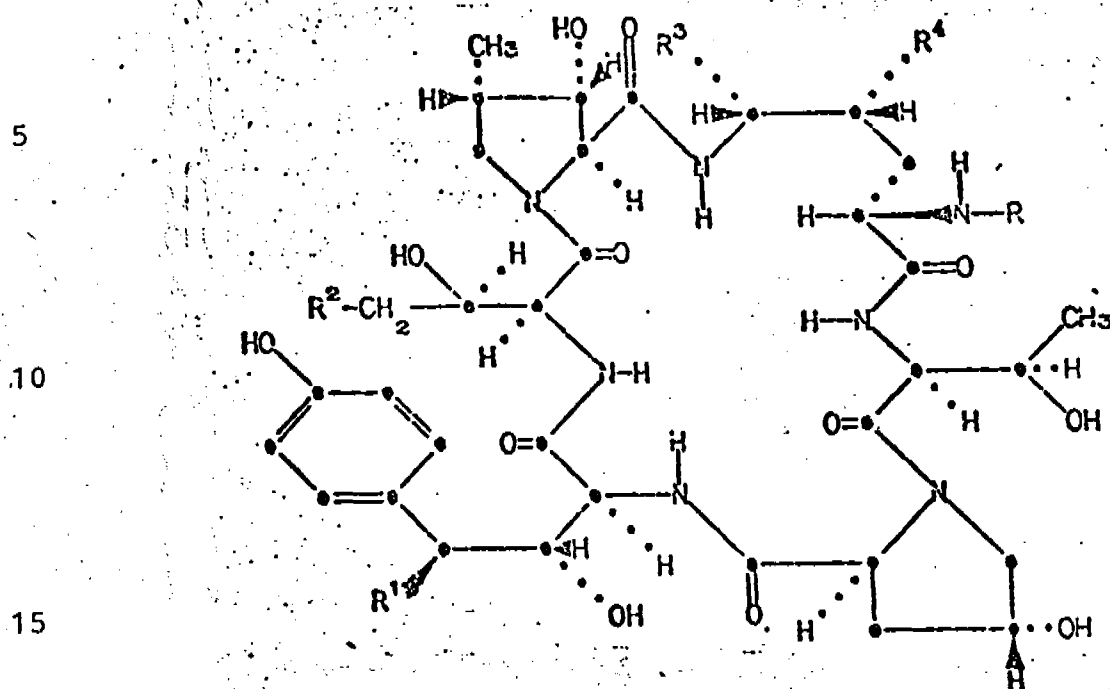
Patenttivaatimukset

1. Syklinen peptidi-rengas, joka on välituote valmistetta-
essa puolisynteettisiä sienenestoaineita ja jolla on kaava:



jossa R^1 on H tai OH ja; kun R^1 on H, on R^2 H ja R^3 ja R^4
ovat kumpikin H tai kumpikin OH, ja kun R^1 on OH, on R^2 H,
 R^3 on OH tai C_1-C_6 alkoksi ja R^4 on OH, tai R^2 on
 $-C(=O)-NH_2$ ja R^3 ja R^4 ovat kumpikin OH, sekä sen happoadditio-
suolat.

2. Menetelmä kaavan I mukaisen syklisen peptidi-renkaan
ja sen happoadditiosuolojen valmistamiseksi, t u n n e t t u
siitä, että vesipitoisessa väliaineessa saatetaan syklinen pep-
tidiantibiotti, jolla on kaava:



II

jossa R^1 on H tai OH ja; kun R^1 on H, on R^2 H ja R^3 sekä R^4 ovat kumpikin H tai kumpikin OH ja R on stearoyyli tai linoleoyyli, ja kun R^1 on OH, on R^2 H ja R^4 on OH, R^3 on OH ja R on stearoyyli, linoleoyyli tai palmitoyyli, tai R^3 on C_1-C_6 alkoksi ja R on stearoyyli tai linoleoyyli, ja kun R^1 , R^3 , R^4 ovat OH ja R^2 on

$\begin{matrix} O \\ || \\ -C-NH_2 \end{matrix}$, on R myristoyyli, kosketukseen deasyloivan entsyymin kanssa, joka on tuotettu eräällä Actinoplanaceae-heimon mikro-organismilla.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että Actinoplanaceae-heimon mikro-organismi on Actinoplanes-suvun jäsen.

4. Patenttivaatimuksen 2 tai 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mikro-organismi on Actinoplanes utahensis.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mikro-organismi on A. utahensis NRRL 12052 tai sen mutantti, joka tuottaa tätä entsyymiä.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mikro-organismi on *A. utahensis* NRRL 12052.

7. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mikro-organismi on *Streptosporangium roseum* var. hollandensis NRRL 12064, tai sen mutantti, joka tuottaa tätä entsyymiä.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mikro-organismi on *Streptosporangium roseus* var. hollandensis NRRL 12064.

9. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mikro-organismi on *Actinoplanes missouriensis* NRRL 12053 tai sen mutantti, joka tuottaa tätä entsyymiä.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mikro-organismi on *Actinoplanes missouriensis* NRRL 12053.

11. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mikro-organismi on *Actinoplanes* sp. NRRL 12065 tai sen mutantti, joka tuottaa tätä entsyymiä.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mikro-organismi on *Actinoplanes* sp. NRRL 12065.

13. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mikro-organismi on *Actinoplanes* sp. NRRL 8122 tai sen mutantti, joka tuottaa tätä entsyymiä.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mikro-organismi on *Actinoplanes* sp. NRRL 8122.

15. Jonkin patenttivaatimuksen 2-14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että tätä entsyymiä on läsnä tuottavan *Actinoplanaceae*-mikro-organismin viljelyssä.

16. Jonkin patenttivaatimuksen 2-15 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää lisävaiheen, jossa syklinen peptidi-rengas tai sen suola eristetään käymisseoksesta.

17. Jonkin patenttivaatimuksen 2-16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää lisävaiheen, jossa syklinen peptidi-rengas tai sen suola puhdistetaan.

Patentkrav

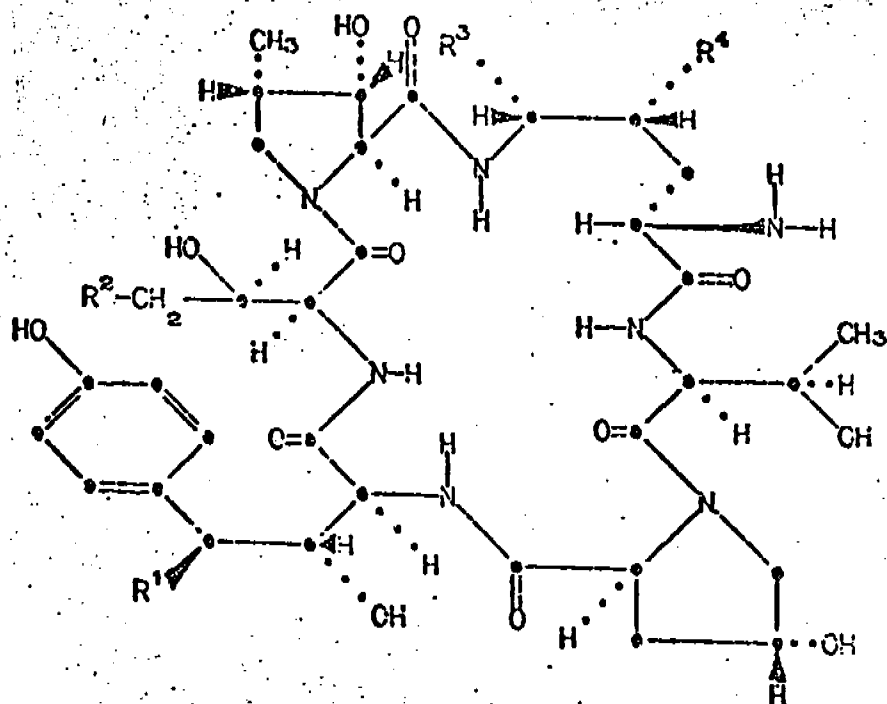
1. Cyklisk peptidring som är en mellanprodukt vid framtällning av halvsyntetiska fungistatiska medel och som har formeln

5

10

15

20

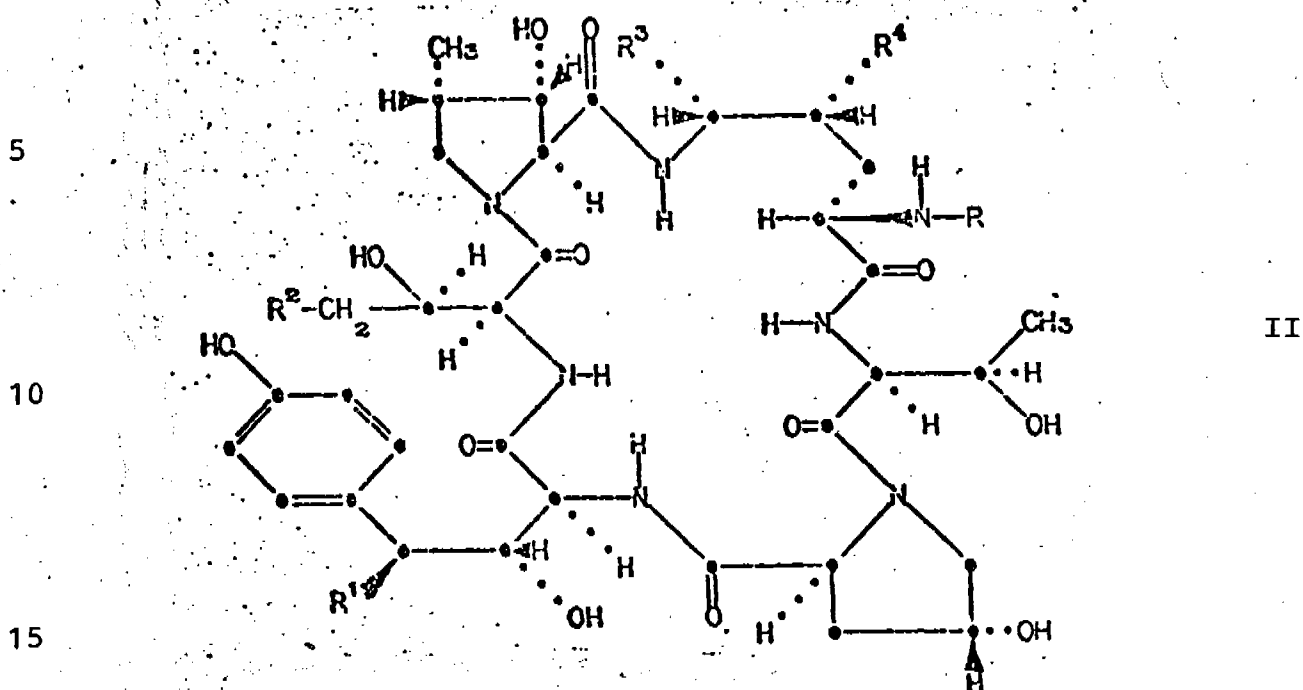


I

där R^1 är H eller OH och, då R^1 är H, är R^2 H och R^3 och R^4 är
 25 båda H eller båda OH, och då R^1 är OH, är R^2 H, R^3 är OH eller C_1-C_6 alkoxi och R^4 är OH, eller R^2 är

$\begin{matrix} O \\ || \\ -C-NH_2 \end{matrix}$ och R^3 och R^4 är båda OH, och syraadditionssalter därav.

2. Förfarande för framställning av en cyklisk peptidring med
 30 formeln I och syraadditionssalter därav, k ä n n e t e c k n a t
 därav, att en cyklisk peptidantibiot med formeln:



där R^1 är H eller OH och, då R^1 är H, är R^2 H och R^3 och R^4 är
 båda H eller båda OH och R är Stearoyl eller linoleoyl, och då
 20 R^1 är OH, är R^2 H och R^4 är OH, R^3 är OH och R är stearoyl,
 linoleoyl eller palmitoyl, eller R^3 är C_1-C_6 alkyloxi och R är
 stearoyl eller linoleoyl, och då R^1 , R^3 , R^4 är OH och R^2 är

-C(=O)-NH_2 , är R myristoyl, i ett vattenhaltigt medium bringas i kon-
 25 takt med ett deacylerande enzym som producerats av en mikro-
 organism av familjen Actinoplanaceae.

3. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a t
 därav, att mikroorganismen av familjen Actinoplanaceae är ett led
 av genuset Actinoplanes.

30 4. Förfarande enligt patentkravet 2 eller 3, k ä n n e -
 t e c k n a t därav, att mikroorganismen är Actinoplanes utahensis.

5. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t
 därav, att mikroorganismen är A. utahensis NRRL 12052 eller en
 mutant därav som producerar enzymet.

35 6. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a t
 därav, att mikroorganismen är A. utahensis NRRL 12052.

7. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att mikroorganismen är *Streptosporangium roseum* var. *hollandensis* NRRL 12064 eller en mutant därav, som producerar enzymet.

5 8. Förfarande enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a t därav, att mikroorganismen är *Streptosporangium roseum* var. *hollandensis* NRRL 12064.

9. Förfarande enligt patentkravet 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att mikroorganismen är *Actinoplanes missouriensis* NRRL 12053 eller en mutant därav som producerar enzymet.

10 10. Förfarande enligt patentkravet 9, k ä n n e t e c k n a t därav, att mikroorganismen är *Actinoplanes missouriensis* NRRL 12053.

11. Förfarande enligt patentkravet 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att mikroorganismen är *Actinoplanes* sp. NRRL 12065 eller en
15 mutant därav som producerar enzymet.

12. Förfarande enligt patentkravet 11, k ä n n e t e c k n a t därav, att mikroorganismen är *Actinoplanes* sp. NRRL 12065.

13. Förfarande enligt patentkravet 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att mikroorganismen är *Actinoplanes* sp. NRRL 8122 eller en
20 mutant därav som producerar enzymet.

14. Förfarande enligt patentkravet 13, k ä n n e t e c k n a t därav, att mikroorganismen är *Actinoplanes* sp. NRRL 8122.

15. Förfarande enligt något av patentkraven 2-14, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att enzymet är närvarande i en odling av
25 den producerande *Actinoplanacea* mikroorganismen.

16. Förfarande enligt något av patentkraven 2-15, k ä n n e -
t e c k n a t av ett ytterligare steg för isolering av den
cykliska peptidringen eller ett salt därav ur fermentations-
blandningen.

30 17. Förfarande enligt något av patentkraven 2-16, k ä n n e -
t e c k n a t av ett ytterligare steg för rening av den cykliska
peptidringen eller ett salt därav.

