



(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 149080 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 2470/81

(22) Indleveringsdag: 04 jun 1981

(41) Alm. tilgængelig: 07 dec 1981

(44) Fremlagt: 13 jan 1986

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 06 jun 1980 JP 5576127

22 aug 1980 JP 55115483

08 sep 1980 JP 55124385

19 sep 1980 JP 55130311

(51) Int.Cl.⁴: C 12 P 17/06

C 12 P 7/62

C 07 C 69/33

C 07 D 309/30

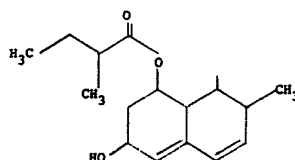
(71) Ansøger: *SANKYO COMPANY LIMITED; Tokyo, JP.

(72) Opfinder: Akira *Terahara; JP, Minoru *Tanaka; JP.

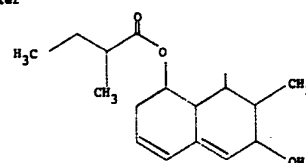
(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af derivater af
ML-236B-carboxylsyre

(57) Sammendrag:

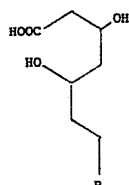


eller



2470-81

Forbindelser med formlen (I):



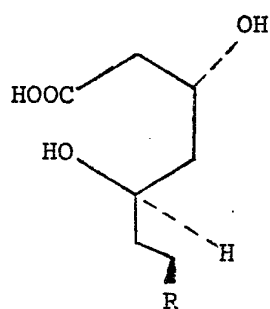
(I)

hvor R betegner en gruppe med formlen

og de tilsvarende ringsluttede lactoner, salte (især alkalimetalsalte) og estere (især C₁-C₅-alkylestere) deraf kan fremstilles ved at underkaste ML-236B eller ML-236B-carboxylsyre eller et salt eller en ester deraf enzymatisk hydroxylering, hvilket kan foretages ved hjælp af mikroorganismer af slægterne Mucor, Rhizopus, Zygorhynchus, Circinella, Actinomucor, Gongronella, Phycomyces, Martierella, Pycnoporus, Rhizoctonia, Absidia, Cunninghamella, Syncephalastrum og Streptomyces eller ved hjælp af cellefri, enzymholdige ekstrakter fra nævnte mikroorganismer.

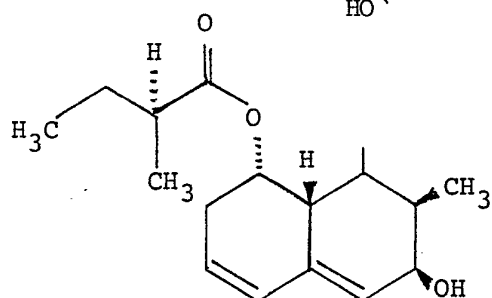
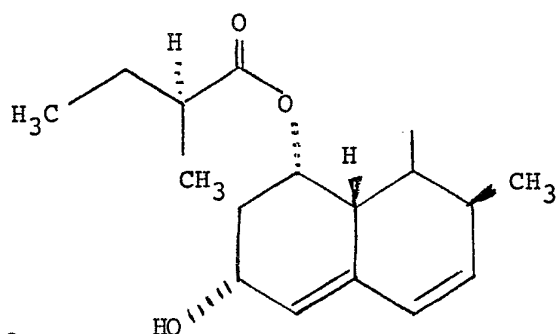
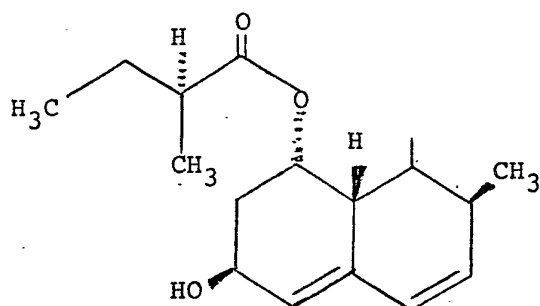
Forbindelserne er i stand til at inhibere biosyntesen af kolesterol og er således nyttige til behandling af hyperkolesterolemier.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte derivater af ML-236B-carboxylsyre med formlen (I):

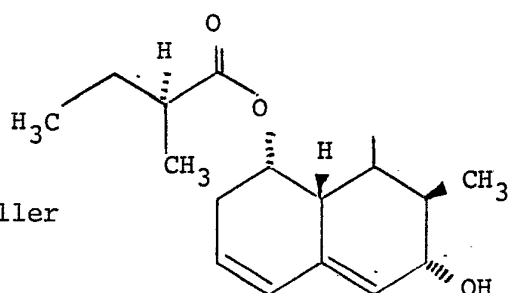


(I),

hvor R betegner en gruppe med formlen

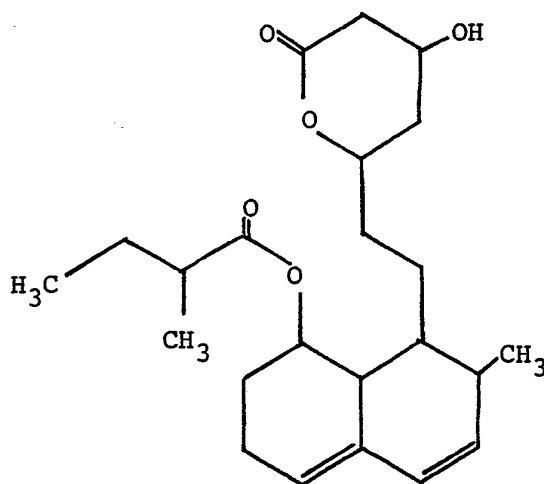


eller



eller en ringsluttet lacton, et salt eller en ester deraf.

ML-236B, som har følgende kemiske formel:

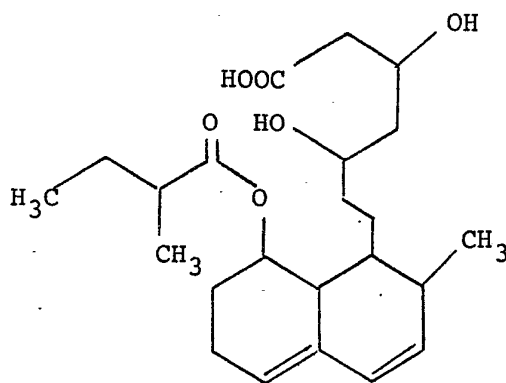


er omhandlet i US patentskrift nr. 3.983.140. Den er blevet isoleret og rensat ud fra stofskifteprodukterne fra mikroorganismer af slægten *Penicillium*, især *Penicillium citrinum*, en blåskimmelart. Den har været demonstreret at inhibere biosyntesen af kolesterol ved hjælp af enzymer eller dyrkede celler fraskilt fra forsøgsdyr ved konkurrence med det hastighedsbegrænsende enzym, der er aktivt ved biosyntesen af kolesterol, nemlig 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzym A-reduktase, og som resultat reduceres kolesterolmængderne i serum hos dyr signifikant [Journal of Antibiotics, 29, 1346 (1936)]. Et antal forbindelser, der strukturelt er beslægtede med ML-236B, har man også fundet frem til, hvilke forbindelser har vist sig at have evnen til at inhibere kolesterolbiosyntesen.

Det har nu overraskende vist sig, at det ved hjælp af enzymatisk hydroxylering af ML-236B eller visse derivater deraf er muligt at fremstille ovennævnte hidtil ukendte derivater af ML-236B-carboxylsyre, som har en evne til

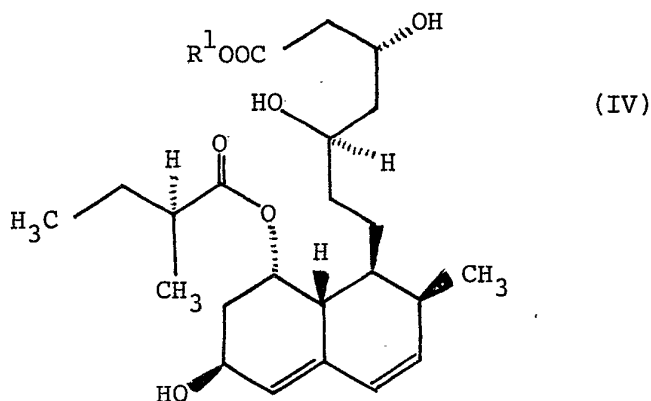
at inhibere biosyntesen af cholesterol, der i det mindste kan sidestilles med og i visse tilfælde i væsentlig grad overgår ML-236B's evne til at inhibere kolesterolbiosyntesen.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er i overensstemmelse hermed ejendommelig ved, at man enzymatisk hydroxylerer en forbindelse valgt blandt ML-236B-carboxylsyre med formelen

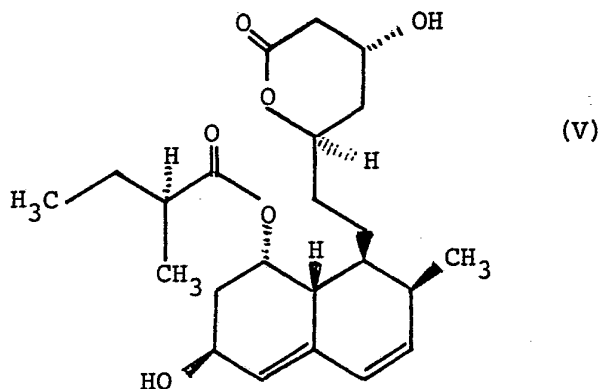


eller en ringsluttet lacton (ML-236B), et salt eller en ester deraf, og fra reaktionsblandingen isolerer en eller flere af forbindelserne med formlen I, eventuelt i form af en ringsluttet lacton, et salt eller en ester deraf.

Hydroxycarboxylsyren med formlen (IV)

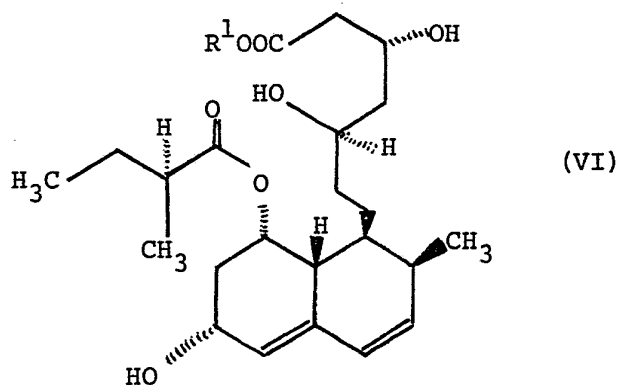


hvor R^1 betegner et hydrogenatom, omtales heri som M-4, og saltene og esterne betegnes som derivater af M-4, medens den tilsvarende lacton med formlen (V)

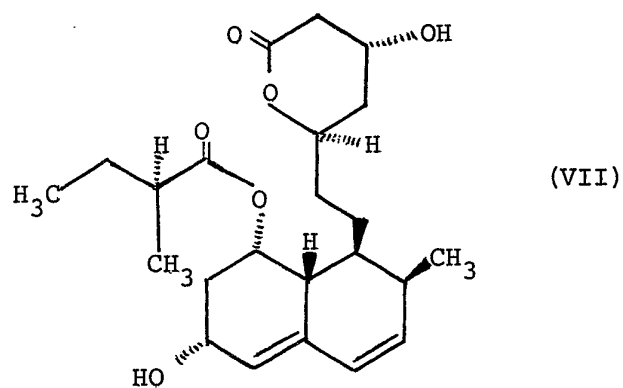


heri omtales som M-4 lacton.

På tilsvarende måde omtales hydroxycarboxylsyren med form-
len (VI)

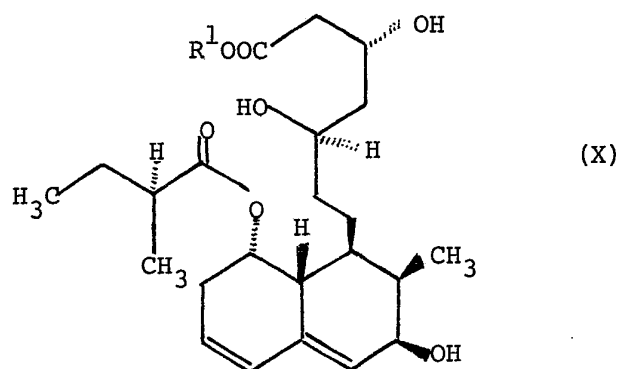


hvor R^1 betegner et hydrogenatom, som M-4', og saltene og estrene af denne syre omtales som derivater af M-4', medens den tilsvarende lacton med formlen (VII)

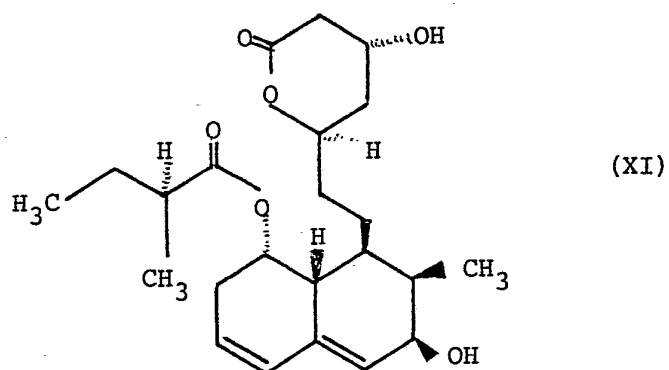


omtales som M-4' lacton.

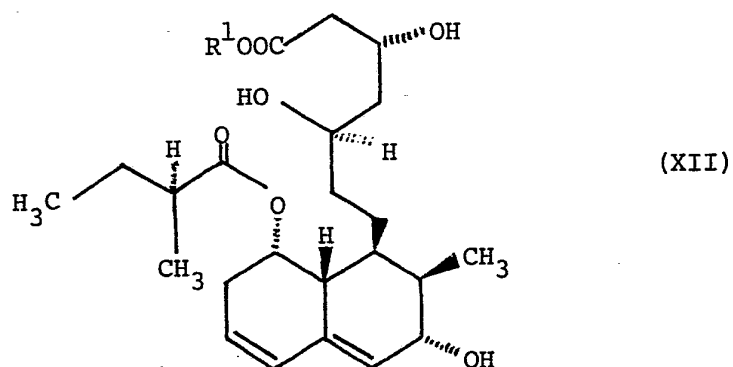
Syren med formelen (X)



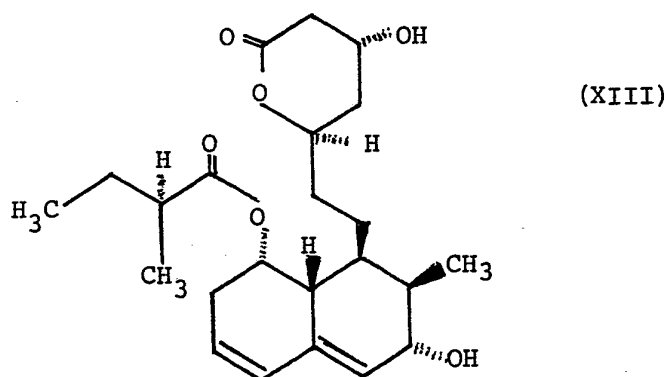
omtales heri som IsoM-4, og dens salte og estere omtales som derivater af IsoM-4, medens den tilsvarende lacton med formelen (XI)



heri omtales som IsoM-4 lacton. Syren med formlen (XII)



hvor R^1 betegner et hydrogenatom, omtales heri som IsoM-4', og dens salte og estere omtales som derivater af IsoM-4', medens dens tilsvarende lacton med formlen (XIII)



heri omtales som IsoM-4' lacton.

Af esterne af hydroxycarboxylsyernerne med formlen (I) foretrækkes C_1 - C_5 -alkylesterne. Disse alkylgrupper kan være ligekædede eller forgrenede grupper og f.eks. indbefatte methyl-, ethyl-, propyl-, isopropyl-, butyl- og isobutylgruppen, hvoraf methylgruppen navnlig foretrækkes.

Hydroxycarboxylsyernerne vil også danne salte med en række forskellige kationer, især metaller og mest foretrukket alkalimetaller, såsom natrium eller kalium. Natriumsaltene er de mest foretrukne.

Af forbindelserne, der fremstilles ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er de mest foretrukne forbindelser M-4 lacton, M-4 natriumsalt, M-4 methylester, IsoM-4' lacton, IsoM-4' natriumsalt og IsoM-4' methylester, idet M-4 natriumsalt især foretrækkes.

Den enzymatiske hydroxylering kan foretages som del af pattedyrstofskiftet af ML-236B eller nævnte derivater deraf, f.eks. ved at administrere ML-236B til et passende dyr, opsamle et stofskifteprodukt, f.eks. urin, og derefter fraskille den ønskede forbindelse eller de ønskede forbindelser fra urinen. Alternativt kan leveren eller en enzymholdig ekstrakt fra leveren benyttes i stedet for det levende dyr. Imidlertid har processer, der benytter dyrestofskiftet eller animalske produkter, en relativt lav produktivitet, og de er vanskelige at udføre reproducerbart. Følgelig foretrækkes det at benytte mikroorganismer eller enzymholdige ekstrakter fra mikroorganismene.

Følgelig udføres fremgangsmåden ifølge opfindelsen fortrinsvis ved anvendelse af en mikroorganisme, der er i stand til at omdanne ML-236B eller nævnte derivater deraf til en forbindelse med formlen I eller ved anvendelse af en enzymholdig ekstrakt af en sådan mikroorganisme. Særlig

foretrukne mikroorganismer er mikroorganismer af følgende slægter: Mucor, Rhizopus, Zygorynchus, Circinella, Actinomucor, Gongronella, Phycomyces, Martierella, Pycnopus, Rhizoctonia, Absidia, Cunninghamella, Syncephalastrum og Streptomyces. Særlig foretrukne er følgende arter:

Absidia coerulea
Cunninghamella echinulata
Syncephalastrum racemosum
Streptomyces roseochromogenus
Mucor hiemalis f. hiemalis

Mucor bacilliformis
Mucor circinelloides f. circinelloides
Mucor hiemalis f. corticolus
Mucor dimorphosporus
Mucor fragilis
Mucor genevensis
Mucor globosus
Mucor circinelloides f. griseo-cyanus
Mucor heterosporus
Mucor spinescens
Rhizopus chinensis
Rhizopus circinans
Rhizopus arrhizus
Zygorynchus moelleri
Circinella muscae
Circinella rigida
Circinella umbellata
Actinomucor elegans
Phycomyces blakesleeana
Martierella isabellina
Gongronella butleri
Pycnopus coccineus
Rhizoctonia solani
Syncephalastrum nigricans
Absidia glauca var. paradoxa

Blandt stammer af ovennævnte arter er følgende særlig foretrukne:

Absidia coerulea IFO-4423
Cunninghamella echinulata IFO-4445
Cunninghamella echinulata IFO-4444
Cunninghamella echinulata ATCC-9244
Syncephalastrum racemosum IFO-4814
Syncephalastrum racemosum IFO-4828
Streptomyces roseochromogenus NRRL-1233
Streptomyces roseochromogenus IFO-3363
Streptomyces roseochromogenus IFO-3411
Mucor hiemalis f. *hiemalis* IFO-5834
Mucor hiemalis f. *hiemalis* IFO-5303
Mucor hiemalis f. *hiemalis* IFO-8567
Mucor hiemalis f. *hiemalis* IFO-8449
Mucor hiemalis f. *hiemalis* IFO-8448
Mucor hiemalis f. *hiemalis* IFO-8565
Mucor hiemalis f. *hiemalis* CBS-117.08
Mucor hiemalis f. *hiemalis* CBS-109.19
Mucor hiemalis f. *hiemalis* CBS-200.28
Mucor hiemalis f. *hiemalis* BCS-242.35
Mucor hiemalis f. *hiemalis* CBS-110.19
Mucor hiemalis f. *hiemalis* CBS-201.65
Mucor bacilliformis NRRL-2346
Mucor circinelloides f. *circinelloides* IFO-4554
Mucor circinelloides f. *circinelloides* IFO-5775
Mucor hiemalis f. *corticulus* NRRL-12473
Mucor dimorphosporus IFO-4556
Mucor fragilis CBS-236.35
Mucor genevensis IFO-4585
Mucor globosus NRRL 12474
Mucor circinelloides f. *griseo-cyanus* IFO-4563
Mucor heterosporus NRRL-3154
Mucor spinescens IAM-6071
Rhizopus chinensis IFO-4772
Rhizopus circinans ATCC-1225
Rhizopus arrhizus ATCC-11145

Zygorynchus moelleri IFO-4833
Circinella muscae IFO-4457
Circinella rigida NRRL-2341
Circinella umbellata NRRL-1713
Circinella umbellata IFO-4452
Circinella umbellata IFO-5842
Phycomyces blakesleeana NRRL-12475
Martierella isabellina IFO-6739
Gongronella butleri IFO-8080
Pycnoporus coccineus NRRL-12476
Rhizoctonia solani NRRL-12477
Syncephalastrum nigricans NRRL-12478
Syncephalastrum nigricans NRRL-12479
Syncephalastrum nigricans NRRL-12480
Absidia glauca var. paradoxa IFO-4431
Actinomucor elegans ATCC-6476

De ovenfor anførte mikroorganismer kan alle fås fra internationale kultursamlinger, således som de er angivet ved hjælp af de koder, der knyttet til deres accessionsnumre, hvilke koder har følgende betydninger:

IFO = Institute for Fermentation, Osaka, Japan
NRRL = Agricultural Research Culture Collection, Illinois,
U. S. A.
CBS = Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Netherlands
IAM = Institute of Applied Microbiology, Tokyo, Japan
ATCC = American Type Culture Collection, Maryland,
U. S. A.

Af de ovenfor anførte arter er følgende særlig foretrukne:

Absidia coerulea
Cunninghamella echinulata
Syncephalastrum racemosum
Mucor hiemalis f. hiemalis
Mucor bacilliformis

Mucor circinelloides f. *circinelloides*
Mucor hiemalis f. *corticolus*
Mucor dimorphosporus
Mucor fragilis
Mucor genevensis
Mucor globosus
Mucor circinelloides f. *griseo-cyanus*
Mucor heterosporus
Mucor spinescens
Pycnoporus coccineus
Rhizoctonia solani
Syncephalastrum nigricans

og følgende er særlig foretrukne stammer af arterne:

Absidia coerulea IFO-4423
Cunninghamella echinulata IFO-4445
Cunninghamella echinulata IFO-4444
Cunninghamella echinulata ATCC-9244
Syncephalastrum racemosum IFO-4814
Syncephalastrum racemosum IFO-4828
Mucor hiemalis f. *hiemalis* IFO-5834
Mucor hiemalis f. *hiemalis* IFO-5303
Mucor hiemalis f. *hiemalis* IFO-8567
Mucor hiemalis f. *hiemalis* IFO-8449
Mucor hiemalis f. *hiemalis* IFO-8448
Mucor hiemalis f. *hiemalis* IFO-8565
Mucor hiemalis f. *hiemalis* CBS-117.08
Mucor hiemalis f. *hiemalis* CBS-109.19
Mucor hiemalis f. *hiemalis* CBS-200.28
Mucor hiemalis f. *hiemalis* CBS-242.35
Mucor hiemalis f. *hiemalis* CBS-110.19
Mucor hiemalis f. *hiemalis* CBS-201.65
Mucor bacilliformis NRRL-2346
Mucor circinelloides f. *circinelloides* IFO-4554
Mucor circinelloides f. *circinelloides* IFO-5775
Mucor hiemalis f. *corticolus* NRRL-12473

Mucor dimorphosporus IFO-4556
Mucor fragilis CBS-236.35
Mucor genevensis IFO-4585
Mucor globosus NRRL 12474
Mucor circinelloides f. griseo-cyanus IFO-4563
Mucor heterosporus NRRL-3154
Mucor spinescens IAM-6071
Pycnoporus coccineus NRRL-12476
Rhizoctonia solani NRRL-12477
Syncephalastrum nigricans NRRL-12478
Syncephalastrum nigricans NRRL-12479
Syncephalastrum nigricans NRRL-12480

Til fremstilling af forbindelserne med formlerne (IV) og (V) og saltene deraf foretrækkes følgende arter:

Mucor hiemalis f. hiemalis
Mucor circinelloides f. circinelloides
Mucor fragilis
Mucor genevensis
Mucor circinelloides f. griseo-cyanus
Pycnoporus coccineus
Rhizoctonia solani.

Til fremstilling af forbindelser med formlen (VI) og (VII) og saltene og C_1-C_5 -alkylestrene deraf foretrækkes arterne Syncephalastrum nigricans og Syncephalastrum racemosum.

Til fremstilling af forbindelser med formlen (XII) og (XIII) og saltene og C_1-C_5 -alkylestrene deraf foretrækkes arterne Absidia coerulea og Cunninghamella echinulata.

Af alle de ovenfor anførte arter er Mucor hiemalis f. hiemalis særlig foretrukket, eftersom den er i stand til at omdanne ML-236B og de nævnte derivater deraf til de ønskede forbindelser med formlen (I) med en omdannelsesgrad på 90% eller endnu højere.

Omdannelse af ML-236B eller derivater deraf til forbindelser med formlen (I) kan opnås ved kontaktering af den fuldstændig cellulære mikroorganisme eller i nogle tilfælde en cellefri ekstrakt fra mikroorganismen med ML-236-B eller et af nævnte derivater deraf. Formen af den producerede forbindelse vil afhænge af dyrkningsbetingelserne og formen af den benyttede mikroorganisme. Hvis således f.eks. den fuldstændig cellulære mikroorganisme dyrkes i nærværelse af ML-236B eller et af nævnte derivater deraf, vil produktet være carboxylsyren, lactonen eller alkalimetalsaltet, afhængigt af dyrkningsbetingelserne, især pH-værdien. Hvis på den anden side ML-236B eller et af nævnte derivater deraf simpelthen kontaktes med et hvilende cellulært system eller med en cellefri ekstrakt, opnås forbindelsen I i form af et alkalimetalsalt.

Forløbet af omdannelsesreaktionen kan bestemmes ved analysering af prøver af reaktionsblandingen under reaktionsforløbet til bestemmelse af omdannelsesgraden. F.eks. kan tilstedeværelsen af M-4 lacton bestemmes ved hjælp af væskerkromatografi, idet man som bærer anvender "Micro Bondapak" C₁₈ (fremstillet af Waters Co. USA), og som opløsningsmiddel anvender 62% vol./vol. vandig methanol med en hastighed på 1 ml/min.. Ved detektering under anvendelse af dens ultraviolette absorption ved 237 nm tilvejebringer M-4 en top ved en retentionstid på 10 minutter, og dette kan benyttes til bestemmelsen. Lignende metoder står til rådighed til bestemmelse af de andre forbindelser I.

Når mikroorganismene skal dyrkes i nærværelse af ML-236B eller et af nævnte derivater deraf med henblik på fremstilling af forbindelserne I, vil dyrkningsbetingelserne og dyrkningsmedierne blive valgt under hensyntagen til den pågældende mikroorganisme, der skal dyrkes. Eftersom de foreslåede mikroorganismearter til anvendelse ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er velkendte, er dyrkningsbetingelser og dyrkningsmedier til anvendelse i forbindelse med disse mikroorganismer også velkendte.

Forbindelserne I kan skilles fra reaktionsblandingen ved hjælp af konventionelle midler, f.eks. ved frafiltrering af mikrobielle celler (om nødvendigt) og derefter ved at udsætte den tilbageværende blanding for enhver kombination af tyndtlagskromatografi, søjlekromatografi eller væskerkromatografi af høj standard. Når to eller flere forbindelser fremstilles sammen, kan de forskellige forbindelser I skilles fra hinanden under forløbet af ét eller flere af disse kromatografiske rensningstrin.

Det har vist sig, at forbindelserne I frembringer en 50% inhibering af kolesterolbiosyntese ved koncentrationer, der kan sidestilles med eller i nogle tilfælde er signifikant mindre end de koncentrationer, der kræves ved anvendelse af ML-236B eller visse andre lignende kendte forbindelser. De inhiberende virkninger af forbindelserne I udtrykt som koncentrationen $\mu\text{g/ml}$, der kræves til inhibering af kolesterolbiosyntese med 50% [målt ved hjælp af den metode, der er beskrevet i the Journal of Biological Chemistry, 234, 2835 (1959)], er som følger:

M-4 methylester	0,001	M-4'	0,019
M-4 natriumsalt	0,0008	M-4' Na-salt	0,00049
M-4 lacton	0,016	ML-236B	0,01
IsoM-4' methylester	0,007		
IsoM-4' lacton	0,013		

Opfindelsen illustreres yderligere i de følgende eksempler.

EKSEMPEL 1

Fremstilling af M-4 lacton

Tyve 500 ml Sakaguchikolber, der hver indeholder 100 ml af et medium med den nedenfor beskrevne sammensætning, blev podet med sporer af *Absidia coerulea* IFO 4423. Kolberne blev underkastet rystedyrkning ved 26°C og 120 slag/min. (s.p.m.) i 2 dage. Ved afslutningen af dette tidsrum blev natriumsaltet af ML-236B sat til hver af kolberne indtil opnåelse af en slutkoncentration på 0,05% vægt/vol.. Dyrkning blev fortsat ved 26°C og 120 s.p.m. i yderligere 5 dage.

Mediets sammensætning var (procenterne er vægt/vol.):

Glucose	2,0%
K ₂ HPO ₄	0,15%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,15%
NH ₄ NO ₃	0,1%
Pepton	0,1%
Majsstøbevæske	0,2%
Gærekstrakt	0,1%
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,001%
Ledningsvand	resten
	(indstillet til pH 7,0).

Efter afslutning af dyrkningen blev reaktionsvæsken filtreret, og filtratet blev indstillet på pH 3 med trifluoreddikesyre. Den resulterende blanding blev ekstraheret med tre portioner ethylacetat på 1 liter til opnåelse af ekstrakter indeholdende M-4. Denne forbindelse viser en R_f-værdi på 0,45 ved tyndtlagskromatografi (TLC) (plade: Merck silicagel Art 5715; opløsningsmiddel: En 50:50:3 (vol./vol./vol.) blanding af benzen, acetone og eddikesyre).

De forenede ekstrakter blev vasket med mættet vandigt natriumchlorid, hvorefter en katalytisk mængde trifluoreddikesyre blev tilsat til lactonisering. Den resulterende blanding blev derefter vasket med en 1% vægt/vol. vandig opløsning af natriumbicarbonat, tørret over vandfrit natriumsulfat og inddampet til tørhed under reduceret tryk. Resten blev underkastet præparativ væskrokromatografi, system 500, under anvendelse af en "Prep[®] PAK"-500/C₁₈ indsats fremstillet af Waters Associates (Prep PAK er et varemærke). Rensning med et 55% vol./vol. vandigt methanolssystem resulterede i 50,1 mg M-4 lacton.

M-4 lacton har følgende fysiske egenskaber.

- 1) Kernemagnetisk resonansspektrum:
NMR-spektret målt ved 60 MHz i deuteriochloroform under anvendelse af tetramethylsilan som den indre standard er vist i figur 1 på tegningen.
- 2) Ultraviolet absorptionsspektrum (methanolopløsning)
 $\lambda_{\text{max}}^{\text{nm}}$: 230; 236,7; 244,6.
- 3) Infrarødt absorptionsspektrum (væskefilm) $\nu \text{ cm}^{-1}$:
3400, 2950, 1725.
- 4) Tyndtlagskromatografi:
TLC-plade: Merck silicagel Art 5715;
Opløsningsmiddel: Benzen, acetone, eddikesyre (50:50:3 efter volumen);
Rf-værdi: 0,62.

EKSEMPEL 2

48 mg M-4 lacton blev fremstillet ved at følge de samme procedurer som i eksempel 1, men ved anvendelse af *Cunninghamella echinulata* IFO 4445.

EKSEMPEL 3

30 mg M-4 lacton blev fremstillet ved at følge de samme procedurer som i eksempel 1, men ved anvendelse af *Streptomyces roseochromogenus* NRRL 1233.

EKSEMPEL 4

5 mg M-4 lacton blev fremstillet ved at følge de samme procedurer som i eksempel 1, men ved anvendelse af *Syncephalastrum racemosum* IFO 4814.

EKSEMPEL 5

6 mg M-4 lacton blev fremstillet ved at følge de samme procedurer som i eksempel 1, men ved anvendelse af *Syncephalastrum racemosum* IFO 4828.

EKSEMPEL 6Fremstilling af IsoM-4'methylester

Tyve 500 ml Sakaguchikolber, der hver indeholder 100 ml af et medium med den nedenfor beskrevne sammensætning, blev podet med sporer af *Absidia coerulea* IFO 4423. Kolberne blev underkastet rystedyrkning ved 120 s.p.m og 26°C i 2 dage. Ved afslutningen af dette tidsrum blev natriumsaltet af ML-236B sat til hver af kolberne indtil opnåelse af en slutkoncentration på 0,05% vægt/vol.. Dyrkning blev fortsat ved 120 s.p.m. og 26°C i yderligere 5 dage.

Mediets sammensætning var (procenter er vægt/vol.).

Glucose	2,0%
K ₂ HPO ₄	0,15%

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,15%
NH ₄ NO ₃	0,1%
Pepton	0,1%
Majsstøbevæske	0,2%
Gærekstrakt	0,1%
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,001%
Ledningsvand	resten
	(indstillet til pH 7,0)

Efter afslutning af dyrkningen blev reaktionsvæsken filtreret, og filtratet blev indstillet på pH 3 med trifluoreddikesyre. Den resulterende blanding blev ekstraheret med tre 1 liter portioner af ethylacetat til opnåelse af ekstrakter indeholdende IsoM-4'. Denne forbindelse har en R_f-værdi på 0,45 ved tyndtlagskromatografi (plade: Merck silikagel Art 5715; opløsningsmiddel: en 50:50:3 (vol./vol./vol.) blanding af benzen, acetone og eddikesyre). Ekstrakten blev vasket med en mættet vandig opløsning af natriumchlorid, og derefter tilsattes en etheropløsning af diazomethan. Blandingen blev henstillet i 30 minutter og derefter inddampet til tørhed under formindsket tryk. Resten blev anbragt på en "Lobar"[®]-søjle (Merck Si 60, størrelse A) og renset, idet der som opløsningsmiddel-system blev benyttet en 1:1 (vol./vol.) blanding af benzen og ethylacetat. Der opnåedes 200 mg af en IsoM-4'methylesterfraktion. Denne fraktion blev yderligere renset på en "Lobar"[®]-søjle (Merck RP-8, størrelse A) under anvendelse af 35% vol./vol. vandig acetonitril som elueringsmidlet til opnåelse af 78 mg ren IsoM-4'=methylester, der har følgende egenskaber:

- 1) Kernemagnetisk resonansspektrum:
NMR-spektret målt ved 100 MHz i deuteriochloroform under anvendelse af tetramethylsilan som den indre standard er vist i figur 2 på tegningen.
- 2) Massespektrum:
Måling blev foretaget [efter silylering med N,O-bis(tri=

methylsilyl]trifluoracetamid] ved anvendelse af et masse-spektrometer af typen D-300, der fremstilles af Nippon Electronics.

M/e: 654 (M^+), 552, 462, 372, 272, 233, 231.

- 3) Ultraviolet absorptionsspektrum (methanolopløsning) $\lambda_{\max}$ nm: 229; 234,8; 244,5.
- 4) Infrarødt absorptionsspektrum (væskefilm):
Som vist i figur 3 på tegningen.
- 5) Tyndtlagskromatografi:
TLC-plade: Merck silicagel Art 5715;
Opløsningsmiddel: Benzen, acetone (1:1 efter volumen);
Rf-værdi: 0,88.

Ved at gå frem som ovenfor beskrevet, men med erstatning af diazomethanen med en anden passende diazoalkan, er det muligt at fremstille andre estere af IsoM-4'.

EKSEMPEL 7

Fremstilling af IsoM-4'lacton

Den i eksempel 6 beskrevne procedure blev gentaget til og med ekstraktionen med ethylacetat til opnåelse af ekstrakter indeholdende IsoM-4'. De forenede ekstrakter blev vasket med en mættet vandig opløsning af natriumchlorid og derefter indampet til tørhed til opnåelse af lactonproduktet. Den resulterende rest blev anbragt på en "Lobar"®-søjle (Merck Si 60, størrelse A) og rensed, idet der som opløsningsmiddel-system blev benyttet en 1:1 (vol./vol.) blanding af benzen og ethylacetat, til opnåelse af 198 mg IsoM-4'lacton. Dette produkt blev yderligere rensed ved hjælp af en "Lobar"®-søjle (Merck RP-8, størrelse A), idet der blev elueret med 35% vol./vol. vandig acetonitril til opnåelse af 62 mg ren IsoM-4'lacton,

der har følgende egenskaber:

- 1) Kernemagnetisk resonansspektrum:
NMR-spektret målt ved 100 MHz i deuteriochloroform under anvendelse af tetramethylsilan som den indre standard er vist i figur 4 på tegningen.
- 2) Ultraviolet absorptionsspektrum (methanolopløsning)
 λ_{max} nm: 229; 234,8; 244,5.
- 3) Infrarødt absorptionsspektrum (væskefilm):
Som vist i figur 5 på tegningen.

EKSEMPEL 8

63 mg IsoM-4'lacton blev fremstillet, idet der blev fulgt de samme procedurer som i eksempel 7, men ved anvendelse af *Cunninghamella echinulata* IFO 4445.

EKSEMPEL 9

24 mg IsoM-4'lacton blev fremstillet, idet der blev fulgt de samme procedurer som i eksempel 7, men ved anvendelse af *Syncephalastrum racemosum* IFO 4814.

EKSEMPEL 10

35 mg IsoM-4'lacton blev fremstillet, idet der blev fulgt de samme procedurer som i eksempel 7, men ved anvendelse af *Syncephalastrum racemosum* IFO 4828.

EKSEMPEL 11

12 mg IsoM-4'lacton blev fremstillet i overensstemmelse med de i eksempel 7 beskrevne procedurer, men ved anvendelse af *Streptomyces roseochromogenus* NRRL 1233.

EKSEMPEL 12Fremstilling af IsoM-4'natriumsalt

I en ringe mængde acetone opløstes 10 mg IsoM-4'-lacton fremstillet ifølge eksempel 7. Til opløsningen sættes en ækvivalent mængde natriumhydroxid, og blandingen blev henstillet i 1 time. Den resulterende blandings pH-værdi blev indstillet på 8,0 med 0,1N saltsyre. Acetonen blev derpå destileret af, og resten blev anbragt på en "XAD"®-20 søjle (ca. 20 ml). Søjlen blev vasket med destilleret vand og derefter elueret med 50 ml 50% vol./vol. vandig acetone. Acetonen blev atter destilleret af, og resten blev frysetørret til opnåelse af 6 mg IsoM-4'natriumsalt, der har følgende egenskaber:

- 1) Ultraviolet absorptionsspektrum (methanolopløsning)
 λ_{max} nm: 229 (skulder); 235; 245 (skulder).
- 2) Infrarødt absorptionsspektrum (KBr) ν cm^{-1} :
3400, 2850, 1710, 1580.
- 3) Tyndtlagskromatografi:
TLC-plade: Merck silicagel Art 5715;
Opløsningsmiddel: Benzen, acetone, eddikesyre (50:50:3 efter volumen);
Rf-værdi: 0,45.

EKSEMPEL 13Fremstilling af M-4 methylester

Tyve 500 ml Sakaguchikolber, der hver indeholder 100 ml af et medium med samme sammensætning som anført i eksempel 1, blev podet med sporer af Absidia coerulea IFO 4423. Kolberne blev udsat for rystedyrkning ved 26°C og 120 s.p.m. i 2 dage. Natriumsaltet af ML-236B blev derpå sat til hver

af kolberne indtil en slutkoncentration på 0,05% vægt/vol.. Dyrkning blev fortsat ved 26°C og 120 s.p.m. i yderligere 5 dage.

Efter afslutning af dyrkningen blev reaktionsvæsken filtreret, og filtratet blev indstillet på pH 3 med trifluoreddikesyre. Den resulterende blanding blev ekstraheret med tre 1 liter portioner af ethylacetat til opnåelse af ekstrakter indeholdende M-4 og IsoM-4'. Såvel M-4 som IsoM-4' viser en Rf-værdi på 0,45 ved tyndtlagskromatografi (plade: Merck silicagel Art 5715; opløsningsmiddel: en 50:50:3 (vol./vol./vol.) blanding af benzen, acetone og eddikesyre). De forenede ekstrakter blev vasket med mættet vandig natriumchlorid, hvorefter en etheropløsning af diazomethan blev tilsat. Blandingen blev henstillet i 30 minutter og derpå inddampet til tørhed under formindsket tryk. Resten blev derpå anbragt på en "Lobar"®-søjle (Merck Si 60, størrelse A), og rensning blev foretaget ved anvendelse af en 1:1 (vol./vol.) blanding af benzen og ethylacetat, hvorved der blev fraskilt en fraktion indeholdende IsoM-4'methylester og en fraktion indeholdende M-4methylester. Der opnåedes 185,3 mg af sidstnævnte aktive fraktion, hvorfra 20 mg ren M-4 methylester blev opnået som en farveløs olie ved anvendelse af en "Lobar"®-søjle (Merck RP-8, størrelse A) og eluering med 35% vol./vol. vandig acetonitril.

M-4 methylester har følgende egenskaber:

1) Kernemagnetisk resonansspektrum:

Måling blev foretaget ved 200 MHz i deuteriochloroform under anvendelse af tetramethylsilan som den indre standard.

δ ppm:

0,88 (3H, triplet, J = 7,3 Hz);

0,89 (3H, doublet, J = 6,5 Hz);

1,12 (3H, doublet, $J = 6,8$ Hz);
1,1 - 1,7 (10H, multiplet);
2,34 (1H, sekstuplet, $J = 7$ Hz);
2,3 - 2,5 (2H, multiplet);
2,49 (2H, doublet, $J = 6,4$ Hz);
2,58 (1H, multiplet);
3,72 (3H, singlet);
3,78 (1H, multiplet);
4,25 (1H, quintet, $J = 7$ Hz);
4,4 (1H, multiplet);
5,42 (1H, multiplet);
5,56 (1H, multiplet);
5,90 (1H, dobbelt doublet, $J = 9,8$ og $5,6$ Hz);
5,99 (1H, doublet, $J = 9,8$ Hz);

2) Massespektrum:

Måling blev foretaget [efter silylering med N,O-bis(tri-methylsilyl)trifluoracetamid] under anvendelse af et massespektrometer, type D-300, fremstillet af Nippon Electronics.

M/e : 654 (M^+), 552, 462, 372, 290, 272, 233, 231.

3) Ultraviolet absorptionsspektrum (ethanolopløsning)

$\lambda_{\max}^{\text{nm}}$: 230,1; 237,3; 246,4.

4) Infrarødt absorptionsspektrum (væskefilm) ν cm^{-1} :

3400, 2950, 1730.

5) Tyndtlagskromatografi:

TLC-plade: Merck silicagel Art 5715.

Opløsningsmiddel: Benzen og acetone (1:1 efter volumen);

R_f-værdi: 0,88.

Ved at gå frem som ovenfor beskrevet, men ved at erstatte diazomethanen med en anden passende diazoalkan, er det muligt at fremstille andre estere af M-4.

EKSEMPEL 14Fremstilling af natriumsalte af M-4 og IsoM-4'

Den i eksempel 1 beskrevne procedure blev gentaget til og med filtreringen af reaktionsvæsken, med undtagelse af at Na_2HPO_4 blev benyttet i stedet for K_2HPO_4 . Filtratet blev derefter adsorberet på en "HP" C_{18} -20-søjle (fremstillet af Mitsubishi Chemical Industries). Efter vaskning af søjlen med vand elueredes fraktioner indeholdende M-4 natriumsalt og IsoM-4' natriumsalt med 50% vol./vol. vandig acetone. De aktive fraktioner blev frysetørret, hvilket resulterede i 830 mg af et frysetørret produkt, der blev rensat ved at det gentagne gange blev underkastet væskrokromatografi af høj standard (søjle: "Micro Bondapak" C_{18} , 40% vol./vol. vandig methanol 1 ml/min.) til opnåelse af 32 mg M-4 natriumsalt og 280 mg IsoM-4' natriumsalt.

IsoM-4' natriumsaltets egenskaber var identiske med egenskaberne af produktet ifølge eksempel 12, og M-4 natriumsaltets egenskaber er som følger:

1) Kernemagnetisk resonansspektrum:

Måling blev foretaget ved 200 MHz i deuteriomethanol under anvendelse af tetramethylsilan som den indre standard.

δ ppm:

0,91 (3H, triplet, $J = 7,5$ Hz);

0,92 (3H, doublet, $J = 7$ Hz);

1,12 (3H, doublet, $J = 7$ Hz);

1,1 - 1,8 (10H, multiplet);

2,25 (1H, dobbelt doublet, $J = 15$ og $7,6$ Hz);

2,34 (1H, dobbelt doublet, $J = 15$ og $5,5$ Hz);

2,2 - 2,4 (3H, multiplet);

2,48 (1H, multiplet);

3,68 (1H, multiplet);
4,07 (1H, multiplet);
4,28 (1H, multiplet);
5,36 (1H, multiplet);
5,48 (1H, dobbelt doublet, $J = 3$ og 2 Hz);
5,88 (1H, dobbelt doublet, $J = 0,6$ og $5,3$ Hz);
5,98 (1H, doublet, $J = 9,8$ Hz).

2) Ultraviolet absorptionsspektrum (methanolopløsning)

$\lambda_{\text{max}}^{\text{nm}}$: 230,0; 237,2; 245,0.

3) Infrarødt absorptionsspektrum (KBr) $\nu \text{ cm}^{-1}$:

3400, 2900, 1725, 1580.

4) Tyndtlagskromatografi:

TLC-plade: Merck silicagel Art 5715

Opløsningsmiddel: Benzen, acetone og eddikesyre (50:
50:3 efter volumen);

Rf-værdi: 0,45.

EKSEMPEL 15

18 mg M-4 methylester blev fremstillet ved at følge de samme procedurer som i eksempel 13, men ved anvendelse af *Cunninghamella echinulata* IFO 4445.

EKSEMPEL 16

33 mg M-4 methylester blev fremstillet ved at følge de samme procedurer som i eksempel 13, med ved anvendelse af *Streptomyces roseochromogenus* NRRL 1233.

EKSEMPEL 17

12 mg M-4 methylester blev fremstillet ved at følge de samme procedurer som i eksempel 13, med ved anvendelse af *Syncephalastrum racemosum* IFO 4814.

EKSEMPEL 18

16 mg M-4 methylester blev fremstillet ved at følge de samme procedurer som i eksempel 13, men ved anvendelse af *Syncephalastrum racemosum* IFO 4828.

EKSEMPEL 19Fremstilling af M-4 methylester

Fem beaglehunde (hankøn, gennemsnitlig vægt 10 kg) blev indgivet ML-236B i en dosis på 200 mg/kg/dag, og deres urin blev opsamlet i tre dage. Tre liter opsamlet urin blev ført gennem en 500 ml "XAD"®-2 søjle, som blev elueret med 500 ml 50% vol./vol. vandig acetone, og efter afdestillation af acetonen under formindsket tryk blev den tilbageværende væske indstillet på pH 3 ved tilsætning af trifluoreddikesyre. Blandingen derpå ekstraheret 3 gange, hver gang med 1 liter ethylacetat, til opnåelse af M-4. Denne forbindelse viser en R_f-værdi på 0,45 ved tyndtlagskromatografi (TLC-plade: Silicagel Art 5715, fremstillet af Merck & Co., Inc.; opløsningsmiddel: en 50:50:3 (vol./vol./vol.) blanding af benzen, acetone og eddikesyre). Ekstrakten blev vasket med en mættet vandig opløsning af natriumchlorid, og efter tilsætning af en etheropløsning af diazomethan blev den henstillet i 30 minutter. Den blev derpå inddampet til tørhed under formindsket tryk. Resten blev opløst i 10 ml af en 55% vol./vol. vandig methanolopløsning og ført gennem en søjlekromatograf (fremstillet af Merck & Co., Inc.; RP-8, størrelse B). Efter passage af 200 ml af en 55% vol./vol. vandig methanolopløsning blev søjlen elueret med en 60% vol./vol. vandig methanolopløsning. De første 240 ml af eluatet blev bortkastet, og de næste 120 ml blev opsamlet. Denne fraktion blev inddampet til tørhed, og resten blev opløst i 2,5 ml af en 65% vol./vol. vandig methanolopløsning og rensat ved hjælp af væskekromatografi af høj standard ("JASCO"-Trirotar"®, søjle: μ -"Bondapak" C₁₈).

Den del, der viste den fjerde top, blev fraskilt, og opløsningsmidlet blev afdestilleret til opnåelse af M-4 methylester som en farveløs olie, der har de i eksempel 13 anførte egenskaber. Der opnåedes 4 mg produkt.

EKSEMPEL 20

Fremstilling af M-4

Homogeniseret kaninlever blev benyttet i dette eksempel til opnåelse af M-4 ud fra ML-236B.

(a) Enzymatisk opløsning

Tre volumener af en 1,15% vægt/vol. kaliumchlorid-10mM phosphat (pH 7,4)-pufferopløsning blev sat til ét volumen kaninlever, og blandingen blev homogeniseret. Den homogeniserede blanding blev derpå centrifugeret i 20 minutter ved 9.000 G, og den ovenpå svømmende fraktion blev betragtet som en enzymatisk opløsning.

(b) Cofaktoropløsning

β-nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduceret form (NADPH)	3 mg
MgCl ₂ -opløsning (508 mg/10 ml)	0,1 ml
1,15% vægt/vol. KCl-opløsning.	0,3 ml
0,2 M phosphatpufferopløsning (pH 7,4)	0,6 ml

De ovenfor nævnte materialer blev blandet til et samlet volumen på 1 ml til dannelse af cofaktoropløsningen.

(c) Reaktionsopløsning

80 µl af den ovenfor nævnte enzymatiske opløsning, 20 µl af den ovenfor anførte cofaktoropløsning og 2 µl af en methanolopløsning af ML-236B blev blandet til opnåelse af en slut-

koncentration af ML-236B på 1 mM. Den resulterende opløsning blev rystet i 30 minutter ved 37°C. M-4 blev dannet i reaktionsblandingen og identificeret ved hjælp af tyndtlagskromatografi (de samme betingelser som anført i eksempel 19).

EKSEMPEL 21

Fremstilling af M-4 natriumsalt

2 mg M-4 methylester fremstillet ifølge eksempel 13 eller 15-19 blev opløst i 1 ml af en 0,1N vandig opløsning af natriumchlorid og underkastet hydrolysering ved 30°C i 1 time. Reaktionsblandingen blev vasket med 1 ml chloroform, og den resulterende vandige fase blev indstillet på pH 8 med 0,1 N saltsyre og ført gennem en XAD-2 søjle (ca 5 ml). Søjlen blev vasket med 20 ml destilleret vand, og det ønskede produkt blev elueret med 15 ml 50% vol./vol. vandig acetone. Acetonen blev afdestilleret fra eluatet. Resten viste sig ved væskerkromatografi af høj standard at resultere i en enkelt top (retentionstiden var 13 minutter ved eluering med 40% vol./vol. vandig methanol med 1 ml/minut). Resten blev derpå lyofiliseret til opnåelse af 0,8 mg M-4 Na-salt med de samme egenskaber som produktet ifølge eksempel 14.

EKSEMPEL 22

Fremstilling af M-4 methylester

Hver af tyve 500 ml Erlenmeyerkolber indeholdende 100 ml af et medium med den nedenfor anførte sammensætning blev podet med sporer af *Mucor hiemalis* f. *hiemalis* IFO-5834. Podematerialet blev underkastet rystedyrkning ved 26°C og 220 omdr. pr. min. Efter fire dage blev ML-236B tilsat indtil en slutkoncentration på 0,05% vægt/vol., og dyrkning blev udført ved 26°C og 220 omdr. pr. min. i yderligere seks dage.

Mediets sammensætning var (procenter er vægt/vol.).

Glucose	1,0%
Pepton	0,2%
Kødekstrakt	0,1%
Gærekstrakt	0,1%
Majsstøbevæske	0,3%
Ledningsvand	resten
	(pH uindstillet)

Efter afslutning af dyrkningen blev filtratet indstillet på en pH-værdi på 3 med trifluoreddikesyre. Blandingen blev derpå ekstraheret tre gange, hver gang med 100 ml ethylacetat. Der opnåedes en fraktion indeholdende M-4. M-4 har en Rf-værdi på 0,45 ved tyndtlagskromatografi (plade: Merck silica= gel Art 5715; opløsningsmiddel: en 50:50:3 (vol./vol./vol.) blanding af benzen, acetone og eddikesyre). Omdannelsesgraden var 90%. Denne ekstrakt blev vasket med en mættet vandig opløsning af natriumchlorid, hvorefter der blev tilsat en etheropløsning af diazomethan. Den resulterende blanding blev henstillet i 30 minutter og derefter inddampet til tørhed under reduceret tryk. Resten blev anbragt på en "Lobar"®-søjle (Merck Si 60, størrelse A) og rensat med en 1:1 vol./vol. blanding af benzen og ethylacetat. Der opnåedes ca. 600 mg M-4 methyl= estere, der har de samme egenskaber som produktet ifølge eksempel 13.

EKSEMPEL 23

Fremstilling af M-4 lacton

Den i eksempel 22 beskrevne procedure blev gentaget til og med vaskning af de tre ethylacetatekstrakter med en mættet vandig opløsning af natriumchlorid. Den resulterende opløsning blev derpå inddampet til tørhed til opnåelse af et lactonprodukt. Produktet blev rekrySTALLiseret fra ethyl= acetat til opnåelse af ca. 560 mg (56%) M-4 lacton, der har

de samme egenskaber som produktet ifølge eksempel 1.

EKSEMPEL 24

Fremstilling af M-4 natriumsalt

Den i eksempel 22 beskrevne procedure blev gentaget til opnåelse af 1,9 liter af filtratet fra omdannelsesreaktionen. Dette filtrat blev ekstraheret tre gange, hver gang med 1 liter ethylacetat, til opnåelse af fraktioner indeholdende M-4. Ved øjeblikkeligt at overføre disse til en 5% vægt/vol. vandig opløsning af natriumbicarbonat opnåedes en fraktion indeholdende M-4 natriumsalt. M-4 natriumfraktionen blev derpå indstillet på en pH-værdi på 7,0 med 2N saltsyre og adsorberet på en "HP"[®]-20 søjle (fremstillet af Mitsubishi Chemical Industries). Vaskning med vand og eluering med 50% vol./vol. vandig acetone resulterede i en fraktion indeholdende M-4 natriumsalt, hvorfra der opnåedes 570 mg (52%) af et frysetørret produkt med de egenskaber, der er beskrevet i eksempel 14.

EKSEMPEL 25

Fremstilling af M-4 methylester.

Den i eksempel 22 beskrevne procedure blev gentaget med den undtagelse, at følgende mikroorganismer blev benyttet, og omdannelsen til M-4 var som vist ved hjælp af de tilhørende koder:

<u>Mikroorganismer:</u>	<u>Omdannelse til M-4</u>
Mucor hiemalis f. hiemalis IFO-5303	+4
Mucor hiemalis f. hiemalis IFO-8567	+4
Mucor hiemalis f. hiemalis IFO-8449	+4
Mucor hiemalis f. hiemalis IFO-8448	+4
Mucor hiemalis f. hiemalis IFO-8565	+4
Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-117.08	+4

<u>Mikroorganismer:</u>	<u>Omdannelse til M-4</u>
Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-109.19	+4
Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-200.28	+4
Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-242.35	+4
Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-110.19	+4
Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-201.65	+4
Mucor bacilliformis NRRL-2346	spor
Mucor circinelloides f. circinelloides IFO-4554	+1
Mucor circinelloides f. circinelloides IFO-5775	+1
Mucor hiemalis f. corticolus NRRL-12473	spor
Mucor dimorphosporus IFO-4556	spor
Mucor fragilis CBS-236.35	+1
Mucor genevensis IFO-4585	+1
Mucor globosus NRRL-12474	spor
Mucor circinelloides f. griseo-cyanus IFO-4563	+1
Mucor heterosporus NRRL-3154	spor
Mucor spinescens IAM-6071	spor
Mucor chinensis IFO-4772	spor
Rhizopus circinans ATCC-1225	+1
Rhizopus arrhizus ATCC-11145	+1
Zygorynchus moelleri IFO-4833	+1
Circinella muscae IFO-4457	+1
Circinella rigida NRRL-2341	spor
Circinella umbellata NRRL-1713	+1
Circinella umbellata IFO-4452	+1
Circinella umbellata IFO-5842	+1
Actinomucor elegans ATCC-6476	+1
Phycomyces blakesleeana NRRL-12475	spor
Martierella isabellina IFO-6739	spor
Gongronella butleri IFO-8080	+1
Pycnoporus coccineus NRRL-12476	+3
Rhizoctonia solani NRRL-12477	+2

Koderne, der repræsenterer omdannelserne til M-4, har følgende betydninger:

spor	=	0,5% eller mindre
+1	=	0,5 - 5%
+2	=	5,0 - 10,0%
+3	=	10,0 - 30,0%
+4	=	70,0 - 90,0%.

EKSEMPEL 26

Fremstilling af IsoM-4' lacton

Hver af tyve 500 ml Sakaguchikolber indeholdende 100 ml af et medium med den i eksempel 22 beskrevne sammensætning blev podet med sporer af *Circinella muscae* IFO-4457. Podematerialet blev underkastet rystedyrkning ved 26°C og 120 slag pr. min. (s.p.m.). Efter 4 dage blev ML-236B tilsat indtil en slutkoncentration på 0,05% vægt/vol., og dyrkning blev fortsat ved 26°C og 120 s.p.m. i yderligere 6 dage.

Efter afslutning af dyrkningen blev omdannelsesreaktionsblandingen filtreret, og filtratet blev indstillet på en pH-værdi på 3,0 med trifluoreddikesyre. Blandingen blev derpå ekstraheret tre gange, hver gang med 1 liter ethylacetat, til opnåelse af en fraktion indeholdende IsoM-4'. Denne ekstrakt blev vasket med en mættet vandig opløsning af natriumchlorid og derpå inddampet til tørhed. Der opnåedes et lactonprodukt. Resten blev anbragt på en "Lobar"®-søjle (Merck Si 60, størrelse A) og rensat med et ethylacetatsystem, hvorved der opnåedes 12 mg IsoM-4' lacton med de i eksempel 7 beskrevne egenskaber.

EKSEMPEL 27

Fremstilling af M-4' lacton

Hver af tyve 500 ml Erlenmeyerkolber indeholdende 100 ml af et medium med den nedenfor anførte sammensætning blev podet med sporer af *Syncephalastrum nigricans* NRRL-12478. Podematerialet blev underkastet rystedyrkning ved 26°C og 220 omdr. pr. min. Efter 3 dage blev ML-236B tilsat indtil en slutkoncentration på 0,05% vægt/vol. og dyrkning blev udført ved 26°C og 220 omdr. pr. min.

Mediets sammensætning var som følger (procenter er

Glucose	1%
Pepton	0,2%
Kødekstrakt	0,1%
Gærekstrakt	0,1%
Majsstøbevæske	0,3%
Ledningsvand	resten
	(pH uindstillet)

Efter afslutning af dyrkningen blev omdannelsesreaktionsblandingen filtreret, og filtratet blev indstillet på en pH-værdi på 3 med trifluoreddikesyre. Blandingen blev derpå ekstraheret tre gange, hver gang med 1 liter ethylacetat, til opnåelse af en fraktion indeholdende M-4', der har en R_f-værdi på 0,46 ved tyndtlagskromatografi (plade: Merck silicagel Art 5715; opløsningsmiddel: en 50:50:3 vol./vol./vol. blanding af benzen, acetone og eddikesyre). Denne ekstrakt blev vasket med en mættet vandig opløsning af natriumchlorid, tørret over vandfrit natriumsulfat og underkastet lactonisering ved tilsætning af en katalytisk mængde trifluoreddikesyre. Den resulterende blanding blev derpå vasket med en 5% vægt/vol. vandig opløsning af natriumbicarbonat, afvandet med vandfrit natriumsulfat og inddampet til tørhed. Resten blev krystalliseret fra ethylacetat til opnåelse af ca. 180 mg M-4' lacton med følgende fysiske egenskaber:

- 1) Kernemagnetisk resonansspektrum:

Målt i deuteriochloroform ved 100 MHz under anvendelse af tetramethylsilan som den indre standard.

δ ppm:

6,01 (1H, doublet);
5,90 (1H, quartet);
5,75 (1H, multiplet);
5,50 (1H, multiplet);
4,60 (1H, multiplet);
4,25 (1H, multiplet).

2) Ultraviolet absorptionsspektrum (methanol)

λ_{max} nm: 230, 237, 245.

3) Infrarødt absorptionsspektrum (KBr) ν cm^{-1}

3500, 1720.

4) Massespektrum:

M/e : 406 (M^+), 304, 286.

5) Optisk drejning:

$[\alpha]_D^{25} = +310,9^\circ$ ($c = 0,66$, methanol).

6) Smeltepunkt:

141 - 143°C.

7) Grundstofanalyse.

Beregnet: C, 67,95%; H, 8,43%

Fundet: C, 68,05%; H, 8,37%

8) Tyndtlagskromatografi:

TLC-plade: Merck silicagel Art 5715.

Opløsningsmiddel: Benzen - acetone (1:1 efter volumen)

Rf-værdi 0,64.

EKSEMPEL 28Fremstilling af M-4' natriumsalt

Ved at følge hovedsagelig de samme dyrkningsprocedurer som anført i eksempel 27 opnåedes en omdannelsesreaktionsblanding.

Efter afslutning af dyrkningen blev omdannelsesreaktionsblandingens filtreret, og filtratet blev indstillet på en pH-værdi på 3 med trifluoreddikesyre. Filtratet blev derpå ekstraheret tre gange, hver gang med 1 liter ethylacetat, til opnåelse af en fraktion indeholdende M-4', som blev vasket med en mættet vandig opløsning af natriumchlorid og øjeblikkeligt derefter indført i en 5% vægt/vol. vandig opløsning af natriumbicarbonat til opnåelse af en fraktion indeholdende M-4' natriumsalt. Det således opnåede vandige lag blev indstillet til pH 8,0 med 0,1 N saltsyre og adsorberet på en "Diaion" "HP" [®] 20 harpiks-søjle (fremstillet af Mitsubishi Chemical Industries). Søjlen blev derpå elueret med 50% vol./vol. vandig opløsning af acetone. Acetonen blev afdestilleret og resten blev frysetørret til opnåelse af 1,41 g M-4' natriumsalt med følgende fysiske egenskaber:

1) Kernemagnetisk resonansspektrum:

Målt i deuteriochloroform ved 60 MHz under anvendelse af tetramethylsilan som den indre standard.

δ ppm:

- 6,00 (1H, doublet);
- 5,95 (1H, quartet);
- 5,70 (1H, bred singlet);
- 5,50 (1H, bred singlet).

2) Ultraviolet absorptionsspektrum (methanol) λ_{max} nm:
230, 238, 246.

- 3) Infrarødt absorptionsspektrum (KBr) ν cm^{-1} ;
3400, 2900, 1680.

EKSEMPEL 29

Fremstilling af M-4' methylester

Ved at følge hovedsagelig de samme dyrkningsprocedurer som i eksempel 27 opnåedes en omdannelsesreaktionsblanding.

Efter afslutning af dyrkningen blev omdannelsesblandingen filtreret, og filtratet blev med tifluoreddikesyre indstillet på en pH-værdi på 3. Det blev derpå ekstraheret tre gange, hver gang med 1 liter ethylacetat. De kombinerede ekstrakter blev vasket med en mættet vandig opløsning af natriumchlorid, hvorefter en etheropløsning af diazomethan blev sat dertil. Den resulterende blanding blev henstillet i 30 minutter og derefter inddampet til tørhed under formindsket tryk. Resten blev rensat ved anvendelse af en "Lobar"[®]-søjle (Merck RP-8, størrelse A) og en 1:1 (vol./vol. blanding af benzen og acetone som det fremkaldende opløsningsmiddel. Der opnåedes 150 mg M-4' methyl-ester som et farveløst olieagtigt materiale, der har følgende egenskaber:

1) Kernemagnetisk resonansspektrum:

Målt i deuteriochloroform ved 60 MHz under anvendelse af tetramethylsilan som den indre standard.

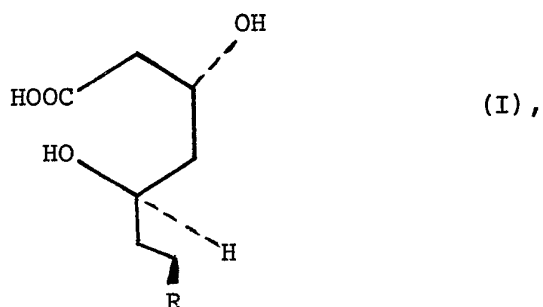
δ ppm:

- 6,01 (1H, doublet);
- 5,90 (1H, quartet);
- 5,75 (1H, bred singlet);
- 5,50 (1H, bred singlet);
- 3,70 (3H, singlet).

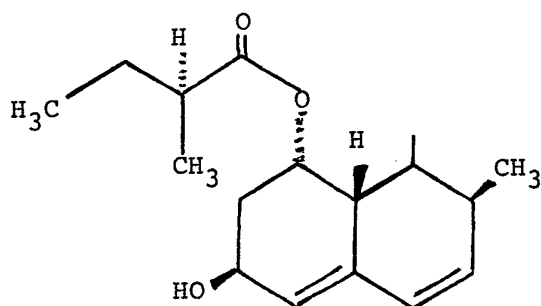
- 2) Ultraviolet absorptionsspektrum (methanol) $\lambda_{\max}^{\text{nm}}$:
230, 238, 246.
- 3) Infrarødt absorptionsspektrum (væskefilm) $\nu \text{ cm}^{-1}$:
3400, 1730.
- 4) Masseanalyse:
Måling blev foretaget efter silylering med N,O-bis(tri-methylsilyl)trifluoracetamid ved anvendelse af et massespektrometer af typen D-300, der fremstilles af Nippon Electronics.
M/e: 654 (M^+).

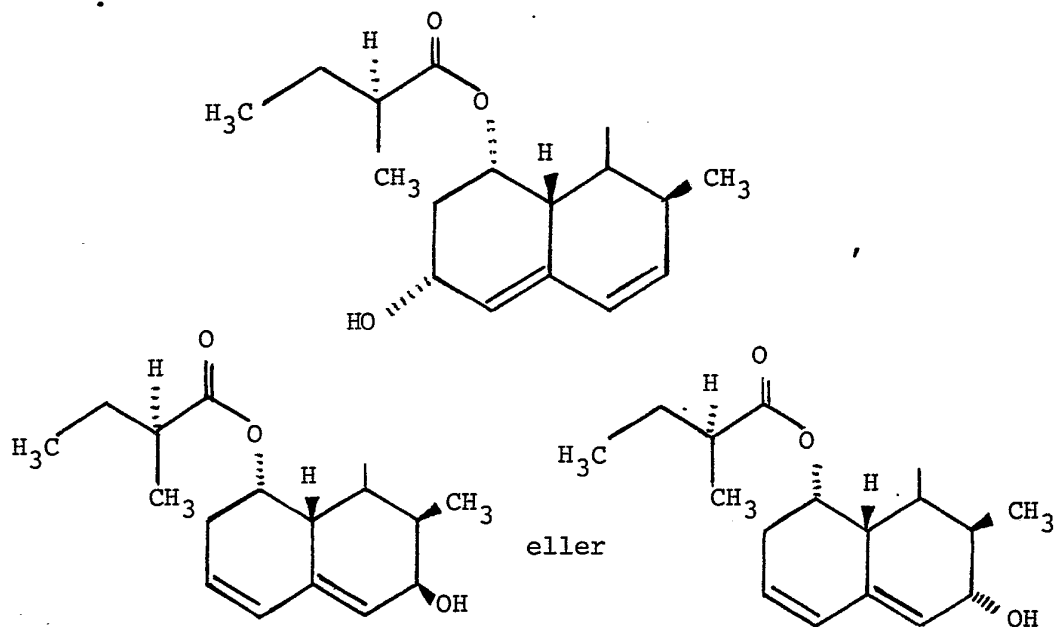
P a t e n t k r a v.

1. Fremgangsmåde til fremstilling af derivater af ML-236B-carboxylsyre med formlen (I):

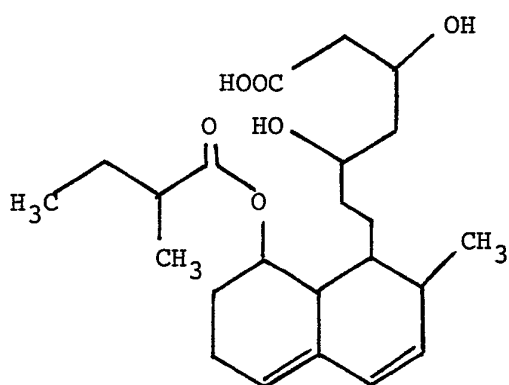


hvor R betegner en gruppe med formlen





eller en ringsluttet lacton, et salt eller en ester deraf, k e n d e t e g n e t ved, at man enzymatisk hydroxylerer en forbindelse valgt blandt ML-236B-carboxylsyre med form-
len



eller en ringsluttet lacton (ML-236B), et salt eller en ester deraf, og fra reaktionsblandingen isolerer en eller

flere af forbindelserne med formlen I, eventuelt i form af en ringsluttet lacton, et salt eller en ester deraf.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den enzymatiske hydroxylering foretages ved hjælp af en mikroorganisme valgt blandt mikroorganismer af slægterne *Mucor*, *Rhizopus*, *Zygorynchus*, *Circinella*, *Actinomucor*, *Gongronella*, *Phycomyces*, *Martierella*, *Pycnopus*, *Rhizoc=tonia*, *Absidia*, *Cunninghamella*, *Syncephalastrum* og *Streptomyces* eller ved hjælp af en cellefri, enzymholdig ekstrakt fra nævnte mikroorganismer.

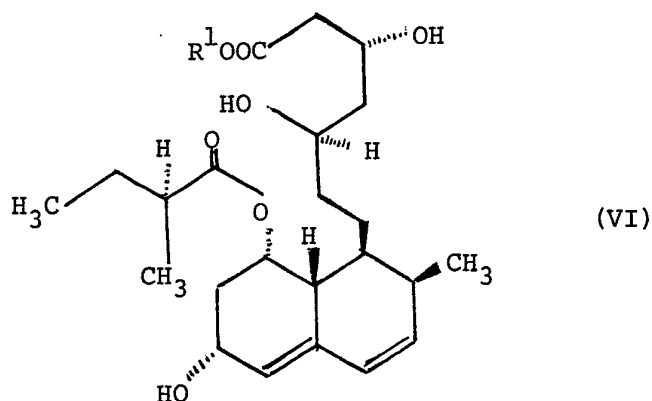
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at esteren er en C_1 - C_5 -alkylester.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at esteren er en methylester.

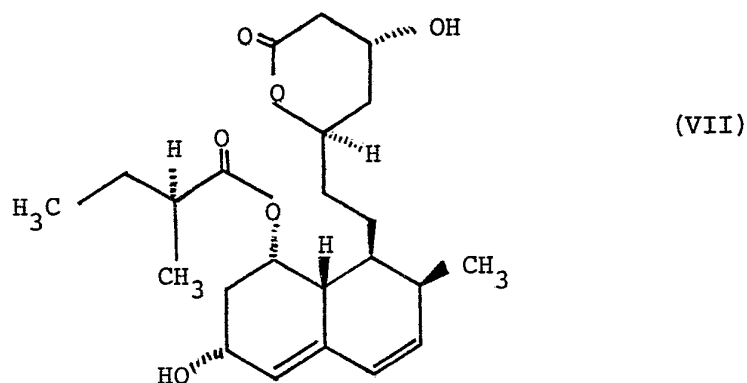
5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at saltet er et alkalimetalsalt.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at saltet er et natriumsalt.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 2 til fremstilling af en forbindelse valgt blandt forbindelser med formlen (VI):

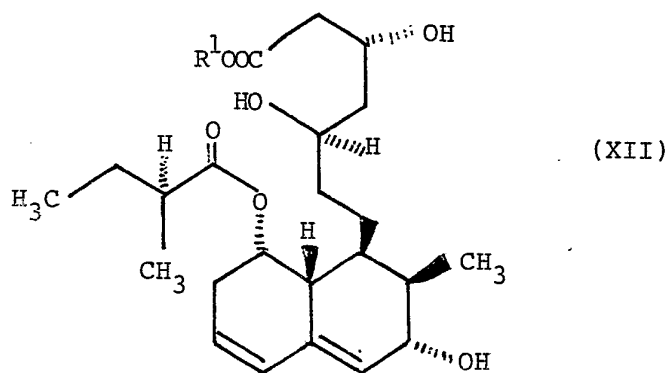


hvor R^1 betegner et hydrogenatom eller en C_1-C_5 -alkylgruppe, farmaceutisk acceptable salte af syren, hvor R^1 betegner et hydrogenatom, og forbindelsen med formlen (VII):



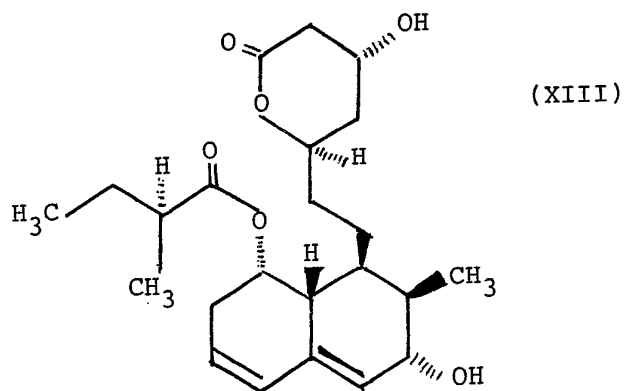
kendetegnet ved, at der som mikroorganisme anvendes en stamme af arten *Syncephalastrum nigricans* eller *Syncephalastrum racemosum*.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 2 til fremstilling af en forbindelse valgt blandt forbindelser med formlen (XII):



hvor R^1 betegner et hydrogenatom eller en C_1-C_5 -alkylgruppe, farmaceutisk acceptable salte af syren, hvor R^1 be-

tegner et hydrogenatom, og forbindelsen med formlen (XIII):



kendetegnet ved, at der som mikroorganisme
anvendes en stamme af arten *Absidia coerulea* eller *Cunning-*
hamella echinulata.

Fremdragne publikationer:

Fig 1

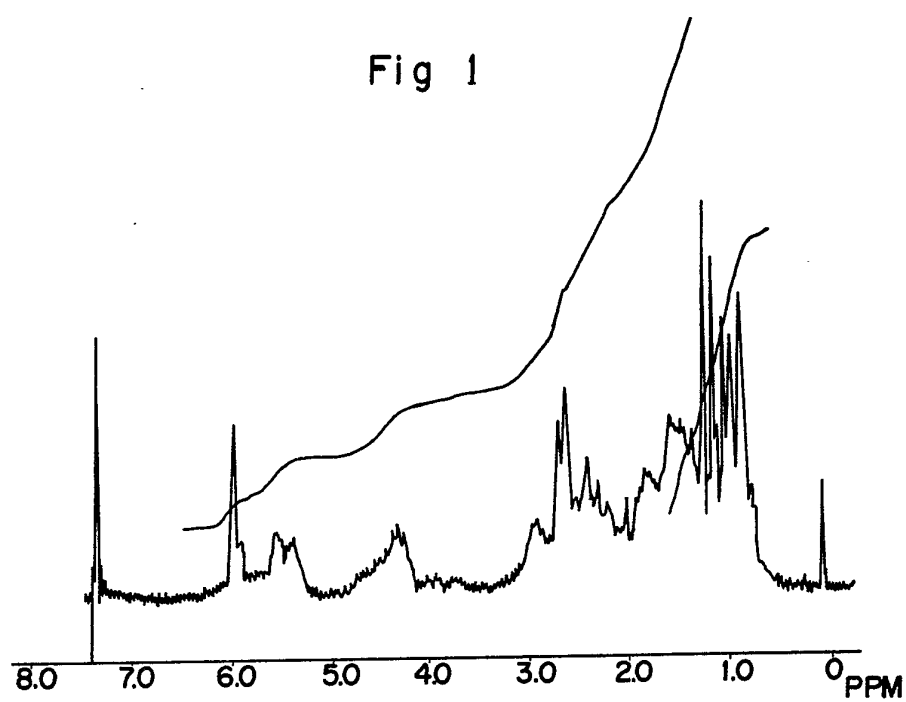


Fig 2

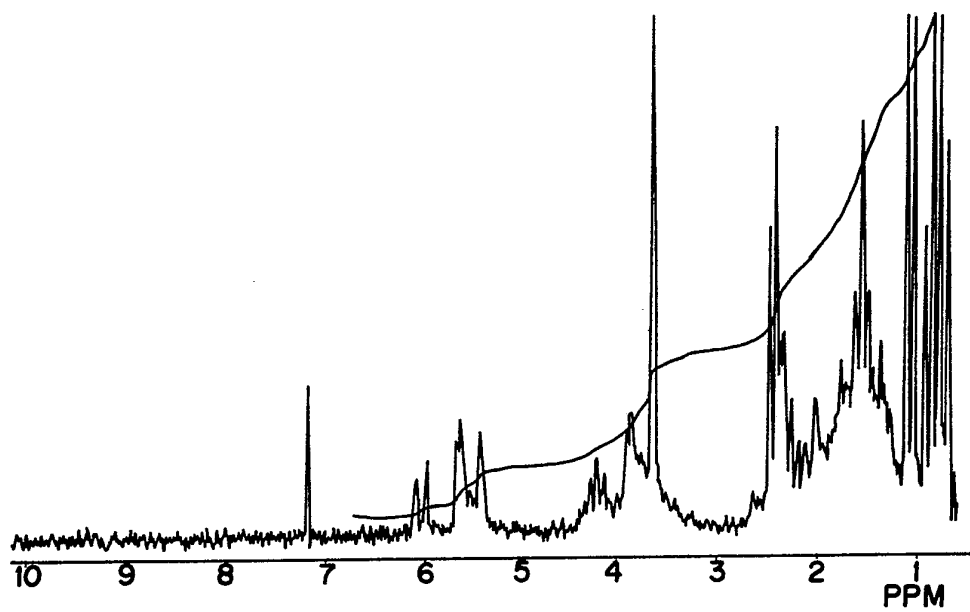


Fig 3

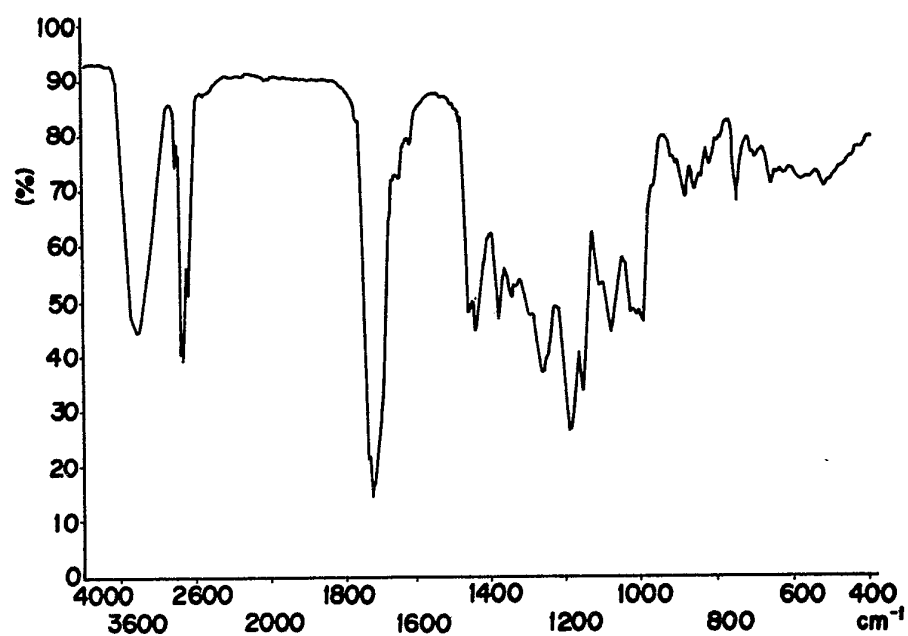


Fig 4

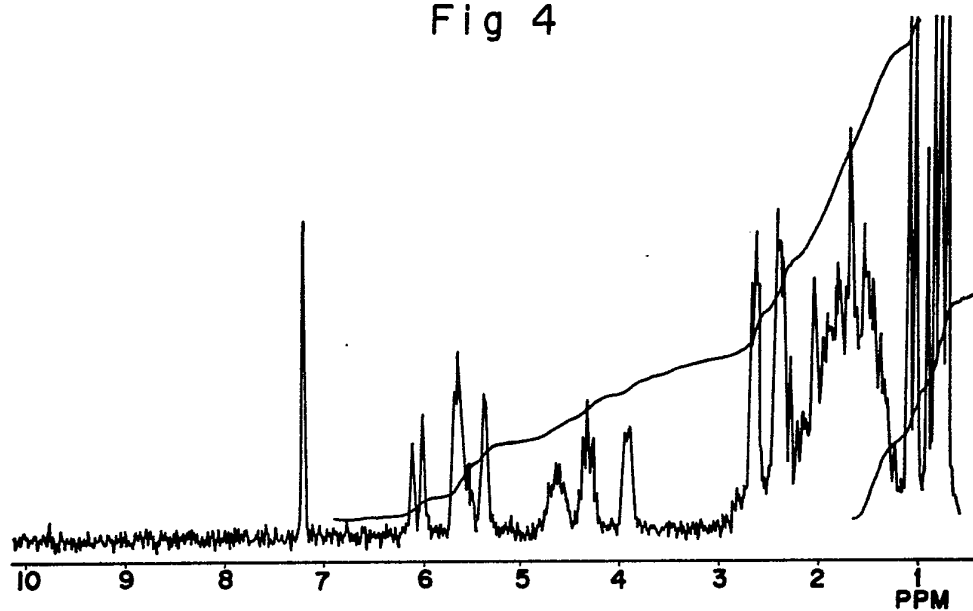


Fig 5

