

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

B

(11) 192 461

A bejelentés napja: (22) 84. 10. 02.

(21) (3724/84)

A bejelentés elsőbbsége:

(33)
US

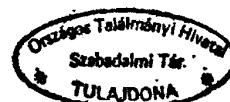
(32)
83. 10. 03.

(31)
(538 453)

A közzététel napja: (41) (42) 85. 11. 28.

Megjelent: (45) 89. 12. 08.

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO₄
C 12 P 19/60
A 61 K 31/71



Feltaláló(k): (72)

KONISHI Masataka, Kawasaki, SUGAWARA Koko, Saitama
MIYAKI Takeo, Yokohama, KAWAGUCHI Hiroshi, Tokió,
JP

Szabadalmaz: (73)

Bristol-Myers Company, New York, N.Y., US

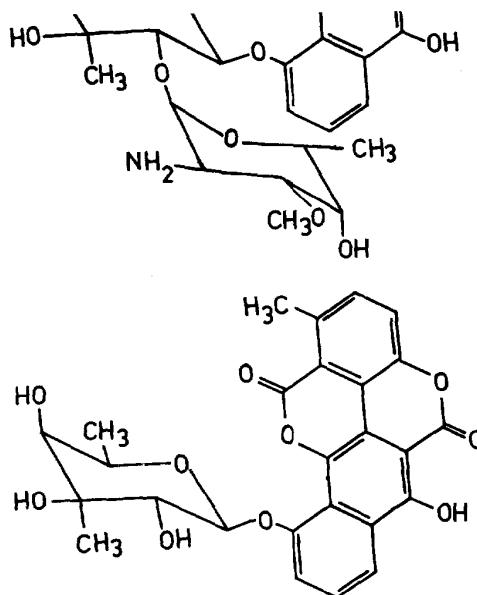
(54)

**ELJÁRÁS A BBM—2478 ANTIBIOTIKUM KOMPLEXNEK
ÉS KOMPONENSEINEK, A BBM—2478A ÉS A BBM—2478B
ANTIBIOTIKUMOKNAK, VALAMINT EZEKET TARTALMAZÓ
GYÓGYSZERKÉSZÍTMÉNYEKNEK AZ ELŐÁLLÍTÁSÁRA**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás az új BBM-2478 antibiotikum komplexnek és komponenseinek: a (VI) képletű BBM-2478A és a (VII) képletű BBM-2478B antibiotikumnak az előállítására az új J907-21 jelzésű (ATCC 39417) actinomycete törzs asszimilálható szén- és nitrogénforrást tartalmazó vizes táptalajon történő tenyésztése, a termelt BBM-2478 antibiotikum komplex elkülönítése és kívánt esetben az említett két komponens szétválasztása útján.

A BBM-2478 antibiotikum komplex és komponensei baktériumellenes hatásúak, emellett a BBM-2478A antibiotikum daganatellenes hatással is rendelkezik.



A találmány tárgya eljárás az új BBM-2478 antibiotikum komplexnek és komponenseinek, a BBM-2478A és 2478B antibiotikumoknak, valamint az említett antibiotikum komplexet vagy komponenseit hatóanyagként tartalmazó gyógyászati készítményeknek az előállítására.

A találmány szerint előállított két antibiotikus hatású vegyület, a BBM-2478A és a BBM-2478B antibiotikum, kémiai szerkezete szempontjából glikozid, amely csartarinból, a sartrozín aglikonjából és egy vagy két cukorcsoportból áll. A BBM-2478B jelű vegyületben az (a) képletű cukorcsoport kapcsolódik az aglikonhoz, míg a találmány szerint előállított másik antibiotikus hatású vegyületben, amelynek jele BBM-2478A, a (b) képletű aminocukor-csoport is kapcsolódik az aglikonhoz az (a) képletű cukorcsoporton keresztül.

Az antibiotikus hatással rendelkező sartrőzint például a következő szakirodalmi helyek ismeretik: J. Am. Chem. Soc. 75, 4011—4012 (1953); Helv. Chim. Acta 47, 1459—1484 (1964). A sartrőzin ugyanazt az aglikoncsoportot tartalmazza, mint a találmány szerint előállított vegyületek, azonban két különböző cukorcsoport is jelen van benne, a D-fukóz és a D-digitalóz. A sartrőzin a (IV) képlettel jellemezhető és a következő mikroorganizmusok fermentálása során képződik: *Streptomyces chartreusis*, *Streptomyces* sp. 747 (*Streptomyces viridis*), *Streptomyces* sp. 6A36 (*Streptomyces viridochromogenes*) és két actinomycete törzs, amelyek jelzése *Streptomyces* sp. X—3988 és S—465. A sartrőzin nyilvánvalóan megegyezik a 747 és az X—465A jelzésű antibiotikummal.

A találmány szerint elsősorban a BBM-2479 jelű új antibiotikum komplexet állítjuk elő a J907—21 új actinomycete törzsnek (ATCC 39417) vagy variánsainak, vagy mutánsainak vizet táptalajon aerob körülmények között történő tenyésztésével. A fenti tenyésztett törzset ellep a táptalaj, amely asszimilálható szén- és nitrogénforrásokat tartalmaz, és a tenyésztést addig folytatjuk, amíg az említett organizmus jelentős mennyiségű BBM-2478 jelű komplexet nem termel, amelyet azután elkülönítjük a táptalajtól. A BBM-2478 jelű komplex két bioaktív antibiotikum komponenset tartalmaz, amelyek jelzése BBM-2478A, illetve BBM-2478B. Ezeket a szokásos kromatográfiás módszerekkel választhatjuk szét és különíthetjük el gyakorlatilag tiszta alakban.

A BBM-2478A és B jelű vegyület antibakteriális hatással rendelkezik aerob Gram pozitív és anaerob baktériumokkal szemben. A BBM-2478A jelű vegyület rosszindulatú daganatok növekedését is gátolja kísérleti úton létrehozott állati daganatok esetén.

Az 1. ábra a BBM-2478A jelű vegyület infravörös abszorpciós spektrumát mutatja be.

A 2. ábrán a BBM-2478B vegyület infravörös abszorpciós spektruma látható.

A 3. ábrán a BBM-2478A jelű vegyület deutero-metanolban felvett protonmágneses rezonancia spektrumát (80 MHz) mutatjuk be.

A 4. ábrán a BBM-2478A vegyület deutero-dimetilszulfoxidban felvett ^{13}C magmágneses rezonancia spektruma (20 MHz) látható.

A következőkben részletesen ismertetjük a találmányt.

A találmány értelmében tehát a BBM-2478 antibiotikum komplexet és kívánt esetben ennek komponenseit, a BBM-2478A és BBM-2478B jelű antibiotikumokat — amelyek valamennyien új, az eddigi irodalomban le nem írt és eddig még elő nem állított termékek — a jelen találmány bejelentője által az American Type Culture Collection intézetnél 1993. 08. 29-én ATCC 39417 sz. alatt letétbe helyezett J907—21 jelzésű actinomycete törzs fermentálásával állítjuk elő. A termelő organizmust, amelyet egy El Salvadorban gyűjtött talajmintából különítettünk el, jelenleg csak nem-*Streptomyces* actinomycete törzsként sorolták be.

A termelő törzs rendszertani jellemzése

A J907—21 törzs jól elágazó, nem töredező vegetatív micéliumot képez, hiányzik azonban az a képessége, hogy valódi légmicéliumot hozzon létre. Az eddigi vizsgálatok szerint a törzs spórátlan. Tekintettel arra, hogy mezo-diamino-pimelinsavat tartalmaz a sejtfalban és madurózt az egész sejt hidrolizátumában, a J907—21 törzs a III_B sejtaltípusba tartozik. A törzs morfológiailag fontos testeket, például spóraláncot vagy spóratokot nem hordoz. Jelenleg tehát a J907—21 jelzésű törzs besorolása csak nem-*Streptomyces* actinomycete törzs lehet.

Morfológia

A J907—21 jelzésű törzs hosszú, jól elágazó, 0,4 μm szélességű vegetatív micéliumot képez, amely nem töredezik pálcika vagy gömb alakú sejtekké. Némelyik agar-agar táptalajon esetenként képződik csökevényes, rövid légmicélium, a minősítéshez használt táptalajok egyikén sem alakul ki azonban igazi légmicélium. Spóráképző testeket és spórákat eddig még nem sikerült megfigyelni.

A tenyészetek jellemzői

Amint az 1. táblázatból kitűnik, a törzs növekedése közepes mértékű a természetes eredetű szerves táptalajokon, gyengén növekszik azonban a legtöbb vegyszeres táptalajon. Jóllehet a J907—21 jelzésű törzs nem képez valódi légmicéliumot, a 2. és 4. számú ISP táptalajon, valamint a Bennett-féle agar-agaron részben képződik csökevényes, rövid, lebegő micélium. Csökevényes légmicélium a 7. számú ISP táptalajon is képződik, ha az adalékanyagként kobalamint vagy vitaminokat tartalmaz. A vegetatív micélium hátoldalának színe a halványsárgától a barna különféle árnyalatáig terjed a legtöbb

agar-agar táptalajon. Mélyvörös micéliumpigment alakul ki a 2. számú ISP táptalajon és a VDYA táptalajon (V8 nedv — dextróz — élesztőkivonat tartalmú agar-agar). Melanoid pigment

ment nem képződik az 1., 6. és 7. számú ISP táptalajokon. A 2. számú ISP táptalajon létrejövő tenyészet rendkívül kiálló, merev és hajtogatott.

1. táblázat

A J907—21 jelzésű törzs tenyészetének jellemzői*

Triptont és élesztőkivonatot tartalmazó húsleves (1. számú ISP táptalaj)	10	G:** csekély; pelyhes, halványsárga szemcsék D: nincs
Szacharózt és nitrátot tartalmazó agar-agar (Czapek-féle agar-agar)	15	G: csekély R: sárgásfehértől (92)*** világos olivabarnáig (94) A: nincs D: nincs
Glükózt és aszparagint tartalmazó agar-agar	20	G: csekély R: sárgásfehértől (92) közepes olivabarnáig (95) A: nincs D: nincs
Glicerint és aszparagint tartalmazó agar-agar (5. számú ISP táptalaj)	25	G: csekély R: világos szürkés-sárgásbarnától (79) sötét szürkés sárgásbarnáig (81) A: nincs D: közepes sárgásbarna (77)
Szervetlen sókat és keményítőt tartalmazó agar-agar (4. számú ISP táptalaj)	30	G: csekély R: szürkés-sárgásbarna (80) A: nincs vagy nagyon kevés; ha képződik, csökevényes, sárgásfehér (92) D: sötét szürkés sárgásbarna (81)
Tirozinttartalmú agar-agar (7. számú ISP táptalaj)	35	G: közepes R: szürkéssárgától (90) mély sárgásbarnáig (75) A: nincs D: nincs
Tápanyagtartalmú agar-agar	40	G: csekély R: mélysárgától (85) sötét olivabarnáig (96) A: nincs D: nincs
Élesztőkivonatot és maláta-kivonatot tartalmazó agar-agar (2. számú ISP táptalaj)	45	G: közepes R: sötét szürkéssárgától (91) sötét olivabarnáig (96) A: nincs vagy nagyon kevés; ha képződik, csökevényes, világos szürkés-sárgásbarna (79) D: sötét sárgásbarna (78)
Zablisztet tartalmazó agar-agar (3. számú ISP táptalaj)	50	G: közepes R: sárgásfehértől (92) szürkéssárgáig (90) A: nincs D: nincs
Bennett-féle agar-agar	55	G: közepes R: sötét szürkéssárgától (91) sötét olivabarnáig (96) A: nincs vagy nagyon kevés; ha képződik, csökevényes, sárgásfehér (92) D: mélysárga (85)
Peptont, élesztőkivonatot és vasat tartalmazó agar-agar (4. számú ISP táptalaj)	60	G: közepes R: világos olivabarnától (94) sötét sárgásbarnáig (75) A: nincs D: ragyogó narancssárga (67)
VDYA agar-agar (Papavizas, 1964)	65	G: bőséges R: élénk mélyvöröstől (14) feketés vörösig (21) A: nincs D: sötétvörös (16)

1. táblázat
(folytatás)

Kukoricalisztet tartalmazó agar-agar (Riker és Riker, 1936)	G: bőséges 5 R: mély sárgásbarnától (75) sötét sárgásbarnáig (78) A: nincs D: erős barna (55) G: csekély
C—2 agar-agar (Nonomura, 1971)	10 R: világos sárgásbarnától (76) mély sárgásbarnáig (75) A: nincs vagy nagyon kevés; ha képződik, csökevényes, fehér (263) D: nincs
Burgonyát és sárgarépat tartalmazó agar-agar (Cross és munkatársai, 1963)	15 G: csekély vagy közepes R: szürkessárgától (90) sötét sárgásbarnáig (78) A: nincs D: sötét sárgáspiros (30)
Tenyészet 2. számú ISP táptalajon	20 kedvező növekedés; rendkívül kiemelkedő, kemény és hajtogatott; 3—5 mm átmérőjű, vörösfekete felületi színű (24), lebegő micélium nem vagy csak csökevényes képződik
Megjegyzések az 1. táblázathoz:	
* A megfigyelés 28 °C-on 3 hétig végzett inkubálás után történt.	25
** Rövidítések: G = növekedés; R = a hátoldal színe; A = légmicélium; D = könnyen diffundálódó pigment.	
*** A színek megnevezése és a zárójelbe tett számok a következő, színekkel kapcsolatos szabványnak felelnek meg: K. L. Kelly és D. B. Judd, ISCC—NBS color-name charts illustrated with centroid colors, U. S. Dept. of Comm. Cir. 553, Washington, D. C., 1975. november.	30

Fiziológias jellemzők

A maximális mértékű növekedés 28 °C-on és 37 °C-on figyelhető meg. Nem tapasztaltunk növekedést 7 °C-on és 45 °C-on. A növekedés 15—43 °C-on történik. L-3,4-dihidroxi-fenil-alaninból (L-DOPA) nem képződik melanin. A J907—21 jelzésű törzs elviseli a nátriumklorid	35	behatását legfeljebb 4% koncentrációig, 5%-os nátriumkloridra azonban érzékeny. A törzs érzékeny lizozimra. A J907—21 jelzésű törzs majdnem az összes pentózt és hexózt hasznosítja. A fiziológias jellemzőket a 2. táblázat, a szénhidrátok hasznosítását pedig a 3. táblázat tartalmazza.
	40	

2. táblázat

A J907—21 jelzésű törzs fiziológias jellemzői

Vizsgálat	Reagálás	Használt módszer vagy táptalaj
Hőmérséklet-tartomány	Maximális növekedés 28—37 °C-on. Növekedési tartomány 15—43 °C-on. Nincs növekedés 7 és 45 °C-on.	Bennet-féle agar-agar
Zselatin elfolyósodása	Elfolyósodik	1—0/0 malátakivonat, 0,4—0/0 élesztőkivonat, 0,4—0/0 glükóz, 20—0/0 zselatin
Keményítő hidrolízise	Hidrolizál	Keményítőt tartalmazó agar-agar lemez
Reakció lefőlözött tejben	Nem koagulál és teljesen peptonizálódik	Difco lefőlözött tej
Melanoid pigment képződése	Negatív	Tirozintartalmú agar-agar, peptont, élesztőkivonatot és vasat tartalmazó agar-agar, tripront és élesztőkivonatot tartalmazó húsleves

Vizsgálat	(folytatás)	Használt módszer vagy táptalaj	Reagálás
Tirozináz reakció		Negatív	Arai-féle módszer*
Nitrátredukció		Negatív	0,5—0/0 élesztőkivonat, 1—0/0 glükóz, 0,5—0/0 káliumnitrát, 0,1—0/0 kalciumkarbonát
pH-tűrés		Növekedés 5,0—11,0 pH-nál. Nincs növekedés 4,5 pH-nál.	Élesztőkivonatot és malátakivonatot tartalmazó agar-agar
Nátriumklorid-tűrés		Növekedés legfeljebb 4% nátriumklorid- koncentrációnál. Nincs növekedés 5% nátriumklorid esetén	Alaptáptalaj: 1—0/0 élesztőkivonat, 2—0/0 oldható keményítő, 1,5—0/0 agar-agar
Lizozimtűrés		Érzékeny	Triptikáz szója húsleves + 1,5—0/0 agar-agar

Megjegyzés:

* Arai, T. és Y. Mikami, Chromogenecity of 20
Streptomyces, Appl. Microbiol., 23, 402—406
(1972).

3. táblázat

A J907—21 jelzésű törzs szénhidrát- hasznosítása

glicerín	+
d-(—)-arabinóz	+
l-(—)-arabinóz	+
d-xilóz	+
d-ribóz	+
l-ramnóz	+
d-glükóz	+
d-galaktóz	+
d-fruktóz	+
d-mannóz	+
l-(—)-szorbóz	—
szacharóz	—
laktóz	—
cellobióz	+
melibióz	—
trehalóz	+
raffinóz	—
d-(+)-melecitóz	—
oldható keményítő	+
cellulóz	—
dulcit	—
inozit	+
d-mannit	+
d-szorbit	—
szalicin	+

A megfigyelést 37 °C hőmérsékleten 3 hétig
történő inkubálás után végeztük.

Alaptáptalaj: Pridham—Gottlieb-féle szervet-
len táptalaj.

Rövidítés:

+ = pozitív hasznosítás

— = negatív hasznosítás

A sejtfal aminosav-komponensei és az egész sejt cukorkomponensei

A sejtfal aminosav-összetételét a következő
módszerekkel vizsgáltuk: Becker és munkatár- 65

sai, Appl. Microbiol., 13, 236—243. (1965) és Ya-
maguchi, J. Bacteriol., 89, 444—453. (1965), to-
vábbá aminosavelemző készülékkel is meghatá-
roztuk (Hitachi 0342U modell).

Az egész sejt hidrolizátumában jelen levő cuk-
rokat a következő módszerekkel azonosítottuk:
Lechevalier és Lechevalier, Chemical Methods
as Criteria for the Separation of Nocardiae from
other Actinomycetes. Biology of the Actinomy-
cetes and related Organisms, 11, 78—92. (1976).
30 A J907—21 jelzésű törzs sejtfala mezo-diamino-
-pimelinsavat és kis mennyiségű glicint tartal-
maz. Az egész sejt hidrolizátumában glükóz,
mannóz, maduróz és ribóz jelenléte mutatható
ki. A fentebb említett sejtfalösszetétel és az
35 egész sejtben megtalálható cukorkomponensek
azt mutatják, hogy a J907—21 törzs a III_B sejt-
fáltípusba tartozik.

Rendszertani jellemzés

40 A J907—21 jelzésű törzs mezofil, Gram po-
zítív actinomycete, egyes esetekben csökevényes,
rövid lebegő micéliumot hoz létre, hiányzik
azonban az a képessége, hogy valódi lebegő mi-
céliumot, spórahordozó testet és spórát képez-
zen. A J907—21 jelzésű törzs III_B típusú sejt-
fállal rendelkezik.

A III_B típusú sejtfállal rendelkező ismert ac-
tinomycetek a következő nemzetségeket tartal-
maznak: Actinomadura, Microbispora, Strepto-
50 sporangium, Spirillospora, Planomonospora, Pla-
nobispora és Dermatophilus. A patogén termé-
szetű Dermatophilus nemzetség vegetatív micé-
liuma mind transzverzális, mind pedig longitu-
dinális válaszfalakat tartalmaz. Ezért a J907—
21 jelzésű törzs világosan eltér a Dermatophilus
nemzetségtől. A többi hat nemzetséget az jel-
lenni, hogy a légmicéliumon spórahólyagot (spó-
ratokot) vagy leszakadt spórát hordoznak.
60 A Streptomyces fajoktól eltérően számos olyan
törzs, amely ebbe a hat nemzetségbe tartozik,
elégé nehézkes spóráképződésű. Ennek követ-
keztében a J907—21 jelzésű törzs esetleg a fen-
tebb említett hat nemzetség valamelyikébe tar-
tozik.

A hat nemzetség közül az *Actinomadura* nemzetség a talajban található, és széles körben elterjedt az egész világon. A J. Gen. Microbiol., 109, 69—78. (1978) szakcikkben Gordon fiziológiailag jellemzett 14 *nocardiae* osztályt, amely *Actinomadura madurae* törzset hoz létre. Gordon fiziológiai vizsgálatai alapján összehasonlítottuk a J907—21 jelzésű törzset az *Actinomadura madurae*-val (4. táblázat). A J907—21 jelzésű törzs szorosabb kapcsolatban volt az *Actinomadura madurae*-val (a hasonlóság 85,7%-os), mint a többi, III_C és IV sejtfaltípusú osztállyal (a hasonlóság mértéke 54,8—76,9%). A III_B típusú sejtfallal rendelkező hat nemzetség közötti fiziológiai összefüggés azonban nem megállapított, mivel e nemzetségek világosan különböznek egymástól morfológiailag. Ennek következtében a J907—21 jelzésű törzs minősítése csak spórátlan nem-*Streptomyces* lehet.

4. táblázat

A J907—21 jelzésű törzs és az *Actinomadura madurae* diagnosztikai fiziológiai tulajdonságainak összehasonlítása

	J907—21 törzs	Actino- madura* (47)**
Az alábbi anyagok bontása:		
adenin	+	—
kazein	+	+
hipoxantin	+	+
tirozin	+	+
karbamid	—	—
xantin	—	—
Ellenállás az alábbiakkal szemben:		
lizozim	—	—
rifampin	+	v
Az alábbi anyagok hidrolízise:		
eszkulin	+	+
hippurát	+	—
keményítő	+	+
Savképzés az alábbi vegyületekből:		
arabinóz	+	+
cellobióz	+	+
glükóz	+	+
glicerín	+	+
inozít	+	v
laktóz	—	v
mannit	+	+
mannóz	+	+
melecitóz	—	—
melibióz	—	—
raffinóz	—	—
ramnóz	+	+
szorbit	—	—
trehalóz	+	+
xilóz	+	+

Az alábbi csoportok hasznosítása:

	benzoát	—	—
	citrát	—	v
5	mukát	—	—
	szukcinát	+	v
	tartarát	—	—
	Nitrit képződése nitrátból	—	+
	Túlélés 50 °C-on 8 óra	—	+
10	elteltével	—	+
Jelölések: + = pozitív; — = negatív; v = 15—84% pozitív.			
* Gordon és munkatársai adatai.			
** A vizsgált törzsek száma.			

Ugyanúgy, mint más organizmusoknál, a J907—21 jelzésű törzs jellemzői megváltoztathatók. Például a J907—21 jelzésű törzs mesterséges variánsaihoz és mutánsaihoz juthatunk önmagában ismert módon történő kezeléssel, például ultraibolya fénnel, röntgensugárzással, nagyfrekvenciás hullámokkal, radioaktív sugárzással és vegyszerekkel. A találmány körébe tartozik a J907—21 jelzésű törzs valamennyi olyan természetes vagy mesterséges variánsa és mutánsa (a következőkben ezeket együttesen mutánsoknak nevezzük), amelyek a BBM—2478 jelű antibiotikumokat termelik.

Az antibiotikum termelése

A találmány értelmében a BBM—2478 jelű antibiotikumokat úgy állítjuk elő, hogy a J907—21 jelzésű törzset (ATCC 39417) vagy annak egy, a BBM—2478 antibiotikumot termelő mutánsát vizes táptalajba bemezítve, aerob körülmények között tenyésztjük. A termelő organizmus tenyésztését olyan táptalajon végezzük, amely valamely asszimilálható szénforrást, például egy asszimilálható szénhidrátot tartalmaz. Alkalmazható szénforrás például a glicerín, arabinóz, xilóz, glükóz, fruktóz, mannóz, oldható keményítő, mannit és cellobióz.

A táptalaj asszimilálható nitrogénforrást is tartalmaz, amely például halliszt, szójaliszt, kukorica-csávale, peptonok, húskivonat, földimogyoróliszt, élesztőkivonat vagy ammóniumsó lehet. Kívánt esetben a táptalajhoz szervesen sokat, így nátriumkloridot, káliumkloridot, magnéziumszulfátot, kalciumkarbonátot, foszfátokat stb. adunk. Nyomelemeket, például rezet, mangánt, vasat, cinket stb. is adhatunk a táptalajhoz kívánt esetben. E nyomelemeket más táptalajkomponensek szennyezéseként is a táptalajba juttathatjuk.

Az inkubálás hőmérséklete minden olyan hőmérsékletérték lehet, amelyen a termelő törzs növekedésre képes, például 15—43 °C. A fermentálást előnyösen 25—35 °C-on, célszerűen 27—32 °C-on végezzük. Előnyösen semleges vagy közel semleges pH-értéket alkalmazunk a táptalajban, és az antibiotikum termelését 6—

10 napig végezzük. Optimális termelést általában 6–7 nap alatt érünk el. Viszonylag kis mennyiségű antibiotikum előállítására rázólab-bikokat és felületi tenyészetet alkalmazhatunk, nagyobb mennyiségű termék előállításához azonban steril tartályokban elhelyezett, merített aerob tenyészet előnyös.

Ha a fermentálást tartályban kívánjuk kivitelezni, célszerűen vegetatív oltóanyagot készí-tünk tápanyagokat tartalmazó húslevesben, amelyet beoltunk az organizmus szuszpenziójá-val, és amikor rendelkezésünkre áll a fiatal, ak-tív, vegetatív oltóanyag, aszeptikus körülmé-nyek között átvisszük azt a fermentáló tartály-ban levő táptalajba. Tartályokban és palackok-ban a levegőztetést úgy oldhatjuk meg, hogy steril levegőt vezetünk át a fermentáló táptala-jon vagy vezetünk annak felületére. További keverést mechanikai keverő segítségével bizto-síthatunk. Kívánt esetben habzástgátló anyago-kat, például lárdolajat is adhatunk a táptalaj-hoz.

A BBM—2478 jelű antibiotikum képződését a fermentációs közegben egyszerűen követhet-jük a fermentálás folyamán a papírkorongos agar-agar diffúziós vizsgálattal, amelynél orga-nizmusként *Micrococcus luteus* PCI 1001 tör-zset alkalmazunk.

A BBM—2478 jelű antibiotikumok elkülönítése

Miután a táptalaj optimális antibiotikum-tar-talmát elértük, önmagában ismert módon, pél-dául szűréssel vagy centrifugálással elválaszt-juk a micéliumot és az oldhatatlan maradékot a fermentációs táptalajtól. A micéliumtartalmú szűrőpogácsában levő antibiotikumot úgy nyer-hetjük ki, hogy a szűrőpogácsát metanollal ext-raháljuk, az oldhatatlan anyagokat szűrjük, és a metanolos extraktumot vizes oldat visszama-radásáig pároljuk be.

A micélium szűrése vagy centrifugálása utáni szűrletből az antibiotikumot n-butanollal extra-háljuk, majd a butanolos extraktumot vizes old-at visszamaradásáig töményítjük.

A BBM—2478A és B jelű antibiotikumokat tartalmazó vizes metanolos és butanolos extrak-tumokat ezután önmagában ismert kromatográ-fias tisztításnak vethetjük alá, és ilyen módon tisztított BBM—2478A és B antibiotikumhoz ju-tunk. Egy előnyös tisztítási módszert ismerte-tünk a 2. példában.

A BBM—2478 jelű antibiotikumok fizikai-kémiai tulajdonságai

A BBM—2478A és B jelű vegyületeket sár-gásnarancs színű kristályos anyagok alakjában különítettük el. A BBM—2478 mindkét kompo-nense eltér a sartrőzintől a vékony-réteggkoma-tográfias vizsgálat alapján, amint azt az 5. táb-lázat mutatja. A BBM—2478A jelű vegyület jól

oldódik, dimetilszulfoxidban, dimetilformamid-ban, dioxánban és savas vízben, rosszul oldódik metanolban, etanolban és kloroformban, s old-hatatlan más szerves oldószerekben. A BBM—2478B jelű vegyület oldhatósága hasonló a BBM—2478A jelű vegyületéhez, azzal az elté-réssel, hogy a BBM—2478B jelű vegyület nem oldódik savas vízben.

A BBM—2478A és B vegyület pozitív reak-ciót ad vas(III)-klorid és antron reagenssel. A BBM—2478A jelű vegyület pozitív reakciót ad ninhidrinnel, míg a BBM—2478B jelű vegyü-let viselkedése negatív ugyanennél a vizsgálat-nál. A Tollen- és Sakaguchi-reakciók mindkét vegyület esetén negatív eredményt szolgáltata-nak. A BBM—2478A és B jelű vegyületek fizi-kai-kémiai tulajdonságait a 6. táblázatban fog-laljuk össze. A két vegyület ultraibolya spekt-ruma hasonló, maximumok jelentkeznek 236, 266, 398 és 422 μm értéknél semleges és savas oldatban. Alkalikus oldatban 240, 268 és 435 μm -nél találhatók a maximumok. Ezek a spektrumok szoros kapcsolatban vannak a sartrőzin spektru-mával. A BBM—2478A és B vegyület infravö-rös spektruma az 1., illetve a 2. ábrán látható. A BBM—2478A jelű vegyület PMR spektrumát a 3. ábra, ^{13}C -NMR spektrumát pedig a 4. ábra mutatja be.

30

5. táblázat

A BBM—2478A és B jelű vegyület,
valamint a sartrőzin vékony-réteggkomatográfias
jellemzői

	SiO ₂ CHCl ₃ — MeOH (7:3)	SiO ₂ EtOAc— MeOH (1:1)
BBM—2478A	R _f 0,37	R _f 0,16
BBM—2478B	0,78	0,57
Sartrőzin	0,65	0,48

45

6. táblázat

A BBM—2478A és B jelű vegyület
fizikai-kémiai tulajdonságai

	BBM— 2478A	BBM— 2478B
Megjelenés	sárga, amorf por	sárga, amorf por
Olvadáspont	225— —226 °C	271— —272 °C (bomlik)
[α] _D ²⁵ (c = 0,5; piridin)	+124°	—8°
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (E ₁ ^{1%} cm)	236 (590) 266 (550) 333 (100) 378 (132) 398 (205) 422 (225)	236 (740) 266 (700) 333 (118) 378 (169) 398 (255) 422 (290)
Analízis talált:	C 59,28% H 5,40% N 2,06%	C 63,07% H 4,51%

65

BBM— 2478A	BBM— 2478B
számított: $C_{33}H_{35}NO_{13}H_2O$	$C_{26}H_{22}O_{10}$
C 59,01%	képletre C 63,16%
H 5,55%	H 4,48%
N 2,09%	

A BBM—2478A jelű vegyület magmágneses rezonanciaspektruma 33 szénatom jelenlétét mutatta, mégpedig a következőkét: négy C— CH_3 , egy $-OCH_3$, kilenc $>CH-$, egy $>C<$, öt $-CH=$ és 13 $>C=$. Ezekből a spektrumadatokból és a BBM—2478A jelzésű vegyület mikroanalitikai adataiból arra következtettünk, hogy a vegyület képlete $C_{33}H_{35}NO_{13}$. A vegyületet 0,4 n metanolos sósavoldattal visszafolyató hűtő alatt forralva 1 órán át hidrolizáltuk. A kivált sárga kristályokat szűrtük, és a szűrletet vákuumban betöményítettük. A kapott szirupszerű folyadék ninhidrinnel pozitív reakciót adó cukortöredékeket tartalmazott. A kristályos anyagot szinképelemzés alapján azonosítottuk, hiteles mintával összehasonlítva, s az csartarinak bizonyult, amely a sartrózin aglikonja, s az (V) képlettel jellemezhető.

A vizes koncentráumban jelenlevő cukortöredék az (I) általános képletű anomer diszacharidkeverék volt, amelyet kromatográfiás úton választottunk szét Amberlite CG—50 (NH_4^+ alakban levő) ioncserélő gyanta alkalmazásával. Így közel azonos mennyiségben kaptuk az R_1 helyén metoxicsoportot, R_2 helyén hidrogénatomot tartalmazó (I) általános képletű alfa-metil-glikozidot és az R_1 helyén hidrogénatomot, R_2 helyén metoxicsoportot tartalmazó (I) általános képletű béta-metil-glikozidot. Mindkét vegyület összegképlete $C_{15}H_{29}NO_8$ volt a tömegspektrum ($M^+ + 1$: m/z 352) és magmágneses rezonanciaspektrum alapján. A két vegyület fizikai-kémiai tulajdonságait a 7. táblázatban foglaljuk össze.

Az R_1 helyén metoxicsoportot, R_2 helyén hidrogénatomot tartalmazó (I) általános képletű vegyület, amelyet a továbbiakban (Ia) általános képletű vegyületnek nevezünk, valamint az R_1 helyén hidrogénatomot és R_2 helyén metoxicsoportot tartalmazó (I) általános képletű vegyület, amelyet a továbbiakban (Ib) általános képletű vegyületnek nevezünk, ellenállt a további savas hidrolízisnek, és a képződő cukortöredékek jelentős mértékben elbomlottak, ha a savasság elegendő volt a glikozidkötés elhasításához.

Az (Ia) és (Ib) képletű vegyület keverékének 370 mg mennyiségét metanolban acetileztük, majd a kapott mono-N-acetil-származékot (460 mg, $M^+ + 1$: m/z 394) 4,5 n metanolos sósavval hidrolizáltuk. A terméket szilikagél tartalmazó oszlopon kromatografáltuk, alsó fázisként kloroform, metanol és tömény ammóniumhidroxid 6:1:1 arányú elegyét használva. Így a következő termékeket kaptuk: egy N-acetil-amino-cukor alfa- és béta-anomerje [140 mg acilezett (IIa) képletű vegyület, amely az R_1 helyén metoxicsoportot, R_2 helyén hidrogénatomot tartalmazó (II) általános képletű vegyület, és 22 mg acile-

zett (IIb) képletű vegyület, amely az R_1 helyén hidrogénatomot, R_2 helyén metoxicsoportot tartalmazó (II) általános képletű vegyület], valamint egy semleges cukor alfa- és béta-anomerje [85 mg (IIIa) képletű vegyület, amely az R_1 helyén metoxicsoportot, R_2 helyén hidrogénatomot tartalmazó (III) általános képletű vegyület és 79 mg (IIIb) képletű vegyület, amely az R_1 helyén hidrogénatomot, R_2 helyén metoxicsoportot tartalmazó (III) általános képletű vegyület].

Amikor a nitrogénatomon acilezett (IIa) képletű vegyületet telített báriumhidroxid-oldattal kezeltük, az kvantitatíve dezacetileződött, és a szabad aminocsoportot tartalmazó (IIa) vegyületté alakult. A (IIa), (IIIa) és (IIIb) vegyületek fizikai-kémiai adatait a 8. táblázatban mutatjuk be.

A magmágneses rezonanciaspektruma alapján a (IIa) képletű vegyület metil-2-amino-2,6-dideoxi-3-O-metil-alfa-D-galaktopiranozidnak bizonyult. Amint az a 8. táblázatból kitűnik, a (IIa) képletű vegyület MMR spektruma öt, gyűrűhöz kapcsolódó protont, továbbá két $-OCH_3$ és egy $C-CH_3$ jelet tartalmaz. A gyűrűhöz kapcsolódó protonok elsőrendű analízise a következő kapcsolási állandókat szolgáltatja: $J_{1-2} = 3,8$; $J_{2-3} = 10,5$; $J_{3-4} = 3,0$; $J_{4-5} < 1,0$ és $J_{5-6} = 6,4$ Hz. Ezek az értékek megfelelnek a feltételezett szerkezetnek. Emellett a (IIa) képletű vegyület N,O-diacetil-származékának fizikai-kémiai adatai (olvadáspont: 163–164 °C és $[\alpha]_D^{25} = +154^\circ$, c = 0,3; kloroform) hasonlóak azokhoz az adatokhoz, amelyeket M. B. Perry adott meg a metil-2-acetamido-4-O-acetil-2,6-dideoxi-3-O-metil-alfa-D-galaktopiranozidra [Can. J. Chem., 52, 3251–3255 (1974)].

A (IIIa) képletű vegyület protonmágneses rezonanciaspektruma a következő kapcsolási állandókat adta: $J_{1-2} = 4,5$; $J_{4-5} < 1,0$ és $J_{5-6} = 6,7$ Hz, míg a (IIIb) képletű vegyület hasonló adatai: $J_{1-2} = 7,8$; $J_{4-5} < 1,0$ és $J_{5-6} = 6,5$ Hz. Mindkét vegyület spektrumából kitűnik a gyűrű 3-as helyzetű szénatomjához kapcsolódó proton hiánya. A szinképadatok arra mutattak, hogy a (IIIa), illetve (IIIb) képletű vegyület a 6-dezoxi-3-C-metil-gulopiranozidnak (metil-virenozidnak) vagy a 6-dezoxi-3-C-metil-galaktopiranozidnak az alfa-, illetve béta-metil-glikozidja.

A vékony-rétegekromatográfiás vizsgálat és a magmágneses rezonanciaspektrum azt mutatta, hogy a metil-béta-D-virenozid hiteles mintája különbözött a (IIIb) képletű vegyülettől: a metil-virenozid H_1 és H_5 jelei lényegesen kisebb értékűek voltak, mint a (IIIb) képletű vegyület hasonló jelei. Ez arra mutat, hogy a metil-virenozid 3-as helyzetű szénatomjához kapcsolódó hidroxilcsoport axiális irányítottaságú, míg a (IIIb) képletű vegyületé ekvatoriális irányítottaságú. A (III) általános képletű vegyületnek D-konfigurációt tulajdonítottunk a (IIIa) és (IIIb) képletű vegyület optikai forgatóképessége alapján, valamint azért, mivel $[\alpha]_D^{25}$ értéke a (IIIa) képletű vegyületre -1309° volt. A (IIIa),

illetve (IIIb) általános képletű vegyület tehát metil-6-dezoxi-3-C-metil-alfa-, illetve -béta-D-galaktopiranozid.

A két cukorrész közötti kötést az (Ia) és (Ib) képletű vegyület, valamint acetátjaik tömegspektruma alapján állapítottuk meg. A tömegspektrum töredékionokat mutatott, amelyeket a (III) általános képletű vegyülethez kapcsolódó (II) általános képletű vegyületnek lehetett hozzárendelni. Az (Ia) képletű vegyület N,0-triacetil-származékának 200 MHz-es protonmágneses rezonanciaspektruma és e származék elbontása azt az eredményt szolgáltatta, hogy a (II) általános képletű cukor alfa-glikozid-kötéssel kapcsolódik a (III) általános képletű vegyület 2-es helyzetű szénatomjának hidroxilcsoportjához, azaz igazolt az (I) általános képlettel leírt szerkezet.

A BBM—2478A jelű vegyület különféle pH-értéken mért ultraibolya spektruma igen hasonló a sartrőzinéhez. Ez arra mutat, hogy a BBM—2478A jelű vegyület diszacharid-csoportja ugyanannál a hidroxilcsoportnál kapcsolódik a csartarinhoz, mint a sartrőzinben.

A BBM—2478A jelű vegyület és a sartrőzin kloroformban felvett infravörös spektruma azonos karbonilabszorpciót mutat, ami alátámasztja a fentebb vázolt szerkezetet. A BBM—2478A jelű vegyület N-acetil-származékának magmágneses rezonanciaspektrumában a (III) általános képletű vegyületben jelenlevő anomer proton egy dublettet ($J = 8,0$ Hz) okoz, és ennek alapján béta-piranozid konformációt tulajdonítottunk a vizsgált vegyületnek.

Mikroanalízis alapján feltételeztük, hogy a BBM—2478B jelű vegyület összegképlete $C_{26}H_{22}O_{10}$. Enyhe savas metanolízis hatására a BBM—2478B jelű vegyületből csartarin és (IIIa) és (IIIb) általános képletű semleges cukor szabadult fel. Ez utóbbiak megegyeztek a BBM—2478A jelű vegyületből kinyert cukrokkal. Ezért a BBM—2478B jelű vegyület nyilvánvalóan a BBM—2478A jelű vegyület analógja, amely nem tartalmazza a (II) általános képletű amino-cukor-csoportot. A BBM—2478A jelű vegyület tehát a (VI) képlettel, a BBM—2478B jelű vegyület pedig a (VII) képlettel írható le.

7. táblázat

Az (Ia) és (Ib) képletű vegyület fizikai-kémiai tulajdonságai

	(Ia)	(Ib)
	képletű vegyület	
Megjelenés	fehér por	fehér por
Olvadáspont	79—82 °C	80—83 °C
$[\alpha]_D$ ($c = 1,0$; víz)	+211°	+116°
Vékony-rétegekromatográfiás vizsgálat, futtatószer n-butanol, ecetsav és víz 63:10:27 arányú elegye	$R_f = 0,19$	$R_f = 0,15$
Összegképlet	$C_{15}H_{29}NO_8$	$C_{15}H_{29}NO_8$
Tömegspektrum (m/z)	352 ($M^+ + 1$)	352 ($M^+ + 1$)
	319	319
	235	235
	160	160
Protonmágneses rezonanciaspektrum (60 MHz, deutériumoxid) δ -értékek, ppm	1,25 (3H, dublett) 1,28 (3H, dublett) 1,37 (3H, szingulett) 3,03 (1H, kettős dublett) 3,41 (3H, szingulett) 3,46 (3H, szingulett) 3,6—4,5 (6H, multiplett) 4,90 (1H, dublett, $J = 4,3$ Hz) 4,98 (1H, dublett, $J = 3,5$ Hz)	1,23 (3H, dublett) 1,26 (3H, dublett) 1,29 (3H, szingulett) 3,07 (1H, kettős dublett) 3,44 (3H, szingulett) 3,54 (3H, szingulett) 3,4—4,4 (6H, multiplett) 4,50 (1H, dublett, $J = 8,0$ Hz) 5,09 (1H, dublett, $J = 3,5$ Hz)

8. táblázat

A (IIa), (IIIa) és (IIIb) képletű vegyületek
fizikai-kémiai tulajdonságai

		(IIa) képletű vegyület
Megjelenés		halványsárga szirup
[α] _D		+106° (c = 0,2; metanol)
Vékony-rétegkromatográfiás vizsgálat, futtatószer kloroform, metanol és ammóniumhidroxid 2:1:1 elegye, alsó fázis	10	R _f = 0,67
n-butanol, ecetsav és víz 63:10:27 elegye		R _f = 0,20
Összegképlet	15	C ₈ H ₁₇ NO ₄
Protonmágneses rezonanciaspektrum, (60 MHz, deutériumoxid), δ -értékek, ppm		1,26 (dublett, 3H, J = 6,4 Hz) 2,97 (kettős dublett, 1H, J = 3,8 és 10,5 Hz) 3,41 (szingulett, 3H) 20 3,43 (szingulett, 3H) 3,45 (kettős dublett, 1H, J = 3,0 és 10,5 Hz) 4,00 (kvartett, 1H, J = 6,4 Hz) 4,02 (széles dublett, 1H, J = 3,0 Hz) 4,72 (dublett, 1H, J = 3,8 Hz)
		25 (IIIa) képletű vegyület
Megjelenés		halványsárga szirup
[α] _D		+152° (c = 0,5; kloroform)
Vékony-rétegkromatográfiás vizsgálat, futtatószer kloroform, metanol és ammóniumhidroxid 2:1:1 elegye, alsó fázis	30	R _f = 0,35 R _f = 0,47
n-butanol, ecetsav és víz 63:10:27 elegye		C ₈ H ₁₆ O ₅
Összegképlet	35	1,27 (dublett, 3H, J = 6,7 Hz) 1,34 (szingulett, 3H) 3,38 (szingulett, 3H) 3,48 (széles szingulett, 1H) 3,83 (dublett, 1H, J = 4,5 Hz) 4,18 (kvartett, 1H, J = 6,7 Hz)
Protonmágneses rezonanciaspektrum, (60 MHz, deutériumoxid), δ -értékek, ppm	40	4,75 (dublett, 1H, J = 4,5 Hz)
		(IIIb) képletű vegyület
Megjelenés		halványsárga szirup
[α] _D		-33° (c = 0,5; kloroform)
Vékony-rétegkromatográfiás vizsgálat, futtatószer kloroform, metanol és ammóniumhidroxid 2:1:1 elegye, alsó fázis	45	R _f = 0,32 R _f = 0,40
n-butanol, ecetsav és víz 63:10:27 elegye		C ₈ H ₁₆ O ₅
Összegképlet	50	1,27 (szingulett, 3H) 1,28 (dublett, 3H, J = 6,5 Hz) 3,45 (széles szingulett, 1H) 3,52 (dublett, 1H, J = 7,8 Hz) 3,60 (szingulett, 3H)
Protonmágneses rezonanciaspektrum, (60 MHz, deutériumoxid), δ -értékek, ppm	55	4,00 (kvartett, 1H, J = 6,5 Hz) 4,39 (dublett, 1H, J = 7,8 Hz)
A vegyületek biológiai tulajdonságai		tásos módszer segítségével. Tápanyagokat tartalmazó agar-agar táptalajt használtunk Gram pozitív és Gram negatív baktériumok, GAM agar-agar táptalajt használtunk anaerob mikroorganizmusok és Sabouraud agar-agar táptalajt gombák esetén. Amint azt a 9. táblázat mutatja, a BBM-2478A és B jelű vegyület, valamint a sartrözin hasonló antibakteriális hatással ren-
A BBM-2478 jelű vegyületek minimális gátló koncentrációját (MIC) a sartrözinével összehasonlítva határoztuk meg különféle Gram pozitív és Gram negatív baktériumok és gombák, továbbá egyes anaerob organizmusok alkalmazásával, kétszeres agar-agar sorozathígítási módszerrel.	60	
	65	

delkezik Gram pozitív baktériumokkal és anaerob baktériumokkal szemben, hatástalanoknak bizonyultak azonban Gram negatív baktériumokkal és gombákkal szemben. A BBM—2478A

jelű vegyület Staphylococcus elleni hatása 2—4-szer nagyobb, mint a BBM—2478B jelű vegyületé vagy a sartröziné.

5

9. táblázat

A BBM—2478A és B jelű vegyület
antibakteriális hatása

Vizsgált mikroorganizmus	10	Minimális gátló koncentráció, mcg/ml		
		BBM—2478A	BBM—2478B	Sartrözin
Staphylococcus aureus 209P		1,6	3,1	3,1
Staphylococcus aureus Smith		0,8	6,3	6,3
Bacillus subtilis PCI 219	15	0,8	0,8	0,4
Micrococcus luteus PCI 1001		0,8	3,1	0,8
Micrococcus flavus D12		0,8	1,6	0,4
Escherichia coli NIHJ		100	>100	>100
Klebsiella pneumoniae D11		100	>100	>100
Pseudomonas aeruginosa D15	20	100	>100	>100
Candida albicans IAM 4888		>100	>100	>100
Cryptococcus neoformans D49		>100	>100	>100
Aspergillus fumigatus IAM 2530		>100	>100	>100
Trichophyton mentagrophytes D155		>100	>100	>100
Bacteroides fragilis	25	12,5		6,3
Clostridium difficile		12,5		25
Clostridium perfringens		6,3		1,6
Propionibacterium acnes		6,3		3,1

A BBM—2478A jelű vegyület daganatellenes hatását egéren határoztuk meg, sartrözinnel összehasonlítva. A vizsgálatokhoz a következő daganattípusokat alkalmaztuk: limfocitás leukémia P388, nyirokleukémia L1210 és melanotikus melanoma B16. A daganatokat intraperitoneálisan ültettük be BDF₁ egerekbe, egerenként 10⁶, 10⁵, illetve 10⁶ sejt mennyiségben. A vizsgált vegyületeket 10% dimetilszulfoxidot tartalmazó 0,9%-os vizes nátriumklorid-oldatban oldottuk, és a kiválasztott dózisokat intraperitoneálisan adtuk be 24 órával a daganat beültetése után. A kezelést naponta egy alkalommal végeztük el

30 9 napon át. A kapott eredményeket a 10., 11. és 12. táblázat tartalmazza. A BBM—2478A jelű vegyület mintegy 10—30-szor volt aktívabb a sartrözinnél a minimális hatékony dózis alapján, és valamennyi vizsgált daganat esetén kedvezőbb T/C értékeket ért el, mint a sartrözin. 35 A BBM—2478B jelű vegyületnél nem tapasztaltunk daganatellenes hatást. A BBM—2478A jelű vegyület akut toxicitását ddY törzsbe tartozó egereken határoztuk meg egyszeri intraperitoneális beadással. A kapott LD₅₀-érték 38 mg/kg volt. 40

10. táblázat

A BBM—2478A jelű vegyület hatása
P388 leukémiára

Vegyület	Dózis, ip mg/kg/nap*	MST nap	T/C %	Átlagos	Túlélők száma	
				súlyváltozás az 5. napon, g	5. napon	45. napon
BBM—2478A	3	20,0	222**	—1,0	5/5	0/5
	1	21,5	239	+0,8	6/6	0/6
	0,3	17,0	189	+1,8	6/6	0/6
	0,1	14,5	161	+1,2	6/6	0/6
	0,03	10,0	111	+2,3	6/6	0/6
	0,01	10,0	111	+2,0	6/6	0/6
Sartrözin	10	19,5	217	+1,3	6/6	0/6
	3	15,0	167	+1,5	6/6	0/6
	1	14,0	156	+1,3	6/6	0/6
	0,3	10,5	117	+2,0	6/6	0/6
	0,1	9,0	100	+2,8	6/6	0/6
Vivőanyag	—	9,0	—	+2,4	12/12	0/12

* Az adagolás 9 napon át történt.

** Az aláhúzás szignifikáns daganatellenes hatást jelez.

T/C: túlélési idő/kontroll

MST: átlagos túlélési idő

11. táblázat

A BBM—2478A jelű vegyület hatása L1210 leukémiára

Vegyület	Dózis, ip mg/kg/nap*	MST nap	T/C %	Átlagos súlyváltozás az 5. napon, g	Túlélők száma 5. napon	45. napon
BBM—2478A	3	12,0	150**	—0,1	6/6	0/6
	1	11,0	138	+0,8	6/6	0/6
	0,3	10,5	131	+1,3	6/6	0/6
	0,1	8,0	100	+2,6	6/6	0/6
	0,03	8,0	100	+2,9	6/6	0/6
	0,01	8,0	100	+3,2	6/6	0/6
Sartrözin	10	11,5	144	+1,3	6/6	0/6
	3	9,0	113	+1,4	6/6	0/6
	1	9,0	113,	+1,9	6/6	0/6
	0,3	8,0	100	+3,2	6/6	0/6
	0,1	8,0	100	+3,1	6/6	0/6
Vivőanyag	—	8,0	—	+2,8	12/12	0/12

* Az adagolás 9 napon át történt.

** Az aláhúzás szignifikáns daganatellenes hatást jelez.

12. táblázat

A BBM—2478A hatása B16 melanómára

Vegyület	Dózis, ip mg/kg/nap*	MST nap	T/C %	Átlagos súlyváltozás az 5. napon, g	Túlélők száma 5. napon	45. napon
BBM—2478A	3	41,5	296**	+1,5	6/6	0/6
	1	34,5	246	+2,2	6/6	0/6
	0,3	25,5	182	+2,5	6/6	0/6
	0,1	18,5	132	+2,5	6/6	0/6
	0,03	16,0	114	+2,0	6/6	0/6
Sartrözin	10	25,0	179	+1,7	6/6	0/6
	3	20,5	146	+2,3	6/6	0/6
	1	16,0	114	+2,3	6/6	1/6
	0,3	14,0	100	+1,8	6/6	0/6
Vivőanyag	—	14,0	—	+2,3	10/10	0/10

* Az adagolás 9 napon át történt.

** Az aláhúzás szignifikáns daganatellenes hatást jelez.

Amint arra fentebb rámutattunk, a BBM—2478A és B jelzésű vegyület kiemelkedő antibakteriális hatással rendelkezik aerob Gram pozitív baktériumokkal és anaerob baktériumokkal szemben, ennek következtében ezek a vegyületek felhasználhatók emlősök és más állatok e baktériumok okozta fertőzéseinek gyógyító kezelésére. Emellett a vegyületek az antibakteriális szerek szokásos alkalmazási területein is felhasználhatók, például orvosi és fogászati eszközök fertőtlenítésére.

A BBM—2478A jelű vegyületnek egészen kísérleti úton létrehozott daganatokkal szemben mutatott szignifikáns daganatellenes hatásából

azt a következtetést vonhatjuk le, hogy ez a vegyület emlősökön létrejövő daganatok növekedésének gátlására is alkalmas.

55 Gyógyítás céljára a baktériumokkal fertőzött élőlénynek antibakteriálisan hatékony dózisban adjuk be a BBM—2478A vagy BBM—2478B jelű vegyületet vagy az ezt tartalmazó gyógyászati készítményt. Daganatos beteg kezelésére daganatgátló dózisban adjuk be a BBM—2478A jelű vegyületet vagy az ezt tartalmazó gyógyászati készítményt.

A találmány szerint a gyógyászati készítményeket úgy állítjuk elő, hogy a BBM—2478A vagy BBM—2478B jelű vegyületet a gyógyszer-

készítésnél szokásos vivőanyaggal/anyagokkal összekeverjük, és a keveréket önmagában ismert módon gyógyászati készítménnyé alakítjuk. Az antibakteriális hatású gyógyászati készítmények a vivőanyag(ok) mellett antibakteriálisan hatékony mennyiségű BBM—2478A vagy BBM—2478B jelű vegyületet tartalmaznak. A daganatellenes hatású gyógyászati készítmények a vivőanyag(ok) mellett hatékony daganatgátlást biztosító mennyiségben tartalmazzák a BBM—2478A jelű vegyületet. Előnyösen parenterálisan beadható gyógyászati készítményeket állítunk elő.

A parenterálisan beadható gyógyászati készítmények steril vizes vagy nem vizes oldatok, szuszpenziók vagy emulziók. Előállításuk közvetlenül beadás előtt is történhet steril, szilárd készítményből, amelyet steril vízben, fiziológias sóoldatban vagy más steril befecskendezhető folyadékban oldunk.

A BBM—2478A és B jelű vegyületből alkalmazott tényleges mennyiség általában függ az illető vegyülettől, az alkalmazott gyógyászati készítménytől, a beadás módjától, továbbá a kezelt személy vagy állat állapotától és betegségétől. A gyógyszer hatását befolyásoló számos tényezőt a szakember figyelembe tud venni. Ilyen például a kezelt személy életkora, testsúlya, neme, étrendje, a beadás ideje, módja, a kiürülés sebessége, a kezelt személy állapota, az esetleg szintén használt másmilyen gyógyhatású vegyület, érzékenység és a betegség súlyossága.

A kezelést végezhetjük folyamatosan vagy szakaszosan, betartva a maximális elviselhető dózist. A fenti útmutatások alapján, ismert dózismeghatározó tesztek alkalmazásával a szakember könnyen megállapíthatja az adott körülmények között alkalmazandó optimális dózist.

A találmányt az alábbi példák segítségével részletesen ismertetjük. A példákban szereplő Amberlite CG—50 gyengén savas, karbonsav-típusú kationcserélő gyanta, a Rohm and Haas Co., (Philadelphia, Amerikai Egyesült Államok) védjegyzett terméke. A Diaion HP—20 nem ionos makroretikuláris polimer gyanta, a Mitsubishi Chemical Industries (Japán) védjegyzett terméke.

1. példa

A BBM—2478A és B jelű vegyület előállítása fermentálással

A J907—21 jelzésű actinomycete törzs jól fejlett ferde tenyészetével beoltottuk az alábbi összetételű vegetatív táptalajt: 3% oldható keményítő, 1% Bacto-máj (Difco), 0,5% halliszt, 0,3% nátriumklorid, 0,1% ammóniumsulfát és 0,6% kalciumkarbonát. Sterilizálás előtt a pH értékét 7,0-re állítottuk be. A vegetatív táptalajt 72 órán át inkubáltuk 28 °C-on forgó rázógépen, 250 fordulat/perc beállításával. A képződő tenyészet 5 ml mennyiségét 500 ml térfogatú Erlenmeyer-lombikba vittük át, amely

100 ml fermentáló táptalajt tartalmazott. Ennek összetétele megegyezett a vegetatív táptalajával. A fermentálást a forgó rázógépen végeztük 28 °C hőmérsékleten, 7—10 napig. A fermentáléban levő antibiotikumok aktivitását papírkorongos agar-agar diffúziós módszerrel határoztuk meg, *Micrococcus luteus* PCI 1001 mikroorganizmust használva a vizsgálathoz. 6—7 napig végzett fermentálás után lett maximális hatékonyságú az antibiotikum képződése (150 mikrogramm/milliliter).

2. példa

A BBM—2478A és B jelű vegyületek elkülönítése és tisztítása

Az 1. példa szerint kapott 20 liter mennyiségű, pH = 6,8 értékű fermentált Sharpless típusú centrifuga (Kokusan No. 4A) segítségével micéliumra és felülúszó folyadékra választottuk szét. A micéliumot háromszor extraháltuk 5—5 liter metanollal. Szűrés után a metanolos extraktumokat egyesítettük, és vákuumban bepároltuk. Így vizes oldat maradt vissza.

A fermentlé centrifugálásakor elválasztott felülúszó folyadékot 20 liter n-butanollal extraháltuk, az extraktumot vákuumban bepároltuk. Vizes oldat maradt vissza, amelyet egyesítettünk a másik vizes koncentrátummal, és 5,5 cm átmérőjű, 60 cm magasságú Diaion HP—20 oszlopra vittük fel. Az oszlopot egymás után eluáltuk 5 liter vízzel, 5 liter 50%-os vizes metanollal és 6 liter 80%-os vizes metanollal. Papírkorongos vizsgálattal, *Bacillus subtilis* M45 (Rec⁻) alkalmazásával állapítottuk meg, hogy melyik frakciók tartalmazzák a BBM—2478 jelű vegyületeket. Ezeket az aktív frakciókat, amelyeket a 80%-os vizes metanollal végzett elúciólanyakat kaptuk, egyesítettük, csökkentett nyomáson bepároltuk, a maradékot pedig fagyasztva szárításnak vetettük alá. Ilyen módon 4,5 g sárga szilárd anyag alakjában kaptuk a nyers BBM—2478 komplexet.

Ezt a nyers terméket 3,5 cm átmérőjű, 55 cm magasságú, előzetesen kloroformmal átmosott szilikagél oszlopra vittük fel, majd kloroform és metanol elegyével eluáltuk, miközben szakaszosan növeltük a metanolkoncentrációt (5—10 térfogat%). Az 5%-os metanollal eluált első aktív frakciókat vákuumban bepároltuk, és a maradékot liofilizáltuk. Ilyen módon 72 mg BBM—2478B jelű vegyületet kaptunk; op.: 271—272 °C (boml.).

Hasonló módon dolgoztuk fel a 10%-os metanollal eluált második aktív frakciókat. Ezekből 2,51 g félig tiszta, szilárd BBM—2478A jelű vegyületet kaptunk. Ez utóbbit további kromatografálásnak vetettük alá szilikagélen, közepes nyomású folyékony kromatogram alkalmazásával (11 mm átmérőjű, 500 mm magasságú Kiri-yama-oszlop, FMI laboratóriumi szivattyú, 80—90 psi nyomás). Az elúciót 97 térfogatrész kloroform és 3 térfogatrész metanol elegyével vé-

geztük, az aktív frakciókat vákuumban bepároltuk. Így 1,30 g homogén, szilárd BBM—2478A jelű vegyületet kaptunk; op.: 225—226 °C. Ezt metanolból átkristályosítva sárgás narancsszínű pálcikák alakjában kaptuk a BBM—2478A jelű vegyület monohidrátját.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás a BBM—2478 antibiotikum komplexnek és komponenseinek, a (VI) képletű BBM—2478A antibiotikumnak és a (VII) képletű BBM—2478B antibiotikumnak az előállítására, azzal jellemezve, hogy a J907—21 jelzésű asztinomycete törzset (ATCC 39417) vagy annak egy, a fenti antibiotikumokat termelő mutánsát asszimilálható szén- és nitrogénforrást tartalmazó vizes táptalajon bemeztéses aerob körülmények között tenyésztjük, a képződött antibiotikumot a tápközegtől elkülönítjük, és kívánt esetben a (VI) képletű BBM—2478A antibiotikumot és a (VII) képletű BBM—2478B antibiotikumot ismert módon szétválasztjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás a (VI) képletű BBM—2478A antibiotikum előállítására, azzal jellemezve, hogy a J907—21 jelzésű törzset (ATCC 39417) vagy annak egy, a (VI) ké-

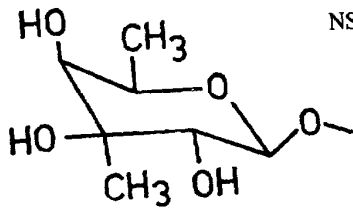
letű antibiotikumot termelő mutánsát asszimilálható szén- és nitrogénforrást tartalmazó vizes táptalajon bemeztéses aerob körülmények között tenyésztjük, majd a (VI) képletű BBM—2478A antibiotikumot elkülönítjük.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás a (VII) képletű BBM—2478B antibiotikum előállítására, azzal jellemezve, hogy a J907—21 jelzésű törzset (ATCC 39417) vagy annak egy, a (VII) képletű antibiotikumot termelő mutánsát asszimilálható szén- és nitrogénforrást tartalmazó vizes táptalajon bemeztéses aerob körülmények között tenyésztjük, majd a (VII) képletű BBM—2478B antibiotikumot elkülönítjük.

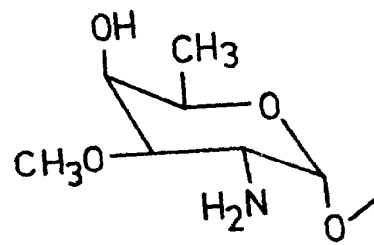
4. Eljárás különösen antibakteriális hatású gyógyászati készítmények előállítására, azzal jellemezve, hogy a (VI) képletű BBM—2478A jelű vegyületet és/vagy a (VII) képletű BBM—2478B jelű vegyületet a gyógyszerkészítésnél szokásos vivőanyaggal/anyagokkal összekeverve gyógyászati készítménnyé alakítjuk.

5. Eljárás különösen tumorgátló hatású gyógyászati készítmények előállítására, azzal jellemezve, hogy a (VI) képletű BBM—2478A jelű vegyületet a gyógyszerkészítésnél szokásos vivőanyaggal/anyagokkal összekeverve gyógyászati készítménnyé alakítjuk.

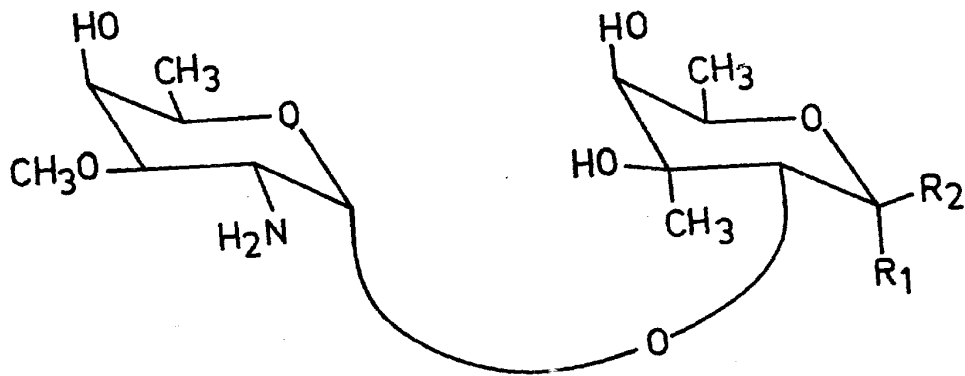
3 rajz + 4 ábra



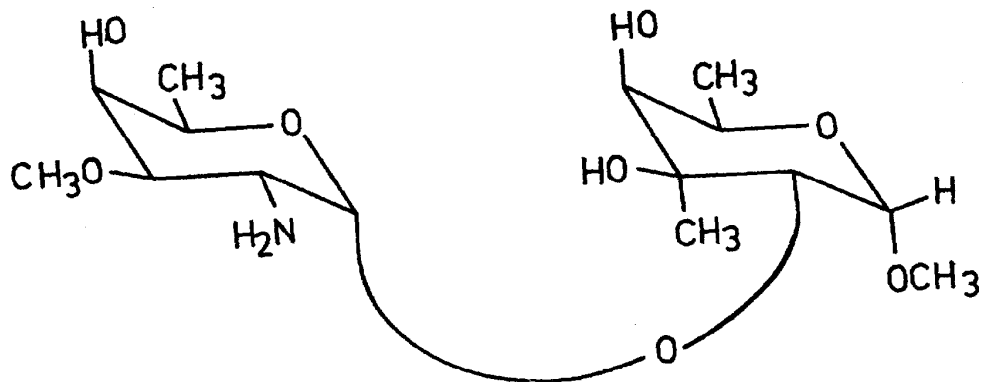
(a)



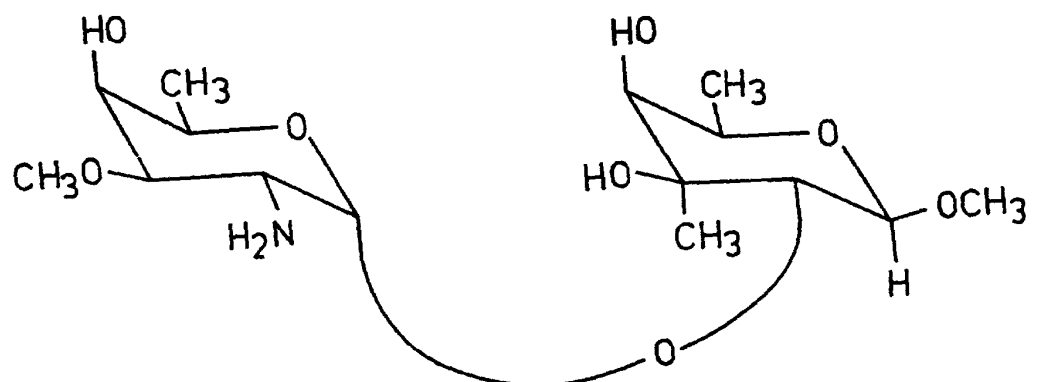
(b)



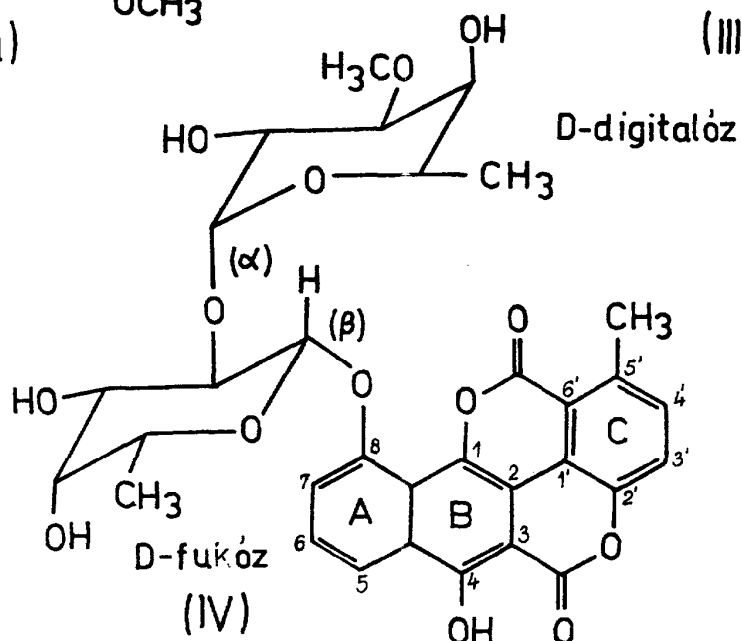
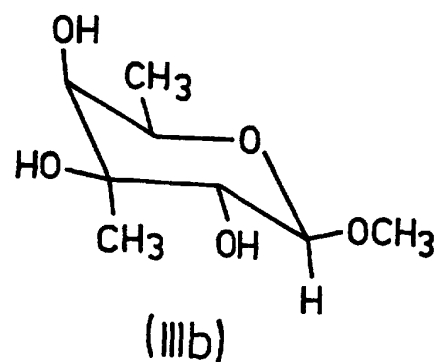
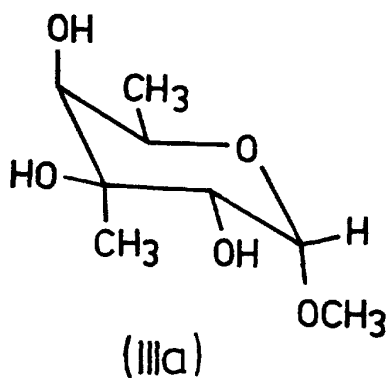
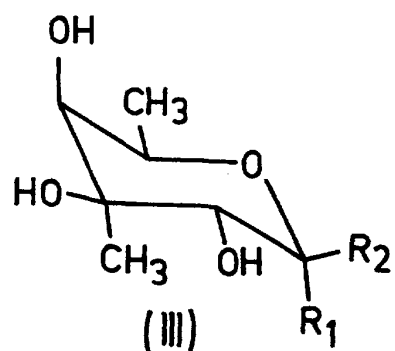
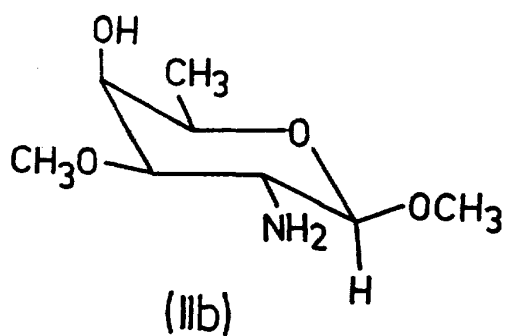
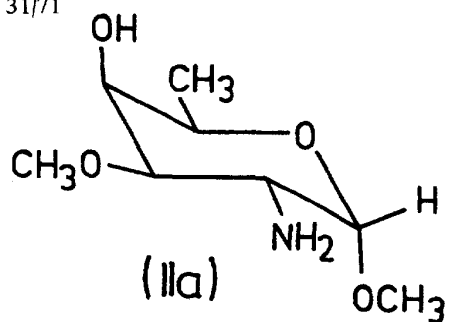
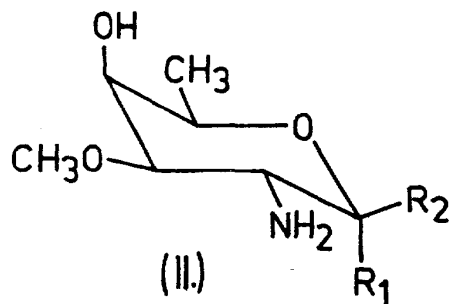
(I)

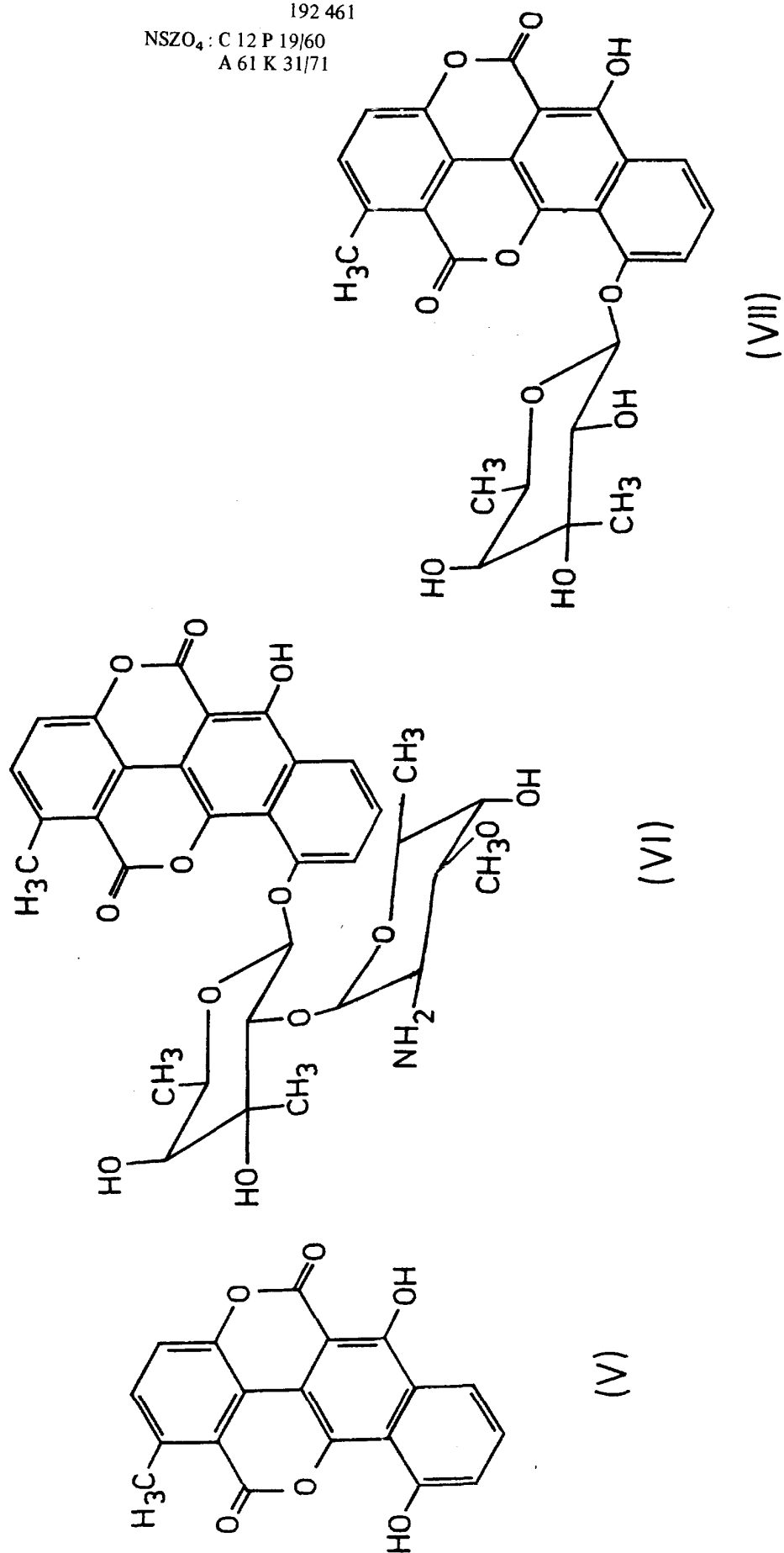


(Ia)



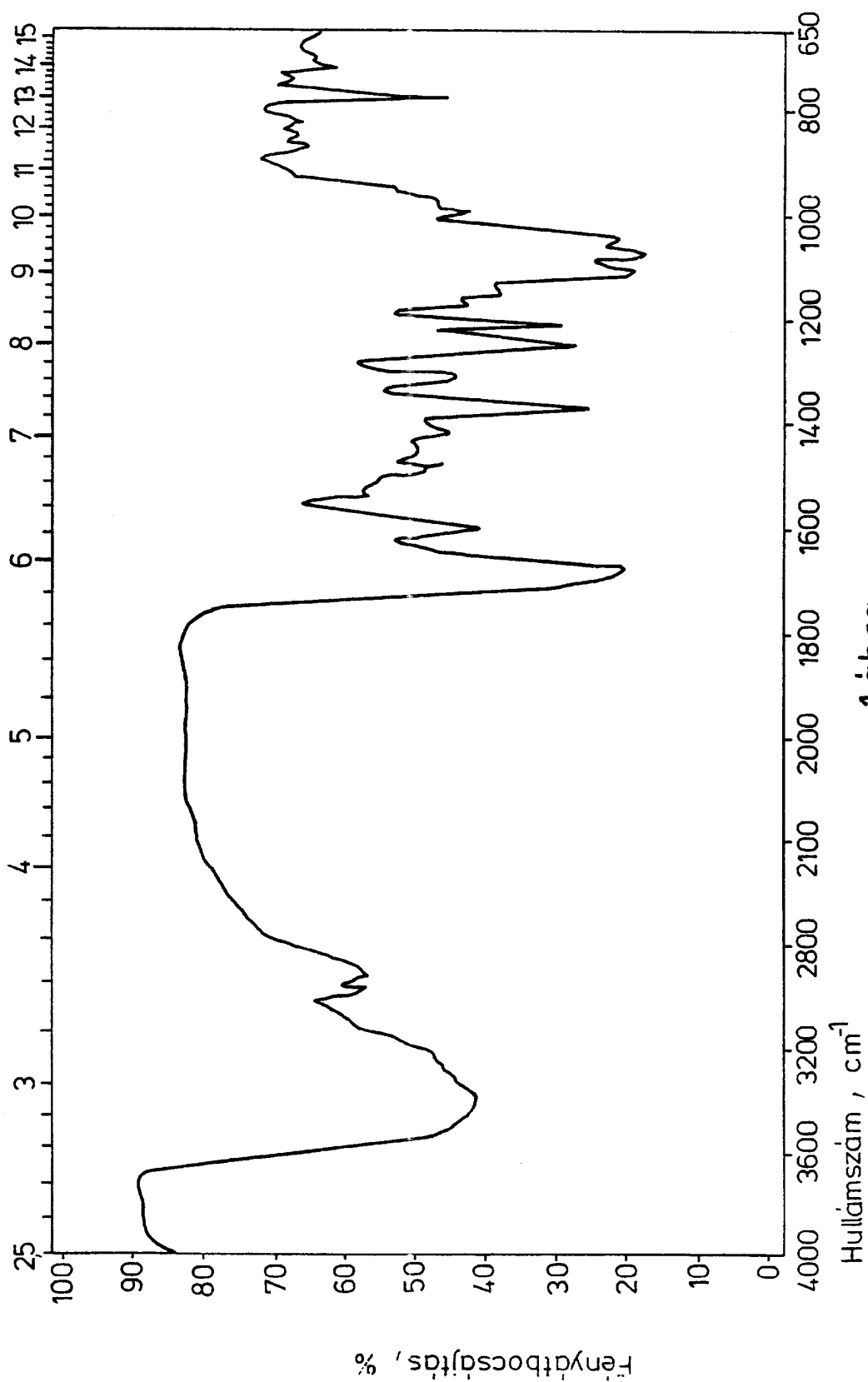
(Ib)





BBM-2478A infravörös abszorpció spektruma

Hullámhossz, mikron

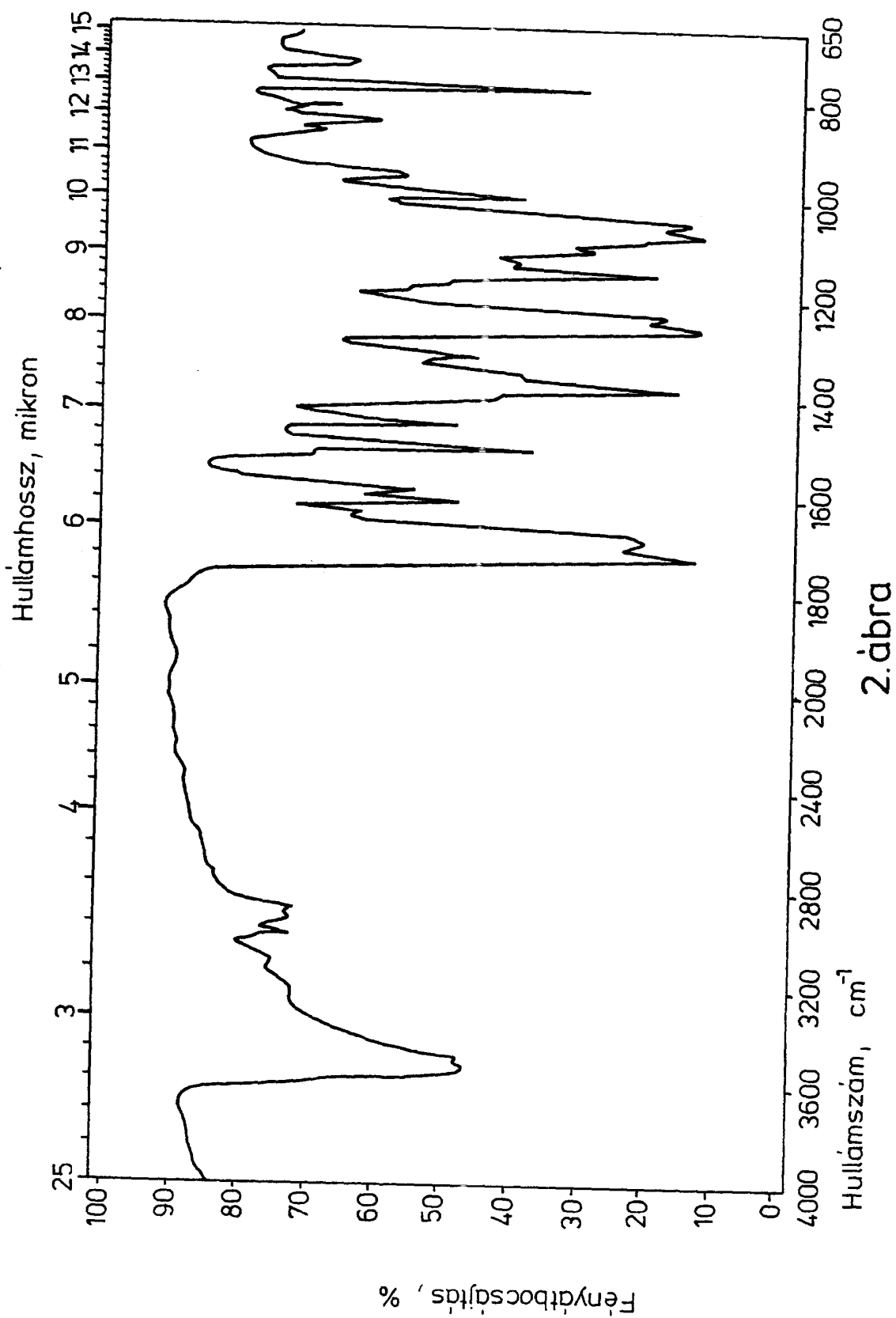


1. ábra

192 461
NSZ₄: C 12 P 19/60
A 61 K 31/71

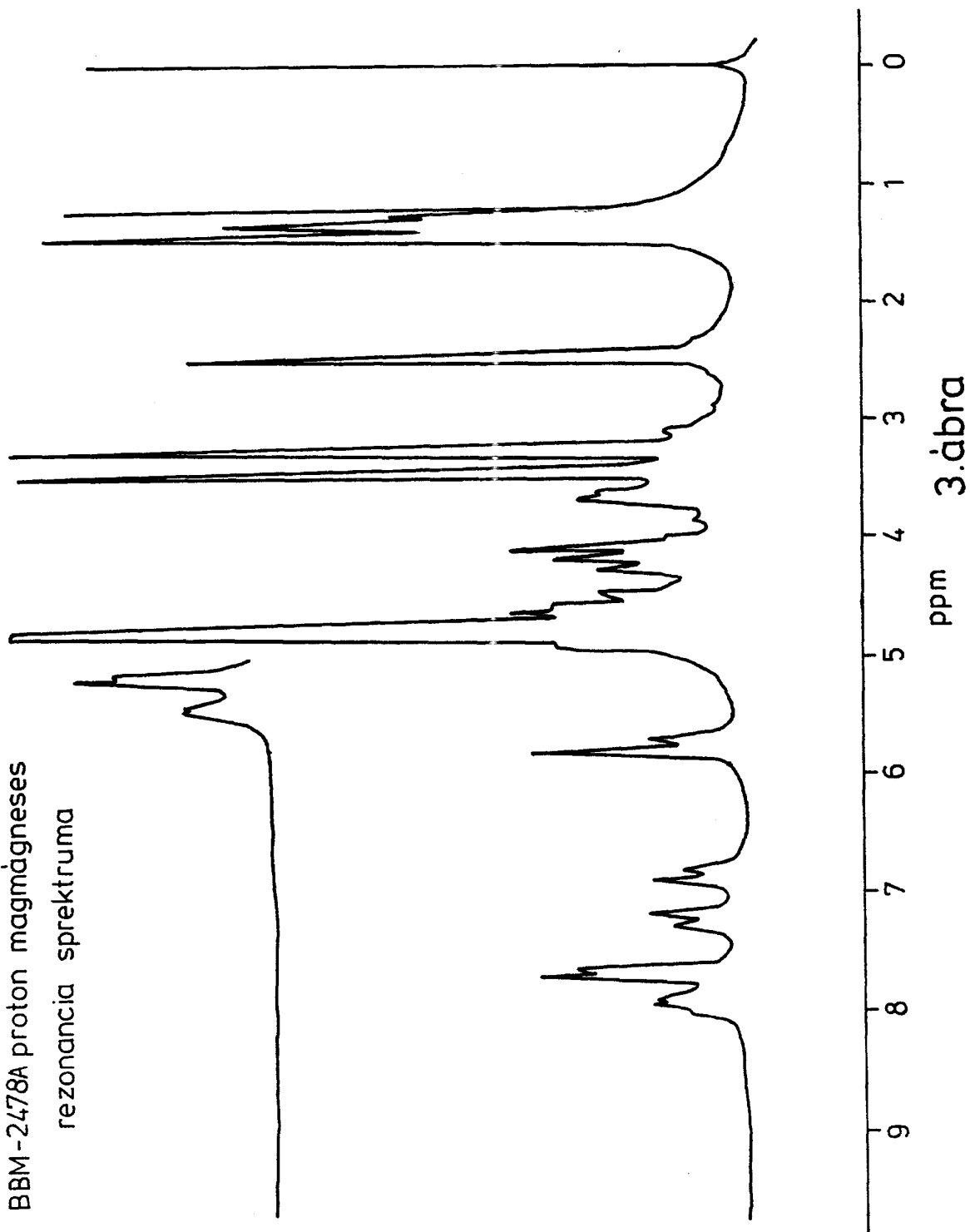
192 461
NSZO₄ : C 12 P 19/60
A 61 K 31/71

BBM-2478B infravörös abszorpció spektruma



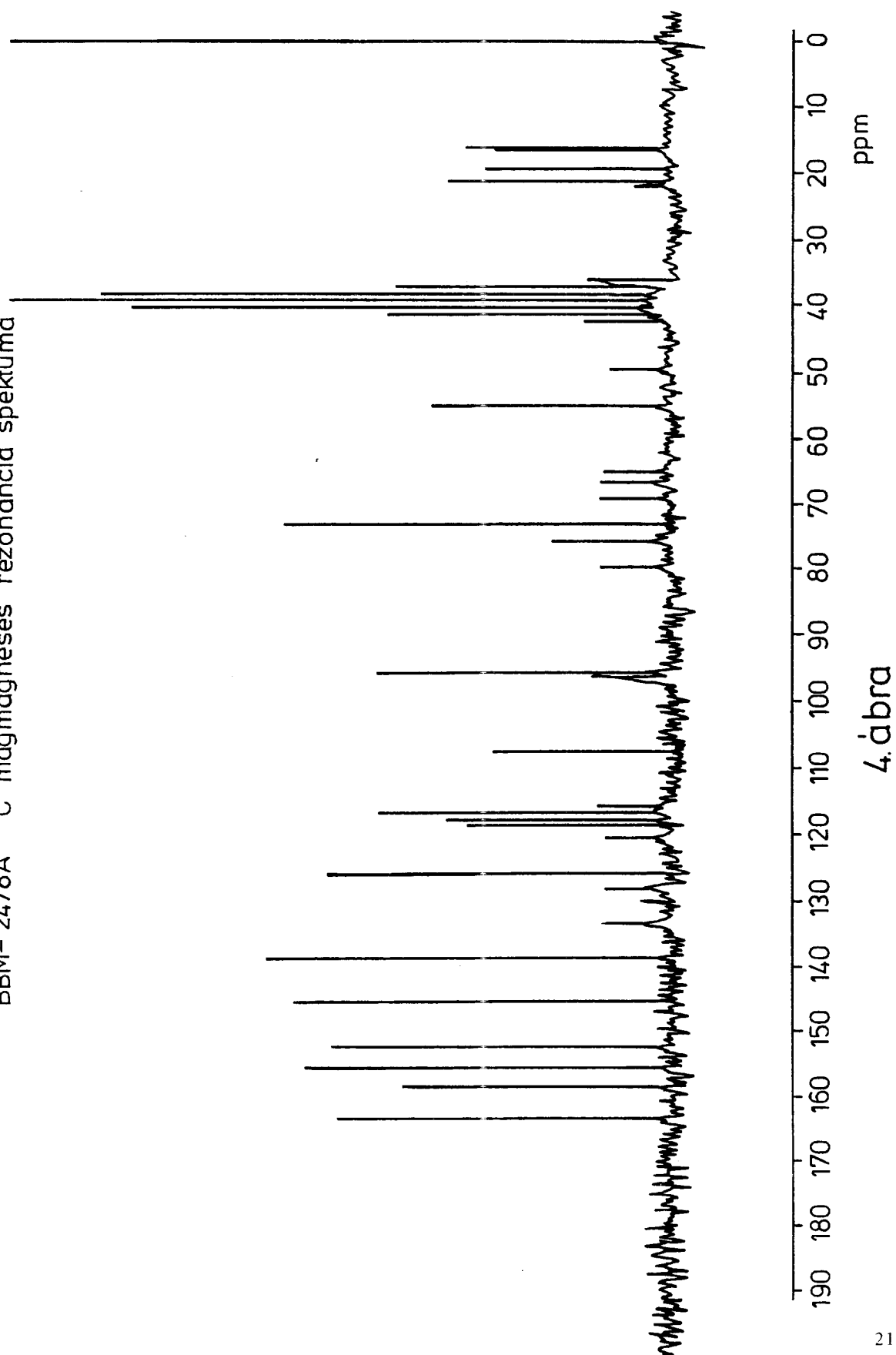
192 461
NSZO₄: C 12 P 19/60
A 61 K 31/71

BBM-2478A proton magnáneses
rezonancia spektruma



BBM-2478A ^{13}C magnághneses rezonancia spektuma

192 461
 NSZO_4 : C 12 P 19/60
 A 61 K 31/71



Kiadja az Országos Találmányi Hivatal
A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető
Megjelent a Műszaki Könyvkiadó gondozásában
Széchenyi Nyomda, Győr, 89. 3423