

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 915024 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 915024

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12P 19/62
C12P 17/16
C12N 1/20
C07D407/06
C07D407/14
C07H 15/08

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 24.10.1991

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 24.10.1991

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 27.04.1992

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

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

26.10.1990 DE 4034110 15.11.1990 DE 4036360

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Hoechst Aktiengesellschaft, 65926 Frankfurt am Main, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Zeeck, Axel, Germany, SAKSA, (DE)
2 • Philipps, Siegrid, BRD, SAKSA, (DE)
3 • Grabley, Susanne, Germany, SAKSA, (DE)
4 • Granzer, Erno, 62333 Kelkheim (Taunus), SAKSA, (DE)
5 • Hütter, Klaus, BRD, SAKSA, (DE)
6 • Thiericke, Ralf, BRD, SAKSA, (DE)
7 • Wink, Joachim, BRD, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Oasomysiinejä, menetelmä niiden valmistamiseksi ja niiden käyttö
Oasomyciner, förfarande för deras framställning och deras användning

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

5989 DSM

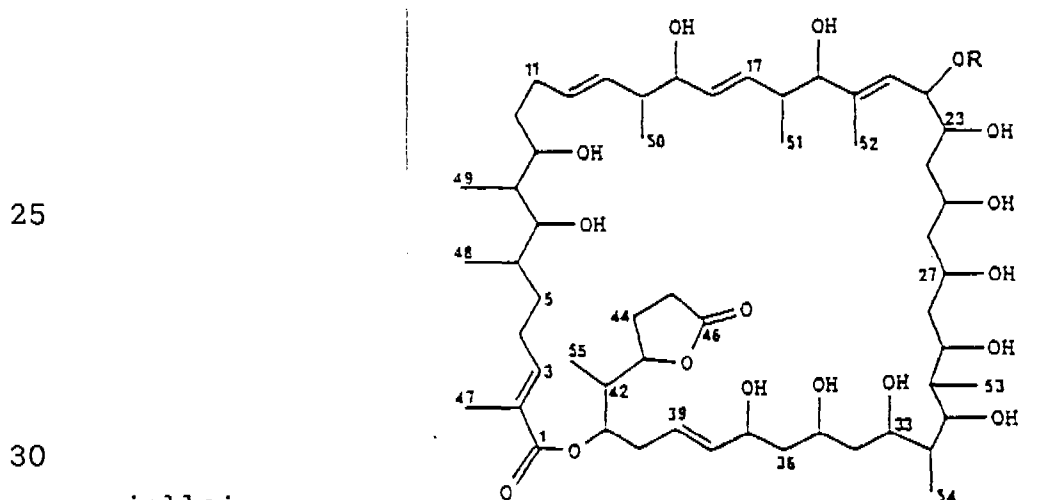
5990 DSM

Oasomysiinejä, menetelmä niiden valmistamiseksi ja niiden käyttö

Streptomyces-lajeista saadut antibiootit ovat pitkään olleet tunnettuja mikro-organismeista saatuja vaikuttavia aineita, joita voidaan käyttää monipuolisesti. J.V. Uri (Acta Microbiologica 33 (1986) 271) kuvaa Streptomyces-lajeista saatavia ei-polygeenisiiä makrolid-antibiootteja, desertomysiinejä. Näillä yhdisteillä on laaja antibioottinen spektri ja selektiivinen sientenvastainen vaikutus. Havaittiin, että Streptovericillium- ja Streptomyces-kannat voivat tuottaa uusia makrosyklisiä laktoneja, oasomysiinejä. Näillä yhdisteillä on farmakologista ja siten terapeutista tehoa ja niitä voidaan käyttää sen vuoksi erityisen edullisesti bakteerienvastaisina aineina sekä kolesterolin biosynteesin estäjinä vastaavin farmakologisina eduin.

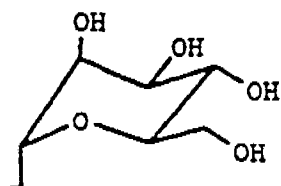
Keksintö koskee siten:

1. Menetelmää yleisen kaavan I mukaisen yhdisteen valmistamiseksi



jolloin

R on vety tai ryhmä



joka menetelmä on tunnettu siitä, että viljellään lajeja *Streptovercillium* sp. ja/tai *Streptomyces* sp. ravinto-aineessa, kunnes viljelmään kerääntyy yleisen kaavan I mukaista yhdistettä.

- 5 2. Yleisen kaavan I mukaisen yhdisteen käyttöä bakteerien vastaisena aineena tai kolesterolin biosynteesin estäjänä sekä niiden farmakologista hyödyntämistä.

Seuraavassa keksintöä kuvataan yksityiskohtaisesti, erityisesti edullisina suoritusmuotoinaan. Lisäksi keksintö määritellään patenttivaatimuksissa.

10 Keksinnön mukaista yhdistettä valmistetaan edullisesti käyttäen kantoja *Streptovercillium* sp. DSM 5989 ja *Streptomyces* sp. DSM 5990. Molemmat kannat eristettiin intialaisista maanäytteistä ja talletettiin Saksalaiseen mikro-organismikokoelmaan Budapestin sopimuksen 18.06.1990 mukaan edellä mainituilla numeroilla.

20 Kannalla *Streptovercillium* sp. DSM 5989 on punaiset itiöt. Itiöketjut ovat kiekuramaisesti ja niiden pinta on sileä. Kannalla *Streptomyces* sp. DSM 5990 on valkoiset itiöketjut, jotka ovat järjestyneet tiukoiksi spiraaleiksi. Itiöiden pinta on sileä.

25 Ravintoliuoksessa, joka sisältää hiililähteen ja typpilähteen sekä tavalliset epäorgaaniset suolat, kannat *Streptovercillium* sp. ja *Streptomyces* sp., edullisesti DSM 5989 ja DSM 5990, tuottavat yleisen kaavan I mukaista yhdistettä. Kantojen DSM 5989 tai DSM 5990 sijasta voidaan tietysti käyttää myös niiden mutantteja tai muunnelmia, mikäli ne syntetisoivat tätä yhdistettä. Sellaaisia mutantteja voidaan tuottaa sinänsä tunnetulla tavalla fysikaalisin keinoin, esimerkiksi säteilyttämällä esimerkiksi ultraviolettii- tai röntgensäteilyllä, tai kemiallisilla muta-
30 geeneilla, kuten esimerkiksi etyyli-metaanisulfonaatilla (EMS), 2-hydroksi-4-metoksibentsofenonilla (MOB) tai N-metyyli-N'-nitro-nitrosoguanidiinilla (MNNG).

Edullisiksi hiililähteiksi aerobiselle fermentaatiolle sopivat yhteyttämiskelpoiset hiilihydraatit ja soke-rialkoholit kuten glukoosi, laktoosi tai D-manniitti sekä hiilihydraattipitoiset luonnontuotteet kuten mallasuute.

5 Typpipitoisina ravintoaineina kyseeseen tulevat: aminohapot, peptidit ja proteiinit sekä niiden hajoamistuotteet kuten peptonit ja tryptonit, lisäksi lihauutteet, jauhetut esimerkiksi maissin, vehnän, pavun, soijan tai puuvillan siemenet, alkoholinvalmistuksen tislauSJäännökset, liha-
10 jauhot ja hiiuvauutteet, mutta myös ammoniumsuolat ja nitraatit. Epäorgaanisina suoloina ravintoliuos voi sisältää esimerkiksi alkali- tai maa-alkalimetallien klorideja, karbonaatteja, sulfaatteja tai fosfaatteja, rautaa, sinkkiä, kobolttia ja mangaania.

15 Kaavan I mukaisen yhdisteen muodostuminen tapahtuu erittäin hyvin ravintoliuoksessa, joka sisältää noin 0,2 - 5 %, edullisesti 1 - 4 % soijajauhoa ja 0,2 - 5 %, edullisesti 1 - 4 % manniittia kulloinkin koko ravintoliuoksen massan suhteen. Samoin hyviä tuloksia saadaan myös
20 ravintoliuoksella, joka sisältää 0,2 - 5 %, edullisesti 1 - 3 % kaurahiutaleita ja 0,1 - 10 ml, edullisesti 1 - 5 ml hivenaineiden vesiliuosta, joka koostuu 0,1 - 10 prosentista kalsiumkloridia, 0,01 - 5 prosentista rauta(III)-sitraattia, 0,01 - 0,1 prosentista mangaanisulfaattia,
25 0,001 - 0,5 prosentista natriumtetraboraattia, 0,0001 - 0,01 kobolttikloridia ja 0,0001 - 0,001 prosentista natriummolybdaattia, sekä ravintoliuoksella, joka sisältää noin 0,2 - 10 %, edullisesti 1 - 5 % glyseriiniä, 0,01 - 1 %, edullisesti 0,1 - 0,4 % kaseiinipeptonia, 0,01 - 1 %,
30 edullisesti 0,05 - 0,5 % kaliumvetyfosfaattia, 0,001 - 2 %, edullisesti 0,01 - 0,8 % natriumkloridia, 0,0001 - 0,5 %, edullisesti 0,001 - 0,2 % magnesiumsulfaattia ja 0,1 - 20 ml, edullisesti 1 - 10 ml hivenaineiden vesiliuosta, joka koostuu 0,1 - 10 prosentista kalsiumklori-
35 dia, 0,01 - 5 prosentista rauta(III)sitraattia, 0,01 - 0,1

prosentista mangaanisulfaattia, 0,001 - 0,5 prosentista sinkkikloridia, 0,0001 - 0,1 prosentista kuparisulfaattia, 0,001 - 0,5 prosentista natriumtetraboraattia, 0,0001 - 0,01 kobolttikloridia ja 0,0001 - 0,01 prosentista natriumolybdaattia kulloinkin koko ravintoliuoksen massasta. Viljely tapahtuu aerobisesti, siis esimerkiksi upotusviljelmänä ravistelemalla tai sekoittamalla ravistuskolveissa tai fermentoreissa, mahdollisesti johtamalla ilmaa tai happea. Se voi tapahtua lämpötila-alueella noin 18 - 35 °C, edullisesti noin 25 - 35 °C, erityisesti 28 - 32 °C. Käytetyn pH-alueen tulisi olla välillä 6 - 8, edullisesti 6,5 - 7,5. Mikro-organismeja viliessä näissä olosuhteissa tavallisesti ajanjakso 24 - 300 tuntia, edullisesti 36 - 140 tuntia.

Edullisesti viljely tapahtuu useissa vaiheissa, eli ensin valmistetaan nestemäiseen ravintoaineeseen yksi tai useampia esiviljelmiä, jotka istutetaan sitten varsinaiseen tuotantoaineeseen, pääviljelmään, esimerkiksi tilavuussuhteessa 1:10. Esiviljelmiä saadaan esimerkiksi niin, että itiöllinen rihmasto siirrostetaan ravintoliuokseen ja annetaan kasvaa noin 36 - 120 tuntia, edullisesti 48 - 72 tuntia. Itiöllistä rihmasto voidaan saada esimerkiksi niin, että kannan annetaan kasvaa noin 3 - 40 päivää, edullisesti 4 - 10 päivää kiinteällä tai nestemäisellä ravintoalustalla, esimerkiksi hiiva-mallas-agarilla tai soijajauho-manniitti-agarilla.

Fermentaation etenemistä voidaan valvoa viljelmän pH-arvon tai rihmaston tilavuuden avulla sekä käyttäen kromatografisia menetelmiä, kuten esimerkiksi ohutlevykromatografiaa tai korkeapainenestekromatografiaa tai tutkimalla biologista aktiivisuutta. Sekä rihmasto että viljelmäsuodos sisältävät yleisen kaavan I mukaista yhdistettä.

Mainitun yhdisteen eristäminen kasvatusaineesta suoritetaan tunnettuja menetelmiä käyttäen ottamalla huomioon tuotteiden kemialliset, fysikaaliset ja biologiset

ominaisuudet. Antibioottipitoisuuden tutkimiseksi kasvatusaineessa tai yksittäisissä eristysvaiheissa voidaan käyttää ohutlevykromatografiaa, esimerkiksi silikageeliä käyttäen ajoliuoksena butanoli/jääetikka/vesi- tai etyyliasettaatti/metanoli/vesi-seoksia. Tunnistus ohutlevykromatografisessa erotuksessa voidaan suorittaa esimerkiksi väriaineilla kuten anisaldehydillä tai käyttäen biologista testausta, esimerkiksi bakteerien, sienten tai alkueläinten avulla, jolloin muodostuneen aineen määrää on tarkoituksenmukaista verrata vertailuliuokseen.

Yhdisteen I eristämiseksi viljelmäseosta ja rihmas-
toa uutetaan ensin poolittomilla orgaanisilla liuottimilla, kuten esimerkiksi n-heksaanilla, petrolieetterillä tai halogenoiduilla hiilivedyillä kuten esimerkiksi trikloorimetaanilla jne. poolittomien epäpuhtauksien poistamiseksi. Sen jälkeen uutetaan polaarisella orgaanisella liuottimella, esimerkiksi alemmilla alkoholeilla, asetonilla ja/tai etyyliasetaatilla sekä näiden liuosten seoksilla.

Kaavan I mukaisen yhdisteen puhdasaeristys suoritetaan sopivilla materiaaleilla, edullisesti esimerkiksi silikageelillä, alumiinioksidilla, ioninvaihtimilla tai adsorbenttihartseilla käyttäen sen jälkeen aluointia orgaanisilla, poolisilla liuottimilla tai liuotinseoksilla, kuten esimerkiksi etikkahapon alkyyliestereillä, etikkahapon alkyyliesterin ja jonkin alemman alkoholin muodostamalla seoksilla, trikloorimetaanilla tai dikloorimetaanilla tai näiden liuotinten alempien alkanolien kanssa muodostamalla seoksilla, mahdollisesti myös vedellä tai ioninvaihtohartseille sopivalla pH- tai suolagradientilla kuten esimerkiksi keittosuola tai tris(hydroksimetyyli)-aminometaani-HCl-(Tris-puskuri), ja yhdistämällä antibioottisesti aktiiviset fraktiot.

Kaavan I mukainen yhdiste on stabiili kiinteässä tilassa ja liuoksina pH-alueella 1 - 8, erityisesti 3 - 7,

ja sitä voidaan siis käsitellä edelleen tavallisiksi galeenisiksi valmisteiksi.

Keksinnön mukaista yhdistettä voidaan käyttää antibakteerisena aineena sekä lipidisäätäjänä. Erityisesti
5 kaavan I mukaista yhdistettä, jossa R on vety, voidaan edullisesti käyttää lipidisäätäjänä, erityisesti estämään kolesterolin biosynteesiä.

Kaavan I mukaista yhdistettä voidaan käyttää sellaisten sairauksien ennaltaehkäisyyn ja hoitoon, joihin
10 liittyy kohonnut kolesterolipeili, erityisesti koronaariset sairaudet, arterioskleroosi ja sen kaltaiset sairaudet. Käyttö koskee myös kaavan I mukaisen yhdisteen farmaseuttisia valmisteita.

Valmistettaessa lääkkeitä vaikuttavan aineen lisäksi voidaan käyttää myös farmaseuttisesti vaarattomia lisäaineita kuten laimentimia ja/tai kantaja-aineita. Näillä
15 tarkoitetaan fysiologisesti vaarattomia aineita, jotka vaikuttavan aineen kanssa sekoittamisen jälkeen saattavat tämän antoon sopivaan muotoon.

Sopivia kiinteitä tai nestemäisiä galeenisia valmistemuotoja ovat esimerkiksi tabletit, rakeet, jauheet, kapselit, peräpuikot, siirapit, emulsiot, suspensiot, ti-
20 pat tai injektoitavat liuokset sekä valmisteet, joilla on viivästynyt vaikuttavan aineen vapautuminen. Yleisesti käytettävinä kantaja-aineina ja laimentimina mainittakoon
25 esimerkiksi erilaiset sokerit tai tärkkelyslajit, selluloosajohdokset, magnesiumkarbonaatti, gelatiini, eläin- ja kasviöljyt, polyetyleeniglykolit, vesi ja muut sopivat liuottimet sekä vesipitoiset puskurointiaineet, jotka voi-
30 daan tehdä isotonisiksi lisäämällä glukoosia tai suoloja.

Sitä paitsi keksinnön mukaisissa lääkevalmisteissa voidaan mahdollisesti käyttää pinta-aktiivisia aineita, väri- ja makuaineita, stabilisaattoreita sekä säilytysai-
35 neita muina lisäaineina. Voidaan käyttää myös farmakologisesti siedettäviä kantajia kuten esimerkiksi polyfenyyli-

pyrrolidoneja tai muita farmaseuttisesti siedettäviä lisä-
aineita, kuten esimerkiksi syklodekstriiniä tai polysakka-
rideja. Yhdisteitä voidaan yhdistää erityisesti myös sel-
laisten lisäaineiden kanssa, jotka sitovat sappihappoa,
5 erityisesti ei myrkyllisten, maha-suoli-alueella imeyty-
mättömien, emäksisten anioninvaihtajien kanssa.

Valmisteita voidaan antaa oraalisesti, rektaalisesti
tai parenteraalisesti. Edullisesti valmisteet voidaan
valmistaa annosteluyksiköinä; erityisesti tabletit, kapse-
10 lit, peräpuikot edustavat esimerkkejä sopivista annostelu-
yksiköistä. Kukin annosteluyksikkö, erityisesti oraaliseen
antoon tarkoitettu, voi sisältää korkeintaan 1000 mg,
edullisesti kuitenkin 10 - 100 mg vaikuttavaa aineosaa.
Kuitenkin voidaan käyttää myös sen ylä- tai alapuolella
15 olevia annosteluyksiköitä, jotka ovat mahdollisesti jaet-
tavissa tai moninkertaistettavissa antoa varten.

Oraaliseen antoon tarkoitettut annosyksiköt voidaan
mahdollisesti mikrokapseloida vapautumisen viivästämiseksi
tai siirtämiseksi pitemmälle ajanjaksolle, kuten esimer-
20 kiksi käyttämällä vaikuttavan aineen päällystystä tai upo-
tusta hiukkasmuodossa sopiviin polymeereihin, vahoihin
tms.

Parenteraalinen anto voidaan suorittaa käyttämällä
nestemäisiä antomuotoja kuten steriilejä liuoksia tai sus-
25 pensioita, jotka on tarkoitettu lihaksensisäiseen tai
ihonalaiseen injektointiin. Sellaisia antomuotoja valmis-
tetaan liuottamalla tai suspendoimalla määrätty määrä vai-
kuttavaa ainetta sopivaan fysiologisesti vaarattomaan lai-
mentimeen kuten esimerkiksi vesi- tai öljyväliaineeseen ja
30 steriloidulla liuos tai suspensio mahdollisesti käyttämäl-
lä mukana sopivia stabilisaattoreita, emulgaattoreita ja/
tai säilöntäaineita ja/tai antioksidantteja.

Oraalinen antomuoto on erityisesti pitkähkön hoi-
donkeston kannalta edullinen ja se tarjoaa oleellisen hel-
35 potuksen edellä esitettyjen sairauksien estoon ja hoitoon.

Farmaseuttisia valmisteita valmistetaan yleisesti tunnettujen tavallisten menetelmien avulla. Annostelukaa-
vio voi riippua potilaan tai vaaralle alttiin henkilön
tyypistä, iästä, painosta, sukupuolesta ja lääketieteelli-
5 sestä tilasta.

Seuraavissa esimerkeissä keksintöä kuvataan yksi-
tyiskohtaisesti. Prosenttiluvut on ilmoitettu massan suh-
teen, ellei toisin ole mainittu.

Esimerkkejä:

- 10 1. a) Tuottajakannan itiösuspension valmistaminen
100 ml:aan ravintoliuosta (12,5 g glyseriiniä, 1 g
arginiinia, 1 g NaCl, 1 g dikaliumvetyfosfaattia, 0,5 g
magnesiumsulfaattia, 2,5 ml hivenaineliuosta A (3 g kal-
siumkloridia, 1 g rauta(III)sitraattia, 0,2 g mangaanisul-
15 faattia, 0,1 g sinkkikloridia, 0,025 g kuparisulfaattia,
0,02 g natriumtetraboraattia, 0,004 g kobolttikloridia,
0,01 g natriummolybdaattia 1 l:ssa tislattua vettä), 1 l
vesijohtovettä, pH-arvo ennen sterilointia 7,3) 500 ml:n
erlenmeyerpullossa istutetaan kanta DSM 5989 tai DSM 5990
20 ja inkuboidaan 72 tuntia lämpötilassa 28 °C kierrosnopeu-
della 150 min⁻¹ pyörivässä ravistelulaitteessa. Sen jälkeen
sekoitetaan tasaisesti 2 ml kasvatusliuosta steriilissä
500 ml:n erlenmeyerpullossa edellä mainitun koostumuksen
omaavan kasvatusalustan kanssa, johon oli lisätty vielä
25 agaria 20 g/l jähmettämistä varten, ja suoritetaan dekan-
tointi. Viljelmiä inkuboidaan 10 - 14 päivää lämpötilassa
30 °C. Tämän ajan kuluttua yhteen pulloon syntyneet itiöt
huuhdellaan 500 ml:lla deionisoitua vettä, joka sisältää
tipan kaupallista ei-ionista tensidiä (esimerkiksi Triton
30 X 100, valmistaja Serva), käytetään välittömästi edelleen
tai säilytetään lämpötilassa -22 °C 50 prosentissa glyse-
riiniä.

b) Tuottajakannan viljelmän tai esiviljelmän valmistus erlenmeyerpullossa

Steriiliin 500 ml:n erlenmeyerpulloon, jossa on 100 ml kohdassa a) kuvattua ravintoliuosta, istutetaan 5 vinoputkessa kasvatettu viljelmä tai 0,2 ml itiösuspensiota ja inkuboidaan ravistelulaitteessa lämpötilassa 30 °C käyttäen pyörimisnopeutta 150 min⁻¹. Kaavan I mukaisen yhdisteen suurin tuotto saavutetaan n. 72 tunnin kuluttua. 10 ja 100 litran fermentoreiden istutukseen riittää 48 10 tunnin ikäinen submerssiviljelmä (istutusmäärä n. 5 %) samasta ravintoliuoksesta.

2. Yleisen kaavan I mukaisen yhdisteen valmistus

10 litran fermentoria käytetään seuraavissa olosuhteissa:

15	Ravintoaine:	20 g/l soijajauhoa
		20 g/l manniittia
		pH 7,5 (ennen sterilointia)
	Inkubointiaika:	72 tuntia
	Inkubointilämpötila:	30 °C
20	Sekoitusnopeus:	250 min ⁻¹
	Ilmastus:	4 l ilmaa/min

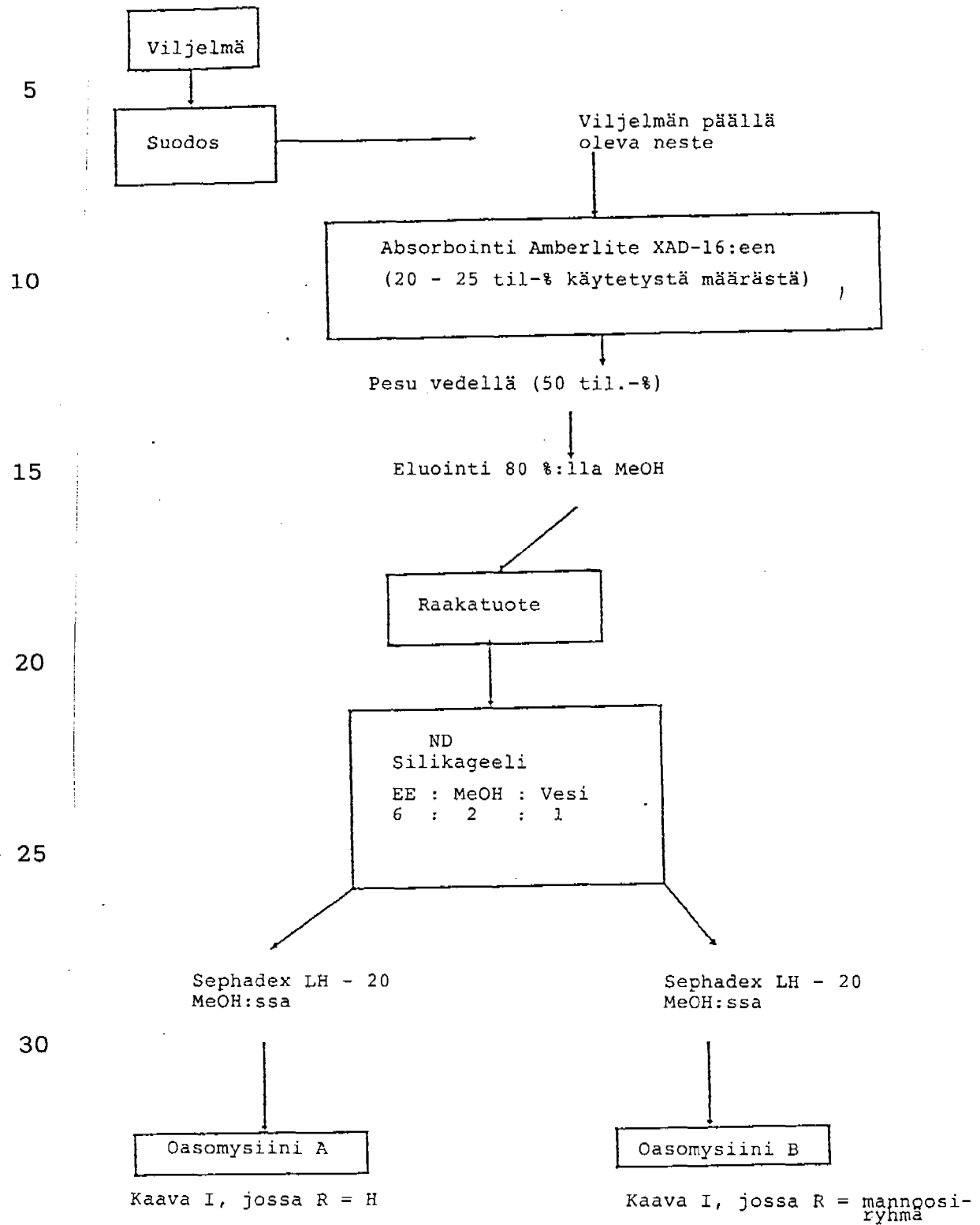
Lisäämällä toistuvasti muutamia pisaroita etanolipitoista polyoliliuosta vaahdonmuodostus voidaan pitää vähäisenä. Suurin tuotto saavutetaan n. 72 tunnin kuluttua. Saannot ovat n. 100 mg/l.

3. Yleisen kaavan I mukaisen yhdisteen eristys

DSM 5989:n tai DSM 5990:n fermentoinnin päätyttyä viljelmäseos suodatetaan lisäämällä n. 2 % suodatuksen apuainetta (esimerkiksi seeliittiä). Jatkokäsittely voidaan suorittaa seuraavan kaavion mukaisesti:

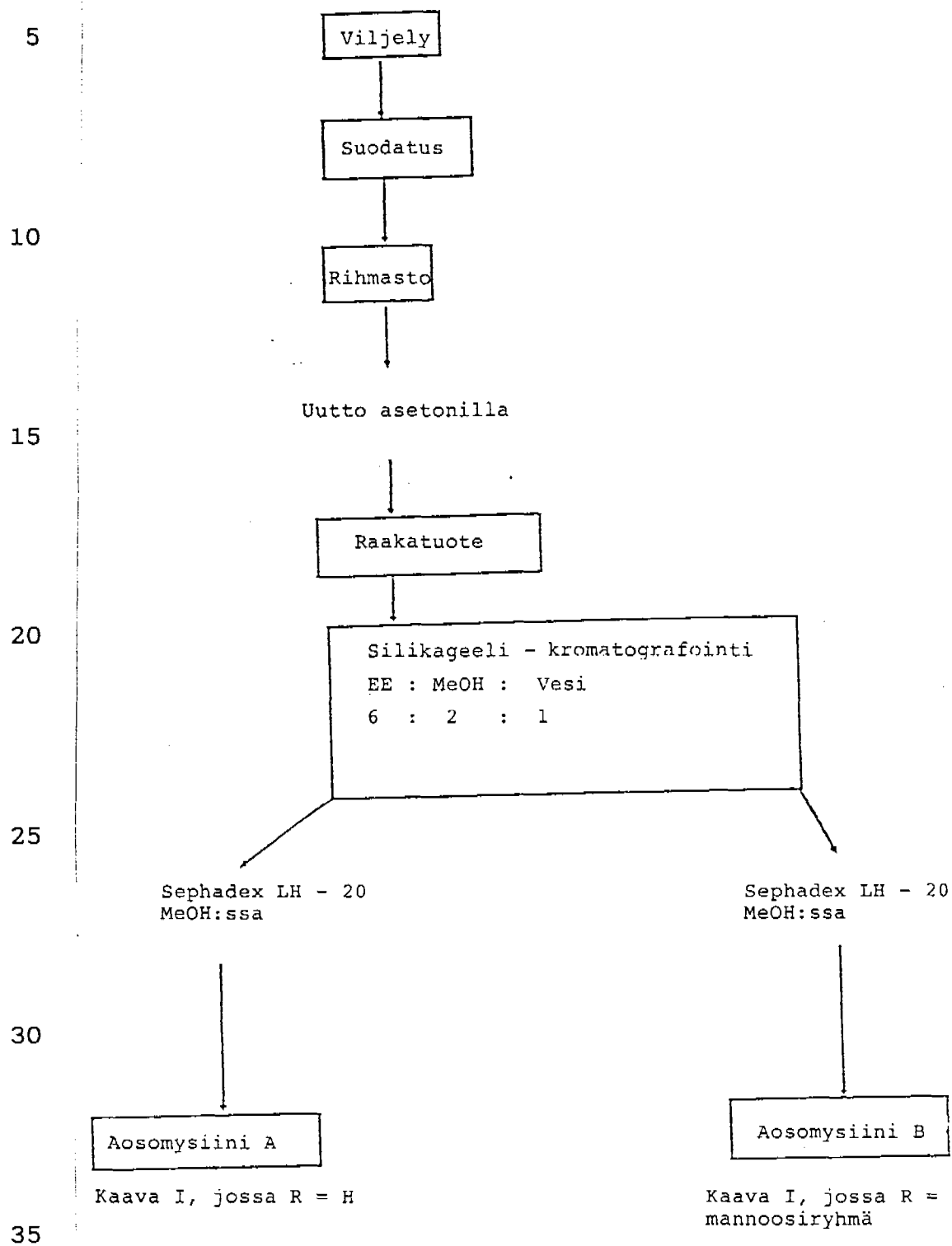
Jatkokäsittely/Eristys

Kaavio 1: Viljelmän päällä oleva neste



Jatkokäsittely/Eristys

Kaavio 1: Rihmasto



4. Biologinen testaus kolesterolin biosynteesin estäjänä

a) In vitro -määritys

HEP-G2-solujen yksittäiskerrosta lipoproteiinittomassa ravintoaineessa esi-inkuboidaan vastaavan pitoisuuden kanssa yleisen kaavan I mukaista kokeiltavaa yhdistettä 1 tunnin ajan. Sen jälkeen kun on lisätty ^{14}C -merkittyä biosynteesiesiaste- $[\text{}^{14}\text{C}]$ -natriumasetaattia, inkubointia jatketaan 3 tuntia. Sen jälkeen saippuoidaan osa soluista emäksisesti, kun etukäteen on lisätty ^3H -kolesterolin sisältä standardia. Saippuoitujen solujen lipidit uutetaan käyttäen trikloorimetaanin ja metanolin seosta. Tämä lipidi-eroseos erotetaan kantajakolesterolin lisäyksen jälkeen preparatiivisesti käyttäen ohutlevykromatografiaa, kolesterolinauhat eristetään värjäyksen jälkeen ja ^{14}C -esiasteesta muodostunut määrä ^{14}C -kolesterolia määritetään tuikelas-
kurilla. Yhtä suuresta määrästä soluja määritettiin soluproteiini, niin että voidaan laskea yhdessä soluyksikössä ^{14}C -esiasteesta saatua milligrammaa kohti soluproteiinia muodostunut määrä ^{14}C -kolesterolia. Lisätyn koevalmisteen estovaikutuksen vertaamisessa käytetään vertailunäytettä, niin että kolesterolin biosynteesin esto voidaan ilmoittaa suoraan koevalmisteen tietyllä molaarisen konsentraation arvolla väliaineessa. Yhtä suurissa määrissä soluviljelmää arvioidaan soluviljelmän vahingoittumattomuus ja puuttuva solujen vaurioituminen morfologisesti (valomikroskopia) valmisteen vaikutuksen avulla ja mitataan biokemiallisesti määrittämällä laktaattidehydrogenaasituotto inkubointia-
neessa. Standardivalmisteena käytettiin lovostatiinia. Kaavan I mukainen yhdiste, jossa $\text{R} = \text{H}$, estää kolesterolin biosynteesiä konsentraation ollessa 10^{-7} mol/l 72-prosent-
tisesti, 10^{-8} mol/l 41-prosenttisesti, lovostatiini estää kolesterolin biosynteesiä konsentraation ollessa 10^{-7} mol/l 74-prosenttisesti ja 10^{-8} mol/l 48-prosenttisesti.

b) In vivo -määrittäminen

Veren kolesterolin biosynteesin esto vaikuttaa vähentävästi seerumilipideihin, kuten voidaan osoittaa urosrotille suoritettavassa kroonisessa kokeessa. Ryhmät kannan HOE: WISKf (SPF 71) urosrottia, joiden lähtöpaino on noin 240 g, saavat päivittäin aamuisin koevalmisteita polyetyleeniglykoli 400:ssa mahaletkun kautta, jolloin kulloinkin kyseessä oleva vertailuryhmä sai vain kantaja-ainetta. 24 tuntia viimeisen annon jälkeen ja 24 tuntia ravinnonpoiston jälkeen otettiin verta ja yhdeltä rottaryhmältä erotettiin saadun seerumin lipoproteiinit veriaineksesta käyttäen preparatiivista ultrasentrifugointitekniikkaa. Tällöin VLDL:n, LDL:n ja HDL:n erottamiseen käytettiin seuraavia tiheysrajoja:

15 VLDL 1,006
 LDL: 1,04
 HDL: 1,21

Kolesterolin ja triglyseridien määrittämiseen käytettiin Boehringer/Mannheimin täysentsymaattisia menetelmiä, proteiinin määrittämiseen Lowryn et al. esittämää menetelmää.

20 Mitatut arvot kaavan I mukaiselle yhdisteelle, jossa R tarkoittaa vetyä, verrattuna klofibraattiin on esitetty seuraavassa:

25

Biologiset tiedot

Yhdiste	Annos mg/kg	Kokonais-						Kolesteroli		Glys	Kolesteroli	
		kolesteroli		Proteiini		LDL		VLDL	LDL		VLDL	HDL/LDL
		VLDL	LDL	HDL	LDL							
Kaava I												
R = H	20	-30	-45	-4	+2		-32	-6	1,74			
Klofi-												
braatti	100	-54	-32	-28	-8		-9	-10	1,05			

a) Kaavan I mukaisen yhdisteen, jossa R tarkoittaa vetyä, karakterisointi

Oasomysiini A eristettiin amorfisena kiintoaineena.

Sulamispiste: 146 °C

5 Kiertoarvo: -13,1 (c = 0,122, metanoli)

Ohutlevykromatografia:

Silikageeli 60, F254: trikloorimetaani/metanoli
(9:1, v:v): R_f 0,0

10 n-butanoli/etikkahappo/vesi (ylempi faasi) (4:1:5,
v:v:v): R_f 0,45

Värjäytyminen: Ehrlich-reagenssi: ruskea; vanilliini-rikkihappo: ruskea/violetti.

FAB-MS: m/e = 1065 (M + K); 1049 (M-Na);

Moolimassa: 1027,3 (C₅₅H₉₄O₁₇)

15 IR (KBr): 3420 (leveä), 2960, 2930, 1780, 1725,
1710, 1600, 1570 cm⁻¹

UV (MeOH): = 202 nm (= 14000); 220 (6100)

+ HCl: = 202 (16400); 220 (5700)

+ NaOH: = 225 (7000)

20 ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 0,86 (53-H₃), 0,78
(55-H₃), 0,64 (54-H₃), 0,64 (49-H₃), 1,54 (52-H₃), 1,77 (47-
H₃), 0,78 (48-H₃), 0,86 (50-H₃), 0,99 (51-H₃), 1,88 ja 2,16
(44-H₂), 2,16 (4-H₂), 2,44 (45-H₂), 1,90 ja 2,18 (11-H₂),
1,20 ja 1,50 (10-H₂), 2,32 (40-H₂), 1,26 ja 1,54 (5-H₂),
25 1,52 (6-H), 2,18 (18-H), 1,46 (30-H), 2,14 (42-H), 1,26
(32-H), 1,42 (24-H₂), 1,58 (8-H), 2,08 (14-H), 1,11 ja 1,42
(34-H₂), 1,52 (28-H₂), 1,40 (26-H₂), 1,34 (36-H₂), 3,90 (25-
H), 3,82 (35-H), 3,90 (27-H), 4,06 (33-H), 4,14 (37-H),
3,68 (31-H), 4,06 (23-H), 3,66 (9-H), 3,62 (29-H), 5,00
30 (41-H), 3,74 (22-H), 3,74 (15-H), 3,25 (7-H), 4,48 (43-H),
3,50 (19-H), 5,48 (39-H), 5,26 (21-H), 5,40 (12-H), 5,34
(16-H), 5,39 (13-H), 5,39 (13-H), 5,48 (38 -H), 6,69 (3-
H).

¹³C-NMR (125,7 MHz, DMSO-d₆) δ = 9,4 (q, C-53), 9,6 (q, C-55), 10,5 (q, C-54), 11,1 (q, C-49), 11,5 (q, C-52), 12,1 (q, C-47), 12,2 (q, C-48), 15,2 (q, C-50), 16,8 (q, C-51), 24,8 (t, C-44), 26,0 (t, C-4), 28,2 (t, C-45), 28,9 (t, C-11), 32,0 (t, C-10), 32,4 (t, C-40), 32,9 (t, C-5), 34,3 (d, C-6), 39,2 (d, C-18), 39,5 (d, C-30), 39,9 (d, C-42), 40,1 (d, C-32), 40,4 (t, C-24), 41,4 (d, C-8), 42,2 (d, C-14), 42,2 (t, C-34), 42,2 (t, C-28), 45,6 (t, C-26), 45,7 (t, C-36), 63,7 (d, C-25), 63,8 (d, C-35), 66,7 (d, C-27), 66,8 (d, C-37), 70,8 (d, C-31), 70,9 (d, C-23), 72,0 (d, C-9), 72,8 (d, C-29), 73,0 (d, C-41), 74,3 (d, C-22), 74,3 (d, C-15), 74,6 (d, C-7), 80,4 (d, C-43), 81,0 (d, C-19), 122,4 (d, C-39), 126,8 (s, C-2), 126,9 (d, C-21), 129,5 (d, C-12), 130,9 (d, C-16), 132,5 (d, C-13), 132,7 (d, C-17), 138,1 (s, C-20), 138,2 (d, C-38), 142,5 (d, C-3), 166,4 (s, C-1), 176,7 (s, C-46).

Alkuaineanalyysi: laskettu: C 64,30 H 9,22

saatu: C 64,20 H 9,22

b) Yhdisteen I, jossa R on mannoosiryhmä, karakterisointi

Oasomysiini B eristettiin amorfisena kiintoaineena.

Sulamispiste: 157 °C

Kiertoarvo: -24,6 (c = 0,199, metanoli)

Ohutlevykromatografia: Silikageeli 60, F254: trikloorimetaani/metanoli (9:1, v:v): R_f 0,0

n-butanoli/etikkahappo/vesi (ylempi faasi) (4:5:1, v:v:v): R_f 0,30

Värjäytyminen: Ehrlich-reagenssi: ruskea; vanilliini-rikkihappo: ruskea/violetti.

FAB/MS: m/e = 1228 (M + K); 1212 (M-Na);

Moolimassa: 1189,5 (C₆₁H₁₀₄O₂₂)

IR (KBr): 3400 (leveä), 2960, 2930, 1770, 1725, 1710, 1580 cm⁻¹

UV (MeOH): = 202 nm (= 23100); 220 (10900)

+ HCl: = 202 (24600); 220 (10100)

+ NaOH: = 218 (14000)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 0,90 (53-H₃), 0,82 (55-H₃), 0,68 (54-H₃), 0,68 (49-H₃), 1,63 (52-H₃), 1,80 (47-H₃), 0,90 (50-H₃), 1,02 (51-H₃), 1,94 ja 2,18 (44-H₂), 2,18 (4-H₂), 2,53 (45-H₂), 1,96 ja 2,21 (11-H₂), 1,24 ja 1,50 (10-H₂), 2,36 (40-H₂), 1,32 ja 1,50 (5-H₂), 1,57 (6-H), 2,24 (18-H), 1,48 (30-H), 2,18 (42-H), 1,44 (32-H), 1,30 (24-H₂), 1,62 (8-H), 2,12 (14-H), 1,23 (34-H₂), 1,59 (28-H₂), 1,42 (26-H₂), 1,30 (36-H₂), 3,48 ja 3,68 (6'-H₂), 3,86 (25-H), 3,82 (35-H), 3,92 (27-H), 4,10 (33-H), 4,15 (37-H), 3,44 (4'-H), 3,82 (23-H), 3,54 (2'-H), 3,78 (31-H), 3,56 (3'-H), 3,64 (9-H), 3,60 (29-H), 5,02 (41-H), 3,40 (5'-H), 4,16 (22-H), 3,70 (15-H), 3,26 (7-H), 4,42 (43-H), 3,54 (19-H), 4,63 (1'-H), 5,20 (21-H), 5,52 (39-H), 5,40 (12-H), 5,37 (16-H), 5,42 (13-H), 5,48 (17-H), 5,52 (38-H), 6,72 (3-H).

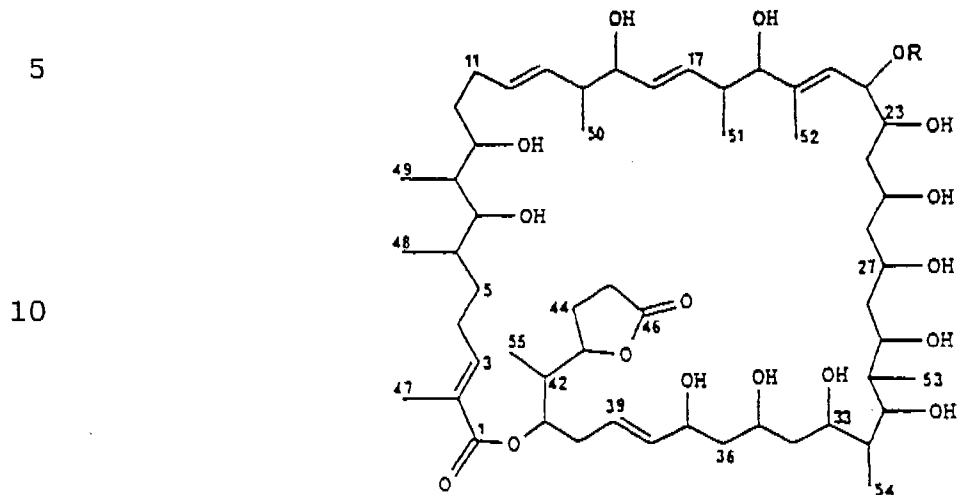
¹³C-NMR (125,7 MHz, DMSO-d₆)

δ = 9,4 (q, C-53), 9,6 (q, C-55), 10,4 (q, C-54), 11,2 (q, C-49), 11,7 (q, C-52), 12,1 (q, C-47), 12,2 (q, C-48), 15,2 (q, C-50), 16,6 (q, C-51), 24,8 (t, C-44), 26,1 (t, C-4), 28,2 (t, C-45), 28,9 (t, C-11), 32,1 (t, C-10), 32,4 (t, C-40), 32,9 (t, C-5), 34,3 (d, C-6), 39,4 (d, C-18), 39,4 (d, C-30), 39,9 (d, C-42), 40,4 (d, C-32), 40,8 (t, C-24), 41,4 (d, C-8), 42,2 (d, C-14), 42,2 (t, C-34), 42,3 (t, C-28), 45,6 (t, C-26), 45,7 (t, C-36), 61,2 (t, C-6'), 63,4 (d, C-25), 63,8 (d, C-35), 66,7 (d, C-27), 66,8 (d, C-33), 66,8 (d, C-37), 67,2 (d, C-4'), 69,4 (d, C-23), 70,6 (d, C-2'), 70,7 (d, C-31), 70,9 (d, C-3'), 72,0 (d, C-9), 72,8 (d, C-29), 73,0 (d, C-41), 73,5 (d, C-5'), 73,7 (d, C-22), 74,4 (d, C-15), 74,6 (d, C-7), 80,4 (d, C-43), 80,7 (d, C-19), 95,9 (d, C-1'), 122,2 (d, C-21), 122,4 (d, C-39), 126,9 (s, C-2), 129,5 (d, C-12), 131,0 (d, C-16), 132,6 (d, C-13), 132,7 (d, C-17), 138,2 (d, C-38), 142,5 (d, C-3), 143,2 (s, C-20), 166,4 (s, C-1), 176,7 (s, C-46).

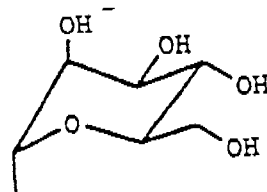
Alkuaineanalyysi: laskettu: C 61,89 H 8,81
 saatu: C 59,91 H 8,85

Patenttivaatimukset:

1. Yleisen kaavan I mukainen yhdiste



15 tunnettu siitä, että R on vety tai ryhmä



2. Menetelmä sellaisen patenttivaatimuksen 1 mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, jolla on yleinen kaava I, tunnettu siitä, että viljellään lajia Streptover-

25 ticillium sp. tai Streptomyces sp. ravintoaineessa, kunnes yleisen kaavan I mukaista yhdistettä kerääntyy viljelmään.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että viljellään kantoja DSM 5989 ja/tai DSM 5990.

4. Patenttivaatimusten 2 tai 3 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että ravintoaine sisältää 0,2 -

30 5 % soijajauhoa ja 0,2 - 5 % manniittia kulloinkin lasketuna koko ravintoliuoksen massan suhteen.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että ravintoaine sisältää 0,2 -

35 5 % kaurahiutaleita ja 0,1 - 10 ml hivenaineiden vesi-

liuosta, joka koostuu 0,1 - 10 prosentista kalsiumkloridia, 0,01 - 5 prosentista rauta(III)sitraattia, 0,01 - 0,1 prosentista mangaanisulfaattia, 0,001 - 0,5 prosentista sinkkikloridia, 0,0001 - 0,1 prosentista kuparisulfaattia, 0,001 - 0,5 prosentista natriumtetraboraattia, 0,0001 - 0,1 kobolttikloridia ja 0,0001 - 0,01 prosentista natriummolybdaattia.

6. Yhden tai useamman patenttivaatimuksen 2 - 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että viljely tapahtuu lämpötilassa 18 - 35 °C.

7. Yhden tai useamman patenttivaatimuksen 2 - 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että viljely tapahtuu pH-alueella 6 - 8.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukaisen yhdisteen, jolla on yleinen kaava I, käyttö kolesterolin biosynteesin estäjänä.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että käytetään yhdistettä, jossa R tarkoittaa mannoosiryhmää.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukaisen yhdisteen, jolla on yleinen kaava I, käyttö bakteerienvastaisena aineena.

11. Streptovercillium sp. DSM 5989 ja Streptomyces sp. DSM 5990 sekä niiden muunnelmat ja mutantit, sikäli kuin ne tuottavat patenttivaatimuksen 1 mukaista yhdistettä, jolla on yleinen kaava.