



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑪ **CH 663 155 A5**

⑤① Int. Cl.4: A 61 K 35/74
C 12 P 1/04

// (C 12 P 1/04, C 12 R 1:03)

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑳ Gesuchsnummer: 2415/84

㉔ Anmeldungsdatum: 16.05.1984

㉔ Priorität(en): 16.05.1983 US 495231
20.04.1984 US 601181

㉔ Patent erteilt: 30.11.1987

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 30.11.1987

㉔ Inhaber:
Bristol-Myers Company, New York/NY (US)

㉔ Erfinder:
Konishi, Masataka, Miyamae-ku/Kawasaki (JP)
Saitoh, Kyoichiro, Zushi-shi/Kanagawa (JP)
Ohkuma, Hiroaki, Itabashi-ku/Tokyo (JP)
Kawaguchi, Hiroshi, Guginami-ku/Tokyo (JP)

㉔ Vertreter:
Bovard AG, Bern 25

⑤④ Antitumorantibiotika.

⑤⑦ Es werden die neuen Antitumorantibiotika BBM-1675 A₁, A₂, A₃, A₄, B₁ und B₂ beschrieben. Diese Verbindungen können aus einem neuen antibiotischen Komplex isoliert werden, wobei die ersten beiden als Hauptkomponenten und die vier weiteren als Nebenkomponten auftreten. Der Komplex wird durch Fermentation von gewissen neuen Stämmen von Actinmadura verrucosospora erhalten. Die Verbindungen können als Aktivsubstanzen mit antimikrobieller Wirkung und Antitumorwirkung in pharmazeutischen Zusammensetzungen eingesetzt werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Antitumorantibiotikum BBM-1675 A₁, das in im wesentlichen reiner Form

- a) als weiss bis schwachgelbe Kristalle erscheint;
- b) löslich ist in Chloroform, Ethylacetat, Aceton, Ethanol und Methanol, schwachlöslich ist in Benzol und Wasser, und unlöslich ist in n-Hexan und Tetrachlorkohlenstoff;
- c) eine positive Reaktion ergibt mit Eisenchlorid, Ehrlich und Tollen's Reagens und eine negative Reaktion ergibt in Sakaguchi-, Ninhydrin- und Anthrontests;
- d) im wesentlichen ein solches Infrarot-Absorptionsspektrum (KBr) aufweist, wie in Fig. 9 dargestellt;
- e) aufgelöst in CDCl₃ ein im wesentlichen solches Kernresonanzspektrum aufweist, wie in Fig. 10 dargestellt;
- f) einen Schmelzpunkt im Bereich von 156–158 °C aufweist;

g) eine optische Drehung von $[\alpha]_D^{27} = -191^\circ$ (c 0,5, CHCl₃) aufweist;

h) ein scheinbares Molekulargewicht von 1248, bestimmt durch Massenspektrographie aufweist;

i) eine approximative elementare Zusammensetzung von 52,17% Kohlenstoff, 6,15% Wasserstoff, 4,63% Stickstoff, 9,09% Schwefel und 27,96% Sauerstoff aufweist, wobei der letzte Wert durch Differenz bestimmt wird;

j) bei der Kieselgel-Dünnschichtchromatographie einen Rf-Wert von 0,74 mit dem Lösungsmittelsystem CHCl₃–CH₃OH (5:1 v/v) aufweist, und in der Umkehrphasen-Kieselgel-Dünnschichtchromatographie einen Rf-Wert von 0,18 mit dem Lösungsmittelsystem CH₃CN–H₂O (75:25 v/v) aufweist;

k) aufgelöst in Methanol bei einer Konzentration von 0,01356 g/l folgende Ultraviolett-Absorptionsmaxima und Absorptionskoeffizienten aufweist

$\lambda_{\max}$ (nm)	Absorptionskoeffizienten
320	12,4
280	Schulter
253	25,1
210	25,5

wobei bei Säure- oder Basenzugabe keine bedeutenden Änderungen auftreten;

l) eine Retentionszeit von 13,3 min aufweist bei einer Hochleistungsflüssigchromatographie mit einer C₁₈-Umkehrphasenkieselgelsäule und dem Lösungsmittelsystem CH₃CN–CH₃OH–0,1M–CH₃COONH₄ (5:2:3 v/v);

m) wirksam ist bei der Hemmung des Wachstums von verschiedenen Bakterien und Fungi;

n) Prophage in Lysogenbakterien induziert; und

o) wirksam ist bei der Hemmung des Wachstums der P-388-Leukämie, L-1210-Leukämie, B16-Melanomen und Lewis-Lungen-Karzinomen in Mäusen.

2. Antitumorantibiotikum BBM-1675 A₂, welches in im wesentlichen reiner Form

a) als weisse Kristalle erscheint;

b) löslich ist in Chloroform, Ethylacetat, Aceton, Ethanol und Methanol, schwachlöslich ist in Benzol und Wasser und unlöslich ist in n-Hexan und Tetrachlorkohlenstoff;

c) eine positive Reaktion ergibt mit Eisenchlorid, Ehrlich und Tollen's Reagens und eine negative Reaktion ergibt in Sakaguchi-, Ninhydrin- und Anthron-Tests;

d) im wesentlichen ein solches Infrarot-Absorptionsspektrum (KBr) aufweist, wie in Fig. 12 dargestellt;

e) aufgelöst in CDCl₃ im wesentlichen ein Kernresonanzspektrum ergibt, wie in Fig. 13 dargestellt;

f) einen Schmelzpunkt im Bereich von 147–149 °C aufweist;

g) eine optische Drehung von $[\alpha]_D^{27} = -179,4^\circ$ (c 0,5, CHCl₃) aufweist;

h) ein scheinbares Molekulargewicht von 1248 aufweist, bestimmt durch Massenspektrographie;

i) eine approximative Elementarzusammensetzung von 52,71% Kohlenstoff, 5,94% Wasserstoff, 3,94% Stickstoff, 9,39% Schwefel und 28,01% Sauerstoff aufweist, wobei der letzte Wert durch Differenz bestimmt wird;

j) einen Rf-Wert von 0,71 bei der Kieselgel-Dünnschichtchromatographie mit dem Lösungsmittelsystem CHCl₃–CH₃OH (5:1 v/v) aufweist und bei der Umkehrphasenkieselgel-Dünnschichtchromatographie einen Rf-Wert von 0,21 aufweist, mit dem Lösungssystem CH₃CN–H₂O (75:25 v/v);

k) aufgelöst in Methanol bei einer Konzentration von 0,02052 g/l folgende Ultraviolettabsorptionsmaxima und Absorptionskoeffizienten aufweist

$\lambda_{\max}$ (nm)	Absorptionskoeffizienten
320	12,2
282	16,3
282	26,2
214	25,8

ohne bedeutende Änderungen bei Säuren oder Basenzugabe;

l) eine Retentionszeit von 17,3 min bei einer Hochleistungsflüssigchromatographie mit einer C₁₈-Umkehrphasen-Kieselgel-säule und dem Lösungssystem CH₃CN–CH₃OH–0,1M CH₃COONH₄ (5:2:3 v/v).

m) wirksam ist bei der Hemmung des Wachstums von verschiedenen Bakterien und Fungi;

n) in lysogenen Bakterien Prophagen induziert; und

o) wirksam ist bei der Hemmung von P-388-Leukämie, L-1210-Leukämie, B16-Melanom und Lewis-Lungenkarzinom in Mäusen.

3. Antitumorantibiotikum BBM-1675 A₃, welches

a) löslich ist in Chloroform, Ethylacetat, Aceton, Ethanol oder Methanol, schwachlöslich ist in Benzol und Wasser, und unlöslich ist in n-Hexan und Tetrachlorkohlenstoff;

b) eine positive Reaktion mit Eisenchlorid, Ehrlich- und Tollen's Reagens und eine negative Reaktion in Sakaguchi-, Ninhydrin- und Anthron-Tests aufweisen;

c) im wesentlichen ein Infrarotabsorptionsspektrum (KBr) aufweist, wie es in Fig. 3 dargestellt ist;

d) aufgelöst in CDCl₃ im wesentlichen ein magnetisches Protonenresonanzspektrum aufweist, wie in Fig. 7 dargestellt;

e) einen Schmelzpunkt im Bereich von 125–127 °C aufweist;

f) eine optische Drehung von $[\alpha]_D^{27} = -161^\circ$ (c 0,5, CHCl₃) aufweist;

g) eine approximative Elementarzusammensetzung von 54,55% Kohlenstoff, 6,46% Wasserstoff, 3,73% Stickstoff, 7,49% Schwefel und 27,77% Sauerstoff aufweist, wobei das letztgenannte durch Differenz bestimmt wird;

h) einen Rf-Wert von 0,72 bei der Kieselgeldünnschichtchromatographie mit dem Lösungsmittelsystem CHCl₃–CH₃OH (5:1 v/v) aufweist und einen Rf-Wert von 0,28 bei der Umkehrphasenkieselgel-Dünnschichtchromatographie mit dem Lösungsmittelsystem CH₃CN–H₂O (75:25 v/v) aufweist;

i) folgende Ultraviolettabsorptionsmaxima aufweist, wenn aufgelöst in Methanol, 0,01N HCl–CH₃OH und 0,01N NaOH–CH₃OH

UV $\lambda_{\max}$ nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$) : 253 (286)
in Methanol 282 (158)
320 (122)

UV $\lambda_{\max}$ nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$) : 253 (287)
in 0,01N HCl-CH₃OH 282 (160)
320 (126)

UV $\lambda_{\max}$ nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$) : 252 (280)
in 0,01N NaOH-CH₃OH 283 (162)
318 (120);

j) eine Retentionszeit von 8,0 min bei einer Hochleistungsflüssigchromatographie auf einer C₁₈-Umkehrphasen-kieselgelsäule und dem Lösungsmittelsystem

CH₃CN-CH₃OH-0,1M CH₃COONH₄ (5:2:3 v/v) aufweist;

k) wirksam ist bei der Hemmung des Wachstums von verschiedenen Bakterien und Fungi;

l) Prophagen induziert in lysogenen Bakterien; und

m) wirksam ist bei der Hemmung des Wachstums von P-388-Leukämie in Mäusen.

4. Antitumorantibiotikum BBM-1675 A₄ welches

a) löslich ist in Chloroform, Ethylacetat, Aceton, Ethanol und Methanol, schwachlöslich ist in Benzol und Wasser und unlöslich ist in n-Hexan und Tetrachlorkohlenstoff;

b) eine positive Reaktion mit Eisenchlorid, Ehrlich und Tollen's Reagens und eine negative Reaktion in Sakaguchi-, Ninhydrin- und Anthron-Tests ergibt;

c) im wesentlichen ein Infrarotabsorptionsspektrum (KBr) ergibt, wie in Fig. 4 dargestellt;

d) aufgelöst in CDCl₃ im wesentlichen ein magnetisches Protonenresonanzspektrum ergibt, wie in Fig. 8 dargestellt;

e) einen Schmelzpunkt im Bereich von 123-126 °C aufweist;

f) eine optische Drehung von $[\alpha]_D^{27} = -176^\circ$ (c 0,5 CHCl₃) aufweist;

g) eine approximative Elementarzusammensetzung von 54,65% Kohlenstoff, 6,29% Wasserstoff, 3,51% Stickstoff, 8,07% Schwefel und 27,48% Sauerstoff aufweist, wobei der letztgenannte Wert durch Differenz bestimmt wird;

h) einen Rf-Wert von 0,71 bei der Kieselgel-Dünnschichtchromatographie im Lösungsmittelsystem CHCl₃-CH₃OH (5:1 v/v) aufweist und einen Rf-Wert von 0,78 in der Umkehrphasenkieselgel-Dünnschichtchromatographie mit dem Lösungsmittelsystem CH₃CN-H₂O (75:25 v/v) aufweist;

i) folgende Ultraviolettabsorptionsmaxima aufweist, wenn aufgelöst in Methanol, 0,01N HCl-CH₃OH und 0,01N NaOH-CH₃OH

UV $\lambda_{\max}$ nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$) : 253 (257)
in Methanol 282 (153)
320 (117)

UV $\lambda_{\max}$ nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$) : 253 (258)
in 0,01N HCl-CH₃OH 282 (155)
320 (118)

UV $\lambda_{\max}$ nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$) : 252 (266)
in 0,01N NaOH-CH₃OH 283 (160)
318 (118);

j) eine Retentionszeit von 5,1 min bei einer Hochleistungsflüssigchromatographie mit einer C₁₈-Umkehrphasen-kieselgelsäule und dem Lösungsmittelsystem

CH₃CN-CH₃OH-0,1M CH₃COONH₄ (5:2:3 v/v) aufweist;

k) wirksam ist bei der Hemmung des Wachstums von verschiedenen Bakterien und Fungi;

l) Prophagen induziert in lysogenen Bakterien; und

m) wirksam ist bei der Hemmung von P-388-Leukämie in Mäusen.

5. Antitumorantibiotikum BBM-1675 B₁, welches

a) löslich ist in Chloroform, Ethylacetat, Aceton, Ethanol und Methanol, und schwachlöslich ist in Benzol und Wasser, und unlöslich ist in n-Hexan und Tetrachlorkohlenstoff;

b) eine positive Reaktion mit Eisenchlorid, Ehrlich und Tollen's Reagens und eine negative Reaktion in Sakaguchi-, Ninhydrin- und Anthrontests ergibt;

c) einen Schmelzpunkt im Bereich von 159-161 °C aufweist;

d) eine optische Drehung von $[\alpha]_D^{27} = -171^\circ$ (c 0,5, CHCl₃) aufweist;

e) einen Rf-Wert von 0,63 bei der Kieselgeldünnschichtchromatographie im Lösungsmittelsystem

CHCl₃-CH₃OH (5:1 v/v) aufweist und einen Rf-Wert von 0,23 bei der Umkehrphasenkieselgel-Dünnschichtchromatographie mit dem Lösungsmittelsystem CH₃CN-H₂O (75:25 v/v) aufweist;

f) folgende Ultraviolettabsorptionsmaxima aufweist, wenn aufgelöst in Methanol, 0,01N HCl-CH₃OH und 0,01N NaOH-CH₃OH

UV $\lambda_{\max}$ nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$) : 253 (225)
in Methanol 282 (140)
320 (104)

UV $\lambda_{\max}$ nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$) : 253 (225)
in 0,01N HCl-CH₃OH 282 (140)
320 (105)

UV $\lambda_{\max}$ nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$) : 252 (236)
in 0,01N NaOH-CH₃OH 283 (141)
318 (105);

g) wirksam ist bei der Hemmung des Wachstums von verschiedenen Bakterien und Fungi; und

h) Prophagen induziert in lysogenen Bakterien.

6. Antitumorantibiotikum BBM-1675 B₂, welches

a) löslich ist in Chloroform, Ethylacetat, Aceton, Ethanol und Methanol, schwachlöslich ist in Benzol und Wasser und unlöslich ist in n-Hexan und Tetrachlorkohlenstoff;

b) eine positive Reaktion mit Eisenchlorid, Ehrlich und Tollen's Reagens und eine negative Reaktion in Sakaguchi-, Ninhydrin- und Anthron-Tests ergibt;

c) einen Schmelzpunkt im Bereich von 156-159 °C aufweist;

d) eine optische Drehung von $[\alpha]_D^{27} = -122^\circ$ (c 0,5 CHCl₃) aufweist;

e) einen Rf-Wert von 0,60 bei der Kieselgel-Dünnschichtchromatographie im Lösungsmittelsystem CHCl₃-CH₃OH (5:1 v/v) aufweist und einen Rf-Wert von 0,16 in der Umkehrphasenkieselgel-Dünnschichtchromatographie im Lösungsmittelsystem CH₃CN-H₂O (75:25 v/v) aufweist;

f) folgende Ultraviolettabsorptionsmaxima aufweist, wenn aufgelöst in Methanol, 0,01N HCl-CH₃OH und 0,01N NaOH-CH₃OH

UV λ_{max} nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) in Methanol	: 248 (212) 279 (141) 318 (103)
UV λ_{max} nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) in 0,01N HCl-CH ₃ OH	: 248 (210) 279 (140) 318 (103)
UV λ_{max} nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) in 0,01N NaOH-CH ₃ OH	: 248 (233) 278 (150) 318 (110);

g) wirksam ist gegen das Wachstum verschiedener Bakterien und Fungi; und

h) Prophagen induziert in lysogenen Bakterien.

7. Verfahren zur Herstellung des Antitumorantibiotikums BBM-1675 A₁ gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein BBM-1675 A₁-produzierender Stamm von *Actinomadura verrucosospora* in einem wässrigen Nährmedium, das assimilierbare Quellen von Kohlenstoff und Stickstoff aufweist, unter submergen aeroben Bedingungen kultiviert wird, bis ein wesentlicher Anteil von BBM-1675 A₁ durch den genannten Mikroorganismus im genannten Kulturmedium produziert worden ist und anschliessend BBM-1675 A₁ aus dem Kulturmedium gewonnen wird.

8. Verfahren gemäss Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der BBM-1675 A₁-produzierende Organismus die Identifizierungscharakteristika von *Actinomadura verrucosospora* Stamm H964-92 ATCC 39334, oder von *Actinomadura verrucosospora* Stamm A1327Y, ATCC 39638 aufweist.

9. Verfahren zur Herstellung des Antitumorantibiotikums BBM-1675 A₂ gemäss Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein BBM-1675 A₂-produzierender Stamm von *Actinomadura verrucosospora* in einem wässrigen Nährmedium, das assimilierbare Quellen von Kohlenstoff und Stickstoff aufweist, unter submergen aeroben Bedingungen kultiviert wird, bis ein wesentlicher Anteil BBM-1675 A₂ durch den genannten Organismus im genannten Kulturmedium produziert worden ist und anschliessend BBM-1675 A₂ aus dem Kulturmedium gewonnen wird.

10. Verfahren gemäss Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass der BBM-1675 A₂-produzierende Organismus die Identifikationscharakteristika von *Actinomadura verrucosospora* Stamm H964-92, ATCC 39334, oder *Actinomadura verrucosospora* Stamm A1327Y, ATCC 39638 aufweist.

11. Verfahren zur Herstellung des Antitumorantibiotikums BBM-1675 A₃ gemäss Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass ein BBM-1675 A₃-produzierender Stamm von *Actinomadura verrucosospora* in einem wässrigen Kulturmedium, das assimilierbare Quellen von Kohlenstoff und Stickstoff aufweist, unter submergen aeroben Bedingungen kultiviert wird, bis ein wesentlicher Anteil von BBM-1675 A₃ durch den genannten Organismus im genannten Kulturmedium produziert worden ist und dann BBM-1675 A₃ aus dem Kulturmedium gewonnen wird.

12. Verfahren gemäss Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass der BBM-1675 A₃-produzierende Organismus die Identifizierungscharakteristika von *Actinomadura verrucosospora* Stamm H964-92, ATCC 39334 oder *Actinomadura verrucosospora* Stamm A1327Y, ATCC 39638 aufweist.

13. Verfahren zur Herstellung des Antitumorantibiotikums BBM-1675 A₄ gemäss Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass ein BBM-1675 A₄-produzierender Stamm von *Actinomadura verrucosospora* in einem wässrigen Nährmedium, das assimilierbare Quellen von Kohlenstoff und Stickstoff enthält, unter submergen aeroben Bedingungen kultiviert wird, bis ein wesentlicher Anteil von BBM-1675 A₄

durch den genannten Organismus im genannten Kulturmedium kultiviert worden ist und anschliessend BBM-1675 A₄ aus dem Kulturmedium gewonnen wird.

14. Verfahren gemäss Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass der BBM-1675 A₄-produzierende Organismus die Identifizierungscharakteristika von *Actinomadura verrucosospora* Stamm H964-92, ATCC 39334 oder *Actinomadura verrucosospora* Stamm A1327Y, ATCC 39638 aufweist.

15. Verfahren zur Herstellung des Antitumorantibiotikums BBM-1675 B₁ gemäss Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass ein BBM-1675 B₁-produzierender Stamm von *Actinomadura verrucosospora* in einem wässrigen Nährmedium, das assimilierbare Quellen von Kohlenstoff und Stickstoff aufweist, unter submergen aeroben Bedingungen kultiviert wird, bis ein wesentlicher Anteil von BBM-1675 B₁ durch den genannten Organismus im genannten Kulturmedium produziert worden ist und dann BBM-1675 B₁ aus dem Kulturmedium gewonnen wird.

16. Verfahren gemäss Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass der BBM-1675 B₁-produzierende Organismus die Identifizierungscharakteristika von *Actinomadura verrucosospora* Stamm H964-92, ATCC 39334 oder *Actinomadura verrucosospora* Stamm A1327Y, ATCC 39638 aufweist.

17. Verfahren zur Herstellung des Antitumorantibiotikums BBM-1675 B₂ gemäss Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass ein BBM-1675 B₂-produzierender Stamm von *Actinomadura verrucosospora* in einem wässrigen Nährmedium, das assimilierbare Quellen von Kohlenstoff und Stickstoff aufweist, unter submergen aeroben Bedingungen kultiviert wird, bis ein wesentlicher Anteil BBM-1675 B₂ durch den genannten Organismus im genannten Kulturmedium kultiviert worden ist und dann BBM-1675 B₂ aus dem Kulturmedium gewonnen wird.

18. Verfahren gemäss Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass der BBM-1675 B₂-produzierende Organismus die Identifizierungscharakteristika von *Actinomadura verrucosospora* Stamm H964-92, ATCC 39334 oder *Actinomadura verrucosospora* Stamm A1327Y, ATCC 39638 aufweist.

19. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend einen wirksamen antimikrobiellen Anteil von BBM-1675 A₁ gemäss Anspruch 1, BBM-1675 A₂ gemäss Anspruch 2, BBM-1675 A₃ gemäss Anspruch 3, BBM-1675 A₄ gemäss Anspruch 4, BBM-1675 B₁ gemäss Anspruch 5 oder BBM-1675 B₂ gemäss Anspruch 6 in Kombination mit einem pharmazeutischen Träger oder Verdünnungsmittel.

20. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend eine wirksame tumorhemmende Menge von BBM-1675 A₁ gemäss Anspruch 1, BBM-1675 A₂ gemäss Anspruch 2, BBM-1675 A₃ gemäss Anspruch 3, BBM-1675 A₄ gemäss Anspruch 4, BBM-1675 B₁ gemäss Anspruch 5 oder BBM-1675 B₂ gemäss Anspruch 6 in Kombination mit einem pharmazeutischen Träger oder Verdünnungsmittel.

21. Biologisch reine Kultur des Mikroorganismus *Actinomadura verrucosospora* Stamm H964-92, ATCC 39334, die fähig ist, das Antibiotikum BBM-1675 in nachweisbarer Quantität nach Kultivierung in einem wässrigen Nährmedium, das assimilierbare Quellen von Kohlenstoff und Stickstoff enthält, zu produzieren, als Mittel zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 8, 10, 12, 14, 16 oder 18.

22. Biologisch reine Kultur des Mikroorganismus *Actinomadura verrucosospora* Stamm A1327Y, ATCC 39638, die fähig ist, das Antibiotikum BBM-1675 in einer nachweisbaren Menge nach Kultivierung in einem wässrigen Nährmedium, das assimilierbare Quellen von Kohlenstoff und Stickstoff enthält, zu produzieren, als Mittel zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 8, 10, 12, 14, 16 oder 18.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf neue antitumorantibiotische Verbindungen und ihre Herstellung und Gewinnung.

Die antitumorantibiotischen Verbindungen der vorliegenden Erfindungen sind strukturell noch nicht identifiziert worden. In Anbetracht ihrer eindeutigen physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften jedoch wird angenommen, dass BBM-1675 Antibiotika neue Substanzen sind.

Die EP-A1-95154 offenbart die Fermentation von *Actinomyces* *pulveraceus* sp. nov. Nr. 6049 (ATCC 39100), um Antitumorantibiotika zu produzieren, die mit WS 6049-A und WS 6049-B bezeichnet wurden. Die Strukturen der WS 6049-Antibiotika sind noch nicht aufgeklärt worden, jedoch kann auf Grund der Charakterisierungseigenschaften, welche für WS 6049-A und WS 6049-B angegeben wurden, geschlossen werden, dass sie strukturell mit den BBM-1675 Antibiotika der vorliegenden Erfindung verwandt sein können. Die Spektraldaten zeigen jedoch, dass weder WS 6049-A noch WS 6049-B identisch sind mit irgendeiner der BBM-1675 Komponenten. Überdies kann der erzeugende Organismus, welcher in der EP-A1-95154 beschrieben ist, klar vom *Actinomyces* *verrucosus* Stamm der vorliegenden Erfindung unterschieden werden, nämlich in der Farbe seines aeralen Myceliums auf ISP-Medium Nrn. 2, 3 und 4, in seiner positiven Milchpeptonisierung und in seiner positiven Verwendung auf D-Fructose, D-Mannit, Trehalose und Cellulose.

Die vorliegende Erfindung stellt neue antitumorantibiotische Verbindungen zur Verfügung, welche in dieser Beschreibung mit BBM-1675 A₁, A₂, A₃, A₄, B₁ und B₂ (gesamthaft) bezeichnet werden, und durch Kultivierung eines BBM-1675-produzierenden Stammes von *Actinomyces* *verrucosus* hergestellt werden, insbesondere durch *Actinomyces* *verrucosus* Stamm H964-92 (ATCC 39334) oder *Actinomyces* *verrucosus* Stamm A1327Y (ATCC 39638) oder eines Mutanten davon in einem wässrigen Nährmedium, welches assimilierbare Quellen von Kohlenstoff und Stickstoff enthält, unter submergen aeroben Bedingungen. Die Verbindungen BBM-1675 umfassen zwei bioaktive Hauptkomponenten nämlich BBM-1675 A₁ und A₂ und die vier bioaktiven NebenkompONENTEN BBM-1675 A₃, A₄, B₁ und B₂. Die Komponenten können durch konventionelle chromatographische Verfahren aufgetrennt und gereinigt werden. Die genannten bioaktiven Komponenten, in ihrer Gesamtheit auch als «BBM-1675 Komplex» bezeichnet, weisen alle antimikrobiische und antitumor Aktivität auf.

Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 zeigt das Infrarot-Absorptionsspektrum von partiell gereinigtem BBM-1675 A₁ (KBr-Tablette)

Fig. 2 zeigt das Infrarot-Absorptionsspektrum von partiell gereinigtem BBM-1675 A₂ (KBr-Tablette)

Fig. 3 zeigt das Infrarot-Absorptionsspektrum von BBM-1675 A₃ (KBr-Tablette)

Fig. 4 zeigt das Infrarot-Absorptionsspektrum von BBM-1675 A₄ (KBr-Tablette)

Fig. 5 zeigt das magnetische Protonenresonanzspektrum von partiell gereinigtem BBM-1675 A₁ in CDCl₃ (60 MHz)

Fig. 6 zeigt das magnetische Protonenresonanzspektrum von partiell gereinigtem BBM-1675 A₂ in CDCl₃ (60 MHz)

Fig. 7 zeigt das magnetische Protonenresonanzspektrum von BBM-1675 A₃ in CDCl₃ (60 MHz)

Fig. 8 zeigt das magnetische Protonenresonanzspektrum von BBM-1675 A₄ in CDCl₃ (60 MHz)

Fig. 9 zeigt das Infrarot-Absorptionsspektrum von gereinigtem BBM-1675 A₁ (KBr-Tablette)

Fig. 10 zeigt das magnetische Protonenresonanzspektrum von BBM-1675 A₁ in CDCl₃ (360 MHz)

Fig. 11 zeigt das magnetische ¹³C-Resonanzspektrum von gereinigtem BBM-1675 A₁ in CDCl₃ (90,3 MHz)

Fig. 12 zeigt das Infrarot-Absorptionsspektrum von gereinigtem BBM-1675 A₂ (KBr-Tablette)

Fig. 13 zeigt das magnetische Protonenresonanzspektrum von gereinigtem BBM-1675 A₂ in CDCl₃ (360 MHz)

Fig. 14 zeigt das magnetische ¹³C-Resonanzspektrum von gereinigtem BBM-1675 A₂ in CDCl₃ (90,3 MHz).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind die neuen Antitumorantibiotika gemäss den Definitionen in den Ansprüchen 1–6 und ihre Herstellung durch Fermentation mit gewissen Stämmen von *Actinomyces* *verrucosus*, gemäss den Definitionen in den Ansprüchen 7–18. Als Mikroorganismen kommen z.B. *Actinomyces* *verrucosus* Stamm H964-92 oder Mutanten davon in Frage, z.B. *Actinomyces* *verrucosus* Stamm A1327Y. Der oben genannte Elternstamm wurde isoliert aus einer Bodenprobe, die bei Pto Esperanza, Misiones, Argentinien gefunden wurde. Eine biologisch reine Kultur des Organismus wurde am 28. März 1983 bei der American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville MD 20852 USA, hinterlegt und in die permanente Sammlung von Mikroorganismen als ATCC 39334 einverleibt. Später wurde der Mutantenstamm A1327Y erhalten, durch übliche Nitrosoguanidin (NTG)-Behandlung des Stammes H964-92 und wurde am 21. März 1984 bei der American Type Culture Collection als ATCC 39638 hinterlegt.

Wie im Falle von vielen Antibiotika produzierenden Kulturen, ergibt die Fermentation *Actinomyces* *verrucosus* Stamm H964-92 oder Stamm A1327Y eine Mischung oder einen Komplex von Komponentensubstanzen. Zwei bioaktive Hauptkomponenten, BBM-1675 A₁ und A₂, und vier bioaktive NebenkompONENTEN, BBM-1675 A₃, A₄, B₁ und B₂ wurden aus dem BBM-1675 Komplex, der durch das Fermentationsverfahren erzeugt wurde, isoliert.

BBM-1675 und seine Komponenten BBM-1675 A₁, A₂, A₃, A₄, B₁ und B₂ weisen eine antimikrobiische Aktivität auf, gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen, einschliesslich grampositiver Bakterien. Der BBM-1675 Komplex und die daraus abgetrennten bioaktiven Komponenten weisen ebenfalls Phag induzierende Eigenschaften in lysogenen Bakterien auf. Zwei der Komponenten, BBM-1675 A₁ und A₂ wurden einem in vivo Screening gegen verschiedene Mäusetumorsysteme unterworfen und zeigten Inhibitoraktivität gegen L-1210-Leukämie, P-388-Leukämie, B16-Melanom und Lewis-Lungenkarzinom. BBM-1675 A₃ und A₄ haben sich als aktiv erwiesen gegen Mäuse-P-388-Leukämie. Der Komplex und seine bioaktiven Komponenten können somit als antimikrobiische Mittel oder als Antitumormittel für die Hemmung von Tumoren bei Warmblütlern eingesetzt werden.

Der Mikroorganismus

Der *Actinomyces* Stamm Nr. H964-92 wurde aus einer Bodenprobe isoliert und durch übliche Methoden als biologisch reine Kultur zubereitet für seine Charakterisierung. Der Stamm H964-92 bildet am aeralen Mycelium kurze Sporenketten, welche gerade, bewegliche oder krumme Formen aufweisen. Die Sporen sind sphärisch oder ovalförmig und weisen eine warzige Oberfläche auf. In den meisten Medien ist das aeriale Mycelium schwach ausgebildet. Die Farbe der aeralen Masse ist weiss und weist später einen rosa Schatten auf oder weitere Wechsel zu einer bläulichen Farbe in gewissen Agarmedien. Die Farbe des Substratmyceliums ist farblos oder schwach rosa. Die Wachstumstemperatur bewegt sich von 15–43 °C. Die Zellwandaminosäurezusammensetzung und die gesamte Zelle hydrolysieren Zuckerkomponenten, was zeigt, dass der Stamm H964-92 zum Zell-

wandtyp III_B gehört. Das Menachinon wurde identifiziert als MK-9(H₆) · MK-9(H₈).

Auf Grund der hauptsächlich morphologischen Kultivierungs- und physiologischen Charakteristika im Zusammenhang mit den chemischen Zellwandzusammensetzung-Charakteristika, kann der Stamm H964-92 als der Gattung *Actinomadura* zugehörend klassifiziert werden.

Obschon der ursprüngliche Stamm H964-92 nur bescheidenes Wachstum zeigte und nur spärliche aerielle Mycelien trug, wurde durch die NTG (Nitrosoguanidin)-Behandlung von H964-92 eine verbesserte Ausbildung des aeriellen Myceliums erhalten. Die Variante, bezeichnet als Stamm A1327Y, erleichterte weitere taxonomische Ermittlungen und wurde anschliessend als *Actinomadura verrucososporea* identifiziert.

Methoden

Die Medien und Verfahren, die für die Prüfung der kulturellen Charakteristika und für die Kohlenhydratverwertung verwendet wurden, waren diejenigen, die durch das International Streptomyces Project (Intl. J. Syst. Bacteriol. 16: 313–340, 1966) empfohlen wurden. Zusätzliche Medien, die durch S. A. Waksman (The Actinomycetes, Vol. 2) und G. M. Lvedemann (Intl. J. Syst. Bacteriol. 21: 240–247, 1971) beschrieben wurden, wurden ebenfalls verwendet. Die Aminosäurezusammensetzung der Zellwand und die gesamten Zellhydrolysat-Zuckerkomponenten wurden gemäss den Methoden, wie sie Becker et al. in «Appl. Microbiol.», 13: 236–243, 1965 bzw. Lechevalier und Lechevalier in «The Actinomycetes», Ed. H. Prauser, Jena, Gustav Fischer Verlag, S. 393–405, 1970, beschrieben wurden. Die Menachinone wurden durch Massenspektrometrie identifiziert, gemäss den Verfahren von Collins et al. in «J. Gen. Microbiol.», 100: 221–230, 1977, und die Menachinonzusammensetzung wurde auf Grund des Systems dargestellt, beschrieben durch Yamada et al. in «J. Gen. Appl. Microbiol.», 23: 331–335, 1977.

Morphologie

Der Stamm H964-92 bildet sowohl Substrate wie aerielle Mycelien. Das Substratmycelium ist lang, verzweigt und nicht in kurze Fasern fragmentiert. Im aeriellen Mycelium sind die kurzen Sporenketten monopodial ausgebildet oder am hyphalen Ende. Wirbelartige Zweige von Sporenketten

werden ebenfalls nahe dem hyphalen Ende beobachtet. Diese Sporenketten umfassen 2–10 Sporen in einer Kette und sind gerade beweglich oder gekrümmt. Die Sporen haben eine warzige Oberfläche und sind spherisch oder elliptisch (0,5–0,6 × 0,6–1,4 µm) in Formen mit abgerundeten oder spitzen Enden. Nach der Reifung sind die Sporen oft von den leeren Hüllen getrennt. Um unbewegliche Sporen, Sporangien oder verhärtete Körnchen konnten in keinem der geprüften Medien bemerkt werden.

Kulturelle und physiologische Charakteristika

Das Wachstum des Stammes H-964-92 ist schwach bis bescheiden sowohl in chemisch definierten Medien als auch in natürlichen organischen Medien. Die Bildung des aeriellen Myceliums ist im allgemeinen schwach, ist jedoch bescheiden in Hafer, Mehl, Agar (ISP Nr. 3-Medium) anorganischem Salz-Stärke-Agar (ISP Nr. 4-Medium) und Bennett's Agar. Spontane Varianten, welchen das aerielle Mycelium fehlt, kommen in hoher Häufigkeit vor. Die Farbe des aeriellen Myceliums ist weiss, welches später zu einem schwachen rosa wechselt in Hafermehl-Agar, anorganischem Salz-Stärke-Agar und Glycerin-Asparagin-Agar (ISP Nr. 5-Medium). Die Farbe der aeriellen Masse wechselt im weiteren zu einer bläulichen Farbe nach einer langen Inkubation (5 Monate) in Hafermehl-Agar, Glycerin-Asparagin-Agar und Tyrosin-Agar. Die Farbe des Substratmyceliums ist farblos bis gelblich in Czapek-Agar, Tyrosin-Agar, Hefeextrakt-Malzextrakt-Agar (ISP Nr. 2-Medium), Pepton-Hefeextrakt-Eisen-Agar (ISP Nr. 6-Medium) und ist von einer ins rosa gehenden Farbe in Glukose-Asparagin-Agar und Glycerin-Asparagin-Agar. Melanoid und andere diffundierbare Pigmente werden nicht erzeugt. Eine Variante Nr. A1327Y, welche aus dem ursprünglichen Stamm erhalten wurde, bildet vorwiegend ein schwachblaues aerielles Mycelium und trägt reichlich aerielle Sporenmasse.

Der Stamm H-964-92 wächst bei 15 °C, 28 °C, 37 °C und 43 °C, jedoch nicht bei 10 °C oder bei 47 °C. Er ist empfindlich auf NaCl bei 7% und resistent auf Lysozym bei 0,01%.

Die kulturellen und physiologischen Charakteristika des produzierenden Stammes sind in den Tabellen 1 bzw. 2 dargestellt. Die Verwertung der Kohlenstoffquellen ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 1
Kulturelle Charakteristika des Stammes H 964-92 (ursprünglicher Stamm ATCC 39334 und Variante A 1327 Y)

Stamm Nr. H 964-92	ursprünglicher Stamm (ATCC 39334)	Variante Nr. A 1327Y	<i>Actinomadura verrucososporea</i> KCC A-0147
Trypton-Hefeextrakt-Agar (ISP Nr. I)	G: reichlich, flockig, sedimentiert und nicht gefärbt	bescheiden, flockig, sedimentiert und nicht gefärbt	bescheiden, flockig, sedimentiert und nicht gefärbt
Saccharose-Nitrat-Agar (Czapek's Agar)	G: bescheiden R: farblos A: spärlich; leicht grau (264); bis schwach rosa (7) D: keines	gering farblos keines oder spärlich; rötlich-weiss keines	gering farblos keines oder spärlich; schwach blau (185) keines
Glucose-Asparagine-Agar	G: bescheiden R: weiss (263) bis tief gelblich-rosa (27) A: keines oder sehr spärlich schwach rosa (7) D: keines	gering farblos keines oder sehr spärlich weiss keines	gering farblos keines oder sehr spärlich weiss keines

Tabelle 1 (Fortsetzung)
Kulturelle Charakteristika des Stammes H 964-92 (ursprünglicher Stamm ATCC 39334 und Variante A 1327 Y)

Stamm Nr. H 964-92	ursprünglicher Stamm (ATCC 39334)	Variante Nr. A 1327Y	Actinomadura verrucosospora KCC A-0147
Glycerin-Asparagin-Agar (ISP Nr. 5)	G: gering bis bescheiden R: farblos bis leicht gelblich-rosa (28) A: gering; leicht gelblich-rosa (28), nach 5 Monaten leicht bläulich-grau (190) D: keines	bescheiden hell gelblich-rosa (28) bescheiden; weiss bis leicht rosa (4) keines bescheiden	bescheiden leicht gelblich-rosa (28) bis tief gelblich-rosa (27) bescheiden; weiss bis stark rosa (2) keines bescheiden
anorganisches Salz-Stärke-Agar (ISP Nr. 4)	G: reichlich R: gelblich-weiss (92) A: reichlich; leicht rosa (4) bis rötlich-grau (10) D: keines	leicht gelblich-rosa (28) bescheiden; leicht bläulich-grau (190) keines bescheiden	leicht gelblich-rosa (28) reichlich; schwach blau (185) keines bescheiden
Tyrosin-Agar (ISP Nr. 7)	G: bescheiden R: gelblich-weiss (92) A: gering; leicht gelblich-rosa (28), viel später (5 Monate) teilweise leicht bläulich-grau (190) D: keines	stark gelblich-rosa (26) bescheiden; weiss bis leicht rosa (4) keines gering	stark gelblich-rosa (26) bescheiden; weiss bis leicht rosa (4) keines gering
Nähragar	G: gering bis bescheiden R: blassgelb (89) A: keines D: keines	farblos bis blassrosa (7) keines keines reichlich	farblos bis blassrosa (7) keines keines reichlich
Hefeextrakt-Malzextrakt-Agar (ISP Nr. 2)	G: reichlich R: schwach gelb (89) A: gering; weiss (263) D: keines	stark gelblich-rosa (26) gering; weiss bis blassgelb (7) keines gering	stark gelblich-rosa (26) gering; weiss bis blassgelb (7) keines gering
Hafermehl-Agar	G: bescheiden R: farblos bis blass-rosa (7) A: gering; rötlich-weiss (9) bis leicht bläulich-grau (190) D: keines	blass gelblich-rosa (31) sehr spärlich; helles blasses blau (184) keines reichlich	blass gelblich-rosa (31) sehr spärlich; helles blasses blau (184) keines reichlich
Bennetts's Agar	G: reichlich R: gräulich-gelb (90) A: bescheiden; weiss (263) bis gelblich-weiss (92) D: keines	stark gelblich-rosa (26) bescheiden; blass gelblich-rosa (31) und bläulich-weiss (189) keines reichlich	stark gelblich-rosa (26) keines keines reichlich
Pepton-Hefeextrakt-Eisen-Agar (ISP Nr. 6)	D: keines G: bescheiden R: farblos A: keine D: keine	keines reichlich farblos keine keine	keines reichlich farblos keine keine

* Beobachtet nach Inkubation bei 37 °C während 3 Wochen.

** Abkürzungen: G = Wachstum; R = Umkehrfarbe; A = aerales Mycelium; D = diffundierbares Pigment.

*** Farbe und Nummern in Klammern entsprechen dem Color-Standard in Kelly, K.L. & D.B. Judd: ISCC-NBS color-name charts illustrated with Centroid Colors. U.S. Dept. of Com. Cir. 553, Washington, D.C., Nov., 1975.

Tabelle 2

Test	Reaktion	Methode und Medium
Temperaturbereich für das Wachstum	maximales Wachstum bei 28–37 °C; bescheiden bei 20 und 43 °C; kein Wachstum bei 10 und 47 °C	Bennett's Agar

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Test	Reaktion	Methode und Medium
Gelatineverflüssigung	Verflüssigung	Glukose-Pepton-Gelatine-Medium
Stärkehydrolysen	Hydrolyse	Stärke-Agar-Platte
Reaktion in entrahmter Milch	keine Koagulation und vollständige Peptonisierung	Difco entrahmte Milch
Bildung des Melanoid-Pigments	nicht erzeugt	Tyrosin-Agar, Pepton-Hefe-Eisen-Agar und Trypton-Hefeextrakt-Brühe
Nitrat-Reduktion	nicht reduziert	Czapek's Glukose-Nitrat-Brühe und Glukose-Hefeextrakt-Nitrat-Brühe
Resistenz gegen NaCl	Wachstum bei 5% oder weniger; kein Wachstum bei 7%.	Trypton-Hefeextrakt-Agar
Lysozym	resistent. Wachstum bei 0,01% oder weniger; kein Wachstum bei 0,1%.	Trypton-Hefeextrakt-Agar
pH-Wert	Wachstum bei pH-Wert 5,0–9,5; kein Wachstum bei pH-Wert 4,5 und 10,0.	Trypton-Hefeextrakt-Agar

Tabelle 3
Verwendung der Kohlenstoffquellen

	Stamm Nr. H964-92 ursprünglicher Stamm	Variante Nr. A1327Y	Actinomadura verrucosospora KCC A-0147
Glycerin	+	+	+
D(–)-Arabinose	–	–	–
L(+)-Arabinose	+	+	+
D-Xylose	+	+	+
D-Ribose	+	–	–
L-Rhamnose	+	+	+
D-Glucose	+	+	+
D-Galactose	–	–	–
D-Fructose	+	+	+
D-Mannose	–	–	–
L(–)-Sorbose	–	–	–
Sucrose	+	+	+
Lactose	–	–	–
Cellobiose	+	+	+
Melibiose	–	–	–
Trehalose	+	+	+
Raffinose	–	–	–
D(+)-Melezitose	–	–	–
lösliche Stärke	+	+	+
Cellulose	+	+	+
Dulcitol	–	–	–
Inositol	+	–	–
D-Mannit	+	+	+
D-Sorbit	–	–	–
Salicin	–	–	–

Beobachter nach Inkubation bei 28 °C während 3 Wochen
Grundmedium: Pridham-Gottlieb-anorganisches-Medium

Zellwandzusammensetzung und gesamte Zellzuckerkomponenten

Die gereinigte Zellwand des Stammes H964-92 enthält Mesodiaminopimelinsäure, jedoch kein Glycin. Das gesamte Zellhydrolysat zeigt die Gegenwart von Madurose (3-O-Methyl-D-galactose), Glukose und Ribose. Die Zellwandaminosäure und die gesamten Zellzuckerkomponenten zei-

gen, dass der Stamm H964-92 in den Zellwandtyp III_B einzu-stufen ist. Zwei Hauptkomponenten des Menachinons wurden als MK–9(H₆) und MK–9(H₈) identifiziert.

Taxonomische Stellung des Stammes H964-92

Der Stamm H964-92 hat die folgenden Hauptcharakteristika: (1) Aeriale Sporenketten: Kurz, gerade, beweglich

oder gekrümmt in der Form. (2) Sporen: Warzige Oberfläche. (3) Aeriales Mycelium: Rötliche oder bläuliche Farbe. (4) Substratmycelium: Rötlich in einigen Medien. (5) Diffundierbares Pigment: Keines. (6) Mesophil. (7) Zellwandtyp III_B. (8) Menachinonsystem: MK-9(H₆) und MK-9(H₈).

Diese Hauptcharakteristika zeigen, dass der Stamm H964-92 in die Gattung *Actinomadura* gehört. Frühe Arten der Gattung *Actinomadura* wurden aus Wärmblütlern isoliert. Einige Stämme wurden ebenfalls aus Pflanzenmaterialien erhalten. Viele der neuen Arten jedoch, die kürzlich beschrieben wurden, wurden aus dem Boden isoliert. Gemäss der numerischen Taxonomie und Übersicht der *Actinomadura* und den verwandten *Actinomycetes* von Goodfellow et al. in «J. Gen. Microbiol.», 112: 95–111 (1979) insbesondere *Actinomadura*-Arten, die aus dem Boden stammen, sind klassifiziert in Gruppe Nr. 7 unter den 14 beschriebenen Gruppen. Stamm Nr. H-964-92 ist den Arten der Gruppe 7 am ähnlichsten. Nonomura und Ohara in «J. Ferment. Technol.», 49: 904–912 (1971) beschrieben fünf saprophytische Arten der Gattung *Actinomadura* und Nonomura (J. Ferment. Technol. 52: 71–77 (1974) und Preobrazhenskaya et al. (*Actinomycetes and Related Organisms* 12: 30–38 (1977)) publizierten die Schlüssel für die Identifikation und Klassifikation der *Actinomadura*-Arten. Als Resultat des Vergleichs mit den Beschreibungen der 30 Arten einschliesslich der Organismen, welche in Patenten offenbart wurden, erscheint der Stamm H964-92 dem *Actinomadura coerulea* gemäss der oben erwähnten Publikation von Preobrazhenskaya und dem *Actinomadura verrucososporea* gemäss der oben zitierten Publikation von Nonomura am ähnlichsten.

Der Stamm Nr. H964-92 wurde direkt verglichen mit *A. verrucososporea* Stamm KCC A-0147 und erwies sich als dem *A. verrucososporea* in den morphologischen, kulturellen und physiologischen Charakteristika als nahe verwandt. Somit wurde der Stamm H964-92 als neuer Stamm von *Actinomadura verrucososporea* klassifiziert.

Es ist selbstverständlich, dass für die Herstellung von BBM-1675 die vorliegende Erfindung, trotzdem sie im einzelnen mit Bezug auf den besonderen Stamm *Actinomadura verrucososporea* Stamm H964-92 (ATCC 39334) und dessen Mutanten Stamm A1327Y (ATCC 39638) beschrieben ist, nicht auf diese Mikroorganismen oder auf Mikroorganismen, deren Charakteristika hierin vollständig offenbart sind, beschränkt ist. Es ist ausdrücklich beabsichtigt, dass die Erfindung die Stämme H964-92 und sämtliche natürlichen und künstlichen BBM-1675-produzierenden Varianten und Mutanten davon umfassen soll.

Die BBM-1675-Antibiotika der vorliegenden Erfindung können hergestellt werden durch Kultivierung eines BBM-1675-produzierenden Stammes von *Actinomadura verrucososporea*, vorzugsweise eines Stammes von *Actinomadura verrucososporea*, mit den Identifizierungscharakteristika von ATCC 39334 oder ATCC 39638 oder eines Mutanten davon, in einem üblichen wässrigen Nährmedium. Der Organismus wird in einem Nährmedium gezüchtet, das bekannte Nährmittelquellen für *Actinomycetes* enthält, z. B. assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und gegebenenfalls anorganische Salze und andere bekannte Wachstumsfaktoren. Submerse aerobe Bedingungen werden bevorzugt verwendet für die Herstellung von grossen Quantitäten des Antibiotikums, trotzdem für die Herstellung von begrenzten Mengen Oberflächenkulturen und Flaschen ebenfalls eingesetzt werden können. Die allgemeinen Verfahren, die für die Kultivierung von anderen *Actinomycetes* verwendet werden, sind in der vorliegenden Erfindung ebenfalls anwendbar. Das Nährmedium sollte zweckmässige assimilierbare Kohlenstoffquellen wie Glycerin, L-(+)-Arabinose, D-Xylose, D-Ribose, L-Rhamnose, D-Glukose, D-Fructose, Saccharose, Cellobiose,

lösliche Stärke, D-Mannit oder Inosit. Als Stickstoffquellen können Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat, Harnstoff, Ammoniumnitrat, Natriumnitrat usw. eingesetzt werden, entweder allein oder in Kombination mit organischen Stickstoffquellen, wie Peptone, Fleischextrakt, Hefeextrakt, Maiswasser, Sojabohnenpulver, Baumwollsaatmehl usw. Nötigenfalls können ebenfalls anorganische Nährsalze als Quellen für Natrium, Kalium, Kalzium, Ammonium, Phosphat, Sulfat, Chlorid, Bromid, Carbonat, Zink, Magnesium, Mangan, Kobalt, Eisen und dgl. eingesetzt werden.

Die Herstellung der Antibiotika BBM-1675 kann bei jeder Temperatur durchgeführt werden, die ein befriedigendes Wachstum des produzierenden Organismus erlaubt, z. B. 15–45 °C, und wird üblicherweise bei einer Temperatur um 27–32 °C durchgeführt. Normalerweise wird die optimale Produktion erhalten nach Inkubationszeiten von 68–180 h, je nach dem, ob eine Schüttelflasche, ein Rührgefäss oder die Tankfermentation eingesetzt wird. Wenn eine Tankfermentation ausgeführt wird, ist es wünschenswert, ein vegetatives Inokulum in einer Nährbrühe herzustellen, indem die Brühenkultur mit einer Schräg- oder Bodenkultur des produzierenden Organismus inokuliert wird. Nachdem auf diese Weise ein aktives Inokulum erhalten worden ist, wird es aseptisch in das Fermentationstankmedium transferiert. Die Antibiotika-Produktion kann durch einen Papier-Disc-Agar-Diffusionsversuch unter Verwendung des *Staphylococcus aureus* 209P als Testorganismus verfolgt werden.

Isolierung und Reinigung

Wenn die Fermentation beendet ist, kann der BBM-1675-Komplex aus der Brühe durch konventionelle Isolierungsverfahren erhalten werden, beispielsweise durch Flüssigextraktion. So kann beispielsweise die gesamte Brühe durch Filtration oder Zentrifugation in einen mycelialen Kuchen und den Brühenüberstand aufgetrennt werden. Das Antibiotikum im mycelialen Kuchen kann gewonnen werden, indem der Kuchen in Methanol aufgeschlämmt wird, das unlösliche Material abfiltriert wird und der methanolische Extrakt konzentriert wird. Die Aktivität im Brühenüberstand kann durch Extraktion mit n-Butanol gewonnen werden. Die oben erwähnten n-Butanol- und Methanolextrakte können anschliessend vereinigt und azeotrop abgedampft werden, wobei eine wässrige Lösung erhalten wird, welche den grössten Teil der antibiotischen Aktivität als ölige Feststoff ausscheidet. Der Feststoff kann anschliessend in Methanol aufgelöst und die Lösung filtriert werden. Das Filtrat wird eingengt und zu einer Mischung von Ethylacetat und Wasser gegeben. Das erhaltene organische Extrakt enthält den rohen BBM-1675-Komplex, welches aus der Lösung ausgefällt werden kann, durch Zugabe eines Antilösungsmittels, wie n-Hexan.

Der rohe BBM-1675-Komplex ist eine Mischung von verschiedenen Komponenten, einschliesslich der beiden bioaktiven Hauptkomponenten BBM-1675 A₁ und A₂ und der vier bioaktiven Nebekomponenten BBM-1675 A₃, A₄, B₁ und B₂. Diese bioaktiven Komponenten können durch konventionelle, chromatographische Verfahren aufgetrennt und gereinigt werden. In einem Verfahren wird der rohe BBM-1675-Komplex in Methanol aufgelöst und dann durch Sephadex LH-20 Säulenchromatographie gereinigt, unter Verwendung von Methanol als Elutionsmittel. Dieser partiell gereinigte Komplex kann dann auf einer Silikagelsäule chromatographiert werden und dann in stufenweiser Weise eluiert werden unter Verwendung von Chloroform und einer zunehmenden Konzentration von Methanol, um BBM-1675 A₁, eine Mischung von BBM-1675 A₂, A₃ und A₄ und eine Mischung von BBM-1675 B₁ und B₂ zu erhalten. Die A₁-Komponenten können weiter gereinigt werden durch Sepha-

dex LH-20 Säulenchromatographie, unter Verwendung von Methanol als Elutionsmittel. Die Mischungen von A₂, A₃ und A₄ können durch Chromatographie auf einer Säule von Bondapak C₁₈ (Waters Associates, Inc.) unter Verwendung von zunehmenden Konzentrationen von wässrigem Acetonitril als Elutionsmittel. Die Mischung der Komponenten B₁ und B₂ kann durch Silikagelsäulenchromatographie aufgetrennt werden, unter Verwendung einer Mischung von Chloroform und Methanol als Elutionsmittel. Weitere Einzelheiten

ten der bevorzugten chromatographischen Trennverfahren werden durch die folgenden Beispiele zur Verfügung gestellt.

Physikochemische Eigenschaften der BBM-1675-Komponenten

Die sechs bioaktiven Komponenten des BBM-1675-Komplexes sind voneinander unterscheidbar durch zwei Dünnschichtchromatographie (TLC)-Systeme, wie in der folgenden Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4
TLC von BBM-1675 Komponenten

Komponenten	RF-Werte	* silanisiert CH ₃ CN-H ₂ O(75:25 v/v)
	SiO ₂ CHCl ₃ -CH ₃ OH(5:1 v/v)	
BBM-1675 A ₁	0,74	0,18
BBM-1675 A ₂	0,71	0,21
BBM-1675 A ₃	0,72	0,28
BBM-1675 A ₄	0,71	0,78
BBM-1675 B ₁	0,63	0,23
BBM-1675 B ₂	0,60	0,16

* C₁₈-Umkehrphasensilicagel

Die Trennung von BBM-1675 A₂, A₃ und A₄ war schwierig durch gewöhnliche Phasen TLC-Systeme, konnte jedoch durch Umkehrphasen TLC durchgeführt werden.

Die einzelnen BBM-1675-Komponenten zeigen Löslichkeit und Farbreaktionen, die einander ähnlich sind. Z. B. sind sie löslich in Chloroform, Ethylacetat, Aceton, Ethanol und Methanol, schwachlöslich in Benzol und Wasser und

unlöslich in n-Hexan und Tetrachlorkohlenstoff. Sie geben positive Reaktionen mit Eisenchlorid, Ehrlich und Tollen's Reagens, jedoch negative Reaktionen in den Sakaguchi-, Ninhydrin- und Anthron-Tests.

Die charakteristischen physikochemischen Eigenschaften der BBM-1675-Komponenten sind in der nachstehenden Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5
Physikalisch-chemische Eigenschaften der BBM-1675-Komponenten

	BBM-1675 A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	B ₁	B ₂
Schmelzpunkt (Zers.)	156–158°	147–149°	125–127°	123–126°	159–161°	156–159°
[α] _D ²⁷ (c 0,5 CHCl ₃)	–191°	–179,4°	–161°	–176°	–171°	–122°
Anal. gefunden (%)	C: 51,52	53,81	55,00	53,67		
	H: 5,81	6,31	6,52	6,35		
	N: 4,02	3,82	3,57	3,45		
	O: 38,65	36,06	34,91	36,53		
durch Differenz						
UV λ _{max} nm(E ₁ ^{1%} _{1 cm})	253(325)	253(281)	253(286)	253(257)	253(225)	248(212)
	282(195)	282(172)	282(158)	282(153)	282(140)	279(141)
	320(143)	320(128)	320(122)	320(117)	320(104)	318(103)
in 0,01N HCl-CH ₃ OH	253(323)	253(276)	253(287)	253(258)	253(225)	248(210)
	282(192)	282(167)	282(160)	282(155)	282(140)	279(140)
	320(144)	320(128)	320(126)	320(118)	320(105)	318(103)
in 0,01N NaOH-CH ₃ OH	252(325)	252(289)	252(280)	252(266)	252(236)	248(233)
	283(172)	283(171)	283(162)	283(160)	282(141)	278(150)
	318(136)	318(122)	318(120)	318(118)	318(105)	318(110)
Molekulargewicht (approximativer Wert)	1,300	1,100	1,100	1,400		

(Gel HPLC = Hochdruckflüssigchromatographie, Finepak, GEL-101)

Die UV-Absorptionsmaxima der BBM-1675-Komponenten wurden bei 253, 282 und 320 nm beobachtet, sie verschoben sich weder in einer angesäuerten noch in einer alkalischen Lösung. Die IR- und PMR-Spektren (magnetische Protonenresonanz) von BBM-1675 A₁, A₂, A₃ und A₄ sind in Fig. 1–4 bzw. in Fig. 5–8 dargestellt. Die 360 MHz PMR von BBM-1675 A₁ weisen auf ein Acetyl (δ : 2,11 ppm), ein N–CH₃ (2,52 ppm), vier OCH₃ (3,42, 3,80, 3,88 und 3,98 ppm) und ein Exomethylen (4,57 und 5,48 ppm) hin, zusammen mit zwei aromatischen Protonen (7,50 und 8,59 ppm) und einem NH-Proton (11,79 ppm). Das CMR-Spektrum von BBM-1675 A₁ zeigte 55 Kohlenstoffsignale einschliesslich eines Signales mit dreifacher Intensität (δ : 56,0 ppm, OCH₃). Die Molekularformel von BBM-1675 A₁ wird als C₅₇H₇₂N₄O₃₂ abgeleitet, auf Basis der Protonen- und ¹³C–NMR-Spektren, Mikroanalysen und Molekulargewichtsbestimmungen durch HPLC und SIMS (sekundäre Ionenmassenspektrometrie).

Strukturstudien von BBM-1675 A₁

Bei der Behandlung mit 0,5N HCl – CH₃OH bei Zimmertemperatur verliert BBM-1675 A₁ seine Bioaktivität und ergibt eine lipophile chromophore Substanz (Verbindung I) zusammen mit verschiedenen nicht identifizierten Fragmenten. Die Verbindung I zeigt eine UV-Absorption, die ähnlich ist wie diejenige des entsprechenden Antibiotikums, was den Schluss zulässt, dass die Verbindung I die chromophore Struktur von BBM-1675 A₁ enthält. Zwei weitere chromophore Fragmente, die der Verbindung I verwandt sind, werden durch alkalische Hydrolyse von BBM-1675 A₁ erhalten: Hydrolyse mit 0,05N KOH – CH₃OH bei 55 °C während 1 h ergibt Verbindung II mit den UV-Absorptionsmaxima bei 252, 284, 297 (Schulter) und 322 nm, während die Reaktion in 1N KOH – CH₃OH eine saure chromophore Substanz ergibt, die mit Verbindung III bezeichnet wird. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Verbindungen I, II und III werden in der nachstehenden Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6

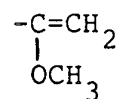
	Verbindung I	Verbindung II	Verbindung III
F.	: 82–83 °C	133 °C	253–255 °C
$[\alpha]_D^{25}$ (c 0,2 CHCl ₃)	: –100 °	0	0
Molekularformel	: C ₂₁ H ₃₁ NO ₁₀	C ₁₄ H ₁₇ NO ₆	C ₁₃ H ₁₅ NO ₆
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ nm(ϵ)	: 244(21,850) 276(9,400) 318(6,300)	252(26,600) 283(11,200) 297(sh8,800) 322(11,700)	248(26,900) 295(14,400) 310(13,500)
MS m/z	: 457 (M ⁺) 425 341 281 264	295 (M ⁺) 280 263 251 248	281 (M ⁺) 263 236 222 218
TLC (Xylol–*MEK–CH ₃ OH = 5:5:1 v/v)	: Rf 0,58	0,66	0,13

* MEK = Methyl-ethyl-keton

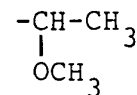
Die Strukturelle Information über die Verbindungen II und III ergab sich aus den folgenden Spektraldaten und der chemischen Transformation. Die ¹³C und Protonen NMR wies auf die Gegenwart von vier OCH₃, einem =CH₂, sieben

–C = , zwei > C = O und eine > NH-Gruppe in Verbindung II. Das NMR-Spektrum der Verbindung III war ähnlich denjenigen von II, es unterschied sich nur in der Abwesenheit von einer der vier OCH₃-Gruppen, die bei der Verbindung der Formel II beobachtet wurden. Dieser Unterschied zusammen mit der sauren Natur der Verbindung III lässt den Schluss zu, dass II ein Methylester der Verbindung III darstellt. Wenn unter Rückfluss erhitzt wird in 1N-methanolischer KOH, wird die Verbindung II quantitativ in die Verbindung III umgewandelt, während die Verbindung III in die Verbindung II umgewandelt wurde bei einer Behandlung mit Diazomethan. Die Verbindung der Formel II mit NaBH₄ in C₂H₅OH ergab ein Reduktionsprodukt (Verbindung IV, M⁺: m/z 267), welche, wie die NMR zeigte eine –CH₂OH-Gruppe anstelle von COOCH₃-Gruppe der Verbindung II aufwies. Nach Hydrierung mit Palladium auf Kohle ergab die Verbindung II ein Dihydroderivat (Verbindung V, M⁺: m/z 297). Das Protonen-NMR-Spektrum der Verbindung V zeigte ein neues Dublett-Methylsignal und die Abwesenheit der Exomethylgruppe, die in Verbindung II vorhanden war. Weiter erschien in der Verbindung V eine

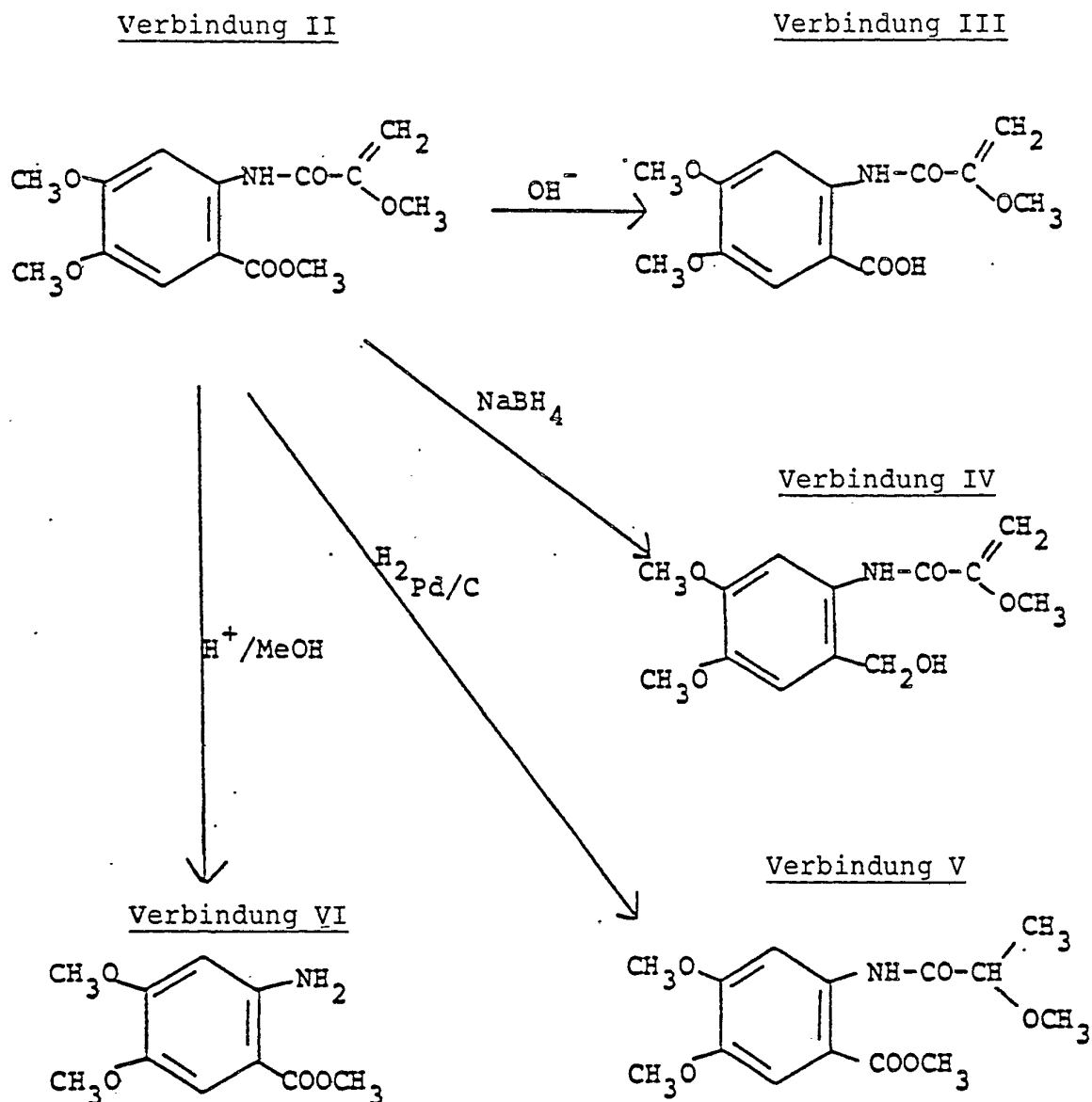
der OCH₃-Gruppen in einem höheren Gebiet (δ : 3,50 ppm). Dieses Resultat zeigt die Gegenwart einer



Gruppe in der Verbindung II an, welche durch Hydrierung zur Gruppe



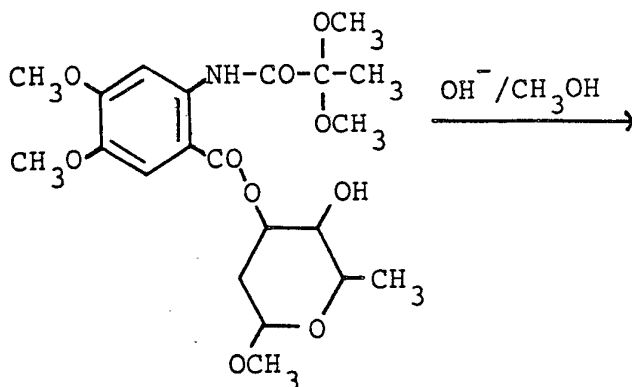
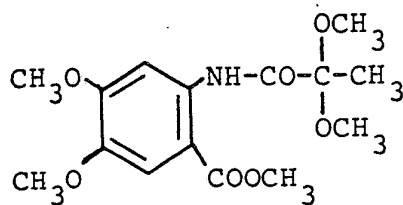
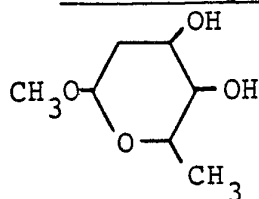
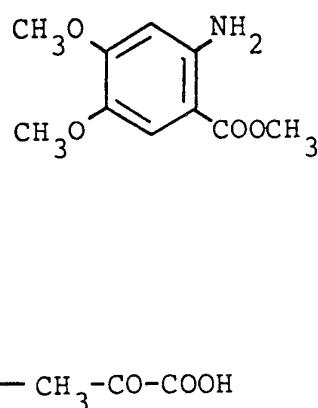
in Verbindung V reduziert wurde. Die Verbindung II wurde mit 1,5N methanolischem Chlorwasserstoff bei 80 °C während 3 h erwärmt, und das Hydrolysat wurde auf einer Silikagelsäule chromatographiert, wobei eine schwachbasische Verbindung (Verbindung VI, M⁺: m/z 211) erhalten wurde. Das IR-Spektrum und die physikalisch-chemischen Eigenschaften ergaben, dass die Verbindung VI eine NH₂-Gruppe enthielt. Die Verbindung VI wurde als Methyl-4,5-dimethoxy-anthramilat identifiziert, durch Vergleich der IR- und NMR-Studien mit einer authentischen Probe. Folglich wurden die Strukturen der Verbindungen II–VI wie nachstehend gezeigt ermittelt.



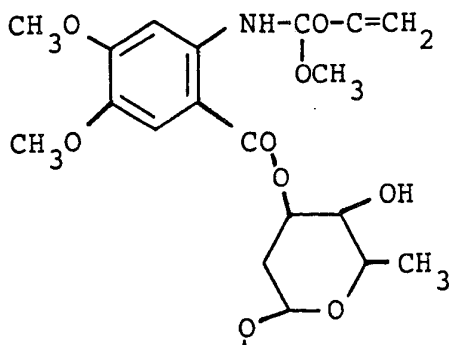
Nach Behandlung mit 0,05N KOH-CH₃OH bei 55 °C wurde die Verbindung I aufgespalten in ein neues, chromophores Fragment (Verbindung VII, C₁₅H₂₁NO₇, M⁺: m/z 327) und einen Zucker (Verbindung VIII). Das NMR-Spektrum von VII zeigte ein Singlet C-CH₃ und zwei OCH₃-Gruppen im hohen Gebiet zusätzlich zu drei OCH₃-Gruppen im tiefen Gebiet und zwei aromatische Protonen, welche üblicherweise bei den Verbindungen II, V und VI beobachtet wurden. Eine weitere Hydrolyse von VII mit 1,5N methanolischem Chlorwasserstoff ergab Verbindung VI, welche identisch war mit derjenigen, die aus II erhalten wurde. Nach der Entfernung von VI, wurde das Hydrolysat mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin behandelt, wobei ein gelber Feststoff ausgefällt wurde, der als 2,4-Dinitrophenylhydrazon der Brenztraubensäure identifiziert wurde. Somit ist die Verbindung VII Methyl-4,5-dimethoxy-N-(2', 2'-dimethoxypropionyl)-

anthranilat. Die Verbindung der Formel VIII zeigte keinen Molekularionenpeak, zeigte jedoch den M-OCH₃-Peak bei m/z 131 im Massenspektrum, in Übereinstimmung mit der Molekularformel C₇H₁₄O₄. Das NMR-Spektrum ergab die 2,6-Dideoxyhexopyranose-Struktur für die Verbindung VIII. Diese Zuweisung wurde durch das ¹³C-NMR-Spektrum der Verbindung I bestätigt, welches einen Anstieg ergab zu einem C-CH₃, einem -CH₂, drei O-CH< und einem anomeren Kohlenstoffatom, zusätzlich zu 15 Kohlenstoffsignalen, die der Verbindung VII zugeschrieben werden konnten. Das C₃-Proton des Zuckers, das in einem niedrigen Gebiet (δ: 5,39 ppm, Octet) erschien, zeigte, dass das C₃-OH des Zuckers mit der Carboxygruppe von VII verestert war. Die obigen Resultate werden untenstehend zusammengefasst.

Struktur der Verbindungen I, VII und VIII

Verbindung IVerbindung VIIVerbindung VIIIVerbindung VI

Das Molekulargewicht der Verbindung I (457) ist etwa für einen Drittel des gesamten BBM-1675 A₁-Molekül verantwortlich (vorgeschlagene Formel C₅₇H₇₂N₄O₃₂; berechnetes Molekulargewicht = 1324). Die Teilstruktur von BBM-1675 A₁ wird als folgende betrachtet:



Nach dem Anmeldedatum der Ursprungsanmeldung mit der Serien-Nr. 495 231 in den USA wurde entdeckt, dass die Komponenten BBM-1675 A₁ und A₂, die vorgehend beschrieben und gemäß Beispiel 2 hergestellt wurden, tatsächlich nicht vollständig rein waren und dass gewisse Charakterisierungseigenschaften, welche zur Definition dieser Verbindungen verwendet wurden, ungenau waren. Gemäss zusätz-

licher chromatographischer Reinigungsverfahren, wie vollständig beschrieben in den Beispielen 3 und 6 unten, wurden BBM-1675 A₁ und A₂ in reinerer Form isoliert und vollständig charakterisiert, wie nachstehend beschrieben. Ebenfalls wurden die Daten für die Elementaranalyse für die Verbindungen A₃ und A₄ revidiert, wobei die Gegenwart von Schwefel in diesen Verbindungen gezeigt wurde und die HPLC-Retentionszeiten wurden für diese beiden Verbindungen berechnet. Nachstehend sind die revidierten physikalisch-chemischen Eigenschaften der BBM-1675-Komponenten zusammengefasst.

55

BBM-1675 A₁

Beschreibung: weisse bis blassgelbe Kristalle;
F. 156–158 °C (Zers.)

60 Elementaranalyse

Analyse 1	Analyse 2	Mittelwert
C: 51,60%	C: 52,74%	C: 52,17%
H: 6,31%	H: 5,99%	H: 6,15
65 N: 5,31%	N: 3,94%	N: 4,63%
S: 8,47%	S: 9,71%	S: 9,09%
O (durch Differenz): 28,31%	O (durch Differenz): 27,62%	O (durch Differenz): 27,96%

Ultraviolett-Absorptionsspektrum:

Instrument-Varian UV,

Cary 219

Lösungsmittel-Methanol

Konzentration 0,01356 g/l

$\lambda_{\max}$ (nm)	Absorptionskoeffizienten
320	12.4
280	sh (Schulter)
253	25.1
210	25.5

Keine bedeutsame Änderung mit Säure oder Base

Optische Drehung:

Lösungsmittel – CHCl₃ $[\alpha]_D^{24^\circ} = -207^\circ$ (C=0.0351)

Eine zweite Analyse zeigte folgende optische Drehung:

 $[\alpha]_D^{27^\circ} = -191^\circ$ (C=0.5, CHCl₃).

Infrarot-Absorptionsspektrum: Siehe Fig. 9

Haupt-Absorptionsbanden (KBr):

985, 1015, 1070, 1110, 1150, 1210, 1250,
1308, 1380, 1405, 1446, 1520, 1592, 1608,
1668, 1715, 2920, 2960, 3360, 3440, cm⁻¹

Massenspektren:

Instrument – VG-ZAB-2F

FAB-MS-Thioglycerin

Molekularmassenbereich Ionen (m/z): 1249, 1357, 1463;
mit Zugabe von NaCl (m/z): 1271, 1379, 1485, 1597.

FAB-MS-MB (MB: Matrix, M.G. 154); Molekularmassenbereich Ionen (m/z): 1249, 1283, 1403, 1555; mit Zu-

gabe von NaCl (m/z): 1249, 1271, 1303, 1425, 1483, 1577.
FAB-MS-Glycerin-DMSO: Molekularmassenbereich Ionen (m/z): 1215, 1247, 1279, 1293, 1325, 1353; mit Zugabe von NaCl (m/z): 1215, 1237, 1247, 1269, 1325, 1347, 1375.

Instrument: Kratos MS-50

FAB-MS-Thioglycerin; Molekularmassenbereich

Ionen (m/z): 1357, 1463.

Molekulargewicht (auf Basis der oben beschriebenen Mas-

senspektraldaten):

Scheinbares MG = 1248

Magnetische Kernresonanzspektren:

Instrument – WM360 Brucker

Lösungsmittel: CDCl₃

¹H-NMR: 360 MHz δ (ppm): 11.75 (1H, s); 8.55 (1H, s); 7.45 (1H, s); 6.61 (1H, m); 6.23 (1H, brs); 6.17 (1H, brs); 5.93 (1H, d, J=9.3); 5.82 (1H, d, J=9.3); 5.7 (1H, brs); 5.49 (1H, m); 5.45 (1H, d, J=2.3); 5.38 (1H, brs); 4.95 (1H, d, J=10.2); 4.64 (2H, m); 4.54 (1H, d, J=2.3); 4.2 (1H, s); 4.15–3.35 (26–28H) [4.10 (1H, m); 4.02 (1H, brs); 3.95 (3H, s); 3.85 (3H, s); 3.79 (3H, s); 3.46 (1H, m); 3.40 (3H, s)]; 2.82–2.70 (3H, brm); 2.50 (3H, s); 2.47 (1H, m); 2.38–2.22 (5H); 2.12 (1H, m); 2.11 (3H, s); 1.60–1.05 (22H) [1.39 (3H, d, J=6.3); 6.31 (3H, d, J=6.3); 1.29 (3H, d, J=6.3), 1.08 (6H)]

Siehe Fig. 10

¹³C NMR: 90.3 MHz

Siehe Fig. 11

In einem separaten Test wurde das ¹³C NMR-Spektrum von gereinigtem BBM-1675 A₁ bestimmt, für ein Beispiel aufgelöst in CDCl₃ (80 MHz). Die Hauptpeaks sind unten angegeben.

CMR von BBM-1675 A₁ (80 MHz in CDCl₃)

Chemische Verschiebung in ppm (Multiplizität*)

BBM-1675 A ₁	13.7(q)	16.6(q)	17.5(q)	19.8(q)	22.2(q)	22.6(q)
	23.4(q)	29.0(t)	34.0(t)	35.1(t)	39.5(t)	47.2(d)
	52.5(q)	55.6(u)	56.0(q)	57.1(d)	62.4(t)	64.5(d)
	67.7(d)	68.2(d)	68.8(t)	69.2(d)	69.6(t)	70.2(d)
	71.9(d)	76.0(d)	76.6(d)	77.1(u)	77.3(d)	83.4(s)
	86.6(d)	88.4(s)	90.5(t)	97.2(d)	98.3(s)	99.0(d)
	99.6(d)	103.8(d)	107.6(s)	112.5(d)	123.1(d)	124.9(d)
	130.1(d)	131.5(s)	134.9(s)	136.7(s)	144.0(s)	147.2(s)
	153.8(s)	154.4(s)	155.0(s)	160.7(s)	166.4(s)	191.8(s)

* Multiplizität – q = Quartett; d = Dublett; u = ungewiss; t = Triplett; s = Singlett.

BBM-1675 A₂

Beschreibung:

Weisse Kristalle; F.147–149 °C

Elementaranalyse:

C: 52,71%

H: 5,94%

N: 3,94%

S: 9,39%

O (durch Differenz): 28.01 %

Ultraviolett-Absorptionsspektren:

Instrument - Varian UV, Cary 219

Lösungsmittel: Methanol

Konzentration: 0,02052 g/l

$\lambda_{\max}$ (nm)	Absorptionskoeffizienten
320	12.2
282	16.3
252	26.2
214	25.8

Keine bedeutsame Änderung mit Säure oder Base.

Optische Drehung $[\alpha]_D^{27^\circ} = -179.4^\circ$ (c 0.5, CHCl₃)

Infrarot-Spektrum:

Siehe Fig. 12

Instrument: Beckman IR Model 4240

Hauptabsorptionsbanden (KBr): 950, 1015, 1070, 1100, 1155, 1213, 1250, 1313, 1375, 1405, 1450, 1520, 1595, 1610, 1685, 1735, 2940, 2980, 3440, cm⁻¹.

Massenspektren:

Instrument: VG-ZAB-2F

FAB-MA-Thioglycerin

Molekularmassenbereich Ionen (m/z): 968, 1249, 1355, 1357, 1463, 1569; mit Zugabe von NaCl (m/z): 990, 1271, 1379, 1485, 1593 FAB-MS-MB (MB: Matrix, M.G. 154); Molekularmassenbereich Ionen (m/z): 1249, 1403, 1419, 1555, 1571, 1587; mit Zugabe von NaCl (m/z): 1249, 1271, 1425, 1441, 1457, 1483, 1577.

FAB-MS-Glycerin-DMSO; Molekularmassenbereich Ionen (m/z): 1215, 1231, 1247, 1263, 1279, 1293, 1309, 1325, 1326, 1341, 1353, 1369.

Molekulargewicht: (auf Basis der oben beschriebenen Massendaten):

Scheinbares MG = 1248

Magnetische Kernresonanzspektren:

Siehe Fig. 13

Instrument: WM 360 Brucker

Lösungsmittel: CDCl₃

¹H NMR 360 MHz δ(ppm): 11.91 (1H, s); 8.62 (1H, s); 7.58 (1H, s); 6.56 (1H, m); 6.22 (1H, s); 6.15 (1H, brs); 5.91 (1H, d, J=9.6); 5.83 (1H, d, J=9.6); 5.70 (1H, m); 5.45 (1H, d, J=2.2); 5.44 (1H, s); 5.34 (1H, brs); 4.95 (1H, d, J=10.2); 4.75 (1H, m); 4.65 (1H, d, J=6.8); 4.54 (1H, d, J=2.2); 4.47 (1H, m); 4.18 (1H, s); 4.10 (1H, brs),

4.05–3.50 (20–24H); [3.96 (3H, s); 3.87 (3H, s); 3.77 (3H, s)]; 3.46 (1H, m); 3.39 (3H, s); 2.79 (1H, m); 2.73 (2H, m); 2.50 (3H, s); 2.50 (1H, m); 2.38–2.22 (3H); 2.14 (1H, m); 2.10 (3H, s); 1.98 (2H, m); 1.65–1.45 (6–8H); 1.38 (3H, d, J=6.0); 1.34 (3H, d, J=6.0); 1.22 (3H, d, J=6.8); 1.10 (6H).

¹³C NMR 90.3 MHz

Siehe Fig. 14

10 In einem separaten Test wurde das ¹³C NMR-Spektrum von gereinigtem BBM-1675 A₂ bestimmt, für eine Probe aufgelöst in CDCl₃ (80 MHz). Die Hauptpeaks sind nachstehend angegeben.

BBM-1675 A ₂	13.7	16.9	17.5	19.8	22.3	22.7	23.4	33.1
	34.1	35.1	39.3	47.6	52.6	55.7	56.0	56.1
	57.6	62.4	64.5	64.9	65.9	68.3	69.2	69.7
	71.9	73.6	75.8	76.1	77.1	77.7	78.1	78.3
	83.3	86.2	88.4	90.4	97.2	98.3	99.1	99.5
	99.6	103.8	107.1	112.4	123.2	124.8	129.9	137.3
	144.1	154.2	154.5	160.9	167.9	192.2		

Tabelle 7
Physikalisch-chemische Eigenschaften von BBM-1675 A₃, A₄, B₁, B₂

	A ₃	A ₄	B ₁	B ₂
Schmelzpunkt (Zers.)	: 125–127 °C	123–126 °C	159–161 °C	156–159 °C
[α] _D ²⁰ (c 0,5, CHCl ₃)	: –161 °C	–176 °C	–171 °C	–122 °C
Anal. gefunden (%):	C: 54,55 H: 6,46 N: 3,73 S: 7,49	54,65 6,29 3,51 8,07		
UV λ _{max} nm (E ₁ ^{1%} _{1 cm})	: 253(286)	253(257)	253(225)	248(212)
in MeOH	282(158) 320(122)	282(153) 320(117)	282(140) 320(104)	279(141) 318(103)
in 0,01N HCl-MeOH	: 253(287) 282(160) 320(126)	253(258) 282(155) 320(118)	253(225) 282(140) 320(105)	248(210) 279(140) 318(103)
in 0,01N NaOH-MeOH	: 252(280) 283(162) 318(120)	252(266) 283(160) 318(118)	252(236) 283(141) 318(105)	248(233) 278(150) 318(110)

Dünnschicht-Chromatographie (TLC)- und Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)-Daten von BBM-1675-Komponenten

A. Studie Nr. 1 – Zusammenfassung

Tabelle 8 TLC und HPLC von BBM-1675-Komponenten

	TLC (Rf) SiO ₂ CHCl ₃ /MeOH (5:1 v/v)	*Silanisiert CH ₃ CN-H ₂ O (75:25 v/v)	HPLC (Retentions-Zeit in min) Lichrosorb RP-18 CH ₃ CN-MeOH-0,1M CH ₃ COONH ₄ (5:2:3 v/v/v)
BBM-1675A ₁	0,74	0,18	13,3
BBM-1675A ₂	0,71	0,21	17,3
BBM-1675A ₃	0,72	0,28	8,0
BBM-1675A ₄	0,71	0,78	5,1
BBM-1675B ₁	0,63	0,23	–
BBM-1675B ₂	0,60	0,16	–

* C₁₈ Umkehrphasen-Silicagel

B. Studie Nr. 2 – TLC und HPLC für gereinigte A₁- und A₂-Komponenten TLC-Chromatographie

Als Platten wurden «Analtech GHFL-Silicagel-Uniplates» für die Normalphasenchromatographie verwendet. Platten mit den Massen 2,5 cm × 10 cm wurden für die eindimensionale TLC verwendet. Diese wurden in Glaszylindern in den Massen 6,4 cm (äusserer Durchmesser) × 12 cm, die 10 cm Elutionsmittel enthielten, entwickelt. Für die zweidimensionale TLC wurden Platten mit den Massen 7,5 cm × 10 cm verwendet. Die Proben wurden an der unteren linken Ecke 1 cm von der Kante aufgetragen. Die Platten wurden zuerst in einem Tank (12,7 cm Weite, 8,6 cm Tiefe, 13 cm Höhe), der 50 ml des ersten Elutionsmittels enthielt, entwickelt. Die Platten wurden dann luftgetrocknet um 90° im Gegenuhrzeigersinn gedreht und in einem zweiten Tank mit 50 ml des zweiten Elutionsmittels entwickelt.

Für die Umkehrphasenchromatographie wurden die analytischen vorbeschichteten C₁₈-Silicagelplatten von «Whatman» verwendet. Die Platten mit den Massen 2,5 cm × 7,6 cm wurden in Glaszylindern mit 10 ml Elutionsmittel entwickelt.

Die Normalphasenplatten wurden unter Ultraviolettlicht mit 254 nm Wellenlänge betrachtet. Die Platten wurden dann in einen Glaszylinder gebracht (6,4 cm äusserer Durchmesser × 12 cm), welcher I₂-Kristalle enthielt. Nach ungefähr 2 min wurden die Platten dann wieder geprüft. Die Umkehrphasenplatten wurden nur mit UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm betrachtet. Die Zonen wurden ermittelt, indem auf Löschung der Fluoreszenz eines imprägnierten Farbstoffes untersucht wurde.

Analytische HPLC

Die folgenden Komponenten wurden verwendet, um ein analytisches HPLC-System aufzubauen: «Waters Associates» Modell 6000A Lösungsmittelfördersystempumpe; «Varian Varichrom» Modell VUV-10 uv/vis-Detektor für 254 nm 0,1 OD; «Fisher Recordal» Serie 5000 Schreiber; «Waters Associates» Modell 660 Lösungsmittelprogramm; «Waters Associates» Modell U6K Injektor; «Alltech, µ-Bondapak C₁₈ (10µ)»-Säule (4,6 mm innerer Durchmesser × 25 cm) mit einer «Whatmann Co. Pell ODS» (0,03–0,038 mm) Schutzsäule (4,6 mm innerer Durchmesser × 5 cm). Die Komponenten wurden mit rostfreien Stahlröhrchen 316 (1,6 mm äusserer Durchmesser - 0,23 mm innerer Durchmesser) verbunden. Für sämtliche Analysen wurde das Elutionsmittel mit 2 ml/min gefördert.

Präparative HPLC

Die folgenden Komponenten wurden verwendet, um ein Mitteldruckflüssigchromatographiesystem aufzubauen: «Fluid Metering, Inc.» Modell RP-SY 2CSC FMI Laborpumpe; «Fluid Metering, Inc.» Modell PD-60LF FMI Pulsbefeuchter; eine 15 ml Probenschleife, hergestellt aus Polypropylen-Schlauch (3,0 mm äusserer Durchmesser × 1,5 mm innerer Durchmesser) durch Umwickeln um ein Kartonrohr (8,65 cm äusserer Durchmesser); «Glenco» Serie 3500 Universal-LC-Säulen; «Instrument Specialties Co.» Modell UA-5 Absorptions/Fluoreszenz-Monitor mit optischer Einheit des Typs 6; «Instrumentation Specialties Co.» Modell 590 Durchlaufunterbrechungsventil; und ein «Instrumentation Specialties Co.» Modell 328 Fraktionensammler. Die Komponenten wurden mit Polypropylen und Teflonschlauch (3,0 mm äusserer Durchmesser × 1,5 innerer Durchmesser) und «Glenco Multifit» Verbindungsstücken und Ventilen in der Ordnung wie angeführt verbunden.

Die «Glenco» Serie 3500 Universal-LC-Säulen wurden gepackt durch Aufschlammern des definierten Adsorbens im

bezeichneten Lösungsmittel, unter Verwendung von Standardtechniken. Der Leerraum zwischen dem gesetzten Bett und dem Rohrende wurde mit Standard-Ottawa Sand aufgefüllt. Das Elutionsmittel wurde maximal so gefördert, dass ein Druck von 4,14 bar nicht überschritten wurde (ungefähr 20 ml/min).

Gradientenelution

Ein «Glenco» Gradientenelutionsapparat, der aus zwei Kammern mit gleichem Durchmesser, Höhe und Volumen besteht, in Tandemanordnung mit einem Teflonventil verbunden, wurde für sämtliche Gradientenelutionen verwendet. Eine Kammer diente als Mischkammer und die andere als statisches Reservoir. Weniger polare Lösungsmittel wurden ursprünglich in die Mischkammer gegeben. Das polare Lösungsmittel wurde in die statische Kammer gegeben. In beide Kammern wurden Teflon beschichtete magnetische Rührstäbe (1,0 × 3,7 cm) gegeben und mit einem Magnetrührer «Thomas» Modell 15 Magne-Matic angetrieben. Das Elutionsmittel wurde von der Mischkammer in Mitteldruck-HPLC-System über Polypropylenschlauch (1,5 mm innerer Durchmesser × 3,0 mm äusserer Durchmesser) gefördert. Wenn das Elutionsmittel aus der Mischkammer entfernt wurde, wurde dem Elutionsmittel aus dem statischen Reservoir ermöglicht, es zu ersetzen, womit ein linearer Elutionsgradient erzeugt wurde.

TLC-Analyse von BBM-1675 A₁ und A₂

Auf der untenstehenden Tabelle 9 sind die beobachteten Rf-Werte für BBM-1675 A₁ und A₂ auf Normalphasenplatten angeführt. Der Rf-Wert wird berechnet, indem die gemessene Distanz vom Zentrum der Zone zum Punkt des Probenauftrages durch die gemessene Distanz der Lösungsmittelfront zum Punkt des Probenauftrages dividiert wird.

Tabelle 9

System/Verbindung	Rf BBM-1675 A ₁	BBM-1675 A ₂
4% Methanol in Chloroform	0,33	0,30
5% Methanol in Diethylether	0,39	–
50% Aceton in Skellysolve B	0,38	0,31

In der nachstehenden Tabelle 10 werden die beobachteten Rf-Werte von BBM-1675 A₁ und A₂ auf Normalphasenplatten, entwickelt in zwei Dimensionen, zusammengefasst. Die Position der Flecken wird ausgedrückt in kartesischen Koordinaten. Die X-Koordinate ist der Rf-Wert des zweiten angeführten Lösungsmittelsystems. Die Y-Koordinate ist der Rf-Wert des ersten angeführten Lösungsmittelsystems.

Tabelle 10

System/Verbindung	Rf BBM-1675 A ₁	BBM-1675 A ₂
4% Methanol in Chloroform gegen		
5% Methanol in Diethylether	(0,34, 0,33)	(0,28, 0,23)
4% Methanol in Chloroform gegen		
50% Aceton in Skellysolve B	(0,33, 0,29)	–

In der untenstehenden Tabelle 11 sind die beobachteten Rf-Werte für BBM-1675 A₁ und A₂ auf C-18-Umkehrpha-

sen-TLC-Platten, entwickelt in binären Elutionsmitteln, angeführt.

Tabelle 11

System/Verbindung	Rf	
	BBM-1675 A ₁	BBM-1675 A ₂
25% 0,5 M NaCl in Acetonitril	0,18	0,21
25% Wasser in Acetonitril	0,00	0,00

In der nachstehenden Tabelle 12 werden die beobachteten Rf-Werte von BBM-1675 A₁ und A₂ auf C-18-Umkehr-

phasen-TLC-Platten, entwickelt mit ternären Elutionsmitteln, zusammengefasst.

Tabelle 12

System/Verbindung				Rf	
				BBM-1675A ₁	BBM-1675A ₂
Acetonitril	:	Methanol	:	0.5M NaCl	
80%	:	10%	:	10%	1.00
60%	:	10%	:	30%	0.57
40%	:	30%	:	30%	0.32
30%	:	50%	:	20%	0.44
50%	:	30%	:	20%	0.62
40%	:	40%	:	20%	0.60
50%	:	20%	:	20%	0.42
60%	:	20%	:	20%	0.74
Acetonitril	:	Methanol	:	Wasser	
40%	:	30%	:	30%	0.00
Acetonitril	:	Methanol	:	0.1M NH ₄ OAc	
40%	:	30%	:	30%	0.32
Acetonitril	:	Methanol	:	0.1M NaH ₂ PO ₄	
40%	:	30%	:	30%	0.00

HPLC-Analyse von BBM-1675 A₁ und A₂

BBM-1675 A₁ und BBM-1675 A₂ wurden getestet unter Verwendung eines einfachen, eines binären und eines ternären Elutionsmittels auf C-18-Umkehrphasen-Silicagelsäulen. Die beobachteten K'-Werte für diese Verbindungen sind in den untenstehenden Tabellen 13, 14 und 15 zusammenge-

40

fasst. Der K'-Wert wurde unter Verwendung der folgenden Formel berechnet:

$$K' = \frac{TR - T_0}{T_0}$$

45

worin TR die Retentionszeit, gemessen aus der Zeit der Injektion zur Peakspitze und T₀ die Zeit des Leervolumens ist.

Tabelle 13

System/Verbindung	K'	
	BBM-1675 A ₁	BBM-1675 A ₂
Acetonitril	a	a
Tetrahydrofuran	a	a
Methanol	0,00	0,00

a = Verbindung wurde nicht aus der Säule eluiert.

Tabelle 14

System/Verbindung	K'	
	BBM-1675 A ₁	BBM-1675 A ₂
25% Wasser in Acetonitril	a	a
25% Methanol in Wasser	1,25	1,25

a = Verbindung wurde nicht aus der Säule eluiert.

Tabelle 15
Ternäre Elutionsmittel

System/Verbindung			K' BBM-1675A ₁	BBM-1675A ₂
Acetonitril : 40%	Methanol : 30%	Wasser : 30%	a	a
Acetonitril : 40%	Methanol : 30%	0.1M NH ₄ OAc : 30%	1.7	3.0
50%	20%	30%	3.8	6.5
43.3%	23.3%	33.3%	6.1	b
42.5%	22.5%	35.0%	7.8	b
41.5%	21.5%	37.0%	9.7	b

a = wurde nicht eluiert b = nicht bestimmt

Biologische Eigenschaften der BBM-1675-Komponenten
Die antimikrobiische Aktivität der BBM-1675-Komponenten wurde für eine Vielzahl von Bakterien (gram-positive, gram-negative und säurefeste) und Fungi durch die serielle Zweifachagarverdünnungsmethode bestimmt. Das Agarnährmedium wurde für gram-positive und gram-negative Bakterien verwendet und das Medium Nr. 1001 (3% Glycerin, 0,3% Natrium-L-Glutamat, 0,2% Pepton, 0,31%

Na₂HPO₄, 0,1% KH₂PO₄, 0,005% Ammoniumcitrat, 0,001% MgSO₄ und 1,5% Agar) wurde für säurefeste Organismen verwendet. Sabouraud-Agarmedium wurde für Fungi verwendet. Wie in der Tabelle 16 dargestellt, zeigte jede der BBM-1675-Komponenten (A₁, A₂, A₃, A₄, B₁ und B₂) ein breites Spektrum von antimikrobiischer Aktivität. BBM-1675 A₁, A₂, A₃ und A₄ wiesen eine besonders hohe Aktivität gegen gram-positive Bakterien auf.

Tabelle 16
Antimikrobiische Aktivität von BBM-1675-Komponenten

Stamm	MIC in µg/ml BBM-1675 A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	B ₁	B ₂
S. aureus 209 P	<0,0008	0,0063	0,0063	0,0125	0,012	0,0063
S. aureus Smith	<0,0008	0,0031	0,0063	0,0125	0,012	0,012
B. subtilis PCI 129	<0,0008	0,05	0,0125	0,0125	0,05	0,05
M. luteus 1001	0,0016	0,0063	0,0125	0,0125	0,1	0,1
M. flavus	<0,0008	0,0016	0,0063	0,0125	0,025	0,025
Mycobacterium 607	0,05	0,1	NT	NT	0,05	0,025
E. coli NIHJ	0,1	0,8	1,6	3,1	0,8	3,1
K. pneumoniae D11	0,4	0,8	1,6	3,1	0,8	0,8
P. aeruginosa D15	0,8	1,6	1,6	3,1	3,1	3,1
C. albicans IAM 4888	0,4	0,4	1,6	6,3	3,1	1,6
C. neoformans	1,6	3,1	1,6	6,3	6,3	12,5

Ein zweiter antimikrobiischer Test wurde durchgeführt mit gereinigtem A₁ und A₂ (hergestellt gemäss dem untenste-

henden Beispiel 3) und mit den Komponenten A₃ und A₄. Die Daten sind nachstehend zusammengefasst.

MIC durch ADT (µg/ml)

Stamm	BBM-1675 A ₁	A ₂	A ₃	A ₄
S. aureus 209 P	<0,0008	0,0063	0,0063	0,012
S. aureus Smith	<0,0008	0,0031	0,0063	0,012
B. subtilis PCI 219	<0,0008	0,05	0,012	0,025
M. luteus 1001	0,0016	0,0063	0,012	0,05
M. flavus	<0,0008	0,0016	0,0063	0,012
Mycobacterium 607	0,05	0,1	0,16	0,16
E. coli NIHJ	0,1	0,8	1,6	3,1
K. pneumoniae D11	0,4	0,8	1,6	3,1
P. aeruginosa D15	0,8	1,6	3,1	3,1
B. fragilis A20928	0,2	1,6	0,2	0,4
C. difficile A21675	0,4	0,8	0,05	0,4
C. perfringens A9635	0,05	0,8	0,4	0,4
C. albicans IAM 4888	0,4	0,4	1,6	6,3
C. neoformans	1,6	3,1	1,6	6,3

Die Aktivität der Prophag-Induktion im lysogenen Bakterium *E.coli* W1709 (λ) wurde für die BBM-1675-Komponenten bestimmt gemäss der Methode von Lein et al in «Nature» 196: 783–784 (1962). Die Plaque-Zahl wurde auf Agarplatten durchgeführt, die das Testmaterial (T) und die Kontrollplatte (C) umfassten. Ein T/C-Verhältnis auf die Plaque-Zahl von mehr als 3,0 wurde als bedeutungsvoll be-

trachtet und die lysogene Induktionsaktivität (ILB-Aktivität) wurde als minimale induzierbare Konzentration der Testverbindung ausgedrückt. Wie in Tabelle 17 dargestellt, zeigten die Komponenten BBM-1675 starke ILB-Aktivität in lysogenen Bakterien, was darauf hinweist, dass sie eine Antitumoraktivität aufweisen können.

Tabelle 17
Lysogene Induktions-Aktivität von
BBM-1675-Komponenten

Antibiotikum	MIC*(μ g/ml)
BBM-1675 A ₁	0,0063
BBM-1675 A ₂	0,0125
BBM-1675 A ₃	0,05
BBM-1675 A ₄	0,10
BBM-1675 B ₁	0,10
BBM-1675 B ₂	0,20

* minimale induzierbare Konzentration

Die Antitumoraktivität von BBM-1675 A₁ und A₂ wurde in verschiedenen Mäusetumorsystemen bestimmt. Die lymphocytische Leukämie P-388, die lymphoide Leukämie L-1210, die melanotischen Melanome B16 und die Lewis-Lunkencarcinome wurden intraperitoneal in männliche BDF₁-Mäuse implantiert, mit einer Grösse des Inokulums von 10⁶, 10⁵, 5 × 10⁵ bzw. 10⁶-Zellen pro Maus. 24 h nach der Tumorinokulation wurden graduierte Dosierungen von Testverbindungen den Mäusen intraperitoneal verabreicht. Die Behandlungen wurden vorgenommen einmal am ersten Tag nur, am Tag 1, 4 und 7 (q3d × 3), einmal täglich während 9 Tagen (qd 1 → 9) oder 11 Tagen (qd 1 → 11). Die Komponenten A₃ und A₄ wurden nur gegen P-388-Leukämie nach dem q3d × 3 – Muster getestet, wegen Knappheit an Material.

BBM-1675 A₁, A₂, A₃ und A₄ wurden in 0,9% Salzlösung, die 10% Dimethylsulfoxid enthielt, aufgelöst, und Chromomycin A₃ (Toyomycin, Takeda) die als Referenzverbindung eingesetzt wurde, wurde in 0,9% Salzlösung aufgelöst. Tod oder Überleben der behandelten und nicht-behandelten Mäuse wurde täglich registriert und die mittlere Überlebenszeit (MST) wurde für jede der Test (T)- und Kontroll (C)-Gruppen berechnet. Ein T/C-Wert, der gleich oder grösser als 125% war, dass ein bedeutungsvoller Antitumoreffekt erreicht wurde. Die Resultate sind in den Tabellen 18–23 dargestellt. BBM-1675 A₁ und A₂ zeigten eine ausgeprägt

25 wirkungsvolle Antitumoraktivität gegen P-388-Leukämie mit einem maximalen T/C-Wert von 160%. Sie sind ungefähr 100–3000 mal stärker aktiv als Chromomycin A₃ bezüglich der minimalen effektiven Dosis. BBM-1675 A₃ und A₄ jedoch waren weniger aktiv als die Komponente A₁ oder A₂ gegen P-388-Leukämie (Tabelle 19). BBM-1675 A₁ und A₂ waren ebenfalls aktiv gegen L-1210-Leukämie (Tabelle 21), B16-Melanom (Tabelle 22) und Lewis-Lungencarcinom (Tabelle 23). Die Toxizität von BBM-1675 A₁ und A₂ wurde bei männlichen ddY-Mäusen durch intraperitoneale oder intravenöse Verabreichung bestimmt; BBM-1675 A₁ war etwa 10 mal stärker toxisch als BBM-1675 A₂ (Tabelle 24). Die therapeutischen Indizes von BBM-1675 A₁ bzw. A₂ waren 4–8 bzw. 8–20 mal besser als diejenigen von Chromomycin A₃ im P-388-Leukämie-System (Tabelle 25). Zweite Experimente wurden durchgeführt durch intravenöse Verabreichung von BBM-1675-Komponenten gegen P-388- und L-1210-Leukämien, welche intravenös in einer Menge von 5 × 10⁵ bzw. 10⁴-Zellen pro Maus inokuliert wurden. In diesen Experimenten wurde als Referenzmittel Adriamycin verwendet, welches in 0,9% Salzlösung aufgelöst wurde und am Tag 1, 4 und 7 verabreicht wurde. Die Resultate sind in den Tabellen 26 und 27 dargestellt. Beide Komponenten A₁ und A₂ waren dem Adriamycin bezüglich des maximalen T/C-Wertes, der minimalen, wirksamen Dosis und dem Aktivitätsbereich überlegen.

55

60

65

Tabelle 18.
Wirkung von BBM-1675-Komponenten auf P-388 Leukämie
(Behandlung am Tag 1)

	Dosis, ip (mg/kg/d*)	MST (d)	T/C (%)	Mittlere Gewichts- änderung am d 5(g)	Überlebende am d 5	d 45
BBM-1675 A ₁	0,03	19,0	(152)	−2,6	5/5	0/5
	0,01	19,0	(152)	−1,0	5/5	0/5
	0,003	18,0	(144)	−1,0	5/5	0/5
	0,001	20,0	(160)	−1,4	5/5	0/5
	0,0003	16,0	(128)	0,0	5/5	0/5
BBM-1675 A ₂	0,0001	15,0	120	−0,2	5/5	0/5
	0,00003	14,0	112	−0,2	5/5	0/5
	0,3	6,0	48	−3,8	3/5	0/5
	0,1	20,0	(160)	−1,8	5/5	0/5
	0,03	18,0	(144)	−1,4	5/5	0/5
	0,01	17,0	(136)	−0,6	5/5	0/5
	0,003	17,0	(136)	−0,4	5/5	0/5
	0,001	16,0	(128)	0,0	5/5	0/5
	0,0003	15,0	120	0,0	5/5	0/5
	0,0001	14,0	112	0,0	5/5	0/5
Chromomycin A ₃	1	19,0	(152)	−0,2	4/5	0/5
	0,3	17,0	(136)	+0,6	5/5	0/5
	0,1	16,0	(128)	+0,8	5/5	0/5
	0,03	14,0	112	0,0	5/5	0/5
	0,01	14,0	112	−0,2	5/5	0/5

Träger — 12,5 — +0,1 10/10 0/10
 * Tag 1, i.p.
 Der Kreis gibt eine bedeutende Antitumor-Aktivität an.

Tabelle 19
Wirkung von BBM-1675-Komponenten auf P-388 Leukämie
(Behandlung am Tag 1, 4 und 7)

	Dosis, ip (mg/kg/d*)	MST (d)	T/C (%)	Mittlere Gewichts- änderung am d 5(g)	Überlebende am d 5	d 45
BBM-1675 A ₁	0,03	7,0	56	−2,8	5/5	0/5
	0,01	19,0	(152)	−1,0	5/5	0/5
	0,003	19,0	(152)	−0,6	5/5	0/5
	0,001	16,0	(128)	−0,6	5/5	0/5
	0,0003	17,0	(136)	−0,4	5/5	0/5
	0,0001	16,0	(128)	−0,2	5/5	0/5
BBM-1675 A ₂	0,00003	14,0	112	+0,4	5/5	0/5
	0,3	tox.	—	—	2/5	0/5
	0,1	11,0	88	−1,0	5/5	0/5
	0,03	18,0	(144)	−1,2	5/5	0/5
	0,01	18,0	(144)	−0,4	5/5	0/5
	0,003	18,0	(144)	−0,4	5/5	0/5
	0,001	17,0	(136)	−0,4	5/5	0/5
	0,0003	16,0	(128)	−0,4	5/5	0/5
	0,0001	16,0	(128)	−0,2	5/5	0/5
	0,00003	15,0	120	−0,4	5/5	0/5
BBM-1675 A ₃	0,01	17,5	(140)	+0,2	4/4	0/4
	0,001	15,0	120	+0,6	4/4	0/4
	0,0001	13,5	108	+0,6	4/4	0/4
BBM-1675 A ₄	0,01	16,5	(132)	+0,2	4/4	0/4
	0,001	14,0	112	+0,4	4/4	0/4
	0,0001	12,5	100	+0,6	4/4	0/4
Chromomycin A ₃	0,3	18,0	(144)	+0,6	5/5	1/5
	0,1	18,0	(144)	+0,6	5/5	0/5
	0,03	17,0	(136)	−0,2	5/5	0/5
Träger	0,01	14,0	112	0,0	5/5	0/5
	—	12,5	—	+0,4	10/10	0/10

* Tage 1, 4 und 7, i.p.

Die Kreise zeigen eine bedeutende Antitumor-Aktivität an.

Tabelle 20
Wirkung von BBM-1675-Komponenten auf P-388 Leukämie
(gd 1→9 Behandlung)

	Dosis, ip (mg/kg/d*)	MST (d)	T/C (%)	Mittlere Gewichts- änderung am d 5(g)	Überlebende am d 5	d 45
BBM-1675 A ₁	0,01	7,0	56	−1,8	5/5	0/5
	0,003	13,0	104	−1,0	5/5	0/5
	0,001	19,0	152	−1,2	5/5	0/5
	0,0003	19,0	152	−0,8	5/5	0/5
	0,0001	18,0	144	0,0	5/5	0/5
	0,00003	16,0	128	+0,2	5/5	0/5
	0,00001	16,0	128	−0,2	5/5	0/5
BBM-1675 A ₂	0,1	6,0	48	−2,2	4/5	0/5
	0,03	13,0	104	−1,4	5/5	0/5
	0,01	18,0	144	−1,0	5/5	0/5
	0,003	18,0	144	−0,6	5/5	0/5
	0,001	18,0	144	−0,8	5/5	0/5
	0,0003	17,0	136	−0,4	5/5	0/5
	0,0001	16,0	128	−0,4	5/5	0/5
Chromomycin A ₃	0,00003	15,0	120	−0,6	5/5	0/5
	0,00001	15,0	120	+0,4	5/5	0/5
	0,3	9,0	72	−2,0	5/5	0/5
	0,1	18,0	144	+0,4	5/5	0/5
	0,03	18,0	144	0,0	5/5	0/5
	0,01	15,0	120	−0,2	5/5	0/5
	0,003	13,0	104	−0,2	5/5	0/5
Träger	—	12,5	—	+0,4	10/10	0/10

* qd 1→9, i.p.

Der Kreis zeigt eine bedeutende Antitumor-Aktivität an.

Tabelle 21
Wirkung von BBM-1675-Komponenten auf L-1210 Leukämie

	Dosis, ip (mg/kg/d*)	MST (d)	T/C (%)	Mittlere Gewichts- änderung am d 5(g)	Überlebende am d 5	d 45
BBM-1675 A ₁	0,003	14,5	(153)	− 1,7	6/6	0/6
	0,001	12,0	(126)	− 0,5	6/6	1/6
	0,0003	12,0	(126)	+ 0,3	6/6	0/6
BBM-1675 A ₂	0,0001	11,0	116	+ 1,0	6/6	0/6
	0,03	10,5	111	− 1,5	6/6	0/6
	0,01	13,5	(142)	− 1,2	6/6	0/6
Chromomycin A ₃	0,003	13,0	(137)	− 0,2	6/6	0/6
	0,001	11,0	116	+ 1,3	6/6	0/6
	0,0003	10,5	111	+ 1,0	6/6	0/6
	0,3	8,5	89	− 1,2	6/6	0/6
	0,1	11,5	121	+ 1,2	6/6	0/6
	0,03	11,0	116	+ 1,2	6/6	0/6
	0,01	11,0	116	+ 1,3	6/6	0/6
	0,01	11,0	116	+ 1,3	6/6	0/6
	0,003	10,0	105	+ 1,5	6/6	0/6
	Träger	9,5	—	+ 1,4	12/12	0/12

* qd 1→9, i.p.

Der Kreis zeigt eine bedeutende Antitumor-Aktivität an.

Tabelle 22
Wirkung von BBM-1675-Komponenten auf B16-Melanom

	Dosis, ip (mg/kg/d*)	MST (d)	T/C (%)	Mittlere Gewichts- änderung am d 5(g)	Überlebende am d 5	d 45
BBM-1675 A ₁	0,003	10,0	61	− 0,7	6/6	0/6
	0,001	31,5	(191)	0,0	6/6	0/6
	0,0003	40,5	(245)	+ 0,3	6/6	0/6
	0,0001	27,0	(164)	+ 0,8	6/6	0/6
	0,00003	22,0	(133)	+ 1,8	6/6	0/6
	0,00001	18,0	109	+ 2,2	6/6	0/6
BBM-1675 A ₂	0,03	11,0	67	− 0,8	6/6	0/6
	0,01	26,5	(161)	+ 0,3	6/6	0/6

Tabelle 22 (Fortsetzung)
Wirkung von BBM-1675-Komponenten auf B16-Melanom

	Dosis, ip (mg/kg/d*)	MST (d)	T/C (%)	Mittlere Gewichts- änderung am d 5(g)	Überlebende am d 5	d 45
BBM-1675 A ₂	0,003	29,5	(179)	+0,2	6/6	0/6
	0,001	26,0	(158)	+0,8	6/6	0/6
	0,0003	22,0	(133)	+0,2	6/6	0/6
	0,0001	18,0	109	+0,2	6/6	0/6
	0,00003	17,0	103	+1,7	6/6	0/6
Chromomycin A ₃	0,1	25,5	(155)	+2,3	6/6	0/6
	0,03	23,0	(139)	+2,2	6/6	0/6
	0,01	21,0	(127)	+2,3	6/6	0/6
Träger	0,003	18,0	109	+2,2	6/6	0/6
	—	16,5	—	+2,1	12/12	0/12

* qd 1→9, i.p.

Der Kreis zeigt eine bedeutende Antitumor-Aktivität an.

Tabelle 23
Wirkung von BBM-1675-Komponenten auf Lungen-Carcinom

	Dosis, ip (mg/kg/d*)	MST (d)	T/C (%)	Mittlere Gewichts- änderung am d 5(g)	Überlebende am d 5	d 45
BBM-1675 A ₁	0,003	10,0	91	−1,7	5/6	0/6
	0,001	31,5	(286)	−0,7	6/6	1/6
	0,0003	21,5	(195)	−0,7	6/6	0/6
	0,0001	21,0	(191)	+1,0	6/6	0/6
	0,00003	13,0	118	+1,0	6/6	0/6
BBM-1675 A ₂	0,00001	11,5	105	+1,0	6/6	0/6
	0,03	10,0	91	−1,8	6/6	0/6
	0,01	25,5	(232)	−1,7	6/6	0/6
	0,003	28,5	(259)	0,0	6/6	1/6
	0,001	17,0	(155)	−0,3	6/6	0/6
	0,0003	15,0	(136)	+1,2	6/6	0/6
	0,0001	10,5	95	+0,5	6/6	0/6
	0,00003	11,0	100	+0,8	6/6	0/6

Tabelle 23 (Fortsetzung)
Wirkung von BBM-1675-Komponenten auf Lungen-Carcinom

	Dosis, ip (mg/kg/d*)	MST (d)	T/C (%)	Mittlere Gewichts- änderung am d 5(g)	Überlebende am d 5	d 45
Chromomycin A ₃	0,1	21,5	195	+ 1,2	6/6	1/6
	0,03	17,0	155	+ 1,7	5/5	0/5
	0,01	17,0	155	+ 1,5	6/6	0/6
	0,003	11,5	105	+ 1,7	6/6	0/6
Träger	—	11,0	—	+ 0,8	12/12	1/12

* qd 1→11, i.p.

Der Kreis zeigt eine bedeutende Antitumor-Aktivität an.

Tabelle 24
Toxizität von BBM-1675-Komponenten

LD ₅₀ (mg/kg/d)	einfache Dosis		mehrfache Dosis i.p.
	i.p.	i.v.	
BBM-1675 A ₁	0,019	0,010	0,00046
BBM-1675 A ₂	0,18	0,10	0,0072
Chromomycin A ₃	0,81	0,41	0,23

Tabelle 25
Therapeutische Indizes

LD ₅₀ /MED*	P-388				
	einfache	qd 1→9	L1210	B16	LL
BBM-1675 A ₁	63	> 46	2	15	5
BBM-1675 A ₂	180	72	2	24	24
Chromomycin A ₃	8	8	inaktiv	23	23

* minimale effektive Dosis

Tabelle 26
Wirkung von BBM-1675-Komponenten auf intravenös implantierte P-388 Leukämie

	Dosis, ip (mg/kg/d*)	MST (d)	T/C (%)	Mittlere Gewichts- änderung am d 5(g)	Überlebende am d 5	d 45
BBM-1675 A ₁	0,01	9,5	106	− 1,7	6/6	0/6
	0,003	14,0	156	− 0,3	6/6	0/6
	0,001	11,5	128	+ 0,3	6/6	0/6
BBM-1675 A ₂	0,0003	9,0	100	+ 0,3	6/6	0/6
	0,1	7,0	78	− 3,7	6/6	0/6
	0,03	15,0	167	− 1,0	6/6	0/6
	0,01	12,0	133	− 0,5	6/6	0/6
	0,003	9,0	100	+ 1,0	6/6	0/6

Tabelle 26 (Fortsetzung)
Wirkung von BBM-1675-Komponenten auf intravenös implantierte P-388 Leukämie

	Dosis, ip (mg/kg/d*)	MST (d)	T/C (%)	Mittlere Gewichts- änderung am d 5(g)	Überlebende am d 5	d 45
Adriamycin	30	tox.	—	—	0/6	0/6
	10	9,0	100	-1,5	6/6	0/6
	3	12,0	(133)	+0,7	6/6	0/6
Träger	1	9,0	100	+1,7	6/6	0/6
	—	9,0	—	+1,7	12/12	0/12

* Tage 1, 4 und 7 i.v.

Der Kreis zeigt eine bedeutende Antitumor-Aktivität an.

Tabelle 27
Wirkung von BBM-1675-Komponenten auf intravenös implantierte L-1210 Leukämie

	Dosis, ip (mg/kg/d*)	MST (d)	T/C (%)	Mittlere Gewichts- änderung am d 5(g)	Überlebende am d 5	d 45
BBM-1675 A ₁	0,008	9,5	119	-2,0	4/6	0/6
	0,004	14,0	(175)	-0,2	6/6	0/6
	0,002	13,0	(163)	+0,2	6/6	0/6
	0,001	9,5	119	+0,8	6/6	0/6
	0,0005	9,0	113	+0,8	6/6	0/6
BBM-1675 A ₂	0,063	11,0	(138)	-1,8	6/6	0/6
	0,032	14,0	(175)	+0,2	6/6	0/6
	0,016	10,5	(131)	+0,8	6/6	0/6
	0,008	8,0	100	+1,2	6/6	0/6
	0,004	8,0	100	+0,8	6/6	0/6
Adriamycin	16	tox.	—	—	2/6	0/6
	8	12,0	(150)	+0,2	6/6	0/6
	4	9,0	113	+1,5	6/6	0/6
Träger	2	8,0	100	+1,7	6/6	0/6
	—	8,0	—	+1,4	12/12	0/12

* Tage 1, 4 und 7, i.v.

Der Kreis gibt eine bedeutende Antitumor-Aktivität an.

Die Antitumoraktivität der Komponenten BBM-1675 A₁ und A₂ wurde ebenfalls durch einen zweiten Test gegen P-388-Leukämie, L-1210-Leukämie und B16 Melanom in Mäusen bestimmt. Die Resultate dieser Tests sind in den untenstehenden Tabellen 28, 29 und 30 dargestellt. Einzelheiten der in diesen Tests verwendeten Methoden sind in «Cancer Chemother. Rep.», 3: 1—87 (Abs. 3), 1972 beschrieben worden.

Tabelle 28
Wirkung von BBM-1675 A₁ und A₂ auf P-388-Leukämie

Material	Behandlungsplan	Dosis, IP µg/kg/d	MST Tage	Wirkung MST, %T/C	AWC, gm d 5	Überlebende am d 5 (30)
*NSC 38270	qd1→9	400	13,0	163	-0,6	6/6
		200	11,0	138	-0,9	6/6
BBM-1675A ₁	d.1	51,2	20,0	250	-2,1	4/6
DMSO-Kochsalzlösung		25,6	18,0	225	-1,8	6/6
		12,8	16,5	206	-1,1	6/6
		6,4	13,0	163	+0,1	6/6
		3,2	12,0	150	-0,3	6/6
		1,6	11,0	138	-0,3	6/6
		0,8	10,5	131	0	6/6
		0,4	10,0	125	+0,4	6/6
		0,2	10,0	125	+0,3	6/6
		0,1	10,0	125	0	6/6
	d.1, 5 + 9	25,6	8,0	100	-1,8	6/6
		12,8	13,5	169	-1,5	6/6
		6,4	16,5	206	-0,8	6/6
		3,2	16,0	200	-0,8	6/6
		1,6	15,5	194	+0,3	6/6
		0,8	12,5	156	+0,3	6/6
		0,4	12,0	150	-0,1	6/6
		0,2	11,5	144	+0,2	6/6
	qd1→9	0,1	12,0	150	+0,8	6/6
		0,05	10,0	125	+0,8	6/6
		12,8	TOX	TOX	TOX	1/6
		6,4	6,0	75	-1,5	4/6
		3,2	13,0	163	-1,2	6/6
		1,6	14,5	181	-1,6	6/6
		0,8	16,5	206	-2,3	6/6
		0,4	16,0	200	-0,9	6/6
BBM-1675A ₂ DMSO→Kochsalzlösung		0,2	15,0	188	-0,8	5/5
		0,1	13,0	163	-0,4	6/6
		0,05	12,0	150	+0,1	6/6
		0,025	12,0	150	-0,7	6/6
	d.1	256	TOX	TOX	TOX	0/6
		128	12,5	156	-3,5	4/6
		64	27,0	338	-1,9	6/6
		32	26,0	325	-2,0	6/6
		16	16,0	200	-1,8	6/6
		8	15,5	194	-1,9	6/6
		4	15,0	188	-0,7	6/6
		2	12,0	150	-0,5	6/6
		1	12,0	150	0	6/6
		0,5	10,0	125	+0,2	6/6
	d.1, 5 + 9	128	TOX	TOX	TOX	0/6
		64	TOX	TOX	TOX	0/6
		32	TOX	TOX	-1,3	2/6
		16	24,5	306	-1,3	5/5
		8	17,5	219	-1,1	6/6
		4	15,0	188	0	6/6
		2	15,0	188	+0,1	6/6
		1	12,5	156	-0,4	6/6
		0,5	12,0	150	-0,4	6/6
BBM-1675A ₂ DMSO-Kochsalzlösung	qd1→9	0,25	11,0	138	-0,4	6/6
		64	TOX	TOX	TOX	1/6
		32	6,0	75	-2,9	4/6
		16	8,0	100	-1,9	6/6
		8	15,5	194	-1,3	6/6
		4	17,0	213	-1,8	6/6
		2	15,0	188	-1,1	6/6

Tabelle 28 (Fortsetzung)
Wirkung von BBM-1675 A₁ und A₂ auf P-388-Leukämie

Material	Behandlungsplan	Dosis, IP µg/kg/d	MST Tage	Wirkung MST, %T/C	AWC, gm d 5	Überlebende am d 5 (30)
BBM-1675A ₂	qd1→9	1	14,0	175	-0,5	6/6
DMSO-Kochsalzlösung		0,5	14,0	175	-0,6	6/6
		0,25	12,0	150	-0,1	6/6
		0,125	12,0	150	+0,1	6/6
Kontrolle		Kochsalz- lösung	8,0	—	+0,5	10/10

Tumordinokulum : 10⁶-Asciteszellen i.p. implantiert
Wirt : CDF₁ ♀ Mäuse
TOX : < 4/6 lebende Mäuse am Tag 5
Auswertung : MST = mittlere Überlebenszeit
Wirkung : % T/C = (MST behandelt / MST-Kontrolle) × 100
Kriterium : % T/C ≥ 125 wurde als bedeutende Antitumor-Aktivität betrachtet

* NSC 38270 = Olivomycin A

Tabelle 29
Wirkung von BBM-1675 A₁ und A₂ auf L-1210-Leukämie

Material	Behandlungsplan	Dosis, IP µg/kg/Inj.	MST Tage	Wirkung MST, %T/C	AWC, gm d 5	Überlebende am d 5 (30)
BBM-1675A ₁	d.1	51,2	12,0	171	-1,1	5/6
		25,6	7,0	100	-2,3	6/6
		12,8	9,0	129	-1,1	5/6
		6,4	9,5	136	-0,5	6/6
		3,2	6,0	86	-1,7	6/6
		1,6	7,0	100	-0,8	6/6
		0,8	8,0	114	-0,4	6/6
		0,4	7,0	100	+0,3	6/6
		0,2	7,0	100	-0,5	5/6
		0,1	7,0	100	+0,8	5/6
	d.1, 5 + 9	25,6	TOX	TOX	TOX	1/6
		12,8	9,0	129	-1,8	6/6
		6,4	9,0	129	-0,8	6/6
		3,2	8,0	114	-1,9	6/6
		1,6	8,5	121	0	6/6
		0,8	8,0	114	-0,4	6/6
		0,4	7,5	107	-1,3	6/6
		0,2	8,0	114	0	6/6
		0,1	8,0	114	+0,4	5/6
		0,05	7,0	100	+0,3	6/6
	qd 1→9	12,8	TOX	TOX	-2,4	3/6
		6,4	8,0	114	-1,6	6/6
		3,2	8,0	114	-1,7	6/6
		1,6	9,0	129	-2,1	6/6
		0,8	8,5	121	-1,6	6/6
		0,4	8,0	114	-1,0	6/6
		0,2	8,0	114	-0,5	5/6
		0,1	7,0	100	+0,3	6/6
		0,05	7,0	100	+0,3	6/6
		0,025	6,0	86	-0,6	6/6
	BBM-1675A ₂	256	TOX	TOX	TOX	0/6
		128	7,0	100	-1,8	5/6
		64	7,5	107	-1,3	4/6
		32	8,0	114	-2,2	5/6
		16	7,0	100	-2,3	6/6
		8	9,5	136	-1,4	6/6
		4	8,5	121	-1,1	6/6
		2	8,0	114	-0,8	6/6
		1	8,0	114	0	6/6
		0,5	8,0	114	-0,1	6/6

Tabelle 30
Wirkung von BBM-1675 A₁ und A₂ auf B16-Melanom

Material	Dosis, IP µg (m) od. mg/kg/Inj.	MST Tage	Wirkung MST, %T/C	AWC, gm d 5	Überlebende am d 10 (61)
BBM-1675A ₁	3,2M	TOX	TOX	-1,8	2/10
	1,6	16,0	64	-1,8	10/10
	0,8	34,5	168	-1,8	10/10
	0,4	56,5	226	-0,9	10/10(2)b
	0,2	47,0	188	-0,7	10/10
	0,1	37,0	148	-0,4	10/10
BBM-1675A ₂	16M	13,0	52	-2,1	10/10
	8	29,5	118	-2,0	10/10
	4	43,5	174	-1,1	10/10
	2	50,5	202	-2,1	10/10(3)b
	1	0,5	140	-1,0	10/10
	0,5	38,0	152	-1,1	10/10
Kontrolle	Kochsalz- lösung	25,0	—	-0,1	10/10

a nur eine ohne Tumor; MST d.m.o. = 55,0 (220%)

b zwei ohne Tumor; MST d.m.o. = 46,0 (184%)

Tumorkinokulum : 0,5 ml von 10% Brei, i.p.

Wirt : BDF₁ ♀ Mäuse

Behandlung : qd 1→9

TOX : ≤ 7/10 lebende Mäuse am Tag 10

Auswertung : MST = mittlere Überlebenszeit

Wirkung : % T/C = (MST behandelt / MST-Kontrolle) × 100

Kriterium : % T/C ≥ 125 wurde als bedeutende Antitumorwirkung betrachtet.

Nach einer weiteren Reinigung von BBM-1675 A₁ gemäss 35 Mäusen getestet. Die Resultate dieser Tests sind nachstehend dargestellt.
Beispiel 6, wurden Proben der gereinigten Verbindung gegen
L-1210-Leukämie, P-388-Leukämie und B16-Melanom in

Tabelle 31
Wirkung von gereinigtem BBM-1675 A₁ auf P-388-Leukämie

(Behandlung am Tag 1) Verbindung	Dosis, (mg/kg Dosis)	Weg, Plan	MST, d	T/C (%)	mittlere Gewichts- änderung am d 5	Überlebende am d 5
BBM-1675A ₁	0,1024	i.p., qd × 1	TOX	TOX		0/6
	0,0512		17,5	159	-1,8	4/6
	0,0256		16,5	150	-2,6	6/6
	0,0128		17,5	159	-1,4	6/6
	0,0064		15,5	141	-2,2	6/6
	0,0032		15,5	141	-2,5	6/6
	0,0016		16,5	150	-1,0	6/6
	0,0008		15,0	136	-1,2	6/6
	0,0004		15,0	136	-2,0	6/6
	0,0256	i.p., q4d × 3;	TOX	TOX	-1,5	1/6
	0,0128		10,0	91	-2,5	5/6
	0,0064		17,5	159	-1,9	6/6
	0,0032		17,0	155	-0,8	6/6
	0,0016		17,0	155	-2,0	6/6
	0,0008		15,0	136	-1,7	6/6
	0,0004		15,0	136	-0,4	6/6
	0,0002		13,0	118	-0,8	6/6
	0,0001		13,0	118	-1,3	6/6
	0,00005		13,5	123	-1,0	6/6

Tabelle 31 (Fortsetzung)
Wirkung von gereinigtem BBM-1675 A₁ auf P-388-Leukämie

(Behandlung am Tag 1) Verbindung	Dosis, (mg/kg Dosis)	Weg, Plan	MST, d	T/C (%)	mittlere Gewichts- änderung am d 5	Überlebende am d 5
	0,0128	i.p., qd × 5	TOX	TOX		0/6
	0,0064		TOX	TOX	−3,6	3/6
	0,0032		17,5	155	−2,2	5/6
	0,0016		14,5	132	−2,0	6/6
	0,0008		15,5	141	−2,2	6/6
	0,0004		16,0	145	−2,8	6/6
	0,0002		17,0	155	−1,3	6/6
	0,0001		14,0	127	−1,6	5/6
	0,00005		15,0	136	−1,6	6/6
	0,000025		15,0	136	−1,0	6/6
Kontrolle (Träger)	1 × 10 ⁶	i.p., q4d × 3;	11,0	100	−0,7	9/9

Wirt: CDF1 weibliche Mäuse

Implantationshöhe und Stelle: 1 × 10⁶ Zellen, i.p.

Tabelle 32
Wirkung des gereinigten BBM-1675A₁ auf L-1210-Leukämie

(Behandlung am Tag 1) Verbindung	Dosis, (mg/kg Dosis)	Weg, Plan	MST, d	T/C (%)	mittlere Gewichts- änderung am d 5	Überlebende am d 5
BBM-1675A ₁	0,1024	i.p., qd × 1	TOX	TOX		1/6
	0,0512		TOX	TOX	−2,0	0/6
	0,0256		8,0	114	−2,9	4/6
	0,0128		11,0	157	−2,0	6/6
	0,0064		11,0	157	−1,9	6/6
	0,0032		10,0	143	−2,0	6/6
	0,0016		10,0	143	−2,6	5/6
	0,0008		8,0	114	−0,4	6/6
	0,0256	i.p., q4d × 3	TOX	TOX	−2,3	2/6
	0,0128		10,5	150	−1,7	6/6
	0,0064		11,0	157	−1,8	6/6
	0,0032		11,0	157	−1,4	6/6
	0,0016		10,5	150	−1,9	6/6
	0,0008		9,0	129	−0,6	6/6
	0,0004		8,5	121	−0,7	6/6
	0,0002		8,0	114	−0,5	6/6
	0,0128	i.p., qd × 5	TOX	TOX	−2,8	2/6
	0,0064		7,0	100	−1,8	5/6
	0,0032		11,5	164	−1,0	6/6
	0,0016		11,0	157	−1,5	6/6
	0,0008		10,0	143	−1,6	5/6
	0,0004		8,5	121	−0,4	6/6
	0,0002		8,5	121	0,1	6/6
	0,0001		8,5	121	0,0	6/6
Kontrolle (Träger)	1 × 10 ⁶	i.p., qd × 5	7,0	100	0,1	10/10

Wirt: CDF1 weibliche Mäuse

Implantationshöhe und Stelle: 1 × 10⁶ Zellen, i.p.

Tabelle 33
Wirkung auf gereinigtes BBM-1675 A₁ auf Basis B16-Melanom

(Behandlung am Tag 1) Verbindung	Dosis, (mg/kg Dosis)	Weg, Plan	MST, d	T/C (%)	mittlere Gewichts- änderung am d 5	Überlebende am d 5
*BBM-1675A ₁	0,0064	i.p., q4d × 3	16,5	110	-3,8	8/10
	0,0032		22,5	150	-3,0	10/10
	0,0016		25,0	167	-1,8	10/10
	0,0008		22,0	147	-2,3	10/10
	0,0004		24,0	160	-1,8	9/10
	0,0016	i.p., qd × 9	27,0	180	-3,7	10/10
	0,0008		27,0	180	-2,9	10/10
	0,0004		26,0	173	-2,3	10/10
	0,0002		24,5	163	-2,4	10/10
	0,0001		25,0	170	-2,3	10/10
Kontrolle (Träger)	0,5 ML	i.p., qd × 9	15,0	100	-0,3	10/10
**BBM-1675A ₁	0,0064	i.v., q4d × 3	15,0	86	-4,7	10/10
	0,0032		32,5	186	-2,1	10/10
	0,0016		26,0	149	-1,4	10/10
	0,0008		24,0	137	-0,4	10/10
	0,0004		24,5	140	-0,0	10/10
	0,0064	i.p., q4d × 3	18,0	103	-2,7	10/10
	0,0032		23,0	131	-1,4	10/10
	0,0016		24,0	137	-0,7	10/10
	0,0008		25,0	146	-0,8	10/10
	0,0004		21,5	123	-1,4	10/10
Kontrolle (Träger)	0,2 ML	i.v., q4d × 3	17,5	100	-0,4	10/10

Wirt: BDFI weibliche Mäuse

* Implantationshöhe und Stelle: 0,5 ML 10% Brei, i.p.

** Implantationshöhe und Stelle: Fragment, s.c.

Die obigen Screening-Daten geben an, dass die gereinigte BBM-1675 A₁-Komponente im wesentlichen die gleichen Antitumoraktivitäten aufweist, wie die weniger gereinigte Probe, die vorher gescreent wurde. Die Verbindung hat eine ausnehmend hohe Wirksamkeit, da Aktivität nachgewiesen wurde bei einer Dosis von 25 Nanogramm/kg beim 5 mal täglich-Plan gegen P-388-Leukämie in Mäusen. Auf Tests gegen P-388- und L-1210-Leukämie ist BBM-1675 A₁ wirksam verabreicht als einzelne Injektion am Tag 1, jeden vierten Tag drei Injektionen oder täglich 5 mal. Gegen das B16-Melanom war die Verbindung ebenfalls wirksam, wenn sie an Tiere verabreicht wurde, die subkutane Tumore aufwiesen und auch wenn sie intraperitoneal an Tiere verabreicht wurde, die i.p. Tumorinplantate aufwiesen. Diese Eigenschaft der erfolgreichen pharmakologischen Abgabe einer Droge an einen Tumor an einer entfernten Stelle ist unüblich unter den Antitumorantibiotika.

Wie oben gezeigt, weisen die BBM-1675-Komponenten eine wirkungsvolle antimikrobiische Aktivität auf und sind somit nützlich bei der therapeutischen Behandlung von Warmblütlern und anderen Tieren gegen infektiöse Krankheiten, die durch solche Mikroorganismen verursacht wurden. Zusätzlich können die Verbindungen ebenfalls für übliche Anwendungen von antimikrobiischen Mitteln, wie die Desinfektion von medizinischen und zahnmedizinischen Ausrüstungen, verwendet werden.

Die Induktion von Prophagen in lysogenen Bakterien und die Aktivität gegen Mäusetumorsysteme zeigt, dass die BBM-1675-Komponenten ebenfalls für die Hemmung des Wachstums von Warmblütlertumoren therapeutisch nützlich sind.

Es wird somit eine Methode für die therapeutische Behandlung von Wirtstieren, welche durch eine mikrobiische Infektion oder durch einen bösartigen Tumor befallen sind, zur Verfügung gestellt, wobei die Methode die Verabreichung einer wirksamen antimikrobiischen oder tumorhemmenden Dosis von BBM-1675 A₁, A₂, A₃, A₄, B₁ oder B₂ oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung davon an das genannte Wirtstier umfasst.

Die vorliegende Erfindung stellt eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Verfügung, welche eine wirksame antimikrobiische oder tumorhemmende Menge von BBM-1675 A₁, A₂, A₃, A₄, B₁ oder B₂ in Kombination mit einem inerten pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Verdünnungsmittel enthält. Diese Zusammensetzungen können in jeder pharmazeutischen Form aufgemacht sein, die zweckmässig für die parenterale Verabreichung ist.

Erfindungsgemässe Zubereitungen für die parenterale Verabreichung umfassen sterile wässrige oder nichtwässrige Lösungen, Suspensionen oder Emulsionen. Sie können ebenfalls in Form von sterilen, festen Zusammensetzungen hergestellt werden, welche unmittelbar vor dem Gebrauch mit sterilem Wasser, physiologischer Kochsalzlösung oder einigen anderen sterilen injizierbaren Medien aufgelöst werden können.

Die gegenwärtig bevorzugten Mengen von BBM-1675-Antibiotika können gemäss den besonderen Komponenten, den besonderen formulierten Zusammensetzungen, der Art der Applikation und der besonderen Lage, der Wirts und der behandelten Krankheit variiert werden. Es müssen viele Faktoren, welche die Wirkung der Droge ändern können, vom Fachmann in Betracht gezogen werden, beispielsweise

das Alter, Körpergewicht, Geschlecht, Diät, Zeit der Verabreichung, Weg der Verabreichung, Ausmass der Ausscheidung, Bedingung des Wirts, Drogenkombinationen, empfindliche Reaktionen und Ernsthaftigkeit des Leidens. Die Verabreichung kann kontinuierlich oder periodisch innerhalb der maximalen tolerierbaren Dosis durchgeführt werden. Das optimale Ausmass der Applikation für vorgegebene Rahmenbedingungen kann durch den Fachmann unter Verwendung von üblichen Dosierungsbestimmungstests in Anbetracht der obengenannten Richtlinien in Erfahrung gebracht werden.

Die nachstehenden Beispiele dienen zur Erläuterung der vorliegenden Erfindung.

Beispiel 1

Fermentation von BBM-1675

Actinomadura Stamm Nr. H964-92 wurde auf einem Agarnährboden, welcher 1% Malzextrakt, 0,4% Glukose, 0,4% Hefeextrakt, 0,05% CaCO_3 und 1,6% Agar enthielt, gezüchtet und am Leben erhalten. Ein gut bewachsener Agarnährboden wurde verwendet, um das vegetative Medium zu inokulieren, welches 3% Stärke, 3% trockene Hefe, 0,3% K_2HPO_4 , 0,1% KH_2PO_4 , 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2% NaCl und 0,1% CaCO_3 enthielt, wobei der pH-Wert vor der Sterilisation auf 7,0 eingestellt wurde. Die vegetative Kultur wurde bei 32 °C während 72 h in einem Rotationsschüttler (250 Umdrehungen/min) inkubiert und 5 ml der Kultur wurden in einen 500 ml Erlenmeyerkolben transferiert, welcher 100 ml Fermentationsmedium enthielt, wobei dieses Fermentationsmedium aus 3% Melasse, 1% Maisstärke, 1% Fischmehl, 0,1% CaCO_3 und 0,005% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ enthielt (pH-Wert vor der Sterilisation 7,0). Die Fermentation wurde bei 28 °C während 8 d in einem Rotationsschüttler durchgeführt. Die antibiotische Aktivität in der Fermentationsbrühe wurde durch Papier-Disc-Agardiffusion bestimmt, unter Verwendung von *Staphylococcus aureus* 209P als Testorganismus. Die antibiotische Wirkung erreichte ein Maximum von etwa 1 µg/ml nach 5 d Fermentation.

Die Fermentation von BBM-1675 wurde ebenfalls in einem Rühr-Gefässfermenter durchgeführt. 500 ml vom Inokulum, das wie vorstehend angegeben gezüchtet wurde, wurde in einen 20 l Fermenter gegeben, der 10 l Fermentationsmedium enthielt, welches aus den gleichen Bestandteilen bestand, wie bei der Schüttelflaschenfermentation. Die Fermentation wurde bei 32 °C durchgeführt, mit einem Belüftungsgrad von 12 l/min und Rühren bei 250 Umdrehungen/min. Unter diesen Bedingungen erreichte die Antibiotikaproduktion ein Maximum von etwa 0,9 µg/ml nach 68–76 h Fermentation.

Es wurden ebenfalls Fermentationsstudien in Fermentationstanks durchgeführt. Eine Impfkultur wurde während 4 d bei 30 °C in Erlenmeyerkolben, welche ein vegetatives Medium enthielten, das aus 3% löslicher Stärke, 3% trockener Hefe, 0,3% K_2HPO_4 , 0,1% KH_2PO_4 , 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2% NaCl und 0,1% CaCO_3 enthielt. Die Impfkultur wurde in einem 200 l Impftank, welcher 130 l Impfmedium mit der gleichen Zusammensetzung wie vorstehend beschrieben, enthielt, inokuliert, und der Impftank wurde bei 240 Umdrehungen/min bei 30 °C während 31 h gerührt. Die zweite Impfkultur wurde verwendet, um 3000 l Fermentationsmedium, welches 1% Maisstärke, 3% Melasse, 1% Fischmehl, 0,005% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ und 0,1% CaCO_3 enthielt, zu inokulieren. Der Produktionstank war in Betrieb bei 28 °C, bei 164 Umdrehungen/min mit einer Durchlüftungsrate von 2000 l/min. Der pH-Wert der Brühe stieg graduell mit dem Fortschritt der Fermentation und erreichte einen Wert von 7,7–7,8 nach 170–180 h, wobei eine Spitze der antibiotischen Aktivität von 1,7 µg/ml produziert wurde.

Beispiel 2

Isolierung und Reinigung der BBM-1675-Komponenten

Die geerntete Fermentationsbrühe (3000 l, pH-Wert 7,8) wurde aufgetrennt in einen mycelischen Kuchen und einen Überstand mit Hilfe einer «Sharpless»-Zentrifuge. Der mycelische Kuchen wurde in 1600 l Methanol suspendiert und die Mischung wurde während 1 h gerührt. Die unlöslichen Teile wurden abfiltriert und der methanolische Extrakt wurde im Vakuum auf 43 l konzentriert. Die im Brühenüberstand enthaltene Aktivität wurde daraus gewonnen durch Extraktion mit zwei 1000 l-Teilen von n-Butanol. Die n-Butanolextrakte und der konzentrierte Methanolextrakt wurden vereinigt und azeotrop abgedampft unter gelegentlicher Zugabe von Wasser zu einer wässrigen Lösung (20 l), worin sich die antibiotische Aktivität grösstenteils als ölgiger Feststoff niederschlug. Der Feststoff wurde in 30 l Methanol aufgelöst und die unlöslichen Teile wurden durch Filtration entfernt. Der Methanolextrakt wurde dann im Vakuum zu einer 10 l-Lösung konzentriert, zu welcher 40 l Ethylacetat und 30 l Wasser gegeben wurden. Nach Rühren während 30 min wurde die organische Schicht abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum auf 4 l eingengt. Die Zugabe des Konzentrates in 20 l n-Hexan ergab einen schwachgelben Feststoff des rohen BBM-1675-Komplexes (90,14 g, Aktivität: 55 µg/mg). Die Dünnschichtchromatographie zeigte, dass der Komplex eine Mischung von zwei Hauptkomponenten BBM-1675 A₁ und A₂ und verschiedenen Nebenkomponten war. Sie wurden aufgetrennt und durch wiederholte Chromatographieverfahren gereinigt, welche in einem Kühlraum durchgeführt wurden, um eine Zersetzung zu vermeiden.

Der BBM-1675-Komplex (20 g) wurde in Methanol (20 ml) aufgelöst und auf eine «Sephadex LH-20»-Säule gegeben (5,5 × 85 cm). Die Säule wurde mit Methanol entwickelt und die Elution wurde durch Bioassay unter Verwendung von *Staphylococcus aureus* 209P verfolgt. Die aktiven Eluate wurden kombiniert, im Vakuum eingengt und lyophilisiert, wobei ein semi-reiner fester BBM-1675-Komplex erhalten wurde (4,19 g). Der Feststoff wurde dann auf einer Silicagelsäule (5,0 × 50 cm) chromatographiert, unter Verwendung von Chloroform und einem zunehmenden Anteil (1 → 5% v/v) von Methanol als Elutionsmittel.

Die Eluate wurden vereinigt auf Basis der antibakteriellen Aktivität (gegen *S. aureus*) und Dünnschichtchromatographie (SiO_2 ; CHCl_3 – CH_3OH = 5:1 v/v) und im Vakuum eingengt. Nahezu homogenes BBM-1675 A₁ (Ausbeute nach Eindampfung 351 mg) wurde zuerst mit 2% Methanol in Chloroform eluiert und dann eine Mischung von BBM-1675 A₂, A₃ und A₄ (507 mg) gefolgt durch die BBM-1675 B-Mischung (210 mg) mit 3% Methanol in Chloroform. Das feste BBM-1675 A₁ wurde auf eine «Sephadex LH20»-Säule (2,0 × 80 cm) gegeben, und mit Methanol entwickelt. Die aktiven Fraktionen wurden im Vakuum zur Trockenheit eingengt und der zurückbleibende Feststoff wurde aus Methanol umkristallisiert, wobei farblose Plättchen von reinem BBM-1675 A₁ (124 mg) erhalten wurden. Dieses Material ist das Ausgangsmaterial für das Beispiel 3A. Der Komplex BBM-1675 A₂, A₃ und A₄ wurde durch Chromatographie aufgetrennt, auf einer Säule von «Bondapak C₁₈» (Waters 3,0 × 50 cm). Die Elution wurde in wässrigem Acetonitril durchgeführt und die bioaktiven Eluate wurden durch Dünnschichtchromatographie getestet (Merck, *Silanized: CH_3CN – H_2O = 75:25 v/v). Die Nebenkomponten A₄ (33 mg) und A₃ (18 mg) wurden sukzessive mit Acetonitril ausgewaschen, wobei eine weitere Hauptkomponente A₂

* C₁₈-Umkehrphasensilikagel.

(301 mg) mit 50% Acetonitril folgte (dieses Material war das Ausgangsmaterial für Beispiel 3B).

Der Feststoff, der BBM-1675 B₁ und B₂ enthielt, wurde auf einer Silikagelsäule chromatographiert (3,0 × 40 cm) mit Chloroform und Methanol als Entwicklungslösungsmittel. Die aktiven Fraktionen, die mit 4% Methanol in Chloroform eluiert wurden, wurden vereinigt und abgedampft, wobei das reine BBM-1675 B₁ (7 mg) erhalten wurde. Eine weitere aktive Fraktion wurde mit 5% Methanol eluiert, wobei die Abdampfung BBM-1675 B₂ (8 mg) ergab.

Beispiel 3

Weitere Reinigung von BBM-1675 A₁ und A₂

A. Reinigung von BBM-1675 A₁

Eine «Glenco»-Säule mit den Massen 2,67 cm innerer Durchmesser × 75 cm wurde durch Aufschlämmung mit einer «Baker» phasengebundenem (C18)-Silicagel (40 µm Partikelgrösse) in Methanol gepackt. Die Säule wurde einem Mitteldruck HPLC-System angeschlossen und mit 1,5 l Elutionsmittel (41,6% Acetonitril - 21,6% Methanol - 36,8% 0,1M Ammoniumacetat) equilibriert. Das partiell gereinigte BBM-1675 A₁ (100,5 mg), das gemäss dem Reinigungsverfahren gemäss Beispiel 2 erhalten wurde, wurde in 2 ml Acetonitril aufgelöst und mit einer Probenschleife aufgenommen. Die Probe wurde auf die Säule gepumpt. Die Säule wurde mit dem obengenannten Elutionsmittel eluiert, wobei 87 ml Fraktionen gesammelt wurden. Die Elution wurde bei 254 nm und 340 nm verfolgt. Die Fraktionen 55–71 wurden vereinigt und zweimal mit 1500 ml aliquoten Anteilen von Chloroform extrahiert. Das Chloroform wurde zur Trockenheit abgedampft, wobei 89,8 mg Rückstand C erhalten wurden.

Eine «Glenco»-Säule mit den Massen 1,5 cm innerer Durchmesser × 20 cm wurde unter Aufschlämmung mit 12 g «Woelm»-Silicagel (60–200 µm Partikel) gepackt. Der Rückstand C wurde in Chloroformlösung auf die Säule appliziert. Die Säule wurde mit 500 ml eines linearen Gradienten von Chloroform zu 10% Methanol in Chloroform eluiert, wobei 10–25 ml Fraktionen gesammelt wurden. Nach der Analyse durch TLC auf Silicagel, wurden die Fraktionen 6–9 vereinigt und zur Trockenheit eingedampft, wobei 73 mg des Rückstandes D erhalten wurden.

Eine «Glenco»-Säule mit den Massen 1,5 cm innerer Durchmesser × 20 cm wurde unter Aufschlämmung mit 12 g «Woelm»-Silicagel (63–200 µm Partikel) in «Skellysolve B» gepackt. Der Rückstand D wurde in etwa 2 ml CHCl₃ aufgelöst und auf die Säule appliziert. Das Chloroform wurde mit 25 ml «Skellysolve B» verdrängt. Die Säule wurde dann mit 500 ml eines linearen Gradienten von «Skellysolve B» zu 60% Aceton in «Skellysolve B» eluiert, wobei 28–25 ml Fraktionen gesammelt wurden. Die Fraktionen 19–23 wurden vereinigt, zur Trockenheit eingedampft, wobei eine Ausbeute von 65,6 mg des reinen BBM-1675 A₁ erhalten wurden.

Dieser Rückstand war homogen in drei Dünnschichtchromatographiesystemen (5% Methanol in Chloroform; 5% Methanol in Ether; und 50% Aceton in «Skellysolve B» auf Silicagel) und auf Hochdruckflüssigchromatographie (C-18 Silicagel - 41,5% Acetonitril: 21,5% Methanol: 37,0% 0,1M Ammoniumacetat).

Gelpermeationschromatographie mit gereinigtem BBM-1675 A₁

Eine «Pharmacia»-Säule mit den Massen 2,5 cm innerer Durchmesser × 45 cm wurde unter Aufschlämmung mit «Sephadex LH-20» in Methanol gepackt und auf ein 33,4 cm Chromatographiebett eingestellt. Das gereinigte BBM-1675 A₁ (ungefähr 120 mg) wurde in 2 ml Methanol aufgelöst und

in ein 2,5 ml Probenreservoir übergeführt. Die Probe wurde auf die Säule appliziert und die Elution begann mit 1,75 ml/min mit Methanol, wobei 10 ml Fraktionen gesammelt wurden («Pharmacia Frac-100»-Fraktionensammler). Die Elution wurde bei 254 nm verfolgt, unter Verwendung eines «Isco UA-5»-Detektors. Es wurde ermittelt, dass BBM-1675 A₁ bei Ve/Vt von 0,79–0,91 eluiert wurde (Ve = Elutionsvolumen; Vt = Bettvolumen).

B. Reinigung von BBM-1675 A₂

Eine «Glenco»-Säule mit den Massen 2,65 cm innerer Durchmesser × 7,5 cm wurde unter Aufschlämmung mit «Baker» phasengebundenem Octadecyl (C18)-Silicagel (40 µm Partikelgrösse) in Methanol gepackt. Die Säule wurde einem Mitteldruck-HPLC-System angeschlossen und mit 1,5 l des Elutionsmittels (50% Acetonitril – 20% Methanol – 30% 0,1M Ammoniumacetat) equilibriert. Das partiell gereinigte BBM-1675 A₂ (76,9 mg), das durch das Verfahren gemäss Beispiel 2 erhalten wurde, wurde in 2 ml Acetonitril aufgelöst und mit einer Probenschleife aufgenommen. Die Probe wurde auf die Säule gepumpt. Die Säule wurde mit dem obengenannten Elutionsmittel eluiert, wobei 87 ml Fraktionen gesammelt wurden. Die Elution wurde bei 254 und 340 nm verfolgt. Die Fraktionen 31–38 wurden vereinigt und zweimal mit 500 ml Aliquoten von Chloroform extrahiert. Das Chloroform wurde abgedampft zur Trockenheit, wobei 65,8 mg homogenes BBM-1675 A₂ erhalten wurde.

BBM-1675 A₂ war homogen in 2 TLC-Systemen, einer 2-d-TLC-Analyse und in HPLC.

Beispiel 4

Bevorzugtes Extraktionsverfahren für BBM-1675 A₁

Rohes Fermentationsprodukt (6,8 l) erhalten gemäss dem Verfahren des Beispiels 1 wurde in einem Polypropylenkesselbecken (12 cm Durchmesser, oben; 10 cm Durchmesser, unten; 37 cm Höhe), das unten mit einem Hahn ausgerüstet war, übergeführt. Ein gleiches Volumen Chloroform wurde zugefügt. Die Mischung wurde ausgiebig gerührt mit einem «CRC»-luftgetriebenen Rührer während 2 h. Ungefähr 4 l (1,3 kg) «Dicalite» (Filterhilfe) wurde zugegeben, wobei das ganze gemischt wurde. Die Mischung wurde auf einem «Dicalite»-Kissen filtriert, welches in einem «Buchner»-Trichter Nr. 12 gehalten wurde. Das Filtrat wurde in einer 19 l Lösungsflasche, die mit einem Vakuumabzug («Ace.» Nr. 5396–06) versehen war, gesammelt. Die Matte wurde mit 2 l Chloroform gewaschen. Das Filtrat wurde in einen 20 l Scheidetrichter übergeführt und die Phasen wurden aufgetrennt. Die untere Phase (Chloroform) wurde entfernt.

Ein «Glenco»-Rohr mit den Massen 2,5 cm innerer Durchmesser × 40 cm wurde unter Aufschlämmung mit 91 g von «Woelm»-Silicagel (63–200 µm Partikel) gepackt. Unter Verwendung einer «FMI RPY-2CSD»-Pumpe wurde die obere Chloroformphase durch die Säule gepumpt. Die Säule wurde mit 60 ml frischem Chloroform gewaschen. Das Chloroformeluat wurde verworfen. Die Säule wurde dann mit 600 ml 10% Methanol in Chloroform eluiert. Dieses Eluat wurde abgedampft zur Trockenheit, wobei 547 mg des Rückstandes A erhalten wurden.

Der Rückstand A wurde in 50 ml Chloroform aufgelöst. Die Chloroformlösung wurde zu 20 g «Dicalite» in einen 1 l Rundkolben gegeben. Durch Zugabe von ungefähr 200 ml «Skellysolve B» wurde eine Aufschlämmung geschaffen. Die Lösungsmittel wurden mittels eines Rotationsverdampfers entfernt. Der Rückstand wurde in 300 ml «Skellysolve B» aufgeschlämmt. Die Aufschlämmung wurde in ein «Ace»-Flaschenchromatographierohr (Teil Nr. B5872-14) (41 mm

innerer Durchmesser $\times$ 45,7 cm) gepackt, durch folgendes Verfahren. Ein Glaswollezapfen wurde in den Hals des Hahns zwischen dem Hahn und des Säulenrohrs eingefügt. Eine 1 cm Schicht von «Standard Ottawa Sand» wurde über die Glaswolle gegeben. Der Hahn, die Glaswolle und das Sandbett wurden von Luft gereinigt, indem unter Druck (0,4 bar) «Skellysolve B» durchgepresst wurde. Die Aufschlammung wurde dann auf die Säule gegeben, wobei unter Druckfluss ein gepacktes Bett entstand. Es wurde vermieden, dass die Säule trocken lief. Nachdem ein stabiles Säulenbett erhalten wurde, wurde eine 2 cm Schicht «Ottawa Sand» oben auf das Bett gegeben. Das Bett wurde dann mit zusätzlichen 600–700 ml «Skellysolve B» eluiert. Das Bett wurde mit 500 ml Toluol eluiert. Das Toluoleluat wurde zur Trockenheit eingedampft, wobei 93 mg Rückstand B erhalten wurden. Dieses partiell gereinigte BBM-1675 A₁ kann weiter gereinigt werden, gemäss dem Verfahren des Beispiels 3.

Beispiel 5

Fermentation des BBM-1675-Komplexes unter Verwendung der Variante H964-92-A1327Y

Der Variantenstamm A1327Y, welcher durch NTG-Behandlung von *Actinomyces verrucosus* Stamm Nr. H964-92 erhalten wurde, wurde verwendet, um das vegetative Medium, welches 0,2% lösliche Stärke, 1% Glukose, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NB-Amin Typ A und 0,1% CaCO₃ enthielt, zu inokulieren, wobei der pH-Wert vor der Sterilisation auf 7,0 eingestellt wurde. Die vegetative Kultur wurde bei 32 °C während 4 d auf einem Rotationsschüttler (250 Umdrehungen/min) inkubiert und 5 ml der Zucht wurden in einem 500 ml «Erlenmeyer»-Kolben übergeführt, welcher 100 ml eines Fermentationsmediums enthielt, das aus 3% Melasse, 1% Maisstärke, 1% Fischmehl, 0,005% CuSO₄·5H₂O, 0,05% MgSO₄·7H₂O und 0,1 % CaCO₃ zusammengesetzt war, wobei der pH-Wert vor der Sterilisation auf 7,0 eingestellt wurde.

Die Fermentation wurde bei 28 °C während 7 d auf dem Rotationsschüttler durchgeführt. Die Antibiotika-Produktion erreichte ein Maximum von ungefähr 1,5 µg/ml.

Beispiel 6

Isolierung und Reinigung der BBM-1675-Komponenten

Die gereinigte Fermentationsbrühe aus Beispiel 5 (3000 l, pH-Wert 7,6) wurde in den Mycel-Kuchen und Überstand aufgetrennt, unter Verwendung einer «Sharpless»-Zentrifuge. Der Mycel-Kuchen wurde mit 2000 l Methanol während 1 h gerührt und die unlöslichen Materialien wurden durch Filtration abgetrennt. Die Aktivität, die im Brühenüberstand enthalten war, wurde daraus mit 1800 l n-Butanol extrahiert. Die Methanol- und n-Butanol-Extrakte wurden vereinigt und azeotrop konzentriert, durch gelegentliche Zugaben von Wasser zur wässrigen Lösung (20 l), welche den grössten Teil der antibiotischen Aktivität als öligen Feststoff ausschied. Die Mischung wurde dreimal mit je 20 l Ethylacetat geschüttelt, um die Aktivität zu extrahieren. Die Extrakte wurden vereinigt, filtriert, um die unlöslichen Teile zu entfernen und im Vakuum auf 4 l eingedampft. Die Zugabe des Konzentrates in 30 l n-Hexan unter Rühren ergab den rohen

BBM-1675-Komplex (81,7 g, Aktivität: 59 µg/mg) als blassgelber Feststoff. Der Komplex war, wie die TLC und HPLC zeigten, eine Mischung von zwei Hauptkomponenten, BBM-1675 A₁ und A₂ und verschiedenen Nebenkomponten. Sie wurden aufgetrennt und gereinigt durch eine Serie von Chromatographien, welche in einem Kühlraum durchgeführt wurden, um die Zersetzung zu vermeiden.

Der rohe BBM-1675-Komplex (20 g) wurde in Methanol (20 ml) aufgelöst und auf eine «Sephadex LH-20» (5,5 $\times$ 85 cm) appliziert. Die Säule wurde mit Methanol entwickelt und die Elution wurde durch einen Bioassay unter Verwendung des *Staphylococcus aureus* 209P verfolgt. Die aktiven Eluate wurden vereinigt, im Vakuum konzentriert und lyophilisiert, wobei der semireine BBM-1675-Komplex als Feststoff erhalten wurde (4,86 g Aktivität: 203 µg/mg). Der Feststoff wurde dann auf einer Silicagelsäule chromatographiert (3,0 $\times$ 70 cm), unter Verwendung von Chloroform und einem zunehmenden Anteil (1–5%) Methanol als Entwicklungslösungsmittel. Die Eluate wurden vereinigt, auf Basis der antibakteriellen Aktivität gegen *S. aureus* und TLC (SiO₂, CHCl₃–MeOH = 5:1, v/v) und im Vakuum konzentriert. BBM-1675 A₁ (425 mg nach Abdampfung, Aktivität: 960 µg/mg) wurde zuerst mit 2% Methanol in Chloroform eluiert und dann eine Mischung von BBM-1675 A₂, A₃ und A₄ (732 mg, Aktivität 340 µg/mg) gefolgt durch den BBM-1675 B-Komplex (200 mg, Aktivität 190 µg/mg) mit 3% Methanol in Chloroform. Das obengenannte BBM-1675 A₁ wurde auf Silicagel rechromatographiert (Säule: 2,2 $\times$ 44 cm) mit 2% Methanol in Benzol. Die bioaktiven Eluate wurden durch HPLC geprüft («Lichrosorb RP-18»: CH₃CN–MeOH–0,1MCH₃COONH₄ = 5:2:3, v/v) und die Fraktionen, welche homogenes BBM-1675 A₁ enthielten, wurden im Vakuum zur Trockenheit eingedampft. Der zurückbleibende Feststoff wurde auf Methanol (10 ml) umkristallisiert, wobei farblose Prismen von BBM-1675 A₁ erhalten wurden (197 mg, Aktivität: 1000 µg/mg).

Der Komplex von BBM-1675 A₂, A₃ und A₄ (537 mg) wurde durch Säulenchromatographie auf «Bondapak» C₁₈ («Waters», 2,0 $\times$ 42 cm) aufgetrennt. Die Elution wurde mit wässrigem Acetonitril durchgeführt und die bioaktiven Eluate wurden durch TLC (Merck, silanized: CH₃CN–H₂O = 75:25, v/v) geprüft. Die Nebenkomponten BBM-1675 A₄ (45 mg, Aktivität 410 µg/mg) und A₃ (19 mg, Aktivität: 300 µg/mg) wurden sukzessive mit 20% Acetonitril ausgewaschen, gefolgt durch eine Hauptkomponente, BBM-1675 A₂ (203 mg) mit 50% Acetonitril. Die BBM-1675 A₂-Fraktion wurde aus Chloroform-n-hexan extrahiert, wobei farblose Stäbchen ausgeschieden wurden (70 mg, Aktivität: 290 µg/mg). Der Feststoff, der die BBM-1675 B-Mischung enthielt, wurde auf einer Silicagelsäule (3,0 $\times$ 40 cm) chromatographiert, mit Chloroform und Methanol als Entwicklungslösungsmittel. Die aktiven Fraktionen, welche mit 4% Methanol in Chloroform extrahiert wurden, wurden vereinigt und eingedampft, wobei reines BBM-1675 B₁ (7 mg, Aktivität: 180 µg/mg) erhalten wurde. Eine weitere aktive Fraktion wurde mit einer Konzentration von 5% Methanol eluiert, welche nach der Eindampfung BBM-1675 B₂ ergab (8 mg, Aktivität: 140 µg/mg).

FIG. 1

IR-Absorptionsspektrum von BBM-1675 A₁ in KBr
Wellenlänge in μm

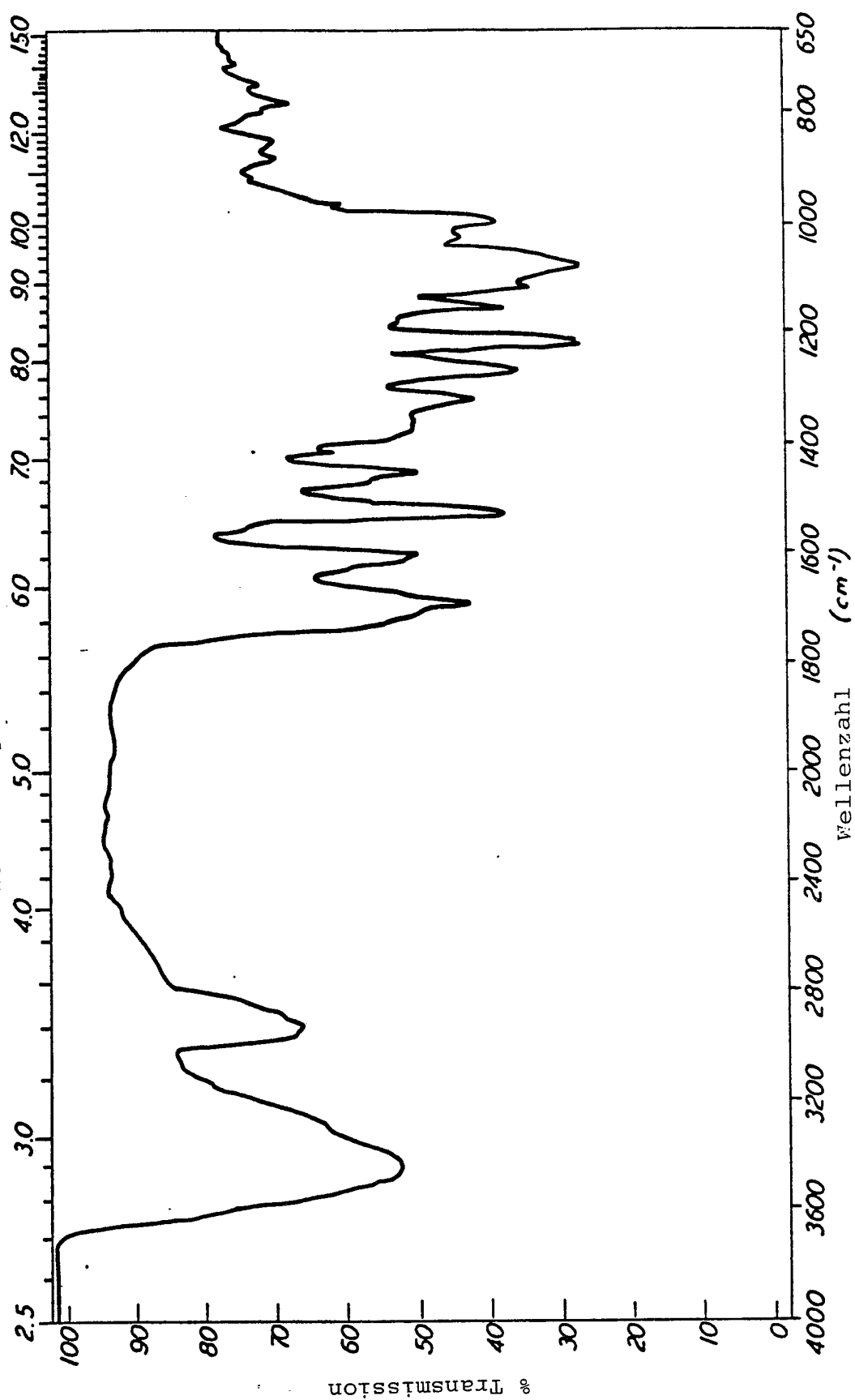


FIG. 2

IR-Absorptionsspektrum von BBM-1675 A₂ in KBr
Wellenlänge in μm

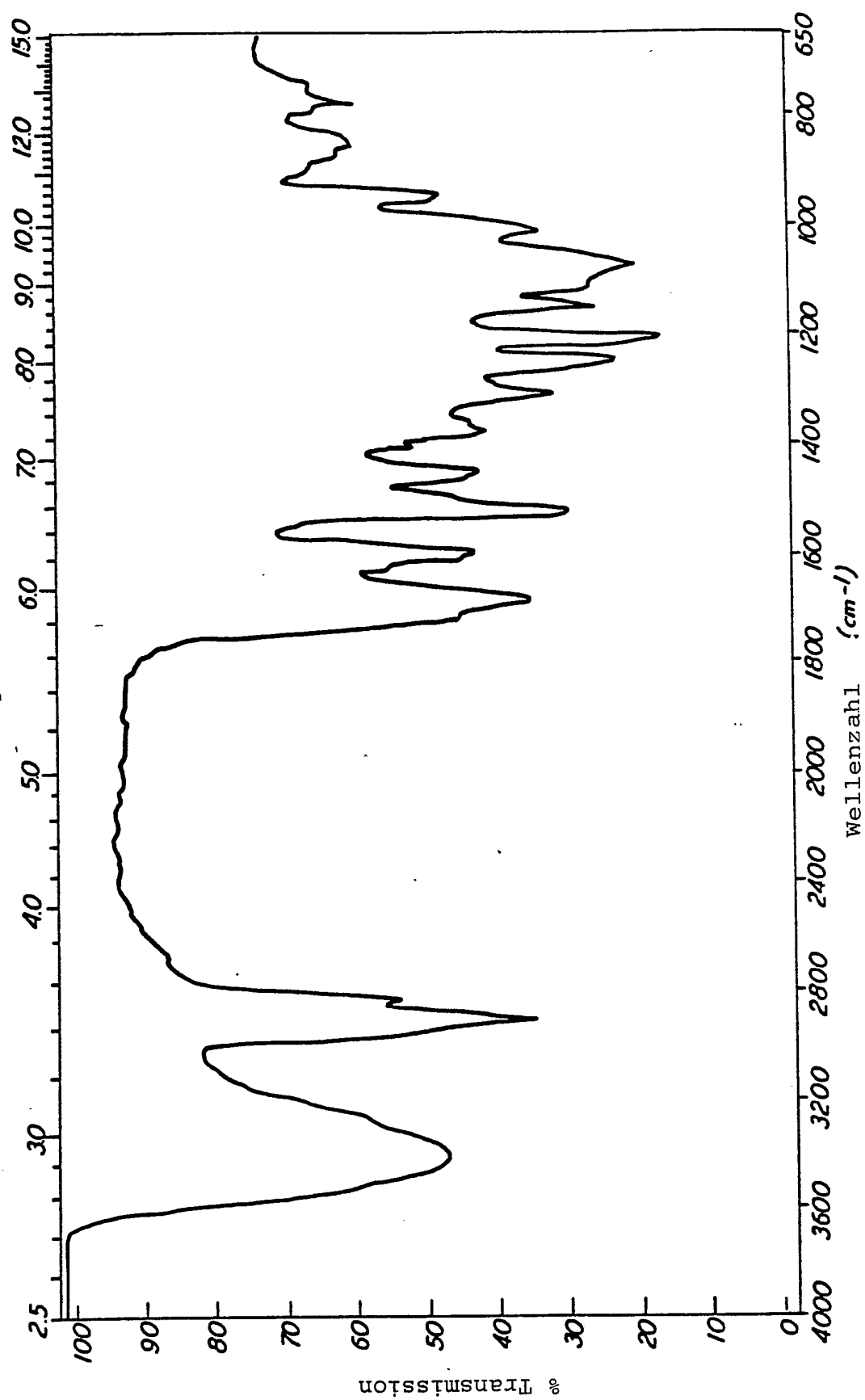


FIG. 3

IR-Absorptionsspektrum von BBM-1675 A₃ in KBr
Wellenlänge in μm

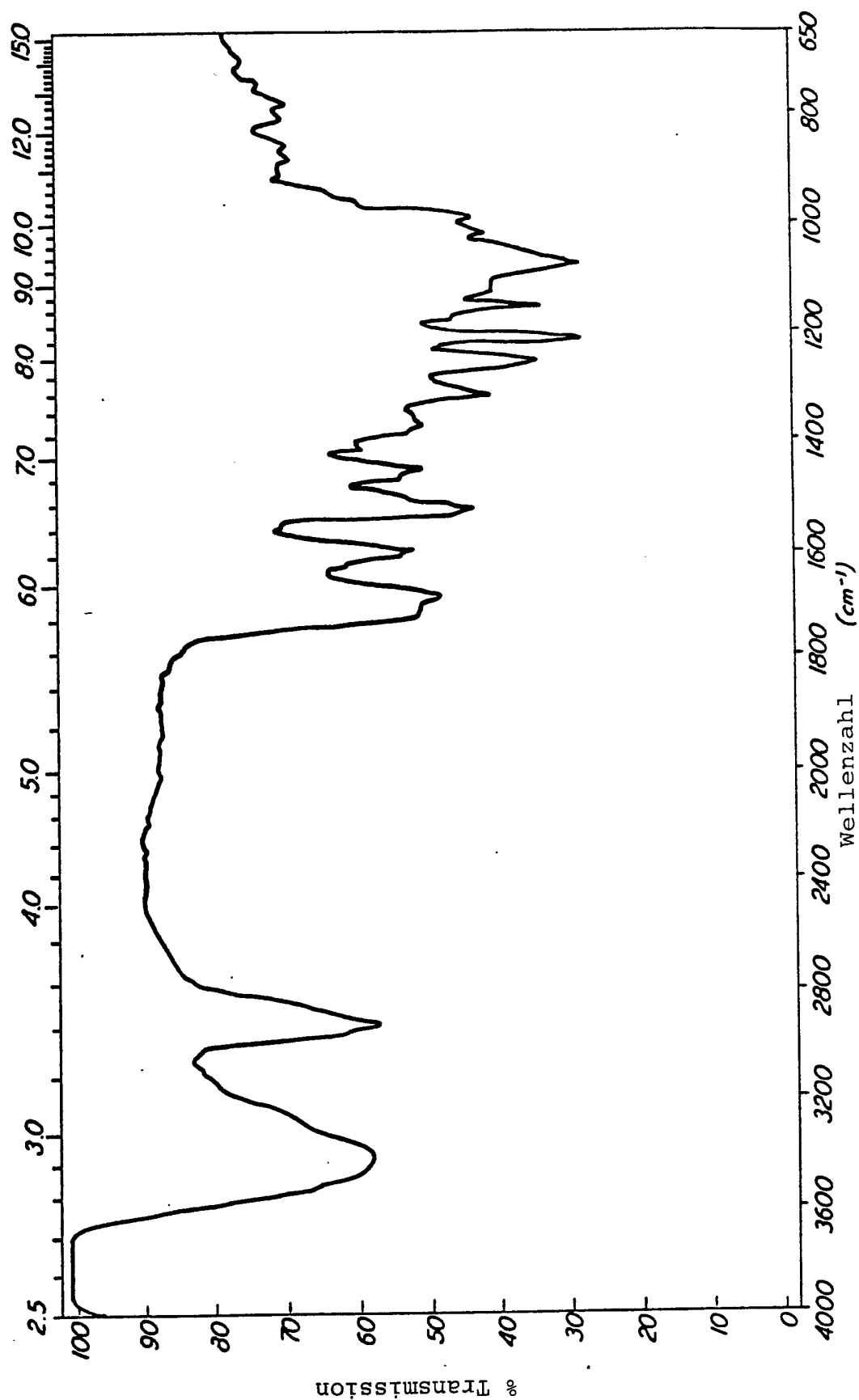


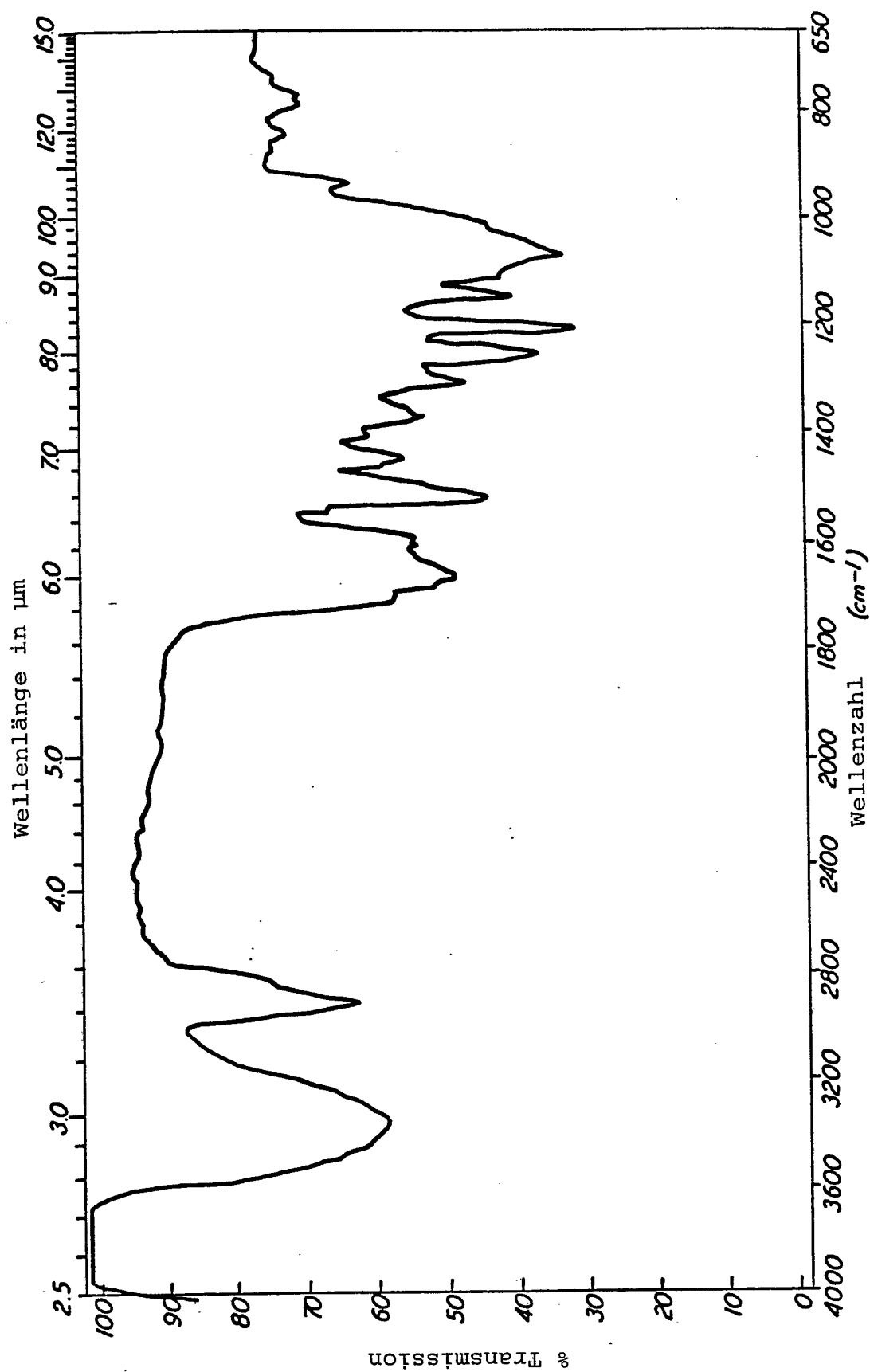
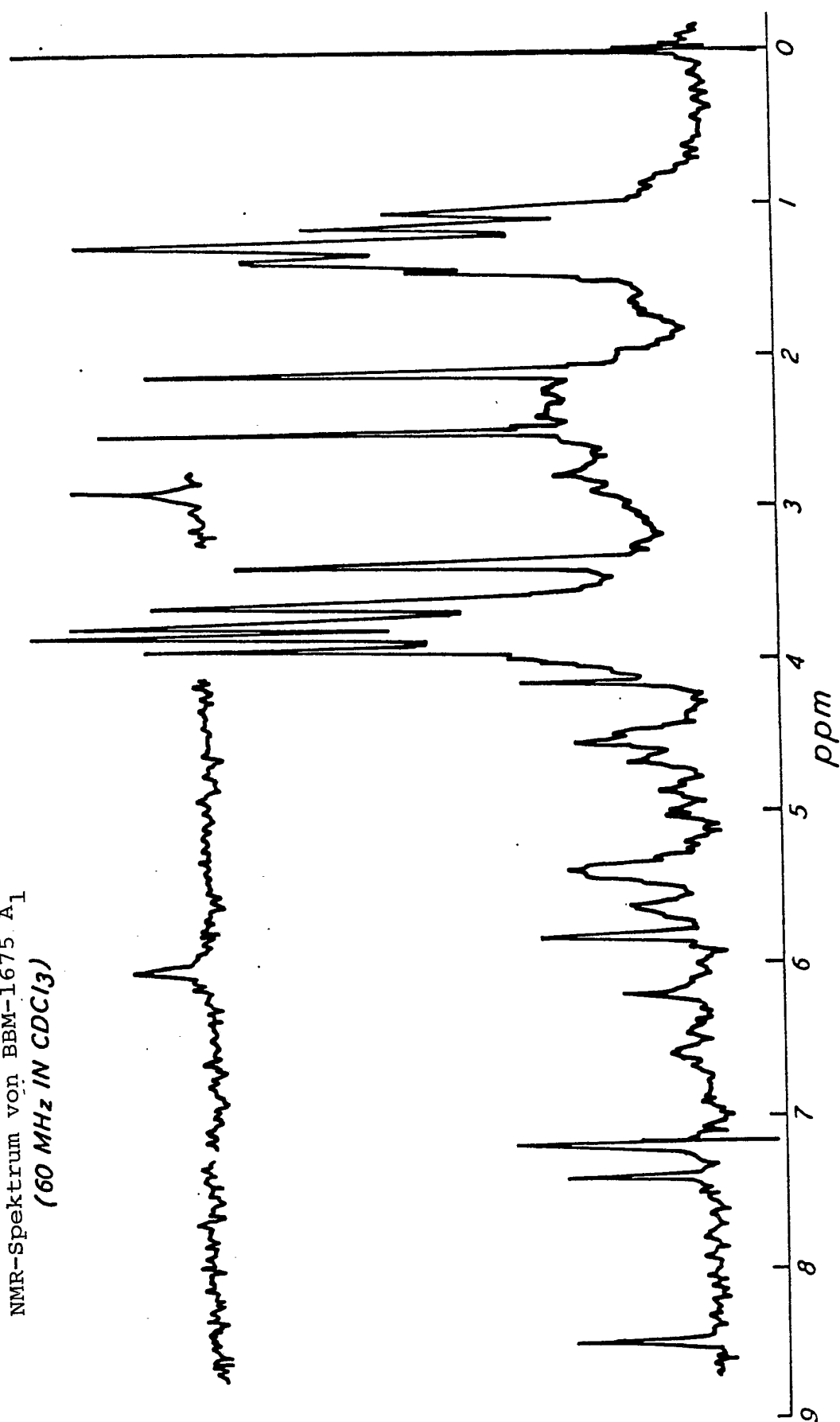
FIG. 4IR-Absorptionsspektrum von BBM-1675 A_4 in KBr

FIG. 5

NMR-Spektrum von BBM-1675 A₁
(60 MHz in CDCl₃)



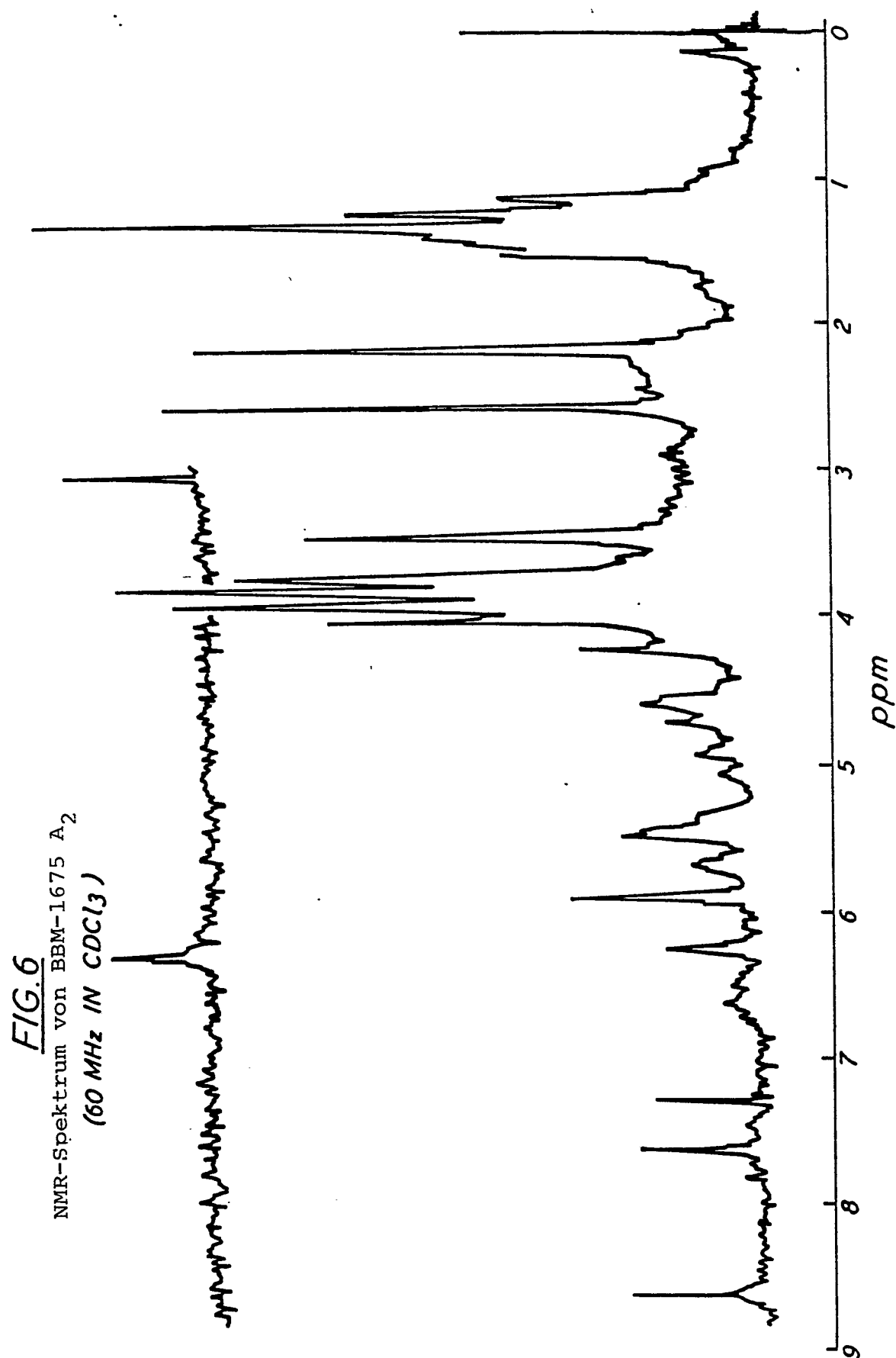


FIG. 7

NMR-Spektrum von BBM-1675 A_3
(60 MHz IN CDCl_3)

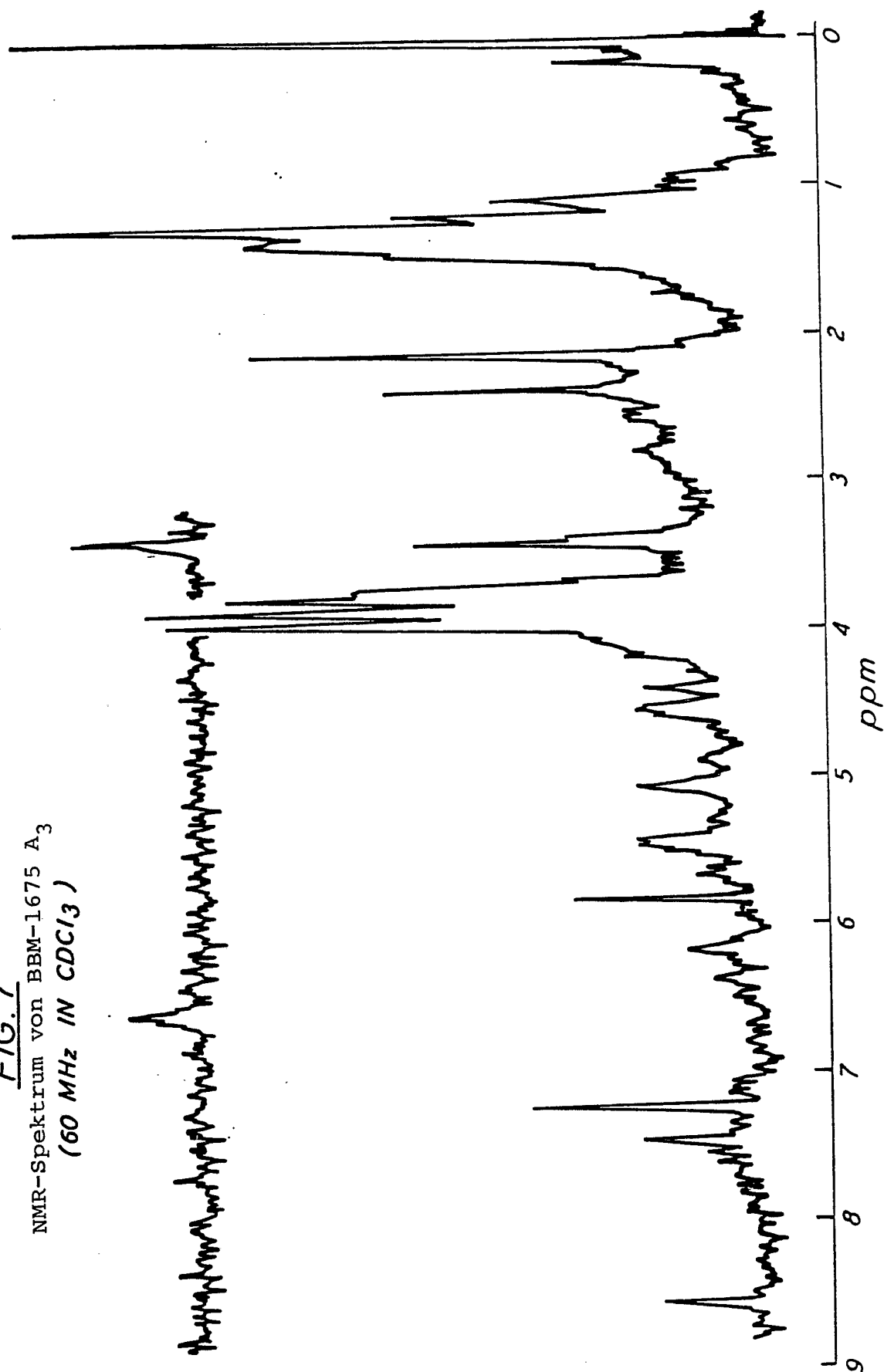


FIG. 8
NMR-Spektrum von BBM-1675 A₄
(60 MHz IN CDCl₃)

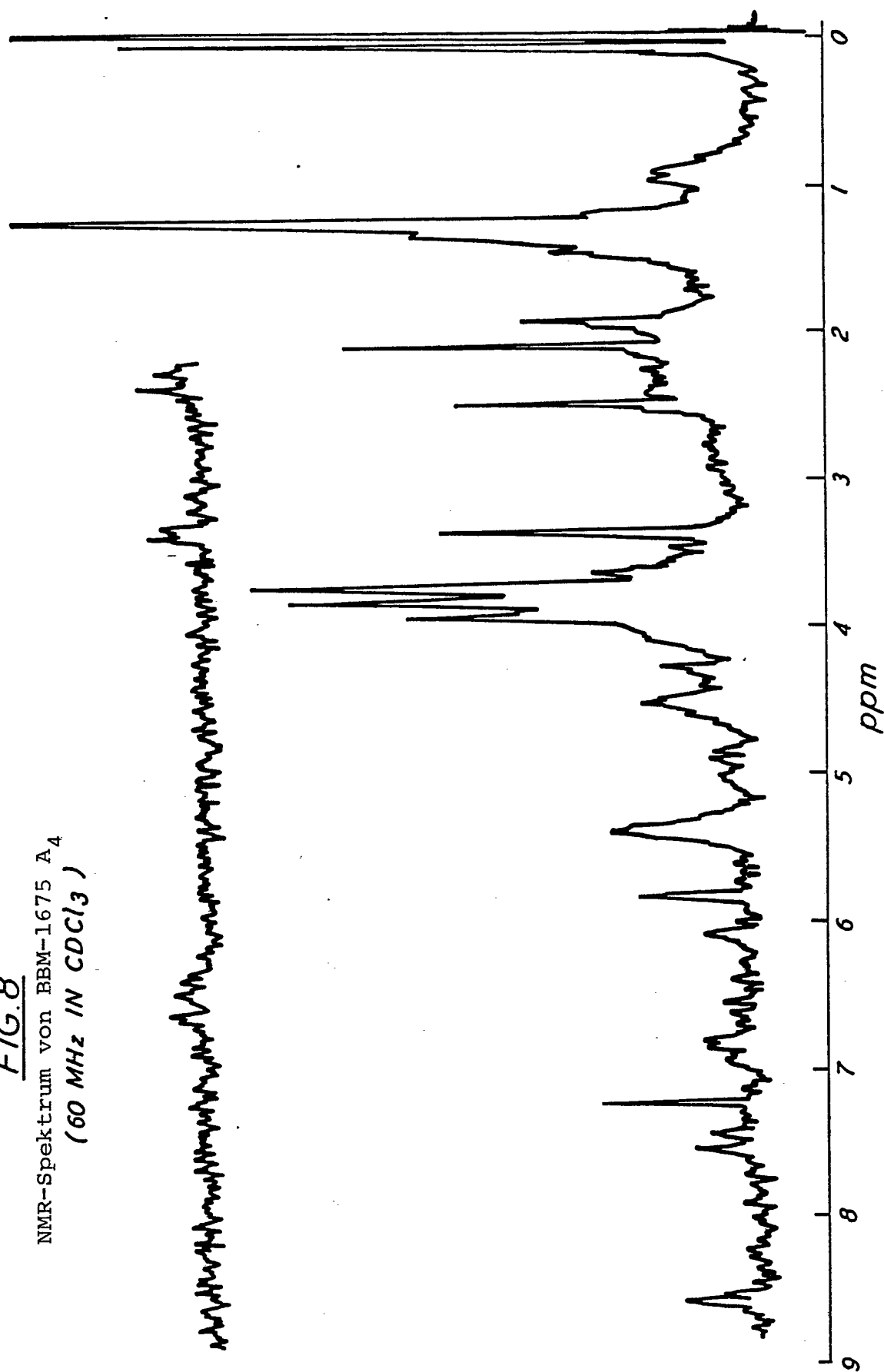


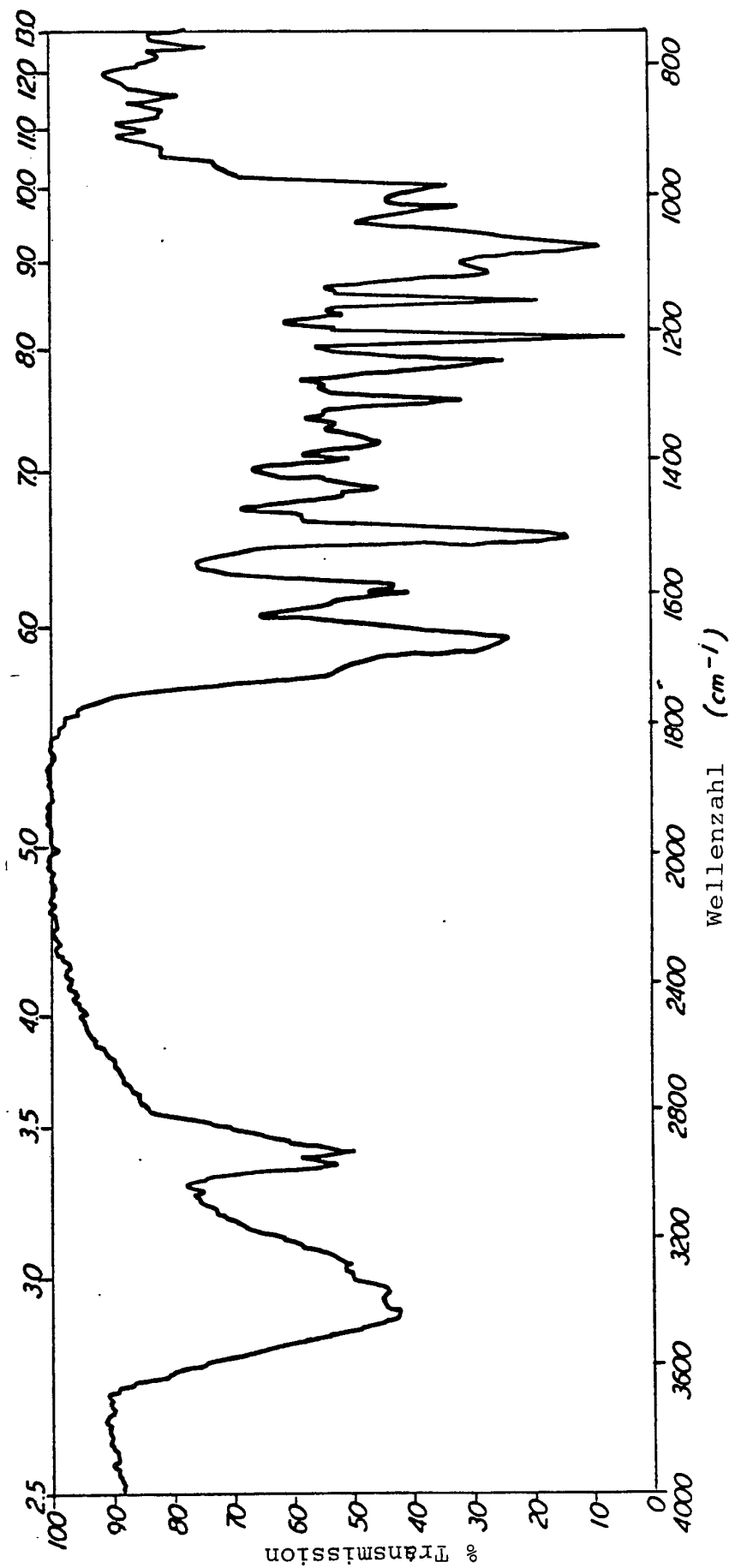
FIG. 9IR-Absorptionsspektrum von gereinigtem BBM-1675 A₁ in KBrWellenlänge in μm 

FIG.10

PMR-Spektrum von gereinigtem BBM-1675 A₁
(360 MHz IN CDCl₃)

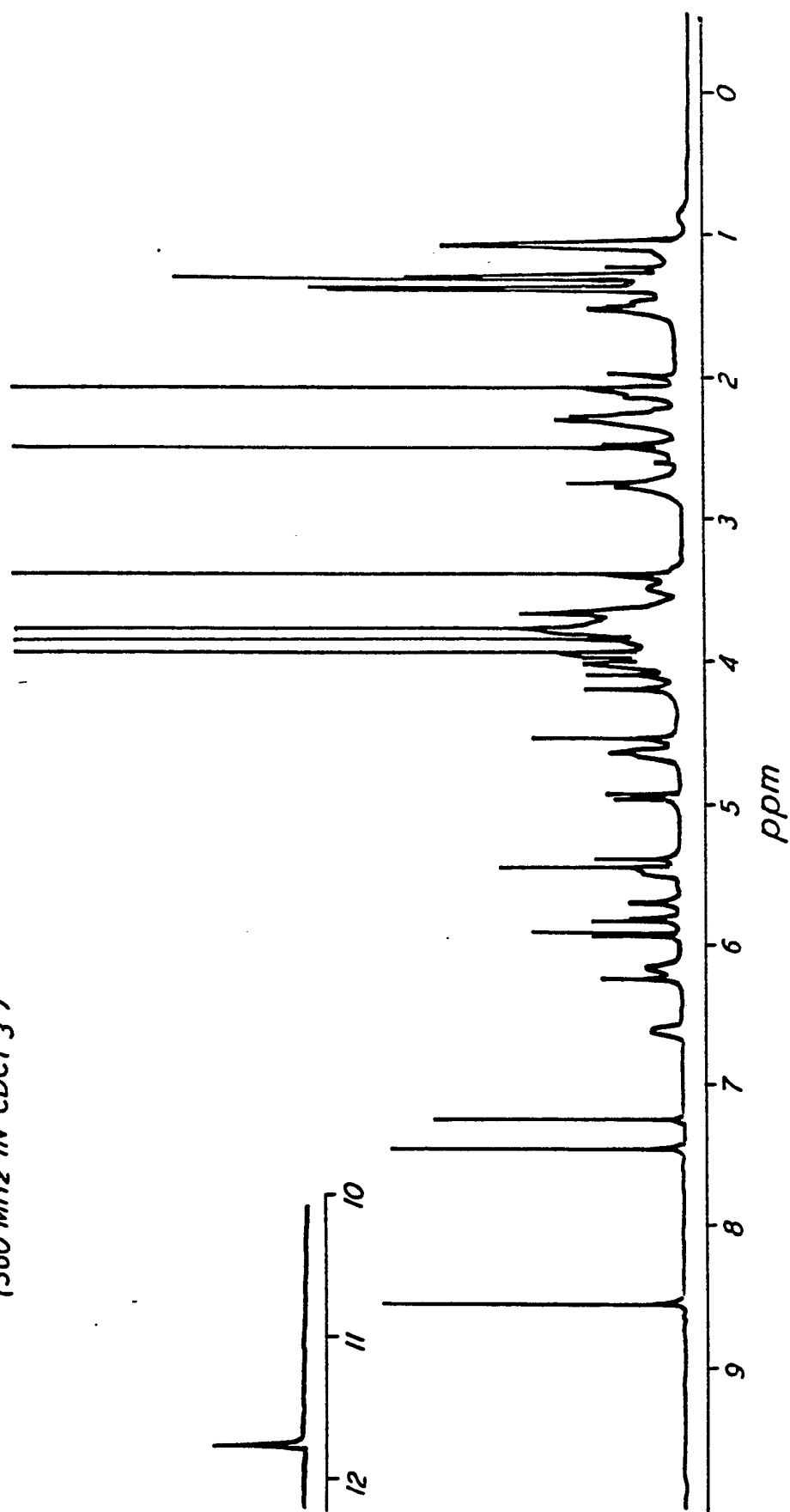


FIG. II

^{13}C NMR-Spektrum von gereinigtem BBM-1675 A₁
(90.3 MHz IN CDCl_3)

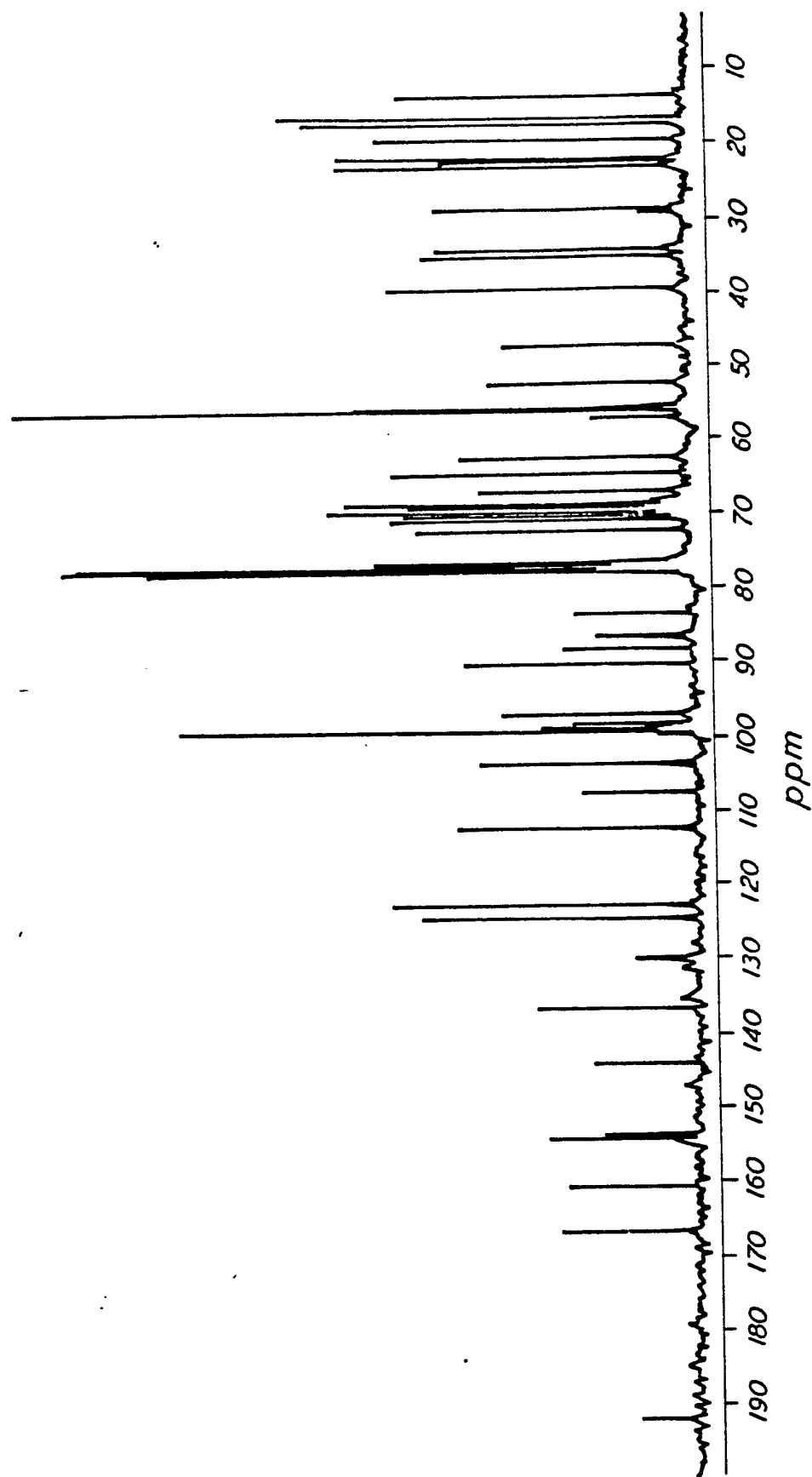


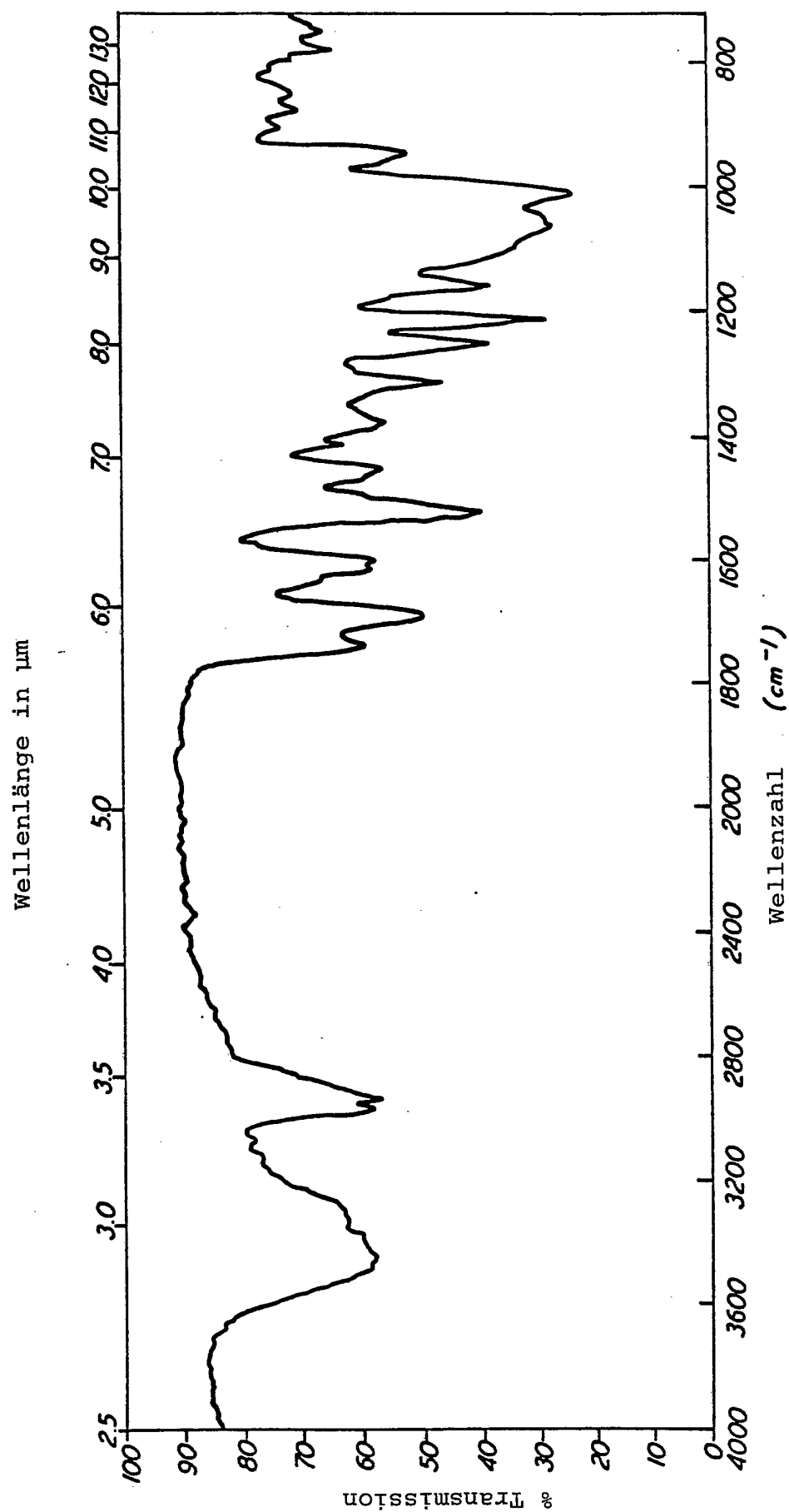
FIG. 12IR-Absorptionsspektrum von gereinigtem BBM-1675 A₂ in KBr

FIG. 13

PMR-Spektrum von gereinigtem BBM-1675 A₂
(360 MHz in CDCl₃)

