

## Ausschliessungspatent

Erteilt gemaeß § 5 Absatz 1 des Aenderungsgesetzes  
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11) 155 250

Int.Cl.<sup>3</sup> 3(51) C 12 P 21/00

## AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21)	AP C 12 P/ 226 034	(22)	12.12.80	(44)	26.05.82
(31)	103121;103268	(32)	13.12.79;13.12.79	(33)	US;US
	103017;103016		13.12.79;13.12.79		US;US
	103313;181437		13.12.79;25.08.80		US;US
	181449;181029		25.08.80;25.08.80		US;US
	181443;181036		25.08.80;25.08.80		US;US

(71) siehe (73)

(72) ABBOTT, BERNARD J.;FUKUDA, DAVID;US;

(73) ELI LILLY AND CO, INDIANA;US;

(74) PATENTANWALTSBUERO BERLIN, 1130 BERLIN, FRANKFURTER ALLEE 286

## (54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG CYCLISCHER PEPTIDKERNE

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung cyclischer Peptidkerne und ihrer Saureadditionssalze, die sich als Zwischenprodukte zur Herstellung semisynthetischer antifungal wirksamer Mittel eignen. Erfindungsgemaeß wird in einem waessrigen Medium ein geeignetes cyclisches Peptidantibiotikum mit einem durch einen Mikroorganismus aus der Familie Actinoplanaceae gebildeten deacylierenden Enzym umgesetzt. Ein geeignetes Peptidantibiotikum ist das Antibiotikum A-30912 Faktor A oder das als Tetrahydro-A-30912 Faktor A bekannte Antibiotikum. Ein geeigneter Mikroorganismus ist beispielsweise Streptosporangium roseum var oder Actinoplas sp. NRRL 12 065.

- 1 - 226034

Vertreter:

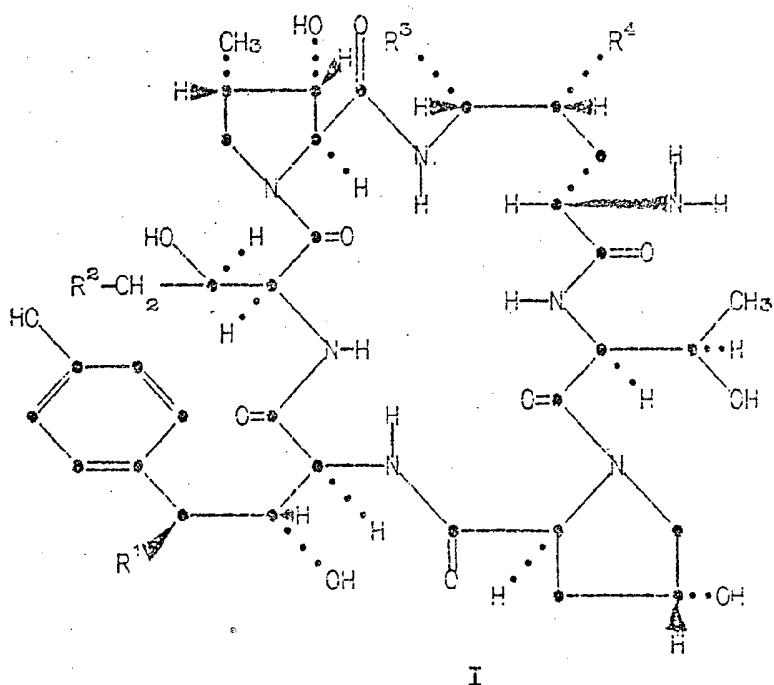
Patentanwaltsbüro Berlin

Titel der Erfindung:

Verfahren zur Herstellung cyclischer Peptidkerne

Anwendungsgebiet der Erfindung:

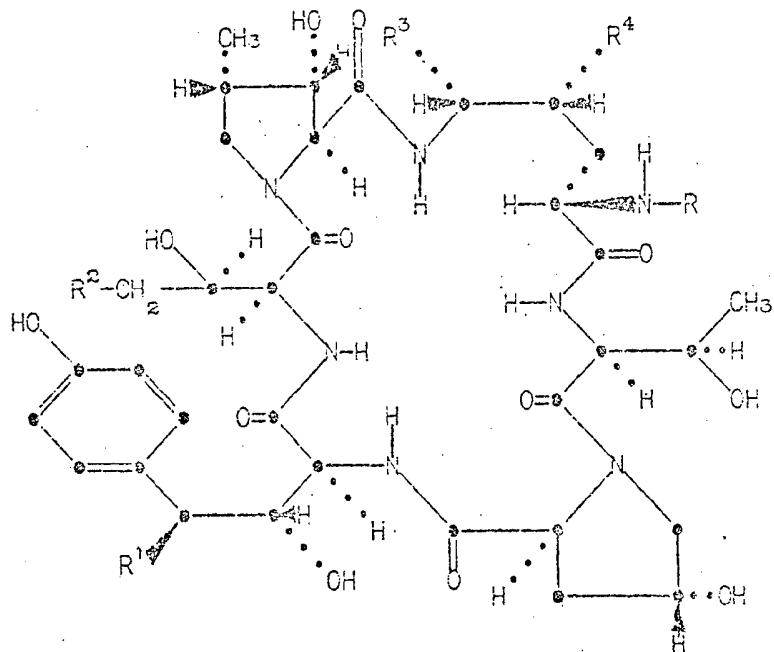
Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung cyclischer Peptidkerne der allgemeinen Formel I



und ihrer Säureadditionsalze.

Die obigen cyclischen Peptidkerne und ihre Säureadditionsalze eignen sich als Zwischenprodukte zur Herstellung semi-synthetischer antifungal wirksamer Mittel.

Die obigen cyclischen Peptidkerne werden hergestellt durch Deacylierung eines cyclischen Peptidantibiotikums der allgemeinen Formel II



II

worin R für eine gesättigte oder ungesättigte Fettsäureseitenkette steht und R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> sowie R<sup>4</sup> Substituenten mit den später angegebenen Bedeutungen sind.

Das obige Verfahren beruht auf einer enzymatischen Entfernung der Fettsäureseitenkette R unter Bildung des entsprechenden cyclischen Peptidkerns. Dieses Verfahren besteht darin, daß man auf das Antibiotikum in einem wäßrigen Medium ein von einem Mikroorganismus aus der Familie Actinoplanaceae gebildetes Enzym solange einwirken läßt, bis eine wesentliche Deacylierung erfolgt ist.

Für die erfindungsgemäße Abspaltung der Fettsäureseitenkette wird vorzugsweise ein Enzym verwendet, das vom Mikroorganismus *Actinoplanes utahensis* NRRL 12052 gebildet wird. Die De-

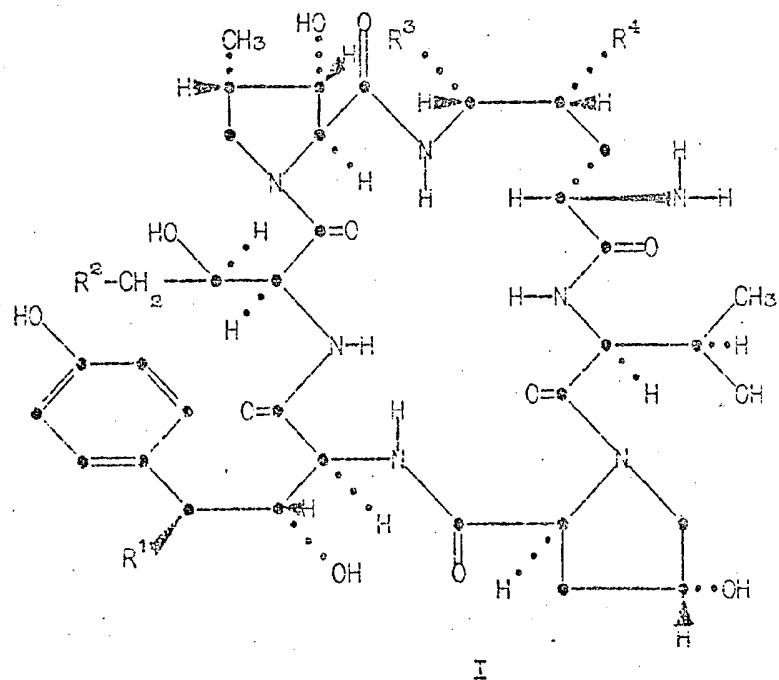
acylierung wird gewöhnlich durchgeführt, indem man das jeweilige Antibiotikum zu einer Kultur von Actinoplanes utahensis gibt und die Kultur bis zur Beendigung der Deacylierung inkubieren lässt. Die hierbei erhaltenen Kerne werden durch bekannte Methoden aus der Fermentationsbrühe abgetrennt. Die besondere Bedeutung dieser Kerne ist darin zu sehen, daß sich durch ihre Reacylierung interessante neue antibiotisch wirksame Substanzen herstellen lassen.

Aufgabe der Erfindung:

Der Erfindung liegt obigen Angaben zufolge die Aufgabe zugrunde, ein besonders elegantes und wirksames Verfahren zur Herstellung cyclischer Peptidkerne zu schaffen, aus denen sich dann neue Antibiotika mit besonders interessanter Wirkung herstellen lassen.

Darlegung des Wesens der Erfindung:

Die obige Aufgabe wird erfindungsgemäß nun gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung cyclischer Peptidkerne der allgemeinen Formel I



worin R<sup>1</sup> für H oder OH steht,

wobei R<sup>2</sup> für H steht und R<sup>3</sup> sowie R<sup>4</sup> jeweils H oder jeweils OH sind, falls R<sup>1</sup> für H steht,

oder wobei R<sup>2</sup> für H steht, R<sup>3</sup> für OH oder C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> Alkyl-oxy steht und R<sup>4</sup> für OH steht, oder R<sup>2</sup> für O  
"C-NH<sub>2</sub> steht und R<sup>3</sup> sowie R<sup>4</sup> jeweils für OH stehen, falls R<sup>1</sup> für OH steht,

und den Säureadditionssalzen hiervon.

Bei einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Kerne bedeuten R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> jeweils OH, während R<sup>2</sup> für H steht. Dieser Kern ist als A-30912A Kern bekannt. Der A-30912A Kern wird hergestellt durch Deacylierung eines cyclischen Peptidantibiotikums aus der allgemeinen Formel II, worin R Linoleyl Stearoyl oder Palmitoyl bedeutet und R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> sowie R<sup>4</sup> die gleichen Bedeutungen wie im A-30912A Kern haben.

Steht R im cyclischen Peptidantibiotikum der allgemeinen Formel II für Linoleyl dann handelt es sich hierbei um das bekannte Antibiotikum A-30912 Faktor A. Bedeutet R darin Stearoyl, dann handelt es sich hierbei um das als Tetrahydro-A-30912 Faktor A bekannte Antibiotikum. Steht R für Palmitoyl, dann handelt es sich hierbei um das unter Aculeacin A bekannte Antibiotikum.

#### A-30912 Faktor A

A-30912 Faktor A ist ein Faktor aus dem A-30912 Gemisch, das ferner auch noch die Faktoren B, C, D, E, F und G enthält. Das A-30912 Gemisch und die einzelnen Faktoren A bis G gehen aus US-PS 4 024 245 hervor. Das Antibiotikum A-30912 Faktor A ist identisch mit dem Antibiotikum A-22802, welches in US-PS 4 024 246 beschrieben ist.

Aus US-PS 4 024 245 und US-PS 4 024 246 ergibt sich, daß A-30912 Faktor A identisch ist mit dem Antibiotikum Echinocandin B siehe Helv. Chim. Acta 57, 2459 bis 2477 (1974) und CH-PS 568 386/. Das Antibiotikum SL 7810/F ist ferner auch identisch mit Echinocandin B Tetrahedron Letters 1976 (46), 4147 bis 4150 und BE-PS 834 289/.

In Tetrahedron Letters 1976 (46), 4147 bis 4150 wird für das Antibiotikum A-30912 Faktor A die Struktur der Formel II vorgeschlagen, worin R Linoleyl bedeutet, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> jeweils OH sind und R<sup>2</sup> für H steht.

#### Tetrahydro-A-30912 Faktor A

Tetrahydro-A-30912 Faktor A (Tetrahydro-SL 7810/F, Tetrahydroechinocandin B), das in BE-PS 834 289 und in Helv. Chim. Acta 57, 2459 bis 2477 (1974) beschrieben wird, hat die Struktur der Formel II, worin R Stearoyl bedeutet, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> jeweils OH sind und R<sup>2</sup> für H steht. Dieses Material wird einfach als Tetrahydro-A-30912A bezeichnet.

#### Aculeacin A

Aculeacin A ist ein Bestandteil des Aculeacin-Gemisches, das aus einem überwiegenden Bestandteil (Aculeacin A) und sechs in geringerer Menge vorhandenen Bestandteilen (Aculeacine B, C, D, E, F und G) besteht. Die Bestandteile des Aculeacins gehen aus US-PS 3 978 210 hervor. Gemäß BE-PS 859 067 hat Aculeacin A möglicherweise die gleiche cyclische Peptidstruktur wie Tetrahydro-A-30912, wobei die Stearoylseitenkette jedoch durch Palmitoyl ersetzt ist.

#### A-30912A Kern

Der obige neue cyclische Peptidkern, nämlich der Kern von

A-30912 Faktor A (Echinocandin B, SL 7810/F), Tetrahydro-A-30912 Faktor A und Aculeacin A, hat die Struktur der Formel I, worin R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> jeweils OH sind und R<sup>2</sup> für H steht.

Dieser Kern (A-30912A Kern) ist ein weißes amorphes Material, das in Lösungsmitteln, wie Wasser, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid und Methanol löslich ist, sich in Lösungsmitteln, wie Chloroform, Toluol oder Diethylether, jedoch nicht löst.

Der A-30912A Kern hat die empirische Formel C<sub>34</sub>H<sub>51</sub>N<sub>7</sub>O<sub>15</sub> und ein Molekulargewicht von 797,83.

Das IR-Absorptionsspektrum von A-30912A Kern in KBr-Scheiben geht aus der beigefügten Figur 1 hervor. Es weist folgende Absorptionsmaxima auf: 3340 breit (OH, H-gebunden), 2970, 2930 und 2890 (CH-Streckung, aliphatisch in CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>, CH Gruppen), 1660 und 1625 (mehrere Carbonyle C=O), 1510-1550, 1430-1450 (CH Bewegung), 1310-1340, 1230-1260, 1080, 835, 650 breit und 550 breit cm<sup>-1</sup>.

Die elektrometrische Titration von A-30912A Kern in 66 %-igem wässrigem Dimethylformamid zeigt die Gegenwart einer titrierbaren Gruppe mit einem pK<sub>a</sub>-Wert von etwa 7,35 (anfänglicher pH-Wert = 7,32).

Der A-30912A Kern lässt sich durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) abtrennen. A-30912A Kern hat eine ungefähre Verweilzeit (k') von 11,52 Minuten bei einer hochleistungsflüssigkeitschromatographischen Abtrennung unter folgenden Bedingungen:

Säule: 4 x 300 mm  
Füllung: Silicagel/C<sub>18</sub>  
Lösungsmittel: Gemisch aus Ammoniumacetat, Acetonitril und Wasser (1:2:97)  
Strömungsgeschwindigkeit: 3 ml/min  
Druck: 175 bar  
Detektor: UV-Licht mit veränderlicher Wellenlänge von 230 nm  
Empfindlichkeit: 0 bis 0,4 A.U.F.S.

Herstellung von A-30912A Kern

Herstellung des Substrats

Der erfindungsgemäße A-30912A Kern lässt sich herstellen aus A-30912 Faktor A, Tetrahydro-A-30912 Faktor A oder Aculeacin A. Diese Substrate können in Form gereinigter Materialien eingesetzt werden, wobei eine Reinigung jedoch nicht unbedingt notwendig ist. Als Substrat zur Herstellung von A-30912A Kern kann man daher beispielsweise A-30912 Gemisch verwenden, worin A-30912 Faktor A der überwiegende Bestandteil ist.

A-30912 Faktor A

A-30912 Faktor A kann durch submerse aerobe Fermentation folgender Organismen hergestellt werden: 1) Einem Stamm von Aspergillus rugulosus NRRL 8113, 2) einem Stamm von Aspergillus nidulans NRRL 8112, 3) einem Stamm von Aspergillus nidulans var. echinulatus A-32204, NRRL 3860, 4) einem Stamm von Aspergillus rugulosus NRRL 8039 oder 5) einem Stamm von Aspergillus nidulans var. roseus, NRRL 11440.

Verwendet man zur Herstellung von A-30912 Faktor A einen Stamm von Aspergillus nidulans var. roseus NRRL 11440, dann gelangt man zu einem Gemisch aus verschiedenen Faktoren, welches einfach als A-42355 Antibiotikumgemisch bezeichnet wird. Der A-30912 Faktor A ist dabei der überwiegende Faktor des A-42355 Antibiotikumgemisches. Die A-30912 Faktoren B, D und H sind in dem A-42355 Gemisch demgegenüber in geringerer Menge vorhanden.

Tetrahydro-A-30912A

Tetrahydro-A-30912A lässt sich aus A-30912 Faktor A durch übliche Hydrierung herstellen, indem man diese Reduktion solange durchführt, bis beide Doppelbindungen der Linoleylseitenkette reduziert sind.

Aculeacin A

Aculeacin A wird durch Fermentation eines Stamms von Aspergillus aculeatus NRRL 8075 nach dem in US-PS 3 978 210 beschriebenen Verfahren hergestellt.

Bei einer anderen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Kerne bedeuten R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> jeweils H, während R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> jeweils für OH stehen. Dieser Kern ist als A-30912B Kern bekannt. A-30912B Kern wird hergestellt durch Deacylierung eines cyclischen Peptidantibiotikums der Formel II, worin R Linoleyl oder Stearoyl bedeutet und R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> sowie R<sup>4</sup> die gleichen Bedeutungen wie im A-30912B Kern haben.

Steht der Substituent R im cyclischen Peptidantibiotikum der Formel II für Linoleyl, dann ist dieses Antibiotikum als A-30912 Faktor B bekannt. Bedeutet der Substituent R dagegen Stearoyl, dann handelt es sich hierbei um das Antibiotikum Tetrahydro-A-30912 Faktor B.

A-30912 Faktor B

A-30912 Faktor B ist ein Faktor des A-30912 Gemisches, das auch die Faktoren A, C, D, E, F und G enthält. Das A-30912 Gemisch wird in US-PS 4 024 245 beschrieben.

Es hat sich gezeigt, daß A-30912 Faktor B identisch ist mit dem Antibiotikum Echinocandin C siehe Helv. Chim. Acta 62, 1252 bis 1267 (1979) und mit dem Antibiotikum SL 7810/F-II (BE-PS 834 289).

In Helv. Chim. Acta 62, 1252 bis 1267

wird für das Antibiotikum Echinocandin C die Struktur der Formel II vorgeschlagen, worin R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> jeweils H sind, R<sup>3</sup> sowie R<sup>4</sup> jeweils OH bedeuten und R für Linoleyl steht. Für das Antibiotikum Tetrahydroechinocandin C wird in dieser Literatur die Struktur der Formel II vorgeschlagen, worin R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> jeweils H sind, R<sup>3</sup> sowie R<sup>4</sup> jeweils OH bedeuten und R für Stearoyl steht.

Tetrahydro-A-30912 Faktor B

Tetrahydro-A-30912 Faktor B (Tetrahydro-SL 7810/F-II, Tetrahydroechinocandin C), das in BE-PS 834 289 und Helv. Chim. Acta 62, 1252 bis 1267 (1979) beschrieben wird, hat die Struktur der Formel II, worin R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> jeweils H ist, R<sup>3</sup> sowie R<sup>4</sup> jeweils OH bedeuten und R für Stearoyl steht. Dieses Material wird einfach als Tetrahydro-A-30912B bezeichnet.

A-30912B Kern

Der neue cyclische Peptidkern dieser Ausführungsform, nämlich der Kern von A-30912 Faktor B (Echinocandin C, SL 7810/F-II) und von Tetrahydro-A-30912B, hat die Struktur der Formel I, worin R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> jeweils H sind und R<sup>3</sup> sowie R<sup>4</sup> jeweils für OH stehen.

A-30912B Kern hat die empirische Formel  $C_{34}H_{51}N_7O_{14}$  und weist ein Molekulargewicht von 781,83 auf.

Herstellung von A-30912B Kern

Herstellung des Substrats

Der A-30912B Kern kann hergestellt werden aus A-30912 Faktor B oder Tetrahydro-A-30912B. Da A-30912 Faktor B nicht der überwiegende Bestandteil des Antibiotikumgemisches ist, in dem er gebildet wird, soll dieses Gemisch so gereinigt werden, daß die anderen gleichzeitig gebildeten Faktoren entfernt werden, bevor man das Material als Substrat verwendet.

A-30912 Faktor B

A-30912 Faktor B kann durch submerse aerobe Fermentation folgender Organismen hergestellt werden: 1) Einem Stamm von Aspergillus rugulosus NRRL 8113,  
2) einem Stamm von Aspergillus nidulans var. echinulatus A-32204, NRRL 3860, 3) einem Stamm von Aspergillus rugulosus NRRL 8039 oder 4) einem Stamm von Aspergillus nidulans var. roseus, NRRL 11440.

Verwendet man zur Herstellung von A-30912 Faktor B einen Stamm von Aspergillus nidulans var. roseus NRRL 11440, dann gelangt man zu einem Gemisch aus verschiedenen Faktoren, welches einfach als A-42355 Antibiotikumgemisch bezeichnet wird. Der A-30912 Faktor A ist dabei der überwiegende Faktor des A-42355 Antibiotikumgemisches. Die A-30912 Faktoren B, D und H sind in dem A-42355 Gemisch demgegenüber in geringerer Menge vorhanden.

Tetrahydro-A-30912 B

Tetrahydro-A-30912B lässt sich aus A-30912 Faktor B durch übliche Hydrierung herstellen, indem man diese Reduktion solange durchführt, bis beide Doppelbindungen der Linoleylseitenkette reduziert sind.

Bei einer anderen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Kerne sind  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  und  $R^4$  jeweils H. Der Kern dieser Ausführungsform ist als A-30912D bekannt. A-30912D wird hergestellt durch Deacylierung eines cyclischen Peptidantibiotikums der Formel II, worin R Linoleyl oder Stearoyl bedeutet und  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  sowie  $R^4$  gleich sind wie beim A-30912D Kern.

Steht im cyclischen Peptidantibiotikum der Formel II der Substituent R für Linoleyl, dann handelt es sich bei diesem Antibiotikum um A-30912 Faktor D. Bedeutet R dagegen Stearoyl, dann wird dieses Antibiotikum als Tetrahydro-A-30912 Faktor D bezeichnet.

#### A-30912 Faktor D

A-30912 Faktor D ist ein Faktor des A-30912 Gemisches, das auch noch die Faktoren A, B, C, E, F und G enthält. Das A-30912 Gemisch wird in US-PS 4 024 245 beschrieben.

Es hat sich gezeigt, daß A-30912 Faktor D identisch ist mit dem Antibiotikum Echinocandin D siehe Helv. Chim. Acta 62, 1252 bis 1267 (1979) und mit dem Antibiotikum SL 7810/F-III (BE-PS 834 289).

In Helv. Chim. Acta 62, 1252 bis 1267 (1979) wird für das Antibiotikum Echinocandin D die Struktur der Formel II vorgeschlagen, worin  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  sowie  $R^4$  jeweils H sind und R für Linoleyl steht. Für das Antibiotikum Tetrahydroechinocandin D wird darin die Struktur der Formel II vorgeschlagen, worin  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  sowie  $R^4$  jeweils H sind und R Stearoyl bedeutet.

Tetrahydro-A-30912 Faktor D (Tetrahydro-SL 7810/F-III, Tetrahydroechinocandin D) wird vorliegend einfach als Tetrahydro-A-30912D bezeichnet.

A-30912D Kern

Der neue cyclische Peptidkern dieser Ausführungsform, nämlich der Kern von A-30912 Faktor D (Echinocandin D, SL 7810/F-III) und von Tetrahydro-A-30912D hat die Struktur von Formel I, worin R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> jeweils H sind.

A-30912D Kern hat die empirische Formel C<sub>34</sub>H<sub>51</sub>N<sub>7</sub>O<sub>12</sub> und weist ein Molekulargewicht von 749,83 auf.

Herstellung von A-30912D Kern

Herstellung des Substrats

Der A-30912D Kern kann hergestellt werden aus A-30912 Faktor D oder Tetrahydro-A-30912D. Da A-30912 Faktor D nicht der überwiegende Bestandteil des Antibiotikumgemisches ist, in dem er gebildet wird, soll dieses Gemisch so gereinigt werden, daß die anderen gleichzeitig gebildeten Faktoren entfernt werden, bevor man das Material als Substrat verwendet.

A-30912 Faktor D

A-30912 Faktor D kann durch submerse aerobe Fermentation folgender Organismen hergestellt werden: 1) Einem Stamm von Aspergillus rugulosus NRRL 8113, 2) einem Stamm von Aspergillus nidulans var. echinulatus A-32204, NRRL 3860, 3) einem Stamm von Aspergillus rugulosus NRRL 8039 oder 4) einem Stamm von Aspergillus nidulans var. roseus, NRRL 11440.

Verwendet man zur Herstellung von A-30912 Faktor D einen Stamm von Aspergillus nidulans var. roseus NRRL 11440, dann gelangt man zu einem Gemisch aus verschiedenen Faktoren, welches einfach als A-42355 Antibiotikumgemisch bezeichnet wird. Der A-30912 Faktor A ist dabei der überwiegende Faktor des A-42355 Antibiotikumgemisches. Die A-30912 Faktoren, B, D und H sind in dem A-42355 Gemisch demgegenüber in geringerer Menge vorhanden.

Tetrahydro-A-30912D

Tetrahydro-A-30912D lässt sich aus A-30912 Faktor D durch übliche Hydrierung herstellen, indem man diese Reduktion so lange durchführt, bis beide Doppelbindungen der Linoleylseitenkette reduziert sind.

Bei einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Kerne bedeuten  $R^1$  und  $R^4$  jeweils OH, während  $R^2$  für H steht und  $R^3$  für  $C_1-C_6$  Alkyloxy steht. Die Kerne dieser Ausführungsform sind als A-30912H Kerne bekannt. Die A-30912H Kerne werden hergestellt durch Deacylierung eines cyclischen Peptidantibiotikums der Formel II, worin R Linoleyl oder Stearoyl ist und  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  sowie  $R^4$  die gleichen Bedeutungen haben wie in den A-30912H Kernen.

Steht im cyclischen Peptidantibiotikum der Formel II der Substituent R für Linoleyl und bedeutet  $R^3$  Methoxy, dann wird dieses Antibiotikum als A-30912 Faktor H bezeichnet. Ist R dagegen Stearoyl und bedeutet  $R^3$  Methoxy, dann wird dieses Antibiotikum als Tetrahydro-A-30912 Faktor H bezeichnet.

Ist im cyclischen Peptidantibiotikum der Formel II der Substituent R Linoleyl und steht darin der Substituent  $R^3$  für  $C_2-C_6$  Alkyloxy, dann werden diese Antibiotika als niedere

Alkyloxyhomologe von A-30912 Faktor H bezeichnet. Bedeutet der Substituent R dagegen Stearoyl und steht der Substituent R<sup>3</sup> für C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> Alkyloxy, dann handelt es sich bei diesen Antibiotika um die niederen Alkyloxyhomologen von Tetrahydro-A-30912 Faktor H.

A-30912 Faktor H

A-30912 Faktor H ist ein Faktor aus dem A-30912 Gemisch, das ferner auch die Faktoren A, C, D, E, F und G enthält. Das A-30912 Gemisch wird in US-PS 4 024 245 beschrieben. A-30912 Faktor H ist ein später aufgefunder A-30912 Faktor. A-30912 Faktor H wird beschrieben in der amerikanischen Patentanmeldung Nr. 117 739 vom 1. Februar 1980 von Karl H. Michel mit dem Titel ANTIBIOTIC A-30912 FACTOR H, und bei dieser Anmeldung handelt es sich um eine continuation-in-part-Anmeldung mit der Serialnummer 46 875 vom 8. Juni 1979 (zwischenzeitlich fallengelassen).

Homologe von A-30912 Faktor H

Nach Entdeckung der Struktur von A-30912 Faktor H wurde auch erkannt, daß die niederen Alkyloxyhomologen von A-30912 Faktor H wertvolle Produkte sind. Vor dieser Zeit wurde den bereits hergestellten Alkyloxyderivaten keine brauchbare Anwendung beigemessen, so daß diese Verbindungen lediglich als Mittel zur Strukturbestimmung hergestellt wurden. Die niederen C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> Alkyloxyhomologen von A-30912 Faktor H werden aus A-30912 Faktor A hergestellt.

A-30912 Faktor A kann durch submerse aerobe Fermentation folgender Organismen hergestellt werden: 1) Einem Stamm von Aspergillus rugulosus NRRL 8113, 2) einem Stamm von Aspergillus nidulans NRRL 8112, 3) einem Stamm von Aspergillus nidulans var. echinulatus A-32204, NRRL 3860, 4) einem Stamm von

Aspergillus rugulosus NRRL 8039 (BE-PS 834 289) oder 5) einem Stamm von Aspergillus nidulans var. roseus, NRRL 11440.

Jeder A-30912H Kern enthält eine Aminogruppe, so daß er auch Salze bilden kann. Solche Salze eignen sich als Zwischenprodukte und zu Reinigungszwecken. Die pharmazeutisch unbedenklichen Salze der A-30912H Kerne sind besonders brauchbar, da in einem solchen Fall die Endprodukte nur minimal gereinigt zu werden brauchen. Unter pharmazeutisch unbedenklichen Salzen werden Salze verstanden, bei denen die Toxizität des Produkts insgesamt gegenüber warmblütigen Tieren nicht erhöht ist.

Säureadditionssalze der A-30912H Kerne lassen sich durch übliche Umsetzung mit einer anorganischen oder organischen Säure bilden. Zu Beispielen für hierzu geeignete anorganische oder organische Säuren gehören Chlorwasserstoffsäure, Bromwasserstoffsäure, Iodwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Essigsäure, Benzoesäure, Sulfaminsäure, Weinsäure, Zitronensäure, Maleinsäure, Bernsteinsäure, Ascorbinsäure, Glykolsäure, Milchsäure, Fumarsäure, Palmitinsäure, Cholsäure, Pamoesäure, Mucinsäure, D-Glutaminsäure, d-Camphersäure, Glutarsäure, Phthalsäure, Laurinsäure, Stearinsäure, Salicylsäure, Methansulfonsäure, Benzolsulfonsäure, Sorbinsäure, Picrinsäure oder Zimtsäure.

#### Herstellung von A-30912H Kernen

##### Herstellung des Substrats

Der A-30912H Kern, nämlich die Verbindung der Formel I, worin R<sup>1</sup> und R<sup>4</sup> jeweils OH bedeuten, R<sup>2</sup> für H steht und R<sup>3</sup> Methoxy ist, kann aus A-30912 Faktor H oder Tetrahydro-A-30912H hergestellt werden. Da A-30912 Faktor H kein überwiegender Bestandteil des Antibiotikumgemisches ist, in dem dieser Faktor gebildet wird, sollte man das Produkt vor der Verwendung

als Substrat soweit reinigen, daß die anderen gleichzeitig gebildeten antibiotischen Faktoren entfernt werden.

Die Substrate zur Herstellung der A-30912H Kerne der Formel I, worin R<sup>1</sup> und R<sup>4</sup> jeweils OH bedeuten, R<sup>2</sup> für H steht und R<sup>3</sup> für C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> Alkyloxy steht (nämlich die A-30912H Homologen) werden hergestellt durch Umsetzen von A-30912 Faktor A oder Tetrahydro-A-30912A mit einem entsprechenden Alkohol, wodurch das jeweilige C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> Alkyloxyderivat entsteht. A-30912 Faktor A ist der überwiegende Bestandteil des Antibiotikumgemisches, in dem dieser Faktor gebildet wird, so daß dieses Verfahren auch ein bevorzugter Weg zur Herstellung von A-30912 Faktor H und Tetrahydro-A-30912H ist.

#### A-30912 Faktor H

A-30912 Faktor H läßt sich durch submerse aerobe Fermentation eines Stammes von Aspergillus rugulosus NRRL 8113 oder eines Stammes von Aspergillus nidulans var. roseus NRRL 11440 herstellen.

Verwendet man zur Bildung von A-30912 Faktor H einen Stamm von Aspergillus nidulans var. roseus NRRL 11440, dann gelangt man zu einem Gemisch an Faktoren, welches als A-42355 Antibiotikumgemisch bezeichnet wird. A-30912 Faktor A ist der überwiegende Faktor des A-42355 Antibiotikumgemisches. A-30912 Faktoren B, D und H sind die im A-42355 Gemisch in geringerer Menge vorhandenen Faktoren.

#### A-30912H Homologe

Die A-30912H Homologen werden hergestellt durch Umsetzen von A-30912 Faktor A oder Tetrahydro-A-30912A mit dem geeigneten entsprechenden Alkohol, wodurch das gewünschte Alkyloxyderivat der Formel II entsteht, worin R<sup>1</sup> und R<sup>4</sup> jeweils OH bedeuten, R<sup>2</sup> für H steht und R<sup>3</sup> für C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> Alkyloxy steht. Diese

Arbeitsweise stellt ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung von A-30912 Faktor H und Tetrahydro-A-30912H dar. Die A-30912H Homologen der Formel II, worin R Stearoyl und R<sup>3</sup> für C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> Alkyloxy steht, können hergestellt werden, indem man entweder (a) zuerst Tetrahydro-A-30912A herstellt und dieses dann durch Umsetzen mit dem geeigneten Alkohol in das entsprechende Alkyloxyderivat überführt oder (b) den A-30912 Faktor A durch Umsetzen mit dem entsprechenden Alkohol in das Alkyloxyderivat überführt und anschließend die Doppelbindungen der Linoleylseitenkette reduziert.

#### Tetrahydroderivate

Tetrahydro-A-30912A, Tetrahydro-A-30912H und die Verbindungen der Formel II, worin R<sup>3</sup> für C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> Alkyloxy steht und R Stearoyl bedeutet, werden aus A-30912 Faktoren A und H und aus den Verbindungen der Formel II, worin R<sup>3</sup> für C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> Alkyloxy steht und R Linoleyl bedeutet, durch übliche Hydrierung hergestellt, wobei man diese Reduktion solange fortführt, bis beide Doppelbindungen der Linoleylseitenkette reduziert sind.

Bei einer wiederum weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Kerne bedeuten R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> jeweils OH und steht R<sup>2</sup> für Carboxamid. Der Kern dieser Ausführungsform ist als S 31794/F-1 Kern bekannt. Der S 31794/F-1 Kern wird hergestellt durch Deacylieren eines cyclischen Peptidantibiotikums der Formel II, worin R Myristoyl bedeutet und R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> sowie R<sup>4</sup> gleich sind wie beim S 31794/F-1 Kern.

#### S 31794/F-1

Zur Herstellung des erfindungsgemäßen S 31794/F-1 Kerns deacyliert man das cyclische Peptidantibiotikum S 31794/F-1.

Das Antibiotikum S 31794/F-1, welches in DE-OS 26 28 965 und US-PS 4 173 629 beschrieben ist, ist eine antifungal wirkende Verbindung, die durch Acrophialophora limonispora nov. spec. Dreyfuss et Muller NRRL 8095 gebildet wird. Dieses Antibiotikum S 31794/F-1 weist folgende charakteristische Eigenschaften auf: Schmelzpunkt 178 bis 180°C (Zersetzung) (amorph), oder 181 bis 183°C (Zersetzung) (kristallin),  $\alpha_D^{20} = -24^\circ$  ( $c = 0,5$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ) oder  $+37^\circ$  ( $c = 0,5$ , Methanol (kristallin), UV-Absorptionsmaxima in Methanol bei 194 nm ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 807$ ), 225 nm (Schulter) ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 132$ ), 276 nm ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 12,8$ ), 284 nm (Schulter) ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 10,5$ ),  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum in Deuteromethanol (190 mg in 1,5 ml Deuteromethanol, Tetramethylsilan als internes Standard)

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

Nach Trocknung des kristallinen Materials über eine Zeitdauer von 2 Stunden unter Hochvakuum bei 100°C hat das obige Antibiotikum etwa folgende Elementaranalyse: 55,5 bis 56,5 % Kohlenstoff, 7,5 bis 7,7 % Wasserstoff, 10,5 bis 10,8 % Stickstoff und 25,5 bis 26,0 % Sauerstoff. S 31794/F-1 ist leicht

löslich in Methanol, Ethanol, Pyridin und Dimethylsulfoxid, schlecht löslich in Wasser, Chloroform, Ethylacetat, Diethylether, Benzol oder Hexan, und ist antifungal wirksam, und zwar insbesondere gegenüber Candida albicans.

Das Antibiotikum S 31794/F-1 dürfte die Struktur der Formel II haben, worin R Myristoyl bedeutet, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> jeweils für OH stehen und R<sup>2</sup> Carboxamid ist.

#### S 31794/F-1 Kern

Der neue erfindungsgemäße cyclische Peptidkern, nämlich der Kern des Antibiotikums S 31794/F-1, dürfte die Struktur der Formel I haben, worin R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> jeweils OH bedeuten und R<sup>2</sup> für Carboxamid steht.

S 31794/F-1 Kern hat die empirische Formel C<sub>35</sub>H<sub>52</sub>N<sub>8</sub>O<sub>16</sub> und weist ein Molekulargewicht von 840,87 auf.

#### Herstellung von S 31794/F-1 Kern

##### Herstellung des Substrats

Zur Herstellung des erfindungsgemäßen S 31794/F-1 Kerns geht man vom Antibiotikum S 31794/F-1 aus.

Das Antibiotikum S 31794/F-1 wird durch submerse aerobe Züchtung von Acrophialophora limonispora NRRL 8095 erzeugt. Dieser Mikroorganismus ist in der Kulturensammlung des Northern Regional Research Center, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Culture Collection, North Central Region, Peoria, Illinois 61604 hinterlegt und bildet einen Teil der Sammlung, von der er unter der Nummer NRRL 8095 für die Öffentlichkeit zugänglich ist.

Die vorliegenden Kerne enthalten jeweils eine Aminogruppe, so daß sie in Salzform vorkommen können. Solche Salze eignen sich als Zwischenprodukte und zu Reinigungszwecken. Die pharmazeutisch unbedenklichen Salze der Kerne sind besonders brauchbar, da in einem solchen Fall die Endprodukte nur minimal gereinigt zu werden brauchen. Unter pharmazeutisch unbedenklichen Salzen werden Salze verstanden, bei denen die Toxizität des Produkts insgesamt gegenüber warmblütigen Tieren nicht erhöht ist.

Säureadditionssalze der Kerne lassen sich durch übliche Umsetzung mit einer anorganischen oder organischen Säure bilden. Zu Beispielen für hierzu geeignete anorganische oder organische Säuren gehören Chlorwasserstoffsäure, Bromwasserstoffsäure, Iodwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Essigsäure, Benzoësäure, Sulfaminsäure, Weinsäure, Zitronensäure, Maleinsäure, Bernsteinsäure, Ascorbinsäure, Glykolsäure, Milchsäure, Fumarsäure, Palmitinsäure, Cholsäure, Pamoesäure, Mucinsäure, D-Glutaminsäure, d-Camphersäure, Glutarsäure, Phthalsäure, Laurinsäure, Stearinsäure, Salicylsäure, Methansulfonsäure, Benzolsulfonsäure, Sorbinsäure, Picrosäure oder Zimtsäure.

Die einzelnen Antibiotika werden zur abschließenden Reinigung vorzugsweise einer Umkehrphasen-Hochleistungsniederdruckflüssigkeitschromatographie (HPLPLC) unter Verwendung von Silicagel/C<sub>18</sub> als Adsorbens unterzogen. Hierzu gibt man das rohe Antibiotikumgemisch in Form einer Lösung in einem geeigneten Lösungsmittel auf eine Säule, die mit dem gleichen Lösungsmittel aquilibriert ist. Anschließend wird die Säule mit dem Lösungsmittel eluiert. Die anfallenden Fraktionen werden durch Bioautographie mittels *Candida albicans* und/oder durch Ultraviolettlicht (bezogen auf die relativen Verweilzeiten) überwacht. Die Fraktionen, die identische einzelne antibiotische Faktoren enthalten, werden vereinigt. Gelegentlich

kann auch die Durchführung einer zusätzlichen chromatographischen Auftrennung erforderlich sein, damit sich die einzelnen Faktoren in gereinigter Form ergeben.

Das rohe Antibiotikumgemisch von A-30912 oder A-42355 erhält man beispielsweise durch Extraktion der Gesamtbrühe oder des gesamten Mycels mit Methanol und Chloroform. Zur Chromatographie dieser Antibiotika wird als Lösungsmittelsystem vorzugsweise ein Gemisch aus Methanol, Wasser und Acetonitril (7:2:1) verwendet.

Zum rohen Antibiotikum S 31794/F-1 gelangt man durch Extraktion der Gesamtbrühe mit einem Gemisch aus Ethylacetat und Isopropanol (4:1) und Chromatographieren des dabei erhaltenen Extrakts.

Die einzelnen Faktoren lassen sich durch Dünnschichtchromatographie (TLC) identifizieren. Als Adsorbens wird hierbei vorzugsweise Silicagel verwendet.

Die dabei für die Faktoren A bis G des Antibiotikums A-30912 durch dünnschichtchromatographische Analyse unter Verwendung von Silicagel mit hohem Kohlenstoffgehalt in einem Lösungsmittelsystem aus Benzol und Methanol (7:3) und durch Bioautographie mit *Candida albicans* erhaltenen  $R_f$ -Werte gehen aus der folgenden Tabelle I hervor.

Tabelle I

A-30912 Faktoren	$R_f$ -Werte
A	0,35
B	0,45
C	0,54
D	0,59
E	0,27
F	0,18
G	0,13

Die ungefähren  $R_f$ -Werte der Faktoren A, B, C, D und H von A-30912 in verschiedenen Lösungsmittelsystemen, die man durch Dünnschichtchromatographie mittels Silicagel mit hohem Kohlenstoffgehalt und Bioautographie mit *Candida albicans* erhält, können der folgenden Tabelle II entnommen werden.

Tabelle II

A-30912 Faktoren

R<sub>F</sub>-Werte - Lösungsmittelsysteme

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

Lösungsmittelsysteme:

- a: Ethylacetat:Methanol (3:2)
- b: Ethylacetat:Methanol (7:3)
- c: Acetonitril:Wasser (95:5)
- d: Ethylacetat:Ethanol:Essigsäure (40:60:0,25)

Die Faktoren A, B, D und H von A-30912 lassen sich ferner auch durch analytische Hochleistungsniederdruckflüssigkeitschromatographie unter folgenden Bedingungen identifizieren.

Säule: Glas, 0,8 x 15,0 cm  
Packung: Nucleosil 10-C<sub>18</sub> (Machery-Nagel  
and Company),  
nach dem im Beispiel 8 beschriebenen  
Aufschlammungsverfahren abgepackt  
Lösungsmittel: Methanol:Wasser:Acetonitril (7:2:1)  
Probenvolumen: 8 µl  
Probengröße: 8 µg  
Säulentemperatur: Umgebung  
Strömungsgeschwindigkeit: 1,8 ml/min  
Druck: etwa 14 bar  
Detektor: UV bei 222 nm (ISCO Model 1800  
Variable Wavelength UV-Visible  
Absorbance Monitor)  
Pumpe: LDC Duplex-Minipumpe  
Injektion: Schlaufeninjektion

Die unter diesen Bedingungen ermittelten ungefähren Verweilzeiten für die Faktoren A, B, D und H von A-30912 gehen aus folgender Tabelle III hervor:

Tabelle III

<u>A-30912 Faktoren</u>	<u>Verweilzeit (Sekunden)</u>
A	792
B	870
H	990
D	1140

Herstellung des Enzyms

A. Enzyrbildender Mikroorganismus

Das Enzym, das sich zur Deacylierung der erfindungsgemäßen Antibiotika eignet, wird durch bestimmte Mikroorganismen aus der Familie Actinoplanaceae gebildet, und zwar vorzugsweise durch den Mikroorganismus *Actinoplanes utahensis* NRRL 12052.

Das Enzym kann das gleiche Enzym sein, das auch zur Deacylierung von Penicillinen verwendet wird, und in diesem Zusammenhang wird auf US-PS 3 150 059 verwiesen. Vorzugsweise wird dieses Enzym jedoch durch Züchten von *Actinoplanes utahensis* NRRL 12052 gemäß Herstellungsbeispiel 1 gebildet, wobei selbstverständlich jedoch auch andere Methoden angewandt werden können.

Die Actinoplanaceae sind eine verhältnismäßig neue Familie von Mikroorganismen aus der Ordnung der Actinomycetales. Diese Familie wird erstmals im Jahre 1955 beschrieben (Sci. Soc. 71, 148 bis 155 (1955)). Die Eigenschaften dieser Familie und einiger einzelner Arten gehen hervor aus Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. Auflage, von R. E. Buchanan und N. E. Gibbons, Verlag The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md., 1974, Seiten 706 bis 723. Bis jetzt sind folgende zehn Arten unterschieden worden: I. *Actinoplanes* (der Typgenus und somit der bekannteste Genus), II. *Spirillospora*, III. *Streptosporangium*, IV. *Amorphosporangium*, V. *Ampullariella*, VI. *Pilimelia*, VII. *Planomonospora*, VIII. *Planobispora*, IX. *Dactylosporangium* und X. *Kitasatoa*.

Einige der bis jetzt isolierten und charakterisierten Species und Varietäten sind folgende: *Actinoplanes philippinensis*, *Actinoplanes armeniacus*, *Actinoplanes utahensis* und *Actinoplanes missouriensis*; *Spirillospora albida*; *Streptosporangium roseum*, *Streptosporangium vulgare*, *Streptosporangium ro-*

seum var. *hollandensis*, *Streptosporangium album*, *Streptosporangium viridialbum*, *Amorphosporangium auranticolor*, *Ampullariella regularis*, *Ampullariella campanulata*, *Ampullariella lobata*, *Ampullariella digitata*, *Pilimelia terevasa*, *Pilimelia anulata*, *Planomonospora parontospora*, *Planomonospora venezuelensis*, *Planobispora longispora*, *Planobispora rosea*, *Dactylosporangium aurantiacum* und *Dactylosporangium thailandense*.

Die *Actinoplanes* stellen eine bevorzugte Quelle für das erfundungsgemäß verwendbare Enzym dar. Innerhalb der *Actinoplanes* ist *Actinoplanes utahensis* eine besonders bevorzugte Enzymquelle.

Kulturen typischer Species von *Actinoplanaceae* sind in der Kulturrensammlung des bereits oben erwähnten Northern Regional Research Center hinterlegt worden und bilden einen Teil der dortigen Sammlung, von der sie unter den im folgenden angegebenen Nummern für die Öffentlichkeit zugänglich sind:

<i>Actinoplanes utahensis</i>	NRRL	12052
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	NRRL	12053
<i>Actinoplanes</i> sp.	NRRL	8122
<i>Actinoplanes</i> sp.	NRRL	12065
<i>Streptosporangium roseum</i>		
var. <i>hollandensis</i>	NRRL	12064

*Actinoplanes utahensis* NRRL 12052 ist abgeleitet von einer Stammkultur, die bei der American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852 hinterlegt ist (*Actinoplanes utahensis* ATCC 14539). Die Kultur *Actinoplanes utahensis* ATCC 14539 lässt sich ebenfalls als Enzymquelle verwenden.

Actinoplanes missouriensis NRRL 12053 ist abgeleitet von einer Kultur, die ebenfalls bei der American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852 hinterlegt ist (Actinoplanes missouriensis ATCC 14538). Diese Kultur stellt eine weitere Enzymquelle dar.

Die Wirksamkeit irgendeines bestimmten Stammes eines Mikroorganismus aus der Familie Actinoplanaceae zur Durchführung der erfindungsgemäßen Deacylierung wird durch folgendes Verfahren ermittelt:

Ein geeignetes Wachstumsmedium wird mit dem Mikroorganismus geimpft. Die Kultur wird dann zwei oder drei Tage bei etwa 28°C auf einem Rotationsschüttler bebrütet. Sodann versetzt man die Kultur mit einem der Substratantibiotika. Der pH-Wert des Fermentationsmediums wird auf etwa pH 6,5 gehalten. Die Kultur wird bezüglich ihrer Aktivität unter Verwendung von *Candida albicans* durch Bioautographie überwacht. Dieses Verfahren ist im Abschnitt E beschrieben. Eine Abnahme der antibiotischen Wirksamkeit ist ein Zeichen dafür, daß der Mikroorganismus das zur Deacylierung geeignete jeweilige Enzym bildet. Diese Tatsache muß jedoch sichtbar gemacht werden, und hierzu kann man sich folgender Methoden bedienen: (1) Einer Analyse durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bezüglich der Gegenwart des intakten Kerns oder (2) einer Reacylierung mit einer entsprechenden Seitenkette zur Wiederherstellung der ursprünglichen Wirksamkeit.

#### B. Bedingungen zur Enzymbildung

Das Enzym wird unter Bedingungen gebildet, unter denen die Actinoplanaceae wachsen können, nämlich bei einer Temperatur von etwa 25 bis 30°C, einem pH-Wert von etwa 5,0 bis 8,0 sowie unter Durchmischung und Belüftung. Im Kulturmedium sollten enthalten sein (a) eine assimilierbare Quelle für Kohlenstoff, wie Saccharose, Glucose oder Glycerin, (b) eine Stickstoffquel-

le, wie Pepton, Harnstoff oder Ammoniumsulfat, (c) eine Phosphatquelle, wie ein lösliches Phosphatsalz, und (d) anorganische Salze, die das Wachstum der Mikroorganismen fördern. Eine wirksame Enzymmenge erhält man im allgemeinen innerhalb von etwa 40 bis 60 Stunden nach Beginn des Wachstumszyklus, und diese hält noch einige Zeit nach Erreichen des effektiven Wachstums an. Die Menge an gebildetem Enzym ist von der jeweiligen Species des verwendeten Mikroorganismus und von den verschiedenen Wachstumsbedingungen abhängig.

Die Mikroorganismen, wie *Actinoplanes utahensis* NRRL 12052, welche das Enzym bilden, können selbstverständlich auch variiert werden. Entsprechende künstliche Varianten und Mutanten dieser Stämme lassen sich beispielsweise durch Behandlung mit verschiedenen bekannten mutagenen Mitteln herstellen, wie Ultraviolettlicht, Röntgenstrahlen, Hochfrequenzwellen, radioaktive Strahlen oder Chemikalien. Alle natürlichen und künstlichen Varianten oder Mutanten, die sich aus *Actinoplaneaceae* herstellen lassen und das Enzym bilden, können erfundungsgemäß verwendet werden.

### C. Deacylierungsbedingungen

Das Substrat wird der Kultur von *Actinoplaneaceae* vorzugsweise nach deren Bebrütung über eine Zeitdauer von wenigstens 48 Stunden zugesetzt. Die Konzentration des Substrats im Umwandlungsmedium kann innerhalb breiter Grenzen schwanken. Für eine maximale Ausnutzung des Enzyms und eine im wesentlichen vollständige Deacylierung innerhalb einer Zeitdauer von 24 Stunden soll die Konzentration des Substrats jedoch im allgemeinen etwa 0,5 bis 1,0 mg/ml betragen. Es können auch niedrigere Konzentrationen angewandt werden, wobei das Enzym dann jedoch nicht maximal ausgenutzt wird. Ferner kann auch unter höheren Konzentrationen gearbeitet werden, wobei dann allerdings das Substrat nicht vollständig deacyliert werden kann,

sofern man die fermentationszeit nicht verlängert.

Die Umwandlung der Substratantibiotika zu den erfindungsgemäßen Kernen verläuft am besten bei einem pH-Wert des fermentationsmediums von etwa 6,0 bis 7,0. Bei einem pH-Wert von 6 oder darunter läuft die Deacylierung nur langsam ab. Bei einem pH-Wert von über 6,0 wird sowohl das gebildete Substrat als auch der entstandene Kern zunehmend weniger stabil. Aus Gründen einer maximalen Stabilität liegt der pH-Wert vorzugsweise bei etwa 6,0. Bei einem pH-Wert von 6,0 verläuft die Deacylierung jedoch langsamer (innerhalb von etwa 30 bis 36 Stunden). Für eine raschere Deacylierung (innerhalb von etwa 24 Stunden) ohne größeren Verlust wird ein Arbeiten bei einem pH-Wert von etwa 6,5 bevorzugt. In Rührfermentern kann man den pH-Wert durch Sensoren entsprechend einstellen. Wo dies nicht gut machbar ist, wie beispielsweise in Kolbenfermentern kann man den pH-Wert durch Zugabe eines 0,1-molaren Phosphatpuffers zum Medium vor Zusatz des Substrats entsprechend einstellen.

Nach Zusatz des Substrats sollte man die Kultur etwa 24 Stunden oder länger weiter inkubieren. Die Reinheit des Substrats beeinflußt die Deacylierungsgeschwindigkeit. Ein Substrat mit einer Reinheit von über 50 % wird beispielsweise mit einer Geschwindigkeit von etwa 0,8 bis 1,2 mg/ml Antibiotikum in 24 Stunden deacyliert. Bei Verwendung von Substraten mit niedrigerer Reinheit verläuft die Deacylierung unter langsamerer Geschwindigkeit.

Das Substrat kann auch mehrmals eingespeist werden. Bei Verwendung von kleinen Fermentationstanks kann man 0,3 bis 0,5 mg/ml Antibiotikum in Zeitabständen von 12 Stunden wenigstens fünfmal zugeben, während bei Einsatz größerer Fermentationstanks 0,7 mg/ml Antibiotikum zweimal zugesetzt werden.

Die Deacylierung lässt sich über einen breiten Temperaturbereich durchführen, beispielsweise bei Temperaturen zwischen etwa 20 und 45°C. Zur Erzielung einer optimalen Deacylierung und Stabilität des Substrats und des Kerns werden jedoch Deacylierungstemperaturen von vorzugsweise etwa 25 bis 30°C, und insbesondere von etwa 26°C, angewandt.

#### D. Das Substrat

Als Substrate werden vorzugsweise gereinigte Antibiotika verwendet. Die Substratantibiotika sind antifungal wirksam, weisen jedoch keine antibakterielle Wirksamkeit auf. Die Substratmaterialien können daher Bakterienzellen oder Sporen beherbergen, die im Deacylierungsfermentationsmedium wachsen können. Solche Verunreinigungen können die Deacylierungsreaktion oder die Stabilität der als Ausgangsmaterialien verwendeten Antibiotika oder der entstandenen Kerne beeinträchtigen. Es ist daher wichtig, daß die Substrate steril sind. Eine Behandlung im Autoklav führt zu einer Zerstörung des Großteils der Substratantibiotika, so daß entsprechende Präparationen vorzugsweise durch Behandlung mit Ethylenoxid in einem Drucksystem sterilisiert werden.

#### E. Überwachung der Deacylierung

Die Ausgangsmaterialien sind antifungal wirksame Antibiotika, die insbesondere gegenüber *Candida albicans* wirksam sind. Die Menge an vorhandenem Substrat wird daher vorzugsweise durch einen Versuch unter Verwendung von *Candida albicans* bestimmt. Die gebildeten Kerne sind in Wasser löslich, jedoch biologisch unwirksam. Die Bestimmung der Abnahme der biologischen Wirksamkeit stellt daher einen raschen Versuch zur Überwachung der Deacylierung dar. Zu diesem Zweck sollen sowohl Brühenproben als auch alkoholische Extrakte der Fermentationsfeststoffe untersucht werden, da die Substrate in der Brühe nur schwach löslich sind.

F. Verwendung isolierter Zellen

Ein anderes Verfahren zur Deacylierung besteht in einer Abtrennung der Zellen von Actinoplanaceae aus dem Kulturmedium, einer erneuten Suspendierung dieser Zellen in einer Pufferlösung und einer Durchführung der Deacylierung nach dem im Abschnitt C beschriebenen Verfahren. Wird nach diesem Verfahren gearbeitet, dann kann das enzymatisch aktive Mycel erneut verwendet werden. Mycel von *Actinoplanes utahensis* NRRL 12052 erhält seine Deacylasewirksamkeit beispielsweise nach einmonatiger oder längerer Lagerung unter Kühlung (4 bis 8°C) oder in gefrorenem Zustand (-20°C). Eine hierbei bevorzugte Pufferlösung ist ein 0,1-molarer Phosphatpuffer.

G. Immobilisierte Enzyme

Ein weiteres Verfahren zur Durchführung der Deacylierung besteht in einer Immobilisierung des Enzyms nach bekannten Verfahren. In diesem Zusammenhang wird beispielsweise hingewiesen auf *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins*, von Thomas Ming Swi Chang, Plenum Press, New York, 1977, Band 1. Das immobilisierte Enzym kann dann in einer Säule (oder einem sonstigen geeigneten Reaktor) zum Zwecke der Deacylierung eingesetzt werden.

Darüber hinaus kann man auch den Mikroorganismus selbst immobilisieren und zur Katalysierung der Deacylierungsreaktion verwenden.

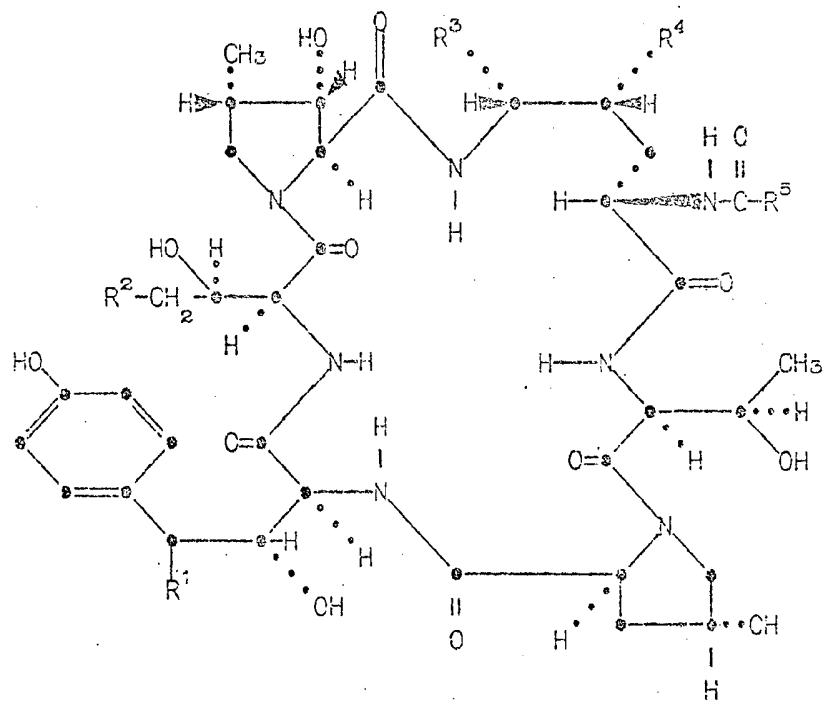
Verwendung der vorliegenden Kerne

Die vorliegend erhältlichen Kerne und ihre Säureadditions-salze stellen wertvolle Zwischenprodukte zur Herstellung synthetischer antifungal wirksamer Verbindungen dar. Aus diesen Kernen hergestellte antifungal wirksame Verbindungen werden

beispielsweise beschrieben in einer Parallelanmeldung von Bernard J. Abbott und David S. Fukuda mit dem internen Aktenzeichen X-5396 und in zwei weiteren Parallelanmeldungen von Manuel Debono mit den internen Aktenzeichen X-5595 und X-5564, die jeweils den Titel DERIVATIVES OF CYCLIC PEPTIDE NUCLEI (Derivate von cyclischen Peptidkernen) haben.

Unter Alkyl werden vorliegend einwertige gesättigte geradkettige oder verzweigtkettige Kohlenwasserstoffreste verstanden. Unter Alkenyl werden einwertige ungesättigte geradkettige oder verzweigtkettige Kohlenwasserstoffreste verstanden, die nicht mehr als drei Doppelbindungen enthalten. Die Doppelbindungen der ungesättigten Kohlenwasserstoffkette können entweder in cis- oder in trans-Konfiguration angeordnet sein. Unter C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub> wird ein Kohlenwasserstoffrest unter Einschluß geradkettiger oder verzweigtkettiger Reste verstanden, der 6 bis 24 Kohlenstoffatome enthält.

## Die Verbindungen der allgemeinen Formel III



werden hergestellt, indem man den entsprechenden Kern an der alpha-Aminogruppe von Ornithin mit der jeweiligen Acylseitenkette in zur Bildung einer Amidbindung üblicher Weise acyliert. Diese Acylierung läßt sich im allgemeinen erreichen, indem man den Kern mit einem aktivierten Derivat der Säure umsetzt, die der gewünschten Acylseitenkettengruppe entspricht.

Unter einem aktivierten Derivat wird ein Derivat verstanden, das die Carboxylfunktion des Acylierungsmittels gegenüber einer Kupplung mit der primären Aminogruppe reaktionsfähig macht, so daß die Amidbindung entsteht, die die Acylseitenkette mit dem Kern verbindet. Beispiele für geeignete aktivierte Derivate dieser Art, Verfahren zu ihrer Herstellung und Methoden für ihren Einsatz als Acylierungsmittel für primäre Amine sind dem Fachmann bekannt. Bevorzugte hierzu geeignete aktivierte Derivate sind: (a) Säurehalogenide, wie Säurechloride, (b) Säureanhydride, wie Alkoxyameisensäureanhydrid oder Aryloxyameisensäureanhydrid, oder (c) aktivierte Ester, wie 2,4,5-Trichlorphenylester. Zu anderen Methoden für eine Aktivierung der Carboxylfunktion gehören eine Umsetzung der Carbonsäure mit einem Carbonyldiimid, wie N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid oder N,N'-Diisopropylcarbodiimid, wodurch man zu einem reaktionsfähigen Zwischenprodukt gelangt, das infolge Instabilität nicht isoliert wird. Die Umsetzung mit dem primären Amin wird hierbei im Reaktionsgemisch durchgeführt.

Enthält eine bestimmte Aminosäure eine andere acylierbare funktionelle Gruppe als die Aminogruppe, dann muß eine solche Gruppe selbstverständlich geschützt werden, bevor man die Aminosäure mit dem zur Einführung der N-Alkanoylgruppe oder N-Alkenoylgruppe verwendeten Reagens umsetzt. Zu diesem Zweck lassen sich alle bekannten Schutzgruppen verwenden, wie sie bereits zum Schutz einer funktionellen Seitenkettengruppe bei Peptidsynthesen eingesetzt werden. Gruppen dieser

Art sind somit wohl bekannt, und die Auswahl der jeweils besonders geeigneten Schutzgruppe und die Methode ihrer Einführung kann dem Fachmann überlassen werden. Es wird in diesem Zusammenhang beispielsweise lediglich hingewiesen auf "Protective Groups In Organic Chemistry", M. McOmie, Plenum Press, N.Y., 1973.

Die Verbindungen der oben erwähnten allgemeinen Formel III hemmen das Wachstum pathogener Pilze, so daß sie sich zur Bekämpfung des Wachstums von Pilzen auf entsprechenden Flächen (als Antiseptikum) oder zur Behandlung von durch Pilze hervorgerufenen Infektionen eignen. Besonders wirksam sind diese Verbindungen gegenüber *Candida albicans*, so daß sie sich vor allem zur Behandlung von Candidosis einsetzen lassen. Die Wirksamkeit dieser Verbindungen läßt sich durch übliche mikrobiologische Versuche ermitteln, beispielsweise in vitro durch die sogenannte Agar-Scheibendiffusionsmethode oder die sogenannte Agar-Verdünnungsmethode, und in vivo durch Untersuchungen von mit *Candida albicans* infizierten Mäusen. Die obigen Verbindungen sind ferner auch wirksam gegenüber *Trichophyton mentagrophytes* (einem dermatophytischen Organismus), *Saccharomyces pastorianus* und *Neurospora crassa*.

Bestimmte Verbindungen, wie sie aus Beispiel 19, Tabelle VIII hervorgehen, ergeben nach oraler Verabreichung an Mäuse stark erhöhte Blutspiegel.

Verabreicht man die Verbindung der Formel III, worin R<sup>5</sup> für p-(n-Octyloxy)benzoyl steht, in einer Dosis von 100 mg/kg täglich über eine Zeitdauer von 5 Tagen intravenös an Hunde, dann lassen sich keinerlei Anzeichen einer Toxizität feststellen, obwohl die Serumglutaminpyruvintransaminasespiegel (SGPT-Spiegel) zeitweilig erhöht sind.

Bei systemischer Anwendung ist die Dosis der jeweiligen Verbindung aus der allgemeinen Formel III abhängig von der jeweils verwendeten Verbindung, der Stärke und Art der Infektion und dem physikalischen Zustand des jeweiligen Empfängers. Bei einer entsprechenden Therapie sollte man mit niedrigen Dosen beginnen und die Dosis bis zur Erzielung der gewünschten antifungalen Wirkung dann erhöhen. Die vorliegenden Verbindungen lassen sich intravenös oder intramuskulär durch Injektion in Form einer sterilen wässrigen Lösung oder Suspension verabreichen, die gewünschtenfalls verschiedene herkömmliche pharmazeutisch unbedenkliche Konservierungsmit tel, Puffermittel, Solubilisierungsmittel oder Suspendiermittel enthalten kann. Zur Herstellung isotonischer Lösungen können auch andere Zusätze verwendet werden, wie Kochsalz oder Glucose. Das jeweils anzuwendende Mengenverhältnis und die jeweilige Art solcher Zusätze sind dem Fachmann geläufig.

Bestimmte Verbindungen aus der allgemeinen Formel III ergeben nach oraler Verabreichung stark erhöhte Blutspiegel (Beispiel 19, Tabelle VIII) und können systemisch oral verabreicht werden. Zur oralen Anwendung können diese Verbindungen in Kombination mit pharmazeutisch unbedenklichen Trägern oder Hilfsstoffen in Form von Kapseln, Tabletten oder Pulvern eingesetzt werden. Art und Menge, in der solche Träger oder Hilfsstoffe zur Anwendung gelangen, sind dem Fachmann bekannt.

Zur Behandlung vaginaler Candida-Infektionen können die Verbindungen der allgemeinen Formel III in Kombination mit pharmazeutisch unbedenklichen Hilfsmitteln verwendet werden, wie sie für intravaginale Anwendungen üblich sind. Auch solche intravaginal verabreichbare Formulierungen sind dem Fachmann bekannt.

Ausführungsbeispiele:

H e r s t e l l u n g s b e i s p i e l 1

Fermentation von Actinoplanes utahensis NRRL 12052

Es wird eine Stammkultur von Actinoplanes utahensis NRRL 12052 hergestellt und auf einer Agar-Schräge gehalten. Das zur Bildung der Schrägen verwendete Medium wird aus folgenden Medien ausgewählt.

MEDIUM A

<u>Bestandteile</u>	<u>Mengen</u>
Babyhafermehl	60,0 g
Hefe	2,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
Czapek-Mineralgrundmischung*	5,0 ml
Agar	25,0 g
Deionisiertes Wasser	q.s. auf 1 Liter

Der pH-Wert vor der Behandlung im Autoklav beträgt etwa 5,9. Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxid auf pH 7,2 eingestellt. Nach der Behandlung im Autoklav liegt der pH-Wert bei etwa 6,7.

\* Die Czapek-Mineralgrundmischung weist folgende Zusammensetzung auf

<u>Bestandteile</u>	<u>Mengen</u>
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (gelöst in 2 ml konz. HCl)	2 g
KCl	100 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	100 g
Deionisiertes Wasser	q.s. auf 1 Liter

MEDIUM B

<u>Bestandteile</u>	<u>Mengen</u>
Kartoffeldextrin	5,0 g
Hefeextrakt	0,5 g
Enzymhydrolysat von Casein*	3,0 g
Rinderextrakt	0,5 g
Dextrose	12,5 g
Maisstärke	5,0 g
Fleischpepton	5,0 g
Portweinmelasse	2,5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,25 g
CaCO <sub>3</sub>	1,0 g
Czapek-Mineralgrundmischung	2,0 ml
Agar	20,0 g
Deionisiertes Wasser	q.s. auf 1 Liter

\* N-Z-AmineA von Humko Sheffield Chemical, Lyndhurst, N.J.

Die Schrägen wird mit Actinoplanes utahensis NRRL 12052 beimpft und die beimpfte Schrägen bei 30°C etwa 8 bis 10 Tage bebrütet. Mit etwa der Hälfte des Schrägenwachstums beimpft man dann 50 ml eines vegetativen Mediums folgender Zusammensetzung

<u>Bestandteile</u>	<u>Mengen</u>
Babyhafermehl	20,0 g
Saccharose	20,0 g
Hefe	2,5 g
Getrocknete Destillationsschlempe*	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
Czapek-Mineralgrundmischung	5,0 ml
Deionisiertes Wasser	q.s. auf 1 Liter

Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxid auf 7,4 eingestellt, und nach Behandlung im Autoklav beträgt der pH-Wert etwa 6,8.

\* National Distillers Products Co., 99 Park Ave., New York,  
N.Y.

Das beimpfte vegetative Medium wird in einem 250 ml fassenden Erlenmeyer-Weithalskolben bei 30°C etwa 72 Stunden auf einem Rotationsschüttler bebrütet, der unter einer Geschwindigkeit von 250 Upm und unter einem Bogen von etwa 5 cm Durchmesser rotiert.

Das so erhaltene bebrütete vegetative Medium lässt sich direkt zur Beimpfung eines vegetativen Mediums der zweiten Stufe verwenden. Wahlweise und vorzugsweise wird dieses vegetative Medium jedoch bis zu einem späteren Gebrauch aufgehoben, indem man die Kultur in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Für eine derartige Lagerung wird die Kultur in einer Mehrzahl kleiner Ampullen folgendermaßen hergestellt:

In jede Ampulle gibt man 2 ml des bebrüteten vegetativen Mediums und 2 ml einer Glycerin-Lactose-Lösung (siehe W. A. Dailey und C. E. Higgens "Preservation and Storage of Micro-organisms in the Gas Phase of Liquid Nitrogen", Cryobiol 10, 364 bis 367 (1973)). Die so hergestellten Suspensionen werden dann in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Eine aufbewahrte Suspension (1 ml) des obigen vegetativen Mediums verwendet man dann zum Beimpfen von 50 ml eines vegetativen Mediums der ersten Stufe (das die oben bereits beschriebene Zusammensetzung hat). Das beimpfte vegetative Medium der ersten Stufe wird dann wie oben beschrieben bebrütet.

Zur Herstellung eines größeren Volumens an Inokulum werden 10 ml der inkubierten vegetativen Kultur der ersten Stufe zu 400 ml eines vegetativen Nährmediums der zweiten Stufe verwendet, das die gleiche Zusammensetzung hat wie das vegetative Medium der ersten Stufe. Das Medium der zweiten Stufe wird in einem 2 Liter fassenden Erlenmeyer-Waithalskolben 24 Stunden bei 25°C auf einer Schüttelvorrichtung inkubiert, die unter einem Bogen von etwa 5 cm Durchmesser mit 250 Upm rotiert.

Mit dem in obiger Weise hergestellten inkubierten vegetativen Medium der zweiten Stufe (800 ml) beimpft man dann 100 Liter eines sterilen Produktionsmediums mit einer der folgenden Zusammensetzungen:

MEDIUM I

<u>Bestandteile</u>	<u>Mengen (g/l)</u>
Erdnußmehl	10,0
Lösliches Fleischpepton	5,0
Saccharose	20,0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,5
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25
Leitungswasser	q.s. auf 1 Liter

Der pH-Wert des Mediums beträgt etwa 6,9 nach Sterilisation durch Behandlung im Autoklav bei 121°C über eine Zeitdauer von 45 Minuten bei einem Druck von etwa 1,1 bis 1,3 bar.

MEDIUM II

<u>Bestandteile</u>	<u>Mengen (g/l)</u>
Saccharose	30,0
Pepton	5,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0
KCl	0,5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,5
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,002
Deionisiertes Wasser	q.s. auf 1 Liter

Der pH-Wert wird mit Chlorwasserstoffsäure auf 7,0 eingestellt, und nach Behandlung im Autoklav beträgt der pH-Wert etwa 7,0.

MEDIUM III

<u>Bestandteile</u>	<u>Mengen (g/l)</u>
Glucose	20,0
NH <sub>4</sub> Cl	3,0
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0
ZnCl <sub>2</sub>	0,019
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,304
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,062
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,035
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,005
CaCO <sub>3</sub>	6,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *	0,67
Leitungswasser	q.s. auf 1 Liter

\* Getrennt sterilisiert und unter aseptischen Bedingungen zugesetzt.

Der pH-Wert am Ende beträgt etwa 6,6.

Das inkulinierte Produktionsmedium lässt man in einem 165 Liter fassenden Fermentationstank bei einer Temperatur von etwa 30°C über eine Zeitdauer von etwa 42 Stunden fermentieren. Hierbei wird das Fermentationsmedium mit herkömmlichen Rührern unter einer Geschwindigkeit von etwa 200 Upm gerührt und mit steriler Luft unter Aufrechterhaltung eines Gehalts an gelöstem Sauerstoff von über 30 % der Luftsättigung bei atmosphärischem Druck belüftet.

### H e r s t e l l u n g s b e i s p i e l 2

#### Herstellung des A-42355 Antibiotikum-Komplexes

##### A. Schüttelkolbenfermentation

Eine Kultur von *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440 wird auf einer Agar-Schräge aus einem Medium der folgenden Zusammensetzung hergestellt und gehalten.

<u>Bestandteile</u>	<u>Mengen</u>
Glucose	5 g
Hefeextrakt	2 g
CaCO <sub>3</sub>	3 g
Pflanzensaft*	200 ml
Agar**	20 g
Deionisiertes Wasser	q.s. auf 1 Liter

(anfänglicher pH=6,1)

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

\*\* Meer Corp.

Die Schrägen wird mit *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440 beimpft, und die beimpfte Schrägen wird etwa 7 Tage bei 25°C bebrütet. Die reife Kultur wird mit Wasser bedeckt und

mit einer sterilen Schlaufe zum Ablösen der Sporen abgekratzt.  
Die so erhaltene Suspension wird mit 10 ml sterilem deionisiertem Wasser aufgenommen.

Ein ml der so erhaltenen Suspension wird zum Inokulieren von 55 ml vegetativen Mediums in einem 250-ml-Kolben verwendet.  
Das vegetative Medium hat folgende Zusammensetzung:

<u>Bestandteile</u>	<u>Mengen</u>
Saccharose	25 g
Portweinmelasse	36 g
Maisquellwasser	6 g
Malzextrakt	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
Enzymhydrolysat von Casein*	10 g
Leitungswasser	1100 ml

(anfänglicher pH=6,5 bis 6,7)

\* N-Z-Case, Humko Sheffield Chemical, Lyndhurst, N.J.

Das inkulierte vegetative Medium wird bei 25°C 48 Stunden auf einem Rotationsschüttler bei 250 Upm inkubiert. Nach 24 Stunden wird das Medium 1 Minute bei geringer Geschwindigkeit in einer Mischvorrichtung (Waring) homogenisiert und dann die übrigen 24 Stunden inkubiert. Stattdessen kann man das inkulierte vegetative Medium aber auch 48 Stunden inkubieren und anschließend 15 Minuten bei geringer Geschwindigkeit homogenisieren.

Dieses inkubierte vegetative Medium kann zum Beimpfen von Schüttelkolbenfermentationskulturmedium oder zum Inokulieren eines vegetativen Mediums der zweiten Stufe verwendet werden. Stattdessen kann man es auch für eine spätere Verwendung aufheben, indem man es in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff

hält. Für eine derartige Aufbewahrung wird die Kultur in einer Mehrzahl kleiner Ampullen folgendermaßen zubereitet.

Die vegetativen Kulturen werden mit gleichen Volumina einer Suspendierlösung der folgenden Zusammensetzung vermischt:

<u>Bestandteile</u>	<u>Mengen</u>
Glycerin	20 ml
Lactose	10 g
Deionisiertes Wasser	q.s. auf 100 ml

Die Suspensionen werden auf kleine sterile Schraubverschlußhülsen (4 ml pro Hülse) verteilt. Die so erhaltenen Hülsen werden in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Eine in dieser Weise zubereitete und aufbewahrte Suspension lässt sich dann zum Inokulieren von Agar-Schrägen oder flüssigen Saat-Medien verwenden. Die Schrägen werden bei 25°C im Licht 7 Tage inkubiert.

#### B. Tankfermentation

Zur Herstellung eines größeren Volumens an Inokulum verwendet man 10 ml der inkubierten vegetativen Kultur der ersten Stufe zum Inokulieren von 400 ml eines vegetativen Wachstumsmediums der zweiten Stufe, das die gleiche Zusammensetzung wie das vegetative Medium hat. Das Medium der zweiten Stufe wird in einem 2-Liter-Erlenmeyer-Weithalskolben 24 Stunden bei 25°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert, der unter einem Bogen mit einem Durchmesser von etwa 5 cm bei 250 Upm rotiert.

Mit dem in obiger Weise hergestellten inkubierten Medium der zweiten Stufe (800 ml) beimpft man dann 100 l steriles Produktionsmedium mit einer der folgenden Zusammensetzungen:

MEDIUM IV

<u>Bestandteile</u>	<u>Mengen</u>
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,00455 g/l
Lösliches Fleischpepton*	30,5 g/l
Sojabohnenmehl	15,5 g/l
Tapiocadextrin**	2,0 g/l
Portweinmelasse	10,5 g/l
Enzymhydrolysat von Casein***	8,5 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,5 g/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5,5 g/l
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,1 g/l
Baumwollsaaatöl	40,0 ml
Antischaummittel****	1,0 ml
Leitungswasser	1000,0 ml

(anfänglicher pH=6,8 bis 7,0)

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

\*\* Stadex 11, A.E. Staley Co., Decatur, Ill.

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

\*\*\*\* P2000, Dow Corning, Midland, Michigan

MEDIUM V

<u>Bestandteile</u>	<u>Mengen</u>
Glucose	2,5 %
Stärke	1,0 %
Lösliches Fleischpepton*	1,0 %
Portweinmelasse	1,0 %
CaCO <sub>3</sub>	0,2 %
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,05 %
Enzymhydrolysat von Casein**	0,4 %
Antischaummittel***	0,02 %
Leitungswasser	q.s. auf Volumen

\* O.M. Peptone

\*\* N-Z-AmineA

\*\*\* Antifoam "A", Dow Corning

Das inkulizierte Produktionsmedium läßt man in einem Fermentationstank von 165 l Fassungsvermögen bei einer Temperatur von 25°C etwa 7 Tage fermentieren. Das Fermentationsmedium wird dabei mit steriler Luft unter Aufrechterhaltung eines Gehalts an gelöstem Sauerstoff von über etwa 50 % der Luftsättigung belüftet.

C. Vegetatives Medium der dritten Stufe

Immer dann, wenn die Fermentation in größeren Tanks als für 100 l Fermentationen durchgeführt wird, ist zu empfehlen, daß zum Beimpfen größerer Tanks eine vegetative Kultur der dritten Stufe verwendet wird. Ein bevorzugtes vegetatives Medium der dritten Stufe hat folgende Zusammensetzung:

<u>Bestandteile</u>	<u>Mengen</u>
Saccharose	25 g
Portweinmelasse	25 g
Maisquellwasser	6 g
Enzymhydrolysat von Casein*	10 g
Malzextrakt	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
Leitungswasser	1000 ml

(anfänglicher pH=6,1)

\*N-Z-Case

### H e r s t e l l u n g s b e i s p i e l 3

#### Abtrennung des A-42355 Antibiotikum-Komplexes

Die nach dem im Herstellungsbeispiel 2 beschriebenen Verfahren unter Verwendung des Produktionsmediums V erhaltene Gesamtfermentationsmaische (4127 l), wird eine Stunde gründlich mit Methanol (4280 l) verrührt und dann unter Verwendung einer Filterhilfe auf Basis von Diatomeenerde (Hyflo Supercel von Johns-Manville Products Corp.) filtriert. Der pH-Wert des Filtrats wird mittels 5 normaler Chlorwasserstoffsäure auf 4,0 eingestellt. Das angesäuerte Filtrat wird zweimal mit gleichen Volumina Chloroform extrahiert. Die Chloroformextrakte werden vereinigt und unter Vakuum auf ein Volumen von 20 l eingeengt. Das erhaltene Konzentrat wird zu 200 l Diethylether gegeben, wodurch der A-42355 Komplex ausfällt. Durch Abfiltrieren des angefallenen Niederschlags gelangt man zu 2775 g des A-42355 Komplexes in Form eines grauweißen Pulvers.

### H e r s t e l l u n g s b e i s p i e l 4

#### Isolierung von A-30912 Faktor A

Zu diesem Zweck löst man zuerst 1 g des im Herstellungsbeispiel 3 beschriebenen A-42355 Antibiotikum-Komplexes in 7 ml eines Gemisches aus Methanol, Wasser und Acetonitril (7:2:1). Die erhaltene Lösung wird filtriert und auf eine 35 cm lange Glassäule mit einem Innendurchmesser von 3,7 cm (Michel-Miller Hihgh Performance Low Pressure (HPLPLC) Chromatography Column, Ace Glass Incorporated, Vineland, N.J. 08360) aufgegeben, die man über eine Schlaufe mittels eines Ventilsystems mit dem gemäß Herstellungsbeispiel 10 hergestellten LP-1/C<sub>18</sub>-Siliciagel-Umkehrphasenharz (10 bis 20 Micron) füllt. Die Säule wird nach dem im Herstellungsbeispiel 11 beschriebenen Aufschlämmfüllverfahren in einem Gemisch aus Methanol, Wasser und Acetonitril (7:2:1) bepackt. Das Lösungsmittel wird mittels einer F.M.I.-Pumpe mit ventilloser Kolbenauslegung (maximale Strömungsgeschwindigkeit 19,5 ml/min) durch die Säule mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 9 ml/min unter einem Druck von etwa 7 bar bewegt, wobei man jede Minute eine Fraktion auffängt. Die Elution des Antibiotikums wird unter Verwendung eines UV-Monitors (ISCO Model UA-5, Instrument Specialist Co., 4700 Superior Ave., Lincoln, Nebraska 68504) mit einer optischen Einheit (ISCO Typ 6) verfolgt.

Die entsprechenden Fraktionen (etwa 112 bis 140) werden vereinigt und zu 20 ml Wasser gegeben. Der pH-Wert dieser Lösung wird mit 1-normaler Chlorwasserstoffsäure auf pH 4,0 eingestellt. Die erhaltene Lösung wird zweimal mit gleichen Volumina Chloroform extrahiert. Die beiden Chloroformextrakte werden vereinigt und unter Vakuum zu einem Öl eingeengt. Das Öl wird in tert.-Butanol gelöst und die Lösung lyophilisiert; wodurch man zu 524 mg A-42355 Faktor A (A-30912 Faktor A, A-22082) gelangt.

### H e r s t e l l u n g s b e i s p i e l 5

#### Isolierung von A-30912 Faktor B

Zur Auftrennung von A-42355 Komplex geht man wie im Herstellungsbeispiel 3 beschrieben vor, mit der Ausnahme, daß man die konzentrierten Chloroformextrakte (285 l) über eine Silicagelsäule (150 l Grace-Silicagel, Sorte 62) bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 2 l/min chromatographiert. Die Säule wird mit Chloroform (200 l) gewaschen, mit Acetonitril (500 l) eluiert und dann kontinuierlich mit einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser (98:2) bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 1 l/min eluiert. Es werden Fraktionen mit einem Volumen von etwa 200 l aufgefangen und einzeln bezüglich ihrer biologischen Wirksamkeit analysiert. Hierzu verwendet man Papierscheiben auf Agar-Platten, die mit Candida albicans beimpft sind. Die Fraktionen 77 bis 103 (1365 l) werden vereinigt und unter Vakuum eingeengt. Die konzentrierte Lösung (4,5 l) enthält einen Niederschlag, durch dessen Abfiltrieren man zu 119 g A-42355 Komplex mit angereichertem Faktor B gelangt. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird wieder in einem entsprechenden Volumen Methanol gelöst. Die Methanollösung wird zu Diethylether (10 Volumina) gegeben, wodurch der den Faktor B enthaltende Komplex des Antibiotikums ausfällt. Dieser Niederschlag wird ebenfalls abfiltriert und getrocknet, wodurch man weitere 24 g A-42355 Komplex mit angereichertem Faktor B in Form eines grauen Pulvers erhält.

Der in obiger Weise hergestellte A-42355 Komplex mit angereichertem Faktor B (1,0 g) wird in 8 ml eines Gemisches aus Methanol, Wasser und Acetonitril (7:2:1) gelöst. Die Lösung wird filtriert und durch eine Schlaufe über ein Ventilsystem auf eine Silicagelsäule (Länge 33 cm, Innendurchmesser 3,7 cm, Michel-Miller-Säule) gegeben. Die Säule wird über eine Schlaufe mit einem Ventilsystem mit LP-1/C<sub>18</sub>-Silicagel-Umkehrphasenharz (10 bis 20 Micron), hergestellt nach dem Herstellungsbeispiel

10, in einer Mischung aus Methanol, Wasser und Acetonitril (7:2:1) gefüllt. Zum Füllen der Säule wird das im Herstellungsbispiel 11 beschriebene Aufschlämmfüllverfahren verwendet. Das Lösungsmittel wird mit einer Fließgeschwindigkeit von 10 ml/min unter einem Druck von etwa 7 bar mittels einer F.M.I.-Pumpe mit einer ventilllosen Kolbenausführung durch die Säule geführt. Jede Minute wird eine Fraktion aufgefangen. Die Elution des Antibiotikums wird unter Verwendung eines UV-Monitors bei 280 nm wie beim Beispiel 1 verfolgt. Die Fraktionen 102 bis 110 werden vereinigt und unter Vakuum zu einem Öl eingeengt. Das Öl wird in einem kleinen Volumen tert.-Butanol gelöst und die Lösung wird lyophilisiert, wodurch man zu 22 mg A-30912 Faktor B gelangt.

#### H e r s t e l l u n g s b e i s p i e l 6

##### Isolierung von A-30912 Faktor D

Konzentrierte Chloroformextrakte von zwei nach dem Herstellungsbispiel 3 erhaltenen Fermentationsversuchen (3800 l und 4007 l) werden vereinigt und auf einer Silicagelsäule (Grace, Sorte 62) chromatographiert. Die Säule wird mit Chloroform gewaschen und dann zuerst mit Acetonitril und anschließend mit einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser (98:2) eluiert. Es werden Fraktionen mit einem Volumen von etwa 200 l gesammelt und bezüglich ihrer biologischen Wirksamkeit durch Verwendung von Papierscheiben auf mit *Candida albicans* angeimpftem Agar analysiert. Die aktiven Fraktionen (850 l) werden vereinigt und unter Vakuum eingeengt. Die eingeengte Lösung (0,7 l) wird zu Diethylether (10 Volumina) gegeben, wodurch der an Faktor D angereicherte A-42355 Komplex ausfällt. Dieser Niederschlag wird abfiltriert und getrocknet, wodurch man 32 g des an Faktor D angereicherten A-42355 Komplexes in Form eines grauen Pulvers erhält.

Der obige, an Faktor D angereicherte A-42355 Komplex (1,0 g) wird in 5 ml eines Gemisches aus Methanol, Wasser und Acetonitril (7:2:1) gelöst. Die Lösung wird filtriert und durch eine Schlaufe mittels eines Ventilsystems in eine Silicagel-säule (Länge 30 cm, Innendurchmesser 3,7 cm, Michel-Miller-Säule) gegeben. Die Säule ist mit LP-1/C<sub>18</sub>-Silicagel-Umkehrphasenharz (10 bis 20 Micron) gefüllt, das nach dem Herstellungsbeispiel 10 hergestellt worden ist. Zum Füllen der Säule bedient man sich des beim Herstellungsbeispiel 11 beschriebenen Aufschlämmfüllverfahrens unter Verwendung eines Gemisches aus Methanol, Wasser und Acetonitril (7:2:1). Das Lösungsmittel wird mit einer Fließgeschwindigkeit von 8 ml/min unter einem Druck von etwa 3,1 bar mittels einer F.M.I.-Pumpe mit einer ventillosen Kolbenführung durch die Säule geführt. Alle 2 Minuten wird eine Fraktion aufgefangen. Die Elution des Antibiotikums wird unter Verwendung eines UV-Monitors (ISCO Model UA-5) mit einer optischen Einheit (ISCO Typ 6) verfolgt. Die Fraktionen 96 bis 108 werden vereinigt und unter Vakuum zu einem Öl eingeengt. Dieses Öl wird in einem kleinen Volumen tert-Butanol gelöst, und durch Lyophilisieren der Lösung gelangt man zu 89 mg A-30912 Faktor D.

#### H e r s t e l l u n g s b e i s p i e l 7

##### Isolierung von A-30912 Faktor H

Der nach dem Herstellungsbeispiel 3 erhaltene A-42355 Antibiotikum-Komplex (5,0 g) wird in 35 ml eines Gemisches aus Methanol, Wasser und Acetonitril (7:2:1) gelöst, und die erhaltene Lösung wird filtriert und durch eine Schlaufe mittels eines Ventilsystems in eine Glassäule mit 42 cm Länge und 3,7 cm Innendurchmesser (Michel-Miller-Säule) eingeführt. Die Säule wird nach dem im Herstellungsbeispiel 11 beschriebenen Verfahren

mit LP-1/C<sub>18</sub>-Silicagel-Umkehrphasenharz (10 bis 20 Micron) in einem Gemisch aus Methanol, Wasser und Acetonitril (7:2:1) gefüllt. Das gefüllt. Die Herstellung des verwendeten Silicagel-Umkehrphasenharzes ist im Herstellungsbeispiel 10 beschrieben. Das Lösungsmittel wird mit einer Fließgeschwindigkeit von 13 ml/min unter einem Druck von etwa 8,4 bar mit einer F.M.I.-Pumpe mit einer ventilllosen Kolbenausführung durch die Säule geführt, wobei man alle 2 Minuten eine Fraktion auffängt. Die Elution des Antibiotikums wird unter Verwendung eines UV-Monitors bei 280 nm nach der im Herstellungsbeispiel 19, Abschnitt C, beschriebenen Methode überwacht. Die Fraktionen 112 bis 132 werden mit den Fraktionen 106 bis 117 aus einer zweiten ähnlichen Reinigung vereinigt. Die vereinigten Fraktionen werden unter Vakuum zu einem Öl eingeengt. Das Öl wird in einem kleinen Volumen tert-Butanol gelöst, und durch Lyophilisieren dieser Lösung gelangt man zu 173 mg rohem A-30912 Faktor H.

Das rohe A-30912 Faktor H (150 mg) wird in 8 ml eines Gemisches aus Methanol, Wasser und Acetonitril (7:2:1) gelöst, und die erhaltene Lösung wird filtriert und wie oben beschrieben in eine Glassäule mit einer Länge von 32 cm und einem Innendurchmesser von 2,0 cm eingeführt. Das Lösungsmittel wird mit einer Fließgeschwindigkeit von 8 mm/min unter einem Druck von etwa 5,6 bar durch die Säule geführt, wobei man alle 3 Minuten eine Fraktion auffängt. Die Elution des Antibiotikums wird bei 280 nm verfolgt. Die Fraktionen 17 und 18 werden vereinigt und unter Vakuum zu einem Öl eingeengt. Das Öl wird in einem kleinen Volumen tert-Butanol gelöst, und durch Lyophilisieren dieser Lösung gelangt man zu 29 mg A-30912 Faktor H.

H e r s t e l l u n g s b e i s p i e l 8

Herstellung von Antibiotikum S31794/F-1

Das Antibiotikum S31794/F-1 wird durch submerse Züchtung von *Acrophialophora limonispora* NRRL 8095 unter Röhren, Schütteln und/oder Belüften bei einem pH-Wert von 3 bis 8, vorzugsweise einem pH-Wert von 5 bis 7, und bei einer Temperatur von 15 bis 30°C, vorzugsweise einer Temperatur von 18 bis 27°C, über eine Zeitdauer von 48 bis 360 Stunden, vorzugsweise eine Zeitdauer von 120 bis 288 Stunden, hergestellt.

Zur Isolierung des Antibiotikums S31794/F-1 wird die Kulturbreihe (90 l) mit einem Gemisch aus Ethylacetat und Isopropanol (4:1, 90 l) behandelt und das Ganze dann 30 Minuten bei Raumtemperatur homogenisiert. Die organische Schicht wird abgetrennt und unter Vakuum bei etwa 40°C eingedampft. Der erhaltene Rückstand wird mit einer 10-fachen Menge Silicagel unter Verwendung eines Gemisches aus Chloroform und Methanol (95:5 bis 60:40) chromatographiert. Die Fraktionen mit antifungaler Wirksamkeit werden vereinigt und mit einer 100-fachen Menge Silicagel (Sephadex LH-20) mit Methanol chromatographiert. Die aus der Sephadex-Säule kommenden Fraktionen mit antifungaler Wirksamkeit werden vereinigt und erneut mit einer 100-fachen Menge Silicagel (0,05 bis 0,2 mm) unter Verwendung eines Lösungsmittelsystems aus Chloroform, Methanol und Wasser (71:25:4) chromatographiert. Die eluierten Fraktionen mit antifungaler Wirksamkeit werden vereinigt und unter Vakuum eingedampft, wodurch man zu rohem Antibiotikum S31794/F-1 gelangt. Dieses Produkt wird in einer kleinen Menge Methanol gelöst und mit Diethylether ausgefällt, wodurch man S31794/F-1 in Form eines weißen amorphen Pulvers erhält, das nach Trocknen unter Hochvakuum bei 25 bis 30°C bei 178 bis 180°C unter Zersetzung schmilzt. Durch Umkristallisation aus einer 10-fachen Menge eines Gemisches aus Ethylacetat, Methanol und Wasser (80:12:8) gelangt man zu kristallinem S31794/F-1, das nach Trocknen unter

Hochvakuum bei 20°C bei 181 bis 183°C unter Zersetzung schmilzt.

H e r s t e l l u n g s b e i s p i e l 9

Isolierung des Antibiotikums S31794/F-1

Das gemäß Herstellungsbeispiel 8 nach Chromatographie über Sephadex erhaltene rohe Antibiotikum S31794/F-1 wird durch eine Schlaufe mittels eines Ventilsystems in eine Silicagel-säule (Michel-Miller-Säule) eingeführt. Die Säule wird durch eine Schlaufe mittels eines Ventilsystems mit LP-1/C<sub>18</sub>-Silicagel-Umkehrphasenharz (10 bis 20 Micron) (hergestellt gemäß Herstellungsbeispiel 10) in einem Gemisch aus Chloroform, Methanol und Wasser (71:25:4) gefüllt. Zur Förderung des Lösungsmittels durch die Säule wird eine F.M.I.-Pumpe mit einer ventilllosen Kolbenausführung verwendet. Die Elution des Antibiotikums wird unter Verwendung eines UV-Monitors bei 280 nm verfolgt. Die Fraktionen mit antifungaler Wirksamkeit werden vereinigt und unter Vakuum eingedampft, wodurch man das Antibiotikum S 31794/F-1 erhält.

## H e r s t e l l u n g s b e i s p i e l 10

### Herstellung von Silicagel/C<sub>18</sub>-Umkehrphasenharz

#### Stufe 1: Hydrolyse

Man gibt LP-1 Silicagel (1000 g von Quantum Corp., jetzt Whatman) zu einer Mischung aus konzentrierter Schwefelsäure (1650 ml) und konzentrierter Salpetersäure (1650 ml) in einem 5-l-Rundkolben und schüttelt das Ganze solange, bis es sauber suspendiert ist. Sodann erhitzt man das Gemisch über Nacht (16 Stunden) auf einem Dampfbad, wobei man auf den Kolben einen mit Wasser gekühlten Kühler aufsetzt.

Anschließend wird das Gemisch in einem Eisbad abgekühlt und vorsichtig unter Verwendung einer Sinterglasnutsche filtriert. Das Silicagel wird solange mit deionisiertem Wasser gewaschen, bis sein pH-Wert neutral ist. Sodann wird das Silicagel mit Aceton (4 l) gewaschen und unter Vakuum bei 100°C zwei Tage getrocknet.

#### Stufe 2: Erste Silylierung

Das nach Stufe 1 erhaltene trockne Silicagel wird in einen Rundkolben übertragen und in Toluol (3,5 l) suspendiert. Der Kolben wird zwei Stunden auf einem Dampfbad erhitzt, um das noch vorhandene restliche Wasser azeotrop zu entfernen. Sodann versetzt man das Ganze mit Octadecyltrichlorsilan (321 ml, Aldrich Chemical Company) und röhrt das Reaktionsgemisch über Nacht (16 Stunden) unter langsamem mechanischem Rühren bei etwa 60°C. Es ist darauf zu achten, daß der Rührer nicht bis zum Boden des Kolbens reicht, damit die Silicagelteilchen nicht gemahlen werden.

Im Anschluß daran läßt man das Gemisch abkühlen. Sodann wird das silanierte Silicagel gesammelt, mit Toluol (3 l) und Aceton (3 l) gewaschen und anschließend über Nacht (16 bis 20 Stunden) an der Luft getrocknet. Das getrocknete Silicagel wird in 3,5 l eines Gemisches aus Acetonitril und Wasser (1:1) in einem 5-l-Kolben suspendiert, worauf man das Ganze vorsichtig 2 Stunden bei Raumtemperatur röhrt, filtriert, mit Aceton (3 l) wäscht und über Nacht an der Luft trocknet.

Stufe 3: zweite Silylierung

Das Verfahren der obigen ersten Silylierung wird unter Verwendung von 200 ml Octadecyltrichlorsilan wiederholt. Die Suspension wird 2 Stunden unter vorsichtigem Rühren bei 60°C unter Rückfluß gehalten. Das hierdurch erhaltene Produkt wird abfiltriert, mit Toluol (3 l) und Methanol (6 l) gewaschen und dann unter Vakuum bei 50°C über Nacht (16 bis 20 Stunden) getrocknet.

H e r s t e l l u n g s b e i s p i e l 11

Aufschlämmfüllverfahren für Michel-Miller-Säulen

Allgemeine Angaben

- A. Dieses Verfahren eignet sich zum Füllen analytischer und präparativer Säulen.
- B. Die Säulen werden vorzugsweise mit Silicagelen oder Umkehrphasen-Silicagelen gefüllt (beispielsweise Quantum LP-1, Teilchengröße 10 bis 20 Micron, Lichoprep RP-8 oder RP-18, Teilchengröße 25 bis 40 Micron). Stattdessen können jedoch auch andere Silicagelle (beispielsweise Shandons ODS Hypersil, Teilchengröße 5 Micron) oder andere Harzarten zum Füllen der Säulen verwendet werden.
- C. Für diese Aufschlämmfülltechnik sind im allgemeinen Drücke von weniger als etwa 14 bar und Fließgeschwindigkeiten von 5 bis 40 ml/min erforderlich. Im einzelnen richten sich diese Werte nach dem Säulenvolumen und den Säulenabmessungen. Der Druck beim Füllen soll um etwa 2 bis 3,5 bar höher sein als der bei der Trennung.

gestellt, daß während der Trennung keine weitere Kompression des Absorbens erfolgt. Die in dieser Weise gefüllten Säulen können ohne Verlust an Wirkungsgrad mehrere Jahre betrieben werden.

DEine plötzliche Erniedrigung des Drucks kann die Bildung von Rissen oder Kanälen im Füllmaterial verursachen, was ein wirksames Arbeiten der Säule stark beeinträchtigen würde. Nach Abstellen der Pumpe muß daher für ein langsames Abfallen des Drucks auf den Wert Null gesorgt werden.

EDie verwendeten Säulen (Ace Glass Cat. No. unbepackt) haben etwa folgende Volumina: No. 5795-04=12 ml, No. 5795-10=110 ml, No. 5795-16=300 ml, No. 5795-24=635 ml und No. 5796-34= 34 ml.

F.Die zum Füllen einer Glassäule erforderliche Zeit liegt je nach Säulenabmessung und Geschicklichkeit zwischen Minuten und mehreren Stunden.

Stufen

1. Die Glassäule wird über eine Kupplung mit einer Vorrats-säule verbunden (das Volumen der Vorratssäule soll doppelt so groß sein wie das der Säule). Beide Säulen werden mit der Vorratssäule oben in senkrechte Stellung gebracht.

2. Das Füllmaterial ist abgewogen (etwa 100 g für eine Säule von etwa 200 ml).

3. Das Füllmaterial wird mit fünf Volumina Lösungsmittel, und zwar einem Gemisch aus 70 bis 80 % Methanol und 20 bis 30 % Wasser, versetzt.

4. Es wird gut geschüttelt, bis alle Teilchen befeuchtet sind, worauf man das Ganze über Nacht oder länger stehenläßt, damit eine vollständige Tränkung der Teilchen durch Lösungsmittel gewährleistet ist. Die überstehende Flüssigkeit wird abgegossen.

5. Das Harz wird mit zur Füllung der Vorratssäule ausreichendem Lösungsmittel aufgeschlämmt und dann schnell in diese gegossen. Die Säule muß dabei mit dem gleichen Lösungsmittel vorgefüllt sein, und die Vorratssäule soll vor dem Eingießen der Aufschlämmung mit Lösungsmittel teilweise gefüllt sein. Die Verwendung größerer Aufschlämmungsvolumina kann gleichfalls zu guten Ergebnissen führen, erfordert jedoch (a) einen größeren Vorratsraum oder (b) mehrere Vorratsraumfüllungen während des Einfüllvorgangs.

6. Die Vorratssäule wird mit dem Tetrafluorethylenstopfen unterhalb der Säule verschlossen (vgl. Fig. 1 von US-PS 4 131 547, Stopfen Nr. 3), worauf man die Pumpe anschließt und sofort mit dem Pumpen von Lösungsmittel durch das System bei einer Höchstfließgeschwindigkeit von 20 ml/min, wenn eine Ace Cat. No. 13265-25-Pumpe oder ein ähnliches Lösungsmittelabgabesystem verwendet wird.

7. Die obige Arbeitsweise wird solange fortgesetzt, bis die Säule vollständig mit Adsorbens gefüllt ist. Der Druck soll die Höchsttoleranz der Säule während dieses Vorgangs nicht übersteigen (etwa 14 bar für große Säulen und etwa 21 bar für Analysensäulen). In den meisten Fällen genügen Drücke von weniger als etwa 14 bar.

8. Wenn der Druck Höchstwerte übersteigt, dann wird die Fließgeschwindigkeit herabgesetzt, so daß der Druck abfällt.

9. Nach Füllung der Säule mit dem Adsorbens wird die Pumpe abgestellt, der Druck auf Null fallengelassen und die Verbindung zur Vorratssäule gelöst. Die Vorratssäule wird durch eine Vorsäule ersetzt, die mit Lösungsmittel und einer kleinen Menge Adsorbens gefüllt wird, wonach bis zur vollständigen Füllung der Säule mit Höchstdruck gepumpt wird. Bezuglich weiterer Hinweise wird auf die allgemeine Verfahrensbeschreibung verwiesen.

Nach dem Abstellen der Pumpe muß dafür gesorgt werden, daß der Druck immer langsam abfällt, wodurch die Bildung von Rissen oder Kanälen im Füllmaterial vermieden wird.

10. Nach Aufheben des Druckes wird die Verbindung zur Vorsäule sorgfältig gelöst. Einige mm (2 bis 4 mm) der Füllung werden mit einem kleinen Spatel vom oberen Ende der Säule entfernt. Auf das obere Ende der Säule werden ein oder zwei Filter gelegt, die gelinde auf das Füllmaterial aufgedrückt werden, worauf man den Tetrafluorethylenstopfen bis zum festen Verschluß auf die Säule aufbringt. Die Säule wird mit der Pumpe verbunden, worauf Druck angelegt wird (gewöhnlich weniger als etwa 14 bar) und durch die Glaswandung am oberen Ende der Säule beobachtet wird, ob sich das Harz noch weiter zusammensetzt. Sollte sich das Füllmaterial noch weiter absetzen (was bei größeren Säulen der Fall sein kann), dann erscheint ein kleiner Leerraum oder eine Kanalbildung, und in diesem Fall sollte die Stufe 9 wiederholt werden.

#### H e r s t e l l u n g s b e i s p i e l 12

##### Herstellung von Tetrahydro-A-30912A

A-30912 Faktor A wird in Ethanol gelöst. Sodann reduziert man Platindioxid in absolutem Ethanol zu elementarem Platin, und mit diesem Platin reduziert man dann A-30912 Faktor A mittels Wasserstoff unter positivem Druck solange, bis die Reaktion beendet ist (etwa 2 bis 3 Stunden). Das Reaktionsgemisch wird filtriert und unter Vakuum eingeengt. Der Rückstand wird in einer kleinen Menge tert.-Butanol gelöst, und durch Lyophilisieren dieser Lösung gelangt man zu Tetrahydro-A-30912A.

#### H e r s t e l l u n g s b e i s p i e l 13

##### Herstellung von Tetrahydro-A-30912B

A-30912 Faktor B wird in Ethanol gelöst. Sodann reduziert man Platindioxid in absolutem Ethanol zu elementarem Platin, und mit diesem Platin reduziert man dann A-30912 Faktor B mittels

Wasserstoff unter positivem Druck solange, bis die Reaktion beendet ist (etwa 2 bis 3 Stunden). Das Reaktionsgemisch wird filtriert und unter Vakuum eingeengt. Der Rückstand wird in einer kleinen Menge tert.-Butanol gelöst, und durch Lyophilisieren dieser Lösung gelangt man zu Tetrahydro-A-30912B.

#### H e r s t e l l u n g s b e i s p i e l 14

##### Herstellung von Tetrahydro-A-30912D

A-30912 Faktor D wird in Ethanol gelöst. Sodann reduziert man Platindioxid in absolutem Ethanol zu elementarem Platin, und mit diesem Platin reduziert man dann A-30912 Faktor D mittels Wasserstoff unter positivem Druck solange, bis die Reaktion beendet ist (etwa 2 bis 3 Stunden). Das Reaktionsgemisch wird filtriert und unter Vakuum eingeengt. Der Rückstand wird in einer kleinen Menge tert.-Butanol gelöst, und durch Lyophilisieren dieser Lösung gelangt man zu Tetrahydro-A-30912D.

#### H e r s t e l l u n g s b e i s p i e l 15

##### Herstellung von Tetrahydro-A-30912H

A-30912 Faktor H wird in Ethanol gelöst. Sodann reduziert man Platindioxid in absolutem Ethanol zu elementarem Platin, und mit diesem Platin reduziert man dann A-30912 Faktor H mittels Wasserstoff unter positivem Druck solange, bis die Reaktion beendet ist (etwa 2 bis 3 Stunden). Das Reaktionsgemisch wird filtriert und unter Vakuum eingeengt. Der Rückstand wird in einer kleinen Menge tert.-Butanol gelöst, und durch Lyophilisieren dieser Lösung gelangt man zu Tetrahydro-A-30912H.

B e i s p i e l 1

A. Deacylierung von Antibiotikum A-30912 Faktor A

Nach dem im Herstellungsbeispiel 1 beschriebenen Verfahren wird eine Fermentation unter Verwendung von *A. utahensis* durchgeführt, wobei man das Schrägenmedium A und das Produktionsmedium I verwendet, und das Produktionsmedium etwa 42 Stunden inkubiert. Das Fermentationsmedium versetzt man mit A-30912 Faktor A (340 g Rohsubstrat, das etwa 19,7 g A-30912 Faktor A enthält, und zwar gelöst in 1,5 l Ethanol). Die Deacylierung von A-30912 Faktor A wird durch einen entsprechenden Versuch unter Verwendung von *Candida albicans* verfolgt. Man lässt die Fermentation bis zur Beendigung der Deacylierung laufen, was sich durch ein Verschwinden der Aktivität gegenüber *C. albicans* äußert.

B. Isolierung von A-30912A Kern

Die gemäß obigem Abschnitt A erhaltene Gesamtfermentationsbrühe (100 l), welche etwa 20 g A-30912 Faktor A enthält, wird filtriert. Der Mycelkuchen wird verworfen. Das erhaltene klare Filtrat (etwa 93 l) führt man mit einer Fließgeschwindigkeit von 200 ml/min durch eine Säule, die 4,5 l HP-20-Harz enthält (DIAION High Porous Polymer, HP-Serie, Mitsubishi Chemical Industries Limited, Tokyo, Japan). Die Säule wird dann mit bis zu acht Säulenvolumina an deionisiertem Wasser bei pH 6,5 bis 7,5 gewaschen, um restliche Filterbrühe zu entfernen. Das Waschwasser wird verworfen. Hierauf wird die Säule mit einem Gemisch aus Wasser und Methanol (7:3) (85 l) mit einer Geschwindigkeit von 200 bis 300 ml/min eluiert.

Die Eluierung wird nach folgendem Verfahren verfolgt:

Von jeder eluierten Fraktion entnimmt man zwei Teilmengen. Eine Teilmenge wird auf ein kleines Volumen eingeengt und mit einem Säurechlorid, wie Myristoylchlorid, nach dem im Bezugsbeispiel 1 beschriebenen Verfahren behandelt. Das hierdurch erhaltene Produkt und die andere (unbehandelte) Teilmenge untersucht man bezüglich der jeweiligen Wirksamkeit gegenüber Candida albicans. Zeigt die unbehandelte Teilmenge keine Wirksamkeit, während die acylierte Teilmenge wirksam ist, dann enthält diese Fraktion A-30912A Kern. Das den A-30912A Kern enthaltende Eluat wird unter Vakuum auf ein geringes Volumen eingeengt, und durch Lyophilisieren dieses Konzentrats gelangt man zu etwa 97 g rohem Kern.

C. Reinigung von A-30912A Kern durch Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie

Der nach obiger Stufe B erhaltene A-30912A Kern (25 g) wird in 300 ml eines Gemisches aus Wasser, Acetonitril, Essigsäure und Pyridin (96:2:1:1) gelöst. Die Lösung wird mittels einer 4 l fassenden Säule aus rostfreiem Stahl (8 cm x 80 cm) chromatographiert, die mit Lichroprep RP-18, Teilchengröße 25 bis 40 Micron (MC/B Manufacturing Chemists, Inc. E/M, Cincinnati, OH) gefüllt ist. Die Säule ist Teil einer Chromatospac Prep 100 Einheit (Jobin Yvon, 16-18 Rue du Canal, 91160 Longjumeau, Frankreich). Die Säule wird unter einem Druck von etwa 6,3 bis 7 bar und unter Verwendung des gleichen Lösungsmittelgemisches betrieben, wodurch sich eine Fließgeschwindigkeit von etwa 60 ml/min ergibt. Die Auftrennung wird unter Verwendung eines UV-Monitors (ISCO Absorptionsmonitor Model UA-5, Instrumentation Specialties Co., 4700 Superior Ave., Lincoln, Nebraska 68504) mit einer optischen Einheit (ISO Typ 6) bei 280 nm verfolgt. Jede Minute werden Fraktionen mit einem Volumen von etwa 500 ml aufgefangen.

Auf Basis der Absorption bei 280 nm werden die Fraktionen, die den A-30912A Kern enthalten, vereinigt, unter Vakuum eingedampft und lyophilisiert, wodurch man zu 2,6 g des gewünschten Kerns gelangt. Bis zur vollständigen chromatographischen Trennung ist eine Lösungsmittelmenge von 7 bis 8 l erforderlich.

D. Eigenschaften vom A-30912A Kern

- (a) Empirische Formel:  $C_{34}H_{51}N_7O_{15}$ .
- (b) Molekulargewicht: 797,83.
- (c) Weißer amorpher Feststoff, der in Wasser, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid und Methanol löslich ist,

sich in Chloroform, Toluol und Diethylether jedoch nicht löst.

- (d) IR-Absorptionsspektrum (KBr-Scheiben) mit folgenden Absorptionsmaxima:  
3340 breit (OH, H-gebunden); 2970, 2930 und 2890 (CH-Streckung, aliphatische  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ , CH Gruppen) 1660 und 1625 (mehrere Carbonyle C=O); 1510-1550; 1430-1450 (CH Bewegung); 1310-1340; 1230-1260; 1080; 835, 650 breit und 550 breit  $\text{cm}^{-1}$ .
- (e) Die elektrometrische Titration in 66%-igem wässrigem Dimethylformamid zeigt die Gegenwart einer titrierbaren Gruppe mit einem  $\text{pK}_a$ -Wert von etwa 7,35 (anfänglicher pH-Wert = 7,32).
- (f) Bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ist die Verweilzeit ( $K'$ ) 11,52 Minuten, und zwar unter folgenden Bedingungen:  
Säule: 4 x 300 mm  
Packung: Silicagel/C<sub>18</sub>  
Lösungsmittel: Ammoniumacetat:Acetonitril:Wasser (1:2:97)  
Strömungsgeschwindigkeit: 3 ml/min  
Druck: 175 bar  
Detektor: UV-Licht mit veränderlicher Wellenlänge von 230 nm  
Sensitivität: 0 bis 0,4 A.U.F.S.

### B e i s p i e l 2

Zur Herstellung und Reinigung von A-30912A Kern geht man wie im Beispiel 1 beschrieben vor, wobei man als Substrat jedoch Tetrahydro-A-30912A verwendet.

B e i s p i e l 3

Zur Herstellung und Reinigung von A-30912A Kern geht man wie im Beispiel 1 beschrieben vor, wobei man als Substrat jedoch Aculeacin A verwendet.

B e i s p i e l 4

A. Deacylierung von Antibiotikum A-30912 Faktor B

Unter Anwendung des im Herstellungsbeispiel 1 beschriebenen Verfahrens fermentiert man A. utahensis, und zwar unter Verwendung des Produktionsmediums I. Nach etwa 48-stündiger Bebrütung der Kultur versetzt man das Fermentationsmedium mit A-30912 Faktor B in Form einer Lösung in einer geringen Menge Methanol.

Die Deacylierung von A-30912 Faktor B wird durch einen Papier scheibenversuch gegenüber Candida albicans oder Neurospora crassa verfolgt. Man lässt die Fermentation solange laufen, bis die Deacylierung beendet ist, was sich durch ein Verschwinden an Aktivität äußert.

B. Isolierung von A-30912B Kern

Die nach obigem Abschnitt A erhaltene Gesamtfermentationsbrühe wird filtriert. Der Mycelkuchen wird verworfen. Das klare Filtrat führt man durch eine Säule, die mit HP-20-Harz (DIAION High Porous Polymer, HP-Serie, Mitsubishi Chemical Industries Limited, Tokyo, Japan) gefüllt ist. Der hierbei erhaltene Säulenabstrom wird verworfen. Die Säule wird dann mit bis zu acht Säulenvolumina an deionisiertem Wasser bei pH 6,5 bis 7,5 gewaschen, um noch vorhandene restliche Fermentationsbrühe zu entfernen. Das dabei anfallende Waschwasser

wird verworfen. Hierauf wird die Säule mit einem Gemisch aus Wasser und Methanol (7:3) eluiert. Die Eluierung der Säule wird nach folgendem Verfahren verfolgt:

Jeder eluierten Fraktion entnimmt man zwei Teilmengen. Eine Teilmenge wird auf ein kleines Volumen eingeengt und mit einem Säurechlorid, wie Myristoylchlorid, behandelt. Das dabei erhaltenen Produkt und die andere (nicht behandelte) Teilmenge untersucht man dann bezüglich der jeweiligen Aktivität gegenüber Candida albicans. Ist die unbehandelte Teilmenge nicht wirksam und die acylierte Teilmenge wirksam, dann enthält diese Fraktion A-30912B Kern. Das den A-30912B Kern enthaltende Eluat wird unter Vakuum auf ein kleines Volumen eingeengt und lyophilisiert, wodurch man zum entsprechenden rohen Kern gelangt.

#### C. Reinigung von A-30912B Kern durch Umkehrphasen-Flüssigkeits-chromatographie

Der nach obigem Abschnitt B erhaltene rohe A-30912B Kern wird in einem Gemisch aus Wasser, Acetonitril, Essigsäure und Pyridin (96:2:1:1) gelöst. Die Lösung wird mit einer Säule chromatographiert, die mit Lichroprep RP-18, Teilchengröße 25 bis 40 Micron (MC/B Manufacturing Chemists, Inc. E/M, Cincinnati, OH) gefüllt ist. Die Säule ist Teil einer Chromatospac Prep 100 Einheit (Jobin Yvon, 16-18 Rue du Canal, 91160 Longjumeau, Frankreich). Die Säule wird beim Druck von etwa 6,3 bis 7 bar unter Verwendung des gleichen Lösungsmittels betrieben, wodurch sich eine Fließgeschwindigkeit von etwa 60 ml/min ergibt. Die Auftrennung wird bei 280 nm unter Verwendung eines UV-Monitors (ISCO Absorptions-monitor Model UA-5, Instrumentation Specialties Co., 4700 Superior Ave., Lincoln, Nebraska 68504) mittels einer optischen Einheit (ISCO Typ 6) überwacht.

Auf Basis der Absorption bei 280 nm werden die Fraktionen, die den A-30912B Kern enthalten, vereinigt, unter Vakuum eingedampft und lyophilisiert, wodurch man zum gereinigten A-30912B Kern gelangt.

B e i s p i e l 5

Zur Herstellung und Reinigung A-30912B Kern geht man wie im Beispiel 4 beschrieben vor, wobei man als Substrat jedoch Tetrahydro-A-30912B verwendet.

B e i s p i e l 6

A. Deacylierung von A-30912 Faktor D

Unter Verwendung des im Herstellungsbeispiel 1 beschriebenen Verfahrens fermentiert man *A. utahensis* mit einem Produktionsmedium I. Nach etwa 48-stündiger Bebrütung der Kultur versetzt man das Fermentationsmedium mit einer Lösung von A-30912 Faktor D in einer kleinen Menge Methanol.

Die Deacylierung von A-30912 Faktor D wird durch einen Papierscheibenversuch gegenüber *Candida albicans* oder *Neurospora crassa* verfolgt. Man lässt die Fermentation solange laufen, bis die Deacylierung beendet ist, was sich durch ein Verschwinden der Aktivität äußert.

B. Isolierung von A-30912D Kern

Die nach obigem Abschnitt A erhaltene Gesamtfermentationsbrühe wird filtriert. Der Mycelkuchen wird verworfen. Das klare Filtrat führt man durch eine Säule, die mit HP-20-Harz (DIAION High Porous Polymer, HP-Serie, Mitsubishi Chemical Industries Limited, Tokyo, Japan) gefüllt ist. Der hierbei erhaltene Säulenabstrom wird verworfen. Die Säule wird dann mit bis zu

acht Säulenvolumina an deionisiertem Wasser bei pH 6,5 bis 7,5 gewaschen, um noch vorhandene restliche Fermentationsbrühe zu entfernen. Das dabei anfallende Waschwasser wird verworfen. Hierauf wird die Säule mit einem Gemisch aus Wasser und Methanol (7:3) eluiert. Die Eluierung der Säule wird nach folgendem Verfahren verfolgt:

Jeder eluierten Fraktion entnimmt man zwei Teilmengen. Eine Teilmenge wird auf ein kleines Volumen eingeengt und mit einem Säurechlorid, wie Myristoylchlorid, behandelt. Das dabei erhaltene Produkt und die andere (nicht behandelte) Teilmenge untersucht man dann bezüglich der jeweiligen Aktivität gegenüber Candida albicans. Ist die unbehandelte Teilmenge nicht wirksam und die acylierte Teilmenge wirksam, dann enthält eine solche Fraktion A-30912D Kern. Das den A-30912D Kern enthaltende Eluat wird unter Vakuum auf ein kleines Volumen eingeengt und lyophilisiert, wodurch man zum entsprechenden rohen Kern gelangt.

#### C. Reinigung von A-30912D Kern durch Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie

Der nach obigem Abschnitt B erhaltene rohe A-30912D Kern wird nach dem im Abschnitt C von Beispiel 4 beschriebenen Verfahren gereinigt.

Auf Basis der Absorption bei 280 nm werden diejenigen Fraktionen vereinigt, die den A-30912D Kern enthalten, unter Vakuum eingedampft und lyophilisiert, wodurch man zum gereinigten A-30912D Kern gelangt.

B e i s p i e l 7

Zur Herstellung und Reinigung von A-30912D Kern geht man wie im Beispiel 6 beschrieben vor, wobei man als Substrat jedoch Tetrahydro-A-30912D verwendet.

B e i s p i e l 8

A. Deacylierung von Antibiotikum A-30912 Faktor H

Nach dem im Herstellungsbeispiel 1 beschriebenen Verfahren fermentiert man A. utahensis unter Verwendung des Produktionsmediums I. Nach 48-stündiger Bebrütung der Kultur löst man A-30912 Faktor H in einer geringen Menge Methanol und gibt die Lösung zum Fermentationsmedium.

Die Deacylierung von A-30912 Faktor H wird durch einen Papier-scheibenversuch gegenüber Candida albicans oder Neurospora crassa verfolgt. Man lässt die Fermentation bis zur Beendigung der Deacylierung laufen, was sich durch ein Verschwinden an Aktivität äußert.

B. Isolierung von A-30912H Kern

Die nach obigem Abschnitt A erhaltene Gesamtfermentationsbrühe wird filtriert. Der Mycelkuchen wird verworfen. Das klare Filtrat leitet man durch eine Säule, die mit HP-20-Harz (DIAION High Porous Polymer, HP-Serie, Mitsubishi Chemical Industries Limited, Tokyo, Japan) gefüllt ist. Der dabei anfallende Säulenabstrom wird verworfen. Die Säule wird dann mit bis zu acht Säulenvolumina an deionisiertem Wasser bei pH 6,5 bis 7,5 gewaschen, um restliche filtrierte Brühe zu entfernen. Das Waschwasser wird verworfen. Sodann wird die Säule mit einem Gemisch aus Wasser und Methanol (7:3) eluiert. Die Elution wird nach folgendem Verfahren verfolgt:

Jeder eluierten Fraktion werden zwei Teilmengen entnommen. Eine Teilmenge wird auf ein kleines Volumen eingeengt und mit einem Säurechlorid, wie Myristoylchlorid, behandelt, wozu man sich des im Bezugsbeispiel 1 beschriebenen Verfahrens bedient. Das hierdurch erhaltene Produkt und die andere (unbehandelte) Teilmenge untersucht man bezüglich der jeweiligen Wirksamkeit gegenüber Candida albicans. Ist die unbehandelte Teilmenge unwirksam und die acylierte Teilmenge wirksam, dann enthält eine solche Fraktion A-30912H Kern. Das den A-30912H Kern enthaltende Eluat wird auf ein kleines Volumen eingeengt und lyophilisiert, wodurch man zum rohen Kern gelangt.

C. Reinigung von A-30912H Kern durch Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie

Der nach obigem Abschnitt B erhaltene rohe A-30912D Kern wird nach dem im Abschnitt C von Beispiel 4 beschriebenen Verfahren gereinigt.

Auf Basis der Absorption bei 280 nm werden diejenigen Fraktionen vereinigt, die den A-30912H Kern enthalten, unter Vakuum eingedampft und lyophilisiert, wodurch man zum gereinigten A-30912H Kern gelangt.

B e i s p i e l 9

Zur Herstellung und Reinigung von A-30912H Kern geht man wie im Beispiel 8 beschrieben vor, wobei man als Substrat jedoch Tetrahydro-A-30912H verwendet.

B e i s p i e l 10

Zur Herstellung und Reinigung von A-30912H Kern geht man wie im Beispiel 8 beschrieben vor, wobei man abweichend davon A-30912 Faktor A jedoch nach folgendem Verfahren erzeugt:

Antibiotikum A-30912 Faktor A (19,6 mg) wird in Dimethylformamid (1 ml) gelöst. Die Lösung versetzt man mit saurem Methanol (3 % HCl, 0,06 ml). Die erhaltene Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und dann unter Vakuum zur Trockne eingedampft. Der angefallene Rückstand wird der im Herstellungsbeispiel 7 beschriebenen Hochleistungsniederdruckflüssigchromatographie unter Verwendung von Umkehrphasen-Silicagel unterzogen (LP-1/C<sub>18</sub>, hergestellt gemäß Herstellungsbeispiel 10) und Einsatz eines Gemisches aus Methanol, Wasser und Acetonitril (7:2:1) als Eluiermittel. Auf diese Weise gelangt man zu 1,4 mg A-30912 Faktor H (nämlich der Verbindung der Formel II, worin R<sup>1</sup> und R<sup>4</sup> jeweils Hydroxy bedeuten, R<sup>2</sup> Wasserstoff ist, R<sup>3</sup> Methoxy darstellt und R für Linoleyl steht).

B e i s p i e l 11

Zur Herstellung und Reinigung von A-30912H Kern der Struktur I, worin R<sup>3</sup> Ethoxy ist, geht man wie im Beispiel 8 beschrieben vor, wobei man abweichend davon als Substrat jedoch die Verbindung der Formel II verwendet, worin R<sup>3</sup> Ethoxy ist und R Linoleyl bedeutet. Das Substrat wird nach dem in Beispiel 10 verwendeten Verfahren hergestellt.

B e i s p i e l 12

Zur Herstellung und Reinigung von A-30912H Kern der Struktur I, worin R<sup>3</sup> n-Propoxy ist, geht man wie im Beispiel 8 beschrieben vor, wobei man abweichend davon als Substrat jedoch die Verbindung der Formel II verwendet, worin R<sup>3</sup> n-Propoxy ist und R Linoleyl bedeutet. Das Substrat wird nach dem in Beispiel 10 verwendeten Verfahren hergestellt.

B e i s p i e l 13

Zur Herstellung und Reinigung von A-30912H Kern der Struktur I, worin R<sup>3</sup> Isobutoxy ist, geht man wie im Beispiel 8 beschrieben vor, wobei man abweichend davon als Substrat jedoch die Verbindung der Formel II verwendet, worin R<sup>3</sup> Isobutoxy ist und R Linoleyl bedeutet.

B e i s p i e l 14

Zur Herstellung und Reinigung von A-30912H Kern der Struktur I, worin R<sup>3</sup> n-Pentyloxy ist, geht man wie im Beispiel 8 beschrieben vor, wobei man abweichend davon als Substrat jedoch die Verbindung der Formel II verwendet, worin R<sup>3</sup> n-Pentyloxy ist und R Linoleyl bedeutet.

B e i s p i e l 15

Zur Herstellung und Reinigung von A-30912H Kern der Struktur I, worin R<sup>3</sup> n-Hexyloxy ist, geht man wie im Beispiel 8 beschrieben vor, wobei man abweichend davon als Substrat jedoch die Verbindung der Formel II verwendet, worin R<sup>3</sup> n-Hexyloxy ist und R Linoleyl bedeutet.

B e i s p i e l 16

Zur Herstellung und Reinigung von A-30912H Kern der Struktur I, worin R<sup>3</sup> Ethoxy ist, geht man wie im Beispiel 8 beschrieben vor, wobei man abweichend davon als Substrat jedoch die Verbindung der Formel II verwendet, worin R<sup>3</sup> Ethoxy ist und R Stearoyl bedeutet.

B e i s p i e l 17

Zur Herstellung und Reinigung von A-30912H Kern der Struktur I, worin R<sup>3</sup> 2-Ethyl-1-butoxy ist, geht man wie im Beispiel 8 beschrieben vor, wobei man abweichend davon als Substrat jedoch die Verbindung der Formel II verwendet, worin R<sup>3</sup> 2-Ethyl-1-butoxy ist und R Linoleyl bedeutet.

B e i s p i e l 18

Zur Herstellung und Reinigung von A-30912H Kern der Struktur I, worin R<sup>3</sup> 3-Methyl-1-butoxy ist, geht man wie im Beispiel 8 beschrieben vor, wobei man abweichend davon als Substrat jedoch die Verbindung der Formel II verwendet, worin R<sup>3</sup> 3-Methyl-1-butoxy ist und R Linoleyl bedeutet.

B e i s p i e l 19

A. Deacylierung von Antibiotikum S 31794/F-1

Nach dem im Herstellungsbeispiel 1 beschriebenen Verfahren fermentiert man A. utahensis unter Verwendung des Produktionsmediums I. Nach etwa 48-stündiger Bebrütung der Kultur versetzt man das Fermentationsmedium mit einer Lösung des Antibiotikums S 31794/F-1 in einer kleinen Menge Methanol.

Die Dacylierung von S 31794/F-1 wird durch einen Papierscheibenversuch gegenüber Candida albicans verfolgt. Man lässt die Fermentation bis zur Beendigung der Deacylierung laufen, was sich anhand eines Verschwindens der Aktivität äußert.

B. Isolierung von S 31794/F-1 Kern

Die nach obigem Abschnitt A erhaltene Gesamtfermentationsbrühe wird filtriert. Der Mycelkuchen wird verworfen. Das angefallene klare Filtrat führt man durch eine Säule, die mit HP-20-Harz (DIAION hochporöses Polymer, HP-Serie, Mitsubishi Chemical Industries Limited, Tokyo, Japan) gefüllt ist. Der dabei anfallende Abstrom wird verworfen. Die Säule wird dann mit bis zu acht Säulenvolumina an deionisiertem Wasser bei pH 6,5 bis 7,5 gewaschen, um restliche filtrierte Brühe zu entfernen. Das anfallende Waschwasser wird verworfen. Die Säule wird hierauf mit einem Gemisch aus Wasser und Methanol (7:3) eluiert. Die Elution wird nach folgendem Verfahren verfolgt:

Jeder eluierten Fraktion werden zwei Teilmengen entnommen. Eine Teilmenge wird auf ein kleines Volumen eingeengt und mit einem Säurechlorid, wie Myristoylchlorid, behandelt. Das

hierdurch erhaltene Produkt und die andere (unbehandelte) Teilmenge untersucht man bezüglich der jeweiligen Aktivität gegenüber Candida albicans. Ist die unbehandelte Teilmenge unwirksam und die acylierte Teilmenge wirksam, dann enthält die jeweilige Fraktion S 31794/F-1 Kern. Das den S 31794/F-1 Kern enthaltende Eluat wird unter Vakuum auf ein kleines Volumen eingeengt und lyophilisiert, wodurch man zum gewünschten rohen Kern gelangt.

C. Reinigung von S 31794/F-1 Kern durch Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie

Der nach obigem Abschnitt B erhaltene rohe S 31794/F-1 Kern wird nach dem in Beispiel 4, Abschnitt C, beschriebenen Verfahren gereinigt.

Auf Basis der Absorption bei 280 nm werden die den S 31794/F-1 Kern enthaltenden Fraktionen vereinigt, unter Vakuum eingeengt und lyophilisiert, wodurch man zum reinen S 31794/F-1 Kern gelangt.

Herstellung von Abbott- und Fukuda-Derivaten

Im folgenden wird die Herstellung von Verbindungen der Formel III nach der Methode über einen aktiven Ester beschrieben. Hierdurch werden im einzelnen Verbindungen aus der Formel III hergestellt, bei denen R<sup>5</sup> für CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>- steht und R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> sowie R<sup>4</sup> die Bedeutungen aus den jeweiligen Kernen haben.

Bezugsherstellungsbeispiel 1

Herstellung von 2,4,5-Trichlorphenyltridecanoat

Eine Lösung von n-Tridecansäure (Sigma Chemical Co., 12,5 g), 2,4,5-Trichlorphenol (11,5 g) und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (12,0 g) in Methylenchlorid (650 ml) wird 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird filtriert und unter Vakuum eingedampft, wodurch man zu 2,4,5-Trichlorphenyltridecanoat (22 g) gelangt. Dieses Material wird säulenchromatographisch über Silicagel (Woelm) unter Verwendung von Toluol als Eluiermittel gereinigt. Die Fraktionen werden dünnschichtchromatographisch unter Verwendung von kurzwelligem UV-Licht zur Detektion verfolgt. Die das gereinigte Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und unter Vakuum zur Trockne eingedampft.

Bezugsbeispiel 1

Acylierung von A-30912A Kern mit 2,4,5-Trichlorphenyl-n-tridecanoat

Eine Lösung von 2,4,5-Trichlorphenyl-n-tridecanoat (6,0 g) und A-30912A Kern (4,5 g) in Dimethylformamid (DMF) (600 ml) wird 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Durch Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum gelangt man zu einem Rückstand (12 g). Der Rückstand wird 45 Minuten in Methylenchlorid (500 ml) aufgeschlämmt und die Mischung dann filtriert. Das Filtrat wird verworfen. Die erhaltenen Feststoffe werden mit Methanol (500 ml) extrahiert. Der Methanolextrakt wird filtriert und unter Vakuum eingedampft, wodurch man ein rohes Produkt (5,0 g) erhält.

Das obige rohe Produkt wird durch Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wie folgt gereinigt:

Eine Probe des Rohprodukts (1 g) wird in Methanol (5 ml) gelöst und in eine Säule aus rostfreiem Stahl (Länge 180 cm; Innendurchmesser 2,5 cm) gegeben, die mit LP-1/C<sub>18</sub>-Harz ge-

füllt ist (siehe Herstellungsbeispiel 10 und 11). Die Säule wird mit einem Lösungsmittelsystem aus Wasser, Methanol und Acetonitril (3:3:4) eluiert. Die Eluierung wird unter einem Druck von etwa 70 bis 105 bar bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 11 bis 12 ml/min mittels einer LDC-Duplex-Pumpe (Milton-Roy) durchgeführt. Der Säulenabstrom wird mit einem UV-Detektor (ISCO-UA-5) bei 280 nm überwacht. Alle 2 Minuten werden Fraktionen (21 bis 24 ml) aufgefangen. Die das gewünschte Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und unter Vakuum eingedampft. Auf diese Weise gelangt man zu 550 mg Produkt. Das oben beschriebene chromatographische Verfahren wird viermal wiederholt, wodurch man folgende weitere gereinigte Produktproben erhält: 620 mg, 520 mg, 670 mg und 490 mg, so daß sich eine gesamte Produktmenge von 2,8 g ergibt.

Nach dem oben beschriebenen Verfahren setzt man 40 g A-30912A Kern mit 2,4,5-Trichlorphenyl-n-tridecanoat um, wodurch man zu 2,6 g des gereinigten Titelprodukts gelangt. Die aus beiden Herstellungen erhaltenen Materialien (5,4 g) werden vereinigt. Eine FDMS-Bestimmung ergibt ein Massenion ( $M^+ + Na^+$ ) von 1016. Der theoretische Wert für  $M^+ + Na^+$  beträgt 1016. Durch analytische Hochleistungsflüssigchromatographie ( $C_{18}$  Micro Bondapak, Waters Co.) unter Anwendung eines Eluiermittelsystems aus Wasser, Methanol und Acetonitril (2:1:2) ergibt sich nur ein einziges Maximum.

#### Bezugsbeispiel 2

##### Acylierung von A-30912B Kern mit 2,4,5-Trichlorphenyl-n-tridecanoat .

Eine Lösung von 2,4,5-Trichlorphenyl-n-tridecanoat (3,3 mMol) und A-30912B Kern (1 mMol) in Dimethylformamid (DMF) (200 ml) wird 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der durch Ent-

fernen des Lösungsmittels unter Vakuum erhaltene Rückstand wird 45 Minuten in Methylenchlorid (300 ml) aufgeschlämmt, und das Gemisch wird dann filtriert. Das Filtrat wird verworfen. Die erhaltenen Feststoffe werden mit Methanol (300 ml) extrahiert, worauf man den Methanolextrakt filtriert und unter Vakuum einengt. Auf diese Weise gelangt man zu einem Rohprodukt.

Das obige Rohprodukt wird durch Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wie folgt gereinigt:

Eine Probe des Rohprodukts (1 g) wird in Methanol (5 ml) gelöst und in eine Säule aus rostfreiem Stahl (Länge 80 cm, Innendurchmesser 2,5 cm) gegeben, die mit LP-1/C<sub>18</sub>-Harz gefüllt ist (siehe Herstellungsbeispiel 10 und 11). Die Säule wird mit einem Lösungsmittelsystem aus Wasser, Methanol und Acetonitril (3:3:4) eluiert. Die Eluierung wird unter einem Druck von etwa 70 bis 105 bar bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 11 bis 12 ml/min mittels einer LDC-Duplex-Pumpe (Milton-Roy) durchgeführt. Der Säulenabstrom wird mit einem UV-Detektor (ISCO-UA-5) bei 280 nm überwacht. Alle 2 Minuten werden Fraktionen (21 bis 24 ml) aufgefangen. Die das gewünschte Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und unter Vakuum eingedampft, wodurch man zum Titelprodukt gelangt. Das gereinigte Produkt wird dünnenschichtchromatographisch unter Verwendung von Umkehrphasen-C<sub>18</sub>-Platten (Whatman KC<sub>18</sub>) und eines Lösungsmittelsystems aus Wasser, Methanol und Acetonitril (1:2:2, Volumen zu Volumen) gereinigt. Nach entsprechender Entwicklung werden die Platten zur Detektion des gewünschten Produkts unter UV-Licht beobachtet.

#### Bezugsbeispiel 3

Acylierung von A-30912D Kern mit 2,4,5-Trichlorphenyl-n-tridecanoat

Eine Lösung von 2,4,5-Trichlorphenyl-n-tridecanoat (3,3 mMol) und A-30912D Kern (1 mMol) in Dimethylformamid (DMF) (200 ml) wird 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der durch Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum erhaltene Rückstand wird 45 Minuten in Methylenechlorid (300 ml) aufgeschlämmt, und das Gemisch wird dann filtriert. Das Filtrat wird verworfen. Die erhaltenen Feststoffe werden mit Methanol (300 ml) extrahiert, worauf man den Methanolextrakt filtriert und unter Vakuum einengt. Auf diese Weise gelangt man zu einem Rohprodukt.

Das erhaltene Rohprodukt wird wie im Bezugsbeispiel 2 beschrieben durch Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gereinigt.

#### Bezugsbeispiel 4

##### Acylierung von A-30912H Kern mit 2,4,5-Trichlorphenyl-n-tridecanoat

Eine Lösung von 2,4,5-Trichlorphenyl-n-tridecanoat (3,3 mMol) und A-30912H Kern (1 mMol) in Dimethylformamid (DMF) (200 ml) wird 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der durch Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum erhaltene Rückstand wird 45 Minuten in Methylenechlorid (300 ml) aufgeschlämmt, und das Gemisch wird dann filtriert. Das Filtrat wird verworfen. Die erhaltenen Feststoffe werden mit Methanol (300 ml) extrahiert, worauf man den Methanolextrakt filtriert und unter Vakuum einengt. Auf diese Weise gelangt man zu einem Rohprodukt.

Das erhaltene Rohprodukt wird wie im Bezugsbeispiel 2 beschrieben durch Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gereinigt.

Bezugsbeispiel 5

Zur Herstellung der Verbindung der Formel III, worin R<sup>3</sup> n-Propoxy bedeutet und R<sup>5</sup> für CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>- steht, geht man wie im Bezugsbeispiel 4 beschrieben vor, wobei man als Ausgangsmaterial jedoch die Verbindung der Formel I verwendet, worin R<sup>3</sup> für n-Propoxy steht (hergestellt nach dem Verfahren von Beispiel 12).

Bezugsbeispiel 6

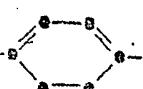
Acylierung von S 31794/F-1 Kern mit 2,4,5-Trichlorphenyl-n-tridecanoat

Eine Lösung von 2,4,5-Trichlorphenyl-n-tridecanoat (3,3 mMol) und S 31794/F-1 Kern (1 mMol) in Dimethylformamid (DMF) (200 ml) wird 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der durch Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum erhaltene Rückstand wird 45 Minuten in Methylenchlorid (300 ml) aufgeschlämmt, und das Gemisch wird dann filtriert. Das Filtrat wird verworfen. Die erhaltenen Feststoffe werden mit Methanol (300 ml) extrahiert, worauf man den Methanolextrakt filtriert und unter Vakuum einengt. Auf diese Weise gelangt man zu einem Rohprodukt.

Das erhaltene Rohprodukt wird wie im Bezugsbeispiel 2 beschrieben durch Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gereinigt.

Herstellung von Derivaten der Debono-Gruppe I

Im folgenden wird die Herstellung von Verbindungen der For-

mel III beschrieben, worin R<sup>5</sup> für CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CONH-

steht, nämlich die Bildung sogenannter Debono I-Verbindungen der Formel III.

### Bezugsherstellungsbeispiel 2

#### Herstellung von N-(n-Dodecanoyl)-p-aminobenzoësäure

Man gibt n-Dodecanoylchlorid (8,74 g, 40 mMol) tropfenweise zu einer Lösung von p-Aminobenzoësäure (5,5 g, 40 mMol) in Pyridin (100 ml). Das Reaktionsgemisch wird 3 Stunden gerührt und dann in Wasser (3 l) gegossen. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und unter Vakuum getrocknet, wodurch man zu N-(n-Dodecanoyl)-p-aminobenzoësäure (11,01 g) gelangt.

### Bezugsherstellungsbeispiel 3

#### Herstellung des 2,4,5-Trichlorphenylesters von N-(n-Dodecanoyl)-p-aminobenzoësäure

Man löst N-(n-Dodecanoyl)-p-aminobenzoësäure (11,01 g, 34,5 mMol), 2,4,5-Trichlorphenol (7,5 g, 38 mMol) und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (6,94 g, 34,5 mMol) in Methylenchlorid (250 ml). Das Reaktionsgemisch wird 3,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann filtriert. Das Filtrat wird unter Vakuum zu einem Rückstand eingedampft, den man aus einer Mischung aus Acetonitril und Wasser umkristallisiert. Auf diese Weise gelangt man zum 2,4,5-Trichlorphenylester von N-(n-Dodecanoyl)-p-aminobenzoësäure (12,84 g).

Bezugsbeispiel 7

Acylierung von A-30912A Kern

Den A-30912A Kern (8,16 g, 10,2 mMol) und den 2,4,5-Trichlorphenylester von N-(n-Dodecanoyl)-p-aminobenzoësäure (4,72 g, 10,2 mMol) löst man in Dimethylformamid (100 ml). Die Lösung wird 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt, und der dabei erhaltene Rückstand wird zweimal mit Diethylether gewaschen. Die Waschflüssigkeiten werden verworfen. Der gewaschene Rückstand wird in Methanol (50 ml) gelöst und durch Umkehrphasenhochleistungs-Flüssigchromatographie mittels einer Prep LC/System 500 Einheit (Waters Associates, Inc., Milford, Mass.) unter Verwendung einer Prep Pak-500/C<sub>18</sub> Säule (Waters Associates, Inc.) als stationäre Phase gereinigt. Die Säule wird isokratisch mit einem Lösungsmittelgemisch aus Wasser, Methanol und Acetonitril (25:65:10, Volumen/Volumen) bei einem Druck von etwa 35 bar eluiert. Die Fraktionen werden dünnenschichtchromatographisch unter Verwendung von Silicagelplatten und von einem Lösungsmittelgemisch aus Wasser, Methanol und Acetonitril (25:65:10, Volumen/Volumen) als Lösungsmittelsystem analysiert. Die das gewünschte Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert, wodurch man das N-(n-Dodecanoyl)-p-aminobenzoylderivat von A-30912A Kern (3,5 g) erhält.

Bezugsbeispiel 8

Acylierung von A-30912B Kern

Man löst A-30912B Kern (10,2 mMol) und den 2,4,5-Trichlorphenylester von N-(n-Dodecanoyl)-p-aminobenzoësäure (10,2 mMol) in Dimethylformamid (100 ml). Die Lösung wird 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der durch anschließendes Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum erhaltene Rückstand wird zweimal mit Diethylether gewaschen. Die Waschflüssigkeiten werden verworfen. Der gewaschene Rückstand wird in Methanol (50 ml)

gelöst und durch Umkehrphasenhochleistungs-Flüssigchromatographie mittels einer Prep LC/System 500 Einheit (Waters Associates, Inc., Milford, Massachusetts) unter Verwendung einer Prep Pak-500/C<sub>18</sub> Säule (Waters Associates, Inc.) als stationäre Phase gereinigt. Die Säule wird isokratisch mit einem Gemisch aus Wasser, Methanol und Acetonitril (25:65:10, Volumen/Volumen) bei einem Druck von etwa 35 bar eluiert. Die Fraktionen werden dünnschichtchromatographisch unter Verwendung von Silicagelplatten und eines Gemisches aus Wasser, Methanol und Acetonitril (25:65:10, Volumen/Volumen) als Lösungsmittelsystem analysiert. Die das gewünschte Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert, wodurch man zum N-(n-Dodecanoyl)-p-aminobenzoylderviat von A-30912B Kern gelangt.

#### Bezugsbeispiel 9

##### Acylierung von A-30912D Kern

Man löst A-30912D Kern (0,2 mMol) und den 2,4,5-Trichlorphenylester von N-(n-Dodecanoyl)-p-aminobenzoësäure

(10,2 mMol) in Dimethylformamid (100 ml). Die Lösung wird 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Sodann wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand zweimal mit Diethylether gewaschen. Die Waschflüssigkeiten werden verworfen. Der gewaschene Rückstand wird in Methanol (50 ml) gelöst und durch Umkehrphasenhochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mittels einer Prep LC/System 500 Einheit (Waters Associates, Inc., Milford, Massachusetts) unter Verwendung einer Prep Pak-500/C<sub>18</sub> Säule (Waters Associates, Inc.) als stationäre Phase gereinigt. Die Säule wird isokratisch unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus Wasser, Methanol und Acetonitril (25:65:10, Volumen/Volumen) bei einem Druck von etwa 35 bar eluiert. Die Fraktionen werden dünnschichtchromatographisch unter Verwendung von Silicagelplatten und eines Gemisches aus

Wasser, Methanol und Acetonitril (25:65:10, Volumen/Volumen) als Lösungsmittelsystem analysiert. Die das gewünschte Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert, wodurch man zum N-(n-Dodecanoyl)-p-aminobenzoylderivat des A-30912D Kerns gelangt.

Bezugsbeispiel 10

Acylierung von A-30912H Kern

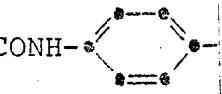
Man löst A-30912H Kern (10,2 mMol) und den 2,4,5-Trichlorphenoxyester von N-(n-Dodecanoyl)-p-aminobenzoësäure

(10,2 mMol) in Dimethylformamid (100 ml). Die Lösung wird 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Sodann wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand zweimal mit Diethylether gewaschen. Die Waschflüssigkeiten werden verworfen. Der gewaschene Rückstand wird in Methanol (50 ml) gelöst und durch Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mittels einer Prep LC/System 500 Einheit (Waters Associates, Inc., Milford, Massachusetts) unter Verwendung einer Prep Pak-500/C18 Säule (Waters Associates, Inc.) als stationäre Phase gereinigt. Die Säule wird isokratisch unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus Wasser, Methanol und Acetonitril (25:65:10), Volumen/Volumen) bei einem Druck von etwa 35 bar eluiert. Die Fraktionen werden dünnenschichtchromatographisch unter Verwendung von Silicagelplatten und eines Gemisches aus Wasser, Methanol und Acetonitril (25:65:10), Volumen/Volumen) als Lösungsmittelsystem analysiert. Die das gewünschte Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert, wodurch man zum N-(n-Dodecanoyl)-p-aminobenzoylderivat des A-30912H Kerns gelangt..

Bezugsbeispiel 11

Zur Herstellung der Verbindung der Formel III, worin R<sup>3</sup>

Isobutoxy bedeutet und R<sup>5</sup> für CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CONH-



steht, geht man wie im Bezugsbeispiel 9 beschrieben vor, wobei man als Ausgangsmaterial jedoch die Verbindung der Formel I verwendet, worin R<sup>3</sup> Isobutoxy bedeutet (hergestellt nach dem Verfahren von Beispiel 13).

Bezugsbeispiel 12

Acylierung von S 31794/F-1 Kern

Man löst den S31794/F-1 Kern (10,2 mMol) und den 2,4,5-Trichlorphenylester von N-(n-Dodecanoyl)-p-aminobenzoesäure

(10,2 mMol) in

Dimethylformamid (100 ml). Die Lösung wird 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der durch Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum erhaltene Rückstand wird zweimal mit Diethylether gewaschen. Die Waschflüssigkeiten werden verworfen. Der gewaschene Rückstand wird in Methanol (50 ml) gelöst und durch Umkehrphasenhochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mittels einer Prep LC/System 500 Einheit (Waters Associates, Inc., Milford, Massachusetts) unter Verwendung einer Prep Pak-500/C18 Säule (Waters Associates, Inc.) als stationäre Phase gereinigt. Die Säule wird isokratisch mit einem Gemisch aus Wasser, Methanol und Acetonitril (25:65:10, Volumen/Volumen) bei einem Druck von etwa 35 bar eluiert. Die Fraktionen werden dünn-schichtchromatographisch unter Verwendung von Silicagelplatten und einem Gemisch aus Wasser, Methanol und Acetonitril (25:65:10, Volumen/Volumen) als Lösungsmittelsystem analysiert. Die das gewünschte Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert, wodurch man zum N-(n-Dodecanoyl)-p-amino-benzoylderivat des S31794/F-1 Kerns gelangt.

Herstellung von Debono-Derivaten der Gruppe II

Im folgenden wird die Herstellung von Verbindungen der For-

mel III, worin R<sup>5</sup> für CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>O- steht, be-

schrieben, nämlich von Debono-Verbindungen II der Formel III.

Bezugsherstellungsbeispiel 4

Herstellung von p-(n-Octyloxy)benzoësäure

Eine Lösung von p-Hydroxybenzoësäure (19,2 g, 150 mMol) in 10 %-igem wäßrigem Natriumhydroxid (120 ml) wird zu vorher auf 80°C erwärmt Dimethylsulfoxid (DMSO) (480 ml) gegeben. Sodann wird die Lösung tropfenweise mit n-Octylbromid (28,95 g, 150 mMol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, worauf man es in Eiswasser (1200 ml) gießt. Sodann gibt man konzentrierte Chlorwasserstoffsäure (30 ml) zu und läßt das Reaktionsgemisch bis zur beendigten Ausfällung stehen. Der Niederschlag wird abfiltriert, getrocknet und aus einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser umkristallisiert. F = 97 bis 99°C.

Analyse für C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>:

Berechnet: C 71,97 H 8,86

Gefunden: C 71,72 H 9,10

Bezugsherstellungsbeispiel 5

Herstellung des 2,4,5-Trichlorphenylesters von p-(n-Octyloxy)benzoësäure

Man löst p-(n-Octyloxy)benzoësäure (6,18 g, 24,7 mMol), 2,4,5-Trichlorphenol (5,39 g, 27,2 mMol) und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (4,94 g, 24,7 mMol) in Methylenchlorid (200 ml). Das Reaktionsgemisch wird 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann filtriert. Das Filtrat wird zu einem Öl eingeengt, durch dessen Umkristallisation aus einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser man den 2,4,5-Trichlorphenylester von p-(n-Octyloxy)benzoësäure erhält.

NMR-Analyse:  $\delta = 4,02$  (2H, t,  $J = 3\text{Hz}$ ),  $\delta = 7,0$  (1H, d,  $J = 4\text{Hz}$ ), (s, 1H), 7,3 (s, 1H), 8,08 (d, 1H,  $J = 4\text{Hz}$ ).

### Bezugsbeispiel 13

#### Acylierung von A-30912A Kern

Man löst A-30912A Kern (14,2 g, 17,8 mMol) und den 2,4,5-Trichlorphenylester von p-(n-Octyloxy)benzoësäure (15,32 g, 35,7 mMol) in Dimethylformamid (150 ml). Die Lösung wird 16 bis 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal mit Diethylether und zweimal mit Methylenchlorid gewaschen. Die Waschflüssigkeiten werden verworfen. Der gewaschene Rückstand wird in einem Gemisch aus Ethylacetat und Methanol (1:3, 80 ml) gelöst und die Lösung durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie unter Verwendung einer Prep LC/System 500-Einheit mittels Silicalgel als stationäre Phase gereinigt. Die Säule wird stufenweise mit einem Gemisch aus Methanol und Ethylacetat (1:4 bis 2:3) als Lösungsmittelsystem eluiert. Die anfallenden Fraktionen werden dünnenschichtchromatographisch unter Verwendung von Silicagel (Merck) und Einsatz eines Gemisches aus Ethylacetat und Methanol (3:2, Volumen/Volumen) als Lösungsmittelsystem analysiert. Diejenigen Fraktionen, die keinen A-30912A Kern enthalten, werden vereinigt und lyophilisiert, wodurch man zum p-(n-Octyloxy)-benzoylderivat von A-30912A Kern gelangt. Ausbeute: 7,13 g,  $M^+ + 23 = 1052$  (durch FDMS).

Bezugsbeispiel 14

Acylierung von A-30912B Kern

Man löst A-30912B Kern (17,8 mMol) und den 2,4,5-Trichlorphenylester von p-(n-Octyloxy)benzoësäure (35,7 mMol) in Dimethylformamid (150 ml). Die Lösung wird 16 bis 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal mit Diethylether und zweimal mit Methylenchlorid gewaschen. Die Waschflüssigkeiten werden verworfen. Der gewaschene Rückstand wird in einem Gemisch aus Ethylacetat und Methanol (1:3, 80 ml) gelöst und die Lösung durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie unter Verwendung einer Prep LC/System 500-Einheit mittels Silicagel als stationäre Phase gereinigt. Die Säule wird stufenweise mit einem Gemisch aus Methanol und Ethylacetat (1:4 bis 2:3) als Lösungsmittelsystem eluiert. Die anfallenden Fraktionen werden dünnsschichtchromatographisch unter Verwendung von Silicagel (Merck) und Einsatz eines Gemisches aus Ethylacetat und Methanol (3:2, Volumen/Volumen) als Lösungsmittelsystem analysiert. Diejenigen Fraktionen, die keinen A-30912B Kern enthalten, werden vereinigt und lyophilisiert, wodurch man zum p-(n-Octyloxy)benzoylderivat von A-30912B Kern gelangt.

Bezugsbeispiel 15

Acylierung von A-30912D Kern

Man löst A-30912D Kern (17,8 mMol) und den 2,4,5-Trichlorphenylester von p-(n-Octyloxy)benzoësäure (35,7 mMol) in Dimethylformamid (150 ml). Die Lösung wird 16 bis 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal mit Diethylether und zweimal mit Methylenchlorid gewaschen. Die Waschflüs-

sigkeiten werden verworfen. Der gewaschene Rückstand wird in einem Gemisch aus Ethylacetat und Methanol (1:3, 80 ml) gelöst und die Lösung durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie unter Verwendung einer Prep LC/System 500-Einheit mittels Silicagel als stationäre Phase gereinigt. Die Säule wird stufenweise mit einem Gemisch aus Methanol und Ethylacetat (1:4 bis 2:3) als Lösungsmittelsystem eluiert. Die anfallenden Fraktionen werden dünnenschichtchromatographisch unter Verwendung von Silicagel (Merck) und Einsatz eines Gemisches aus Ethylacetat und Methanol (3:2, Volumen/Volumen) als Lösungsmittelsystem analysiert. Diejenigen Fraktionen, die keinen A-30912D Kern enthalten, werden vereinigt und lyophilisiert, wodurch man zum p-(n-Octyloxy)benzoylderivat von A-30912D Kern gelangt.

#### Bezugsbeispiel 16

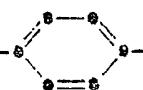
##### Acylierung von A-30912H Kern

Man löst A-30912H Kern (17,8 mMol) und den 2,4,5-Trichlorphenylester von p-(n-Octyloxy)benzoësäure (35,7 mMol) in Dimethylformamid (150 ml). Die Lösung wird 16 bis 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal mit Diethylether und zweimal mit Methylenechlorid gewaschen. Die Waschflüssigkeiten werden verworfen. Der gewaschene Rückstand wird in einem Gemisch aus Ethylacetat und Methanol (1:3, 80 ml) gelöst und die Lösung durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie unter Verwendung einer Prep LC/System 500-Einheit mittels Silicagel als stationäre Phase gereinigt. Die Säule wird stufenweise mit einem Gemisch aus Methanol und Ethylacetat (1:4 bis 2:3) als Lösungsmittelsystem eluiert. Die anfallenden Fraktionen werden dünnenschichtchromatographisch unter Verwendung von Silicagel (Merck) und Einsatz eines Gemisches aus Ethylacetat und Methanol (3:2, Volumen/Volumen)

als Lösungsmittelsystem analysiert. Diejenigen Fraktionen, die keinen A-30912H Kern enthalten, werden vereinigt und lyophilisiert, wodurch man zum p-(n-Octyloxy)benzoylderivat von A-30912H Kern gelangt.

#### Bezugsbeispiel 17

Zur Herstellung der Verbindung der Formel III, worin R<sup>3</sup>

n-Hexyloxy ist und R<sup>5</sup> für CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>O- steht,

geht man wie im Bezugsbeispiel 16 beschrieben vor, wobei man als Ausgangsmaterial jedoch die Verbindung der Formel I verwendet, worin R<sup>3</sup> n-Hexyloxy bedeutet (hergestellt nach dem Verfahren von Beispiel 15).

#### Bezugsbeispiel 18

##### Acylierung von S 31794/F-1 Kern

Man löst S 31794/F-1 Kern (17,8 mMol) und den 2,4,5-Trichlorphenylester von p-(n-Octyloxy)benzoësäure (35,7 mMol) in Dimethylformamid (150 ml). Die Lösung wird 16 bis 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal mit Diethylether und zweimal mit Methylenechlorid gewaschen. Die Waschflüssigkeiten werden verworfen. Der gewaschene Rückstand wird in einem Gemisch aus Ethylacetat und Methanol (1:3, 80 ml) gelöst und die Lösung durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie unter Verwendung einer Prep LC/System 500-Einheit mittels Silicagel als stationäre Phase gereinigt. Die Säule wird stufenweise mit einem Gemisch aus Methanol und Ethylacetat (1:4 bis 2:3) als Lösungsmittelsystem eluiert. Die anfallenden Fraktionen werden dünnenschichtchromatographisch unter Verwendung von Silicagel (Merck) und Einsatz eines Ge-

misches aus Ethylacetat und Methanol (3:2, Volumen/Volumen) als Lösungsmittelsystem analysiert. Diejenigen Fraktionen, die keinen S 31794/F-1 Kern enthalten, werden vereinigt und lyophilisiert, wodurch man zum p-(n-Octyloxy)benzoylderivat von S 31794/F-1 Kern gelangt.

#### Bezugsbeispiel 19

Die antifungale Wirksamkeit der Verbindungen der allgemeinen Formel III lässt sich durch übliche Scheibendiffusionstests und Agar-Verdünnungstests *in vitro* und durch übliche Untersuchungen an Mäusen *in vivo* ermitteln, die gegenüber einer systemischen Pilzinfektion wirksam sind. Die bei dieser Ermittlung der antifungalen Wirksamkeit für typische Verbindungen aus der allgemeinen Formel III erhaltenen Ergebnisse gehen aus den später folgenden Tabellen IV bis VIII hervor.

Die Tabellen IV und V zeigen die Ergebnisse einer Untersuchung der Verbindungen der Beispiele 1, 7 und 13 durch die sogenannte Agar-Scheibendiffusionsmethode *in vitro*. In der Tabelle IV ist die ermittelte Wirksamkeit durch die Größe (Durchmesser in mm) der beobachteten Hemmzone des Mikroorganismus angegeben, die von der jeweils untersuchten Verbindung gebildet wird. In Tabelle V ist die Wirksamkeit durch die minimale Hemmkonzentration (MIC) der Substanz (mg/Scheibe) angegeben, die zur Hemmung des Wachstums des jeweiligen Testorganismus erforderlich ist. Aus der Tabelle VI gehen die Ergebnisse der Untersuchung des p-(n-Octyloxy)benzoylderivats von A-30912A Kern *in vitro* gegenüber fünf Stämmen von *Candida albicans* durch die Agar-Verdünnungsmethode hervor. In dieser Tabelle VI ist die Wirksamkeit durch die minimale Hemmkonzentration (MIC) der Substanz ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) angegeben, die für eine Hemmung des jeweiligen Testorganismus erforderlich ist.

Aus Tabelle VII gehen die Ergebnisse entsprechender in-vivo-Untersuchungen zur Ermittlung der Wirksamkeit der angegebenen Derivate gegenüber einer durch Candida albicans A-26 an Mäusen verursachten Infektion hervor, wobei die Wirksamkeit in Form der  $ED_{50}$ -Werte angegeben ist, worunter die Dosis in mg/kg verstanden wird, die zur Heilung von 50 % der Versuchstiere benötigt wird. Wurden keine  $ED_{50}$ -Werte ermittelt, dann ist als Wirksamkeit jeweils die niedrigste Dosis angeführt, bei der sich eine beachtliche antifungale Wirkung feststellen lässt. Für die entsprechenden Untersuchungen werden Gruppen aus männlichen weißen Mäusen (die pathogen frei sind) mit einem Gewicht von 18 bis 20 g verwendet, welche man intravenös mit Candida albicans A-26 infiziert. Die Tiere werden 24 Stunden vor der Infizierung über eine Zeitdauer von 8 Minuten mit Röntgenstrahlen in einer Dosis von etwa 50 Röntgen pro Minute (Gesamtdosis 400 Röntgen) behandelt, um auf diese Weise eine Immunreaktion gegenüber dem infizierenden Mikroorganismus herabzusetzen. Jeweils 0, 4 und 24 Stunden nach erfolgter Infektion gibt man jeder Gruppe an Mäusen subcutan abgestufte Dosen der jeweils zu untersuchenden Verbindung in Form einer Suspension in 33 % Polyethylenglykol-Wasser. Man ermittelt den Tag, an dem die jeweiligen Tiere verendet sind. Nach dem sogenannten Student-T-Test bestimmt man durch Vergleich des jeweiligen mittleren Todestages zwischen jeder Gruppe an infizierten behandelten Mäusen bei der jeweiligen Dosierungshöhe und an 10 infizierten unbehandelten Tieren, ob es durch die jeweilige Behandlung zu einer wesentlichen Verlängerung der Überlebenszeit gekommen ist.

Aus der später folgenden Tabelle VIII gehen die Ergebnisse der Bestimmung der Absorption von Verbindungen aus den Bezugsbeispielen 1, 7 und 13 nach oraler Verabreichung hervor. Hierzu gibt man Mäusen über eine Magensonde eine Dosis von 416 mg/kg des jeweiligen Wirkstoffes in Form einer Suspension in 33% Polyethylenglykol 400-Wasser. In bestimmten Zeitabständen werden vom Orbitalsinus Blutproben entnommen und in folgender Weise

- 93 - 226034

bezüglich einer antibiotischen Wirksamkeit ausgewertet:

Eine 7 mm große Scheibe, die 20 µl Gesamtblut enthält, wird auf Agar gelegt, der mit Aspergillus montevidensis A35137 angeimpft ist. Nach 40-stündiger Inkubation bei 30°C vergleicht man die Hemmzonen der Blutproben mit einem aus dem jeweiligen Wirkstoff erhaltenen Standard und ermittelt die in den Blutproben enthaltenden Wirkstoffmengen.

**Tabelle IV**  
**Derivate von A-30912A Kern**  
**Antifungale Wirksamkeit im Agar-Scheibendiffusionstest**

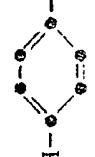
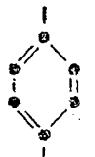
Bezugsbeispiel Nr.	R <sup>5</sup> =	Verbindungen der Formel III	Größe der Hemmzone (mm) <sup>a</sup>			
			Saccharomyces		Trichophyton mentagrophytes	Candida albicans
			Pastorianus	X-52	A-23	A-26
1		CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> -	21	32	60*	30
7		CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> CONH-C(=O)-	21 17	33* 35*	55* 56*	23 19
13		CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> O-C(=O)-	18	23*	--	28

\* Ausgeprägte messbare Hemmzone, bei der der Organismus um die Scheibe herum gewachsen ist.

a Die zu untersuchenden Verbindungen sind in einer Wirkstoffkonzentration von 1 mg/ml in Methanol suspendiert, wobei man zur Untersuchung dieser Verbindungen in die jeweilige Suspension dann eine 7 mm große Scheibe eintaucht und diese dann auf die Agar-Oberfläche gibt. Inkubation: 24 bis 48 Stunden bei 25 bis 37°C.

Tabelle V

Derivate von A-30912A Kern  
Antifungale Wirksamkeit im Agar-Scheibendiffusionstest

Bezugsbeispiel Nr.	Verbindungen der Formel III $R^5 =$	Minimale Hemmkonzentration (mg/Scheibe)*		
		Candida albicans A-26	Trichophyton mentagrophytes Nr. 6	
1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}^-$	0.625	0.039	
7	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CONH}-\text{O}-$ 	0.625 1.25	>0.039 0.678	
13	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{O}-$ 	0.156 >0.302 (0.312) **		

\* Die Verbindungen sind in 0,01-molarer Natriumboratlösung suspendiert, die einen pH-Wert von 7,5 hat.  
Die Verbindungen werden in einer Menge von 20 mg/Scheibe als höchster Konzentration und unter Zweifachverdünnungen bis zum Erreichen der jeweiligen Endpunkte untersucht. Inkubation: 24 Stunden bei 30°C.

\*\* Gegenüber 5 Isolaten.

Tabelle VI

In-vitro-Wirksamkeit von Derivaten von A-30912A Kern,

worin R<sup>5</sup> für CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>O- steht, gegenüber Stämmen

von Candida albicans

Minimale Hemmkonzentration (µg/ml)

A26

SBH 16

SBH 31

SBH 28

SBH 29

0,312

0,312

0,312

0,312

0,312

Tabelle VII  
Derivate von A-30912A Kern  
Therapeutische Wirksamkeit gegenüber Candida albicans bei Mäusen

Bezugsbeispiel Nr.	Verbindungen der Formel III $\text{R}^5 =$	Dosisierungsschema*	ED <sub>50</sub> (mg/kg)		Niedrigste wirksame Dosis (mg/kg)
			B	A	
1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}-$		34	20	
7	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CONH}-$ 		15 15	10 ≥ 5	
13	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{O}-$ 		13 22.2	10 ≥ 12.5	

\*Dosisierungsschema:

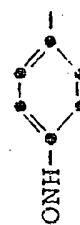
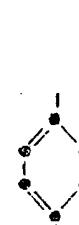
A = 40, 20, 15 und 10 mg/kg.

B = 80, 40, 20 und 10 mg/kg.

Die entsprechenden Dosen werden 0,4 und 24 Stunden nach erfolgter Injektion in Form einer Suspension des jeweiligen Wirkstoffes in 30 % PEG-H<sub>2</sub>O verabreicht. Jede Wirkstoffdosis wird jeweils einer Gruppe aus 6 Mäusen gegeben. Die Kontrollgruppe (unbehandelte Tiere) besteht jeweils aus 10 Mäusen.

\*\* Gemessen anhand der Zunahme der Überlebenszeit der behandelten Tiere gegenüber den Kontrollen und berechnet nach der Methode von Reed V. Muench, American, J. Hygiene 27, 493 bis 497 (1938).

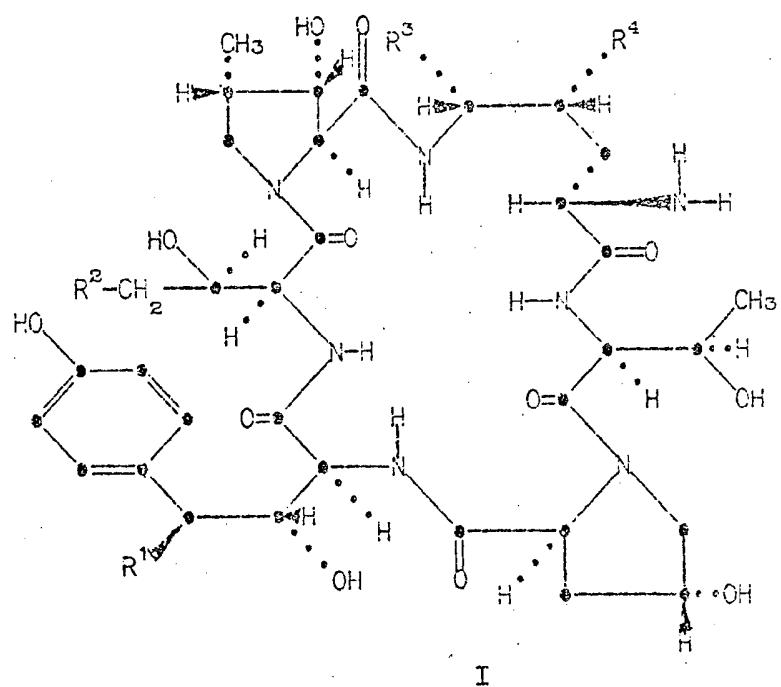
Tabelle VIII  
 Derivate von A-30912A Kera  
 Blutspiegel nach oraler Verabreichung an Mäuse

<u>Bezugsbeispiel Nr.</u>	<u>Verbindungen der Formel III R<sub>5</sub> =</u>	<u>Blutspiegel* (µg/ml)</u>
1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}-$	0.10
7	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CONH}-$ 	0.83
13	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{O}-$ 	23.

\* 4 Stunden nach Verabreichung des Wirkstoffes in einer Dosis von 416 mg/kg mittels einer Magensonde in Form einer Suspension des jeweiligen Wirkstoffes in 33 % PEG 400-H<sub>2</sub>O. Zur Bestimmung wird Aspergillus montevidensis A-35137 verwendet.

Erfindungsansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines cyclischen Peptidkerns der allgemeinen Formel I



worin  $R^1$  für H oder OH steht,

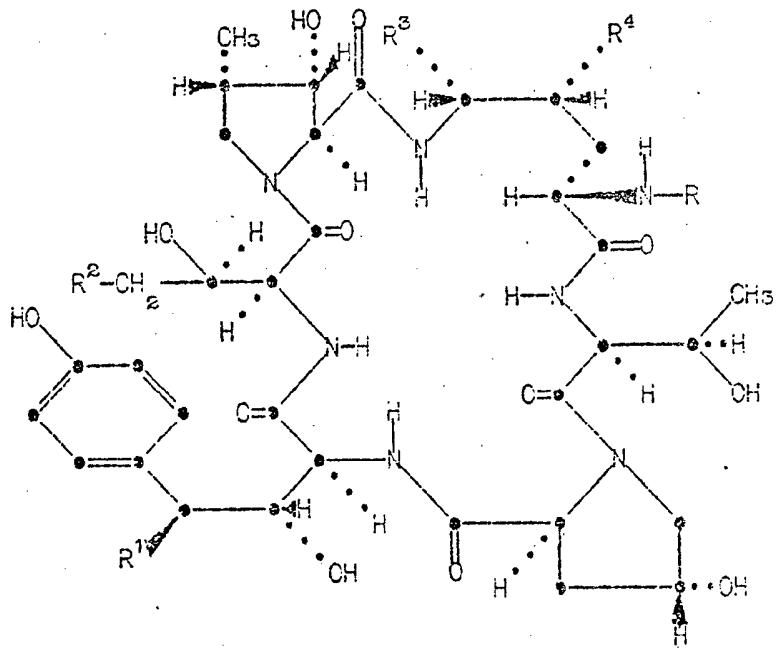
wobei  $R^2$  für H steht und  $R^3$  sowie  $R^4$  jeweils H oder jeweils OH sind, falls  $R^1$  für H steht,

oder wobei  $R^2$  für H steht,  $R^3$  für OH oder  $C_1-C_6$  Alkyl-oxy steht und  $R^4$  für OH steht, oder  $R^2$  für

$\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}} \text{-NH}_2$  steht und  $R^3$  sowie  $R^4$  jeweils für OH stehen, falls  $R^1$  für OH steht,

und den Säureadditionssalzen hiervon,

dadurch gekennzeichnet, daß man in einem wäßrigen Medium ein cyclisches Peptidantibiotikum der allgemeinen Formel II



II

worin R<sup>1</sup> für H oder OH steht,

wobei R<sup>2</sup> für H steht und R<sup>3</sup> sowie R<sup>4</sup> jeweils für H oder jeweils für OH stehen und R Stearoyl oder Linoleyl bedeutet, falls R<sup>1</sup> für H steht,

oder wobei R<sup>2</sup> für H steht, R<sup>4</sup> für OH steht, R<sup>3</sup> für OH steht und R Stearoyl, Linoleyl oder Palmitoyl bedeutet oder R<sup>3</sup> für C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> Alkyloxy steht und R Stearoyl oder Linoleyl ist, falls R<sup>1</sup> für OH steht,

oder wobei R Myristoyl bedeutet, falls R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> jeweils OH bedeuten und R<sup>2</sup> für  $\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}} \text{-NH}_2$  steht,

mit einem durch einen Mikroorganismus aus der Familie Actinoplanaceae gebildeten deacylierenden Enzym umsetzt.

2. Verfahren nach Punkt 1 zur Herstellung von A-30912A Kern, dadurch gekennzeichnet, daß man die Antibiotika der Formel II, worin R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> für OH stehen, R<sup>2</sup> für H steht und R Linoleyl, Stearoyl oder Palmitoyl ist, mit einem von einem Mikroorganismus aus der Familie Actinoplanaceae gebildeten deacylierenden Enzym umsetzt.

3. Verfahren nach Punkt 1 zur Herstellung von A-30912B Kern, dadurch gekennzeichnet, daß man das Antibiotikum der Formel II, worin R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> jeweils H sind, R<sup>3</sup> sowie R<sup>4</sup> jeweils OH bedeuten und R für Stearoyl oder Linoleyl steht, mit einem von einem Mikroorganismus aus der Familie Actinoplanaceae gebildeten deacylierenden Enzym umsetzt.

4. Verfahren nach Punkt 1 zur Herstellung von A-30912D Kern, dadurch gekennzeichnet, daß man das Antibiotikum der Formel II, worin R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> H sind und R für Stearoyl oder Linoleyl steht, mit einem von einem Mikroorganismus aus der Familie Actinoplanaceae gebildeten deacylierenden Enzym umsetzt.

5. Verfahren nach Punkt 1 zur Herstellung von A-30912H Kern, dadurch gekennzeichnet, daß man das Antibiotikum der Formel II, worin R<sup>1</sup> und R<sup>4</sup> für OH stehen, R<sup>2</sup> für H steht, R<sup>3</sup> für CH<sub>3</sub>O steht und R Stearoyl oder Linoleyl ist, mit einem von einem Mikroorganismus aus der Familie Actinoplanaceae gebildeten deacylierenden Enzym umsetzt.

6. Verfahren nach Punkt 1 zur Herstellung von A-30912H Kernen, dadurch gekennzeichnet, daß man das Antibiotikum der Formel II, worin R<sup>1</sup> und R<sup>4</sup> für OH stehen, R<sup>2</sup> für H steht, R<sup>3</sup> für C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> Alkyloxy steht und R Stearoyl oder Linoleyl bedeutet.

tet, mit einem von einem Mikroorganismus aus der Familie Actinoplanaceae gebildeten deacylierenden Enzym umsetzt.

7. Verfahren nach Punkt 1 zur Herstellung von S 31794/-F-1 Kern, dadurch gekennzeichnet, daß man das Antibiotikum der Formel II, worin R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> für OH stehen, R<sup>2</sup> für

O  
" -C-NH<sub>2</sub> steht und R Myristoyl ist, mit einem von einem Mikroorganismus aus der Familie Actinoplanaceae gebildeten deacylierenden Enzym umsetzt.

8. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man als Mikroorganismus aus der Familie Actinoplanaceae einen Vertreter des Genus Actinoplanes verwendet.

9. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als Mikroorganismus Actinoplanes utahensis verwendet.

10. Verfahren nach Punkt 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als Mikroorganismus Actinoplanes utahensis NRRL 12052 oder eine Mutante hiervon, die das Enzym bildet, verwendet.

11. Verfahren nach Punkt 10, dadurch gekennzeichnet, daß man als Mikroorganismus Actinoplanes utahensis NRRL 12052 verwendet.

12. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als Mikroorganismus Streptosporangium roseum var. hollandensis NRRL 12064 oder eine Mutante hiervon, die das Enzym bildet, verwendet.

13. Verfahren nach Punkt 12, dadurch gekennzeichnet, daß man als Mikroorganismus Streptosporangium roseum var. hollandensis NRRL 12064 verwendet.

14. Verfahren nach Punkt 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als Mikroorganismus *Actinoplanes missouriensis* NRRL 12053 oder eine Mutante hiervon, die das Enzym bildet, verwendet.
15. Verfahren nach Punkt 14, dadurch gekennzeichnet, daß man als Mikroorganismus *Actinoplanes missouriensis* NRRL 12053 verwendet.
16. Verfahren nach Punkt 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als Mikroorganismus *Actinoplanes* sp. NRRL 12065 oder eine Mutante hiervon, die das Enzym bildet, verwendet.
17. Verfahren nach Punkt 16, dadurch gekennzeichnet, daß man als Mikroorganismus *Actinoplanes* sp. NRRL 12065 verwendet.
18. Verfahren nach Punkt 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als Mikroorganismus *Actinoplanes* sp. NRRL 8122 oder eine Mutante hiervon, die das Enzym bildet, verwendet.
19. Verfahren nach Punkt 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als Mikroorganismus *Actinoplanes* sp. NRRL 8122 verwendet.
20. Verfahren nach einem der Punkte 1 oder 8 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym in einer Kultur des produzierenden Mikroorganismus *Actinoplanaceae* enthalten ist.
21. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß man den jeweils gewünschten cyclischen Peptidkern oder das Salz hiervon aus dem Fermentationsgemisch isoliert.
22. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß man den jeweils gewünschten cyclischen Peptidkern oder ein Salz hiervon einer Reinigung unterzieht.

226034 - 104 -

