



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 3487/84

(22) Indleveringsdag: 16 jul 1984

(41) Alm. tilgængelig: 22 jan 1985

(44) Fremlagt: 25 nov 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 21 jul 1983 JP 133506/83 02 mar 1984 JP 40748/84

(71) Ansøger: *FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.; 3, Doshomachi 4-chome, Higashi-ku; Osaka-shi, Osaka, JP

(72) Opfinder: Sumio *Kiyoto; JP, Masakuni *Okuhara; JP, Eiko *Kino; JP, Hirokazu *Tanaka; JP, Hatsuo *Aoki; JP, Masanobu

*Kohsaka; JP, Hiroshi *Imanaka; JP

(51) Int.Cl.⁵

A 61 K 35/72

A 61 K 31/42

//C 07 G 11/00

C 07 D 493/22

C 12 P 1/02

C 12 N 1/14

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau A/S

(54) Forbindelse, betegnet FR-900216, til anvendelse som terapeutisk aktivt stof, farmaceutisk præparat indeholdende forbindelsen samt anvendelse af forbindelsen

(56) Fremdragne publikationer

5) ultraviolet absorptionspektrum:

$\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ = 232 nm ($\epsilon = 11.300$)
 = 238 nm (skulder)
 = 285 nm (skulder)
 = 296 nm ($\epsilon = 55500$)
 = 308 nm ($\epsilon = 70300$)
 = 324 nm ($\epsilon = 51900$).

(57) Sammenlægning:

6) Infrarødt absorptionspektrum:

$\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$: 3450, 3140, 2960, 2920, 2860, 1730, 1715 (skulder), 1607, 1575, 1455, 1445, 1435, 1377, 1360, 1343, 1305, 1280, 1260, 1225, 1190, 1170, 1140, 1107, 1077, 1045, 1030 (skulder), 980, 970, 950, 930, 915, 905, 895, 875, 860, 850, 835, 825, 790, 780, 755, 705, 670 og 635 cm^{-1} .

7) ^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 , intern standard: tetramethylsilan):
 Spektret er vist på tegningen.

8) ^{13}C -NMR-Spektrum (CDCl_3 , intern standard: tetramethylsilan):

δ (ppm): 9,65, 11,41, 11,71, 13,77, 14,32, 16,93, 22,57, 29,24, 31,49, 31,85, 34,16, 35,86, 36,40, 37,98, 45,32, 54,18, 56,12, 63,77, 65,10, 76,81, 82,33, 89,25, 120,80, 123,77, 126,44, 129,29, 135,97, 136,21, 136,57, 137,67, 138,51, 139,54, 160,84, 168,01, 169,34.

9) Oploselighed:

Fuldt oploselig: methanol, ethanol, acetone, ethylacetat
 Oploselig: chloroform, benzen
 Svagt oploselig: hexan, diethylether
 Uoploselig: vand.

10) Farvereaktion:

3487-84

Antitumormiddel, der som aktiv bestanddel indeholder forbindelsen med betegnelsen FR-900216 eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

Forbindelsen med betegnelsen FR-900216 har følgende fysiske og kemiske egenskaber:

- 1) molekylvægt:
625 (massespektrum)
- 2) molekylformel:
 $\text{C}_{35}\text{H}_{47}\text{NO}_9$
- 3) smeltepunkt:
130-135°C (sønderdeling)
- 4) specifik drejning:
 $[\alpha]_D^{20} = -140^\circ\text{C}$ ($c = 1$, CHCl_3)

fortsættes

3487-84

Positiv: Dragendorff-reaktion, iodreaktion

Negativ: Ferrichloridreaktion, Molisch-reaktion, ninhydrin-reaktion, Ehrlich-reaktion.

11) Natur:

Svagt basisk forbindelse.

Den foreliggende opfindelse angår forbindelsen med betegnelsen F-R900216 eller et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt deraf til anvendelse som terapeutisk aktivt stof, fortrinsvis til anvendelse ved behandling af tumorer; et farmaceutisk præparat som er ejendommeligt ved det i krav 2's kendetegnende del angivne; samt anvendelse af forbindelsen eller et syreadditionssalt til fremstilling af et farmaceutisk præparat til behandling af tumorer.

Forbindelsen FR-900216 ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at den har følgende fysiske og kemiske egenskaber:

10 1) Molekylvægt:

625 (massespektrum)

2) Molekylformel:

$C_{35}H_{47}NO_9$

3) Smeltepunkt:

15 130-135°C (sønderdeling)

4) Specifik drejning:

$[\alpha]_D^{20} = +140^\circ$ (c = 1, $CHCl_3$)

5) Ultraviolet absorptionsspektrum:

20 $\lambda_{max}(CH_3OH)$ = 232 nm ($\epsilon = 11.300$)
= 238 nm (skulder)
= 285 nm (skulder)
= 296 nm ($\epsilon = 55500$)
= 308 nm ($\epsilon = 70300$)
= 324 nm ($\epsilon = 51900$).

25 6) Infrarødt absorptionsspektrum:

$\nu_{max}(KBr)$:3450, 3140, 2960, 2920, 2860, 1730, 1715 (skulder), 1607, 1575, 1455, 1445, 1435, 1377, 1360, 1343, 1305, 1280, 1260, 1225, 1190, 1170, 1140, 1107, 1077, 1045, 1030 (skulder), 980, 970, 950, 930, 915, 905, 895, 875, 860, 850, 835, 825, 790, 780, 755, 705, 670
30 og 635 cm^{-1} .

7) 1H -NMR-Spektrum ($CDCl_3$, intern standard: tetramethylsilan), som vist på tegningen.

8) ^{13}C -NMR-Spektrum (CDCl_3 , intern standard: tetramethylsilan):

δ (ppm): 9,65, 11,41, 11,71, 13,77, 14,32, 16,93, 22,57, 29,24,
31,49, 31,85, 34,16, 35,86, 36,40, 37,98, 45,32, 54,18, 56,12, 63,77,
65,10, 76,81, 82,33, 89,25, 120,80, 123,77, 126,44, 129,29, 135,97,
5 136,21, 136,57, 137,67, 138,51, 139,54, 160,84, 168,01, 169,34.

9) Opløselighed:

Fuldt opløselig i methanol, ethanol, acetone og ethylacetat
Opløselig i chloroform og benzen
Svagt opløselig i hexan og diethylether
10 Uopløselig i vand

10) Farverreaktion:

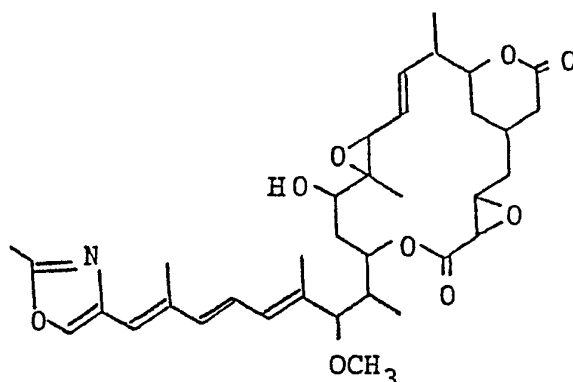
Positiv: Dragendorff-reaktion, iodreaktion
Negativ: Ferrichloridreaktion, Molisch-reaktion,
ninhydrin-reaktion, Ehrlich-reaktion.

15 11) Natur:

Svagt basisk forbindelse.

Forbindelsen med betegnelsen FR-900216 antages at være den samme
forbindelse som "Rhizoxin", som blev offentliggjort i "Symposium
Papers of the 25th Symposium on the Chemistry of Natural Products",
20 afholdt i Tokyo i 1982.

"Rhizoxin" har følgende strukturformel:



Det har nu overraskende vist sig, at forbindelsen FR-900216 og dens farmaceutisk acceptable syreadditionssalte har en bemærkelsesværdig antitumoraktivitet.

Forbindelsen med betegnelsen FR-900216 kan fremstilles ved fermentering af en stamme, som danner forbindelsen med betegnelsen FR-900216, og som hører til slægten *Rhizopus* såsom *Rhizopus* sp. nr. F-1360 eller lignende i et næringsmedium.

- 10 Nærmere oplysninger om den mikroorganisme, der anvendes til at fremstille forbindelsen med betegnelsen FR-900216, og fremstillingen deraf gives nedenfor.

Den mikroorganisme, som kan anvendes til fremstillingen af forbindelsen med betegnelsen FR-900216, er en stamme, som hører til slægten *Rhizopus*, blandt hvilken en stamme af *Rhizopus* sp. nr. F-1360 for nyligt er blevet isoleret fra en jordprøve, der blev indsamlet ved Uji-shi, Kyoto-fu, i Japan.

Taxonomiske karakteristika for *Rhizopus* sp. nr. F-1360:

1) Morfologiske karakteristika

- 20 a) Makroskopisk iagttagelse

i) Kulturer på maltekstraktagar

Kolonierne spredtes bredt ud og når op på over 8,0 cm i diameter efter 3-5 dage ved 30°C, og til sidst dækkes Petri-skålen med myceliet. Overfladen af kolonien er plan og tyk. Medens unge kulturer er hvide, bliver de, under dannelse og modning af sporehuse og sporer, grå eller sorte. Sporehusene og sporerne dannes i rigelig mængde. Kanten af kolonien er spindelvævslignende, og der opstår luftmycelium på væggene af Petri-skålene eller skråsubstratglassene. Bagsiden er glasklar eller bleggul. Der dannes hverken opløselige pigmenter eller udsondringer. Lugten er sødlig. Kolonien vokser hurtigt ved 25°C.

ii) Kulturer på YpSs-agar:

Kolonierne er de samme som på maltekstraktagar

iii) Kulturer på kartoffeldextroseagar:

Kolonierne er de samme som på maltekstraktagar.

15 iv) Kulturer på Czapek's opløsningsagar:

Kolonierne vokser meget begrænset.

b) Mikroskopisk iagttagelse

Sporehusene er dækket med en tyndvægget membran. Når de modner, sprænges de og frigør et antal enterogene sporer. De er kugleformede og 30-200 μm i diameter. Sporerne fra sporehusene er ellipseformede med en størrelse på 7,5 x 15 μm , glatte til rynkede. Substratmyceliet har ikke skillevægge, og det danner rhizoiderne. Hver af sporerne fra sporehusene er forbundet via udløbere, og columella dannes ved toppen af disse.

25 2) Fysiologiske karakteristika:

a) Temperaturområde for vækst:

Denne stamme kan vokse ved en temperatur i området 10-48°C med en optimal vækst ved 33°C. Den kan danne sporehuse ved 14-39°C. Disse data blev bestemt på kartoffeldextroseagar.

b) Vækst i Pfeffer-opløsning:

- 5 Denne stamme kan vokse i et temperaturområde på 25-42°C; ingen vækst ved 10°C.

c) pH-område for vækst:

Denne stamme kan vokse ved en pH-værdi på 2,5-12,0 på maltekstraktagar og YpSs-agar.

- 10 d) Dannelse af organiske syrer:

Denne stamme danner organiske syrer.

Ud fra ovennævnte karakteristika blev stammen antaget at være en stamme af zygomycet-slægten *Rhizopus* Ehrenb. Følgelig blev stammen betegnet *Rhizopus* sp. nr. F-1360.

- 15 En kultur af *Rhizopus* sp. nr. F-1360 er blevet deponeret hos ATCC (American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive Rockville, MD 20852, USA) den 21. november 1979 under deponeringsnummer ATCC 20577, og der er nu blevet ansøgt om, at deponeringen konverteres til Budapest-traktat-formål.

- 20 Man kan også anvende eventuelle mutanter, som er i stand til at danne forbindelsen med betegnelsen FR-900216, herunder naturlige mutanter, som dannes ved naturlig mutation af organismen, samt kunstige mutanter, som kan dannes ud fra den beskrevne organisme ved sædvanlige metoder såsom røntgenstråler, ultraviolet bestråling, behandling med
- 25 et muteringsmiddel såsom nitrogensenepsoiler, azaserin, salpetersyrling, 2-aminopurin, N,N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG) eller lignende, behandling med phag, transformation, transduktion, konjugation og lignende.

Forbindelsen med betegnelsen FR-900216 ifølge opfindelsen dannes, når en stamme, der danner forbindelsen med betegnelsen FR-900216, og som hører til slægten *Rhizopus* (fx *Rhizopus* sp. nr. F-1360 ATCC 20577), dyrkes i et næringsmedium indeholdende kilder af assimilerbart carbon og nitrogen under aerobe betingelser (fx rystekultur, submers kultur, etc.).

Foretrukne carbonkilder i næringsmediet er carbonhydrater såsom glucose, saccharose, maltose, glycerin, stivelse, opløselig stivelse, dextrin og lignende.

10 Foretrukne nitrogenkilder er kødekstrakt, hydrolyseret casein, pepton, glutenmel, majsmel, mel af bomuldsfrø, sojabønne- og majsstøbe- vand, tørret gær, gærekstrakt, urinstof, ammoniumphosphat, etc.

Det er ikke nødvendigt, at carbon- og nitrogenkilderne anvendes i deres rene form, selv om de med fordel anvendes i kombination, da mindre rene materialer, som indeholder spor af vækstfaktorer og betydelige mængder af mineralnæringsstoffer, også er egnede til anvendelse.

Om ønsket kan der til mediet sættes mineralsalte såsom dinatrium- eller dikaliumhydrogenphosphat, magnesiumchlorid, magnesiumsulfat, calciumcarbonat og lignende.

Om nødvendigt, især når kulturmediet skummer meget, kan der tilsættes et antiskummiddel såsom en planteolie (sojabønneolie, linolie, etc.), flydende paraffin, en fedtolie, en højere alkohol (octadecanol, tetradecanol, heptanol, etc.) eller silicone.

25 Til fremstilling af forbindelsen med betegnelsen FR-900216 i store mængder foretrækkes neddyppede aerobe kulturbetingelser. Til fremstilling i små mængder anvendes en ryste- eller overfladekultur i en kolbe eller flaske. Når dyrkningen udføres i store tanke, foretrækkes det endvidere at anvende den vegetative form af organismen til inokulering i produktionstankene for at undgå vækstforsinkelse i produktionsprocessen til dannelse af forbindelsen med betegnelsen FR-900216. Således er det ønskeligt først at fremstille et vegetativt podestof

af organismen ved at inokulere en relativt lille mængde kulturmedium med sporer eller mycelium af organismen og dyrke dette inokulerede medium, og derefter aseptisk overføre det dyrkede vegetative podestof aseptisk til store tanke. Det medium, i hvilket det vegetative po-
5 destof fremstilles, er i det væsentlige det samme som eller forskel-
ligt fra det medium, der anvendes til fremstillingen af forbindelsen med betegnelsen FR-900216.

Omrøring og beluftning af kulturblandingen kan udføres på mange måder. Omrøring kan tilvejebringes af en propel eller lignende meka-
10 nisk omrøringsudstyr, ved at dreje eller ryste fermenteringsbehol-
deren, ved forskelligt pumpeudstyr eller ved at lede steril luft gen-
nem mediet. Beluftning kan foretages ved at lade steril luft passere
gennem fermenteringsblandingen.

Fermenteringen udføres sædvanligvis ved en temperatur på ca. 20-40°C,
15 fortrinsvis 25-35°C i et tidsrum på ca. 50-100 timer.

Den således fremstillede forbindelse med betegnelsen FR-900216 kan
udvindes fra kulturmediet ved sædvanlige metoder, som sædvanligvis
anvendes til udvinding af andre kendte biologisk aktive stoffer.

Forbindelsen med betegnelsen FR-900216 kan inkluderes i både fil-
20 treret kulturvæske og dyrket mycelium, men det meste at forbindelsen
med betegnelsen FR-900216 findes sædvanligvis i det dyrkede myceli-
um. Forbindelsen med betegnelsen FR-900216 kan ekstraheres fra det
dyrkede mycelium med et opløsningsmiddel såsom ethylacetat og lig-
nende. Forbindelsen med betegnelsen FR-900216 kan endvidere isoleres
25 eller renses fra den således vundne ekstrakt eller den filtrerede
kulturvæske ved sædvanlige metoder såsom inddampning under reduceret
tryk, ekstraktion med et opløsningsmiddel, behandling med en harpiks
(fx anion- eller kationbytterharpiks, ikke-ionisk adsorptionshar-
piks), behandling med et sædvanligt adsorberende middel (fx aktivkul,
30 kiselsyre, silicagel, aluminiumcellulose, etc.), krystallisation,
omkrystallisation, søjlechromatografi under anvendelse af silicagel
og lignende, væskesøjlechromatografi under anvendelse af silicagel og
lignende, og lignende.

Den således vundne forbindelse med betegnelsen FR-900216 kan omdannes til det tilsvarende farmaceutisk acceptable syreadditionssalt deraf ved behandling med en syre på sædvanlig måde.

Hensigtsmæssige farmaceutisk acceptable syreadditionssalte af forbindelse med betegnelsen FR-900216 kan omfatte uorganiske eller organiske syreadditionssalte såsom eddikesyresalt, mælkesyresalt, maleinsyresalt, fumarsyresalt, oxalsyresalt, citronsyresalt, methansulfonsyresalt, saltsyresalt, svovlsyresalt, phosphorsyresalt og lignende.

10 Det farmaceutiske præparat ifølge opfindelsen kan anvendes i form af et farmaceutisk præparat, fx i fast, halvfast eller flydende form, hvilket præparat indeholder forbindelsen med betegnelsen FR-900216 eller farmaceutisk acceptable syreadditionssalte deraf som aktiv bestanddel i blanding med en organisk eller uorganisk bærer eller
15 excipiens, som er egnet til ekstern, enteral eller parenteral anvendelse. Den aktive bestanddel kan fx blandes med sædvanlige ikke-toxiske farmaceutisk acceptable bærere for tabletter, pellets, kapsler, suppositorier, opløsninger, emulsioner, suspensioner og en hvilken som helst anden form, der er egnet til anvendelse. Om nødvendigt kan der herudover anvendes hjælpestoffer, stabilisatorer, fortykkelsesmidler, farvestoffer og parfumer. Forbindelsen med betegnelsen FR-900216 inkorporeres i det farmaceutiske præparat i en mængde, som er tilstrækkelig til at fremkalde den ønskede antitumorstyring på sygdomsprocesserne eller -tilstandene.

25 For at anvende dette præparat til mennesker foretrækkes det at anvende det til intravenøs, intramuskulær eller oral administration. Medens doseringen af en terapeutisk virksom mængde af forbindelsen med betegnelsen FR-900216 varierer i henhold til og også afhænger af alderen og tilstanden af hver enkelt patient, som skal behandles, gives der sædvanligvis, til behandling af tumor, ved intravenøs
30 administration en daglig dosis på 0,01-1 mg/kg, fortrinsvis ca. 0,1 mg/kg, ved intramuskulær administration en daglig dosis på 0,1-10 mg/kg, fortrinsvis ca. 1 mg/kg, og ved oral administration en daglig dosis på 0,5-50 mg/kg, fortrinsvis ca. 5 mg/kg af forbindelsen med
35 betegnelsen FR-900216.

Opfindelsen angår også anvendelse af forbindelsen FR-900216 eller et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt deraf til fremstilling af et farmaceutisk præparat til behandling af tumorer.

Antitumorstyrkningen hos forbindelsen med betegnelsen FR-900216 il-
5 lustreres nedenfor.

Test 1

Antitumorstyrkning af forbindelsen med betegnelsen FR-900216 mod lymfocytisk leukæmi L1210 og P388:

1) Intraperitoneal administration:

10 Fremgangsmåde

Celler fra lymfocytisk leukæmi (L1210 eller P388) blev successivt overført til DBA/2-mus. På dag 7 blev ascites opsamlet fra bughulen for at isolere tumorcellerne, ud fra hvilke en suspension af tumorcellerne blev fremstillet. Cellesuspensionen (0,2 ml) indeholdende
15 10^5 celler (L1210) eller 10^6 celler (P388) blev planteret intra-peritonealt i BDF₁-hunmus (7 uger gamle og med en vægt på 17,9-21,7 g for L1210, og 8 uger gamle og med en vægt på 18,4-22,5 g for P388).

Den til forsøget anvendte prøve af forbindelsen med betegnelsen FR-900216 blev solubilisert i methanol, inddampet i vakuum og der-
20 efter suspenderet i steriliseret vand.

24 timer efter planteringen af tumorcellerne til musene blev forbindelsen med betegnelsen FR-900216 administreret intraperitonealt i de respektive graduerede doser til hver behandlingsgruppe (kun vand i kontrolgruppen) én gang daglig i 4 dage.

25 Antitumorstyrkningen af forbindelsen med betegnelsen FR-900216 over for leukæmier blev bedømt ud fra stigningen i levetiden hos den behandlede gruppe i forhold til kontrolgrupperne (T/C x 100), hvor T

betegner den mediane overlevelsestid (MST) for den behandlede gruppe, og C betegner den mediane overlevelsestid for kontrolgruppen.

Resultat

Forsøgsresultatet er angivet i nedenstående tabel I.

5

Tabel I

	Tumor-celler	Doseret/kontrol	Antal mus	Enkelt-dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Toxiske døds-fald	Gennem-snitlig overle-velses-tid (dage)	T/C x 100 (%)	Vægt-ændring (g) dag 0-4
10								
	Lymfocy-tisk	doseret	10	1000	0	13,1	152	-1,8
		med for-	10	500	0	11,3	131	-0,6
15	leukæmi	bindelsen	10	250	0	10,4	121	-0,1
	L1210	FR-900216	10	125	0	9,3	108	+0,2
		Kontrol	20	-	0	8,6	100	+0,6
	Lymfo-cytisk	doseret	10	500	0	14,5	121	-2,7
		med for-	10	250	0	16,0	133	-2,2
20	leukæmi	bindelsen	10	125	0	14,0	117	-1,7
	P388	FR-900216						
		Kontrol	20	-	0	12,0	100	-1,0

2) Oral administration:

25

Fremgangsmåde

Celler fra lymfocytisk leukæmi L1210 blev successivt overført til DBA/2-mus. På dag 7 blev ascites opsamlet fra den intraperitoneale hule for at isolere tumorcellerne, ud fra hvilke en suspension af tumorcellerne blev fremstillet. Cellesuspensionen (0,2 ml) indeholdende

10⁵ celler blev implanteret intraperitonealt til BDF₁-mus, der var 7 uger gamle og vejede 17,9-21,7 g.

Den til forsøget anvendte prøve af forbindelsen med betegnelsen FR-900216 blev solubiliseret i methanol, inddampet i vakuum og derefter suspenderet i steriliseret vand.

24 timer efter implanteringen af tumorcellerne til musene blev forbindelsen med betegnelsen FR-900216 administreret oralt i doser på henholdsvis 10.000 og 30.000 µg/kg til hver behandlet gruppe (kun vand til kontrolgruppen) én gang daglig i 4 dage.

10 Antitumorstyrkningen af forbindelsen med betegnelsen FR-900216 blev bedømt ud fra stigningen i levetid for den behandlede gruppe i forhold til kontrolgruppen (T/C x 100) i leukæmi, hvor T betegner den gennemsnitlige overlevelsestid (MST) for den behandlede gruppe, og C betegner den gennemsnitlige overlevelsestid for kontrolgruppen.

15 Resultat

Forsøgsresultatet er vist i nedenstående tabel II.

Tabel II

Tumorceller	Doseret/kontrol	Antal mus	Enkeltdosis	T/C
			(µg/kg)	x 100 (%)
20 Lymfocytisk leukæmi L1210	doseret med for-			
	bindelsen	5	30000	173
	FR-900216	5	10000	122
25	Kontrol	5	-	100

Test 2

Antitumorstyrkning af forbindelsen med betegnelsen FR-900216 mod melanoma B16:

Fremgangsmåde

- 5 14 dage efter subcutan implantering af melanoma B16-celler til DBA/2-mus blev 1 g af tumoren adskilt aseptisk fra musen og homogeniseret i 10 ml Hank's opløsning. 0,5 ml af homogenatet blev inokuleret i 12 uger gamle BDF₁-mus med en vægt på 19,7-28,4 g. 24 timer efter implanteringen af tumorcellerne blev graduerede doser af forbindelsen
- 10 med betegnelsen FR-900216 administreret intraperitonealt til musene én gang daglig på dag 1, 2, 3 og 4. Forbindelsen med betegnelsen FR-900216 blev først opløst i methanol og inddampet i vakuum ved tilføjelse af vand og forelå til sidst i vandig suspension. Tumoraktiviteten blev bedømt ud fra T/C (%), som beskrevet i test 1.

15 Resultat

Forsøgsresultatet er vist i nedenstående tabel III.

Tabel III

Tumorcel- ler	Doseret/ kontrol	Antal mus	Enkelt- dosis (µg/- kg)	Toxiske døds- fald	Gennem- snitlig overlevel- sestid (dage)	T/C x 100 (%)	Vægt- æn- dring (g) dag 0-4
25 Mus melanoma B16	doseret	10	1000	0	19,0	136	-3,6
	med for-	10	500	0	17,5	125	-0,6
	bindelsen	10	250	0	17,0	121	+0,2
	FR-900216						
	Kontrol	20	-	0	14,0	100	-0,2

Test 3

Antitumorvirkning af forbindelsen med betegnelsen FR-900216 overfor subrenalkapsel-fremmedpodet humant brystcarcinom MX-1:

Fremgangsmåde

- 5 Antitumorvirkningen af forbindelsen med betegnelsen FR-900216 blev bestemt i et eksperimentelt tumorsystem hos Swiss-nu/nu-mus. Swiss-nu/nu-mus blev subcutant implanteret med et 2 x 2 mm fragment af MX-1-celler. Når donorens tumor nåede en vægt på ca. 1 g (30 dage efter implantationen af tumorceller), blev MX-1-celler implanteret med et
- 10 1 x 1 x 1 mm fragment under den subrenale kapsel under anvendelse af en 16 gauge (1,62 mm) trokar efter at have blotlagt nyren med et 7 mm's dorsalt snit i huden. Såret blev lukket med en 9 mm's sårklemme, efter at bughinden var blevet lukket med 1-4 silkesuturer. Én dag efter implantering af tumorcellerne blev graduerede doser af for-
- 15 bindelsen med betegnelsen FR-900216 administreret intraperitonealt til mus. De i forsøget anvendte prøver af forbindelsen med betegnelsen FR-900216 blev solubiliseret i methanol, inddampet i vakuum og derefter suspenderet i steriliseret vand. Behandlingen sker med 4 dages mellemrum på dag 1, 5 og 9. Kontrolmusene modtog intraperitone-
- 20 alt doser af fysiologisk saltopløsning. Injektionsvolumenet var 0,2 ml i alle forsøgene. 6 mus blev anvendt til hver forsøgsgruppe. På dag 1 og 11 blev tumorlængden og tumorbredden målt. Antitumorvirkningen blev beregnet i henhold til protokollerne for selekterede *in vivo*-modeller i NCI, USA.

25 Resultat

Resultatet er vist i tabel IV.

Tabel IV

	Doseret/kontrol	Dosis ($\mu\text{g/kg}$)	T/C x 100
5	Doseret med for-	2000	-26
	bindelsen	1000	3
	FR-900216	500	2
		250	34
	Kontrol	-	100

- 10 Nedenstående fremstillinger tjener til belysning af fremstillingen af forbindelsen med betegnelsen FR-900216.

Fremstilling 1

- 80 ml podningsmedium indeholdende 1% majsstivelse, 0,5% glucose, 1% glutenmel, 1% tørgær og 1% majsstøbevand (justeret til en pH-værdi på 7,0 før sterilisering) blev hældt i hver af 6 Erlenmeyer-kolber på 250 ml og steriliseret ved 120°C i 30 minutter. En smule skråkultur af *Rhizopus* sp. nr. F-1360 ATCC 20577 blev inokuleret til hvert af medierne og dyrket ved 30°C i 48 timer ved 250 omdr./min. under anvendelse af en rotationsryster. Det samlede volumen af således vundet
- 20 podekultur blev inokuleret igen til et podningsmedium (20 liter) indeholdende 2% af en opløselig stivelse, 0,5% glycerin, 0,5% glucose, 1% glutenmel, 1% tørgær, 1% majsstøbevand (justeret til en pH-værdi på 7,0 før sterilisering) i en 30 liters rustfri fermenteringsbeholder, som var blevet steriliseret ved 120°C i 30 minutter, og dyrket ved 30°C i
- 25 24 timer under beluftning med 1 VVM og rystning ved 200 omdr./min. Endvidere blev et samlet volumen af således vundet podningskultur inokuleret til et produktionsmedium (150 liter) indeholdende 2% opløselig stivelse, 0,5% glycerin, 1% tørgær, 1% bomuldsfrømel, 0,5% sojabønneemel og calciumcarbonat (0,2%) (pH-værdi 7,0) i en 200 liters
- 30 rustfri fermenteringsbeholder, som var blevet steriliseret ved 120°C i 30 minutter, og dyrket ved 30°C i 72 timer under beluftning med 0,7 VVM og rystning ved 250 omdr./min.

Den således vundne kulturvæske blev filtreret ved hjælp af 5 kg diatoméjord. Til det vundne mycelium blev sat 80 liter ethylacetat, og der blev ekstraheret. Denne ekstraktionsprocedure blev foretaget 2 gange, og ekstrakterne blev forenet. Ekstrakten blev indampet i vakuum til et volumen på 1 liter. Koncentratet blev vasket med 500 ml 0,5% vandig natriumhydrogencarbonatopløsning, tørret over vandfrit natriumsulfat og yderligere indampet i vakuum til et volumen på 300 ml. Det således vundne koncentrat blev underkastet søjlechromatografi under anvendelse af 2500 ml silicagel. Søjlen blev vasket med chloroform og derefter elueret med en blanding af chloroform og methanol (100:1). De fraktioner, som indeholdt forbindelsen med betegnelsen FR-900216, blev koncentreret til et volumen på 20 ml. Til koncentratet blev der sat 1,5 liter hexan, og koncentratet blev filtreret. Det således vundne bundfald blev tørret, hvilket gav 1,1 g af et råt pulver. Råpulveret blev opløst i 100 ml methanol og blev derefter underkastet omvendt fase-søjlechromatografi under anvendelse af 1500 ml NS-gel (fremstillet af Nihon Seimitsukagaku Co., Ltd.). Søjlen blev elueret med methanol, og de fraktioner, som indeholdt forbindelsen med betegnelsen FR-900216, blev indsamlet (i alt 800 ml) og indampet til et volumen på 10 ml. 1 liter hexan sættes til koncentratet, som blev filtreret. Det således vundne bundfald blev tørret, hvilket gav 630 mg af et pulver. Pulveret blev rensat under anvendelse af tyndtlagschromatografi (fremkaldeopløsningsmiddel: chloroform/methanol = 20:1). Bånd indeholdende forbindelsen med betegnelsen FR-900216 blev indsamlet og suspenderet i en blanding af chloroform og methanol (10:1). Ekstrakten blev koncentreret til et volumen på 5 ml og sat til 500 ml hexan, hvilket gav 300 mg af et farveløst pulver af forbindelsen med betegnelsen FR-900216.

Analyse: C 66,30 H 7,61 N 2,18

30 Fremstilling 2

80 ml podemedium indeholdende 1% majsstivelse, 0,5% glucose, 1% glutenmel, 1% torgær og 1% majsstøbevand (justeret til en pH-værdi på 7,0 før sterilisering) blev hældt i hver af seks Erlenmeyer-kolber på hver 275 ml og steriliseret ved 120°C i 30 minutter. En smule kultur på skråsubstrat af *Rhizopus* sp. nr. F-1360 ATCC 20577 blev inokuleret til

hver af medierne og dyrket ved 30°C i 48 timer ved 250 omdr./min. under anvendelse af en rotationsryster. Det samlede volumen af således vundet podekultur blev igen inokuleret til 20 liter af et podemedium indeholdende 2%'s opløselig stivelse, 0,5% glycerin, 0,5% glucose, 1% glutenmel, 1% tørgær og 1% majsstøbevand (justeret til en pH-værdi på 7,0 før sterilisering) i en 30 liters rustfri fermenteringsbeholder, som var blevet steriliseret ved 120°C i 30 minutter, og dyrket ved 30°C i 24 timer under beluftning med 1 VVM og rystning ved 200 omdr./min. Et samlet volumen af den således vundne podekultur blev endvidere inokuleret til 150 liter af et produktionsmedium indeholdende 2% opløselig stivelse, 0,5% glycerin, 1% tørgær, 1% bomuldsfrømel, 0,5% sojabønneemel og calciumcarbonat (0,2%) (pH-værdi 7,0) i en 200 liters rustfri fermenteringsbeholder, som var blevet steriliseret ved 120°C i 30 minutter, og dyrket ved 30°C i 72 timer under beluftning med 0,7 VVM og rystning ved 250 omdr./min.

Den således vundne kulturvæske blev filtreret ved hjælp af 5 kg diatoméjord. Til det vundne mycelium sættes 80 liter ethylacetat, og der blev ekstraheret. Denne ekstraktionsprocedure blev udført to gange, og ekstrakterne blev forenet. Ekstrakten blev koncentreret i vakuum til et volumen på 1 liter. Koncentratet blev vasket med 500 ml 0,5%'s vandig natriumhydrogencarbonatopløsning, tørret over vandfrit natriumsulfat og yderligere koncentreret i vakuum til et volumen på 300 ml. Det således vundne koncentrat blev underkastet søjlechromatografi under anvendelse af 2500 ml silicagel. Søjlen blev vasket med chloroform og derefter elueret med en blanding af chloroform og methanol (100:1). De fraktioner, som indeholdt forbindelsen med betegnelsen FR-900216, blev koncentreret til et volumen på 50 ml. Til koncentratet sættes 2 liter hexan, og koncentratet blev filtreret. Det således vundne bundfald blev tørret, hvilket gav 2,5 g af et råt pulver. Råpulveret blev opløst i 10 ml chloroform og underkastet højtrykssvæskechromatografi (fremstillet af Nippon Water Limited Co., Ltd., søjle: Prepack 500 pakket med silica-gel) og elueret med en blanding af chloroform og methanol (100:15). De således vundne fraktioner, som indeholdt forbindelsen med betegnelsen FR-900216, blev indsamlet, koncentreret i vakuum til et volumen på 10 ml og sat til 100 ml hexan, hvilket gav et bundfald. Det således vundne bundfald blev tørret, hvilket gav 1,2 g af et pulver. Denne fremgangs-

måde blev udført endnu en gang, hvilket gav 500 mg af et farveløst pulver af forbindelsen med betegnelsen FR-900216.

Opfindelsen belyses nærmere ved nedenstående eksempler:

EKSEMPEL 1

5 Suspension til intramuskulær injektion:

FR-900216-forbindelse	50 mg
Polysolvat 80	10 mg
Natriumchlorid	0,09 g
Destilleret vand	4 ml

10 EKSEMPEL 2

Emulsion til intravenøs injektion:

FR-900216-forbindelse	5 mg
Sesamolie	100 mg
Polysolvat 80	10 mg
15 Natriumchlorid	0,09 g

EKSEMPEL 3

Suspension til langtidsvirkende intramuskulær injektion:

FR-900216-forbindelse	50 mg
Sesamolie	4 ml

EKSEMPEL 4

Tablet til oral administration:

	FR-900216-forbindelse	250 mg
	Calciumcarboxymethylcellulose	35 mg
5	Hydroxypropylcellulose	4 mg
	Magnesiumstearat	7 mg
	Lactose	84 mg
	(samlet vægt: 370 mg).	

PATENTKRAV

- 10 1. Forbindelse med betegnelsen FR-900216 eller et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt deraf til anvendelse som terapeutisk aktivt stof,

k e n d e t e g n e t ved, at forbindelsen har følgende fysiske og kemiske egenskaber:

- 15 1) molekylvægt:

625 (massespektrum)

- 2) molekylformel:

$C_{35}H_{47}NO_9$

- 3) smeltepunkt:

20 130-135°C (sønderdeling)

- 4) specifik drejning:

$[\alpha]_D^{20} = +140^\circ$ (c = 1, $CHCl_3$)

- 5) ultraviolet absorptionsspektrum:

25 $\lambda_{max}(CH_3OH)$ = 232 nm ($\epsilon = 11.300$)
 = 238 nm (skulder)
 = 285 nm (skulder)
 = 296 nm ($\epsilon = 55500$)
 = 308 nm ($\epsilon = 70300$)
 = 324 nm ($\epsilon = 51900$).

6) Infrarødt absorptionsspektrum:

$\nu_{\max}(\text{KBr})$: 3450, 3140, 2960, 2920, 2860, 1730, 1715 (skulder), 1607,
1575, 1455, 1445, 1435, 1377, 1360, 1343, 1305, 1280, 1260, 1225, 1190,
1170, 1140, 1107, 1077, 1045, 1030 (skulder), 980, 970, 950, 930, 915,
5 905, 895, 875, 860, 850, 835, 825, 790, 780, 755, 705, 670 og 635 cm^{-1} .

7) ^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 , intern standard: tetramethylsilan), som
vist på tegningen.

8) ^{13}C -NMR-Spektrum (CDCl_3 , intern standard: tetramethylsilan):

δ (ppm): 9,65, 11,41, 11,71, 13,77, 14,32, 16,93, 22,57, 29,24, 31,49,
10 31,85, 34,16, 35,86, 36,40, 37,98, 45,32, 54,18, 56,12, 63,77, 65,10,
76,81, 82,33, 89,25, 120,80, 123,77, 126,44, 129,29, 135,97, 136,21,
136,57, 137,67, 138,51, 139,54, 160,84, 168,01, 169,34.

9) Opløselighed:

Fuldt opløselig i methanol, ethanol, acetone og ethylacetat
15 Opløselig i chloroform og benzen
Svagt opløselig i hexan og diethylether
Uopløselig i vand.

10) Farverektion:

Positiv: Dragendorff-reaktion, iodreaktion
20 Negativ: Ferrichloridreaktion, Molisch-reaktion,
ninhydrin-reaktion, Ehrlich-reaktion.

11) Natur:

Svagt basisk forbindelse.

2. Farmaceutisk præparat,

25 k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter forbindelsen med beteg-
nelsen FR-900216 ifølge krav 1 eller et farmaceutisk acceptabelt syre-
additionssalt deraf sammen med en farmaceutisk acceptabel, i det væ-
sentlige ikke-toxisk bærer eller excipients.

3. Anvendelse af forbindelsen med betegnelsen FR-900216 ifølge krav 1 eller et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt deraf til fremstilling af et farmaceutisk præparat til behandling af tumorer.

