

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 832985 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentsökan - Patent application 832985

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12P

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 22.08.1983

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 22.08.1983

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 27.02.1984

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

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

26.08.1982 GB 8224512

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Gruppo Lepetit S.p.A., Via Durando 38, 20158 Milano, ITALIA, (IT)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Pirali, Giorgio, TOWN UNKNOWN, ITALIA, (IT)

2 •Pagani, Hermes, Italia, ITALIA, (IT)

3 •Grandi, Maria, TOWN UNKNOWN, ITALIA, (IT)

4 •Paternoster, Manuela, TOWN UNKNOWN, ITALIA, (IT)

5 •Tamoni, Giorgio, Italia, ITALIA, (IT)

6 •Cassani, Giovanni, Italy, ITALIA, (IT)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Munsterhielm Ky Kb, Päivärinnankatu 3 A 1, 00250 Helsinki

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

Antimikrobinen ja kasvaimia estävä antibiootti M 9026 ja sen puhtaat, yksittäiset fraktiot 1,2,3 ja 4.

Antibiot M 9026 och dess rena, individuella fraktioner 1,2,3 och 4 med antimikrobiell och antitumörakantitumöraktivitet.

17.10.83

ANTIMIKROBINEN JA KASVAIMIA ESTÄVÄ ANTIBIOOTTI M 9026
JA SEN PUHTAAT, YKSITTÄISET TEKIJÄT 1, 2 ja 3

5 Keksintö koskee antibiootteja, joita kutsutaan antibiootti M 9026 kompleksi ja sen puhtaat tekijät, antibiootti M 9026 tekijä 1, tekijä 2 ja tekijä 3, jotka eristetään antibiootti M 9026 kompleksista, keksintö koskee edelleen käymismenetelmää näiden antibioottien tuottamiseksi sekä kompleksin erottamista yksittäisiin tekijöihin.

10 Täten yhtenä tämän keksinnön kohteena on antibiootti M 9026 kompleksi, joka saadaan viljelemällä tähän asti merkittömätöntä kantaa, joka taksonomisesti on kuvattu Micromonospora-suvun lajina ja on myös tämän keksinnön kohteena.

15 Tämän kannan, joka kerättiin Nangal'ista (Intia), viljelmä on tallennettu Budapestin kokouksen 30. heinäkuuta, 1982 edellyttämällä tavalla, Agricultural Research Culture Collection'in viljelykokoelmaan (NRRL), 1815 N. University Street - Peoria, Illinois 61601 - USA, jossa sille on annettu liittymisnumero NRRL 15,118.

20 Tämän keksinnön kohteena on myös antibioottien M 9026 tekijät 1, 2 ja 3 eristäminen ja erottaminen Micromonospora-viljelmän käymisliemestä ja/tai myseelimassasta.

25 Yksinkertaisuuden ja antibiootin M 9026 kompleksin, antibioottien M 9026 tekijän 2 ja tekijän 3 samanlaisen käytön vuoksi seuraavassa esityksessä, käsiteltäessä aktiivisuuksia tai valmistus- ja puhdistusmenetelmiä, termejä "M 9026 yhdisteet" tai "M 9026 antibiootit" vastaa yhdiste, joka on antibiootti M 9026 kompleksi, antibiootti M 9026 tekijä 2 tai antibiootti M 9026 tekijä 3.

30 In vitro M 9026 yhdisteet estävät tiettyjen patogeenisten bakteerien, erityisesti gram-positiivisten bakteerien kasvun, ja niiden on havaittu olevan tehokkaita estäen kasvainsolujen kasvun sekä in vitro viljelmissä että in vivo kokeissa imettäväsillä.

Kannan *Micromonospora* sp. NRRL 15,118 tunnusmerkit on esitetty seuraavissa kappaleissa:

MORFOLOGIA

- 5 Kanta *Micromonospora* sp. NRRL 15,118 kasvaa hyvin erilaisilla ravintoagareilla. Kaura-agarilla ^{parvekkeet} koloniat kasvavat, niin että niiden läpimitta on 2-3 mm, niillä on säännölliset ääriviivat ja terävähuippuiset pinnat. Ilmamyeeli puuttuu aina. Mikroskooppisessa tarkastelussa myseeli paljastuu pitkäksi, haarautuneeksi ja läpimitaltaan säännölliseksi (0,6 μ m). Itiöitä, jotka ovat soikeita - pallomaisia, muodostuu runsaasti, niiden läpimitta on 0,7 - 1,0 μ m. Varrettomat itiöt kohoavat suoraan myseelistä ja sijaitsevat vallitsevasti yksinkertaisesti haarautuneilla itiöalustoilla.
- 10
- 15 Havainnot itiöistä ja itiöalustoista tehtiin ravistelu-viljelyliemessä menetelmän mukaan, jonka on esittänyt Luedemann (Intern. J. Syst. Bact. 21, 240-247, 1971).

VILJELYTUNNUSMERKIT

- 20 Taulukossa I on esitetty kannan *Micromonospora* sp. NRRL 15,118 viljelytunnusmerkit, viljeltäessä erilaisilla standardiväliaineilla Shirling'in ja Gottlieb'in mukaan (Inter. J. Syst. Bact. 16, 313-340, 1966) ja muilla väliaineilla Waksman'in mukaan (The Actinomycetes, Vol. II, the William and Wilkins Co. 1961).
- 25 Viljelytunnusmerkit määritettiin 7-14 vuorokauden inkuboinnin jälkeen 30°C:ssa.

TAULUKKO I

Kannan Micromonospora sp. NRRL 15,118 viljelytunnusmerkit:

	<u>Viljelyväliaine</u>	<u>Viljelytunnusmerkit</u>
5	Väliaine No 2 (hiivauute-mallas-agar)	ei kasvua
	Väliaine No 3 (kaurajauho-agar)	kohtuullista kasvua, rosoi- nen, vaalean oranssi, rus- kehtava pinta 12 E 8
10	Väliaine No 4 (epäorgaanisia suoloja - tärkkelys-agar)	runsasta kasvua, rosoinen, oranssi 11 F 11
	Väliaine No 5 (glyseroli-asparagiini-agar)	huonoa kasvua, tasainen, läpinäkyvästä - oranssin vaaleaan
15	Väliaine No 6 (peptoni-hiivauute- rauta-agar)	kohtuullista kasvua, rypis- tynyt, kullanruskea 12 D 9
	Väliaine No 7 (tyrosiini-agar)	huonoa kasvua, tasainen, läpinäkyvä
20	Kaurajauho-agar (Waksman'in mukaan)	runsasta kasvua, rosoinen, oranssi, tummahko pinta, kostea
	Hickey'n ja Tresner'in agar	runsasta kasvua, rypistynyt, ruskehtava
25	Czapeck-glukoosi-agar	ei kasvua
	Glukoosi-asparagiini-agar	huonoa kasvua, tasainen, läpinäkyvästä vaalean orans- siin
30	Ravintoagar	kohtuullista kasvua, rosoi- nen, oranssi 10 T 9
	Peruna-agar	runsasta kasvua, rypistynyt, oranssi, tummahko pinta, kostea
35	Bennett'in agar	runsasta kasvua, rosoinen, oranssi, ruskehtava pinta
	Kalsium-malaatti-agar	huonoa kasvua, tasainen, läpinäkyvä
	Kuorittumaito-agar	kohtuullista kasvua, rosoi- nen, oranssi 11 C 10
40	Czapeck-agar + CaCO ₃	huonoa kasvua, tasainen, läpinäkyvästä oranssiin

- | | | |
|----|----------------------------|--|
| | Czapeck-agar | huonoa kasvua, tasainen, läpinäkyvästä oranssiin |
| | Muna-agar | huonoa kasvua, tasainen, läpinäkyvästä oranssiin |
| 5 | Peptoni-glukoosi-agar | kohtuullista kasvua, rypistynyt, oranssi 11 G 8 |
| | Emerson-agar | kohtuullista kasvua, rosoinen, oranssi, ruskehtava pinta |
| 10 | Peruna | ei kasvua |
| | Peruna + CaCO ₃ | kohtuullista kasvua, rypistynyt, pölymäinen oranssi |
- Värimääritys suoritettiin menetelmällä, jonka on esittänyt Maerz ja Paul (Maerz, A. and M. Reg. Paul 1950. A dictionary of colors, 2nd Ed., Mc Grow-Hill Book Company, Inc., New York).
- 15
- Esitetyt viljelyväliainenumerot viittaavaat Shirling'in ja Gottlieb'in esittämiin numeroihin (Intern. J. Syst. Bact. 16, 313-314, 1966).
- 20
- Taulukossa II on esitetty hiililähteiden hyväksikäyttö, joka on määritetty Luedemann'in esittämällä väliaineella (Inter. J. Syst. Bact. 21, 240-247, 1971), kun taas Taulukko III esittää kannan Micromonospora sp. NRRL 15,118 fysiologiset tunnusmerkit.

TAULUKKO II

HIILILÄHTEIDEN HYVÄSIKÄYTTÖ

<u>Hiililähteet</u>	<u>Hyväksikäyttö</u>
Arabinoosi	+
Ksyloosi	+
Glukoosi	+
Fruktoosi	+
Mannoosi	+
Mannitoli	-
Inositoli	-
Ramnoosi	-
Sakkaroosi	+
Laktoosi	+
Raffinoosi	+
Selluloosa	-
Salisiini	-
Melibioosi	+
Galaktoosi	+
Riboosi	-
Dulsitoli	-
Glyseroli	-
Sellobioosi	+
Tre ^{hy} aloosi	+
Liukeneva tärkkelys	+

+ tarkoittaa hyväksikäyttöä

- tarkoittaa ei hyväksikäyttöä

+ tarkoittaa huonoa hyväksikäyttöä

TAULUKKO III

FYSIOLOGISET TUNNUSMERKIT

<u>Koe</u>	<u>Tulos</u>
Tärkkelyshydrolyysi	positiivinen
H ₂ S-muodostus	positiivinen
Melaniinin tuotto	negatiivinen
Tyrosinaali-reaktio	negatiivinen
Kaseiini-hydrolyysi	positiivinen
Kalsiummaleaatti-hydrolyysi	negatiivinen
Nitraatti-pelkistys	positiivinen
Lakmusmaito	koaguloituu
Gelatiinin nesteytys	positiivinen

Kuten muillakin organismeilla, M 9026 yhdisteitä tuottavan kannan *Micromonospora* sp. NRRL 15,118 tunnusmerkit ovat alttiina muutokselle. Esimerkiksi kannan keinotekoiset muunnokset ja mutantit voidaan saada käsittelemällä monilla tunnetuilla mutageeneilla, kuten US-säteillä, röntgensäteillä, korkeataajuisilla aalloilla, radioaktiivisilla säteillä ja kemikaaleilla, kuten typpihapolla, N-metyyli-N'-nitro-N-nitrosoguanidiinilla ja monilla muilla. Kaikki luonnolliset ja keinotekoiset muunnokset ja mutantit, jotka kuuluvat *Micromonospora*-suvun lajeihin ja tuottavat M 9026 antibiootteja ovat ekvivalentteja kannan *Micromonospora* sp. NRRL 15,118 kanssa ja kuuluvat tämän keksinnön piiriin.

- M 9026 antibioottien tuottamiseksi viljellään kantaa *Micromonospora* sp. NRRL 15,118 (tai sen ekvivalenttista mutanttia) submersisissa, aerobisissa olosuhteissa vesipitoisessa ravintoväliaineessa, joka sisältää assimiloituvia hiili- ja typpilähteitä sekä epäorgaanisia suoloja. Mainittu viljelyväliaine voi olla mikä tahansa lukuisista ravintoväliaineista, joita tavallisesti käytetään käymisessä, kuitenkin tietyt väliaineet ovat edullisempia. Täten esimerkiksi edullisia hiililähteitä ovat glukoosi, tärkkelys, maltoosi, sakkarooosi, galaktoosi, sellobioosi, raffinoosi, fruktoosi, dekstriini, melassi ja vastaavat. Muita hyödyllisiä hiililähteitä ovat maapähkinäöljy, maissiöljy, soijapapuöljy, kalaöljy ja vastaavat.

Edullisia typpilähteitä ovat hiivauutteet, aminohapot, kaseiinihydrolysaatti, lihauute, soijapapujauho (hieno), peptonit ja vastaavat.

- Muita hyödyllisiä typpilähteitä ovat kaurajauho, maapähkinäjauho, soijapapujauho (karkea), soijapapurouhe, pel-lavasiemenjauho ja vastaavat.

Epäorgaanisia suoloja, joita voidaan lisätä viljelyväliaineisiin, ovat yleisesti liukenevat suolat, jotka pysty-

POIS

20.9.1980 Annettu

liite 1:58
10

- vät tuottamaan natrium-, kalium-, rauta-, sinkki-, koboltti-, magnesium-, kalsium-, ammonium-, kloridi-, karbonaatti-, sulfaatti-, nitraatti-, fosfaatti-ioneja ja muita vastaavia. Välttämättömiä hivenaineita, jotka ovat
- 5 organismin kasvulle ja kehitykselle tarpeellisia tulee myös lisätä viljelyväliaineeseen. Tällaiset hivenaineet esiintyvät tavallisesti epäpuhtauksina muissa väliaineen aineosissa riittävässä määrin vastaten organismin kasvun vaatimuksia.
- 10 Voi olla tarpeen lisätä pieniä määriä (esim. 0,2 ml/l) vaahdon estävää ainetta, kuten polypropyleeniglykolia tai silikonijohdannaisia, suuren mittakaavan käymisessä, jos vaahtoamisesta muodostuu ongelma.
- Tavallisesti antibioottia tuottavaa kantaa esiviljellään ravistelupullossa, sen jälkeen viljelmää käytetään ympä-
- 15 täessä käymisastiat M 9026 antibioottien huomattavien määrien tuottamiseksi. Esiviljelmässä käytetty väliaine voi olla sama, jota käytetään suuremmissa käymisastioissa, mutta muitakin väliaineita voidaan käyttää.
- 20 M 9026 antibiootteja tuottava kanta voi kasvaa lämpötilassa, joka on 25°C - 37°C ja mieluummin 26°C - 30°C . Käymismassan pH pidetään yleensä välillä 6,0 - 8,5. Tavanomaiseen tapaa aerobisessa submersisessa viljelmässä, jota käytetään käymisastioissa, viljelyväliaineen läpi puhalletaan steriili ilmavirta. Organismien tehokkaan kasvun var-
- 25 mistamiseksi käytetty ilmatilavuus tuotantoastias- sellainen, joka riittää ylläpitämään liuenneen hapen konsentraation suurempana kuin 20 %.
- Käymisen kuluessa antibioottituotantoa voidaan seurata tes-
- 30 taamalla antibioottinen aktiviteetti näytteistä, jotka on otettu käymisliemestä ja/tai myseelimassan uutteista. Tähän testiin sopivia ovat organismit, joiden tiedetään olevan herkkiä M 9026 antibiooteille. Erityisen hyödyllinen koeorganismi on *Staphylococcus aureus*. Muita edullisia

testiorganismeja ovat solut, joiden tiedetään olevan herkkiä mainittujen antibioottien sitotoksiini-aktiivisuudelle.

- 5 Määritys suoritetaan helposti käyttäen agar-diffuusio-
-menetelmää agar-levyillä tai käyttäen TLC-automääritystä.

Maksimaalinen antibioottinen aktiviteetti saadaan yleensä, kun inkubointi on kestänyt noin 48-72 tuntia edellä esitetyissä käymisolosuhteissa.

- 10 Tämän menetelmän mukaan viljeltäessä submersisissa, aerobisissa käymisolosuhteissa, M 9026 antibiootit voidaan ottaa talteen käymisväliaineesta käymismenetelmässä käytetyillä menetelmillä, joita ovat esimerkiksi uuttaminen liuottimilla, vastavirtauutot, saostaminen ei-liuottimilla, pylväskromatografia, ohutkerroskromatografia ja vastaavat,
15 ja antibiootit voidaan puhdistaa edelleen esimerkiksi kiteyttämällä liuottimista, nestekromatografisesti, korkeapainenestekromatografisesti (HPLC), käänteisfaasi-HPLC-
-tekniikkaa ja muita vastaavia menetelmiä käyttäen.

- 20 Antibiootteja, joita muodostuu M 9026 antibiootteja tuottavien organismien käymisen kuluessa, on sekä viljelyliemissä että myseelimassassa.

- Edullinen menetelmä M 9026 antibioottien talteenottamiseksi on siten uuttaa suodatetut käymisliemet ja myseelimassa erikseen. Täten, sen jälkeen kun myseelimassa on erotettu
25 suodattamalla, M 9026 antibiootit otetaan talteen suodoksesta uuttamalla sopivalla, orgaanisella liuottimella. Uuttaminen suoritetaan yleensä sen jälkeen, kun suodoksen pH on säädetty arvoon 3,5 - 8,5, mieluummin 6,0 - 7,7 ja erityisesti noin 7.

- 30 Sopivia orgaanisia liuottimia ovat veteen sekoittumattomat liuottimet, jotka liuottavat M 9026 antibiootteja; edullisina ~~mutta ei rajoittavina~~ esimerkkeinä voidaan

mainita: alempialkanolit, kuten metanoli, etanoli, propanoli ja vastaavat; alempihalogeenialkaanit, kuten kloroformi, metyleenikloridi, kloorietaani ja vastaavat; alempialkyyliesterit, kuten etyyliasetaatti, butyyliasetaatti, propyyliasetaatti, etyylipropionaatti, etyylibutyraatti ja vastaavat; ja ketonit, kuten metyylietyyliketoni ja vastaavat.

Sen jälkeen uutteen konsentroidaan pieneen tilavuuteen ja saostuva sakka otetaan talteen suodattamalla. Saostumista täydennetään lisäämällä toista, orgaanista liuotinta, johon M 9026 antibiootit ovat liukenemattomia, kuten petrolieetteriä, etyylieetteriä tai vastaavia.

Myseelimassa puolestaan pestään vedellä ja suspendoidaan johonkin edellä mainittuun liuottimeen, joka on sopiva M 9026 antibioottien uuttoon.

Hämmennetään, jonka jälkeen seos suodatetaan ja orgaaninen liuotin erotetaan suodoksesta. Jäljelle jäävän vesipitoisen seoksen pH säädetään arvoon 3,5 - 8,5 ja mieluiten 6 - 7 ja uutetaan kuten jo edellä käymisliemelle on esitetty.

Saadut M 9026 antibiootit voidaan puhdistaa edelleen tunnetuilla puhdistusmenetelmillä, käyttäen mieluiten preparatiivista ohutlevykromatografiaa tai pylväskromatografiaa.

Absorbanttiaineina voidaan käyttää edullisesti sellaisia kuin alumiini, piihappogeeli, ioninvaihtohartseina esimerkiksi Dowex[®] -hartseja, selluloosaa, Sephadex[®] -pylvästä ja vastaavia.

Eräs tämän keksinnön mukainen edullinen suoritusmuoto on M 9026 kompleksin puhdistaminen käyttäen piihappogeeli-kromatografiapylvästä ja suorittamalla eluointi polaarisen liuottimen, kuten alempialkanolin ja halogeenialempialkaanin, kuten kloroformin ja emäksisen aineen, kuten ammoniumhydraatin seoksella.

Toisen edullisen suoritusmuodon mukaan eluointiseoksena käytetään kloroformi:metanoli:ammoniakki-seosta, suhteessa 66:30:4.

5 Eluoidut fraktiot, joilla on antimikrobinen aktiivisuus edellä esitetyssä kokeessa, yhdistetään ja antibioottinen M 9026 kompleksi otetaan talteen jollain edellä esitetyllä tekniikalla.

10 Antibioottien M 9026 tekijä 2 ja tekijä 3 erottaminen suoritetaan käyttäen jotain monista tunnetuista menetelmistä, joita pääasiassa ovat kromatografiset menetelmät.

Voidaan käyttää myös uuttamista liuottimilla, saostamista liuottimilla, vastavirtauuttoa ja vastaavia.

15 Erään toisen edullisen suoritusmuodon mukaan käytetään pylväskromatografiaa; edullinen adsorbentti on piihappogeeli ja edullinen eluointiseos koostuu polaarista liuotimesta, kuten alempialkanolista, ja liuotimesta, jolla on alhainen polarisuus, kuten halogeenialempialkaanista.

Edullinen eluointiseos on myös kloroformi plus metanoli suhteessa 9:1.

20 Eluoidut fraktiot kerätään, testataan edellä esitetyn koe-menetelmän mukaan ja yhdistetään. Antibiootti M 9026 tekijä 2 ja antibiootti M 9026 tekijä 3 otetaan sen jälkeen talteen yhdistetyistä, niitä sisältävistä fraktioista käyttäen jotain edellä esitettyä menetelmää, jolla M 9026 kompleksi otetaan talteen uuttoseoksesta.

ANTIBIOOTIN M 9026 KOMPLEKSI JA ANTIBIOOTTIEN M 9026 TEKIJÄT 1, 2 ja 3 FYSIKO-KEMIAALLISET OMINAISUUDET

ANTIBIOOTTI M 9026 KOMPLEKSI:

5 Infrapuna-absorptiospektri nujolissa on esitetty liitteenä kuvassa 1.

Havaitaan seuraavat absorptiomaksimit (cm^{-1}): 3260 (leveä), 3060, 2730, 1735, 1720 (olka), 1650, 1630, 1545, 1515, 1495, 1300, 1260, 1210, 1170, 1090, 1030, 980, 940, 830, 760, 720, 700.

10 UV-spektrissä on terminaalinen absorptio kohdassa noin 215 nm, metanolissa ja spektri on esitetty liitteenä kuvassa 2.

ANTIBIOOTTI M 9026 TEKIJÄ 1:

15 Antibiootti M 9026 tekijä 1 on kiteinen aine, jonka sulamispiste on noin 235°C

Se liukenee kloroformiin, metanoliin, huonommin liukeneva asetoniin, hydrokarbideihin, liukenematon veteen.

20 Alkuaineanalyysillä saadaan seuraava likimääräinen prosenttinen koostumus: hiiltä 68,83 %; vetyä 8,70 %; typpeä 5,56 %; happea (saatu erotuksena) 16,91 %.

Infrapuna-absorptiospektri nujolissa on esitetty liitteenä kuvassa 3.

25 Havaitaan seuraavat absorptiomaksimit (cm^{-1}): 3670, 3550, 3460, 3320, 3100, 3080, 3040, 2740, 1720, 1660, 1630, 1545, 1500, 1260, 1245, 1220, 1190, 1140, 1090, 1040, 985, 950, 895, 750, 725, 700.

Ultraviolettiabsorptiospektrissä havaitaan terminaalinen absorptio kohdassa noin 215 nm, metanolissa (pääpiirteittäin samanlainen kuin kuvassa 2).

NMR-spektri on esitetty liitteenä kuvassa 4 ja siinä havaitaan seuraavat pääpiikit:

- 5 δ 0,70-0,73 (2d, 6H, J=6,5), 0,83 (d, 6H, J=7), 1,0-2,0 (m, 4H), 1,06 (m, 1H), 1,24 (d, 3H, J=6,5), 1,5-2,0 (m, 2H), 1,66 (t sept, 1H, J=7,5), 1,98 (ddd, 2H, J=7,5-7,5-1); 2,49 (ddd, 1H, J=7-10; 2,5), 3,00 (d, 2H; J=7,5), 3,91 (dddd, 1H, J=9; 8; 2,5-9,5), 4,08 (dd, 1H), 4,32 (ddq, 1H; J=2,5-10), 4,57 (dt, 1H; J=8), 5,69 (dt, 1H, J=15), 6,15 (d, 1H), 6,22 (d, 1H), 6,73 (dt, 1H), 7,18 (m, 5H).

- 10 Massaspektri on esitetty liitteenä kuvassa 5.

Pääpiikit ovat seuraavat (ensimmäinen numero on suhde m/z ja toinen, suluissa oleva on suhteellinen esiintymisprosentti):

- 15 486 (35); 91 (18); 111 (81); 120 (37); 216 (18); 217 (19); 230 (70); 231 (34); 258 (100); 344 (48); 372 (8,3); 395 (3,5); 486 (2,6); 471 (1,1).

ANTIBIOOTTI M 9026 TEKIJÄ 2:

Antibiootti M 9026 tekijä 2 on valkoisen harmaa jauhe, jonka sulamispiste on yli 280°C.

- 20 Se on liukeneva metanoliin, etanoliin, asetoniin, etyyli-asetattiin, kloroformiin; huonosti liukeneva asetonitriiliin, liukenematon veteen, petrolieetteriin, etyylieetteriin.

- 25 Alkuaineanalyysillä saadaan seuraava likimääräinen prosenttinen koostumus (useamman analyysin keskiarvo): hiiltä 68,82 %; vetyä 9,04 %; typpeä 5,70 %; happea (saatu erotuksena) 17,09 %.

Infrapuna-absorptiospektri nujolissa on esitetty liitteenä kuvassa 6a.

- 30 Havaitaan seuraavat absorptiomaksimit (cm^{-1}): 3340, 3295, 3070, 2730, 1720, 1670, 1655, 1630, 1540, 1500, 1270, 1240, 1215, 1190, 1140, 1090, 1040, 980, 945, 760, 720, 700.

UV-spektrissä havaitaan terminaalinen absorptio kohdassa noin 215 nm, metanolissa (spektri pääpiirteittäin samanlainen kuin kuvassa 2).

5 NMR-spektri on esitetty liitteenä kuvassa 7 ja siinä on seuraavat pääpiikit:

δ 0,78 (d, 6H; J=7); 0,87-0,90 (2d, 6H; J=6,5); 1,4-2,0 (m, 8H); 1,24 (d, 3H; J=6,5); 1,27 (d, 3H J=7); 1,92 (ddd, 2H, J=7,5-7,5-1); 2,60 (ddd, 1H, J=2,5-7-11); 3,27 (dq, 1H; J=9); 4,08 (dddd, 1H, J=9; 9-9-2); 4,14 (dd, 10 1H); 4,38 (ddq, 1H, J=2-11); 4,54 (dd, 1H, J=8); 5,62 (dt, 1H, J=15); 6,13 (d, 1H); 6,60 (dt, 1H); 7,23 (m, 5H); 7,27 (d, 1H).

Massaspektri on esitetty liitteenä kuvassa 8.

15 Pääpiikit ovat seuraavat (ensimmäinen numero on suhde m/z ja toinen, sulussa oleva, on suhteellinen esiintymisprosentti):

500 (9); 105 (28); 111 (78); 134 (40); 230 (12); 231 (20); 244 (82); 245 (34); 272 (100); 358 (42); 386 (18); 395 (34); 482 (6); 485 (3).

20 Piihappogeeli-TLC Merck'in levyllä 60 F 254 antaa tuloksi R_f -arvon 0,54 käytettäessä eluointiseoksena metyleenikloridi:metanolia suhteessa 95:1 ja R_f -arvon 0,76 käytettäessä eluointiseoksena metyleenikloridi:metanolia suhteessa 9:1.

ANTIBIOOTTI M 9026 TEKIJÄ 3:

Antibiootti M 9026 tekijä 3 on valkoinen kiteinen aine, jonka sulamispiste on noin 110°C (kofler).

5 Alkuaineanalyysillä saadaan seuraava likimääräinen prosent-
tinen koostumus: hiiltä 67,01 %; vetyä 9,24 %; typpeä
5,52 %; happea (saatu erotuksena) 18,33 %.

Infrapuna-absorptiospektri CDCl_3 :ssa on esitetty liitteenä kuvassa 9.

10 Havaitaan seuraavat absorptiomaksimit: 3700, 3610, 3420,
3300, 3040, 2960, 2935, 2880, 1730, 1665, 1635, 1600, 1500,
1455, 1435, 1370, 1275, 1235, 1200, 1170.

UV-spektrissä on terminaalinen absorptio kohdassa noin 215 nm, metanolissa (spektri pääosin samanlainen kuin kuvassa 2).

15 NMR-spektri on esitetty liitteenä kuvassa 10 ja siinä havaitaan seuraavat pääpiikit:

20 δ 0,88 (d, 6H; $J=7$); 0,91-0,94 (2d, 6H, $J=7$); 1,4-2,0 (m, 8H), 1,16 (d, 3H; $J=6,5$), 1,31 (d, 3H, $J=7$), 1,99 (ddd, 2H, $J=7-7-1$); 2,49 (ddd, 1H, $J=2,5$; 7-11); 3,07 (b, 1H); 3,34 (dq, 1H; $J=8$), 3,68 (s, 3H); 3,70 (m, 1H); 3,75 (dd, 1H, $J=10$); 3,88 (b, 1H); 4,01 (dddd, $J=9$, $J=2-11$); 4,54 (dd, 1H, $J=9$), 5,62 (dt, 1H, $J=15$); 6,16 (d, 1H); 6,52 (d, 1H); 6,65 (dt, 1H); 7,27 (m, 5H).

Massaspektri on esitetty liitteenä kuvassa 8a.

25 Pääpiikit ovat seuraavat (ensimmäinen numero on suhde m/z ja toinen, sulussa oleva, on suhteellinen esiintymisprosentti):

30 532 (0,6); 105 (28); 111 (76); 134 (40); 230 (12); 231 (20); 244 (82); 245 (34); 272 (100); 358 (40); 386 (6);
395 (5); 427 (7); 482 (2); 500 (1,2).

Piihappogeelillä, käyttäen ohutkerroskromatografiassa Merck'in levyä 60 F 254, saadaan R_f -arvo 0,41 käytettäessä eluointiseoksena metyleenikloridi:metanolia suhteessa 95:1, ja R_f -arvo 0,63 käytettäessä eluointiseoksena metyleenikloridi-metanolia suhteessa 9:1.

Antibiootti M 9026 kompleksi ja sen tekijät 1, 2 ja 3 omaavat in vitro antimikrobisen aktiivisuuden erityisesti gram-positiivisia bakteereita vastaan.

Seuraavassa taulukossa IV on esitetty antibiootin M 9026 kompleksin MIC-arvot. Hyvin samanlaisia tuloksia saadaan yksittäisillä antibiooteilla M 9026 tekijä 2 ja tekijä 3.

TAULUKKO IV

KANTA		<u>MIC µg/ml</u>
<u>Staphylococcus aureus</u>	ATCC 6538	0,1
<u>Staphylococcus aureus Tour</u>		0,05
<u>Staphylococcus aureus Tour</u>		
(Difco P liemi + 30 % vasikan seerumia)		12,5
<u>Streptococcus haemolyticus</u>	C 203	0,2
<u>Diplococcus pneumoniae</u>	UC 41	0,4
<u>Clostridium perfringens</u>	ISS 30543	12,5
<u>Proteus vulgaris X 19 H</u>	ATCC 881	>100
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	ATCC 10145	>100
<u>Candida albicans</u>	SKF 2270	100
<u>Trichophyton mentagrophytes</u>	SKF 17410	>100
<u>Mycobacterium tub. H37Rv</u>	ATCC 9360	12,5
<u>Mycoplasma gallisepticum H 21</u>	C.Z.B.	0,1
<u>Trichomonas vaginalis</u>		> 100

Antibiootti M 9026 kompleksi ja antibiootit M 9026 tekijä 2 ja tekijä 3 omaavat sytotoksisen aktiivisuuden in vitro sekä kasvaimia estävän aktiivisuuden in vivo kokeissa.

IN VITRO KOKEET:

- 5 HL60-solujen suspensioita säilytetään RPMI 1640-väliaineessa (katso S.J. Collins et al. Nature, 270, 347-349, 1977), johon on lisätty 20 % ~~kuolleen~~ ^{sikiön} vasikan seerumia, antibioottia (gentamysiiniä 50 µg), 2 mM L-glutamiinia, suspensioita pidetään 37°C:ssa kostutetussa ilmakehässä, 10 joka sisältää 5 % hiilidioksidia.

Testattavat yhdisteet liuotetaan 10 % metanoliin, jonka jälkeen ne laimennetaan steriiliin suolaliuokseen, lopullisen konsentraation ollessa 1000 µg/ml.

- 15 Antibiootti M 9026 kompleksin IC₅₀-arvo (t.s. konsentraatio, joka vaaditaan, jotta solukasvu 50 prosenttisesti estyy verrattuna kontrolliin) oli 0,1 - 0,25 µg/ml.

- 20 Samoissa olosuhteissa IC₅₀-arvo antibiootille M 9026 tekijä 2 oli 5 - 0,5 µg/ml ja IC₅₀-arvo antibiootille M 9026 tekijä 3 oli noin 0,05 µg/ml. Solun kasvun estymisen mittana käytetään ³H-tymidiini-liittymisen estymistä. Actinomyysiini D ja sykloeksimiidiä käytetään positiivisena kontrollina, ja näille saadaan vastaavasti IC₅₀-arvo noin 0,05 µg/ml ja noin 0,25 µg/ml edellä esitetyissä olosuhteissa.

- 25 IN VIVO KOKEET:

- 30 Keksinnön mukaisten yhdisteiden kasvaimia estävän aktiivisuuden ennakolta tapahtuva testaus suoritetaan käyttäen hiiriä, joilla on P₃₈₈-kasvain. Kokeet suoritetaan pääpiirteittäin seuraten National Cancer Institute'n menetelmiä (Geran et al., Cancer Chem. Rep., osa III, 3, 17, 1972).

Tässä kokeessa 10⁶ kasvainsolua siirrostetaan intraperi-

- toneaalisesti CDF_1 -hiiriin. Testattava yhdiste suspendoidaan karboksimeetyyliselluloosaan ja injektoidaan intraponeaalisesti, käyttäen päivittäistä hoitoa 1 - 5 päivän ajan, alkaen 24 tunnin kuluttua kasvainsiirrosta.
- 5 Kontrollihiiret eivät saa yhdistettä. Käsiteltyjen ja kontrollihiirten elinikä katsotaan ja tulokset saadaan näissä kokeissa laskemalla prosentuaalinen kontrolli-elinaika (T/C):

$$10 \quad \frac{\text{Käsitellyn ryhmän keskimääräinen elinaika}}{\text{Kontrolliryhmän keskimääräinen elinaika}} \times 100$$

Arvon ollessa suurempi kuin 100, se osoittaa käsitellyn ryhmän keskimääräisen elinajan pidentymistä verrattuna kontrolliryhmään.

- 15 NCI:ssä käytetyn arvion mukaan tässä testissä saatujen tulosten arvioinnissa T/C-arvon ollessa ≥ 125 , tulosta pidetään tarkemman tutkimisen arvoisena.

Annoksen ollessa 5 mg/kg T/C-arvo antibiootti M 9026 kompleksille oli 153 ja T/C-arvo antibiootti M 9026 tekijälle 3 oli 168.

- 20 5-fluoriurasiilia käytettiin positiivisena kontrollina ja sille saatiin T/C-arvo 168 % annoksen ollessa 60 mg/kg.

Kuten edellä esitettiin, tämän keksinnön mukaiset yhdisteet omaavat antimikrobisen ja kasvaimia estävän aktiivisuuden.

- 25 Näitä yhdisteitä käytetään siten farmakologisesti aktiivisina aineina. Tätä käyttöä varten yhdisteet valmistetaan mieluummin tunnetuiksi farmaseuttisiksi koostumuksiksi, joita voidaan sopivasti antaa oraalisesti tai parenteraalisesti niitä tarvitseville potilaille.

- 30 Oraaliset koostumukset voivat olla jauheina, kapseleina,

tabletteina, siirappeina ja vastaavina, ja ne valmistetaan yleisten menetelmien mukaan, käyttäen hyvin tunnettuja apuaineita ja kantajia.

5 Parenteraalista annostamista varten, joka tässä on edullinen annostamistapa, keksinnön mukaiset yhdisteet voidaan annostaa yhdisteiden liuoksen tai suspension injektoitavana annoksena fysiologisesti hyväksyttävässä kantajassa, joka voi olla steriili neste, kuten vesi ja/tai öljyt, yhdessä tai ilman pinta-aktiivisen aineen ja muiden farmaseuttisesti hyväksyttävien lisäaineiden lisäystä. Esimerkkejä öljyistä, joita voidaan käyttää näissä valmisteissa ovat petroli- ja eläinöljyt tai synteettistä alkuperää olevat öljyt, esimerkiksi maapähkinäöljy, soijapapuöljy, seesamiöljy ja mineraaliöljy. Yleensä injektoitavien liuosten nestemäisinä kantajina voidaan käyttää kahdesti tislattua, pyrogeeni-vapaata vettä, suolaliuoksia, vesipitoista dekstraania ja vastaavia sokeriliuoksia, etanolia ja glykoleja, kuten propyleeniä tai polyetyleeniglykoleja. Näitä valmisteita voidaan käyttää heti-valmiina käyttöliuoksina tai mieluummin kuivien, liukenevien valmisteiden muodossa, jolloin ne yhdistetään liuottimen kanssa juuri ennen käyttöä. Viimeksi mainitussa tapauksessa aktiivaine on yleensä lyofilisoitu.

25 Parenteraalisessa annostuksessa terapeuttisesti tehokas määrä on päivittäin 0,5 - 20 mg/kehon painokiloa kohti.

Yhdisteiden toistuvat päivittäiset annokset voivat hahuttaessa ja vaihtelevatkin potilaan olotilasta ja annostamistavasta riippuen.

25 Yhdisteet voidaan annostaa myös kestoinjektion tai siirränäisvalmisteen muodossa, joka voidaan valmistaa siten, että aktiiviatteen vapautuminen tapahtuu vähitellen. Aktiiviatte voidaan puristaa pelleteiksi tai pieniksi sylintereiksi ja siirrostaa subkutaanisesti tai lihaksensisäisesti kestoinjektioina tai siirroksina. Siirroksina

voidaan käyttää inerttejä aineita, kuten biologisesti hajoavia polymeerejä tai synteettisiä silikoneja, esimerkiksi Silastic'ia, joka on Dow Corning Corporation'in valmistama silikonikumi.

- 5 Tämä keksintö koskee täten myös terapeutista koostumusta, joka sisältää keksinnön mukaisen yhdisteen seoksessa farmaseuttisesti hyväksyttävien kantajien kanssa.

- 10 Seuraavat esimerkit kuvaavat tapaa, jolla alan ammattimiehet voivat käyttää keksintöä, esimerkit eivät kuitenkaan millään tapaa rajoita keksinnön piiriä.

UV/Vis-spektrit rekisteröitiin käyttäen Perkin Elmer 320 UV/Vis-spektrofotometriä.

Massaspektrit rekisteröitiin käyttäen Hitachi-Perkin-Elmer RMU-6L-massaspektrometriä.

- 15 NMR-spektrit rekisteröitiin CDCl_3 :ssa, sisäisenä standardina TMS, käyttäen Bruker WH-270 spektrometriä 270 MHz:ssä.

ESIMERKKI 1

Kannan *Micromonospora* sp. NRRL 15,118 käyminen

Micromonospora sp. NRRL 15,118:n viljelmää esiviljellään kasvattamalla kantaa ravistuspulloviljelmässä, jolla on
5 seuraava koostumus:

	hiivauutetta	5 g
	lihauutetta	3 g
	tryptonia	4 g
	dekstroosia	1 g
10	tärkkelystä	24 g
	CaCO ₃	4 g
	vesijohtovettä	1000 ml:aan.

Pulloja pidetään 48 tuntia 30°C:ssa ja esiviljelmää käytetään ympättäessä käymisastiat, joista jokainen sisältää
15 1 litran seuraavaa ravintoväliainetta:

	hiivauutetta	2 g
	kaseiini-hydrolysaattia	4 g
	lihauutetta	2 g
	dekstroosia	10 g
20	tärkkelystä	20 g
	CaCO ₃	3 g
	vesijohtovettä	1000 ml:aan.

Käymiserät inkuboidaan submersisissa, aerobisissa olosuhteissa, samalla hämmentäen 26-30°C:ssa. pH pidetään välillä 6,0 - 8,5. Tietyin aikaväleihin määritetään antibioottien aktiviteetti mikrobiologisesti agar-diffuusiomenetelmällä käyttäen testiorganismina *Staphylococcus aureus*'ta.
25 Maksimiaktiviteetti saavutetaan yleensä 72 tunnin kuluttua.

ESIMERKKI 2

30 Antibiootti M 9026 kompleksin talteenotto

Esimerkissä 1 esitetyllä tavalla valmistettu käymisliemi

suodatetaan. Suodoksen pH säädetään arvoon 7 ja suodos uutetaan kaksi kertaa yhtä suurella tilavuudella etyyliasettaattia. Orgaaniset uutteet erotetaan ja konsentroidaan tyhjössä noin 1/100 alkuperäisestä tilavuudesta.

5 Muodostuva sakka otetaan talteen suodattamalla.

Lisää samaa tuotetta saadaan lisäämällä etyylietteriä emäliuoksiin. Suodattamisen jälkeen saatu kiinteä aine kuivataan tyhjössä huoneen lämpötilassa, näin saadaan raaka antibiootti M 9026 kompleksi.

10 ESIMERKKI 3

Antibiootti M 9026 tekijän 1 talteenotto

Myseelimassa, joka saadaan suodattamalla käymisliemi, pestään vedellä, pH säädetään arvoon noin 7,0 ja seos suspendoidaan metanoliin hämmentäen 20 minuutin ajan. Sen jälkeen seos suodatetaan ja metanoli haihdutetaan suodoksesta. Saadun vesipitoisen kerroksen pH säädetään arvoon 7,0 ja se uutetaan etyyliasetaatilla, kuten edellä esitettiin käymisliemen yhteydessä.

20 Saatu antibiootti M 9026 tekijä 1 voidaan puhdistaa kuten antibiootit M 9026 tekijä 2 ja tekijä 3 (kts. esimerkki 4). Sen fysiko-kemialliset tunnusmerkit on esitetty jo edellä.

25 Samanlaiset tulokset saadaan korvattaessa edellä esitetyssä menetelmässä etyyliasetaatilla kloroformilla tai metyylietyyliketonilla.

ESIMERKKI 4

Antibiootti M 9026 kompleksin puhdistus

30 1,5 g raakaa kompleksia (saatu esimerkin 1 mukaisesti) liuotetaan 10 ml:aan eluointiseosta ja siirretään piihappogeelikromatografia-pylvääseen (Kieselgel 60 (70-230 mesh ASTM) (120 g) Merck), pylväs valmistetaan kloroformi:meta-

noli:ammoniakki-seokseen, suhteessa 66:30:4.

Pylväs kehitetään käyttäen kloroformi:metanoli:ammoniakki-seosta (60:30:4), ja kerätään 15 ml:n fraktiot. Pylvään kehittymistä seurataan testaamalla jokainen fraktio HL60-soluja tai *Staphylococcus aureus*'ta tai *B. subtilis*'ta vastaan ja käyttäen ohutkerroskromatografia-bioautografiaa osoitusorganismina *S. aureus*.

Fraktiot yhdistetään havaittujen aktiivisuuksien perusteella. Konsentroituihin, yhdistettyihin fraktioihin lisätään etyylietteriä puhtaan antibiootti M 9026 kompleksin saostamiseksi. Tässä viimeisessä vaiheessa voidaan käyttää myös isopropylietteriä tai petrolieetteriä.

Tämän tuotteen fysiko-kemialliset tunnusmerkit on esitetty jo edellä.

15 ESIMERKKI 5

Antibiootti M 9026 tekijän 2 ja tekijän 3 erottaminen

Puhdistettu M 9026 kompleksi (340 mg), joka saadaan edellä esimerkissä 4 esitetyllä tavalla, liuotetaan 5 ml:aan metyleenikloridi:metanolia, 9:1.

20 Saatu liuos siirretään piihappogeelikromatografia-pylväseen (30 g Kieselgel (70-230 mesh ASTM) Merck), pylväs valmistetaan metyleenikloridi:metanoliin, 9:1.

25 Samaa seosta käytetään pylvään kehittämisessä, kerätään 15 ml:n fraktiot. Pylvään eluoitumista seurataan testamalla fraktiot *Staphylococcus aureus*'ta tai *B. subtilis* HL60-soluja vastaan, tai TLC:llä tai TLC-bioautografialla käyttäen osoitusorganismina *S. aureus*'ta tai *B. subtilis*'ta. Fraktiot yhdistetään sisältämänsä tekijän ja aktiivisuuden mukaan. Jokainen yhdistetty fraktio konsentroidaan tyhjöissä. Jokaiseen konsentraattiin lisätään etyylietteriä toi-

30

votun tekijän saostamiseksi. Käyttäen tätä menetelmää kolme suurinta tekijää erotetaan peräkkäin ja niitä kutsutaan vastaavasti tekijä 1, tekijä 2 ja tekijä 3.

Niiden fysiko-kemialliset tunnusmerkit on esitetty edellä.

PATENTTIVAATIMUKSET:

1. Menetelmä tuottaa antibioottia^a M 9026 kompleksia^a t u n n e t t u siitä, että viljellään kantaa Micromonospora sp. NRRL 15,118 tai sen ekvivalenttista mutanttia submersisissa, aerobisissa käymisolosuhteissa, vesipitoisessa ravintoväliaineessa, joka sisältää assimiloituvat hiili- ja typpilähteet ja epäorgaanisia suoloja, kunnes on tuotettu huomattava määrä antibioottista aktiviteettia, joka mainittu antibiootti otetaan talteen hyvin tunnetuilla menetelmillä ja jolla on seuraavat tunnusmerkit:

infrapuna-absorptiomaksimit (cm^{-1}):

3260 (leveä), 3060, 2730, 1735, 1720 (olka), 1650, 1630, 1545, 1515, 1495, 1300, 1260, 1210, 1170, 1090, 1030, 980, 940, 830, 760, 720, 700;

- 15 ultraviolettispektri: terminaalinen absorptio noin 215 nm (metanoli),

ja josta kompleksista mahdollisesti eristetään pääfraktiot, joita^{the. event} nimitetään

- 20 antibiootti M 9026 tekijä 1, joka on kiteinen aine ja jolla on seuraavat tunnusmerkit:

a) sulamispiste noin 235°C ;

b) hyvin liukeneva kloroformiin, metanoliin, osittain liukeneva asetoniin, hiilivetyihin, liukenematon veteen;

- 25 c) likimääräinen prosenttinen alkuainekoostumus: hiiltä 68,83 %; vetyä 8,70 %; typpeä 5,56 %; happea (saatu erotuksena) 16,91 %;

- 30 d) infrapuna-absorptiomaksimit (cm^{-1}) nujolissa: 3670, 3550, 3460, 3320, 3100, 3080, 3040, 2740, 1720, 1660, 1630, 1545, 1500, 1260, 1245, 1220, 1190, 1140, 1090, 1040, 985, 950, 895, 750, 725, 700;

e) ultraviolettiaabsorptiospektri: terminaalinen absorptio noin 215 nm, metanolissa;

f) NMR-spektrissä pääpiikit (δ = ppm; J=Hz):

5 δ 0,70-0,73 (2d, 6H, J=6,5), 0,83 (d, 6H, J=7), 1,0-2,0 (m, 4H), 1,06 (m, 1H), 1,24 (d, 3H, J=6,5), 1,5-2,0 (m, 2H), 1,66 (t sept, 1H, J=7,5), 1,98 (ddd, 2H, J=7,5-7,5-1); 2,49 (ddd, 1H, 1H, J=7-10; 2,5), 3,00 (d, 2H, J=7,5), 3,91 (dddd, 1H, J=9; 8; 2,5-9,5), 4,08 (dd, 1H), 4,32 (ddq, 1H, J=2,5-10), 4,57 (dt, 1H, J=8), 5,69 (dt, 1H, J=15), 6,15 (d, 1H), 6,22 (d, 1H), 6,73 (dt, 1H), 7,18 (m, 5H);

10

g) massaspektrissä pääpilkkoutumispiikit (m/z):

486 (35); 91 (18); 111 (81); 120 (37); 216 (18); 217 (19); 230 (70); 231 (34); 258 (100); 344 (48); 372 (8,3);

15 395 (3,5); 486 (2,6); 471 (1,1),

antibiootti M 9026 tekijä 2, joka on valkoharmaa jauhe ja jolla on seuraavat tunnusmerkit:

a) sulamispiste yli 280°C;

20 b) hyvin liukeneva metanoliin, etanoliin, asetoniin, etyyliasetattiin, kloroformiin, huonommin liukeneva asetonitriiliin, liukenematon veteen, petrolieetteriin, etyylieetteriin;

c) likimääräinen prosenttinen alkuainekoostumus: hiiltä 68,82 %; vetyä 9,04; typpeä 5,70; happea (saatu erotuksena) 17,09 %;

25

d) infrapuna-absorptiomaksimit (cm^{-1}) nujolissa: 3340, 3295, 3070, 2730, 1720, 1670, 1655, 1630, 1540, 1500, 1270, 1240, 1215, 1190, 1140, 1090, 1040, 980, 945, 760, 720, 700;

e) UV-spektri: terminaalinen absorptio noin 215 nm, metanolissa (kuva 2);

30

- f) NMR-spektrissä pääpiikit (δ = ppm; J=Hz);
 δ 0,78 (d, 6H; J=7); 0,87-0,90 (2d, 6H; J=6,5); 1,4-2,0 (m, 8H); 1,24 (d, 3H; J=6,5); 1,27 (d, 3H, J=7); 1,92 (ddd, 2H, J=7,5-7,5-1); 2,60 (ddd, 1H, J=2,5-7-11); 3,27 (dq, 1H, J=9); 4,08 (dddd, 1H, J=9; 9-9-2); 4,14 (dd, 1H); 4,38 (ddq, 1H, J=2-11); 4,54 (dd, 1H, J=8); 5,62 (dt, 1H, J=15); 6,13 (d, 1H); 6,60 (dt, 1H); 7,23 (m, 5H); 7,27 (d, 1H);
- g) massaspektrissä pääpilkkoutumispiikit (m/z)(% suht. runsaus):
 500 (9); 105 (28); 111 (78); 134 (40); 230 (12); 231 (20); 244 (82); 245 (34); 272 (100); 358 (42); 386 (18); 395 (34); 482 (6); 485 (3);
- h) ohutkerroskromatografiassa, levyllä Merck 60 F 254
 R_f -arvo 0,54 metyleenikloridi:metanolissa, suhteessa 95:1, ja R_f -arvo 0,76 metyleenikloridi:metanolissa, suhteessa 9:1, ja
- antibiootti M 9026 tekijä 3, joka on valkoinen kiteinen aine ja jolla on seuraavat tunnusmerkit:
- a) sulamispiste noin 110°C (Kofler);
- b) likimääräinen prosenttinen alkuainekoostumus: hiiltä 67,01 %; vetyä 9,24 %; typpeä 5,52 %; happea (saatu erotuksena) 18,33 %;
- c) infrapuna-absorptiomaksimit (cm^{-1}) CDCl_3 :ssa:
 3700, 3610, 3420, 3300, 3040, 2960, 2935, 2880, 1730, 1665, 1635, 1600, 1500, 1455, 1435, 1370, 1275, 1235, 1200, 1170;
- d) UV-spektri: terminaalinen absorptio noin 215 nm, metanolissa (kuva 2);
- e) NMR-spektrissä pääpiikit (δ = ppm; J=Hz):
 δ 0,88 (d, 6H; J=7); 0,91-0,94 (2d, 6H, J=7); 1,4-2,0 (m, 8H), 1,16 (d, 3H; J=6,5), 1,31 (d, 3H, J=7), 1,99 (ddd, 2H,

J=7-7-1); 2,49 (ddd, 1H, J=2,5; 7-11); 3,07 (b, 1H); 3,34 (dq, 1H; J=8), 3,68 (s, 3H); 3,70 (m, 1H); 3,75 (dd, 1H, J=10); 3,88 (b, 1H); 4,01 (dddd, J=9, J=2-11); 4,54 (dd, 1H, J=9), 5,62 (dt, 1H, J=15); 6,16 (d, 1H); 6,52 (d, 1H);
 5 6,65 (dt, 1H); 7,27 (m, 5H);

f) massaspektrissä pääpilkkoutumispiikit (m/z, suhteellinen esiintymisprosentti):

532 (0,6); 105 (28); 111 (76); 134 (40); 230 (12); 231 (20);
 244 (82); 245 (34); 272 (100); 358 (40); 386 (6); 395 (5);
 10 427 (7); 482 (2); 500 (1,2);

g) ohutkerroskromatografiassa, levyllä Merck 60 F 254, R_f -arvo 0,41 metyleenikloridi:metanolissa, suhteessa 95:1, ja R_f -arvo 0,63 metyleenikloridi:metanolissa, suhteessa 9:1.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa käyminen suoritetaan lämpötilassa, joka on välillä 26-30°C.
 15

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa käyminen suoritetaan pH-arvossa 6,0 - 8,5.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa antibioottinen aktiviteetti käymisen lopussa otetaan talteen uuttamalla käymisliemet orgaanisella liuottimella, joka on alempialkanoli, halogeenialempialkaani, alempialkyyliesteri tai alempialkyyliketoni.
 20

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa antibioottinen aktiviteetti käymisen lopussa otetaan talteen, sen jälkeen kun suodoksen pH on säädetty arvoon 3,5 - 8,5, uuttamalla käymisliemet orgaanisella liuottimella, joka on alempialkanoli, halogeenialempialkaani, alempialkyyliesteri tai alempialkyyliketoni.
 25

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa antibioottinen aktiviteetti käymisen lopussa otetaan talteen, sen jälkeen kun suodoksen pH on säädetty arvoon 6,0 - 7,5,
 30

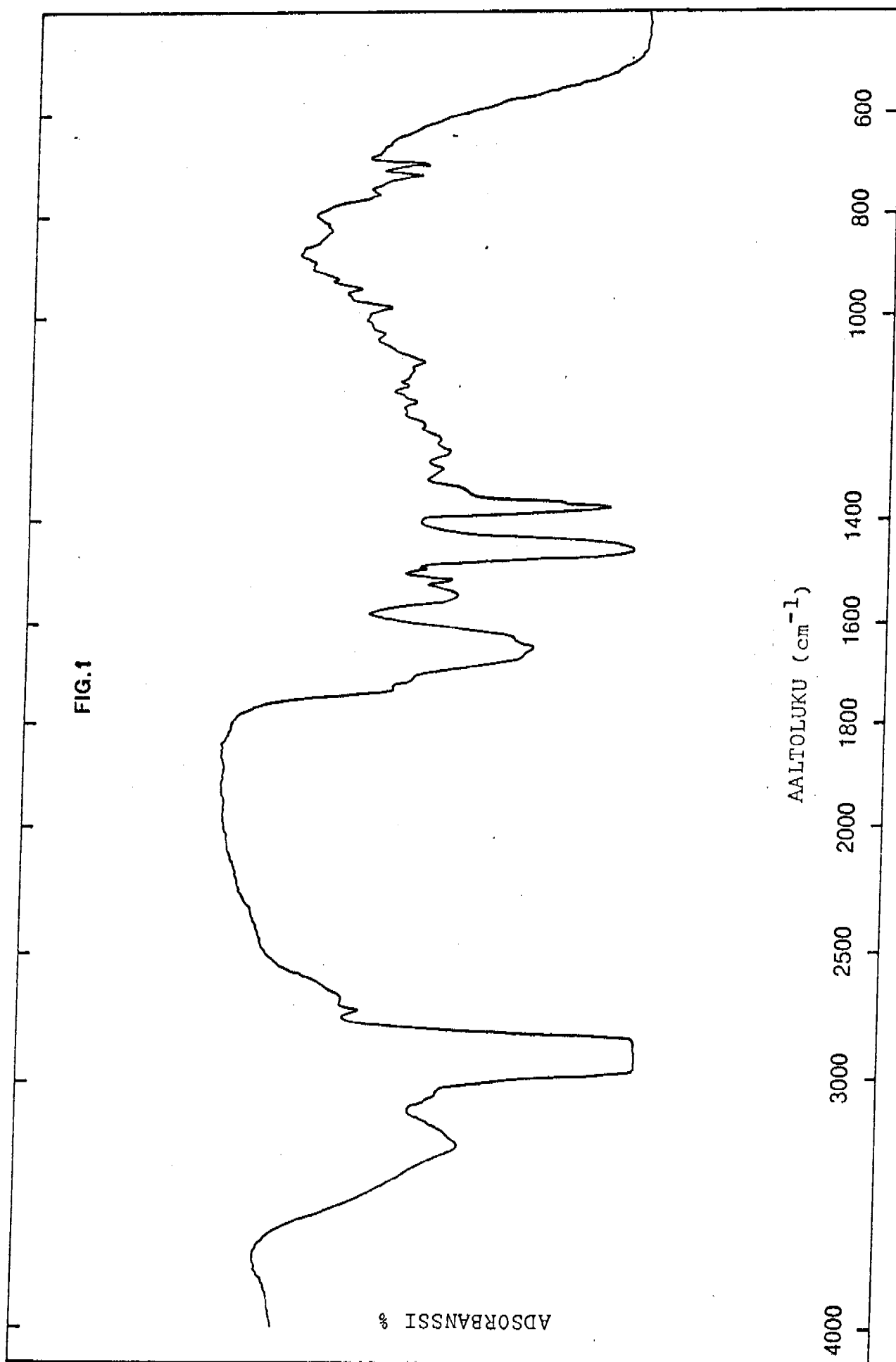
uuttamalla käymisliemet orgaanisella liuottimella, joka on alempialkanoli, halogeenialempialkaani, alempialkyyliesteri tai alempialkyyliketoni.

5 7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa antibioottinen aktiviteetti käymisen lopussa otetaan talteen uuttamalla käymisliemet etyyliasetaatilla.

10 8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jolle edelleen on tunnusomaista, että antibiootit M 9026 tekijä 2 ja tekijä 3 eristetään erikseen käyttäen tavanomaisia kromatografisia menetelmiä.

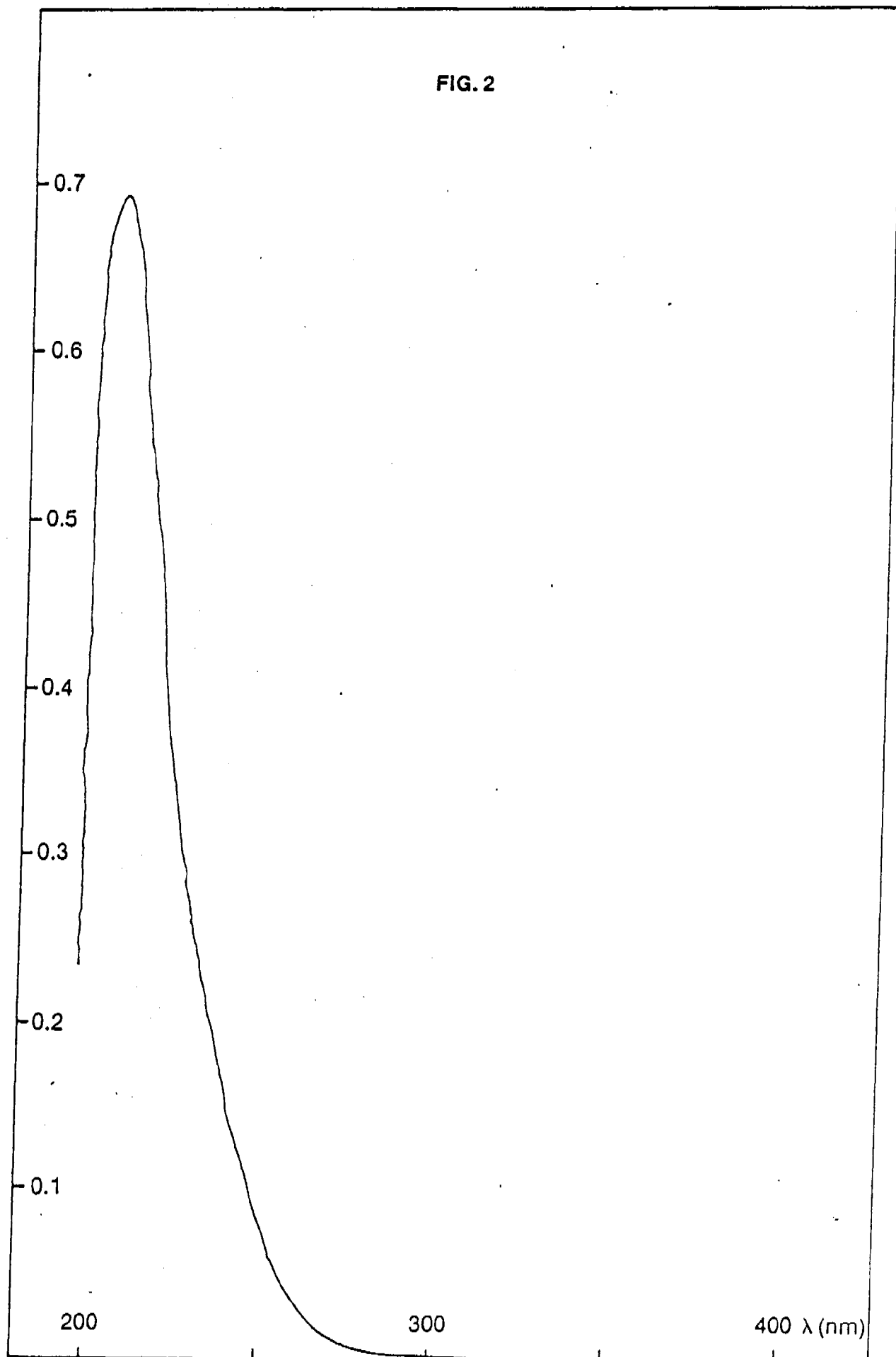
15 9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jolle edelleen on tunnusomaista, että antibiootti M 9026 tekijä 2 tai tekijä 3 eristetään pylväskromatografisesti käyttäen piihappogeelipylvästä ja eluointiseosta, jossa on metyleenikloridi:metanolia, suhteessa 9:1.

20 10. Mikro-organismin Micromonospora sp. 15,118 puhdas viljelmä, joka pystyy tuottamaan antibioottia M 9026 talteenotettavassa määrin aerobisissa käymisolosuhteissa, vesipitoisessa ravintoväliaineessa, joka sisältää assimiloituvat hiili- ja typpilähteet sekä epäorgaanisia suoloja.

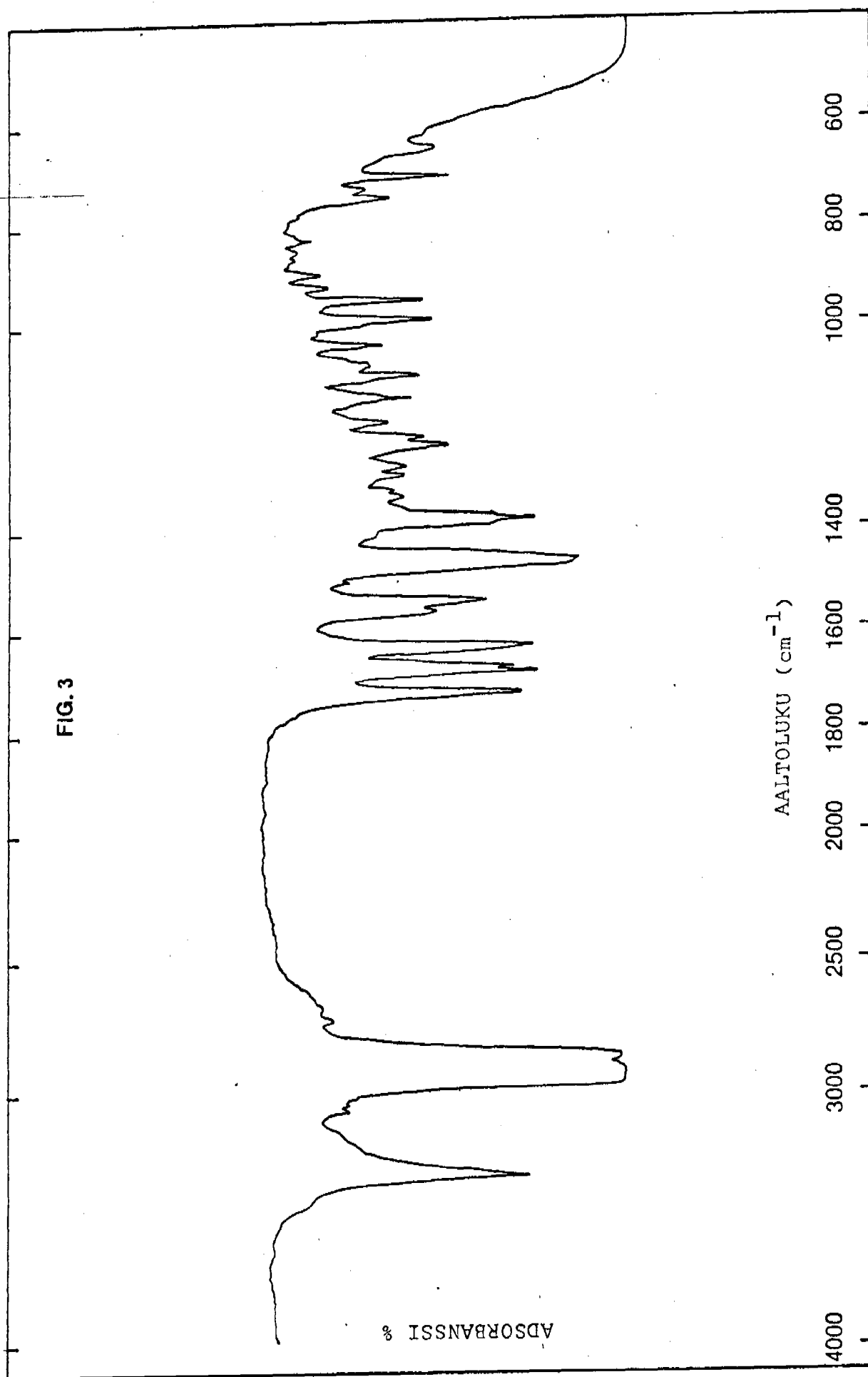


Gruppo Lebelit SpA

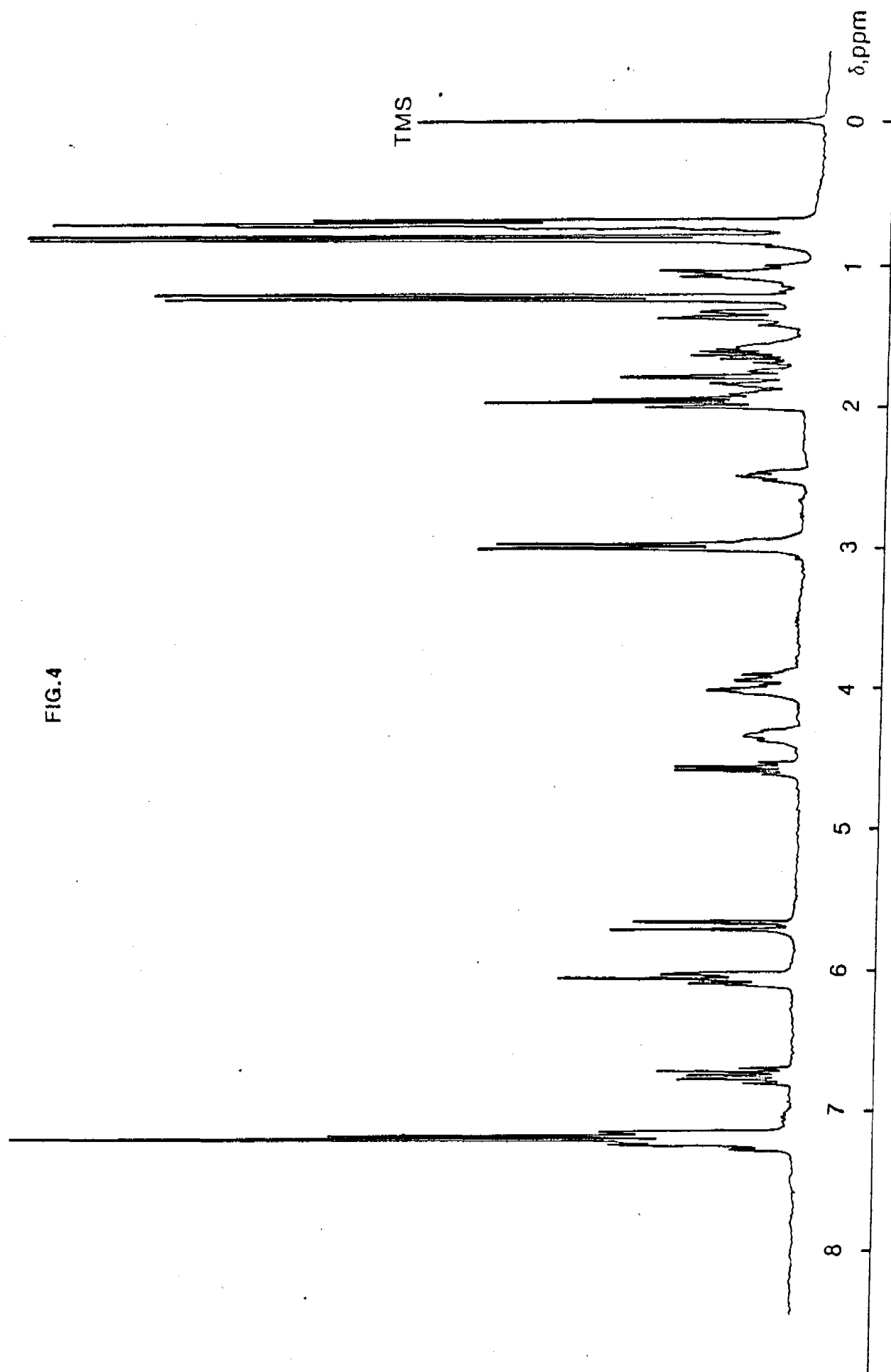
FIG. 2



Gruppe Lepidif. Sp. A.

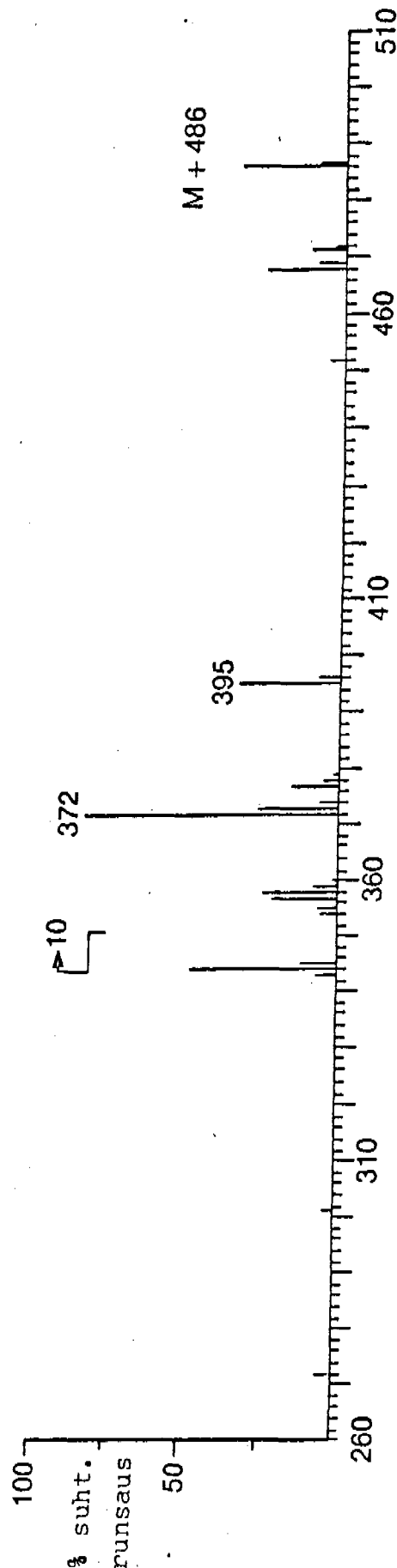
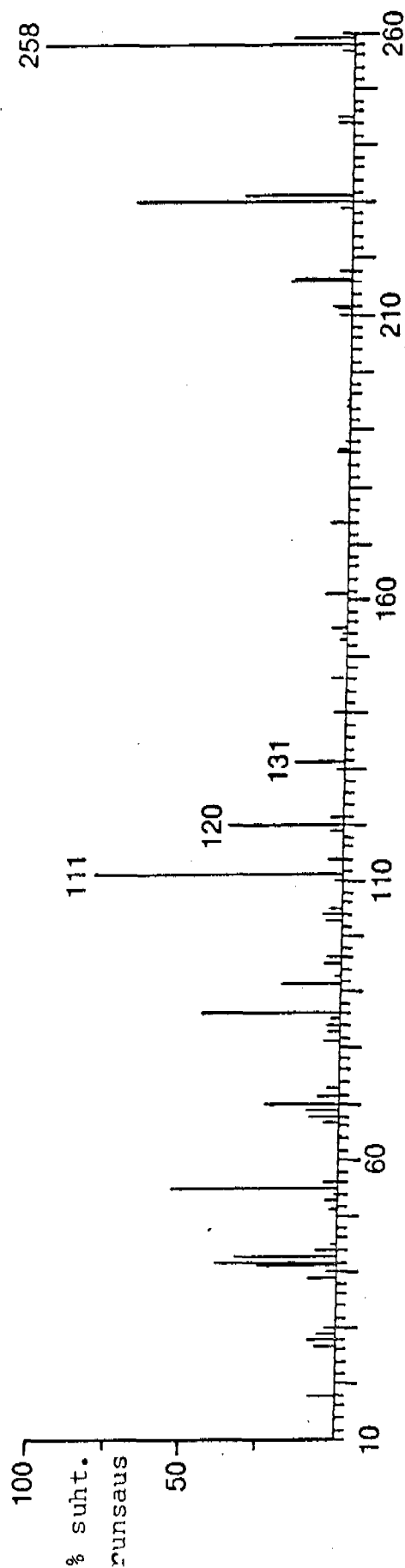


Gruppo Lepetit SpA



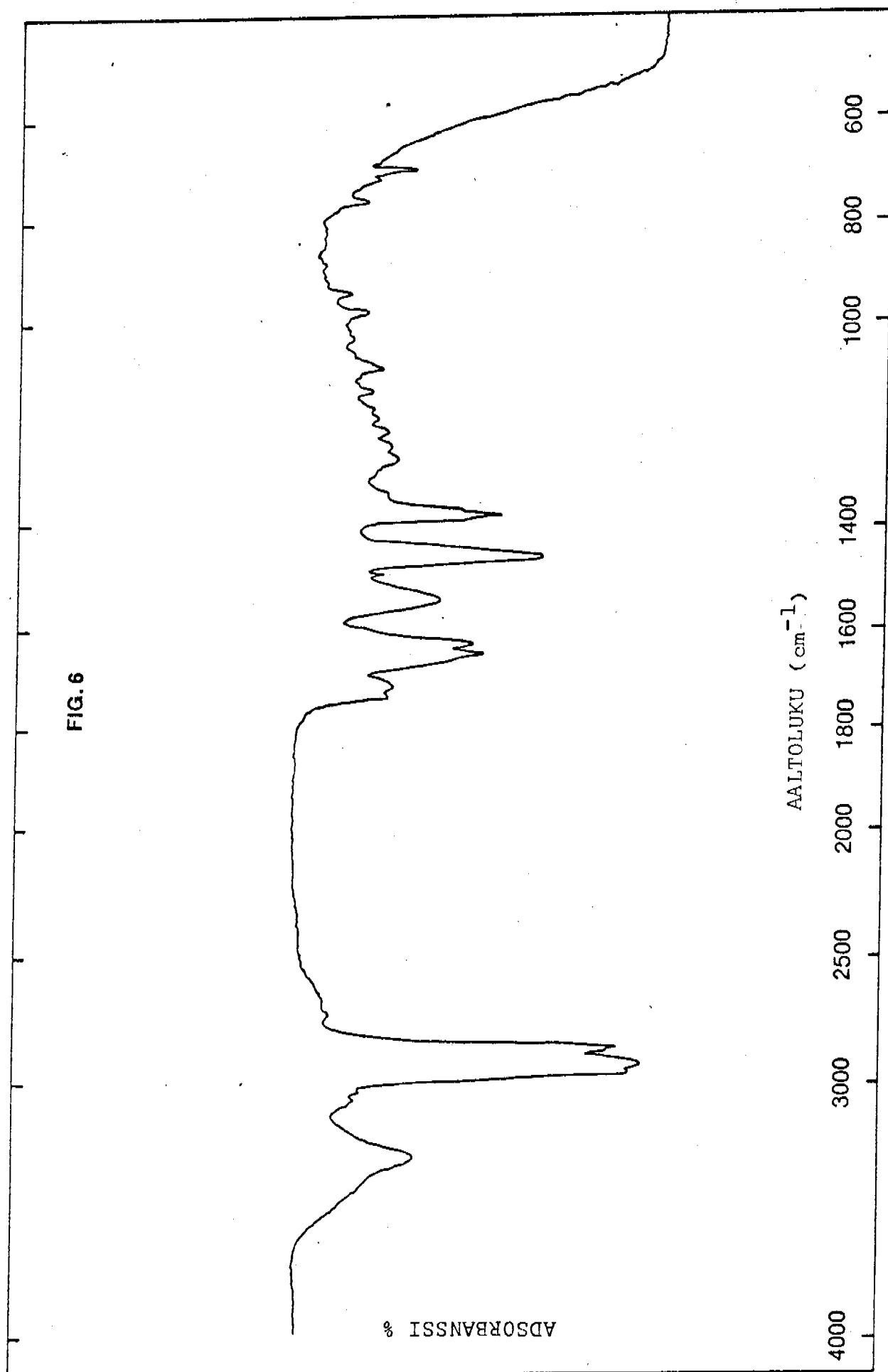
Gruppo Lepetit S.p.A.

FIG. 5



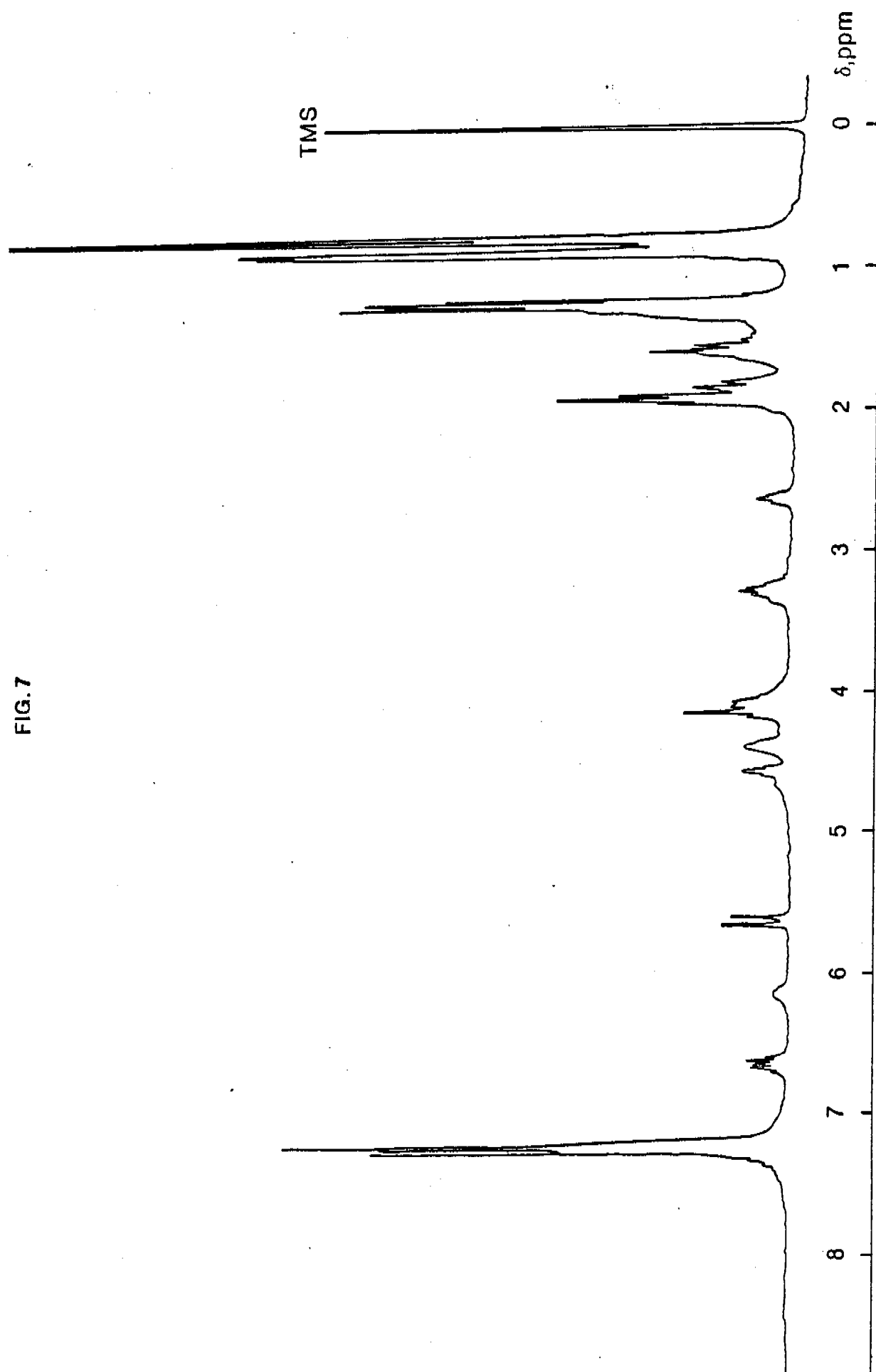
(m/e) atomimassayksikkö

Gruppen 1 opetit Spä



Gruppo Lepetit SpA

FIG. 7



Gruppo Lepetit SpA

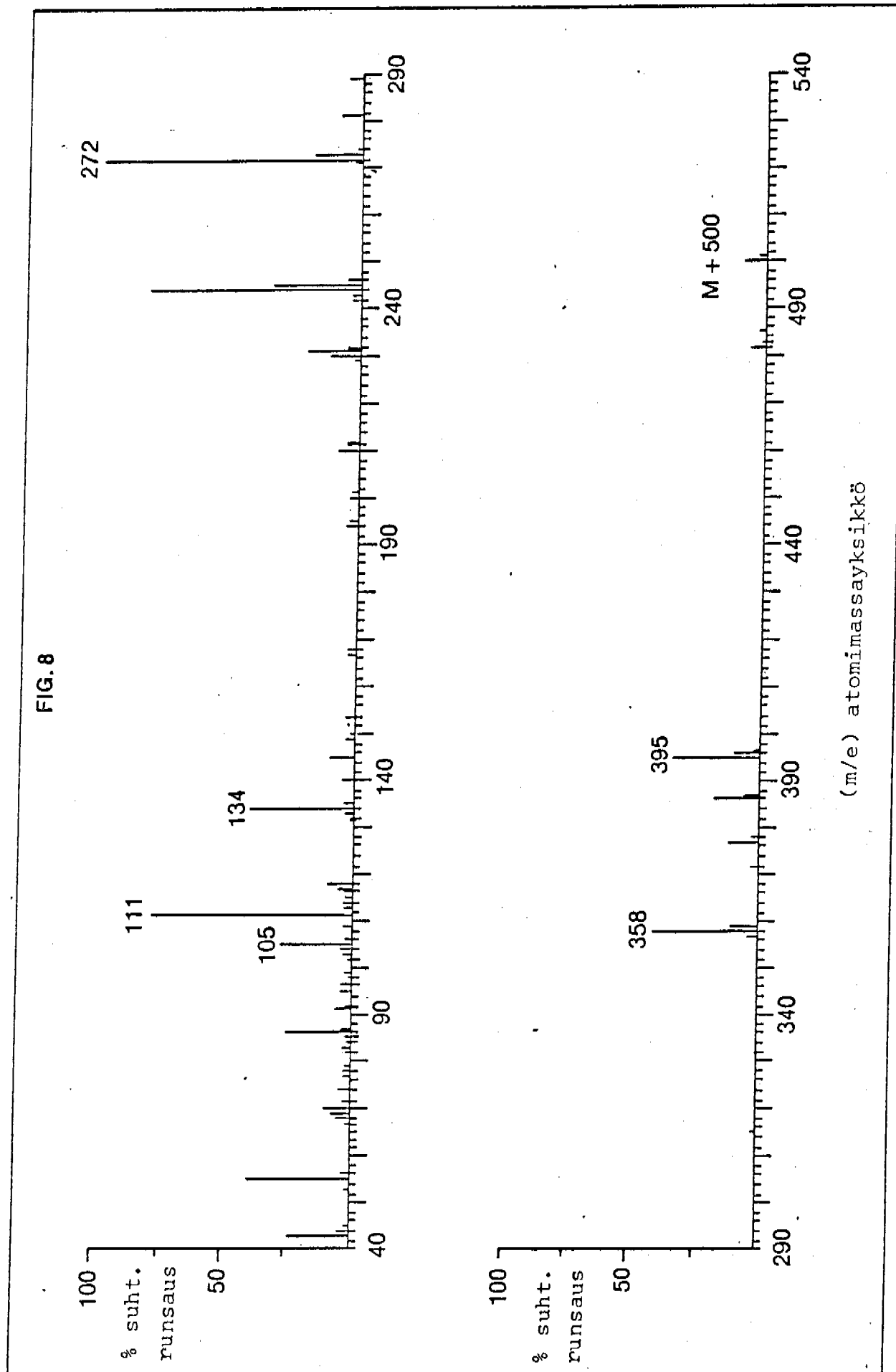
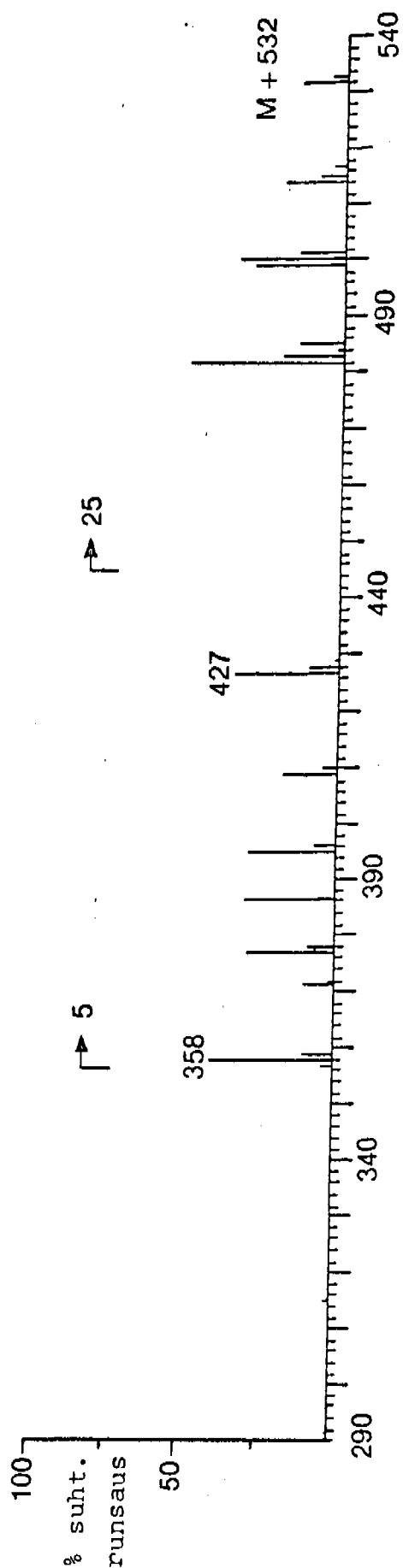
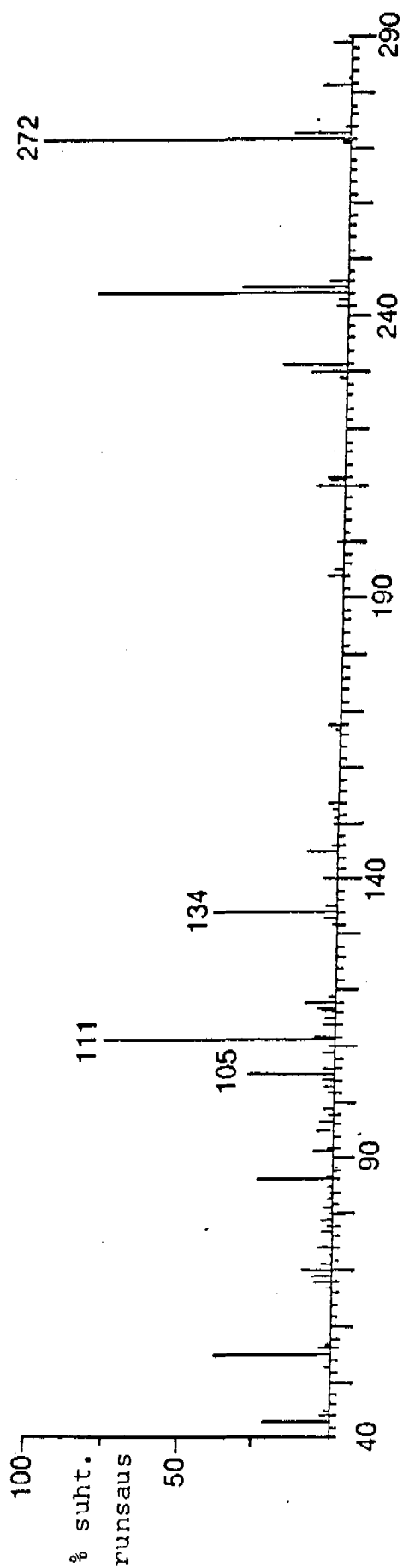
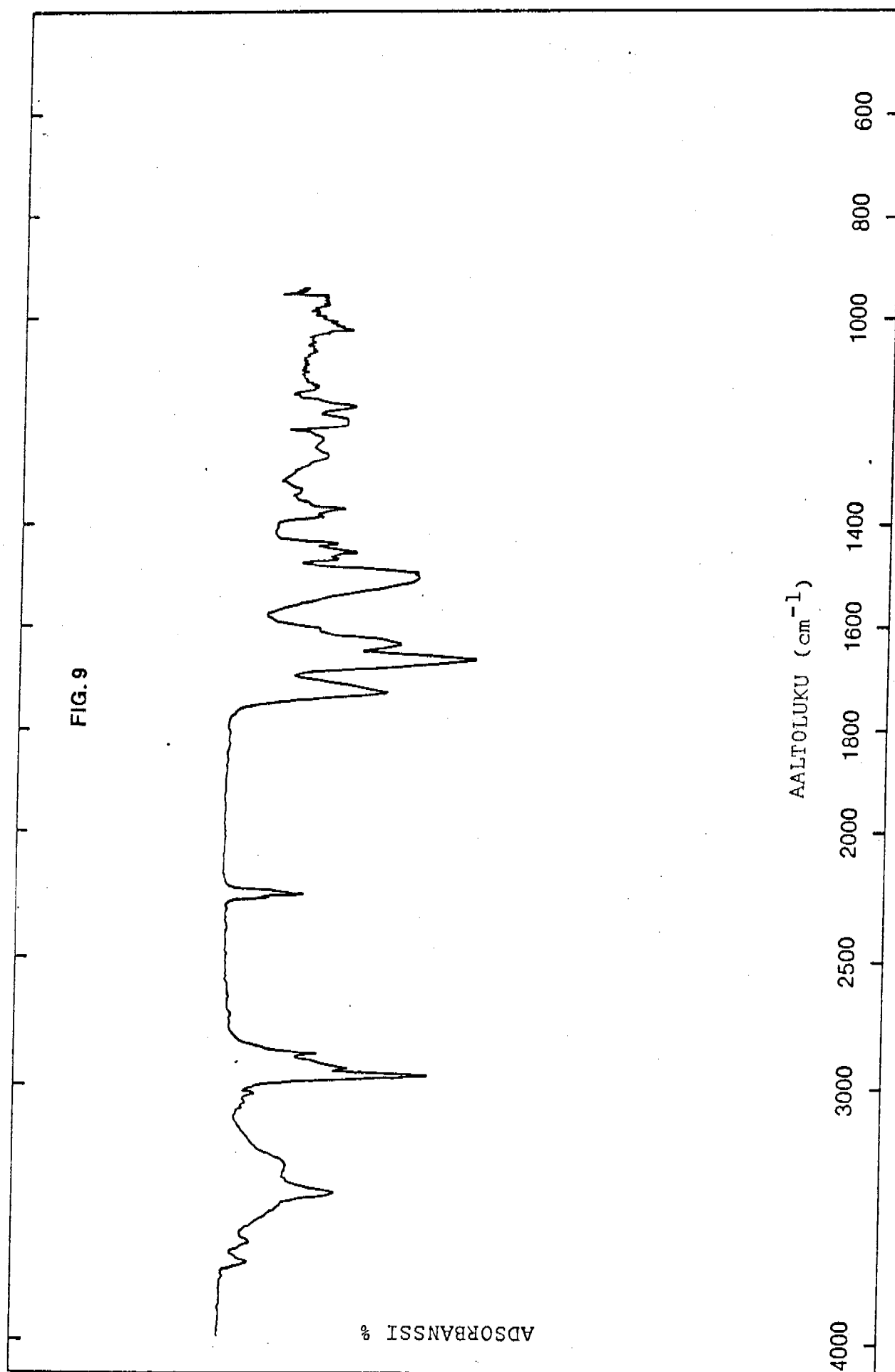


FIG. 8a



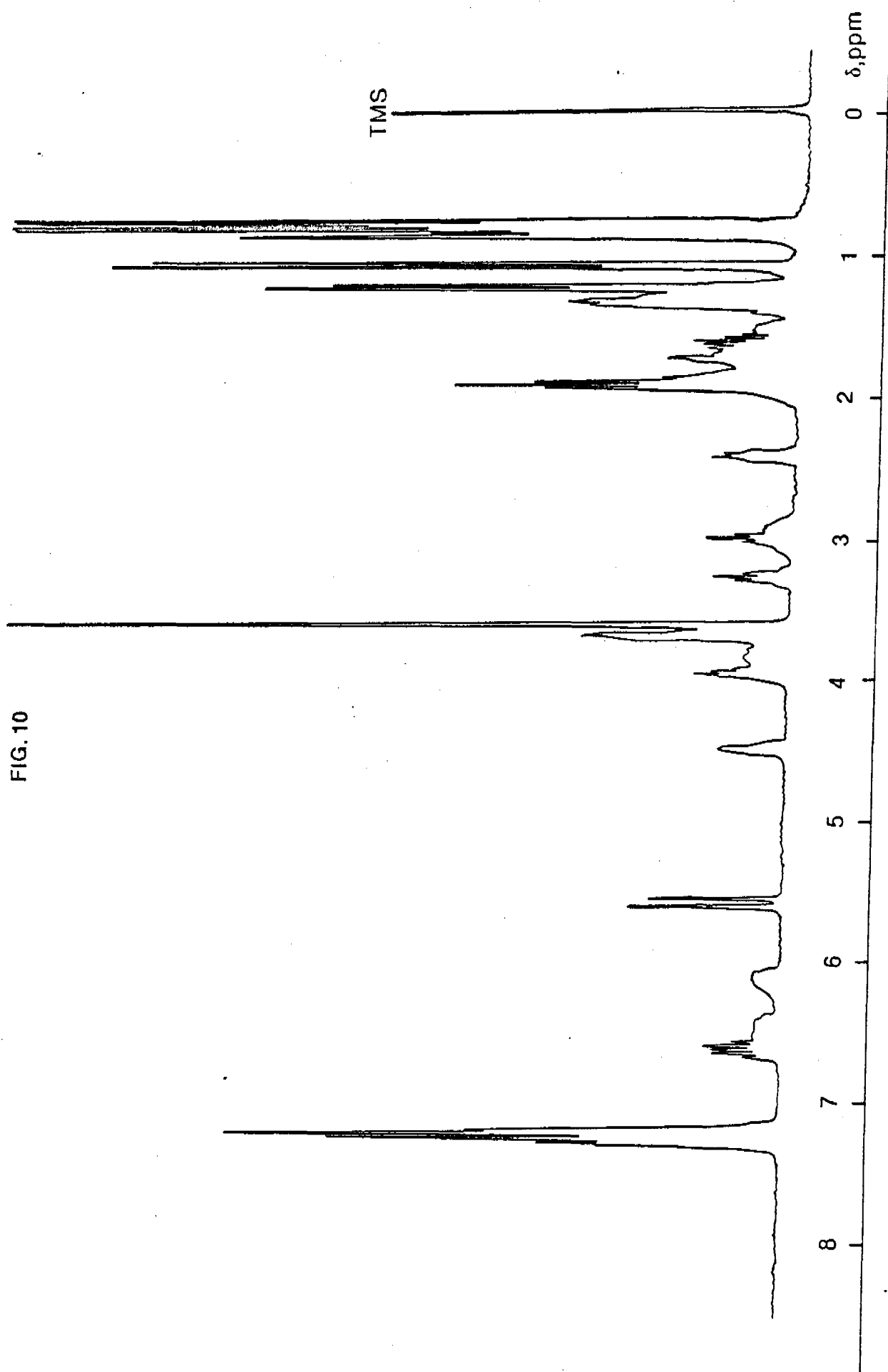
(m/e) atomimassayksikkö

Gruppe Hepatitis A



Gruppo Lepetit Sp.A

FIG. 10



Gruppo Lepetit SpA

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökning

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggnings- och patentskrifter:

FI P 43421 (C12 d 9/14), P 43422 (C12 d 9/14),
P 46519 (C12 d 9/14), P 65082 (C12 P 1/06)

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

29/12-87

Jouko Ikonen

Allekirjoitus