



**NORGE**

(19) [NO]

STYRET FOR DET  
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) № 159104

(51) Int. Cl.<sup>4</sup> C 12 P 1/06, C 07 G 11/00

(21) Patentsøknad nr. **831754**

(22) Inngivelsesdag 16.05.83

(24) Lopedag 16.05.83

(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(71)(73) Søker/Patenthaver **GRUPPO LEPETIT S.P.A.**,  
Via Durando 38,  
Milano, Italia.

(86) Internasjonal søknad nr. -

(86) Internasjonal inngivelsesdag -

(85) Videreføringssdag -

(41) Alment tilgjengelig fra 09.12.83

(44) Utlegningsdag 22.08.88

(72) Oppfinner **ANGELO BORGHI**, Milano,  
**ROSA PALLANZA**, Milano,  
**CAROLINA CORONELLI**, Milano,  
**GIOVANNI CASSANI**, Pavia, Italia.

(74) Fullmektig Siv.ing. Lars Brevig,  
Bryns Patentkontor A/S, Oslo.

(30) Prioritet begjært 08.06.82, GB, nr. 8216590.

(54) Oppfinnelsens benevnelse **FREMANGSMÅTE FOR FREMSTILLING AV RENE TEICHOMYCIN  
A<sub>2</sub> ENKELTFAKTORER 1, 2, 3, 4, og 5.**

(57) Sammendrag Foreliggende oppfinnelse angår en individuell anti-biotisk forbindelse valgt fra gruppen bestående av teichomycin A<sub>2</sub> faktor 1, teichomycin A<sub>2</sub> faktor 2, teichomycin A<sub>2</sub> faktor 3, teichomycin A<sub>2</sub> faktor 4 og teichomycin A<sub>2</sub> faktor 5 i en ialt vesentlig ren form, samt en fremgangsmåte for fremstilling av disse ved at de innvinnes fra teichomycin A<sub>2</sub>, som er en kjent antibiotisk forbindelse, ved hjelp av høyeffektive kromatografiske metoder.

De enkelte rene forbindelsene teichomycin A<sub>2</sub> faktor 1, teichomycin A<sub>2</sub> faktor 2, teichomycin A<sub>2</sub> faktor 3, teichomycin A<sub>2</sub> faktor 4 og teichomycin A<sub>2</sub> faktor 5 er biologisk skillbare fra teichomycin A<sub>2</sub> ved at de har en høyere grad av antibiotisk aktivitet overfor mikroorganismer som er følsomme for slike forbindelser.

(56) Anførte publikasjoner Ingen.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstilling av et individuelt antibiotikum valgt fra gruppen bestående av teichomycin A<sub>2</sub> faktor 1, teichomycin A<sub>2</sub> faktor 2, teichomycin A<sub>2</sub> faktor 3, teichomycin A<sub>2</sub> faktor 4 og  
5 teichomycin A<sub>2</sub> faktor 5 i en i alt vesentlig ren form.

Teichomycin A<sub>2</sub> er et av flere forskjellige antibiotikum som oppnås når man dyrker rasen *Actinoplanes Teichomyceticus* nov.sp. ATCC 31121 i et kulturmedium som inneholder assimilerbare kilder for karbon, nitrogen og uorganiske salter  
10 (se belgisk patent nr. 839.259). Ifølge den fremgangsmåte som er beskrevet i ovennevnte patent innvinnes man en antibiotisk blanding inneholdende teichomycin A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> og A<sub>3</sub> fra det utskilte fermenteringsmediet ved at man ekstraherer  
15 dette med et egnet organisk oppløsningsmiddel som er ublandbart med vann, og deretter foretar en utfelling fra det ekstraherende oppløsningsmiddel ved hjelp av kjente fremgangsmåter. Teichomycin A<sub>2</sub> kan så utskilles fra den antibiotiske blandingen ved hjelp av kolonnekromatografi på  
20 Sephadex<sup>®</sup>. Etter at teichomycin A<sub>2</sub> er ytterligere rensset ved at det er ført gjennom en sulfonert polystyren harpiks, kan det så karakteriseres ved en rekke forskjellige kjemiske-fysikalske parametere såsom R<sub>f</sub>-verdier på forskjellige sett av papir og tynnsjikt-kromatografiske systemer hvor forbindelsen opptrer som et virkelig enhetlig produkt.  
25

Man har nå uventet funnet at teichomycin A<sub>2</sub> i virkeligheten består av en blanding av flere samfremstilte nærstående antibiotiske forbindelser, og disse hovedfaktorene er blitt  
30 betegnet teichomycin A<sub>2</sub> faktor 1, faktor 2, faktor 3, faktor 4 og faktor 5. Man har funnet at disse rene enkeltfaktorene er biologisk skillbare fra teichomycin A<sub>2</sub>-komplekset ved at de har en høyere grad av antibiotisk aktivitet overfor en rekke forskjellige mikroorganismer.

35

Ifølge foreliggende oppfinnelse er det således tilveiebragt en fremgangsmåte for fremstilling av en i alt vesentlig ren individuell antibiotisk forbindelse valgt fra gruppen

bestående av Teichomycin A<sub>2</sub> faktor 1, Teichomycin A<sub>2</sub> faktor, Teichomycin A<sub>2</sub> faktor 3, Teichomycin A<sub>2</sub> faktor 4 og Teichomycin A<sub>2</sub> faktor 5, med de i det nedenstående angitte kjemisk-fysikalske egenskaper, og deres farmasøytisk  
5 akseptable salter, og denne fremgangsmåten er kjenne-  
tegnet ved at man separerer Teichomycin A<sub>2</sub> i enkeltfaktorer ved revers fasefordelingskromatografi under anvendelse av en silanert silisiumdioksydgelkolonne og en gradient-  
10 eluering med acetonitril i fortynnet ammoniumformiat som elueringsmiddel, eller utfører nevnte separering ved ione-  
bytterkromatografi, og eventuelt omdanner de således opp-  
nådde forbindelser til deres tilsvarende farmasøytisk akseptable salter.

15 Betegnelsene "Teichomycin A<sub>2</sub>", "Teichomycin A<sub>2</sub>-kompleks" eller "antibiotika-kompleks" slik det brukes i foreliggende sammenheng, refererer seg til den blanding som inneholder de ovennevnte fem samproduserte antibiotiske faktorer som kan oppnås f.eks. slik som beskrevet i belgisk patent  
20 839.259, og som der er betegnet Teichomycin A<sub>2</sub>.

Separasjon av komplekset i de rene enkeltfaktorer kan oppnås ved reversert fasefordeling eller ioneutbytterkromatografi. I førstnevnte tilfeller kan man hensiktsmessig bruke inakti-  
25 vert silisiumdioksydgel som kolonnepakking, og som eluerings-  
middel kan man bruke en gradienteluering av acetonitril/  
vandig ammoniumformiat, mens man i sistnevnte tilfeller bruker en anionutbytter av en svak geltype som den stasjonære fase og vandig buffere eller blandinger av vandige  
30 buffere og ikke-vandige oppløsningsmidler som eluerings-  
systemer. Spesielt oppnår man optimale separasjons-  
resultater ved å føre en oppløsning av Teichomycin A<sub>2</sub> oppløst i en blanding av fortynnet vandig ammoniumformiat og acetonitril gjennom en silanisert silisiumdioksydgelkolonne  
35 og utvikle denne med en gradienteluering i samme oppløsnings-  
middelsystem. Man oppnår også gode resultater ved å bruke dietyl aminoetyl derivatet av agarose som den stasjonære fasen og utføre separasjonen ved en progressiv eluering med

bufferoppløsninger eller blandinger av bufferoppløsninger og ikke-vandige, vannblandbare oppløsningsmidler.

- 5 Selve separasjonen kontrolleres ved hjelp av høytrykks-  
væskerkromatografi. Fraksjoner med tilsvarende høytrykks-  
væskerkromatografiprofil kombineres, og hvis det er ønskelig,  
kan de ytterligere renses ved preparativ høytrykksvæske-  
kromatografi, og deretter avsaltes. Fra disse oppløsninger  
10 kan de enkelte faktorer så utvinnes ved å fordampe de  
organiske oppløsningsmidler, fjerning av vann til et mindre  
volum og tilsette et overskudd av et organisk oppløsnings-  
middel hvor forbindelsene ikke er oppløselige, hvorved man  
får utfelt de fremstilte produkter.
- 15 Det følgende spesifikke eksempel er gitt for bedre å illu-  
strere den foreliggende fremgangsmåte.

Separasjon av Teichomycin A<sub>2</sub> faktorene 1, 2, 3, 4 og 5

- 20 10 g Teichomycin A<sub>2</sub>-kompleks fremstilt ved hjelp av den  
fremgangsmåte som er beskrevet i belgisk patent 839.259  
ble oppløst i 1 liter av en 0,2% ammoniumformiat-acetonitril  
(9:1)-blanding og justert til pH 7,5 med 1N NaOH. Denne  
25 oppløsningen ble ført gjennom en kolonne som inneholdt  
500 g silanisert silisiumdioksydgel 60 (Merck).

- 30 Kolonnen ble så eluert med en lineær gradient fra 10-20%  
acetonitril i en 0,2% ammoniumformiatoppløsning i et totalt  
volum på 10 liter.

Fraksjoner på ca. 20 ml ble oppsamlet og kontrollert ved  
hjelp av høytrykksvæskerkromatografi.

- 35 I den følgende tabell I er det angitt oppholdstidene ( $t_R$ )  
for Teichomycin A<sub>2</sub> faktorene 1, 2, 3, 4 og 5 i en represen-  
tativ høytrykksvæskerkromatografiseparasjon (drifts-  
betingelsene er angitt under tabellen):

159104

4

TABELL I

|   | Teichomycin A <sub>2</sub> faktor | Oppholdstid<br>i min. |
|---|-----------------------------------|-----------------------|
|   | 1                                 | 21,2                  |
| 5 | 2                                 | 22,6                  |
|   | 3                                 | 23,3                  |
|   | 4                                 | 25,8                  |
|   | 5                                 | 26,4                  |

3,5-dihydroksytoluen  
(indre standard) 8,84

10

Kolonne: 5µ "Zorbax" ODS (Du Pont)

Mobil fase: Lineær gradient fra 0%B til 50%B i A i løpet  
av 40 minutter.

- 15 A) 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> | acetonitril (9:1) bufferet  
til pH 6,0 med 0,1N NaOH  
B) 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> | Acetonitril (3:7) bufferet  
til pH 6,0 med 0,1N NaOH

Strøm: 2 ml/min.

Detektor: U.V. fotometer ved 254 nanometer.

20

- Fraksjoner med tilsvarende høytrykksvæskerkromatografiprofil  
ble slått sammen og det organiske oppløsningsmiddel fordampet  
under redusert trykk. De vandige oppløsninger ble ført  
gjennom en kolonne inneholdende 10 g silanert silisium-  
25 dioksydgel (60) (Merck). Kolonnen ble vasket med destillert  
vann for å eliminere ammoniumformiatet, hvorefter kolonnen  
ble eluert med 50% vandig acetonitril.

- 30 Eluatet ble konsentrert til et lite volum ved å tilsette  
butanol som letter fordampingen av vannet, og produktet  
så utfelt med en blanding av aceton-etyleter (1:1). Ren  
teichomycin A<sub>2</sub> faktor 1 (410 mg) og faktor 2 (770 mg) ble  
oppnådd ved hjelp av ovennevnte fremgangsmåte.

- 35 Teichomycin A<sub>2</sub> faktor 3 som en 1:1-blanding med teichomycin  
A<sub>2</sub> faktor 2 ble så ytterligere rensset ved høytrykksvæske-  
kromatografi på en semipreparativ kolonne ved hjelp av  
følgende driftsbetingelser.

Kolonne: "Whatman Partisil" ODS M 9 10/50

Mobil fase: 0,2% ammoniumformat i H<sub>2</sub>O/acetonitril  
(76:24)

Strøm: 4,5 ml/min.

5 Detektor: U.V. fotometer ved 254 nm

Belastning: 20 mg

Også i dette tilfellet ble rensingen kontrollert ved at hver fraksjon ble undersøkt ved høytrykksvæskerkromatografi.

10

Fraksjoner inneholdende ren teichomycin A<sub>2</sub> faktor 2 så vel som fraksjoner inneholdende ren teichomycin A<sub>2</sub> faktor 3 ble slått sammen, avsaltet og utfelt som beskrevet tidligere (utbytte 510 mg teichomycin A<sub>2</sub> faktor 2 og 520 mg teichomycin A<sub>2</sub> faktor 3).

15

Fraksjoner inneholdende faktorene 4 og 5 i et 1:1-forhold (ca. 500 mg) fra første kolonne ble slått sammen med et ytterligere utbytte av fraksjoner inneholdende en blanding av faktorene 4 og 5 (ca. 490 mg) fremstilt på samme måten fra en annen parallell separasjon, og disse ble skilt ved semipreparativ høytrykksvæskerkromatografi ved hjelp av samme betingelser som angitt ovenfor for teichomycin A<sub>2</sub> faktor 3. Utbyttet var 350 mg teichomycin A<sub>2</sub> faktor 4 og 300 mg teichomycin A<sub>2</sub> faktor 5.

20

25

Kjemisk-fysikalske egenskaper for rene enkeltfaktorer av teichomycin A<sub>2</sub>

Teichomycin A<sub>2</sub> faktor 1 er et hvitt amorft pulver som ved oppvarming begynner å mørkne ved ca. 220°C og er fullstendig dekomponert ved 255°C. Det har følgende egenskaper:

30

a) Det er fritt oppløselige i vann ved pH over 7,0 eller ved pH mindre enn 2, i dimetylformamid, dimetylsulfoksyd og propylenglykol;

35

Det er svakt oppløselig i metylcellosolve og glycerol; Dårlig oppløselig i metanol og etanol, nesten uoppløselig i kloroform, benzen, n-heksan, acetonitril, etyleter, aceton, etylacetat, karbontetraklorid.

- b) har et ultrafiolett absorpsjonsspektrum som er angitt på fig. 1 på de vedlagte tegninger, som har følgende absorpsjonsmaksima:
- i 0,1N saltsyre:  
5  $\lambda_{\text{maks}} \quad 278 \text{ nm} \quad (E_{\text{lcm}}^{1\%} = 49,5)$
  - i fosfatpuffer pH 7,4:  
 $\lambda_{\text{maks}} \quad 278 \text{ nm} \quad (E_{\text{lcm}}^{1\%} = 50,0)$
  - i 0,1N natriumhydroksyd:  
10  $\lambda_{\text{maks}} \quad 297 \text{ nm} \quad (E_{\text{lcm}}^{1\%} = 72,1)$
- c) har et infrarødt absorpsjonsspektrum i nujol som er vist på fig 2 på de medfølgende tegninger, med følgende absorpsjonsmaksima: 3700-3100, 2960-2840 (nujol), 1645, 1590,  
15 1510, 1460 (nujol), 1375 (nujol), 1305, 1230, 1180, 1155, 1060, 1025, 970, 890, 845, 815, 720 (nujol);
- d) har en elementæranalyse etter at en prøve er blitt tørket ved ca.  $140^{\circ}\text{C}$  under en inert atmosfære (%  $\Delta$  vann =  
20 8,5) som indikerte følgende omtrentlige prosentvise sammensetning (middel): karbon 56,70%, hydrogen 4,90%, nitrogen 6,65%, klor 3,80%, oksygen (ved forskjell) 27,95%.
- 25 e) har en oppholdstid ( $t_R$ ) på 21,2 minutter ved analyse ved en reversert fase høytrykksvæskeskromatografi når man bruker en  $5\mu$  "Zorbax" ODS-kolonne og eluerer denne med en lineær gradient fra 0-50% oppløsning av B i oppløsning A i løpet av 40 minutter (oppløsning A: 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /  
30 acetonitril (9/1) bufferet til pH 6,0 med 0,1N NaOH; oppløsning B: 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /acetonitril (3/7) bufferet til pH 6,0 med 0,1N NaOH), ved en strømhastighet på 2 ml/min. (indre standard: 3,5-dihydroksty-toluen  $t_R$  8,84 minutter).
- 35 f) har de følgende grupper av signaler i et 270 MHz  $^1\text{H}$  NMR-spektrum (hele spekteret er vist på fig. 3 på de vedlagte tegninger) registrert i  $\text{DMSO}-d_6$  med tilsetning av et par

dråper  $D_2O$  (kons. 25 mg/0,5 ml) (TMS som indre standard:  
 $\delta = 0,00$  ppm): 0,8-1,5(m), 1,7-2,3 (m), 2,7-4,0 (m),  
4,0-4,7 (m), 4,8-5,8 (m), 6,2-8,1 (m).

- 5 g) har en syrefunksjon som er i stand til å danne salter;
- h) har en saltbar basisk funksjon;
- i) har en molekylvekt på ca. 1875 slik dette kunne bestemmes  
10 ved en massespektrometrisk analyse, idet man brukte en  
rask atombombardering (FAB) som ionekilde (for presenta-  
sjon av FAB-massespektrometri, se f.eks. M. Barber et al.  
Nature, 293, 5830, 270-275 (1981)).
- 15 Teichomycin  $A_2$  faktor 2 er et hvitt amorft pulver som begyn-  
ner å mørkne når det oppvarmes ved ca.  $210^\circ C$  og er fullsten-  
dig dekomponert ved  $250^\circ C$ , og som har følgende egenskaper:
- a) er fritt oppløselig i vann ved pH over 7,0 eller ved pH  
20 lavere enn 2 i dimetylformamid, dimetylsulfoksyd og propylen-  
glykol;  
svakt oppløselig i metylcellosolve og glycerol;  
dårlig oppløselig i metanol og etanol;  
nesten uoppløselig i kloroform, benzen, n-heksan, aceto-  
25 nitril, etyleter, aceton, etylacetat og karbontetraklorid.
- b) har et ultrafiolett absorpsjonsspektrum som er gitt på  
fig. 4 på de vedlagte tegninger som har følgende absorp-  
sjonsmaksima:
- 30 - i 0,1N saltsyre:  
 $\lambda_{maks} \quad 278 \text{ nm} \quad (E_{lcm}^{1\%} = 48)$
- i fosfatbuffer pH 7,4:  
 $\lambda_{maks} \quad 278 \text{ nm} \quad (E_{lcm}^{1\%} = 49,0)$
- 35 - i 0,1N natriumhydroksyd:  
 $\lambda_{maks} \quad 297 \text{ nm} \quad (E_{lcm}^{1\%} = 70,0)$



- c) har et infrarødt absorpsjonsspektrum i nujol vist på fig. 5 på de medfølgende tegninger, med følgende observerbare absorpsjonsmaksima: 3700-3100, 2960-2860 (nujol), 1645, 1590, 1510, 1460 (nujol), 1375 (nujol), 1300, 1260, 1230, 1180, 1150, 1060, 1025, 970, 890, 845, 815, 720 (nujol).
- d) har en elementæranalyse etter at en prøve er blitt tørket ved 140°C under en inert atmosfære (%  $\Delta$  vann = 9,8), som indikerer følgende otmrentlige prosentvise sammensetning (middel): karbon 56,15%, hydrogen 5,15%, nitrogen 6,30%, klor 3,90%, oksygen (ved forskjell) 28,50%.
- e) en oppholdstid ( $t_R$ ) på 22,6 minutter ved analyse ved hjelp av reversert fasehøytrykksvæskeskromatografi når man bruker en 5 $\mu$  "Zorbax" ODS-kolonne og eluerer denne med en lineær gradient fra 0-50% oppløsning B i oppløsning A i 40 minutter (oppløsning A: 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /acetonitril (9/1) bufferet til pH 6,0 med 0,1N NaOH  
oppløsning B: 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /acetonitril (3/7) bufferet til pH 6,0 med 0,1N NaOH) med en gjennomstrømningshastighet på 2 ml/min. (indre standard: 3,5-dihydroksytoluen  $t_R$  8,84 minutter).
- f) har følgende grupper av signaler i et 270 MHz  $^1\text{H}$  NMR-spektrum (hele spekteret er vist på fig. 6 på de vedlagte tegninger) registrert i  $\text{DMSO}-d_6$  med tilsetning av et par dråper  $\text{D}_2\text{O}$  (kons. 25 mg/0,5 ml) (TMS som indre standard  $\delta = 0,00$  ppm): 0,7-1,5 (m); 1,8-2,2 (m); 2,7-4,5 (m); 4,6-5,7 (m); 6,2-8,1 (m).
- g) har en syrefunksjon som er i stand til å danne salter.
- h) har en saltbar basisk funksjon.
- i) har en molekylvekt på ca. 1877 slik dette kunne bestemmes ved FAB-massespektrometri.

Teichomycin A<sub>2</sub> faktor 3 er et hvitt amorft pulver som ved oppvarming begynner å dekomponere ved 205°C og er fullstendig dekomponert ved 250°C, og som har følgende egenskaper:

5

a) Det er fritt oppløselig i vann ved pH over 7,0 eller ved pH lavere enn 2 i dimetylformamid, dimetylsulfoksyd og propylenglykol;  
svakt oppløselig i metylcellosolve og glycerol;  
dårlig oppløselig i metanol og etanol;  
nesten uoppløselig i kloroform, benzen, n-heksan, acetonitril, etyleter, aceton, etylacetat og karbontetraklorid.

10

b) har et ultrafiolett absorpsjonsspektrum som er gitt på fig. 7 på de vedlagte tegninger, som har følgende absorpsjonsmaksima:

15

- i 0,1N saltsyre:

$\lambda_{\text{maks}} 278 \text{ nm } (E_{1\text{cm}}^{1\%} = 49,2)$

20

- i fosfatbuffer pH 7,4:

$\lambda_{\text{maks}} 278 \text{ nm } (E_{1\text{cm}}^{1\%} = 50,8)$

- i 0,1N natriumhydroksyd:

$\lambda_{\text{maks}} 297 \text{ nm } (E_{1\text{cm}}^{1\%} = 72,7)$

25

c) har et infrarødt absorpsjonsspektrum i nujol som er vist på fig. 8 på de medfølgende tegninger, med følgende observerbare absorpsjonsmaksima: 3700-3100, 2960-2850 (nujol), 1645, 1590, 1510, 1460 (nujol), 1375 (nujol), 1300, 1230, 1180, 1150, 1120, 1060, 1030, 970, 890, 845, 820, 800, 720 (nujol).

30

d) har en elementæranalyse etter at prøvene er blitt tørket ved ca. 140°C under en inert atmosfære (% Δ vann = 12,0) som indikerer følgende omtrentlige prosentvise sammensetning (middel): karbon 56,26%, hydrogen 5,20%, nitrogen 6,69%, klor 3,95%, oksygen (ved forskjell) 27,90%.

35

e) har en oppholdstid ( $t_R$ ) på 23,3 minutter ved analyse ved

- en reversert fasehøytrykksvæskékromatografi når man bruker en 5  $\mu$  "Zorbax" ODS-kolonne og eluerer denne med en lineær gradient fra 0-50% oppløsning B i oppløsning A i løpet av 40 minutter (oppløsning A: 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /acetonitril (9/1) bufferet til pH 6,0 med 0,1 N NaOH, oppløsning B: 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /acetonitril (3/7) bufferet til pH 6,0 med 0,1N NaOH) og en strømhastighet på 2 ml/min. (indre standard: 3,5-dihydroxy-toluen  $t_R$  8,84 minutter).
- 10 f) har følgende grupper av signaler i et 270 MHz  $^1\text{H}$  NMR-spektrum (hele spekteret er vist på fig. 9 på de vedlagte tegninger) registrert i  $\text{DMSO}-d_6$  med tilsetning av et par dråper  $\text{D}_2\text{O}$  (kons. 25 mg/0,5 ml) (TMS som indre standard
- 15  $\delta = 0,00$  ppm): 0,7-1,5 (m): 1,8-2,0 (m), 2,7-4,5 (m), 4,6-5,7 (m), 6,2-8,0 (m).
- g) har en syrefunksjon som er i stand til å danne salter.
- 20 h) har en saltbar basisk funksjon.
- i) en molekylvekt på ca. 1877 slik dette kunne bestemmes ved FAB-massespektrometri.
- 25 Teichomycin  $\text{A}_2$  faktor 4 er et hvitt amorft pulver som ved oppvarming begynner å mørkne ved ca. 210°C og er fullstendig dekomponert ved 250°C, og har følgende egenskaper:
- 30 a) er fritt oppløselig i vann ved pH over 7,0 eller ved pH mindre enn 2 i dimetylformamid, dimetylsulfoksyd og propylenglykol;  
svakt oppløselig i metylcellosolve og glycerol;  
dårlig oppløselig i metanol og etanol,  
nesten uoppløselig i kloroform, benzen, n-heksan, acetonitril, etyleter, aceton, etylacetat og karbontetraklorid.
- 35 b) har et ultrafiolett absorpsjonsspektrum som er gitt på fig. 10 på de medfølgende tegninger, som har følgende absorp-

sjonsmaksima:

- i 0,1N saltsyre:

$\lambda_{\text{maks}}$  278 nm ( $E_{\text{lcm}}^{1\%} = 52,5$ )

- i fosfatbuffer pH 7,4:

$\lambda_{\text{maks}}$  278 nm ( $E_{\text{lcm}}^{1\%} = 52,5$ )

- i 0,1N natriumhydroksyd:

$\lambda_{\text{maks}}$  297 nm ( $E_{\text{lcm}}^{1\%} = 75,5$ )

c) har et infrarødt absorpsjonsspektrum i nujol som er vist på fig. 11 på de medfølgende tegninger, med følgende absorpsjonsmaksima: 3700-3100, 2960-2840 (nuhol), 1645, 1590, 1510, 1460 (nujol), 1375 (nujol), 1300, 1230, 1175, 1140, 1060, 1025, 970, 890, 840, 815, 720 (nujol),

d) har en elementæranalyse etter at en prøve på forhånd er blitt tørket ved ca. 140°C under en inert atmosfære (%  $\Delta$  vann = 9,8) som indikerer følgende omtrentlige prosentvise sammensetning (middel): karbon 56,50%, hydrogen 5,10%, nitrogen 6,50%, klor 3,80%, oksygen (ved forskjell) 28,10%.

e) har en oppholdstid,  $t_R$ , på 25,8 minutter ved analyse ved hjelp av reversert fasehøytrykksvæskeskromatografi når man bruker en 5 $\mu$  "Zorbax" ODS-kolonne og eluerer denne med lineærgradient fra 0-50% oppløsning B i oppløsning A i løpet av 40 minutter (oppløsning A: 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /acetonitril (9/1) bufferet ved pH 6,0 med 0,1N NaOH. oppløsning B: 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /acetonitril (3/7) bufferet til pH 6,0 med 0,1N NaOH) og med en strømhastighet på 2 ml/min. (indre standard: 3,5-dihydroksty-toluen,  $t_R$  8,84 minutter).

f) har en syrefunksjon som er i stand til å danne salter.

g) en saltbar basisk funksjon.

h) en molekylvekt på 1891 slik denne kunne måles ved FAB-massespektrometri.

Teichomycin A<sub>2</sub> faktor 5 er et hvitt amorft pulver som begynner å mørkne når det oppvarmes til 210°C og er fullstendig dekomponert ved 250°C, og som har følgende egenskaper:

- 5 a) Det er fritt oppløselig i vann ved pH over 7,0 eller ved pH lavere enn 2 i dimetylformamid, dimetylsulfoksyd og propylenglykol;  
svakt oppløselig i metylcellosolve og glycerol;  
dårlig oppløselig i metanol og etanol, og  
10 nesten oppløselig i kloroform, benzen, n-heksan, acetonitril, etyleter, aceton, etylacetat, karbontetraklorid.
- b) Det har et ultrafiolett absorpsjonsspektrum som er gitt på fig. 12 på de vedlagte tegninger, som har følgende  
15 absorpsjonsmaksima:  
- i 0,1N saltsyre:  
 $\lambda_{\text{maks}} 278 \text{ nm } (E_{1\text{cm}}^{1\%} = 49,6)$   
- i fosfatbuffer pH 7,4:  
20  $\lambda_{\text{maks}} 278 \text{ nm } (E_{1\text{cm}}^{1\%} = 51,8)$   
- i 0,1N natriumhydroksyd:  
 $\lambda_{\text{maks}} 297 \text{ nm } (E_{1\text{cm}}^{1\%} = 78,8)$
- c) har et infrarødt absorpsjonsspektrum i nujol som er vist  
25 på fig. 13 på de medfølgende tegninger, med følgende observerbare absorpsjonsmaksima: 3700-3100, 2960-2840 (nujol), 1645, 1590, 1510, 1460 (nujol), 1375 (nujol), 1300, 1230, 1175, 1145, 1060, 1025, 970, 890, 840, 815, 720 (nujol).
- 30 d) har en elementæranalyse etter at prøven er blitt tørket ved 140°C under en inert atmosfære (% Δ vann = 10,1) som indikerer følgende omtrentlige prosentvise sammensetning (middel): karbon 56,60%, hydrogen 5,05%, nitrogen 6,63%, klor 3,85%, oksygen (ved forskjell) 27,87%.
- 35 e) en oppholdstid ( $t_R$ ) på 26,4 minutter ved analyse ved en reversert høytrykksvæskeskromatografi når man bruker en 5 μ "Zorbax" ODS-kolonne og eluerer denne med en lineær

gradient fra 0-50% oppløsning B i oppløsning A i løpet av 40 minutter (oppløsning A: 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /acetonitril (9/1) bufferet i pH 6,0 med 0,1N NaOH, oppløsning B: 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  bufferet i pH 6,0 med 0,1N NaOH) ved en strømhastighet på 2 ml/min. (indre standard: 3,5-di-hydroksytoluen,  $t_R$ , 8,84 minutter).

f) en syrefunksjon som er i stand til å salte.

g) en saltbar basisk funksjon.

h) en molekylvekt på ca. 1891 slik dette kunne bestemmes ved FAB-massespektrometri.

Hver av Teichomycin  $A_2$  faktorene 1, 2, 3, 4 og 5 inneholder en syrefunksjon som er i stand til å danne salter. Fremstilling av alkalimetall-, jordalkalimetall- og farmasøytisk akseptable ammoniumsalter av Teichomycin  $A_2$ , faktorene 1, 2, 3, 4 og 5 omfattes også av foreliggende oppfinnelse.

Representative alkalimetall- og jordalkalimetallsalter innbefatter natrium-, kalium-, litium-, kalsium- og magnesiumsalter. Ammoniumsaltene innbefatter ammonium og primære, sekundære og tertiære ( $C_1$ - $C_4$ )alkylammonium og hydroksy- ( $C_1$ - $C_4$ )alkylammoniumsalter.

Alkali- og jordalkalimetallsaltene fremstilles ved hjelp av vanlige kjente fremgangsmåter som brukes for fremstilling av metallsalter. Som et eksempel kan det angis at Teichomycin  $A_2$  faktor 1, 2, 3, 4 og 5 i den frie syreformen, oppløses i et egnet oppløsningsmiddel såsom propylenglykol, hvorefter oppløsningene gradvis tilsettes en støkiometrisk mengde av en egnet valgt mineralbase.

Alkali- og jordalkalimetallsaltene som dannes, kan så innvinnes ved utfelling med et utfellingsmiddel og frafiltrering.

Alternativt kan disse salter fremstilles i en i alt vesentlig vannfri form gjennom lyofilisering. I dette tilfellet vil vandige oppløsninger inneholdende de ønskede salter som er et resultat fra utsaltningen av den frie syreformen med et egnet valgt alkali- eller jordalkalimetallkarbonat eller -hydroksyd i en slik mengde at man oppnår en pH mellom 7 og 8, frafiltreres eventuelle uoppløselige stoffer og så lyofiliseres.

- 10 De organiske ammoniumsalter kan fremstilles enten ved at man tilsetter et passende valgt amin til en oppløsning av den fri syreformen av teichomycin A<sub>2</sub> faktorene 1, 2, 3, 4 og 5 i et egnet oppløsningsmiddel såsom propylenglykol. Deretter kan man fordampe oppløsningsmidlet og overskuddet av aminreagensen, eller alternativt kan man kontakte de to reagensene i en minimal mengde vann og så utfelle de fremstilte saltene ved tilsetning av et utfellingsmiddel.
- 20 Som nevnt ovenfor inneholder hver av teichomycin A<sub>2</sub> faktorene 1, 2, 3, 4 og 5 også en basisk funksjon som er i stand til å danne syreaddisjonssalter. Deres farmasøytisk akseptable syreaddisjonssalter kan fremstilles på en i seg selv kjent måte, f.eks. ved at man kontakter de rene enkeltfaktorer med en relativt sterk syre, fortrinnsvis en mineralsyre.

#### Fremstilling av teichomycin A<sub>2</sub> faktor 2 natriumsalt

- 30 En vandig oppløsning av teichomycin A<sub>2</sub> faktor 2 (150 mg, 15 ml) ble justert til pH 8,0 ved dråpevis tilsetning av 0,1N NaOH. Den fremstilte oppløsning ble filtrert, overført til et kammer i et frysetørkingssystem og så frosset. Etter at frysing var fullstendig, ble kammeret evakuert til 0,1 torr og is ble sublimert ved å oppvarme varmeplaten til 0°C. Denne prosessen fortsatte inntil produktet var nesten tørt (ca. 1% fuktighet). En titrering av en oppløsning av teichomycin A<sub>2</sub> faktor 2 natriumsaltet fremstilt på

denne måten, i 25 ml metylcellosolve/H<sub>2</sub>O 3/1 med 0,1N HCl, viste et nærvær av to titrerbare funksjoner karakterisert ved følgende pK: 7,03 og 4,78.

- 5 Ved å bruke samme fremgangsmåte som beskrevet ovenfor, men ved å anvende teichomycin A<sub>2</sub> faktorene 1, 3, 4 og 5, kan de tilsvarende natriumsalter fremstilles. Bestemmelse av natriummengden i saltene bekrefter dannelsen av et mononatriumsalt.

10

Den in vitro antibakterielle aktiviteten for teichomycin A<sub>2</sub> faktorene 1, 2, 3, 4 og 5 som viste seg i alt vesentlig å være aktiv mot gram-positive bakterier, ble bestemt på kliniske isolater av stafylokokker og streptokokker idet

15

man brukte en togangers fortynningsmetode i et mikro-titreringssystem. Penassay-medium (Difco) og Todd-Hewitt-medium (Difco) ble brukt for stafylokokki og streptokokki henholdsvis. Kulturer som hadde stått over natten ble

20

fortynnet slik at det endelig inokulum var ca. 10<sup>3</sup> kolonidannende enheter/ml. Man avleste den minimalt hemmende konsentrasjon (MIC) som den laveste konsentrasjon hvor man ikke fikk noen synlig vekst etter en 18-24 timers inkubering ved 37°C. De oppnådde resultater er vist i tabell II.

25

30

35



TABELL II

In vitro antibakteriell aktivitet for teichomycin A<sub>2</sub> faktorene 1, 2, 3, 4 og 5.

| Mikroorganisme                    | Antall prøvede raser | M.I.G. (µg/ml)                      |                                     |                                     |                                     |                                     |
|-----------------------------------|----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|                                   |                      | Teichomycin A <sub>2</sub> faktor 1 | Teichomycin A <sub>2</sub> faktor 2 | Teichomycin A <sub>2</sub> faktor 3 | Teichomycin A <sub>2</sub> faktor 4 | Teichomycin A <sub>2</sub> faktor 5 |
| <i>Staphylococcus aureus</i>      | 5                    | 0,8-1,6                             | 0,8-1,6                             | 0,4-0,8                             | 0,2-0,8                             | 0,2-0,8                             |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 4                    | 0,2-1,6                             | 0,1-1,6                             | 0,2-0,8                             | 0,2-0,8                             | 0,2-0,8                             |
| <i>Streptococcus pyogenes</i>     | 7                    | 0,05-0,1                            | 0,025-0,1                           | 0,025-0,05                          | 0,006-0,05                          | 0,006-0,05                          |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 6                    | 0,1-0,2                             | 0,05-0,1                            | 0,05-0,1                            | 0,05-0,1                            | 0,05-0,1                            |
| <i>Streptococcus faecalis</i>     | 5                    | 0,2-0,4                             | 0,1-0,4                             | 0,1-0,2                             | 0,1-0,4                             | 0,1-0,4                             |
| <i>Streptococcus mitis</i>        | 1                    | 0,025                               | 0,025                               | 0,0125                              | 0,025                               | 0,025                               |
| <i>Streptococcus salivarius</i>   | 1                    | 0,2                                 | 0,2                                 | 0,1                                 | 0,05                                | 0,05                                |
| <i>Streptococcus sanguis</i>      | 1                    | 0,1                                 | 0,1                                 | 0,1                                 | 0,05                                | 0,05                                |
| <i>Streptococcus bovis</i>        | 1                    | 0,4                                 | 0,4                                 | 0,2                                 | 0,4                                 | 0,4                                 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i>   | 1                    | 0,1                                 | 0,1                                 | 0,05                                | 0,1                                 | 0,1                                 |

Forholdet mellom de mikrobiologiske egenskaper for de individuelle faktorene 1, 2, 3, 4 og 5 ble bestemt ved agar-diffusjonsmetoden idet man brukte *S. aureus* ATCC 6538 som spireprøve, og teichomycin A<sub>2</sub>-kompleks som standard.

5

Ved prøven ble en passende mengde av teichomycin A<sub>2</sub> faktor 1, teichomycin A<sub>2</sub> faktor 2, teichomycin A<sub>2</sub> faktor 3, teichomycin A<sub>2</sub> faktor 4, teichomycin A<sub>2</sub> faktor 5 og teichomycin A<sub>2</sub>-kompleks, som ble brukt som standard, oppløst i dimetylformamid i en konsentrasjon på 2000 µg/ml. Disse oppløsninger ble ytterligere fortynnet, idet man brukte fosfatbuffer 0,067 M pH 7,4 tilsatt 1% storfeserum slik at man fikk de følgende konsentrasjoner: 2,5, 5, 10 og 20 µg/ml.

15

Filtrerpapirskiver ble så dyppet i prøveoppløsningene og plassert med jevne mellomrom på overflaten av agarplater som var tilført en suspensjon av prøveorganismen. Platene ble så inkubert ved 37°C i 18 timer, hvorefter man målte diameteren på inhiberingssonene. De data man oppnådde ble tilført en regnemaskin for å beregne styrken på de individuelle faktorer i forhold til komplekset.

20

De oppnådde resultater er angitt i det etterfølgende.

25

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| Teichomycin A <sub>2</sub> faktor 1  | 841 U/mg  |
| Teichomycin A <sub>2</sub> faktor 2  | 1086 U/mg |
| Teichomycin A <sub>2</sub> faktor 3  | 1131 U/mg |
| Teichomycin A <sub>2</sub> faktor 4  | 1066 U/mg |
| Teichomycin A <sub>2</sub> faktor 5  | 954 U/mg  |
| Teichomycin A <sub>2</sub> -kompleks | 1000 U/mg |

30

Teichomycin A<sub>2</sub> faktorene 2, 3, 4 og 5 ble også prøvet i eksperimentelle infeksjoner forårsaket av *S. pneumoniae* og *S. pyogenes* i mus. Eksperimentene ble utført i sammenlingning med teichomycin A<sub>2</sub>-komplekset. Resultatene er angitt i tabell III.

35

159104

18

TABELL III

In vivo antibakteriell aktivitet

| 5  | Forbindelse                         | ED <sub>50</sub> (mg/kg/dag) s.c. |                    |
|----|-------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|
|    |                                     | S.pneumoniae L 44                 | S. pyogenes L 49   |
|    | Teichomycin A <sub>2</sub> faktor 2 | 0,28 (0,22-0,34)                  | 0,15 (0,13-0,18)   |
| 10 | Teichomycin A <sub>2</sub> faktor 3 | 0,27 (0,23-0,32)                  | 0,13 (0,11-0,16)   |
|    | Teichomycin A <sub>2</sub> faktor 4 | 0,12 (0,08-0,14)                  | 0,098 (0,073-0,11) |
|    | Teichomycin A <sub>2</sub> faktor 5 | 0,13 (0,10-0,15)                  | 0,10 (0,098-0,13)  |
| 15 | Teichomycin A <sub>2</sub> kompleks | 0,35 (0,28-0,44)                  | 0,18 (-)           |

Den omtrentlige akutte toksisitet i mus (i.p.) for teichomycin A<sub>2</sub> faktorene 1, 2, 3, 4 og 5 er vist i tabell IV nedenfor.

TABELL IV

Akutt toksisitet i mus (i.p.)

| 25 | Forbindelse                         | Omtrentlig LD <sub>50</sub> (mg/kg) |        |
|----|-------------------------------------|-------------------------------------|--------|
|    | Teichomycin A <sub>2</sub> faktor 1 | >1500                               | < 2000 |
|    | Teichomycin A <sub>2</sub> faktor 2 | >1500                               | < 2000 |
|    | Teichomycin A <sub>2</sub> faktor 3 | >1000                               | < 1500 |
| 30 | Teichomycin A <sub>2</sub> faktor 4 | > 500                               | < 1000 |
|    | Teichomycin A <sub>2</sub> faktor 5 | > 500                               | < 1000 |

Sett på bakgrunn av de ovennevnte resultater kan forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse, dvs. teichomycin A<sub>2</sub> faktor 1, teichomycin A<sub>2</sub> faktor 2, teichomycin A<sub>2</sub> faktor 3, teichomycin A<sub>2</sub> faktor 4, teichomycin A<sub>2</sub> faktor 5 kan effektivt

brukes som den aktive ingrediens i antimikrobielle preparater som kan brukes for mennesker og dyr for å hindre og for å behandle infeksjonssykdommer som er forårsaket av patogene bakterier, som er følsomme overfor de aktive ingredienser. I slike behandlinger kan nevnte forbindelser brukes som sådanne, eller brukes som enkeltindividuelle faktorer, eller når man tar hensyn til likheten i deres aktivitetsmønster, også i form av blandinger av to eller flere av de nevnte fem faktorer i ethvert mengdeforhold.

Forbindelser fremstilt ifølge oppfinnelsen kan tilføres oralt, topikalt eller parenteralt, men parenteral tilførsel er imidlertid mest foretrukket. Avhengig av tilførselsveien kan disse forbindelsene opparbeides i forskjellige doseringsformer. Preparater for oral anvendelse kan være i form av kapsler, tabletter, flytende oppløsninger eller suspensjoner. Kapslene og tablettene kan videre i tillegg til den aktive ingrediens inneholde vanlige kjente for-  
tynningsmidler såsom laktose, kalsiumfosfat, sorbitol og lignende, smøremidler som f.eks. magnesiumstearat, talkum, polyetylenglykol, bindemidler, f.eks. polyvinylpyrrolidon, gelatin, sorbitol, tragant, akacia, smaksstoffer og akseptable nedbrytningsmidler og fuktemidler. De flytende preparatene er vanligvis i form av vandige eller oljeaktige oppløsninger eller suspensjoner, og kan inneholde vanlige kjente additiver, f.eks. suspenderingsmidler. For topisk anvendelse kan forbindelser fremstilt ifølge oppfinnelsen opparbeides i egnet form for en absorpsjon gjennom huden, slimhinnen i nesen eller svelget eller bronkievevet, og kan f.eks. være i form av væskeinhaleringsmidler, svelgpenslingsoppløsninger og lignende. Preparater for anvendelse i øyne og ører kan være en flytende eller halvflytende form. Topiske preparater kan opparbeides i hydrofobe eller hydrofile stoffer i form av salver, kremer, lotioner, malinger eller pulvere.

Preparater for injeksjon kan være i form av suspensjoner,

oppløsninger eller emulsjoner i oljeholdige eller vandige væsker, og kan inneholde andre tilsetningsstoffer såsom suspenderingsmidler, stabiliserende midler og/eller dispergeringsmidler. Alternativt kan den aktive ingrediens være i form av et pulver for senere rekonstituering på det tidspunkt når preparatet skal brukes, f.eks. ved hjelp av sterilt vann.

Den mengde av den aktive forbindelse som tilføres, vil være avhengig av forskjellige faktorer såsom størrelse på pasienten og dennes tilstand, den vei og den frekvens man ønsker å tilføre preparatet samt årsaken til den sykdom man ønsker å behandle.

Teichomycin A<sub>2</sub> faktorene 1, 2, 3, 4 og 5 er generelt effektive i daglige doser mellom 0,1 og 20 mg aktiv ingrediens pr. kg kroppsvekt, eventuelt oppdelt i to doser pr. døgn. Spesielt ønskelige preparater kan fremstilles i form av doseringsenheter inneholdende 50-250 mg pr. enhet.

20

25

30

35

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av en i alt vesentlig ren individuell antibiotisk forbindelse valgt fra gruppen bestående av Teichomycin A<sub>2</sub> faktor 1, Teichomycin A<sub>2</sub> faktor 2, Teichomycin A<sub>2</sub> faktor 3, Teichomycin A<sub>2</sub> faktor 4 og Teichomycin A<sub>2</sub> faktor 5, med henholdsvis følgende kjemisk-fysikalske egenskaper:
- 10 Teichomycin A<sub>2</sub> faktor 1: et hvitt amorft pulver som ved oppvarming begynner å mørkne ved ca. 220°C og er fullstendig dekomponert ved 255°C, og som
- a) er fullstendig oppløselig i vann ved pH større enn 7 eller ved pH mindre enn 2 i dimetylformamid, dimetylsulfoksyd og propylenglykol;
- 15 er svakt oppløselig i metylcellosolve og glycerol; dårlig oppløselig i metanol og etanol og nesten uoppløselig i kloroform, benzen, n-heksan, acetonitril, etyleter, aceton, etylacetat, karbontetraklorid
- 20 b) har et ultrafiolett absorpsjonsspektrum som viser følgende absorpsjonsmaksima:
- i 0,1N saltsyre:
- 25  $\lambda_{\text{maks}} 278 \text{ nm } (E_{\text{lcm}}^{1\%} = 49,5)$
- i fosfatbuffer pH 7,4:
- $\lambda_{\text{maks}} 278 \text{ nm } (E_{\text{lcm}}^{1\%} = 50,0)$
- i 0,1N natriumhydroksyd:
- 30  $\lambda_{\text{maks}} 297 \text{ nm } (E_{\text{lcm}}^{1\%} = 72,1)$
- c) har et infrarødt absorpsjonsspektrum i nujol med følgende absorpsjonsmaksima: 3700-3100, 2960-2840 (nujol), 1645, 1590, 1510, 1460 (nujol), 1375 (nujol), 1305, 1230, 1180, 1155, 1060, 1025, 970, 890, 845, 815, 720 (nujol);
- 35 d) har en elementæranalyse etter at prøven på forhånd er tørket ved ca. 140°C under en inert atmosfære (% Δ va = 8,5),

159104

som indikerer følgende omtrentlige prosentvise sammensetning (middel): karbon 56,70%, hydrogen 4,90%, nitrogen 6,65%, klor 3,80%, oksygen (ved forskjell) 27,95%.

- 5 e) har en oppholdstid,  $t_R$ , på 21,2 minutter ved analyse ved hjelp av reversert fasehøytrykksvæskerkromatografi, idet man bruker en 5 $\mu$  "Zorbax" ODS-kolonne og eluerer denne med en lineær gradient fra 0-50% oppløsning B i oppløsning A i løpet av 40 minutter (oppløsning A: 25 mM
- 10  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /acetonitril (9/1) bufferet til pH 6,0 med 0,1N NaOH, oppløsning B: 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /acetonitril (3/7) bufferet til pH 6,0 med 0,1N NaOH) og med en gjennomstrømningshastighet på 2 ml/min. (indre standard: 3,5-dihydroksty-toluen  $t_R$  8,84 minutter).
- 15 f) har følgende grupper av signaler i 270 MHz  $^1\text{H}$  NMR-spektrum registrert i DMSO- $d_6$  med tilsetning av et par dråper  $\text{D}_2\text{O}$  (kons. 25 mg/0,5 ml) (TMS som indre standard:  $\delta = 0,00$  ppm): 0,8-1,5 (m); 1,7-2,3 (m); 2,7-4,0 (m);
- 20 4,0-4,7 (m); 4,8-5,8 (m); 6,2-8,1 (m).
- g) har en syrefunksjon som er i stand til å danne salter.
- h) en saltbar basisk funksjon
- 25 i) en molekylvekt på ca. 1875 bestemt ved hjelp av FAB-massepektrometri;

Teichomycin  $\text{A}_2$  faktor 2: et hvitt amorft pulver som begynner å mørkne når det oppvarmes til 210°C og er fullstendig dekomponert ved 250°C, og som

30

- a) er helt oppløselig i vann ved pH større enn 7 eller pH mindre enn 2 i dimetylformamid, dimetylsulfoksyd og propylenglykol;
- 35 svakt oppløselig i metylcellosolve og glycerol; dårlig oppløselig i metanol og etanol og nesten uoppløselig i kloroform, benzen, n-heksan, acetonitril, etyleter, aceton, etylacetat, karbontetraklorid.

b) har et ultrafiolett absorpsjonsspektrum som viser følgende absorpsjonsmaksima:

- i 0,1N saltsyre:

$\lambda_{\text{maks}} 278 \text{ nm}$  ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 48$ )

- i fosfatbuffer pH 7,4:

$\lambda_{\text{maks}} 278 \text{ nm}$  ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 49,0$ )

- i 0,1N natriumhydroksyd:

$\lambda_{\text{maks}} 297 \text{ nm}$  ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 70,0$ )

c) har et infrarødt absorpsjonsspektrum i nujol med følgende observerbare absorpsjonsmaksima: 3700-3100, 2960-2860 (nujol), 1645, 1590, 1510, 1460 (nujol), 1375 (nujol), 1300, 1260, 1230, 1180, 1150, 1060, 1025, 970, 890, 845, 815, 720 (nujol).

d) har en elementæranalyse etter at prøven er blitt tørket på forhånd ved ca. 140°C under en inert atmosfære ( $\% \Delta v = 9,8$ ), som indikerer følgende omtrentlige prosentvise sammensetning (middel): karbon 56,15%, hydrogen 5,15%, nitrogen 6,30%, klor 3,90%, oksygen (ved forskjell) 28,50%.

e) har en oppholdstid ( $t_R$ ) på 22,6 minutter ved analyse ved hjelp av reversert fasehøytrykksvæskeskromatografi når man bruker en 5 $\mu$  "Zorbax" ODS-kolonne og eluerer denne med lineær gradient fra 0-50% oppløsning av B i oppløsning A i løpet av 40 minutter (oppløsning A: 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /acetonitril (9/1) bufferet til pH 6,0 med 0,1N NaOH, oppløsning B: 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /acetonitril (3/7) bufferet til pH 6,0 med 0,1 NaOH) med en gjennomstrømningshastighet på 2 ml/min. (indre standard: 3,5-dihydroksy-toluen  $t_R$  8,84 minutter).

f) har følgende grupper av signaler i et 270 MHz  $^1\text{H}$  NMR-spektrum registrert i  $\text{DMSO}-d_6$  med tilsetning av et par dråper  $\text{D}_2\text{O}$  (kons. 25 mg/0,5 ml) (TMS som indre standard  $\delta = 0,00$  ppm): 0,7-1,5 (m), 1,8-2,2 (m), 2,7-4,5 (m),



4,6-5,7 (m), 6,2-8,1 (m).

- g) har en syrefunksjon som er i stand til å danne salter.
- 5 h) en saltbar basisk funksjon.
- i) en molekylvekt på ca. 1877 bestemt ved hjelp av FAB-massespektrometri;
- 10 Teichomycin A<sub>2</sub> faktor 3: et hvitt amorft pulver som ved oppvarming begynner å dekomponere ved 205°C og er fullstendig dekomponert ved 250°C, som:
- 15 a) er fullstendig oppløselig i vann ved pH større enn 7,0 eller ved pH mindre enn 2 i dimetylformamid, dimetylsulfoksyd og propylenglykol; svakt oppløselig i metylcellosolve og glycerol; dårlig oppløselig i metanol og etanol, og nesten uoppløselig i kloroform, benzen, n-heksan, acetonitril, etyleter, aceton, etylacetat, karbontetraklorid.
- 20 b) har et ultrafiolett absorpsjonsspektrum som viser følgende absorpsjonsmaksima:
- i 0,1N saltsyre:
- 25  $\lambda_{\text{maks}} 278 \text{ nm } (E_{1\text{cm}}^{1\%} = 49,2)$
- i fosfatbuffer pH 7,4:
- $\lambda_{\text{maks}} 278 \text{ nm } (E_{1\text{cm}}^{1\%} = 50,8)$
- i 0,1N natriumhydroksyd:
- 30  $\lambda_{\text{maks}} 297 \text{ nm } (E_{1\text{cm}}^{1\%} = 72,7)$
- c) har et infrarødt absorpsjonsspektrum i nujol med følgende observerbare absorpsjonsmaksima: 3700-3100, 2960-2850 (nujol), 1645, 1590, 1510, 1460 (nujol), 1375 (nujol), 1300, 1230, 1180, 1150, 1120, 1060, 1030, 970, 890, 845, 820, 800, 720 (nujol).
- 35 d) har en elementæranalyse etter at prøven som på forhånd var tørket ved 140°C under en inert atmosfære (% Δ v =

12,0) som indikerer følgende omtrentlige prosentvise sammensetning (middel): karbon 56,26%, hydrogen 5,20%, nitrogen 6,69%, klor 3,95%, oksygen (ved forskjell) 27,90%.

5

e) har en oppholdstid ( $t_R$ ) på 23,3 minutter ved analyse ved hjelp av reversert fasehøytrykksvæskeskromatografi når man bruker en 5 $\mu$  "Zorbax" ODS-kolonne og eluerer denne med en lineær gradient fra 0-50% av oppløsning B i oppløsning A i løpet av 40 minutter (oppløsning A: 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /acetonitril (9/1) bufferet ved pH 6,0 med 0,1N NaOH, oppløsning B: 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /acetonitril (3/7) bufferet ved pH 6,0 med 0,1N NaOH) med en gjennomstrømningshastighet på 2 ml/min. (indre standard: 3,5-dihydroksty-toluen  $t_R$  8,84 minutter).

10

15

f) har følgende grupper av signaler i et 270 MHz  $^1\text{H}$  NMR-spektrum registrert i  $\text{DMSO}-d_6$  med tilsetning av et par dråper  $\text{D}_2\text{O}$  (kons. 25 mg/0,5 ml) (TMS som indre standard  $\delta = 0,00$  ppm): 0,7-1,5 (m), 1,8-2,0 (m), 2,7-4,5 (m), 4,6-5,7 (m), 6,2-8,0 (m).

20

g) har en syrefunksjon som er i stand til å danne salter.

25

h) en saltbar basisk funksjon.

i) en molekylvekt på ca. 1877 bestemt ved FAB-massespektrometri;

30

Teichomycin  $\text{A}_2$  faktor 4: et hvitt amorft pulver som ved oppvarming begynner å mørkne ved ca. 210°C og er fullstendig dekomponert ved 250°C, som

35

a) er fullstendig oppløselig i vann ved pH over 7,0 eller ved pH mindre enn 2 i dimetylformamid, dimetylsulfoksyd og propylenglykol;  
svakt oppløselig i metylcellosolve og glycerol;  
dårlig oppløselig i metanol og etanol, og

nesten uoppløselig i kloroform, benzen, n-heksan, acetronitril, etyleter, aceton, etylacetat, karbon-tetraklorid

- 5 b) har et ultrafiolett absorpsjonsspektrum som har følgende absorpsjonsmaksima:
- i 0,1N saltsyre:  
 $\lambda_{\text{maks}} 278 \text{ nm}$  ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 52,5$ )
  - 10 - i fosfatbuffer pH 7,4:  
 $\lambda_{\text{maks}} 278 \text{ nm}$  ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 52,5$ )
  - i 0,1N natriumhydroksyd:  
 $\lambda_{\text{maks}} 297 \text{ nm}$  ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 75,5$ )
- 15 c) har et infrarødt absorpsjonsspektrum i nujol med følgende absorpsjonsmaksima: 3700-3100, 2960-2840 (nujol), 1645, 1590, 1510, 1460 (nujol), 1375 (nujol), 1300, 1230, 1175, 1140, 1060, 1025, 970, 890, 840, 815, 720 (nujol);
- 20 d) har en elementæranalyse etter at prøven på forhånd er tørket ved 140°C under en inert atmosfære (%  $\Delta v = 9,8$ ) som indikerer følgende omtrentlige prosentvise sammensetning (middel): karbon 56,50%, hydrogen 5,10%, nitrogen 6,50%, klor 3,80%, oksygen (ved forskjell) 28,10%.
- 25 e) har en oppholdstid ( $t_R$ ) på 25,8 minutter ved analyse ved hjelp av reversert fasehøytrykksvæskeskromatografi når man bruker en 5 $\mu$  "Zorbax" ODS-kolonne og eluerer denne med en linær gradient fra 0-50% av oppløsning B i oppløsning A i løpet av 40 minutter (oppløsning A: 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /acetonitril (9/1) bufferet til pH 6,0 med 0,1N NaOH, oppløsning B: 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /acetonitril (3/7) bufferet til pH 6,0 med 0,1N NaOH) med en gjennomstrømningshastighet på 2 ml/min. (indre standard: 3,5-dihydroksytoluen  $t_R$  8,84 minutter).
- 30
- 35 f) har en syrefunksjon som er i stand til å danne salter.

g) en saltbar basisk funksjon.

h) en molekylvekt på ca. 1891 bestemt ved FAB-massespektrometri;

5

Teichomycin A<sub>2</sub> faktor 5: et hvitt amorft pulver som begynner å mørkne når det oppvarmes til 210°C og er fullstendig dekomponert ved 250°C, og som:

10 a) er fullstendig oppløselig i vann ved pH større enn 7,0 eller ved pH mindre enn 2 i dimetylformamid, dimetylsulfoksyd og propylenglykol;

svakt oppløselig i metylcellosolve og glycerol;

dårlig oppløselig i metanol og etanol, og

15 nesten uoppløselig i kloroform, benzen, n-heksan, acetonitril, etyleter, aceton, etylacetat, karbontetraklorid

b) har et ultrafiolett absorpsjonsspektrum som viser følgende absorpsjonsmaksima:

20

- i 0,1N saltsyre:

$\lambda_{\text{maks}} 278 \text{ nm } (E_{1\text{cm}}^{1\%} = 49,6)$

- i fosfatbuffer pH 7,4:

25

$\lambda_{\text{maks}} 278 \text{ nm } (E_{1\text{cm}}^{1\%} = 51,8)$

- i 0,1N natriumhydroksyd:

$\lambda_{\text{maks}} 297 \text{ nm } (E_{1\text{cm}}^{1\%} = 78,8)$

c) har et infrarødt absorpsjonsspektrum i nujol med følgende

30

observerbare absorpsjonsmaksima: 3700-3100, 2960-2840

(nujol), 1645, 1590, 1510, 1460 (nujol), 1375 (nujol),

1300, 1230, 1175, 1145, 1060, 1025, 970, 890, 840, 815,

720 (nujol).

35 d) har en elementæranalyse etter at prøven på forhånd er tørket ved ca. 140°C under en inert atmosfære (%  $\Delta v = 10,1$ ) som indikerer følgende omtrentlige prosentvise

sammensetning (middel): karbon 56,60%, hydrogen 5,05%, nitrogen 6,63%, klor 3,85%, oksygen (ved forskjell) 27,87%

- 5 e) en oppholdstid  $t_R$  på 26,4 minutter ved analyse ved hjelp av reversert fasehøytrykksvæskeskromatografi idet man bruker en 5 $\mu$  "Zorbax" ODS-kolonne og eluerer denne med en lineær gradient fra 0-50% av oppløsning B i oppløsning A i løpet av 40 minutter (oppløsning A: 25 mM
- 10  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /acetonitril (9/1) bufferet til pH 6,0 med 0,1N NaOH, oppløsning B: 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /acetonitril (3/7) bufferet til pH 6,0 med 0,1N NaOH) med en gjennomstrømningshastighet på 2 ml/min. (indre standard: 3,5-di-hydroksy-toluen  $t_R$  8,84 minutter).

- 15 f) har en syrefunksjon som er i stand til å danne salter.

g) en saltbar basisk funksjon,

- 20 h) en molekylvekt på ca. 1891 bestemt ved FAB-massespektrometri,

og deres farmasøytisk akseptable salter;

- 25 k a r a k t e r i s e r t v e d at man separerer Teichomycin  $A_2$  i enkeltfaktorer ved revers fasefordelingskromatografi under anvendelse av en silanert silisiumdioksydgelkolonne og en gradienteluering med acetonitril i fortynnet ammoniumformiat som elueringsmiddel, eller
- 30 utfører nevnte separering ved ionebytterkromatografi,

og eventuelt omdanner de således oppnådde forbindelser til deres tilsvarende farmasøytisk akseptable salter.

- 35 2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte kolonne elueres med en lineær gradient med fra 10 til 20% acetonitril i en 0,2% ammoniumformiatoppløsning.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i -  
s e r t v e d at når blandinger av to faktorer utvinnes  
fra kolonnen, så separeres disse i enkeltfaktorene ved  
revers fasekolonnekromatografi ved anvendelse av en oktadecyl-  
5 silan-kolonne og en blanding av acetonitril og 0,2% vandig  
ammoniumformiat i et forhold på 24:76 som eluerings-  
middel.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 1, for fremstilling av  
10 Teichomycin A<sub>2</sub> faktor 2, k a r a k t e r i s e r t v e d  
at man oppløser Teichomycin A<sub>2</sub> kompleks i en blanding av 0,2%  
ammoniumformiat/acetonitril i et forhold på 9:1, justerer  
pH-verdien til ca. 7,5 ved tilsetning av NaOH, fører den opp-  
nådde oppløsning gjennom en silanert silisiumdioksydkolonne,  
15 utvikler kolonnen i en lineær gradient fra 10 til 20% aceto-  
nitril i en 0,2% ammoniumformiatoppløsning, oppsamler frak-  
sjonene som har de samme høytrykksvæskerkromatografi-  
profilegenskaper som Teichomycin A<sub>2</sub> faktor 2, inndamper det  
organiske oppløsningsmiddelet under redusert trykk, avsalter  
20 den vandige tilbakeværende oppløsning ved å føre den gjennom  
en silanert silisiumdioksydkolonne, vasker kolonnen med  
vann, eluerer den med en 50% vandig acetonitriloppløsning,  
konsentrerer eluatet til et lite volum, og utfeller ren  
Teicomycin A<sub>2</sub> faktor 2 derfra ved tilsetning av et utfellings-  
25 middel.

30

35

159104

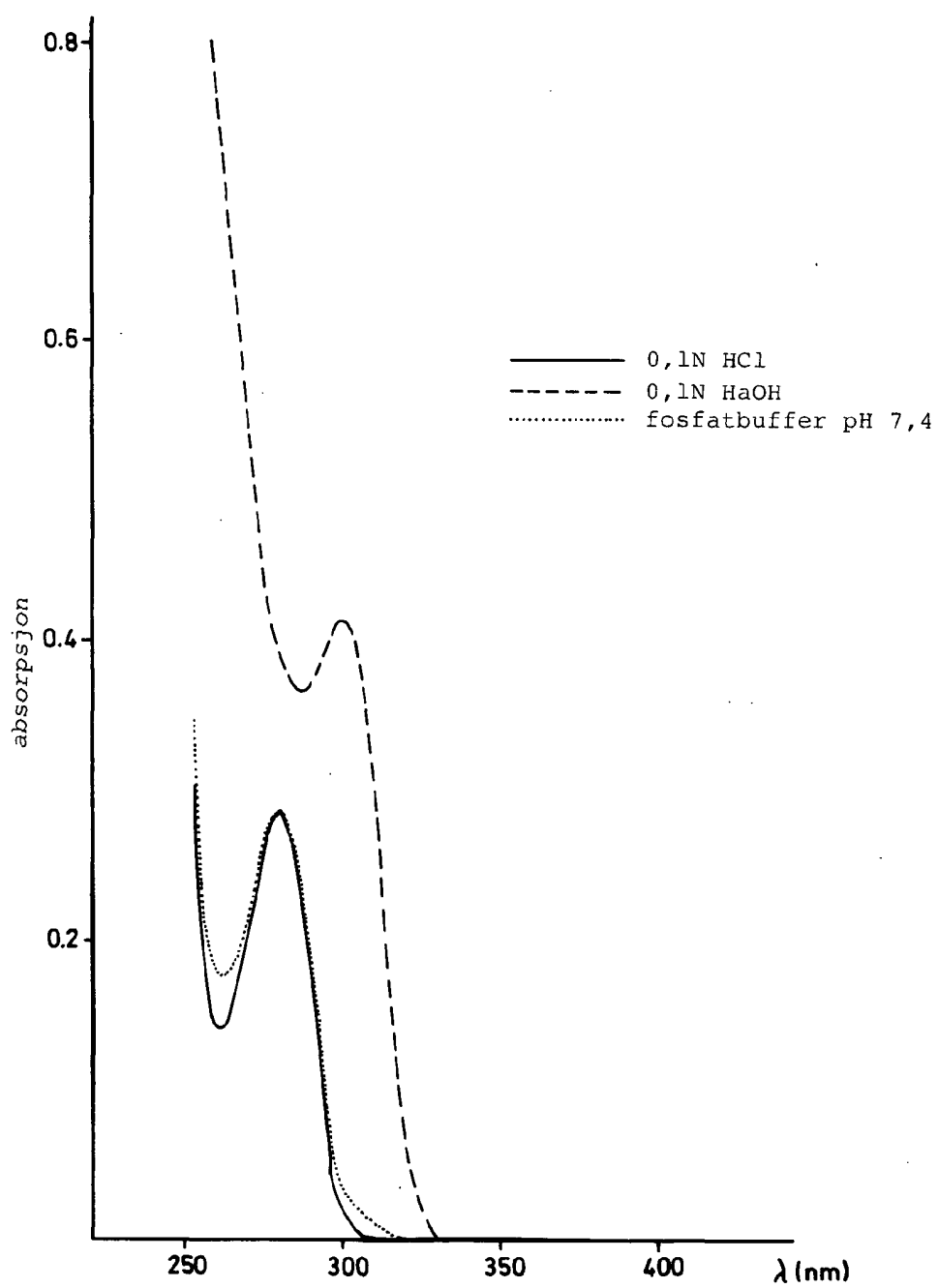


Fig. 1 : U.V. absorpsjonsspektrum for Teichomycin A<sub>2</sub>  
faktor 1

159104

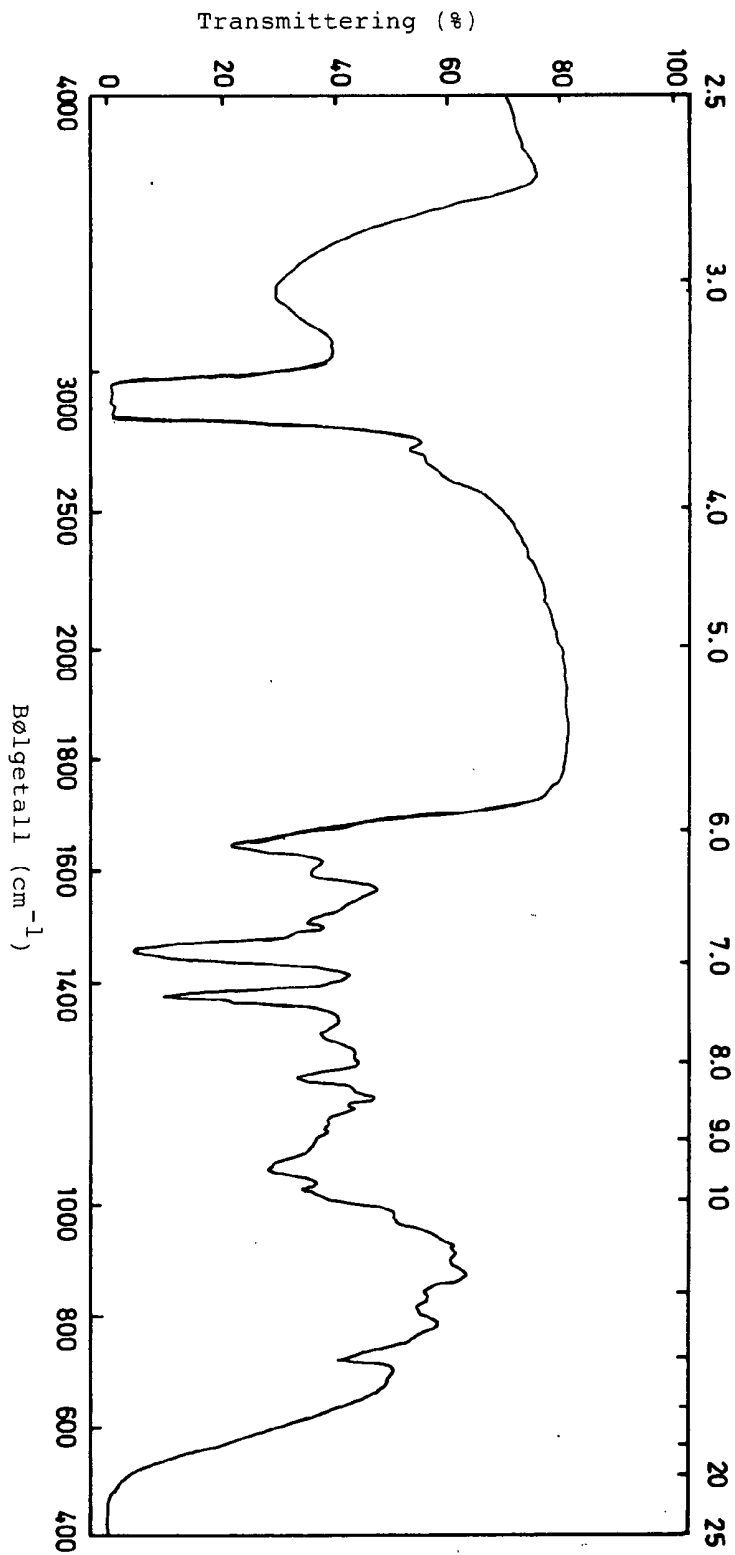
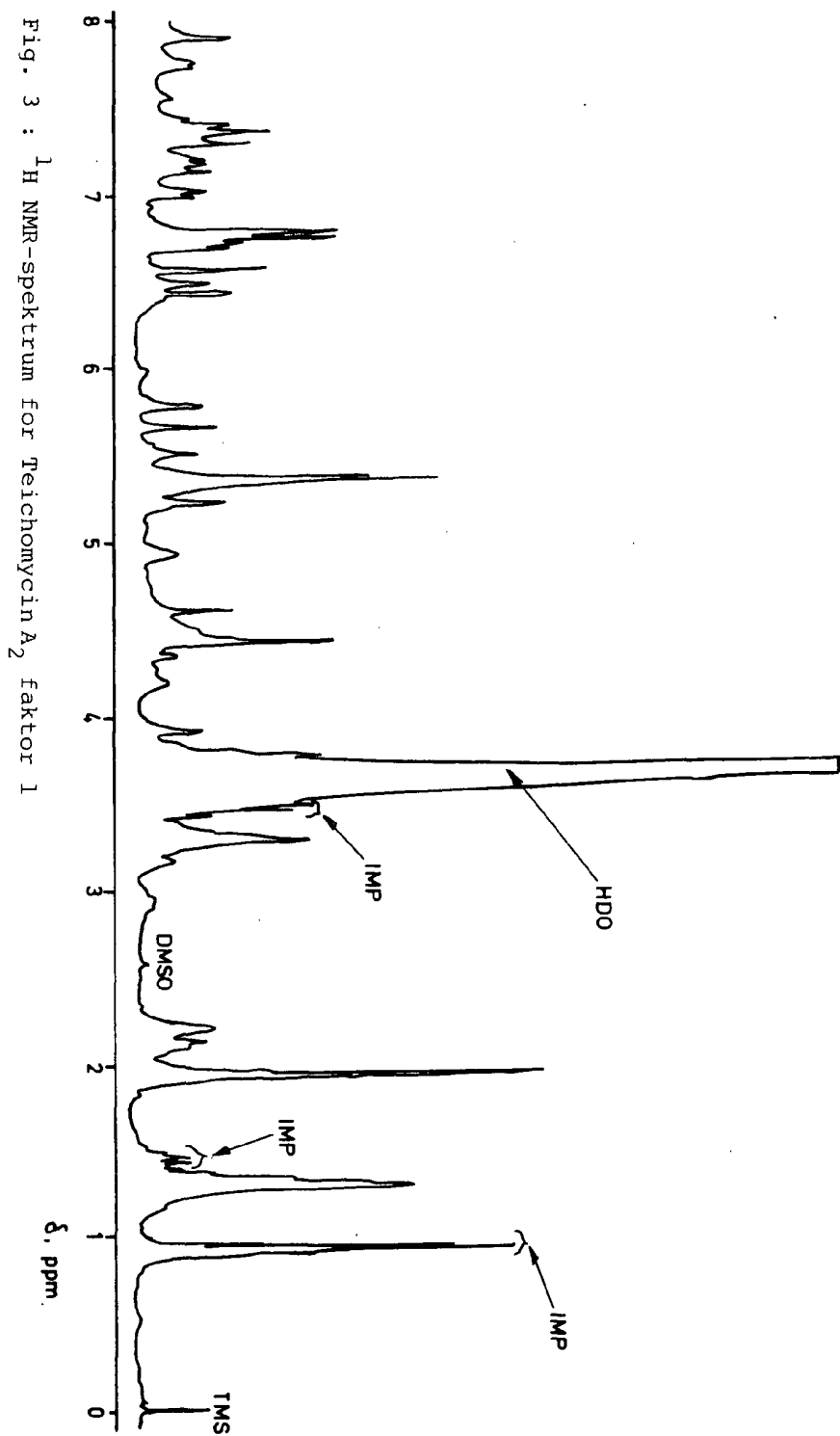


Fig. 2 : Infrarødt spektrum (nujol) for Teichomycin A<sub>2</sub> faktor 1



159104



159104

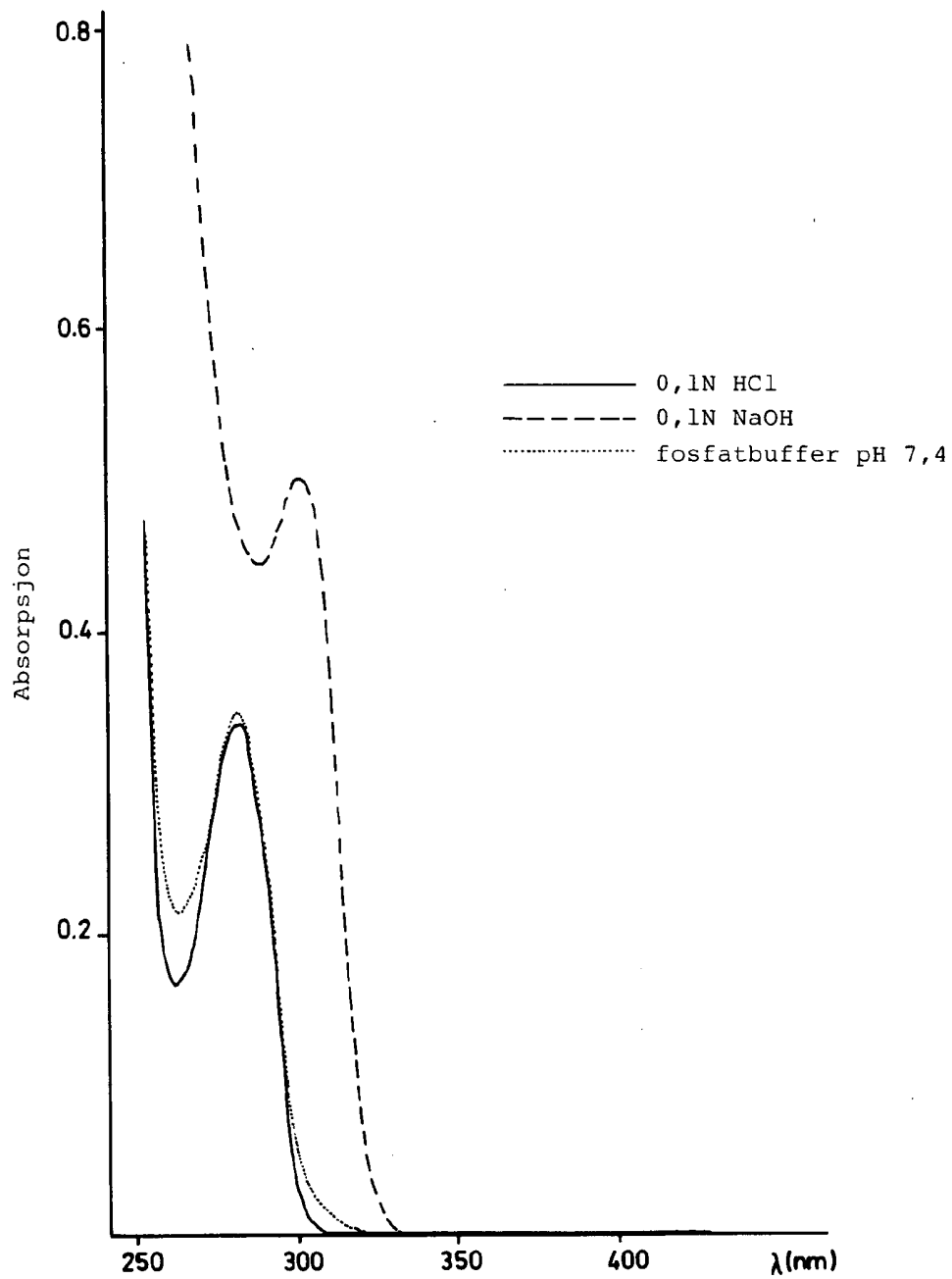


Fig. 4 : U.V. absorpsjonsspektrum for Teichomycin A<sub>2</sub>  
faktor 2

159104

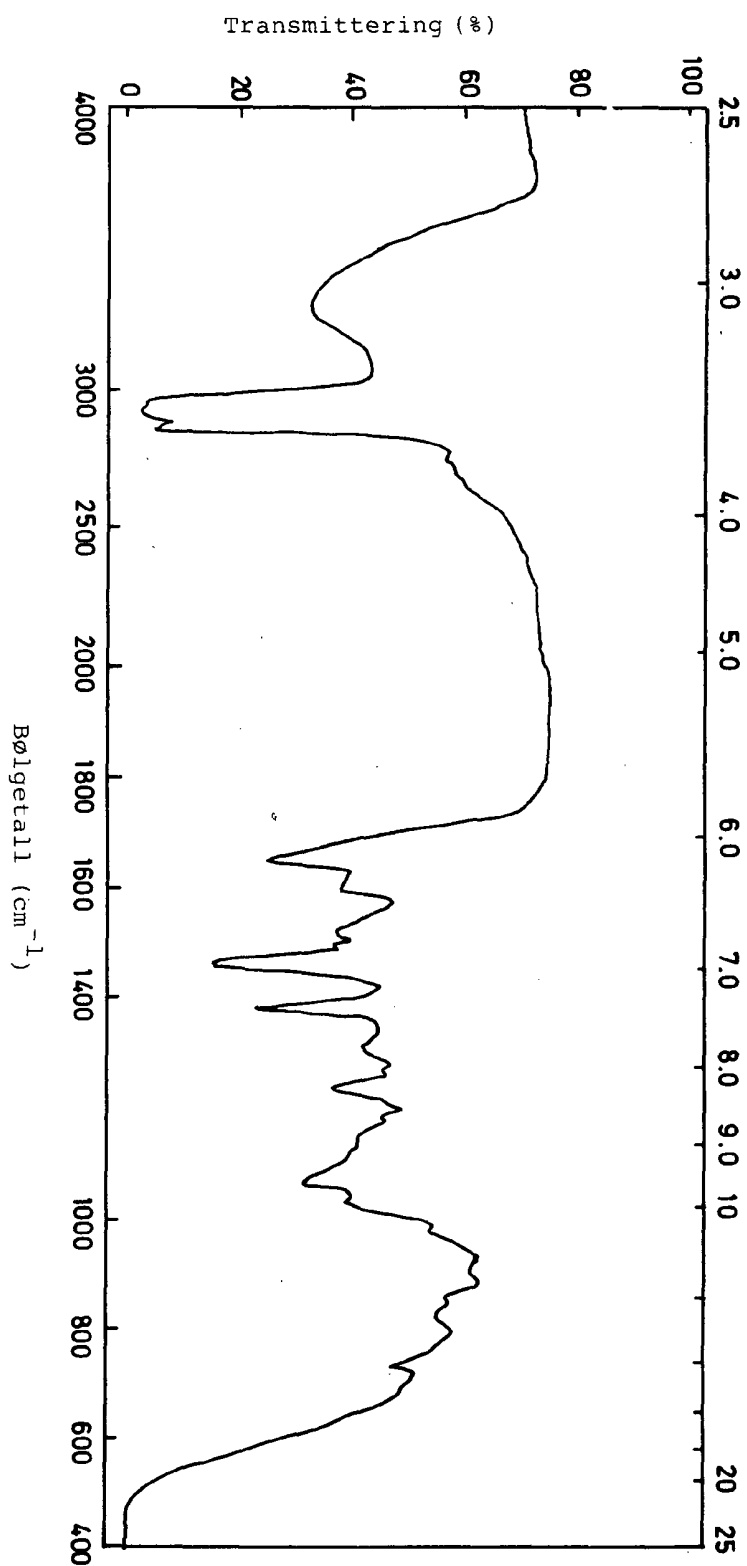


Fig. 5 : Infrarødt spektrum (nujol) for teichomycin A<sub>2</sub> faktor 2

159104

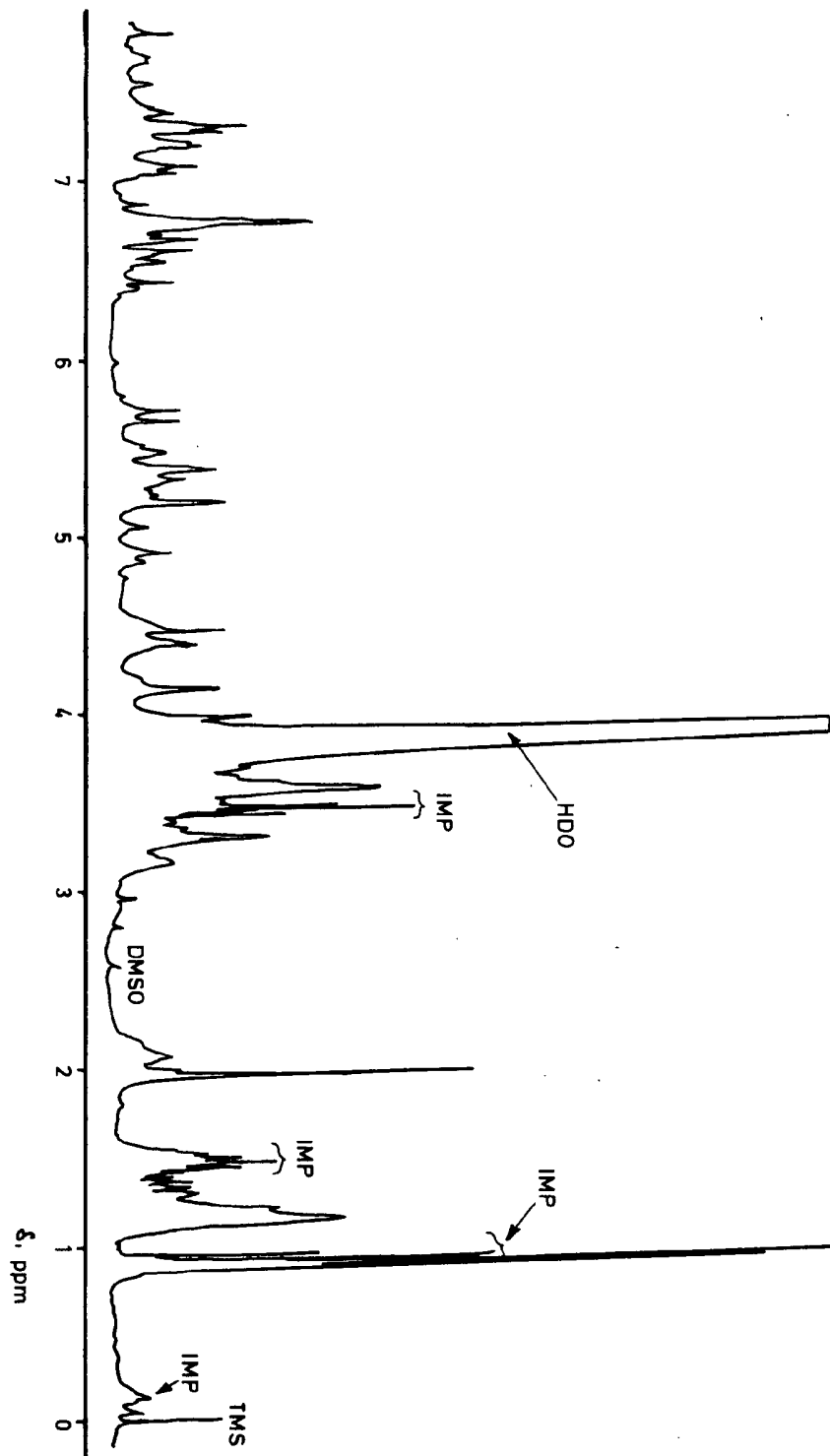


Fig. 6 :  $^1\text{H}$  NMR-spektrum for Teichomycin  $A_2$  faktor 2

159104

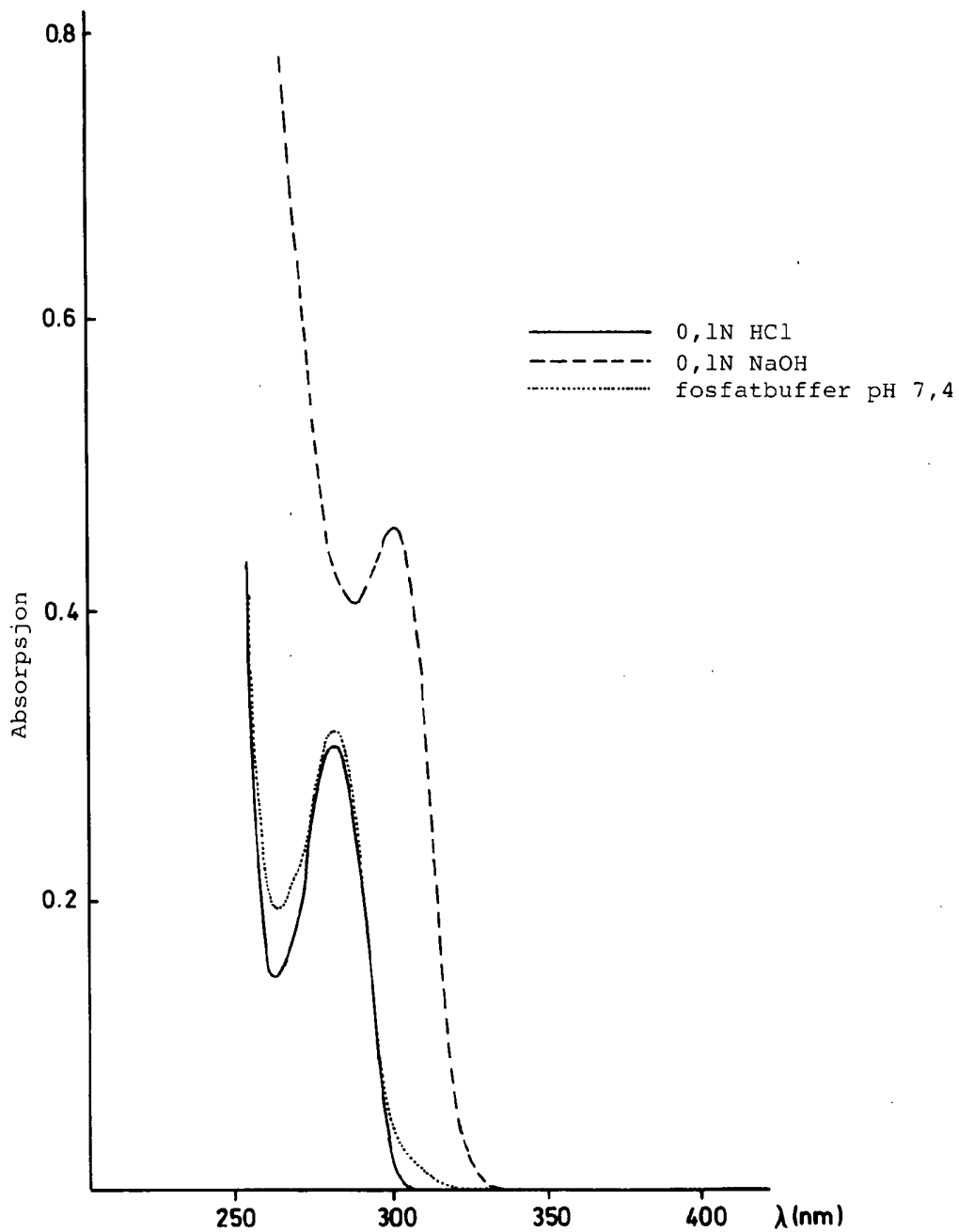


Fig. 7 : U.V. absorpsjonsspektrum for Teichomycin A<sub>2</sub>  
faktor 3

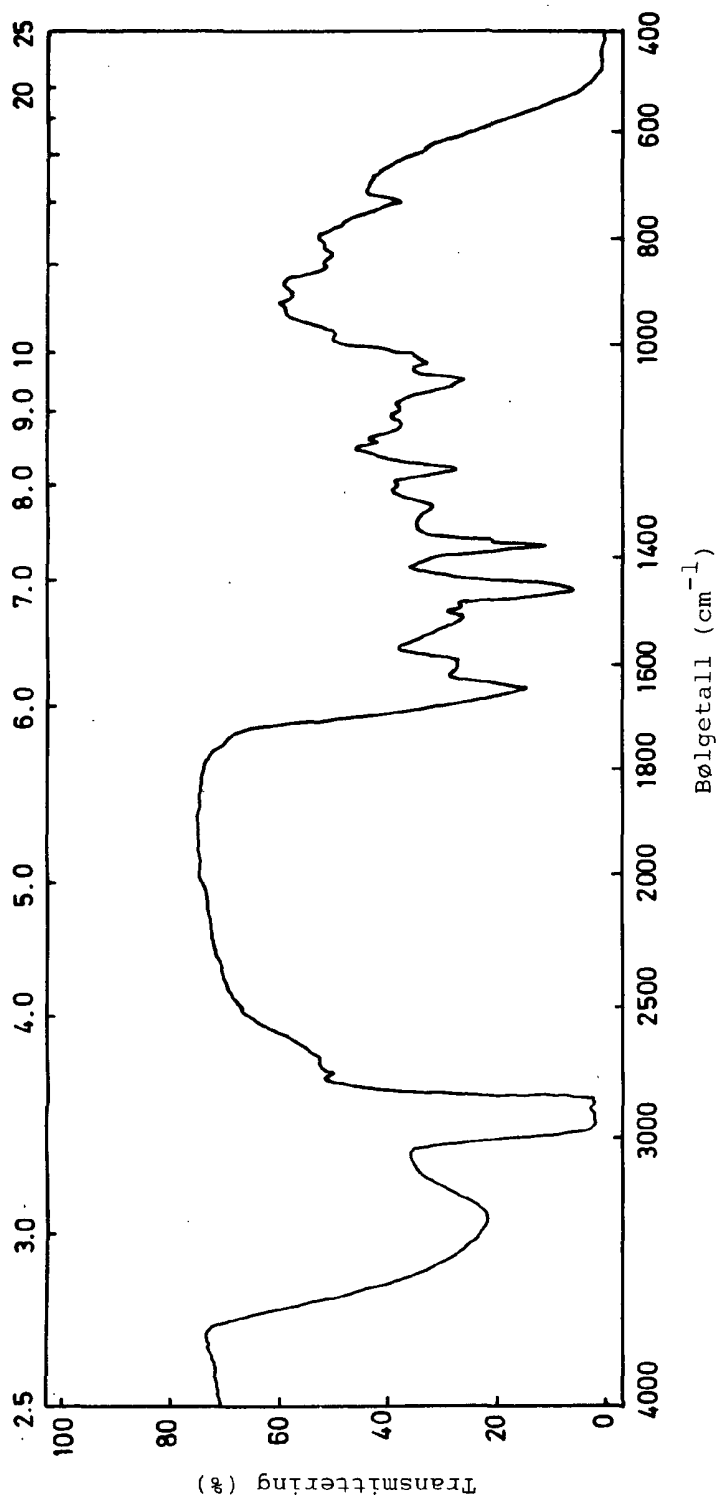


Fig. 8 : Infrarødt spektrum (nujol) for Teichomycin A<sub>2</sub> faktor 3

159104

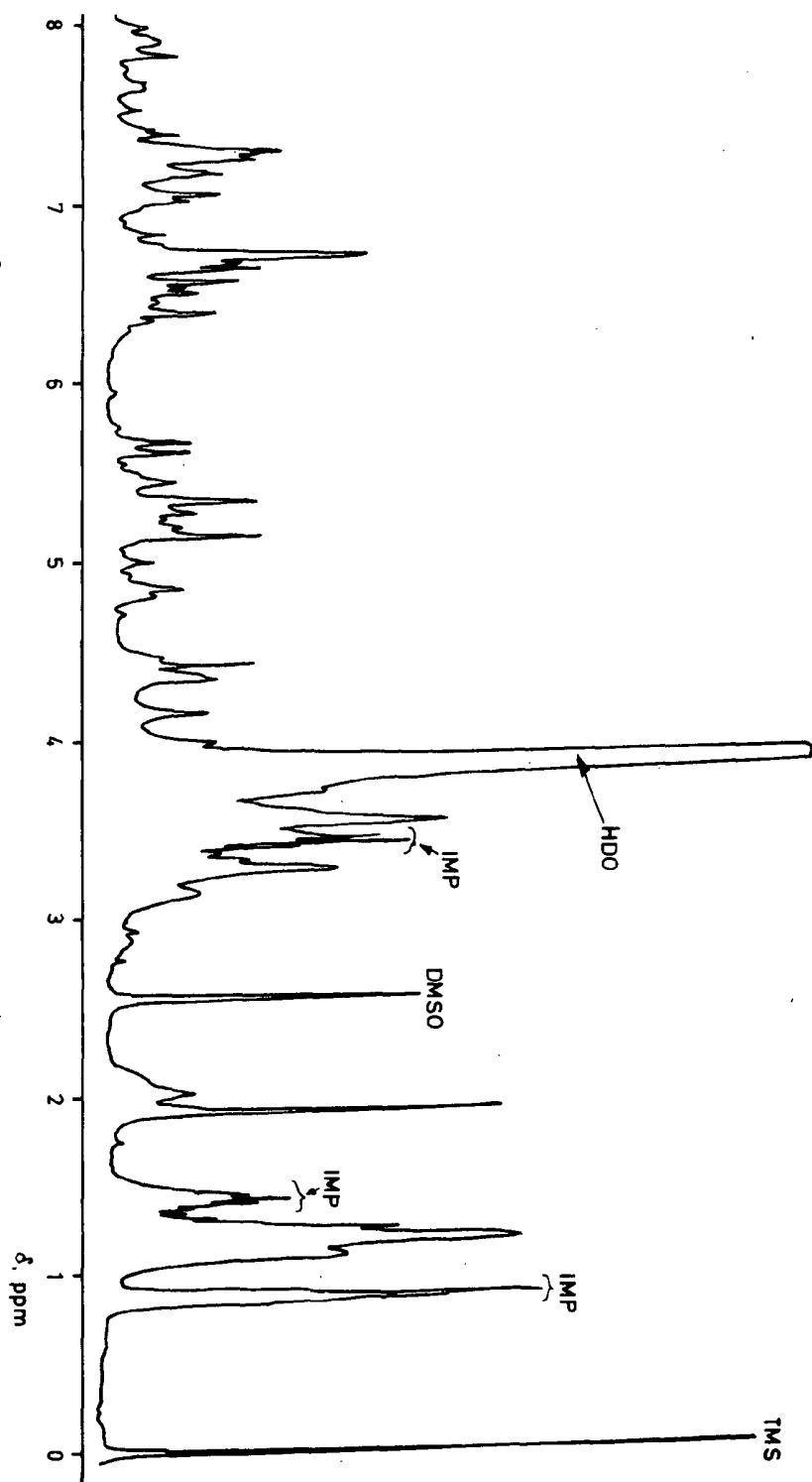


Fig. 9 :  $^1\text{H}$  NMR-spektrum for Teichomycin  $\text{A}_2$  faktor 3

159104

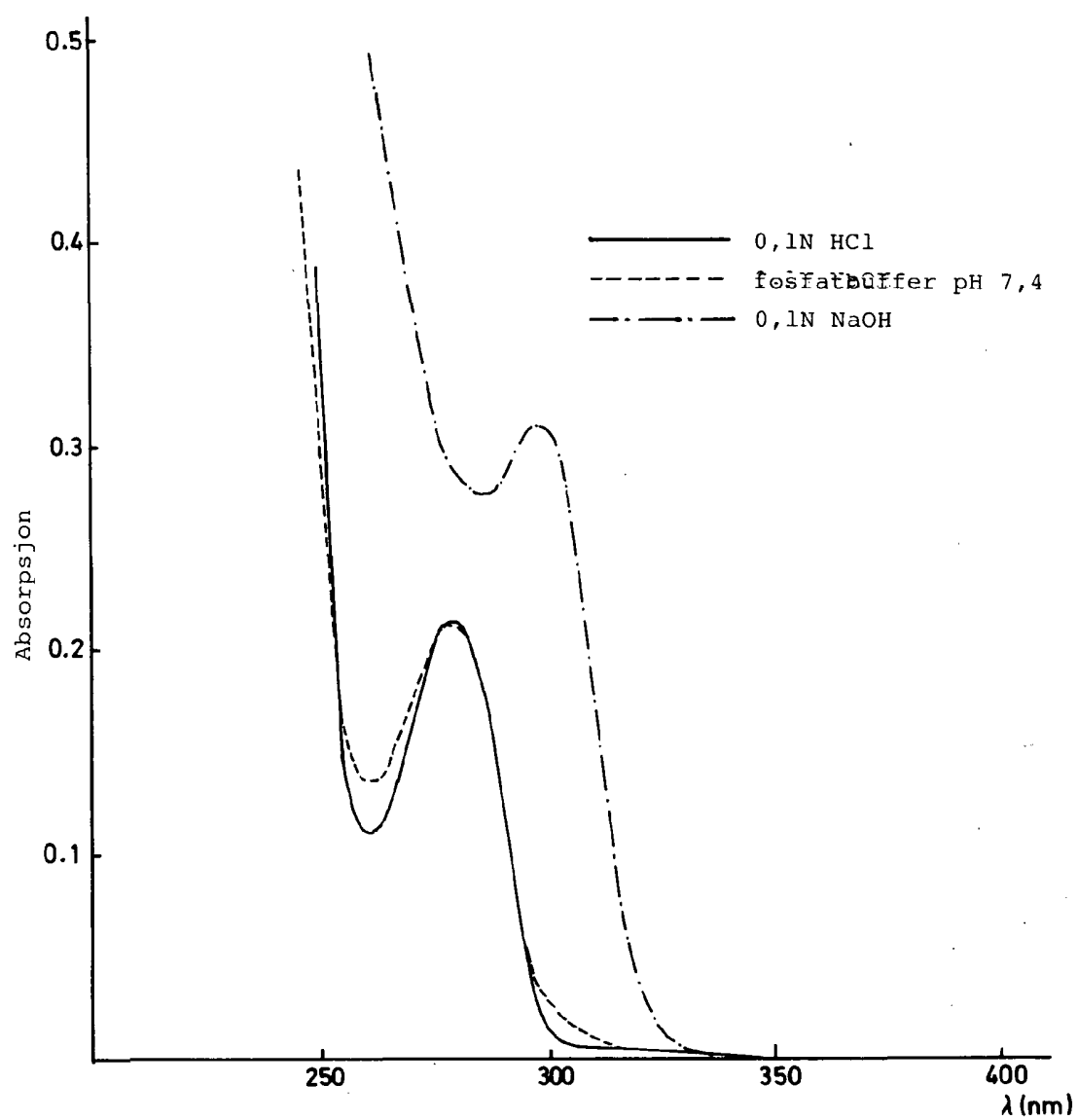


Fig. 10 : U.V. absorpsjonsspektrum for Teichomycin A<sub>2</sub>  
faktor 4



159104

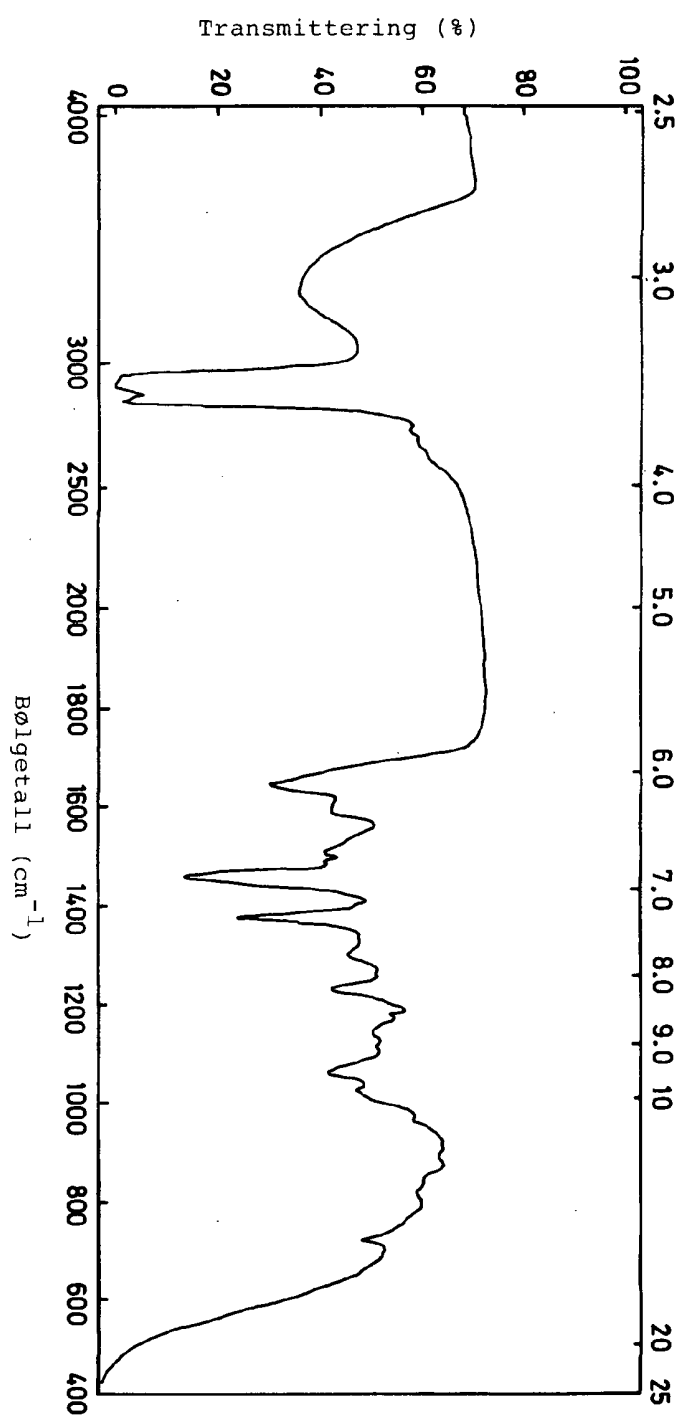


Fig. 11 : Infrarødt spektrum(nujol) for Teichomycin A<sub>2</sub> faktor 4

159104

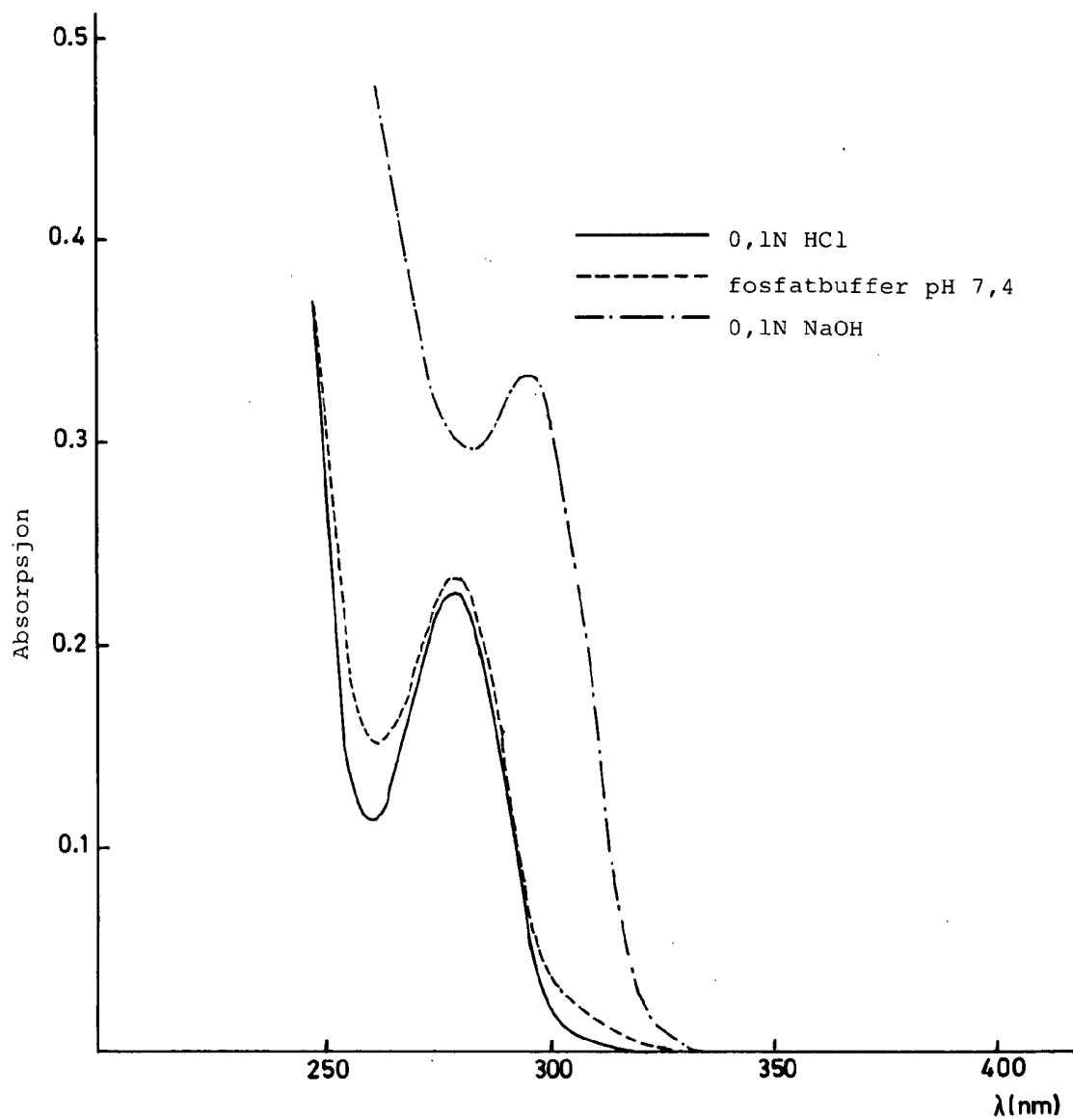


Fig. 12 : U.V. absorpsjonsspektrum for Teichomycin A<sub>2</sub>  
faktor 5

159104

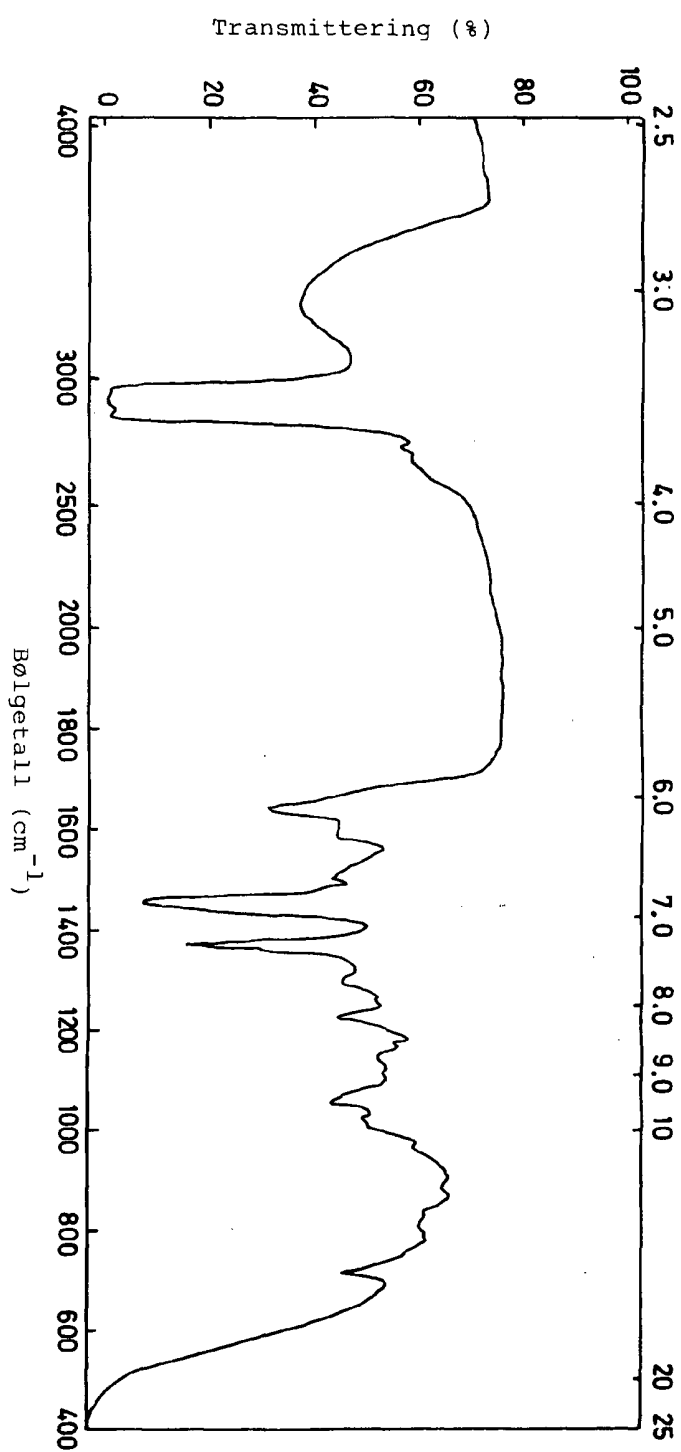


Fig. 13 : Infrarødt spektrum (nujol) for Teichomycin  $A_2$  faktor 5