



F100095286B



**SUOMI-FINLAND**  
(FI)

**Patentti- ja rekisterihallitus**  
**Patent- och registerstyrelsen**

(B) (11) **KUULUTUSJULKAISU**  
**UTLAGGNINGSSKRIFT** 95286  
C (45) **Patentti myönnetty**  
**Patent meddelat 10 01 199 6**

(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6

C 12P 17/06, C 12N 1/20, C 07D 309/22

(21) Patentihakemus - Patentansökning 903459  
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 09.07.90  
(24) Alkuperäpäivä - Löpdag 09.07.90  
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 13.01.91  
(44) Nähtävöksipanon ja kuul.julkaisun pvm. -  
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 29.09.95  
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet  
12.07.89 US 378677 P 03.11.89 US 431423 P

(71) Hakija - Sökande

1. Bristol-Myers Squibb Company, 345 Park Avenue, New York, NY 10154, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Ohkuma, Hiroaki, 3-19, Inaridai, Itabashi-ku, Tokyo, Japan, (JP)  
2. Tomita, Koji, 5-2-3 Kami-yoga, Setagaya-ku, Tokyo, Japan, (JP)  
3. Konishi, Masataka, 7-5-7 Arima, Miyamae-ku, Kawasaki, Japan, (JP)  
4. Kamei, Hideo, 3-30-6 Takaidohigashi, Suginami-ku, Tokyo, Japan, (JP)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä kasvainten vastaisen antibiootin BU-3285T tai BU-3285T-desulfaatin valmistamiseksi**  
**Förfarande för framställning av antitumört antibiotikum BU-3285T eller BU-3285T-desulfat**

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: 53903 ATCC

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 139457 (C 07D 309/32), EP A 128651 (C 07D 309/32), US A 4792522 (C 12P 23/00),  
Chemical Abstracts 99 (1983) 122129p

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Tämä keksintö koskee kasvaimia vastustavaa antibioottista BU-3285T-yhdistettä ja sen valmistusta. Yhdistettä saadaan kasvattamalla *Chainia rosea* uutta kantaa, ja sillä on sekä kasvaimia että sienä vastustavaa aktiivisuutta. Keksintö koskee myös BU-3285T:n desulfatoitua derivaattia, jota saadaan käsittelemällä BU-3285T:tä sulfaataasiensyymillä. BU-3285T-desulfaatilla on kasvaimia vastustavaa aktiivisuutta.

Föreliggande uppfinning avser den antitumöraktiva, antibiotiska föreningen BU-3285T och framställningen av densamma. Föreningen erhålls genom odling av nya stam av *Chainia rosea* och uppvisar både antitumör- och antifungal aktivitet. Uppfinningen avser även det desulfaterade derivatet av BU-3285T, vilket erhålls genom behandling av BU-3285T med sulfatasenzym. BU-3285T-desulfatet har antitumöraktivitet.

Menetelmä kasvainten vastaisen antibiootin BU-3285T tai BU-3285T-desulfaatin valmistamiseksi

5 Tämä keksintö koskee menetelmää uuden kasvaimia vastustavan antibiootin BU-3285T:n valmistamiseksi kasvatamalla Chainia-sukuun kuuluvaa mikro-organismia. Tämä yhdiste osoittaa korkeaa kasvaimia vastustavaa aktiivisuutta, ja sillä on myös sienä vastustavaa aktiivisuutta. Keksintö koskee myös menetelmää BU-3285T-desulfaatin valmistamiseksi, joka saadaan BU-3285T:n sulfaattisidoksen entsyymaattisella katkaisulla tietyillä sulfataasientsyymeillä. Desulfatoidulla johdannaisella on kasvaimia vastustavaa aktiivisuutta. Keksintö koskee myös BU-3285T:tä tuottavaa Chainia rosea ATCC 53903 viljelmää.

15 Tekniikan tason viitteiden joukossa, joista viitteistä hakijat ovat tietoisia, seuraava edustaa sitä, jonka uskotaan olevan lähinyä tekniikan tasoa.

20 US-patentti nro 4 495 286, joka julkaistiin 22. tammikuuta 1985, tuo esiin biologisesti puhtaan Streptomyces pulveracus -mikro-organismien alalajin fostreus ATCC 31906:n viljelmän, joka pystyy tuottamaan CL 1565 -antibioottikompleksia, joka on hyödyllinen antibioottina ja kasvaimia vastustavana aineena/aineina.

25 US-patentti nro 4 578 383, joka julkaistiin 25. maaliskuuta 1986, esittää uusia fosforia sisältäviä antibioottisia yhdisteitä, CL 1565 ja niiden suolat, kuten myös farmaseuttisia koostumuksia, jotka sisältävät yhdisteiden erilaisia suoloja yksistään tai yhdessä muiden kasvaimia vastustavien aineiden kanssa.

30 US-patentti nro 4 680 416, joka julkaistiin 14. heinäkuuta 1987, esittää uusia pyranoniyhdisteitä ja niihin liittyviä yhdisteitä, menetelmiä yhdisteiden valmistamiseksi ja niiden käyttöä sytotoksisina ja/tai leukemiaa vastustavina aineina.

Mikään näistä viitteistä ei esitä tämän keksinnön mukaisia uusia yhdisteitä tai niiden käyttöä kasvaimia ja sieniä vastustavina antibiootteina.

Kuvio 1 esittää BU-3285T:n IR-spektrin.

5 Kuvio 2 esittää BU-3285T:n <sup>1</sup>H-NMR-spektrin (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>:ssa).

Tämä keksintö koskee menetelmää uuden kasvaimia ja sieniä vastustavan antibiootin, jota nimitetään BU-3285T:ksi, valmistamiseksi fermentaatiomenetelmällä käyttäen uutta aktinomykeettiä, jota tässä nimitetään Chainia rosea-kannaksi L827-7 (ATCC-53903), ja BU-3285T:n desulfatoidun johdannaisen valmistamiseksi BU-3285T:n entsyymaattisella käsittelyllä tietyillä sulfataaseilla. BU-3285T-desulfatilla on huomattu olevan kasvaimia vastustavaa aktiivisuutta. Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 1 esitetään.

Edullinen tuottava kanta BU-3285T:n tuottamiseksi on aktinomykeetti, kanta nro L827-7, joka eristettiin Gujaratin osavaltiossa, Intiassa kerätystä maanäytteestä. Uuden BU-3285T-antibiootin ja tunnettujen sivutuotteiden, kromomysiinin, pentalenolaktonin ja aburamysiinin seos saatiin fermentoimalla tätä kantaa.

Morfologian, kasvun ja fysiologisten tunnusmerkkien ja solukemian perusteella yllämainittu tuottava kanta tunnistettiin Chainia-suvuksi, toisin sanoen Chainia roseaksi.

Morfologia: Ilmamyyseeliä ei muodostu tai sitä muodostuu vain niukalti agarkasvualustan pinnalle. Substraattimyyseelit ovat hyvin haarautuneita, eivätkä ne ole katkonaisia. Substraattimyyseelissä syntyy pääasiallisesti pallo-  
30 lomaisia, läpikuultavia osasia (3 - 10 µm), joissa on yksittäinen tai useampi varrellinen hyyfi, joista osasista tulee kovettuneita pallon muotoisia kappaleita (halkaisija 10 - 60 µm). Elektronimikroskoopilla tutkiminen osoittaa,  
35 että pallon muotoinen pinta on aaltomainen eikä sillä ole

membraania. Ultraohuet preparaattit näyttävät pallojen vai-  
pan epätasaisesti kiertävät ja osittain turvonneet hyyfit,  
jotka ovat liittyneet yhteen ekstrasellulaarisen metabo-  
liitin kanssa.

5 Ilmamyyseelillä, jota tuskin muodostuu, on kiinteät  
tai avokierteiset itiöketjut (20 - 50 tai enemmän itiöitä  
ketjussa). Itiöt ovat soikeita tai pitkulaisia (0,6 x 0,8  
- 1,2  $\mu\text{m}$ ), ja niillä on pehmeä pinta.

10 Kasvulliset ja fysiologiset tunnusmerkit: Ilmassa  
kasvavaa myseeliä ei yleensä muodostu, mutta sitä nähdään  
niukalti ISP-kasvualustoilla nrot 4 ja 7. Substraattimy-  
seelin alla oleva väri on syvästä oranssista tummaan puna-  
ruskeaan. Nämä pigmentit eivät ole diffundoituvia.

15 Melaniinia ei muodostu, ja tyrosinaasireaktio on  
negatiivinen.

20 Solukemia: Kokosoluhydrolysaatti sisältää LL-diami-  
nopimeliinihappoa ja mannoosia, ja siten kuuluu tyyppiin  
I. Fosfolipidit sisältävät fosfatidyylietanoliaamia, ja  
ne on siten sijoitettu malliin P-II. Palloset sisältävät  
2,3-diaminopropionihappoa.

Variantit: Spontaaneja variantteja, jotka muodosta-  
vat hyvin ilmassa kasvavaa myseeliä, esiintyy toistuvien  
siirrostusten yhteydessä.

25 Taksonominen asema: Palloset identifioidaan rihmas-  
topakkana, joka kuvataan Chainiassa.<sup>1,2</sup> Morfologia ja solu-  
kemia osoittavat, että kanta L827-7 luokitellaan Chainia-  
sukuun. Taulukossa 1 ja 2 esitetyt kasvun ja fysiologiset  
tunnusmerkit selvittivät, että kanta muistuttaa Chainia  
30 aureaa, C. flavaa, C. minutiscleroticaa, C. roseaa ja  
C. rubraa, erityisesti suvun 15 lajin joukosta C. roseaa.  
<sup>1,2,3</sup> Siten kanta L827-7 identifioitiin uudeksi Chainia  
rosea -kannaksi.

- 
- 1 Lechevalier, M.P.; H.A. Lechevalier ja C.E. Heintz:  
Morphological and chemical nature of the Sclerotia of  
Chainia olivacea Thirumalachar and sukapore of the order  
5 Actinomycetales. Int. J. Syst. Bacteriol. 23: 157-170,  
1973.
- 2 Ruan, J.; M.P. Lechevalier, C. Jiang ja H.A. Lechevalier:  
Chainia kunmingensis, a new actinomycete species found in  
soil. Int. J. Syst. Bacteriol. 35: 164-168, 1985.
- 10 3 Shirling, E.B. ja D. Gottlieb: Cooperative description of  
type strain of Streptomyces. V. Additional descriptions.  
Int. J. Syst. Bacteriol. 22: 265-394, 1972.

Taulukko 1

Kannan L827-7 kasvun tunnusmerkit

<u>Kasvualue</u>	<u>Kasvu</u>	<u>ilmassa kasvava myseeli</u>	<u>Vastaväri</u>	<u>diffundoituva pigmentti</u>
sakkarooosi-nitraattiagar (Czapek-Dox agar)	hyvä	ei	keskinkertainen punaruskea (43)	ei
tryptoni-hiivauuteliemi (ISP nro 1)	kohtuullinen, ei samaa	ei	väritön	ei
hiivauute-mallasuuteagar (ISP nro 2)	hyvä	ei	syvä oranssi (51)	tumma oranssinkeltainen (72)
kaurajauhoagar (ISP nro 3)	kohtuullinen	ei	keskinkert. keltainen(87)	harmahtava keltainen (90)
epäorgaanisia suoloja sisältävä tärkkelysagar(nro 4)	kohtuullinen	heikko; valkoinen	ruskeahko oranssi (54)	ei
glyseroli-asparagiiniagar (ISP nro 5)	kohtuullinen	ei	tumma punaruskea (44)	vaalea punaruskea (42)
peptoni-hiivauute-rautaagar (nro 6)	heikko	ei	väritön	ei
tyrosiiniagar (ISP nro 7)	kohtuullinen	niukka; valkoinen	tummanruskea (59)	keskinkert. ruskea (58)
glukoosi-asparagiiniagar	heikko	ei	vahva keltainen (84)	ei
ravintoagar	heikko	ei	väritön	ei
Bennettin agar	kohtuullinen	ei	vahva keltainen (84)	ei

lavannot 3 viikon inkuboinnin jälkeen 28°C:ssa

Väri ja numero sulussa seuraa ISCC-NBS väri-nimi -taulukkoita

Taulukko 2  
Kannan L827-7 fysiologiset tunnusmerkit

	Hydrolyysi:		laktoosi	+
			sellobioosi	+
5	gelatiini	+	melibioosi	-
	tärkkelys	+	trehaloosi	+
	ksantiini	-	raffinoosi	-
			D-melezitoosi	-
10	Maito: koagulaatio	+	liukeneva tärk-	+
			kelys	
	peptonisaatio	+	selluloosa	-
			dulsitoli	-
	Toleranssi:		inositoli	+ <sup>w</sup>
			D-mannitoli	+
15	lysotsyymi	-	D-sorbitoli	-
	0,01 %			
	0,001 %	+	salisiini	+
	NaCl 1 - 7 %	+	bentsoaatti	-
	8 %	-	oksalaatti	+
20	pH 5,0 - 10,5	+	tartraatti	-
	Lämpötila:		hapon tuotto:	
	kasvuaalue			
	18°C - 45°C		adonitoli	-
	optimikasvu			
25	35°C - 40°C		dulsitoli	-
	ei kasvua			
	14°C & 48°C		erytritoli	-
			i-inositoli	+ <sup>w</sup>
	Tuotto:		laktoosi	+
30	nitraatti-	-/+ <sup>*</sup>	D-melibioosi	+
	reduktaasi			
	tyrosinaasi	-	α-metyylygluko-	+ <sup>w</sup>
			sidi	
	ureaasi	+	raffinoosi	-
			L-ramnoosi	+
35	Hyväksikäyttö:		D-sorbitoli	-
			sakkaroosi	-
	glyseroli	+	D-ksyloosi	+

Taulukko 2 (jatk.)

	D-arabinoosi	-
	L-arabinoosi	+
5	D-ksyloosi	+
	D-riboosi	+
	L-ramnoosi	+
	D-glukoosi	+
	D-galaktoosi	+
10	D-fruktoosi	+
	D-mannoosi	+
	L-sorboosi	-
	sakkaroosi	+ <sup>w**</sup>
	<hr/>	
15	* Czapekin sakkaroosi-nitraatti -liemi/peptoni-nit- raatti -liemi	
	**+w heikosti positiivinen	

Chainia rosea -kannan nro L827-7 biologisesti puhdas viljelmä on talletettu American Type Culture Collection -talletuslaitokseen, Rockvilleen, Marylandiin talletusnumerolla ATCC-53903.

Kuten muidenkin mikro-organismien, myös uuden, tämän keksinnön mukaisen, BU-3285T:tä tuottavan viljelmän, Chainia rosea ATCC-53903:n, tunnusmerkit ovat muuntelun kohteena. ATCC-53903-kannan rekombinantteja, variantteja ja mutantteja voidaan saada aikaan käsittelemällä erilaisilla tunnetuilla mutageeneilla, kuten UV-säteily, röntgensäteily, korkeataajuiset radioaallot, radioaktiivinen säteily ja kemikaalit. Chainia rosea ATCC-53903:n luonnolliset ja aikaansaadut variantit, mutantit ja rekombinantit, jotka säilyttävät ominaispiirteen tuottaa BU-3285T:tä, aiotaan sisällyttää tähän keksintöön.

BU-3285T:tä voidaan tuottaa viljelemällä Chainia rosean BU-3285T:tä tuottavaa kantaa, edullisesti Chainia rosea ATCC-53903:a tai sen mutanttia tai varianttia, ve-

denalaisissa aerobisissa olosuhteissa vesipitoisessa ravintoalustassa. Organismi kasvaa ravintoalustassa, joka sisältää assimiloituvan hiililähteen, esim. assimiloituvan hiilihydraatin. Esimerkkejä sopivista hiililähteistä ovat

5 laktoosi, glyseroli, sakkaroosi, maissitärkkelys, glukoo-  
si, mannoosi, fruktoosi, sellobioosi, trehaloosi, mannito-  
li ja ksyloosi. Ravintoalustan pitäisi sisältää myös assi-  
miloituva typpilähde, kuten kalajauhoa, peptonia, soija-  
jauhoa, maapähkinäjauhoa, puuvillansiemenjauhoa ja mais-  
10 sinliotusvettä. Epäorgaaniset ravintosuolat voidaan myös  
sisällyttää kasvualustaan, ja sellaiset suolat saattavat  
käsittää mitkä tahansa tavallisista suoloista, jotka pys-  
tyvät antamaan natriumia, kaliumia, ammoniumia, kalsiumia,  
fosfaattia, sulfaattia, kloridia, bromidia, nitraattia,  
15 karbonaattia tai vastaavanlaisia ioneja.

BU-3285T-antibiootin tuotanto voidaan saada aikaan missä tahansa lämpötilassa, joka osaltaan vaikuttaa organismin tyydyttävään kasvuun, toisin sanoen suunnilleen 18 - 45 °C:ssa, ja sopivasti se toteutetaan noin 28 °C:n läm-  
20 pötilassa. Tavallisesti optimituotanto saadaan 3 - 4 päi-  
vän inkuboinnin jälkeen. Fermentaatio voidaan toteuttaa pulloissa ja erilaiset kapasiteetit omaavissa laboratorio-  
ja teollisuusfermentoreissa. Kun toteutetaan säiliöfermen-  
tointi, on toivottavaa tuottaa vegetatiivinen ympäri ravin-  
25 toliemessä siirrostamalla liemiviljelmä vinopinta- tai  
maaperäviljelmällä tai organismin lyofilisoidulla viljel-  
mällä. Kun saadaan tällä tavalla aktiivinen ympäri, se  
siirretään aseptisesti fermentaatio-säiliön kasvualustaan  
antibiootin suuren mittakaavan tuotantoa varten. Kasvu-  
30 alusta, jossa vegetatiivinen ympäri tuotetaan, voi olla  
samanlainen tai erilainen kuin se, jota käytetään säiliös-  
sä uuden antibiootin tuottamiseen, kunhan se on sellainen,  
että saadaan hyvä mikro-organismin kasvu.

BU-3285T-antibiootin tuottamista voidaan seurata  
35 fermentoinnin aikana testaamalla lieminäytteitä tai mysee-

lin kiintoaineiden uutteista antibioottista aktiivisuutta  
organismeihin, joiden tiedetään olevan herkkiä antibioot-  
tille. Tämän antibiootin testaamisessa hyödylliset testi-  
organismit ovat Candida albicans A9540 ja Cryptococcus  
5 neoformans IAM4514. Määritys tehdään edullisesti paperi-  
kiekkokokeena agarmaljoilla.

Kun fermentaatio on täydellinen, BU-3285T otetaan  
talteen fermentaatioliemestä ja erotetaan kolmesta tunne-  
tusta sivutuotteesta, pentalenolaktonista, aburamysiinistä  
10 ja kromomysiinistä, uuttamalla sopivalla orgaanisella  
liuottimella, jota seuraa sarja pylväskromatografioita.  
Esimerkit 1 ja 2 valaisevat yksityiskohtaisia menetelmiä  
BU-3285T:n saamiseksi melkoisen puhdistettuun muotoon.

#### Esimerkki 1

15 BU-3285T:n fermentaatio

Hyvin kasvanutta Chainia rosea -kannan nro L827-7  
vinopintaa käytettiin 500 ml:n erlenmeyerpullon siirrosta-  
miseen, jossa pullossa oli 100 ml vegetatiivista kasvu-  
alustaa sisältäen 2 % mallasuutetta (Oriental), 2 % mais-  
sinliotusvettä (Oji Corn Starch Co.), 0,5 % NaCl, 0,02 %  
20 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ja 0,2 % CaCO<sub>3</sub> (pH 7,0, ennen sterilointia).

Vegetatiivista kasvualustaa inkuboitiin 28 °C:ssa  
3 päivää pyörivässä ravistelijassa (200 rpm), ja sen jäl-  
keen 5 ml viljelmästä siirrettiin 500 ml:n erlenmeyerpul-  
loon, joka sisälsi 100 ml tuotantoalustaa, jolla oli sa-  
manlainen koostumus kuin vegetatiivisella kasvualustalla.  
25 Fermentaatio toteutettiin 28 °C:ssa 4 päivässä pyörivässä  
ravistelijassa. Antibiootin tuotanto fermentaatioliemessä  
määritettiin paperikiekko-agar-diffuusiomenetelmällä käyt-  
täten testiorganismina Candida albicans A9540:a.  
30

Fermentaatio toteutettiin myös säiliöfermentorissa.  
Pullofermentaatiossa valmistetusta ympyviljelmästä 2 l  
siirrostettiin 200 l:n säiliöfermentorissa olevaan  
120 litraan tuotantoalustaa. Fermentaatio toteutettiin  
35 28 °C:ssa ravistelunopeudella 250 rpm ja ilmastusnopeudel-

la 120 litraa minuutissa. Antibiootin tuotanto saavutti maksimin 30 µg/ml 70 tunnin fermentaation jälkeen.

### Esimerkki 2

#### Uuttaminen ja puhdistaminen

5 Saatuun liemeen (58 l, pH 7,5), joka valmistettiin esimerkissä 1 annetun menetelmän mukaan, lisättiin n-butanolia (40 l) ja sekoitettiin yksi tunti. Seos jaettiin orgaaniseen ja vesipitoiseen kerrokseen Sharples-sentrifuugin avulla (Kokusan nro 4A). Orgaaninen uute (30 l)  
10 konsentroidtiin tyhjiössä atseotrooppisesti lisäämällä vettä silloin tällöin, yhteensä yksi litra. Konsentraatti lisättiin tipoittain n-heksaaniin (10 l) antibioottikompleksin (32,2 g) saostamiseksi tumman ruskeaksi kiinteäksi aineeksi. Raakakiintoaine liuotettiin 50 %:een vesipitoiseen metanoliin (300 ml) ja se laitettiin Diaion HP-20  
15 -kolonniin (Mitsubishi Kasei, 8 x 20 cm). Kun kolonni oli pesty 50 %:lla vesipitoisella metanolilla (2,8 l), kolonni kehitettiin 80 %:lla vesipitoisella metanolilla ja sitten 80 %:lla vesipitoisella asetonilla. Eluaatti kerättiin 120  
20 ml:n fraktioissa, jotka tutkittiin paperikiekkokokeella käyttäen testikantana *Cryptococcus neoformans* IAM4514:ä. Aktiiviset fraktiot yhdistettiin ja konsentroidtiin tyhjiössä, jotta saatiin ruskea sakka (11,0 g). Sakka kromatografioitiin silikageelikolonniin (Wako gel C-200,  
25 4 x 70 cm) ensin käyttäen eluenttina n-heksaani-asetonia (1:1 v/v) ja sitten asetonia. Eluaatteja tarkasteltiin myrkyllisyyskokeen (*C. neoformans* IAM4514) ja TLC:n (SiO<sub>2</sub>, n-butanoli-etikkahappo-vesi = 4:1:1 v/v) perusteella. Sivutuoteantibioottien eluoinnin jälkeen n-heksaani-asetonilla (1:1 v/v), BU-3285T eluointiin asetonilla. Sopivat  
30 fraktiot yhdistettiin ja konsentroidtiin tyhjiössä. Sakka kromatografioitiin käänteisfaasisilikageelikolonniin (ODS-60, 350/250 mesh, Yamamura Chemical Lab, kolonni 4 x 32 cm), joka oli esikäsitelty M/15-fosfaattipuskuri (pH 7,0)-asetonitriilillä (8:2 v/v). Kun kolonni oli pesty  
35

samalla liuottimella (5 l), se kehitettiin M/15-fosfaattipuskuri (pH 7,0)-asetonitrilillä (7:3 v/v) BU-3285T:n eluomiseksi. Vastaavien fraktioiden konsentroiminen ja sitä seuraava suolan poisto Diaion HP-20 :llä tuotti puolipuhtaan kiinteän aineen (2,2 g). Kiinteää ainetta käsiteltiin EDTA:lla (2 g) 10 %:ssa vesipitoisessa metanolissa (pH 9,0, 100 ml) ja liuos laitettiin Diaion HP-20 -kolonnin (40 ml) läpi ylimääräisen EDTA:n poistamiseksi. Saatu aktiivinen kiinteä aine kromatografioitiin Sephadex LH-20 -kolonnissa (4 x 40 cm) käyttäen metanolia kehittävänä liuottimena. Kun eluaattia oli tarkasteltu yllä kuvatulla tavalla myrkyllisyyskokeella (C. neoformans IAM4514) ja TLC:llä, sopivat fraktiot konsentroitiin tyhjiössä, jotta saatiin 753 mg puhdasta BU-3285T:tä valkoisena amorfisena jauheena.

#### Fysiko-kemialliset ominaisuudet

BU-3285T saatiin valkoisena amorfisena kiinteänä aineena. Tämä kiinteä aine oli liukoinen veteen, metanoliiin, etanoliin ja dimetyylisulfoksiidiin, jossain määrin liukoinen asetoniin ja etyyliasetaattiin mutta liukenematon kloroformiin ja n-heksaaniin. Se antoi positiivisen reaktion jodihöyryn ja rikkihapon kanssa, mutta negatiivisen reaktion ninhydiini- ja antronitesteille. BU-3285T:n FAB-massaspektri osoitti pseudomolekulaarisia ioneja m/z 493 (M+H)<sup>+</sup>, 515 (M+Na)<sup>+</sup> ja 531 (M+K)<sup>+</sup>, jotka vastaavat molekyyllipainoa 492. BU-3285T:n molekyylikaavaksi osoitettiin C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>O<sub>8</sub>SNa suuren resoluution FAB-massaspektrillä [M+Na<sup>+</sup>, m/z 515,1692; laskettuna C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>O<sub>8</sub>SNa<sub>2</sub>, m/z 515,1714].

BU-3285T:n fysiko-kemiallisista ominaisuuksista on yhteenveto taulukossa 3. IR-spektri (Kuva 1.) osoitti absorptiovoita 3400, 2930, 1720, 1635, 1460 ja 1260 cm<sup>-1</sup>:ssä. Vahva karbonyyliabsorptio 1720 cm<sup>-1</sup>:ssä viittasi α, β-tyydyttämättömään δ-laktoniin, ja absorptio 1260 cm<sup>-1</sup>:ssä viittasi sulfaattiryhmään antibiootissa. BU-3285T:n UV-spektrillä oli tunnusomaiset maksimit 260, 269 ja 279

nm:ssä, jotka maksimit eivät muuttuneet happamassa tai alkalisessa liuoksessa, osoittaen konjugoitunutta trieeniryhmää molekyylissä. BU-3285T:n  $^1\text{H}$ -NMR-spektri (Taulukko 4 ja kuvio 2) osoitti kaksi metyyli- ( $\delta$ : 0,64 ja 0,87), viisi metyleeni- ( $\delta$ : 1,23 - 1,29, 1,36, 2,10 ja 2,17 & 2,38), viisi metiini- ( $\delta$ : 1,23 - 1,29, 4,09, 4,29, 4,46 ja 4,79) ja kymmenen olefiinistä protonia ( $\delta$ : 5,35, 5,67, 5,74, 5,79, 5,95, 6,00, 6,14, 6,47, 6,54 ja 6,99). BU-3285T:n  $^{13}\text{C}$ -NMR (Taulukko 5) näytti 23 hiilimerkkiä sisältäen kaksi metyyli- ( $\delta$ : 8,7 ja 13,9), viisi metyleeni- ( $\delta$ : 21 - 37), viisi metiini- ( $\delta$ : 40 - 82), kymmenen  $\text{sp}^2$ - ( $\delta$ : 120 - 147) ja yhden karbonyylihiilen ( $\delta$ : 163,4).

#### Rakenteellinen määrittely

Kuten aikaisemmin mainittiin, BU-3285T:llä on määritetty olevan molekyylikaava  $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{O}_8\text{SNa}$  korkean resoluution FAB-massaspektrometrillä. UV-absorptiomaksimit 260, 269 ja 279 nm:ssä viittaavat trieeniryhmän läsnäoloon antibiootissa. Sen IR-spektri sisälsi vahvoja absorptioita 1720 ja 1260  $\text{cm}^{-1}$ :ssä viitaten vastaavasti  $\alpha$ ,  $\beta$ -tyydyttämättömään  $\delta$ -laktoniin ja O-sulfonyryhmään. Fragmentti-ioni ( $\text{M}-\text{SO}_3\text{Na}$ -,  $m/z$  389) havaittiin yhdessä pseudomolekulaarisen ionin ( $\text{M}-\text{H}^-$ ,  $m/z$  491) kanssa negatiivisessa SIMS-spektrissä, tukien mononatriumsulfaattiesterin läsnäoloa BU-3285T:ssä. Kymmenen olefiinisen protonin joukossa BU-3285T:n  $^1\text{H}$ -NMR:ssä merkit  $\delta$ : 5,95:ssä ja 6,99:ssä osoitettiin vastaavasti  $\alpha$ ,  $\beta$ -tyydyttämättömän  $\delta$ -laktonin  $\alpha$ - ja  $\beta$ -protoniksi.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY -kokeessa tämä  $\delta$ -protoni liitettiin pariksi hydroksyyliiryhmän ( $\delta$ : 4,09) omaavan metiini-protonin kanssa, joka vuorostaan liitettiin pariksi toisen happea sisältävän metiiniprotonin ( $\delta$ : 4,79) kanssa  $\delta$ -laktonirenkaan muodostamiseksi. COSY-tutkimus selvitti lisäksi, että protoni  $\delta$ : 4,79:ssä liittyi trans-kaksoissidokseen ( $\delta$ : 5,69 ja 5,79) ja sitten  $\text{CH}_2\cdot\text{CH}(\text{OSO}_3\text{Na})\cdot\text{CH}(\text{CH}_3)\cdot\text{CH}(\text{OH})$ -ryhmään aikaansaaden osarakenteen (A). Sulfaatin paikka määritettiin  $^{13}\text{C}$ -NMR:llä, jossa C-9 resonoi huomatt-



analogioihin. Kuitenkin se on erilainen kuin tunnetut anti-  
tibiootit siinä, että sillä on mononatriumsulfaattiesteri-  
toiminnallisuus.

5 BU-3285T osoittaa in vitro sieniä vastustavaa ak-  
tiivisuutta ja sytotoksisuutta ja voimakasta in vivo eh-  
käisevää aktiivisuutta hiireen siirrettyä P388- ja L-1210-  
leukemiaa ja B16-melanoomaa vastaan. Rakenteellisesti lä-  
heisesti yhteen liittyvästä fostriesiini-antibiootista ja  
10 sen analogioista on raportoitu, että niillä ei ole sieniä  
vastustavaa aktiivisuutta eikä kasvaimia vastustavaa vai-  
kutusta B16-melanoomaa vastaan. BU-3285T:n huomattiin myös  
olevan proteiinisynteesin spesifinen inhibiittori L-1210-  
leukemiasoluissa.

### Taulukko 3

#### 15 BU-3285T:n fysiko-kemialliset ominaisuudet

luonne	: valkoinen amorfinen kiinteä aine
sulamispiste (haj.)	: 123 - 125°C
20 $[\alpha]_D^{24}$ (c 1.0, MeOH)	: + 23°
UV $\lambda_{\max}$ nm ( $\epsilon$ )	: 260(25,600), 269(31,600), 279(24,400)
25 molekyylikaava	: $C_{23}H_{33}O_8Na$
FAB-massa (m/z)	: 493(M+H) <sup>+</sup> , 515(M+Na) <sup>+</sup> , 531(M+K) <sup>+</sup>
30 HR-FAB-massa	: 515,1692 (M+Na) <sup>+</sup>
	(laskettu $C_{23}H_{33}O_8Na_2$ , m/z 515,1714)
35 TLC, SiO <sub>2</sub>	: R <sub>f</sub> 0,42
(n-butanoli-etikkahappo-vesi= 4:1:1 v/v)	

## Taulukko 4

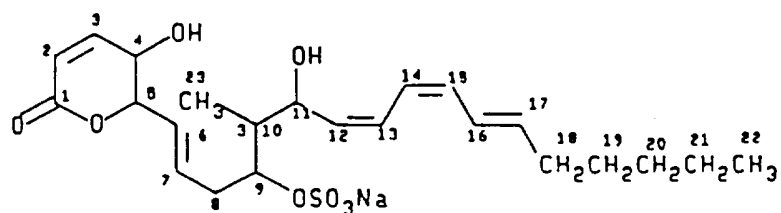
BU-3285T:n  $^1\text{H-NMR}$ -spektri (400 MHz, DMSO- $d_6$ :ssa)

	protoni	BU-3285T
5	23-CH <sub>3</sub>	0,64 (3H, d, J=6,8 Hz)
	22-CH <sub>3</sub>	0,87 (3H, t, J=6,8 Hz)
10	10-CH, 20-CH <sub>2</sub> , 21-CH <sub>2</sub>	1,23 - 1,29 (5H, m)
	19-CH <sub>2</sub>	1,36 (2H, m)
	18-CH <sub>2</sub>	2,10 (2H, m)
15	8-CH <sub>2</sub>	2,17 & 2,38 (2H, m)
	4-H	4,09 (1H, dd, J=5,4 & 2,9 Hz)
20	11-H	4,29 (1H, t, J=10,2 Hz)
	9-H	4,46 (1H, m)
	5-H	4,79 (1H, dd, J=7,3 & 2,9 Hz)
25	12-H	5,35 (1H, dd, J=10,2 & 11,3 Hz)
	6-H	5,67 (1H, dd, J=15,7 & 7,3 Hz)
30	17-H	5,74 (1H, m, J=15,1 & 7,3 Hz)
	7-H	5,79 (1H, m)

Taulukko 4 (jatk.)

	protoni	BU-3285T
5	2-H	5,95 (1 H, d, J=9,7 Hz)
	15-H	6,00 (1H, t, J=11,3 Hz)
10	13-H	6,14 (1H, t, J=11.3 Hz)
	14-H	6,47 (1H, t, J=11.3 Hz)
	16-H	6,54 (1H, dd, J=15.1 & 11,3 Hz)
15	3-H	6,99 (1H, dd, J=9,7 & 5,4 Hz)

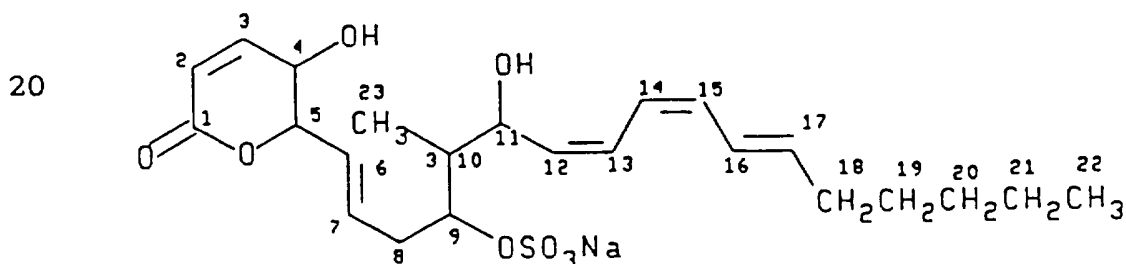
20



Taulukko 5  
BU-3285T:n  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektri (100 MHz DMSO- $d_6$ :ssa)

5	C-1	163,4 (s)*	C-13	123,0 (d)
	2	120,9 (d)	14	123,5 (d)
	3	146,9 (d)	15	129,7 (d)
	4	61,6 (d)	16	125,6 (d)
	5	81,4 (d)	17	136,5 (d)
10	6	126,8 (d)	18	32,4 (t)
	7	131,9 (d)	19	28,4 (t)
	8	36,8 (t)	20	30,8 (t)
	9	71,0 (d)	21	21,9 (t)
	10	40,1 (d)	22	13,9 (q)
15	11	66,8 (d)	23	8,7 (q)
	12	135,2 (d)		

\*Multiplicity in off-resonanssispektri



25           BU-3285T:n kasvaimia vastustava aktiivisuus

BU-3285T:tä testattiin in vitro -sytotoksisuuden suhteen useita hiiren ja ihmisen kasvainsolulinjoja vastaan ja in vivo kasvaimia vastustavan aktiivisuuden suhteen hiirissä. Mitomysiini C:tä käytettiin vertailuyhdisteenä sekä in vitro - että in vivo -kokeissa. B16-F10 (hiiren melanooma) - ja Moser (ihmisen paksusuoli-peräsuolialueen syöpä) -soluja kasvatettiin logaritmiseen vaiheeseen parannellulla Eagle-minimikasvualustalla, johon oli lisätty sikiövasikan seerumia (FCS, 10 %) ja kanamysiiniä

30

35 (60 µg/ml); HCT-116 (ihmisen paksusuolisyöpä) -solut oli-

vat McCoy'n 5A -kasvualustalla, johon oli lisätty FCS:a (10 %), penisilliiniä (100 U/ml) ja streptomysiiniä (100 µg/ml); ja P388 (hiiren lymfosyyttinen leukemia) -solut ja sen vinkristiinille resistentti alalinja (P388/VCR) olivat  
5 RPMI 1640 -kasvualustalla, johon oli lisätty FCS:a (10 %), penisilliiniä (100 U/ml) ja streptomysiiniä (100 µg/ml).

B16-F10-, Moser-, HCT-116- ja P388-solut kerättiin ja siirrettiin 96-koloisen (B16-F10-, Moser- ja HCT-116-soluille) tai 24-koloisen (P388-soluille) kudosisviljelyle-  
10 vyn koloihin testimateriaalien kanssa siirrostusmääriltään vastaavasti  $3 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$  ja  $2 \times 10^4$  solua/ml. Niitä inkuboitiin 37 °C:ssa kostutetussa ilmassa, jossa oli 5 % CO<sub>2</sub> ja 95 % ilmaa, 72 tunnin ajan. Sytotoksisuus määritettiin kolorimetrisesti aallonpituudella 540 nm sen  
15 jälkeen, kun solut oli värjätty 0,006 % neutraalilla punaisella liuoksella. P388-soluille elävien solujen lukumäärä määritettiin Coulter-laskurilla. Kuten taulukosta 6 näkyy, kolmessa ei-leukemia-solulinjassa, B16-F10-, HCT-166- ja Moser-soluissa, BU-3285T osoitti voimakkainta  
20 sytotoksista aktiivisuutta Moser-soluja (luonnostaan esiintyviä lääkeresistenttejä soluja) vastaan. Mielenkiintoisesti tämä yhdiste osoitti melkein samaa sytotoksisuutta P388/VCR:ää vastaan kuin sen kantasoluja vastaan.

BU-3285T:n ehkäisevät vaikutukset makromolekyyli-  
25 biosynteesissä (DNA, RNA ja proteiini) määritettiin kasvatetuissa L1210-hiirileukemiasoluissa. Soluja ( $5 \times 10^5$  solua/ml) inkuboitiin yhdisteen kanssa 37 °C:ssa 15 minuuttia ja inkubointia jatkettiin 60 minuuttia merkityn prekursorin, 3H-tymiinin, 14C-uridiinin tai 3H-leusiinin li-  
30 säyksen jälkeen kasvatusseokseen. Jäähdytetyllä 5 % trikloroetikkahappoliuoksella pesun jälkeen solujen happoon liukenemattomaan fraktioon liittynyt radioaktiivisuus määritettiin nestetuikelaskurilla. Kuten taulukosta 7 näkyy, BU-3285T ehkäisi proteiinisynteesiä 18 kertaa voimakkaam-  
35 min kuin RNA-synteesiä. Tämä yhdiste ei osoittanut merkit-

tävää ehkäisevää vaikutusta DNA-synteesiin korkeimmalla testatulla konsentraatiolla 100 µg/ml.

BU-3285T:n in vivo kasvaimia vastustava aktiivisuus määritettiin kokeellisissa hiirikasvaimissa. Naaraspuolisiin CDF<sub>1</sub>-hiiriin siirrostettiin vatsaontelon sisäisesti 0,4 ml laimennettua ascites -nestettä, joka sisälsi 10<sup>6</sup> lymfocyttisiä leukemia-P388-solua tai 10<sup>5</sup> imuleukemia-L1210-solua, ja urospuolisiin BDF<sub>1</sub>-hiiriin siirrostettiin vatsaontelon sisäisesti 0,5 ml 10 % melanoottista melanooma-B16-sosetta. Testiyhdisteet annettiin vatsaontelon sisäisesti hiirille seuraavan käsittelysuunnitelman mukaan; päivinä 1, 2 ja 3 (Q1D x 3) tai päivinä 1, 4 ja 7 (Q3D x 3). Kuten taulukoista 8, 9 ja 10 näkyy, BU-3285T osoitti hyvää kasvaimia vastustavaa aktiivisuutta kaikissa testatuissa kasvaimissa. Verrattuna mitomysiini C:hen tämän yhdisteen aktiivisuus oli verrannollinen aktiivisuuteen P388-leukemiaa vastaan, mutta jonkin verran heikompi B16-melanoomaa ja L1210-leukemiaa vastaan pienimmän tehokkaan annoksen muodossa.

#### Taulukko 6

In vitro -sytotoksisuus hiiren ja ihmisen kasvainsoluja vastaan

	IC <sub>50</sub> (µg/ml)				
<u>yhdiste</u>	<u>B16-F10</u>	<u>HCT-116</u>	<u>Moser</u>	<u>P388</u>	<u>P388/VCR</u>
BU-3285T	13,3	3,4	0,85	3,8	4,4
mitomysiini C	0,5	0,8	1,2	ND*	ND

\*ND: ei tehty

Taulukko 7

Makromolekyylibiosynteesin ehkäisy L1210 -leukemiasoluissa

5	<u>yhdiste</u>	<u>IC<sub>50</sub>-(µg/ml)</u>		
		<u>DNA</u>	<u>RNA</u>	<u>proteiini</u>
	BU-3285T	>100	14,4	0,78
10	mitomysiini C	1,7	>100	>100

Taulukko 8

## BU-3285T:n kasvaimia vastustava aktiivisuus P388 -leukemiaa vastaan (ip)

15	<u>yhdiste</u>	<u>annos</u> (mg/kg/- päivä)	<u>käsittely-</u> <u>suunnitel-</u> <u>ma (ip)</u>	<u>MST*1</u> (päivä)	<u>T/C</u> (%)	<u>ruumiinpai-</u> <u>non muutos</u> <u>päivänä 4(g)</u>
	BU-3285T	10	Q1D x 3	16,0	160*2	0,0
		3	"	15,0	150*2	+1,5
		1	"	14,0	140*2	+1,0
20		0,3	"	13,0	130*2	+1,0
		0,1	"	12,0	120	+1,5
	mitomysiini C	3	Q1D x 3	20,0	200*2	-1,0
		1	"	13,5	135*2	+0,5
25		0,3	"	14,0	140*2	+1,0
		0,1	"	11,5	115	+1,8
	apuvaine	-	Q1D x 3	10,0	-	+1,3

30

\*1 keskimääräinen hengissäpysymisaika

\*2 osoittaa merkittävää kasvaimia vastustavaa vaikutusta

(T/C  $\geq$  125%)

Taulukko 9

BU-3285T:n kasvaimia vastustava aktiivisuus L1210 -leukemiaa vastaan (ip)

5	<u>yhdiste</u>	annos (mg/kg/ päivä)	käsittely- suunnitel- ma (ip)	MST*1 (päivä)	T/C (%)	ruumiinpai- non muutos päivänä 6 (g)
	BU-3285T	10	Q1D x 3	10,5	150*2	0,0
		3	"	9,0	129*2	+1,5
10		1	"	9,0	129*2	+1,5
		0,3	"	8,0	114	+2,5
		0,1	"	8,0	114	+2,3
	mitomysiini C	3	Q1D x 3	13,0	186*2	-2,5
15		1	"	9,5	136*2	+0,3
		0,3	"	10,0	143*2	+2,3
		0,1	"	8,5	121	+2,5
	apuaine	-	Q1D x 3	7,0	-	+3,1
20						

\*1 keskimääräinen hengissäpysymisaika

\*2 osoittaa merkittävää kasvaimia vastustavaa vaikutusta

(T/C  $\geq$  125%)

Taulukko 10

BU-3285T:n kasvaimia vastustava vaikutus B16 -melanoomaa vastaan (ip)

	annos (mg/kg/ päivä)	käsittely- suunnitel- ma (ip)	MST <sup>*1</sup> (päivä)	T/C (%)	ruumiinpai- non muutos päivänä 5 (g)	
5	<u>yhdiste</u>					
	BU-3285T	10	Q3D x 3	21,5	126 <sup>*2</sup>	+0,5
		3	"	26,5	156 <sup>*2</sup>	0,0
		1	"	22,5	132 <sup>*2</sup>	+0,5
10		0,3	"	20,0	118	+0,3
		0,1	"	18,5	109	+0,8
	mitomysiini C	2	Q3D x 3	34,5	203 <sup>*2</sup>	0,0
		1	"	23,0	135 <sup>*2</sup>	+1,0
15		0,5	"	22,0	129 <sup>*2</sup>	+0,3
		0,25	"	20,0	118	+0,3
	apuaaine	-	Q3D x 3	17,0	-	+0,8

20

\*1 keskimääräinen hengissäpysymisaika

\*2 osoittaa merkittävää kasvaimia vastustavaa vaikutusta  
(T/C  $\geq$  125%)

25

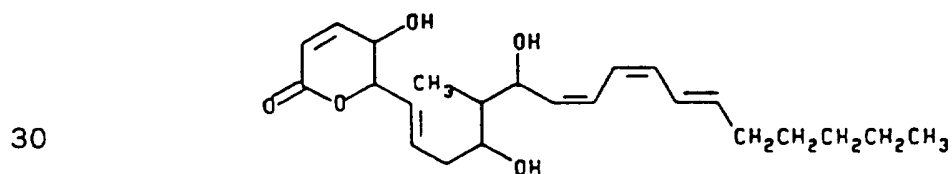
BU-3285T:n in vitro sieniä vastustava aktiivisuus

30

In vitro sieniä vastustava aktiivisuus määritettiin erilaisia sieniä vastaan sarja-agarlaimennusmenetelmällä. Sabouraud-dekstroosiagar (pH 7,0) käytettiin kokeeseen. Siirrostusmäärä säädettiin arvoon 10<sup>6</sup> CFU/ml. Neljäkymmenen tunnin inkuboinnin jälkeen 28 °C:ssa, pienin ehkäisevä konsentraatio (MIC) tutkittiin. Kuten allaolevasta yhteenvedosta selviää, BU-3285T osoitti suhteellisen hyvää ja laajaa sieniä vastustavaa profiilia.

5	testiorganismi	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		
		BU-3285T	amofote- risiini B	ketoko- natsoli
	<u>Candida albicans</u> IAM4888	25	1,6	50
	<u>C. albicans</u> A9540	25	1,6	50
	<u>Cryptococcus neoformans</u> D49	1,6	0,8	0,4
10	<u>C. neoformans</u> IAM4514	1,6	0,8	0,4
	<u>Aspergillus fumigatus</u> IAM2530	25	3,1	3,1
	<u>A. fumigatus</u> IAM2034	>100	3,1	6,3
	<u>A. flavus</u> FA21436	50	1,6	0,4
	<u>Fusarium moniliforme</u> A2284	25	3,1	6,3
15	<u>Piricularia oryzae</u> D91	50	12,5	3,1
	<u>Trichophyton mentagrophytes</u> D155	25	6,3	1,6
	<u>T. mentagrophytes</u> #4329	12,5	6,3	1,6
	<u>Blastomyces dermatidis</u> D40	12,5	12,5	0,4
	<u>Sporothrix schenckii</u> IFO8158	100	>100	6,3
20	<u>Petriellidium boydii</u> IFO8078	0,8	>100	1,6
	<u>Mucor spinosus</u> IFO5317	25	6,3	100

25 Tämän patenttihakemuksen ensimmäinen prioriteetti-  
hakemuksen jättämisen jälkeen tiettyjen sulfataasientsyy-  
mien huomattiin katkaisevan BU-3285T:n sulfaattisidoksen  
tuottaen desulfatoidun BU-3285T:n, jolla on kaava



35 Desulfatoitu johdannainen osoitti samanlaista in  
vitro sytotoksisuutta kuin kanta-antibiotti. Desulfatoitu  
yhdiste ei ollut aktiivinen yhdessä in vivo -testissä,  
joka toteutettiin hiiren lymfosyyttisessä leukemia

P388:ssa. Desulfatoitu yhdiste ei osoittanut aktiivisuutta sieniä vastaan in vitro.

BU-3285T:tä käsiteltiin sulfataasientsyymeillä, joita saatiin erilaisista lähteistä (Taulukko 11.; Sigma Chemical Co.) pH:ssa 7,5 tai pH:ssa 5,0. Tuotteet analysoitiin silikageeli-TLC:llä (Kiesel-geeli 60F<sub>254</sub>) detektoimalla OD 254 nm:ssä (Shimadzu Co.). Kuten on kuvattu taulukossa 11., H-5-sulfataasi (S-3009 tyyppi H-5) tuotti BU-3285T:n desulfatoitua johdannaista hyvällä saannolla sekä pH:ssa 7,5 että 5,0. Kolme muuta sulfataasia, jotka on luetteloitu taulukkoon, tuottivat myös desulfaattia, mutta paljon pienemmällä saannolla. Esimerkki 3 valaisee desulfatoidun BU-3285T:n valmistusta.

#### Taulukko 11

#### 15 BU-3285T:n sulfataasireaktio

<u>Sigma No</u>	<u>Tyyppi</u>	<u>lähde</u>	<u>pH*</u>	<u>desulfatoitu</u> <u>BU-3285T (%)</u>
S-3009	H-5	Helix pomatia	7,5	90
			5,0	90
20 S-8629	V	Limpets (Petella vulgata)	7,5	2
			5,0	2
S-1629	VI	Aerobactor aerogenes	7,5	3
S-9629	VII	Abalone Entrails	7,5	5
			5,0	5

25 \*puskuri 0,1M Tris-HCl, pH 7,5  
0,2M asetaatti pH 5,0

#### reaktio-olosuhteet

30 substraatti (BU-3285T, 0,4 mg/50 µl-H<sub>2</sub>O)  
jokainen entsyymi 5 yksikköä/100 µl -puskuri  
jokainen puskuri 200 µl  
H<sub>2</sub>O 150 µl

35 yhteensä 500 µl  
inkuboi 37°C:ssa, 18 tuntia

Detektio: Reaktioseos 20 µl laitettiin silikageeli-levylle (Merck Co.) ja levy kehitettiin CHCl<sub>3</sub>-MeOH (5:1, v/v) -liuotinsysteemissä. TLC-levy tutkittiin lukemalla OD 254 nm:ssä.

5

Esimerkki 3BU-3285T-desulfaatin valmistus

BU-3285T:n (45 mg) ja sulfataasin (28 mg, S-3009 tyyppi H-5) liuosta 0,1 M tris-HCl-puskurissa (pH 7,5, 10 ml) inkuboitiin 37 °C:ssa 18 tuntia. Reaktioseos kaadettiin veteen (40 ml) ja uutettiin sitten kahdella 50 ml:n annoksella etyyliasetaatia. Uutteet yhdistettiin ja haihdutettiin kuivaksi tyhjiössä, jotta saatiin vaalean keltainen sakka (27 mg). Sakka puhdistettiin preparatiivisella TLC:llä käyttäen metyleenikloridi:metanoli (5:1 v/v) -liuotinsysteemiä ja sen jälkeen pylväskromatografiolla Sephadex LH-20:llä (2 x 40 cm) käyttäen metanolia kehittäväänä liuottimena. Kun eluaattia oli tarkkailtu TLC:llä (SiO<sub>2</sub>, metyleenikloridi:metanoli, 5:1 v/v) sopivat fraktiot yhdistettiin ja konsentroidiin tyhjiössä, jotta saatiin 8 mg BU-3285T-desulfaattia valkoisena amorfisena jauheena.

20

BU-3285T-desulfaatin fysiko-kemialliset ominaisuudet

BU-3285T-desulfaatti saatiin valkoisena amorfisena kiinteänä aineena. Tämä kiinteä aine liukenee metanoliin, etanoliin, asetoniin ja dimetyylisulfoksidiin, se liukenee jonkin verran veteen, mutta on liukenematon hiilitetrakloridiin ja n-heksaaniin. Se antoi positiivisen reaktion jodihöyrylle ja rikkihapolle, mutta negatiivisen reaktion ninhydiini- ja antronitesteille. BU-3285T-desulfaatin positiivinen FAB-massaspektri osoitti pseudomolekulaarisiaioneja kohdissa m/z 413 (M+Na)<sup>+</sup> ja 429 (M+K)<sup>+</sup>, mikä vastaa molekyyliainetta 390. Sen molekyylikaava arvioitiin C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub>:ksi spektrometrianalyysillä, ehdottaen, että se oli BU-3285T:n desulfatoitu johdannainen. BU-3285T-desulfaatin fysiko-kemiallisista ominaisuuksista on yhteenveto

35

taulukossa 12. IR-spektri osoitti absorptiovöitä 3410, 2930, 2850, 1715, 1670, 1635, 1450, 1380, 1085 ja 1035  $\text{cm}^{-1}$ :ssä. Sulfaattiryhmään viittaava vahva absorptio 1260  $\text{cm}^{-1}$ :ssä havaitaan kanta-antibiootissa, mutta se puuttuu tuotteesta. BU-3285T-desulfaatin UV-spektrillä on absorptiomaksimit 260, 270 ja 280 nm:ssä, jotka eivät muuttuneet happamassa ja alkalisessa liuoksessa kuten ei BU-3285T:n tapauksessakaan, osoittaen molekyylin konjugoituneen trieeniryhmän retention. Sen  $^1\text{H-NMR}$ -spektri (Taulukko 13) muistuttaa läheisesti BU-3285T:n spektriä paitsi, että sulfaattiryhmän omaavaan hiiliatomiin liittynyt metiini-protoni jälkimmäisessä siirtyi yläkenttään ( $\delta$  4,46:sta  $\delta$  3,94:ään) edellä mainitussa. Nämä spektritiedot osoittavat, että tuote säilytti kaikki muut rakenteelliset piirteet, mutta sisälsi hydroksyyliiryhmän BU-3285T:n sulfaattiryhmän tilalla.

#### Taulukko 12

#### BU-3285T-desulfaatin fysiko-kemialliset ominaisuudet

20	luonne	:	valkoinen amorfinen kiinteä aine
	sulamispiste (haj.)	:	223 - 226°C
	UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm ( $\epsilon$ )	:	260(25,300), 270(31,500), 280(24,600)
25	molekyylikaava	:	$\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_5$
	FAB-massa	:	413(M+Na) <sup>+</sup> , 429(M+K) <sup>+</sup>
30	TLC, $\text{SiO}_2$		
	n-bütanoli-etikkahappo-vesi = 4:1:1 v/v	:	Rf 0,70
	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH = 5:1 v/v	:	Rf 0,62

## Taulukko 13

BU-3285T:n ja sen desulfaattijohdannaisen  $^1\text{H-NMR}$  -spektri  
(400 MHz DMSO- $d_6$ :ssa)

5	protoni	BU-3285T	BU-3285T-desulfaatti
	23- $\text{CH}_3$	0,64 (3H. d. J-6,8 Hz)	0,67 (3H. d. J-6,8 Hz)
	22- $\text{CH}_3$	0,87 (3H. t. J-6,8 Hz)	0,86 (3H. t. J-6,5 Hz)
10	10- $\text{CH}$ , 20- $\text{CH}_2$ , 21- $\text{CH}_2$	1,23 - 1,29 (5H. m)	1,23 - 1,26 (5H. m)
	19- $\text{CH}_2$	1,36 (2H. m)	1,36 (2H. m)
	18- $\text{CH}_2$	2,10 (2H. m)	2,11 (2H. m)
	8- $\text{CH}_2$	2,17 & 2,38 (2H. m)	2,11 & 2,20 (2H. m)
	4-H	4,09 (1H. dd. J-5,4 & 2,9 Hz)	4,05 (1H. m)
15	11-H	4,29 (1H. t. J-10,2 Hz)	4,33 (1H. m)
	9-H	4,46 (1H. m)	3,94 (1H. m)
	5-H	4,79 (1H. dd. J-7,3 & 2,9 Hz)	4,81 (1H. dd. J-7,7 & 2,5 Hz)
	12-H	5,35 (1H. dd. J-10,2 & 11,3 Hz)	5,38 (1H. m)
	6-H	5,67 (1H. dd. J-15,7 & 7,3 Hz)	5,67 (1H. m)
20	17-H	5,74 (1H. m. J-15,1 & 7,3 Hz)	5,71 (1H. m)
	7-H	5,79 (1H. m)	5,84 (1H. m)
	2-H	5,95 (1H. d. J-9,7 Hz)	5,98 (1H. d. J-9,8 Hz)
	15-H	6,00 (1H. t. J-11,3 Hz)	6,00 (1H. m)
	13-H	6,14 (1H. t. J-11,3 Hz)	6,15 (1H. t. J-11,1 Hz)
25	14-H	6,47 (1H. t. J-11,3 Hz)	6,48 (1H. t. J-11,1 Hz)
	16-H	6,54 (1H. dd. J-15,1 & 11,3 Hz)	6,52 (1H. dd. J-15,2 & 11,1 Hz)
	3-H	6,99 (1H. dd. J-9,7 & 5,4 Hz)	7,01 (1H. dd. J-9,8 & 5,5 Hz)

BU-3285T-desulfaatin kasvaimia vastustava aktiivisuus

30 BU-3285T:tä ja sen desulfatoitua johdannaista, BU-3285T-desulfaattia, tutkittiin vertaillen in vitro -sytotoksisuuden suhteen hiiren ja ihmisen kasvainsolulinjoja vastaan.

35 B16-F10:tä (hiiren melanoomaa), HCT-116:ta (ihmisen paksusuolisyöpää), A549:ää (ihmisen keuhkosyöpää) ja

A549/VP29:ää (A549:n etoposidiresistenttiä alalinjaa) kasvatettiin Eaglen MEM-alustalla (Nissui), johon oli lisätty FCS:a (vasikkasikiön seerumia, 10 %) ja ei-välttämättömiä aminohappoja (B16-F10), tai McCoyn 5A -alustalla (Gibco),  
5 jossa oli FCS:a (10 %), välttämättömiä ja ei-välttämättömiä aminohappoja, vitamiineja ja antibiootteja (HCT-116 ja molemmat A549) 37 °C:ssa kostutetussa ilmassa 5 % CO<sub>2</sub> -inkubaattorissa. Eksponentiaalisesti kasvavat B16-F10-, HCT-116- ja A549-solut kerättiin, laskettiin ja suspentoitiin  
10 kasvualustaan vastaavasti 1,5 x 10<sup>4</sup>, 3 x 10<sup>4</sup> ja 3 x 10<sup>4</sup> solua/ml. Sen jälkeen, kun 180 µl solususpensiota oli laitettu 96-koloisen mikrotiitterin koloihin päivänä 0, testimateriaalit (20 µl) lisättiin päivänä 1 ja levyjä inkuboitiin 72 tuntia. Sytotoksinen aktiivisuus määritettiin  
15 kolorimetrisesti aallonpituudella 540 nm sen jälkeen, kun elävät solut oli värjätty neutraalilla punaisella liuoksella. Tuloksista on yhteenveto taulukossa 14. Sekä BU-3285T että BU-3285T-desulfaatti olivat melko aktiivisia hiiren ja ihmisen kasvainsolulinjoja vastaan ja niiden  
20 IC<sub>50</sub>-arvot olivat vastaavasti 1,9 - 38 µg/ml ja 5,5 - 14 µg/ml. Mielenkiintoisesti desulfaatti oli melkein yhtä sytotoksinen resistenttiä kasvainsolulinjaa A549/VP29 vastaan kuin kantasolulinjaa vastaan.

Taulukko 14

In vitro -sytotoksisuus hiiren ja ihmisen kasvainsoluja vastaan

5	Yhdiste	IC <sub>50</sub> (µg/ml)			
		B16-F10	HCT-116	A549	A549/VP29
10	Bu-3285T A	38	1,9	4,1	17
	Bu-3285T-desulfaatti	14	5,5	13	15
15	Adriamysiini	0,03	0,30	ND*	ND
	VP16	0,21	5,3	1,2	40

20

\*ND: ei tehty

25

30

35

Edellä mainittujen yhdisteiden makromolekyylibio-synteesin (DNA, RNA ja proteiini) ehkäisevät vaikutukset määritettiin kasvatetuissa L1210-hiirileukemiasoluissa. Soluja ( $5 \times 10^5$  solua/ml) inkuboitiin testimateriaalien kanssa 37 °C:ssa 15 minuuttia ja merkityn prekursorin, <sup>3</sup>H-tymidiinin, <sup>14</sup>C-uridiinin tai <sup>3</sup>H-leusiinin, lisäyksen jälkeen kasvatusseokseen vielä 60 minuuttia. Jäähdytetyllä 5 % trikloroetikkahappoliuoksella pesun jälkeen solujen happoon liukenemattomaan fraktioon liittynyt radioaktiivisuus määritettiin nestetuikelaskurilla. Kuten taulukosta 15. näkyy, BU-3285T ja BU-3285T-desulfaatti ehkäisivät voimakkaasti RNA- ja proteiinisynteesin IC<sub>50</sub>-arvoilla vastaavasti 5,8 ja 2,4 µg/ml, ja 6,1 ja 8,1 µg/ml. Sekä BU-3285T-desulfaatti että kantayhdiste eivät osoittaneet mer-

kittävää ehkäisevää vaikutusta DNA-synteesissä korkeimmalla testatulla konsentraatiolla 100 µg/ml.

Taulukko 15

Makromolekyylibiosynteesin ehkäiseminen L1210 -leukemiasoluissa

Yhdiste	IC <sub>50</sub> (µg/ml)		
	DNA	RNA	proteiini
BU-3285T A	>100	5,8	2,4
BU-3285T-desulfaatti	>100	6,1	8,1

Kuten on edellä osoitettu, BU-3285T omaa ehkäisevää vaikutusta sieniorganismeja ja nisäkkäiden pahanlaatuisia kasvaimia vastaan. BU-3285T-desulfaattilla on ehkäisevää aktiivisuutta nisäkkäiden kasvaimia vastaan.

Keksintö tarjoaa mahdollisuuden terapeuttisesti käsitellä eläinisäntää, jolla on sieni-infektio, jolloin tehokas sieniä vastustava BU-3285T-annos annetaan mainitulle isännälle.

On myös mahdollista terapeuttisesti käsitellä nisäkkäisäntää, jolla on pahanlaatuinen BU-3285T:lle tai BU-3285T-desulfaatille herkkä kasvain, jolloin tehokas kasvainta ehkäisevä BU-3285T- tai BU-3285T-desulfaattiannos tai farmaseuttinen BU-3285T:tä tai BU-3285T-desulfaattia sisältävä koostumus annetaan mainitulle isännälle.

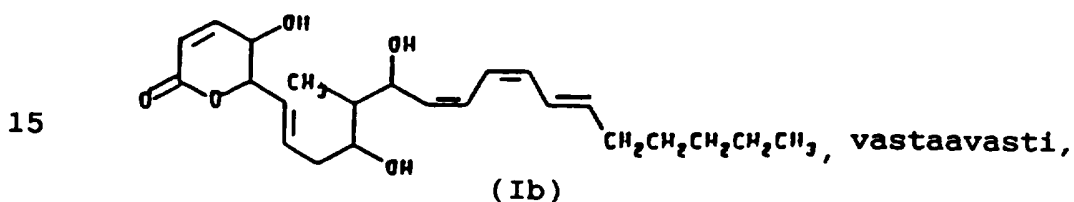
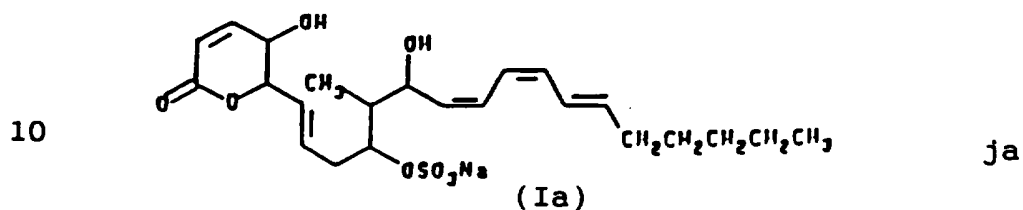
Valmistettavia yhdisteitä voidaan sisällyttää farmaseuttiseen koostumukseen, joka käsittää tehokkaan sieniä vastustavan BU-3285T-määrän yhdessä inertin farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan tai laimennusaineen kanssa.

Nämä koostumukset voidaan tehdä missä tahansa farmaseuttisessa muodossa, joka on sopiva ruansulatuskanavan ulkopuoliselle antamiselle.

- 5 On myös mahdollista valmistaa farmaseuttinen koostumus, joka käsittää tehokkaan kasvainta ehkäisevän BU-3285T- tai BU-3285T-desulfaattimäärän yhdessä inertin farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan tai laimennusaineen kanssa. Nämä koostumukset voidaan tehdä missä tahansa farmaseuttisessa muodossa, joka on sopiva ruansulatuskanavan
- 10 ulkopuoliselle antamiselle.

## Patenttivaatimukset

1. Menetelmä terapeutisesti käyttökelpoisen BU-3285T:n (Ia) tai BU-3285T-desulfaatin (Ib) valmistamiseksi, joilla on kaava



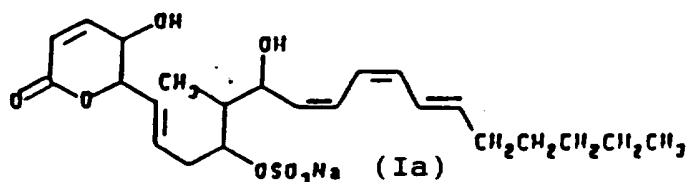
20 tunnettu siitä, että BU-3285T:tä tuottava *Chainia rosea* ATCC 53903 kasvatetaan vedenalaisissa aerobisissa olosuhteissa vesipitoisessa kasvualustassa, joka sisältää assimiloituvat hiilen ja typen lähteet kunnes mikro-organismi on tuottanut huomattavan määrän BU-3285T:tä mainitussa kasvualustassa, ja sitten BU-3285T otetaan talteen kasvualustasta melko vapaana sivutuotteista, ja, haluttaessa, kaavan I b mukaisen yhdisteen valmistamiseksi BU-3285T saatetaan reagoimaan joko ennen talteenottoa tai talteenoton jälkeen sulfataasientsyymien kanssa, joka pysyyt muuttamaan BU-3285T:n halutuksi BU-3285T-desulfaattijohdannaiseksi.

30 2. Biologisesti puhdas mikro-organismin *Chainia rosea* ATCC 53903 viljelmä.

## Patentkrav

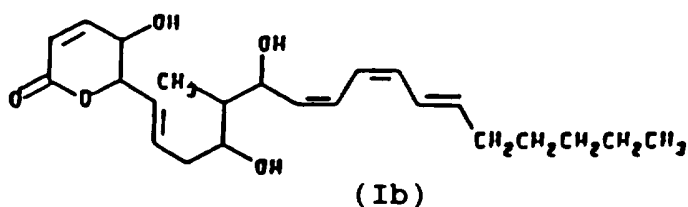
1. Förfarande för framställning av terapeutiskt användbart BU-3285T (Ia) eller BU-3285T-desulfat (Ib) med formeln

5



10

respektive



15

(Ib)

k ä n n e t e c k n a t därav, att man odlar *Chainia rosea* ATCC 53903 under submersa aeroba betingelser i ett vattenhaltigt odlingsmedium, som innehåller assimilerbara källor av kol och kväve tills mikroorganismen har producerats en ansevärd mängd BU-3285T i nämnda odlingsmedium, och sedan tar tillvara BU-3285T ur odlingsmediet som en relativt fri biprodukt, och, om man så önskar, för att framställa föreningen enligt formeln Ib, bringar BU-3285T att reagera antingen innan eller efter tillvaratagandet med sulfatasenzym, som förmår omvandla BU-3285T till det önskade BU-3285T-derivatet.

25

30

2. En biologiskt ren kultur av mikroorganismen *Chainia rosea* ATCC 53903.

BU-3285T:n IR-SPEKTRI KBr:ssä

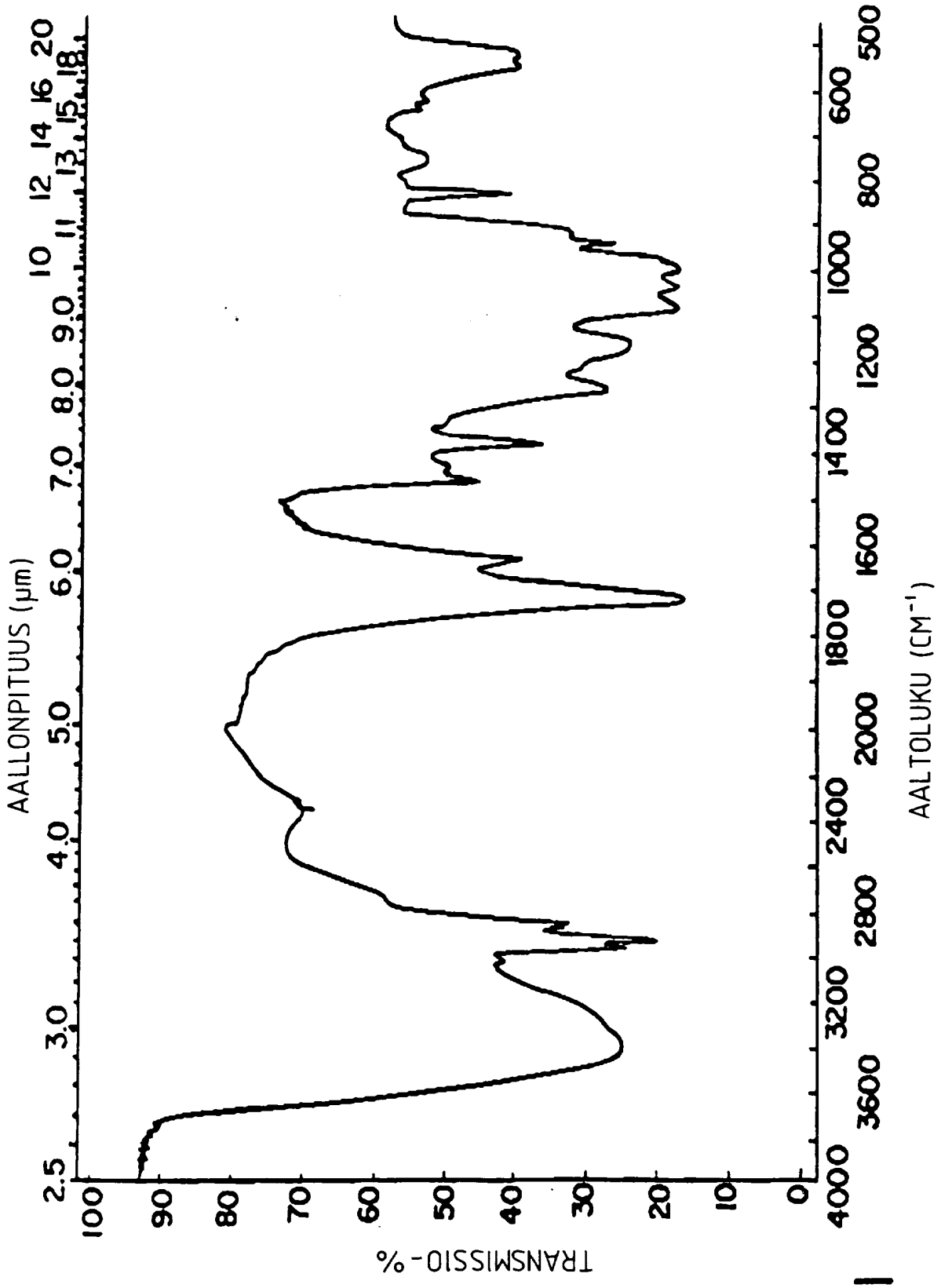


FIG. 1

BU-3285T:n  $^1\text{H-NMR-SPEKTRI}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6\text{:ssa}$ )

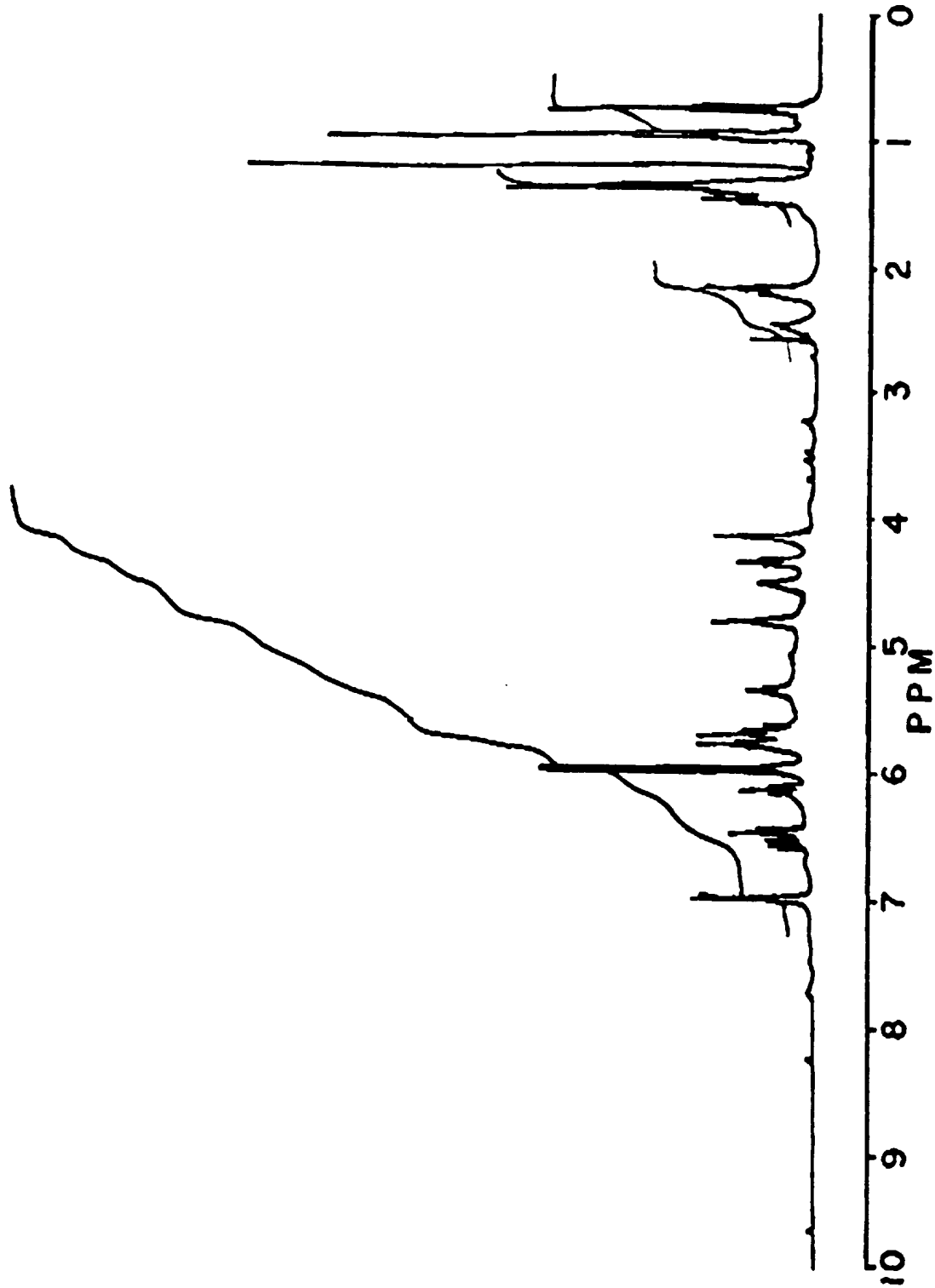


FIG. 2

95286