



NORGE

(19) [NO]

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) Nr. 165200

(51) Int. Cl.⁸ C 12 N 1/20, C 12 P 13/00,
C 07 C 277/00, A 61 K 31/195

(21) Patentsøknad nr. 832046
(22) Inngivelsesdag 06.06.83
(24) Løpedag 06.06.83
(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(86) Internasjonal søknad nr. -
(86) Internasjonal inngivelsesdag -
(85) Videreforingsdag -
(41) Alment tilgjengelig fra 08.12.83
(44) Utlegningsdag 01.10.90

(71)(73) Søker/Patenthaver **MICROBIAL CHEMISTRY RESEARCH
FOUNDATION,**
14-23, Kamiosaki 3 chome,
Shinagawa-ku, Tokyo 141, JP.

(72) Oppfinner **HAMAO UMEZAWA,** Nerima-ku, Tokyo,
TAKAAKI AOYAGI, Fujisawa-city,
Kanagawa Prefecture, **TOHJO TAKEUCHI,**
Shinagawa-ku, Tokyo, **MASA HAMADA,**
Shinjuki-ku, Tokyo, **MASAAKI ISHIZUKA,**
Ohta-ku, Tokyo, JP.

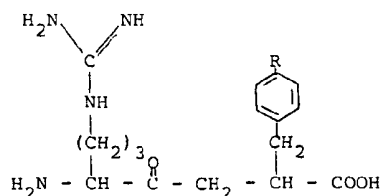
(74) Fullmektig Bryns Patentkontor AS, Oslo.

(30) Prioritet begjært 07.06.82, JP, nr. 96276/82.

(54) Oppfinnelsens benevnelse **FREMGANGSMÅTE FOR FREMSTILLING AV ARFAMENIN VED DYRKING AV
MIKROORGANISMESTAMMEN CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM BMG 361-CF4.**

(57) Sammendrag

Den nye mikroorganismestammen Chromobac-
terium violaceum, forbindelser med formelen



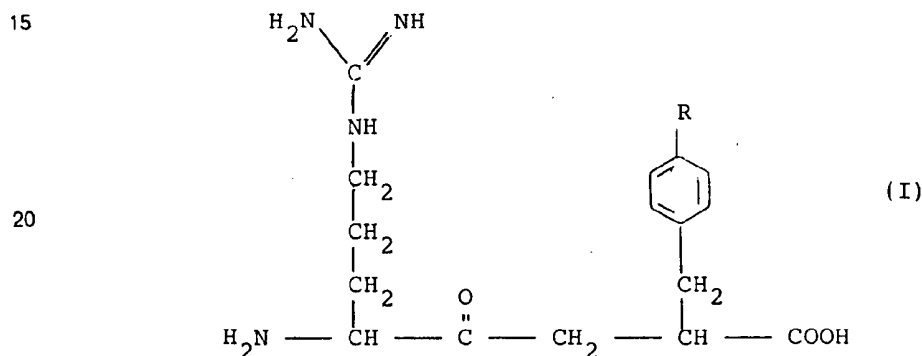
hvor R er hydrogen eller hydroksylgruppen, fremstilt
ved hjelp av den ovenfor nevnte stamme, samt deres
anvendelse som legemidler.

(56) Anførte publikasjoner Ingen.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av arfamenin ved å dyrke mikroorganismestammen *Chromobacterium violaceum* BMG 361-CF4.

- 5 Det er funnet at stoffet arfamenin, som henviser til arfamenin A eller arfamenin B (slik som forklart nedenunder) eller begge av disse arfameninene generelt eller en blanding som omfatter begge arfameninene, oppviser en virkning ved å øke celle-formidlet immunitet og anti-cancer-virkning. Det er
 10 spesielt funnet at stoffet er virksomt til å inhibere dekomponeringen av arginin- β -naftylamid ved hjelp av aminopeptidase B.

Stoffet arfamenin har den følgende formel



- 25 hvor R er et hydrogenatom i tilfelle av arfamenin A eller en hydroksylgruppe i tilfelle av arfamenin B, eller disses salter.

Som de senere gjengitte eksemplene vil vise, kan både arfamenin A og B erholdes som fargeløst pulver ved fraksjonering av filtratet fra et dyrkingsmedium etter dyrking
 30 av en arfamenin-produserende bakterie. Fraksjoneringen kan utføres ved kromatografi på CM-"Sephadex", etc. Egenskapene til fraksjonene som oppnås omtales nedenunder.

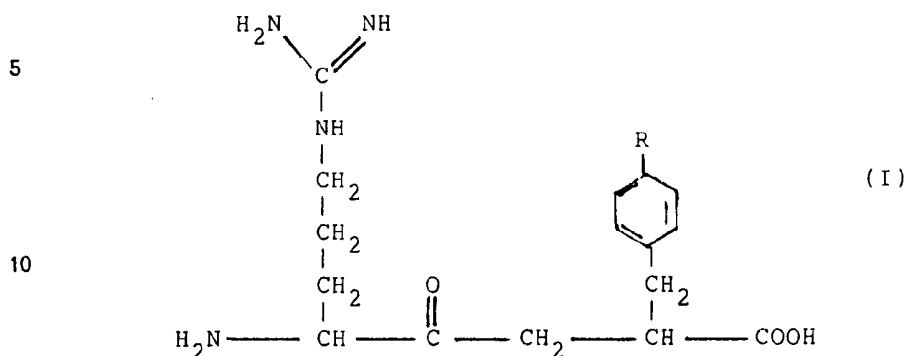
Arfamenin A har et smeltepunkt på 117 - 119°C og
 35 en molekylvekt, bestemt ved hjelp av massespektrometri, på

165200

2

320. Elementæranalyseverdiene er C 53,45%, H 7,11%, N 14,91%, O 14,20%, Cl 10,49%, hvilket indikerer molekylformel $C_{16}H_{24}N_4O_3 \cdot HCl$. Det ultrafiolette absorpsjonsspekteret for en vandig oppløsning som inneholder 100 $\mu\text{g/ml}$ arfamenin A er tegnet opp i fig. 1, som viser en absorpsjon med λ maks på 2547 nm (ϵ 180). Det infrarøde absorpsjonsspekteret for arfamenin A ved KBr-metoden er vist i fig. 2, som viser karakteristiske absorpsjonsbånd ved 3370, 3170, 2950, 1730, 1670, 1560, 1460, 1410, 1320, 1190, 1110, 760 og 710 cm^{-1} . Absorpsjonsspekteret for kjernemagnetisk resonans ($^1\text{H-NMR}$) (oppløsning i tungt vann, δ , 100 MHz) er gjengitt i fig. 3 og viser absorpsjoner ved 2,04-2,33 (CH_2), 2,35-2,72 (CH_2), 3,34-3,69 ($\text{CH}_2 \times 2$), 3,69-3,84 (CH, CH_2), 4,83 (CH) og 7,82-8,00 (C_6H_5) δ .
- 15 Arfamenin B har et smeltepunkt på 118 - 120°C og en molekylvekt bestemt ved hjelp av massespektrometri på 336. Elementæranalyseveridene er C 49,30%, H 6,88%, N 13,77%, O 20,82% og Cl 8,73% hvilket indikerer molekylformelen $C_{16}H_{24}N_4O_4 \cdot HCl \cdot H_2O$. Det ultrafiolette absorpsjonsspekteret for en vandig oppløsning som inneholder 100 $\mu\text{g/ml}$ arfamenin B er gjengitt i fig. 4 som viser absorpsjoner ved λ maks på 275 nm (ϵ 1040) og λ maks på 222 nm (ϵ 5500). Det infrarøde absorpsjonsspekteret for arfamenin B ved KBr-metoden er vist i fig. 5 som viser karakteristiske absorpsjonsbånd ved 3370, 3180, 2960, 1730, 1670, 1560, 1520, 1460, 1420, 1330, 1250, 1180, 1110 og 840 cm^{-1} . Absorpsjonsspekteret for kjernemagnetisk resonans (oppløsning i tungt vann, δ , 100 MHz) er åpenbart i fig. 6 og viser absorpsjoner ved 1,87-2,30 (CH_2), 2,30-2,62 (CH_2), 3,14-3,54 ($\text{CH}_2 \times 2$), 3,54-3,78 (CH, CH_2), 4,75 (CH), 7,30-7,67 (C_6H_4) δ .
- 20
- 25
- 30

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for å fremstille en forbindelse med formel (I)



15 hvor R er hydrogen eller en hydroksylgruppe, kjennetegnet ved at man dyrker mikroorganismen *Chromobacterium violaceum* BMG-CF4 i nærvær av kjente næringsstoffer og utvinner forbindelsen med formel (I) fra kulturmediet.

20 En arfamenin-produserende mikroorganisme er en mikroorganisme som er istand til å produsere arfamenin A eller arfamenin B eller begge disse arfameninene. Et eksempel på mikroorganismen er *Chromobacterium violaceum* BMG361-CF4, en stamme som ble isolert fra jord samlet opp i Poropina i ved bredden av Lake Shikotsu, Hokkaido, Japan. Denne stammen

25 ble deponert 4. mai 1982 ved the Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry of Japan under deponeringsnr. 6521 (FERM P-6521).

30 De mikrobiologiske kjennetegnene til den ovenfor nevnte stamme er som følger:

(a) Morfologiske kjennetegn

- (1) Cellens form og størrelse: stavform, ca. 0,8 - 1,0 μm x 2,0 - 4,0 μm .
- (2) Pleomorfisme: ikke-pleomorf.
- 35 (3) Bevegelighet/flagelldannelse: bevegelige/polare og laterale flageller.

165200

4

- (4) Sporedannelse: ikke-sporulerende.
- (5) Gram-farging: negativ.
- (6) Syrefasthet: negativ.

5 (b) Dyrkingskjennetegn på forskjellige media (dyrking ved 27°C, 20°C og 30°C bare for stykkultur i næringsgelatin)

(1) Platekultur på næringsagar:

10 Dyrkede kolonier var noe forhøyet semisfærisk, og kantene var glatte og sirkulære. Overflatene var glatte og glisende. Etter ca. 17 timers dyrking var koloniene gjennomskinnelige, men ble gradvis opake og oppviste et gummiaktig utseende. Rundt den andre dyrkingsdagen skiftet koloniene over til purpurfarge, men produserte ingen diffuserbare pigmenter.

15 (2) Stikkultur i næringsagar:

Koloniene vokste enhetlig langs inokuleringslinjene. Overflatene var glatte og skinnende, og kantene var glatte. Rundt den andre dyrkingsdagen utviklet koloniene nederst på overflaten av stikkagaren en purpurfarge, men ingen oppløselige pigmenter ble observert.

(3) Næringsvæskeskultur:

25 Rundt den andre dyrkingsdagen ble det dannet purpurfargede, ringformede kolonier på overflaten av mediet. Etter ca. 40 timer med dyrking økte antallet celler på bunnen av prøverøret. Cellene skiftet over til purpurfarge rundt den tredje dyrkingsdagen.

(4) Stikkultur i næringsgelatin:

30 Når dyrkingstemperaturen var 30°C, vokste cellene langs stikklinjen. Rundt den tredje dyrkingsdagen begynte mediet å bli flytende og det flytende området hadde en rørform. I tilfellet med dyrking ved 20°C oppsto flytendegjøringen på den 6. dyrkingsdagen.

35

(5) BCP-melkekultur:

Etter 3 dager med dyrking skiftet BCP over til blått og mediet koagulerte. På den 5. dyrkingsdagen var koaguleringen fullstendig og umiddelbart begynte peptonisering. Peptoniseringen var fullstendig i løpet av ca. 2 uker.

(c) Fysiologiske egenskaper (dyrkingstemperaturene var alle 27°C med mindre annet er angitt)

- (1) Reduksjon av nitrater: dannelse av nitritter fra nitrater.
- (2) Denitrifikasjon (fremgangsmåten til Komagata et al.; Edited by Takeharu Hasegawa: Classification and Identification of Microorganisms, side 223, Tokyo University Publisher, 1975): positiv, ingen generering av gasser.
- (3) MR-prøve: positiv.
- (4) VP-prøve: negativ.
- (5) Produksjon av indol: negativ.
- (6) Produksjon av hydrogensulfid (TSI-agarmedium, et produkt fra Eiken, Japan): negativ.
- (7) Hydrolyse av stivelse: negativ.
- (8) Utnyttelse av sitronsyre: positiv på et Koser-medium og et Christensen-medium.
- (9) Utnyttelse av uorganisk nitrogenkilde (natriumsulfat, ammoniumsulfat og natriumglutamat): enhver uorganisk nitrogenkilde ble utnyttet til veksten.
- (10) Fremstilling av pigment (King A- og B-media, produkter fra Eiken): små mengder av et gult oppløselig pigment ble dannet på hvert medium.
- (11) Urease (Ureamedium, et produkt fra Eiken): negativ.
- (12) Oksydase: positiv.
- (13) Katalase: positiv.
- (14) Temperatur- og pH-områder for vekst: vekst ved 12 - 37°C, fortrinnsvis ca. 27 - 30°C. Vekst ved en pH på 5,0 - 9,6, fortrinnsvis 6,0 - 7,8.
- (15) Oksygenfordring: Aerob (fakultativ anaerob).

- (16) O-F-prøve (i henhold til fremgangsmåten til Hugh & Leifson): fermentativ.
- (17) Dannelse av syrer og gasser fra sakkarider (en Hugh & Leifson-kultur): syrer ble dannet fra D-glukose, D-fruktose og trehalose. Ingen syrer ble dannet fra de følgende 19 sakkarider: L-arabinose, D-xylose, D-mannose, D-galaktose, maltose, sukrose, laktose, D-sorbitol, D-mannitol, inositol, glycerin, stivelse, adonitol, cellobiose, dulcitol, inulin, melibiose, melezitose og raffinose. Ingen av sakkaridene dannet gasser.
- (18) Hydrolyse av kasein: mikroorganismen ble strekdyrket på en kasein-agarplate (pH 7,4) fremstilt ved å tilsette sterilisert skummet melk til en næringsagar til en konsentrasjon på 5% og la blandingen størkne. Etter 24 timer med dyrking ble kasein brutt ned og dens hydrolyse var fullført på den 8. dyrkingsdagen.
- (19) Måling av synlig spektrum på purpurpigment: De purpurfargede cellene dyrket i skrå-næringsagar ble ekstrahert med etanol og ekstraktet ble målt med hensyn på dets synlige spektrum. Maksimum absorpsjon ble funnet ved 573 nm og minimum absorpsjon ved 430 nm. Når pigmentet ble oppløst i 10% etanolsulfat, dannet det en grønn oppløsning med maksimum absorpsjon ved 693 nm. Dette faktum viste at det purpurfargede pigmentet var et violacein-pigment (se Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. utgave, side 354).

En oppsummering av de ovenfor nevnte kjennetegnene viste at BMG361-CF4 var en gram-negativ, fakultativ, anaerob bacillus med polare og laterale flageller. Dens kolonier inneholdt et purpurfarget pigment som ble påvist å være violacein ved måling av dets synlige spektrum. Utforskning av disse egenskapene ble utført ved henvisning til Bergey's

Manual of Determinative Bacteriology 8. utgave, og ut fra resultatene antas BMG361-CF4-stammen å tilhøre slekten Chromobacterium. Chromobacterium omfatter de to artene C. violaceum og C. lividum. BMG361-CF4-stammer innehadde 5 egenskaper som var svært like egenskapene til de tidligere kjente artene. Nærmere bestemt ble stamme BMG361-CF4 klart sjeldnet fra C. lividum ved hensyn til vekst ved 37°C, spor av syredannelse fra sakkarider (syreproduksjon fra trehalose, ingen syreproduksjon fra arabinose eller xylose), hydrolyse 10 av kasein, etc. Følgelig ble stamme BMG361-CF4 identifisert som Chromobacterium violaceum BMG361-CF4.

Fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse vil bli beskrevet i detalj nedenunder. Kjente næringsstoffer for bakterier kan, om ønsket, brukes til å dyrke den arfamenin- 15 produserende mikroorganismen ved utførelsen av fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse. Eksempler på karbonkilder er fettstoffer og karbohydrater som er tilgjengelige i handelen, slik som glycerin, glukose, laktose, sukrose, stivelse, maltose og molasser. Eksempler på nitrogenkilder 20 omfatter markedsførte varer slik som pepton, kjøtttekstrakt, maisstøpevæske, bomullsfrømel, peanøttmel, soyabønnemel, maisglutenmel, fiskemel, gjærekstrakt, N-Z-amin, kasein, natriumnitrat, ammoniumnitrat og ammoniumsulfat. Eksempler på uorganiske næringsstoffer er natriumkloridfosfater, kal- 25 siumkarbonat og magnesiumsulfat. Spormengder av andre metallsalter kan, om ønsket, tilsettes,

Ethvert av disse nevnte materialene kan brukes så lenge som de kan utnyttes av den arfamenin-produserende mikroorganismen og de vil ikke forhindre produksjonen av 30 foreliggende forbindelse.

Hvilke som helst kjente materialer for bakterie- dyrking kan brukes. Særlig foretrukne bestanddeler av kulturmedier er karbonkilder slik som glycerin og oppløselig stivelse, og nitrogenkilder slik som soyabønnemel, fiskemel 35 og maisglutenmel. Eksempler på foretrukne kulturmedier er et medium som inneholder 1,5% glycerin, 1,5% oppløselig stivelse, 0,5% "Prorich", 1,5% fiskemel og 0,2% kalsiumkar-

bonat og et medium som inneholder 3% oppløselig stivelse, 0,5% "Prorich", 1,2% maisglutenmel og 0,2% kalsiumkarbonat.

Væskekultur er fortrukket til masseproduksjon av arfamenin. Dyrkingstemperaturen kan velges innenfor et område som tillater den arfamenin-produserende mikroorganisme å vokse og produsere arfamenin. Den særlig foretrukne temperatur er 25 - 35°C. Dyrkingen utføres vanligvis til en tilstrekkelig mengde av stoffet er akkumulert i dyrkingsmediet.

F.eks. ble et dyrkingsmedium som inneholdt 3% oppløselig stivelse, 0,5% "Prorich", 1,2% maisglutenmel og 0,2% kalsiumkarbonat sterilisert og deretter inokulert med en løkkefull av en skråkultur av den arfamenin-produserende mikroorganisme. Inokulumet ble aerobt rystedyrket ved 27°C. Etter 8 - 52 timers dyrking akkumulerte arfamenin. Arfamenin ble produsert tilfredsstillende ved dyrking i en tank likeså vel som ved rystekultur. F.eks. ble 300 liter av mediet plassert i en 570 liters dyrkingsbeholder sterilisert og dyrkingen ble utført med omrøring ved 190 omdr./min. under lufting med 300 l/min. sterilisert luft. Under disse betingelser nådde produksjonen av det foreliggende stoffet sitt maksimumsnivå i løpet av 23 timer.

Kontroll av arfamenin under dens fremstilling ved dyrking og rensing ble utført ved å måle den inhiberende virkning mot aminopeptidase B på følgende måte:

Den aminopeptidase B-inhiberende virkning av arfamenin ble målt ved hjelp av en modifikasjon av fremgangsmåten beskrevet ifølge V.K. Hoppusu, K.K. Makinen & G.G. Glenner, Archives of Biochemistry and Biophysics 114, 557, 1966). Nærmere bestemt ble 0,5 ml av 0,1 M tris-hydrokloridbufferoppløsning (pH 7,0) og 0,25 ml av en oppløsning som inneholdt prøven, tilsatt til 0,25 ml av 0,002 M arginin- β -naftylamid. Den blandede oppløsning ble oppvarmet ved 37°C i 3 minutter. Til den oppvarmede oppløsning ble det tilsatt 5 μ l av en oppløsning av aminopeptidase B som var blitt rensset med DEAE-cellulose i henhold til den enzym-rensende teknikken til Hoppusu et al. Blandingen ble omsatt i 30 minutter ved 37°C etterfulgt av tilsetning til reaksjonsbland-

Arfamenin foreligger i dyrkningsmedier og celler fra den arfamenin-produserende mikroorganisme etter dyrking. Oppfinnelsen omfatter videre at man anvender et flytende kulturmedium, og at forbindelsene med formel (I) utvinnes fra kulturmediet ved adsorbering av et filtrat av kulturmediet på et vanlig adsorberingsmiddel og isolering av de 5 ønskede forbindelsene fra adsorbatet. Eksempler på adsorberingsmidlet omfatter organiske adsorberingsmidler slik som aktivt kull, "Amberlite XAD-4" og "Diaion HP-20", ionebytterharpikser, aluminiumdioksyd og silikagel. F.eks. 10 adsorberes arfamenin til "Amberlite XAD-4" og elueres med en vandig oppløsning av aceton. Nærmere bestemt pakkes en passende kolonne med "Amberlite XAD-4" i en mengde på 1/10 av filtratmengden fra kulturmediet etter dyrking. 15 Filtratet som inneholder arfamenin sendes gjennom kolonnen og adsorberes til denne. "Amberlite XAD-4"-kolonnen vaskes med vann og elueres med en 50% vandig oppløsning av aceton i en mengde på 2 - 4 ganger til "Amberlite XAD-4". Eluatet inneholder mer enn 70% av den arfamenin som foreligger i kulturfiltratet. Det således erholdte eluatet oppkonsentreres til tørrhet ved redusert trykk for å få et råpulver av arfamenin.

Kromatografi på en ionebytterharpiks kan også brukes til rensingen. Særlig er kromatografi på "CM-Sephadex" 25 effektivt idet den gjør det mulig å adskille arfameninene A og B fra hverandre ved hjelp av en gradienteluering under anvendelse av vandig oppløsning av natriumklorid. F.eks. underkastes det rå pulveret som er erholdt ved adsorbsjon til "Amberlite XAD-4" og eluering med en vandig oppløsning 30 av aceton, kromatografi på "CM-Sephadex". Kolonnen elueres med en vandig oppløsning av salt slik som natriumklorid for å samle opp en fraksjon som inneholder arfamenin A og en fraksjon som inneholder arfamenin B. hver for seg. Deretter isoleres arfamenin A og B fra hver av disse.

35 Sluttrensingen av det foreliggende stoffet kan utføres ved å avsalte med "Sephadex LH-20".

Arfamenin ble undersøkt med hensyn på farmakologiske virkninger. Det foreliggende stoffet ble funnet å potensiere celle-formidlet immunitet og inneha en anti-cancer-virkning.

5 De biologiske virkningene av arfamenin A og B er beskrevet i de følgende eksperimentelle eksempler.

1. Virkning på celle-formidlet immunitet hos normale mus

10 Virkningene av arfamenin A og B på celle-formidlet immunitet ble undersøkt ved å bruke som en indeks hypersensitivitet av forsinket type (forkortet D.T.H.) fremstilt ved å inokulere røde blodceller fra saud (forkortet SRBC) i fotputene hos mus som et antigen (se J. Exp. Med. 139, 1529 - 1539, 1974).

15 En suspensjon av 10^8 SRBC i 0,05 ml fysiologisk saltvannsoppløsning ble inokulert subkutant i én av fotputene til CDF₁-mus (hunnkjøn, 8 uker gamle). Samtidig ble en vanlig oppløsning som inneholdt 5, 0,5, 0,05 eller 0,005 mg/kg arfamenin A eller B administrert oralt i en enkelt dose.

20 4 dager etter administrering ble en suspensjon av 10^8 SRBC i 0,05 ml fysiologisk saltvannsoppløsning administrert subkutant til den andre fotputen for å forårsake en andre sensitivisering. 24 timer senere ble svelling av fotputen (økt tykkelse på fotputen) målt med et skyvelær. Hos kontrolldyr 25 som var subkutant injisert med SRBC i fysiologisk saltvannsoppløsning uten administrering av prøveforbindelsen, ble den økte tykkelse av fotputen verdsatt til 100%. Den økte tykkelse av fotputen hos de behandlede dyrene ble sammenlignet med den hos de ubehandlede dyrene for å beregne forholdet 30 mellom den førstnevnte verdien og den sistnevnte verdien (100%), og derved bestemme den celle-formidlede immunitetspotensierende virkning av prøveforbindelsen. Resultatene er gjengitt i de følgende tabeller:

T a b e l l 1

Prøveforbindelser	Dose mg/kg	Økt tykkelse av fotpute (x 0,1 mm)	Forhold til kontrollverdien (%)
Arfamenin A	5	10,4 ± 0,77	125
"	0,5	11,5 ± 1,29	139
"	0,05	13,0 ± 0,97	157
"	0,005	11,9 ± 1,00	143
"Bestatin"*	0,5	12,5 ± 1,24	151
Kontroll		8,3 ± 0,97	100

T a b e l l 2

Prøveforbindelser	Dose mg/kg	Økt tykkelse av fotpute (x 0,1 mm)	Forhold til kontrollverdien (%)
Arfamenin B	5	13,7 ± 1,77	157
"	0,5	14,7 ± 1,74	169
"	0,05	14,0 ± 1,33	161
"	0,005	12,4 ± 1,40	143
"Bestatin"*	0,5	13,0 ± 1,13	149
Kontroll		8,7 ± 1,48	100

*Referanseforbindelse

2. Virkning på celle-formidlet immunitet hos mus med kreft

(1) Fremgangsmåter hvor det brukes SRBC som antigen

Hevelse av fotputen hos mus ble undersøkt på samme måte som i eksperimentelt eksempel 1, med unntak av at CDF₁-mus ble inokulert intraperitonealt med 10⁶ celler av Ascites Sarcoma 180 og at arfamenin A ble administrert intraperitonealt én gang daglig i 4 på hverandre følgende dager, idet man

165200

12

begynte på dagen for sensitivisering av SRBC, og 2 dager senere ble SRBC gitt for å forårsake en andre sensitivisering. Resultatene er vist i tabell 3.

5

T a b e l l 3

Prøveforbindelser	Dose mg/kg	Økt tykkelse av fotpute (x 0,1 mm)	Forhold til kontrollverdien (%)
10 Arfamenin A	5	5,8 ± 1,19	129
"	0,5	6,7 ± 1,03	149
"	0,05	6,5 ± 1,29	144
"	0,005	5,9 ± 0,79	131
"Bestatin"*	5	6,0 ± 0,96	133
15 Kontroll		4,5 ± 0,74	100

*Referanseforbindelse

20 (2) Fremgangsmåte ved anvendelse av pikrylklorid som antigen

Hos mus med Ascites Sarcoma 180 ble virkningen av arfamenin A på celle-formidlet immunitet undersøkt på følgende måte hvor man observerte D.T.H.-reaksjon frembragt ved bruken av pikrylklorid som antigen. 10^6 celler av Ascites Sarcoma 180 ble transplantert intraperitonealt til 12 uker gamle CDF₁-mus av hunnkjønn (6 mus pr. gruppe). Transplantasjonsdagen ble betegnet som 0. dag. På 1. dag ble et barberet område (25 mm x 15 mm) av buken sensitivisert med 0.6 ml av en 6% etanoloppløsning av pikrylklorid absorbert til et stykke absorbent-bomull (20 mm x 20 mm x 2 mm). På 8. dag ble tykkelsen av ørene på begge sider målt med et mikrometerur for å få en grunnverdi (a). Deretter ble begge ørene sensitivisert med en 1% olivenoljeoppløsning av pikrylklorid absorbert til et stykke absorbent-bomull med størrelse 10 mm x 4 mm x 1 mm. På den 9. dag ble hevelsen av de sensitiviserte ørene målt med et mikrometerur for å få en verdi (b). Grunnverdien (a) ble trukket fra verdien (b) for å bestemme en økning i tykkelse av ørene (b - a) i kontrollgruppen.

Hver for seg ble 0,5, 0,05 eller 0,005 mg/kg av prøveforbindelsen som var oppløst i fysiologisk saltvannsoløsning, administrert oralt 6 ganger pr. dag i på hverandre følgende dager fra og med 1. dag til og med 8. dag, og pikryl-
 5 kloridsensitivisering ble utført på samme måte som i kontrollgruppen. Økningen i tykkelse for begge ørene (b' - a') i denne behandlede gruppen ble bestemt på samme måte som i kontrollgruppen.

10 Forholdet mellom slik økning hos den behandlede gruppen og hos kontrollgruppen ble beregnet fra den følgende ligning

$$15 \quad \frac{(b' - a')}{(b - a)} \times 100$$

idet verdien for kontrollgruppen var satt til 100%, og der ved bestemme prøveforbindelsens aktivitet til å potensierte celle-formidlet immunitet. Resultatene er vist i tabell 4.

20

T a b e l l 4

Prøveforbindelser	Dose mg/kg	Økt tykkelse av ører (x 0,1 mm)	Forhold til kontrollverdien (%)
25 Arfamenin A	0,5	6,05 ± 0,97	136,0
"	0,05	7,40 ± 0,72*	166,3
"	0,005	6,40 ± 0,63	143,8
30 Kontroll**		4,45 ± 2,36	100,0

* P<0,05

** Fysiologisk saltvannsoløsning

35 Resultatene ovenfor viser at det ble erholdt en signifikant aktivitet til å potensierte celle-formidlet immunitet i gruppen som mottok 0,05 mg/kg arfamenin A.

165200

14

Forsøkseksempel 3Antitumor-virkning av argamenin mot Ehrlich fast tumor

3 x 10⁶ celler av Ehrlich bukhulekreft ble transplantert subkutant i siden på 8 uker gamle ddY-mus av hunn-
 5 kjønn (5 mus pr. gruppe). Transplantasjonsdagen ble betegnet som 0. dag. Deretter ble 0,5, 0,05 eller 0,05 mg/kg av prøveforbindelsen oppløst i fysiologisk saltvannsoppløsning administrert oralt hver annen dag over ialt 7 ganger inntil 15. dag, idet man begynte på 1. dag. På 30. dag ble størrelsen (kor-
 10 teste diameter² x lengste diameter/2) og vekten av tumoren målt. Resultatene i denne behandlede gruppen ble sammenlignet med resultatene i kontrollgruppen for å beregne tumorinhiberingsforholdet (TIR, %) fra den følgende ligning:

$$15 \quad \frac{C - T}{C} \times 100$$

hvor C er størrelsen eller vekten av tumor i kontrollgruppen og T er størrelsen eller vekten av tumor i den behandlede
 20 gruppen.

Resultater for TIR (%), en indeks for antitumorvirkning av prøveforbindelsen, er vist i den følgende tabell:

T a b e l l 5

25

Prøveforbindelser	Dose mg/kg	Gjennomsnittlig størrelse av tumor (mm ³)	TIR (%)	Gjennomsnittlig vekt av tumor (g)	TIR (%)
Arfamenin A	0,5	4467 ± 4311	15,8	2,62 ± 1,90	1,9
"	0,05	3120 ± 3584	41,2	1,66 ± 1,50	37,8
"	0,005	2378 ± 3138	55,2	1,62 ± 1,44	39,3
"Bestatin" (referanseforbindelse)	0,05	2089 ± 1946*	60,6	1,47 ± 0,92**	44,9
35 Kontroll	-	5305 ± 2027	0	2,67 ± 0,84	0

* P<0,1 (T-prøve)

** P<0,05 (T-prøve)

Resultatene ovenfor viser at administreringen i mengder på hhv. 0,05 og 0,005 mg/kg arfamenin A ga en vertiformidlet antitumor-virkning med hensyn til tumorstørrelse og tumorvekt.

5 Arfameninene A og B viser seg således å forsterke celle-formidlet immunitet hos normale dyr, modulere celleformidlet immunitet som er dempet av kreft, og oppviser en vertiformidlet antitumorvirkning.

10 Prøver på akutt toksisitet hos mus har vist at ingen dødsfall forårsakes av arfamenin A ved en intravenøs dose på 250 mg/kg eller arfamenin B ved en intravenøs dose på 150 mg/kg. Arfamenin anses således for å være et sikkert stoff.

15 Som beskrevet ovenfor øker arfameninene A og B imunitet og oppviser en vertiformidlet carcinostatisk virkning når de administreres hver for seg. Disse forbindelsene er derfor nyttige som immunopotensierende midler og antitumor-immunomodulerende midler eller som hjelpestoffer i forskjellige kjemoterapeutiske midler for anvendelse ved
20 behandlingen av kreft.

De nevnte legemidler som inneholder arfamenin som aktiv bestanddel kan fremstilles ved å blande arfamenin A eller B eller begge arfameninene A og B eller deres farmasøytisk akseptable salter med bærere som er i vanlig bruk, og om ønsket, videre med forskjellige kjemoterapeutiske midler. Eksempler på arfameninsaltene omfatter salter dannet gjennom reaksjonen mellom karboksylgruppen i arfamenin og farmasøytisk akseptable kationer, slik som ammoniumioner, og
30 kationer av alkalimetaller slik som natrium og kalium, og kationer av jordalkalimetaller slik som kalsium og magnesium (dvs. karboksylater av arfamenin). Ytterligere eksempler omfatter syreaddisjonssalter dannet gjennom reaksjonen mellom
35 guanidyl- eller aminogruppen av arfamenin og farmasøytisk akseptable uorganiske syrer slik som saltsyre, eller organiske syrer slik som eddiksyre.

Forbindelsene eller legemidlene kan administreres som orale preparater, injeksjoner eller rektale suppositorier. Lyofiliserte injeksjonsløsninger kan fremstilles ved å tilsette pH-justeringsmidler, buffere, stabilisatorer og bindemidler til forbindelsene som omfatter de aktive bestanddelene, og deretter frysetørke blandingene på vanlige måter. Injeksjonsoppløsninger for subkutan, intramuskulær eller intravenøs administrering kan fremstilles ved å tilsettes pH-justeringsmidler, buffere, stabilisatorer, isotoniseringsmidler og lokalanestetiske midler til forbindelsene som inneholder den aktive bestanddel, og deretter ved å anvende vanlig brukte fremgangsmåter.

Ved fremstillingen av faste stoffer for oral administrering, kan formingsstoffer, og om ønsket, bindemidler, oppsmuldringsmidler, smøremidler, fargestoffer, korreksjonsmidler for smak og lukt tilsettes til forbindelsene som inneholder den aktive bestanddel, hvorefter blandingen formes til tabletter, overtrukne tablett, granulater, pulvere og kapsler ved hjelp av vanlige fremgangsmåter.

Ved fremstillingen av væsker for oral administrering kan korreksjonsstoffer for smak, buffere, stabilisatorer og korreksjonsstoffer for lukt tilsettes til forbindelsene som inneholder den aktive bestanddel, og deretter fremstilles blandingene som siruper og tørre siruper ved hjelp av vanlige fremgangsmåter.

For å fremstille rektale suppositorier, kan formingsstoffer og om ønsket overflateaktive midler tilsettes til forbindelsene som inneholder den aktive bestanddel hvorefter blandingene fremstilles som suppositorier ved hjelp av vanlig teknikk.

Dosen av arfamenin kan varieres avhengig av symptomer, men den vanlige dosering for en voksen person er 0,02 - 200 mg arfamenin én gang daglig. Når samtidig terapi med andre kjemoterapeutiske midler mot kreft eller andre immunopotensierende midler skal opprettes, kan arfamenin i det nevnte doseringsområdet kombineres med disse andre legemidlene i deres vanlige doseringer.

Fremstillingen av arfamenin ifølge foreliggende oppfinnelse skal beskrives i nærmere detalj under henvisning til de følgende utførelseseksemplene. Den foreliggende oppfinnelse er imidlertid ikke på noen måte begrenset til disse 5 eksemplene ettersom de fysikalsk-kjemiske egenskapene til arfamenin og teknikkene for dens fremstilling og rensing som tydelig er beskrevet av oppfinnerne, ville gjør det lett for enhver å modifisere fremgangsmåtene i henhold til det som er åpenbart gjennom den foreliggende beskrivelse.

10 Eksempel 1

En løkkefull celler ble tatt fra en skråkultur av den arfamenin-produserende mikroorganismen *Chromobacterium violaceum* BMG361-CF4 (deponeringsnr- 6521 ved the Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry of Japan). 15

Cellene ble inokulert i et dyrkingsmedium som inneholdt 3% oppløselig stivelse, 0,5% "Prorich", 1,2% maisglutenmél og 0,2% kalsiumkarbonat. Kulturmediet var blitt sterilisert ved 120°C i 20 minutter og fordelt i mengder på 20 110 ml i 500 ml roterende kolber. Inokulumet ble dyrket ved 27°C ved 180 omdr./min. og arfameninutskillelsen ble undersøkt etter hvert som tiden forløp. Arfameninutskillelsen var maksimal etter 32 timer med dyrking. Da 36 timer hadde passert etter oppstartning av dyrkingen, avtok arfameninkonsentrasjonen bestemt ved hjelp av anti-aminopeptidase B-aktiviteten gradvis. 25

pH i dyrkingsmediet under dyrkingen var 7,4 ved oppstartingen av dyrkingen, 7,8 etter 8 timer, 7,6 etter 16 timer, 7,85 etter 24 timer, 8,1 etter 32 timer, 8,1 etter 36 30 timer og 8,45 etter 52 timer.

Eksempel 2

Stammen *Chromobacterium violaceum* BMG361-CF4 ble dyrket under de samme betingelser ved å bruke det samme dyrkingsmediet som i eksempel 1. 9,5 liter av dyrkingsmediet erholdt etter dyrkingen ble justert til en pH på 2 med saltsyre og sugefiltrert ved hjelp av en filterinnretning ("Hyflo Super Cell") hvorved man fikk 9 liter av et filtrat. Fil- 35

165200

18

trartet hadde en aminopeptidase B-inhiberende virkning (IC_{50}) på 0,05 μ l/ml.

Eksempel 3

9 liter av filtrartet erholdt i eksempel 2 ble justert til en pH på 5 med natriumhydroksyd og adsorbent på en 1 liter stor kolonne med "Amberlite XAD-4". Adsorbentet ble vasket med vann og deretter eluert med en 50% vandig oppløsning av aceton. 2,3 liter av den virksomme fraksjonen ble oppkonsentrert og tørket under redusert trykk, hvorved man fikk 19,6 g av et rått pulver. Råpulveret hadde en inhiberingsaktivitet for aminopeptidase B (IC_{50}) på 0,2 μ g/ml. Deretter ble det rå pulveret oppløst i en passende mengde av en 0,05 M vandig oppløsning av natriumklorid og adsorbent på 500 ml "CM-Sephadex C-25". Adsorbentet ble vasket med 1,5 liter av 0,05 mol vandig oppløsning av natriumklorid og 1 liter 0,05 M sitratbufferoppløsning (pH 4,5), og underkastet gradienteluering med 2,5 liter av den samme bufferoppløsning sammen med 2,5 liter av den samme bufferoppløsning inneholdende 0,55 M natriumklorid. I overensstemmelse med denne fremgangsmåten ble eluatet samlet som 18 ml store fraksjoner. Arfamenin A ble erholdt i fraksjonene nr. 39 - 59, mens arfamenin B ble erholdt i fraksjonene nr. 60 - 89. De respektive fraksjonene ble avsaltet med "Amberlite XAD-4" og deretter frysetørket hvorved man fikk 188 mg av et rått arfamenin A-pulver (inhiberingsaktivitet overfor aminopeptidase B IC_{50} = 0,0065 μ g/ml) fra arfamenin A-fraksjonene. Fra arfamenin B-fraksjonene ble det erholdt et rått arfamenin B-pulver i et utbytte på 79 mg (inhiberingsaktivitet overfor aminopeptidase B IC_{50} = 0,0023 μ g/ml).

Eksempel 4

188 mg av det rå arfamenin A-pulveret erholdt i eksempel 3 ble oppløst i en passende mengde av en 0,05 M vandig oppløsning av natriumklorid og justert til en pH på 2,3 med 1N saltsyre. Oppløsningen ble adsorbent på en 80 ml kolonne med "CM-Sephadex C-25" og vasket med 100 ml av en 0,07 M vandig oppløsning av natriumklorid. Adsorbentet ble så underkastet gradienteluering ved å bruke 300 ml av en

0,07 M vandig oppløsning av natriumklorid og 300 ml av en 0,05 M vandig oppløsning av natriumklorid. Dette rensetrinnet ga fraksjoner (8 ml hver) og man fikk arfamenin i fraksjonene nr. 11 - 34. Fraksjonene nr. 11 - 30 ble oppkonsentrert og justert til en pH på 2,3 ved hjelp av 1N saltsyre. Konsentratet ble eluert med vann på en 500 ml kolonne med "Sephadex LH-20" for å avsalte det. Den avsaltede oppløsning av arfamenin ble justert til en pH på 5 med "Dowex WGR" og frysetørket, hvorved man fikk 94 mg arfamenin A som et hvitt pulver (inhiberingsvirkning overfor aminopeptidase B $IC_{50} = 0,0054 \mu\text{g/ml}$).

Eksempel 5

79 mg av arfamenin B-fraksjonen erholdt i eksempel 3 ble oppløst i en passende mengde av en 0,05 mol vandig oppløsning av natriumklorid. Oppløsningen ble justert til en pH på 2,3 ved hjelp av 1N saltsyre og adsorbent på en 100 ml kolonne av "CM-Sephadex C-25". Adsorbatet ble vasket med 100 ml av en 0,15 M vandig oppløsning av natriumklorid og deretter underkastet gradienteluering ved å bruke 350 ml av en 0,15 M vandig oppløsning av natriumklorid og 350 ml av en 0,6 M vandig oppløsning av natriumklorid. I henhold til dette rensetrinnet ble eluatet erholdt som 11 ml store fraksjoner og man fikk arfamenin B i fraksjonene nr. 17 - 30. Disse fraksjonene ble oppkonsentrert og eluert med 0,01N saltsyre på en 500 ml stor kolonne av "Sephadex LH-20" for å avsalte konsentratet. Den avsaltede fraksjonen med arfamenin B ble justert til en pH på 4 med "Dowex WGR" og frysetørket hvorved man fikk 32 mg arfamenin B som et hvitt pulver. Dette produktet hadde en inhiberingsvirkning overfor aminopeptidase B IC_{50} på $0,0020 \mu\text{g/ml}$.

Eksempel 6

En 500 ml Sakaguchi-kolbe ble fylt opp med 80 ml av et dyrkingsmedium omfattende 1,5% glycerin, 1,5% oppløselig stivelse, 0,5% "Prorich", 1,5% fiskemel, 0,2% kalsiumkarbonat og 0,05% antiskummiddel ("KM-72"). Dyrkingsmediet ble sterilisert i 15 minutter ved 120°C , avkjølt og inokulert med en løkkefull *Chromobacterium violaceum* BMG361-CF4 (deponerings-

165200

20

nr. 6521 ved the Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry of Japan) oppdyrket ved hjelp av skråkulturr. Inokulumet ble rystedyrket ved 28°C i 24 timer med 135 frem- og tilbakegående bevegelser pr. minutt for å lage et første inokulum.

En 100 liter stor tank ble påfylt 50 liter av et dyrkingsmedium omfattende 1,5% glycerin, 1,5% oppløselig stivelse og 0,5% "Prorich", 1,74% bonittekstrakt, 0,2% kalsiumkarbonat og 0,05% antiskummiddel ("KM-72"). Dyrkingsmediet ble sterilisert ved 120°C i 30 minutter, avkjølt og inokulert med 80 ml av det første inokulumet. Det inokulerte mediet ble dyrket i 24 timer ved 28°C med omrøring ved 200 omdr./min. under tilførsel av sterilisert luft i en hastighet på 50 l/min., hvorved et andre inokulum ble fremstilt.

300 liter av et dyrkingsmedium som omfattet 3,0% oppløselig stivelse, 0,5% "Prorich", 1,2% maisglutenmel, 0,2% kalsiumkarbonat og 0,05% antiskummiddel ("KM-72") ble tilført en 570 liter stor tank, dyrkingsmediet ble sterilisert ved 120°C i 30 minutter, avkjølt og inokulert med 6 liter av det andre inokulumet. Inokulumet ble dyrket ved 28°C i 24 timer med omrøring ved 190 omdr./min. under tilførsel av 300 liter luft pr. minutt. Etter dyrkingen ble dyrkingsmediet justert til en pH på 2 med svovelsyre og sugefiltrert under anvendelse av en filterinnretning ("Hyflo Super Cell"). Filtratet ble justert til en pH på 6 med natriumhydroksyd og sugefiltrert på nytt, hvorved man fikk 185 liter av et filtrat. Filtratet hadde en inhiberingsaktivitet overfor aminopeptidase B IC₅₀ på 0,17 µl/ml.

10 liter aktivkull for kromatografibruk ble tilsatt til 185 liter av filtratet og blandingen ble omrørt i 2 timer. Aktivkullet ble fraskilt fra blandingen gjennom en 200 mesh sikt. Aktivkullet ble så vasket med 50 liter vann og tilsatt til 80 liter en 50% vandig oppløsning av aceton justert til en pH på 2 med saltsyre. Blandingene ble omrørt i 2 timer for ekstrahering. Aktivkullet ble fjernet ved hjelp av en kurvsentrifuge og ekstraktet ble konsentrert

hvorved man fikk 3,54 liter av et konsentrat. Inhiberingsaktiviteten overfor aminopeptidase B (IC_{50}) hos konsentratet var 0,0063 μ l/ml.

Eksempel 7

5 3.54 liter av konsentratet erholdt i eksempel 6 ble nøytralisert med 2N natriumhydroksyd til 5,35 liter av en væske. Væsken ble adsorbent på en 1,7 liters kolonne med "Amberlite XAD-4" og vasket med vann. Kolonnen ble eluert med 12 liter av en 50% vandig oppløsning av aceton og
10 7 liter av den virksomme fraksjonen ble konsentrert under redusert trykk, hvorved man fikk 280 ml av et konsentrat. Inhiberingsaktiviteten overfor aminopeptidase B (IC_{50}) av konsentratet var 0,01 μ l/ml. Deretter ble konsentratet adsorbent på en 1,7 liters kolonne med "CM-Sephadex" og vasket
15 med 6 liter av en 0,05 M vandig oppløsning av natriumklorid og 2 liter med 0,05 M sitratbufferoppløsning (pH 4,5). Det vaskede adsorbentet ble gradienteluert med 6 liter av den samme bufferoppløsning og 6 liter av den samme bufferoppløsningen inneholdende 0,6 M natriumklorid. I henhold til
20 denne fremgangsmåten ble eluatet samlet opp som fraksjoner på 200 ml hver. Arfamenin A fremkom i fraksjonene nr. 30 - 39 og arfamenin B i fraksjonene nr. 42 - 52. De respektive fraksjonene ble oppkonsentrert og avsaltet med "Amberlite XAD-4" hvorved man fikk 85 ml av en arfamenin A-fraksjon
25 (IC_{50} = 0,00058 μ l/ml) og 43 ml av en arfamenin B-fraksjon (IC_{50} = 0,00031 μ l/ml).

Eksempel 8

85 ml av arfamenin A-fraksjonen erholdt i eksempel 7 ble adsorbent på en 240 ml kolonne med "Biogel P-2" (et produkt fra Bio-lad). Kolonnen ble vasket med 2,5 liter
30 vann og 1 liter av en 20% vandig oppløsning av metanol, og eluert med en 0,001 M vandig oppløsning av natriumklorid. Eluatet ble samlet opp som fraksjoner på 18 ml hver. Arfamenin A fremkom i fraksjonene nr. 7 - 81. Disse fraksjonene
35 ble oppkonsentrert, avsaltet med "Amberlite XAD-4" og frysetørket, hvorved man fikk 1,48 g arfamenin A som et lysegult pulver. Dette pulveret hadde en inhiberingsaktivitet overfor aminopeptidase B (IC_{50}) på 0,030 μ g/ml.

Eksempel 9

43 ml av arfamenin B-fraksjonen erholdt i eksempel 7 ble adsorbent på en 240 ml kolonne med "Biogel P-2" (Bio-lad's produkt). Kolonnen ble vasket med 2 liter vann og 1 liter av en 20% vandig oppløsning av metanol, fulgt av å eluere den med en 0,005 M vandig oppløsning av natriumklorid. Eluatet ble samlet opp som fraksjoner på 18 ml hver og arfamenin B fremkom i fraksjonene 6 - 25. Disse fraksjonene ble oppkonsentrert, avsaltet med "Amberlite XAD-4" og frysetørket. Det ble erholdt 1,89 g arfamenin B som et lysegult pulver. Inhiberingsaktiviteten overfor aminopeptidase B (IC_{50}) av pulveret var 0,019 $\mu\text{g/ml}$.

Kort beskrivelse av tegningene:

- Fig. 1 viser det ultrafiolette absorpsjonsspekteret for arfamenin A ifølge foreliggende oppfinnelse.
- Fig. 2 viser det infrarøde absorpsjonsspekteret for arfamenin A.
- Fig. 3 viser NMR-absorpsjonsspekteret for arfamenin A.
- Fig. 4 viser det ultrafiolette absorpsjonsspekteret for arfamenin B ifølge foreliggende oppfinnelse.
- Fig. 5 viser det infrarøde absorpsjonsspekteret for arfamenin B.
- Fig. 6 viser NMR-absorpsjonsspekteret for arfamenin B.

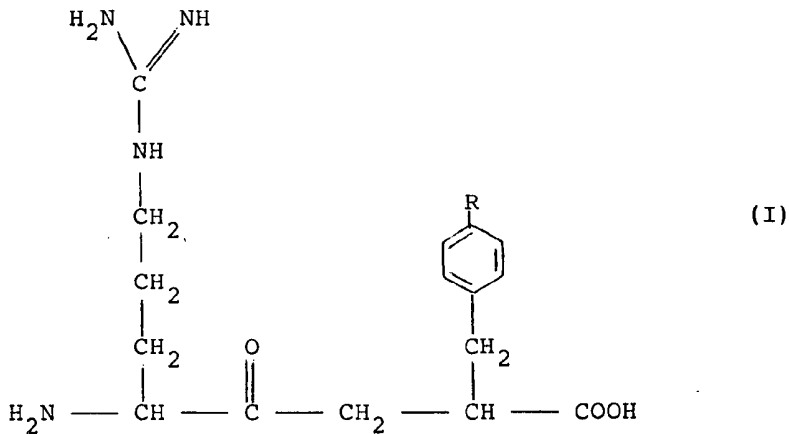
25

30

35

P a t e n t k r a v

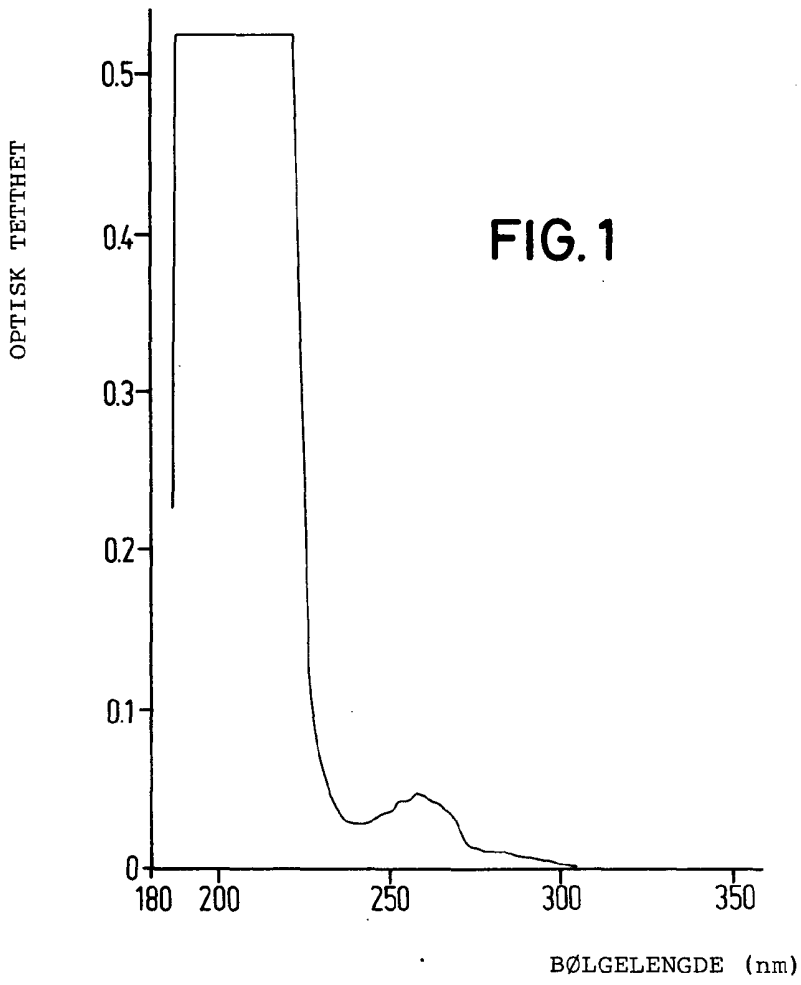
1.
 Fremgangsmåte for fremstilling av en forbindelse med formel
 5 (I)



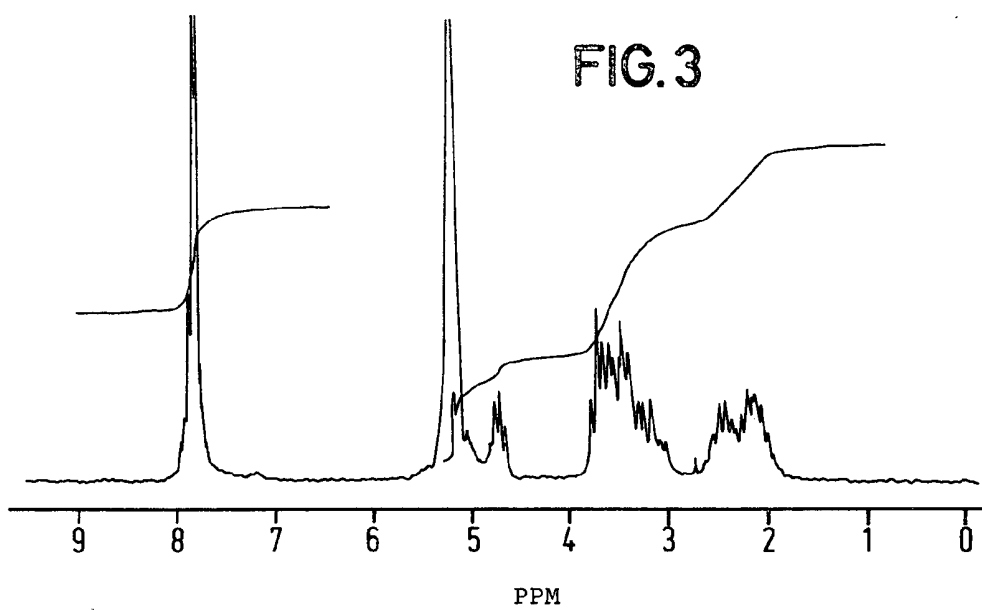
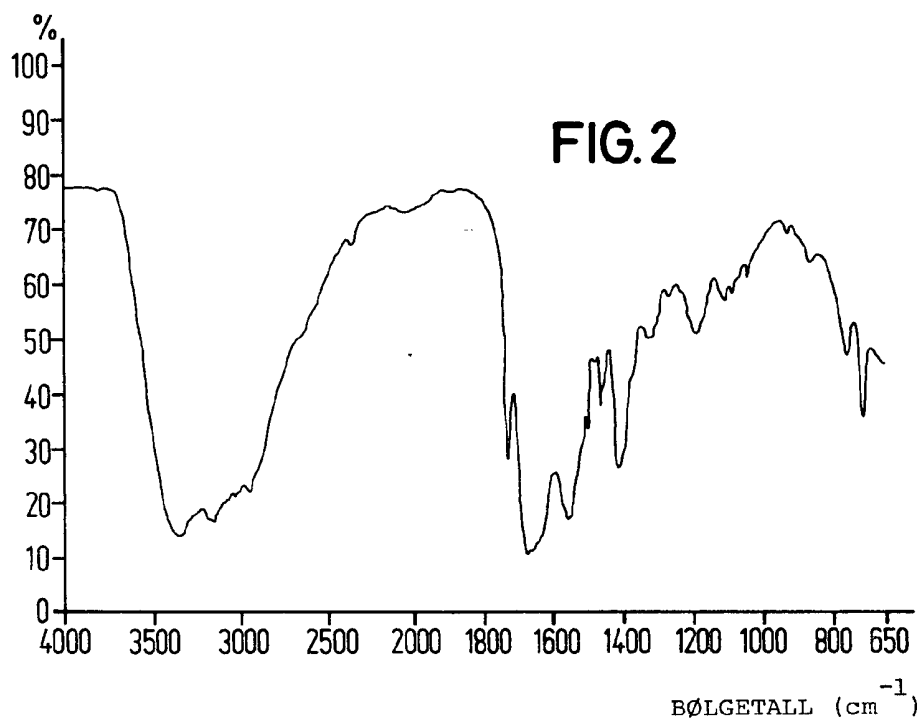
25 hvor R er hydrogen eller en hydroksylgruppe, k a r a k -
 t e r i s e r t v e d at man dyrker mikroorganismen
 Chromobacterium violaceum BMG 361-CF4 i nærvær av kjente
 næringsstoffer og utvinner forbindelsen med formel (I) fra
 kulturmediet.

2.
 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
 30 v e d at man anvender et flytende kulturmedium, og at
 forbindelsene med formel (I) utvinnes fra kulturmediet
 ved adsorbering av et filtrat av kulturmediet på et van-
 lig adsorberingsmiddel og isolering av de ønskede for-
 bindelsene fra adsorbatet.

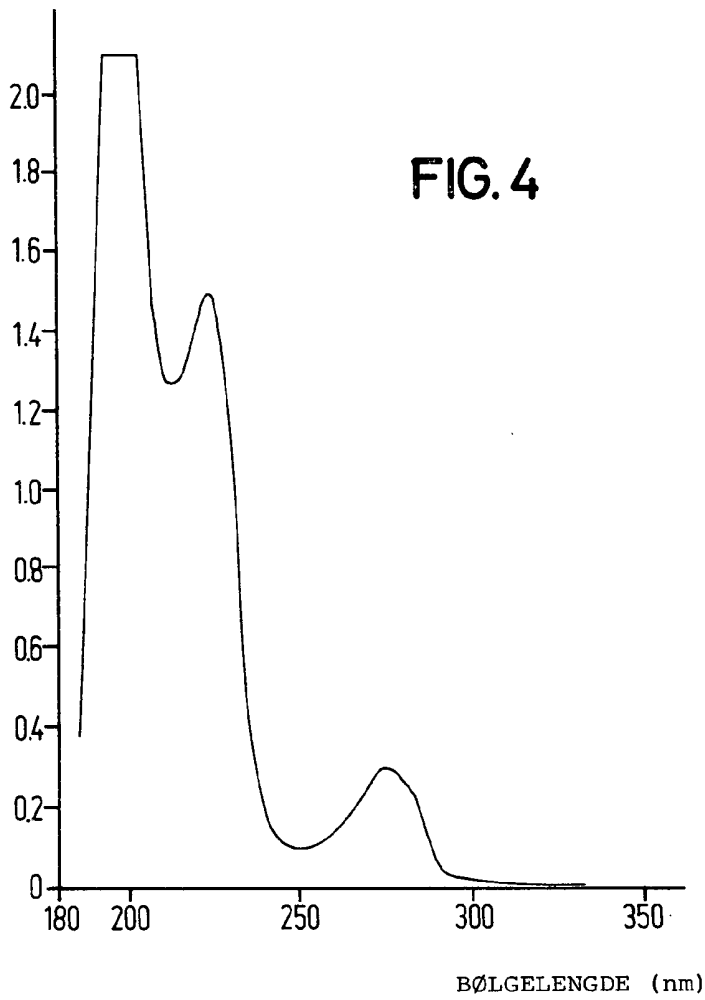
165200



165200



165200



165200

