

NORGE

[B] (II) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 131080



STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN

(51) Int. Cl. C 12 d 13/02

(52) Kl. 6b-16/03

(21) Patentsøknad nr. 3958/70

(22) Inngitt 20.10.1970

(23) Løpedag 20.10.1970

(41) Søknaden alment tilgjengelig fra 4.8.1971

(44) Søknaden utlagt og
utlegningsskrift utgitt 23.12.1974

(30) Prioritet begjært fra: 3.2.-70 og 12.5.1970 Japan,
nr. 8984/70 og 39772/70

- (71)/(73) ZAIDAN HOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYU KAI,
No. 14-23, 3-chome, Kamoisaki, Shingawa-ku,
Tokyo, Japan.
- (72) Hamao Umezawa, No. 4-23, Toyotama-Kita, Nerima-Ku, Tokyo,
Osamu Tanabe, No. 16 Terado-Shibukawa, Muko-cho, Otokuni-gun,
Kyoto-fu og Tomio Takeuchi, No. 5-1-11 Higashi-Gotanda,
Shingawa-ku, Tokyo, alle: Japan.
- (74) A/S Oslo Patentkontor Dr. ing. K. O. Berg.
- (54) Fremgangsmåte for fremstilling av en ny hypotensiv forbindelse,
kalt oudenon, og dets alkali- eller jordalkali-metallsalter.

Oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av et nytt hypotensivt middel, kalt oudenon, og alkali- eller jordalkali-metallsalter derav ved dyrking av en soppstamme i en vandig karbohydrat-løsning, som inneholder et nitrogen-holdig næringsmiddel under submerse, aerobe betingelser, samt utvinning av oudenon fra nevnte løsning, og er karakterisert ved at det som soppstamme anvendes *Oudemansiella radicata* ATCC nr. 20 295. Det fremstilte midlet inhiberer effektivt utviklingen av tyrosin-hydrolase og senker blodtrykket. Midlet er anvendbart for behandling av hypertensive sykdommer.

Ifølge nærværende oppfinnelse har man nå således fremskaffet et hypotensivt middel, som sammen med dets salter effektivt inhiberer

131080

tyrosin-hydrolase og reduserer blodtrykket. Nevnte hypotensive stoff er løselig i vann, metanol, etanol, propanol, butanol, aceton, metylisobutylketon, etylacetat, butylacetat, kloroform og benzen, og det er uløselig i eter, heksan og petroleter. Videre viser stoffet ved UV-analyse et maksimum ved 246 m μ i fosfat buffer-løsning (pH 7.0) og to maskima ved 221m μ og 285 m μ i en 0.1N HCl-løsning. Det gir videre positiv reaksjon med 2,4 dinitrofenylhydrazin og tetrazolium reagenser, men negativ reaksjon med Fehlings- og Tollensreagenser. Dets krystaller smelter ved 77-79°C og er optisk aktive ($[\alpha]_D^{20} = 10,6^\circ$ i 0,5% etanol). Ved titrering i vandig løsning har det et pK' på ca. 4,1, og molekylformelen er C₁₂H₁₆O₃. Når stoffet pelletiseres sammen med kaliumbromid, viser det absorpsjonsbånd i det infrarøde området ved følgende bølgelengder, angitt i cm⁻¹: 3400, 2900, 1710, 1660, 1560, 1455, 1420, 1380, 1300, 1270, 1255, 1195, 1170, 1130, 1100, 1050, 1015, 990, 980, 955, 935, 895, 885, 860, 840, 820, 810, 780. Oudenon, slik som det utkrystalliseres i heksan, har følgende struktur:

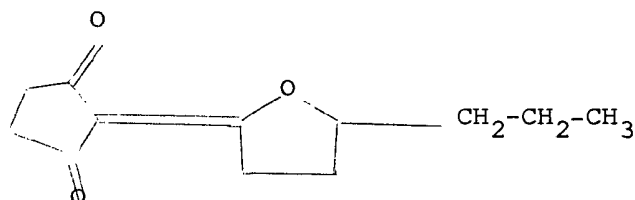


Fig. 1 viser ultrafiolette absorpsjonsspektra for oudenon i fosfat-buffer ved pH 7.0 og i 0.1N HCl.

Fig. 2 viser det infrarøde absorpsjonsspektrum for oudenon pelletisert med kaliumbromid.

Fig. 3 viser det infrarøde spektrumet for kaliumoudenon pelletisert med kaliumbromid.

Ifølge oppfinnelsen er det framskaffet en fremgangsmåte for fremstilling av oudenon ved dyrkning av den oudenonproduserende mikroorganisme i et vandig miljø, som inneholder karbon-kilder og nitrogenkilder, under aerobe betingelser inntil man har frem-

stilt en større mengde oudenon i nevnte løsning. Oudenon kan i dyrkede substrat påvises ved hjelp av fotometrisk metode eller ved sin virkning med hensyn til å inhibere tyrosin-hydrolase.

Oudenon er en ny forbindelse. Organismen som produserer oudenon ble først funnet under nåletrær i Kirizumiyama i Gumma av oppfinnerne. Organismen er en sopp. Den ble dyrket og stammen fikk navnet lo F i oppfinnernes institutt (Institute of Microbial Chemistry, Shingawa-ku, Tokyo). Den er innlevert til Kogyo Gijutsuin Hakko Kenkyujo i Chiba og innlemmet i dennes permanente samling som nr. 503. Det utvikles et fruktlegeme når den dyrkes på et sagmugg-substrat (lo g sagmugg ble blandet med 60 cm³ av en blanding bestående av 2.0% glukose og 0.5% tørr gjær, og dette ble overført til en 500 cm³ flaske og sterilisert 20 min. ved 120°C) ved 27°C. Det utviklede fruktlegemet er av Collybiatype. Pileus, som er 4-11 cm i diameter, er til å begynne med konveks. Deretter åpner den seg og blir plan, og den sentrale delen av pileus skyter litt opp. Når det er fuktig er overflaten mukøs og svak brun eller svak grå-brun. Hattstrengene er formet radially eller nett-lignende. Skiven er løstsittende, hvit til gul-hvit, og direkte bundet til stilken. Stilken er innhul og sporemorcelle-mønsteret er hvitt. Sammenlignet med kjente sopper har stammen lo F felles egenskaper med Oudemansiella, og blant tre kjente arter av Oudemansiella er den mest lik Oudemansiella radicata.

Når det gjelder beskrivelse av Oudemansiella radicata, så kan det henvises til R.J. Imazeki og J. Hongo, "Gensyoku Nippon Kinrui Zukan", vol. 1, s. 34, 1968, Hoiku Sha; Louis C.C. Krueger, "The Mushroom Handbook", s. 306-309, 1967, Dover Publication Co; og Morten Lang og F. Bayard Hora, "A guide to Mushroom and Poas-tools", 1.e edition, s. 106-107, 1963, E.P. Dutton Co. Ltd.

Soppene klassifiseres etter fruktlegemets morfologi, men det er ikke helt sikkert at fruktlegemet, som utvikles på kunstig måte, er helt identisk med det som forekommer i naturen. Stammen lo F ble undersøkt etter en kort vekstperiode på det beskrevne sagmugg-substratet, og stammen lignet Pseudohiatula ohshimae, Hongo et Matsuda. Helt utgrodd oppviste stammen lo F spore-størrelser på

15-20 x 9,5-16 μ mens tilsvarende sporestørrelser for *Pseudohiatula ohshimae* var 4,5-6,5 x 2-3 μ . Toppen av fruktlegemet fra stammen lo F var konveks, men den tilsvarende topp av fruktlegemet fra *Pseudohiatula ohshimae* var konkav. Når stammen fikk gro helt ut, som beskrevet ovenfor, ble den klassifisert som *Oudemansiella radicata*, og den er innlemmet i "The American Type Culture Collection" under benevnelsen "ATCC No. 20 295". Det er nå fremskaffet en spektrofotometrisk metode for å bestemme oudenon, og det er nå lett å påvise oudenon i dyrkede mikroorganismer. Den spektrofotometriske metoden for bestemmelse av oudenon er også nyttig ved fremskaffing av effektive fremgangsmåter for ekstraksjon og rensing.

Ifølge nærværende oppfinnelse fremstilles oudenon ved aerob dyrking av den oudenon-produserende stamme. Ved fremstillingen av oudenon er det mulig å dyrke på et fast substrat, men ved fremstilling av større mengder er det ifølge nærværende oppfinnelse foretrukket å dyrke i et flytende substrat. Stammen lo F blir f.eks. dyrket på en skrå-agar bestående av 2,0% glukose, 0,5% tørr gjær, 1,5% agar (sterilisert 20 min. ved 120°C uten justering av pH, og etter steriliseringen ble pH justert til ca. 5,6), og det utviklede myceliet på skrå-agaren blir podet i et substrat hvor oudenon fremstilles. Det finnes en annen effektiv metode for poding: den oudenon-produserende stammen dyrkes på et sagmuggsubstrat, som beskrevet ovenfor, ved 27°C i 10-20 dager, hvorefter substratet med mycelium oppslemmes i et ferskt substrat, (f.eks. et substrat bestående av 2,0% glukose og 0,5% tørr-gjær), og suspensjonen tilsettes det substrat hvor oudenon fremstilles.

Det er også mulig å innpode en kultur, som er fremstilt ved rystekultur eller ved gjennomluftet fermentering, i et substrat i hvilket oudenon kan fremstilles. Den oudenon-produserende stammen kan utvikles ved 20-35°C, men det foretrekkes å dyrke den oudenon-produserende stammen ved fremstilling av oudenon. Ved dyrkning av den oudenon-produserende stammen anvendes stoffer som er kjent som næringsstoffer for mikroorganismer. Som karbonkilde kan man anvende glukose, maltose, dekstrin, stivelse, laktose, sakkarose, glycerol eller eddiksyre. Det ble tilsatt karbon-kilder til grunn-substratet, som besto av 0,5 pepton, 0,3%

törrgjær, 0,3% KH_2PO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1% NaCl , og oudenon-produksjonen i dette substrat, som inneholdt forskjellige karbonkilder, ble undersøkt i rystekultur 14 dager ved 27°C . Den oudenon-produserende stammen, som var dyrket på sagmugg-substrat ved 27°C i 14 dager, ble oppslemmet i et substrat bestående av 2,0% glukose og 0,5% törrgjær, og 10 cm^3 av suspensjonen ble innpodet i substrater på 120 cm^3 , som ble plassert i 500 cm^3 flasker. Produksjon av oudenon (mcg/cm^3) i kulturløsningen og veksten (rikelig vekst +++, middelvekst ++, svak vekst +) var følgende: glukose: 59 mcg/cm^3 etter 7 dager, 300 mcg/cm^3 og +++ etter 10 dager; maltose: 7 mcg/cm^3 etter 7 dager, mindre enn 5 mcg/cm^3 og ++ etter 10 dager; dekstrin: $12,5\text{ mcg/cm}^3$ etter 7 dager, mindre enn 5 mcg/cm^3 og ++ etter 10 dager; stivelse: 5 mcg/cm^3 etter 7 dager, mindre enn 5 mcg/cm^3 og ++ etter 10 dager; 25 mcg/cm^3 etter 7 dager, 100 mcg/cm^3 og + etter 7 dager, 15 mcg/cm^3 og ++ etter 10 dager; glycerol: 19 mcg/cm^3 etter 7 dager, 215 mcg/cm^3 og +++ etter 10 dager; natriumacetat: mindre enn 5 mcg/cm^3 etter 7 dager og 10 dager, 18 mcg/cm^3 og + etter 15 dager. Vegetabiliske oljer, som f.eks. soyabønne-olje, sesamolje etc., og animalsk fett, som f.eks. svinefett etc., kan anvendes ved fremstillingen som karbon-kilde og også som antiskum-middel. Oudenon består av karbon, hydrogen og oksygen, og inneholder ikke nitrogen. Imidlertid kan nitrogen-holdige stoffer, som er kjent for å være nyttige i forbindelse med mikroorganismenes vekst, anvendes for dyrkning av den oudenon-produserende stammen. F.eks. kan pepton, kjøttekstrakt, gjær, gjærekstrakt, soyabönnemel, bomullsfrömel, peanöttmel, maisstöpeväske, riskli og uorganiske nitrogen-holdige stoffer anvendes for dyrkning av den oudenon-produserende stammen. Oudenon ble f.eks. fremstilt fra den oudenon-produserende stammen i en rystekultur med følgende sammensetning: A: 2,0% glukose, 0,5% pepton, 0,3% KH_2PO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH ble ikke justert); B: 2,0% glukose, 1,0% maisstöpeväske (pH 5,6); C: 2,0% glukose, 1,0% soyabönnemel, 0,5% törrgjör (pH 5,6). Hvert substrat på 125 cm^3 ble tilført en 500 cm^3 stor flaske, og den oudenon-produserende stammen, som var dyrket på sagmugg-substrat, ble innpodet som beskrevet ovenfor. pH og produsert mengde oudenon vises nedenfor:

Dager	A substrat		B substrat		C substrat	
	pH	mcg/cm ³	pH	mcg/cm ³	pH	mcg/cm ³
5	4,4	11	4,8	< 5	4,4	15
7	4,4	5	4,4	12	4,4	64
8	4,4	11	4,8	29	4,4	88
11	4,4	62	4,6	100	5,0	95
12	4,8	158	5,0	215	4,8	229
15	5,2	180	5,2	255	5,6	475

Som det fremgår av ovenstående eksempler er pepton, maisstøpevæske, soyabönnemel og tørr-gjær eksempler på nitrogen-kilder som er anvendbare for produksjon av oudenon. Peanöttmel, bomullsfrömel, kasein og hydrolysater av kasein ble funnet å være anvendbare nitrogen-kilder ved produksjon av oudenon. Det er også mulig å tilsette uorganiske salter, og, hvis nødvendig, kan man tilsette meget små mengder tungmetallsalter.

For produksjon av oudenon ved hjelp av fermentering kan den samme fermenteringsprosessen som anvendes for produksjon av antibiotika anvendes. F.eks. produseres den ved hjelp av rystekultur eller ved gjennomluftet fermentering, og antiskum-midler, som f.eks. vegetabiliske oljer, animalsk fett eller silikonharpiks blir tilsatt.

Oudenon kan bestemmes ved å prøve dens aktivitet med hensyn til å inhibere tyrosin-hydrolase. Metoden har blitt beskrevet i "Journal of Antibiotics 21", s. 350-352, 1968. En spektrofotometrisk metode for bestemmelse av oudenon består i følgende: en oudenon-løsning som skal undersøkkes, fortynnes med 1/15M fosfat-buffer med pH 7,0 (antall ganger fortynning er n) og den optiske tetthet (a) av den fortynnede løsningen i 1 cm-kuvette avleses ved 246 mμ; løsningen som skal undersøkkes, fortynnes med 0,1N HCl (antall ganger fortynning er n) og den optiske tetthet (b) i en 1 cm-kuvette avleses ved 246 mμ. Mengden oudenon i den undersøkte løsningen beregnes på følgende måte:

$$\frac{(a - b)n}{1000 - 60} \times 10^4 = \text{mcg/cm}^3 \text{ oudenon i løsningen}$$

Når den oudenon-produserende stammen ble dyrket i et løsnings-substrat, forekommer oudenon både i kulturens væskedel og i kulturens faste del. Når f.eks. den oudenon-produserende stammen ble dyrket i en ryste-kultur og i et substrat bestående av 2,0% glukose og 0,5% pepton (125 cm³ ble tilført en 500 cm³ stor flaske) og oudenon ble bestemt i løsningsdelen og i den faste delen, ble følgende mengder oudenon funnet i 10 cm³ av kultur-ekstraktet (oudenon i den faste delen ble ekstrahert med metanol og spektrofotometrisk bestemt):

Dager	mcg oudenon i løsningsdelen	mcg oudenon i den faste delen
5	372	185
7	845	365
8	1300	410
11	2180	342

Oudenon er løselig i vann, metanol, etanol, butanol, etylacetat, butylacetat, klororform og benzen, og det overføres fra den vandige løsningen til løsninger som ikke er blandbare med vann, som f.eks. butanol, etylacetat, butylacetat, kloroform og benzen.

Fordelingskoeffisienten butanol-vann, som ble bestemt, var følgende: 8 ved pH 2,0, 7,5 ved pH 3, 4 ved pH 4, 2,5 ved pH 5, 2,5 ved pH 6, 3 ved pH 8, 0,6 ved pH 9, 0,8 ved pH 10; fordelingskoeffisienten etylacetat-vann: 5 ved pH 2,0, 4 ved pH 3, 1,5 ved pH 4, 0,2 ved pH 5, mindre enn 0,1 ved pH 6; fordelingskoeffisienten butylacetat-vann: 3 ved pH 2, 2,5 ved pH 3, 1 ved pH 4, 0,1 ved pH 5, mindre enn 0,1 ved pH 6; fordelingskoeffisienten kloroform-vann: 19 ved pH 4, 1 ved pH 5 og 0,1 ved pH 6. Fordelingskoeffisienten mellom metylisobutylketon-vann ble undersøkt ved å bestemme aktiviteten som var nødvendig for å inhibere tyrosin-hydrolase, og de var følgende: 1 ved pH 2, 1 ved pH 3, 0,3 ved pH 4, 0,1 ved pH 5, 0,1 ved pH 6.

Oudenon er stabil ved pH 2,0, 7,0 og 9,0, og ingen reduksjon med hensyn til aktiviteten viser seg etter 30 min. ved 60°C og etter 5 min. ved 100°C. Oudenon i vandig løsning kan ekstraheres ved sur reaksjon ved hjelp av en løsning som ikke er blandbar med

vann. Oudenon i løsningen kan konsentreres ved destillasjon som fjerner løsningsmiddelet. Oudenon i organiske løsningsmidler, som ikke er blandbare med vann, kan overføres til vann i nøytralt eller alkalisk miljø, og som fremgår av fordelingskoeffisienten. F.eks. kan oudenon i det fermenterte substratet ekstraheres med butanol, etylacetat, butylacetat, kloroform etc. ved pH 2-3. For å oppnå en effektiv ekstraksjon kan en flertrinnsekstraksjonsmetode anvendes. Denne ekstraksjons-fremgangsmåten kan anvendes for hele kulturen inkludert mycelium. Konsentrasjonen av løsningen som inneholder oudenon kan foretas ved destillasjon ved atm. trykk eller under redusert trykk, og dette gir sirup eller tørt, rått pulver, hvorfra oudenon kan krystalliseres. Krystallisasjonen gir hvite oudenon-krystaller. Ved denne fremgangsmåten blir om nødvendig, kultur-kraften filtrert, og oudenon i filtratet gjenvinnes ved hjelp av den ovenbeskrevne fremgangsmåten, og oudenon i den faste delen ekstraheres med metanol, etanol, aceton, etylacetat, butylacetat, kloroform etc. For krystallisering av en mindre mengde oudenon er heksan eller heksan-benzen eksempler på egnede løsningsmidler. Hvis det foreligger større mengder, kan imidlertid løsningsmidler, i hvilke oudenon er mer løselig, som f.eks. vann, metanol, etanol, butanol, etylacetat, aceton, benzen og klorform, anvendes. For krystallisasjonen finnes det også en metode hvorved et løsningsmiddel, i hvilket oudenon er uløselig, tilsettes en oudenon-løsning.

Hvis et materiale som skal krystalliseres inneholder forurensninger som hindrer krystallisasjon, overføres oudenon fra et løsningsmiddel som ikke er blandbart med vann til et vannsjikt i nøytralt eller alkalisk miljø, og oudenon ekstraheres fra den vandige løsningen med et løsningsmiddel som ikke er blandbart med vann i surt miljø. Hvis det er nødvendig, kan oudenon renses på kromatografisk vei. F.eks. er kromatografering med silica-gel og benzen-etylacetat (1:2) et eksempel på en egnet metode.

Som det klart fremgår har oudenon en sur karakteristikk, og derfor kan en anion-bytter-harpiks-fremgangsmåte anvendes for ekstraksjon og isolasjon av oudenon. Når f.eks. 130 cm^3 fermentert substrat, som inneholder 310 mcg/cm^3 oudenon, fikk passere gjennom en søyle fylt med 20 cm^3 "Dowex 1 X 2" harpiks i Cl^- -form,

og etter at søylen var vasket med destillert vann, ble oudenon eluert fra søylen med 0,2N HCl. Fra fraksjonen 2-9 ble det utvunnet 16 mg oudenon (etter å ha spylt med 0,2N HCl ble eluatet oppdelt i porsjoner på 20 g). En anion-bytter-harpiks "IRA-400" er også et eksempel på en egnet harpiks for ekstraksjon av oudenon. Ved å anvende en anion-bytter-harpiks, kan man fremstille oudenon fra det fermenterte ekstraktet i et utbytte på mer enn 75%. På grunn av sine sure egenskaper kan oudenon utfelles fra løsningen. F.eks. kan oudenon utfelles fra den vandige løsningen ved tilsetning av kopper(II)-ioner. Behandling av bunnfallet med syre og ekstraksjon med et organisk løsningsmiddel fulgt av en inndampning, gir en rå eller ren oudenon.

Som ovenfor beskrevet, kan oudenon gjenvinnes ved hjelp av løsningsmiddel-ekstraksjons-fremgangsmåte, absorpsjons- og eluerings-fremgangsmåter, utfellings-fremgangsmåter og destillasjons-fremgangsmåter.

Oudenon som er fremstilt ifølge nærværende oppfinnelse, har følgende egenskaper og følgende biologiske virkninger:

Oudenon-krystaller (hvite plater), erholdt ved rekrystallasjon i heksan eller benzen-heksan smelter ved 77-79°C, har formelen $C_{12}H_{16}O_3$ (elementæranalyse: beregnet: C 69,21, H 7,74, O 23,05; funnet: C 69,5, H 7,86, O 23,01; $C_{12}H_{16}O_3$ ved hjelp av masse-spektroskopi), er løslig i vann, metanol, etanol, propanol, butanol, aceton, metylisobutylketon, etylacetat, butylacetat, benzen og kloroform og er uløselig i eter, petroleter og heksan og er optisk aktiv ($[\alpha]_D^{20} = -10,6^\circ$, 0,5% etanol). Dets fosfatbuffer-løsning (1/15M), (10 mcg/cm³) med pH 7,0 viser et maksimum ved 246 mμ ($E_{1cm}^{1\%} = 1000$), og dens oppløsning (10 mcg/cm³) i 0,1N HCl viser to maksima ved 221 mμ ($E_{1cm}^{1\%} = 625$) og ved 285 mμ ($E_{1cm}^{1\%} = 963$). Pelletisert med kaliumbromid får man følgende bånd i det infrarøde spektrumet: 3400, 2900, 1710, 1660, 1560, 1455, 1420, 1380, 1300, 1270, 1255, 1195, 1170, 1130, 1100, 1050, 1015, 990, 980, 955, 935, 895, 885, 860, 840, 820, 810, 780 cm⁻¹. Det har syrekarakter og kan ved sur pH overføres i en løsning som er ikke-blandbar med vann, og kan videre overføres fra løsningen til vann

ved pH høyere enn 5-6. Det absorberes ved anion-bytter-harpiks, og ved titrering er pK' ca. 4,1. Det gir positive reaksjoner med 2,4-dinitrofenylhydrazin, hydroksaminsyre-ferriklorid og tetrazolium, men negative reaksjoner med Fehlings- og Tollensløsninger. Det absorberer to mol hydrogen med palladium-karbon, hvorved $C_{12}H_{20}O_3$ dannes. Ved tynnsjikt-kromatografi med silica-gel og butanol-eddiksyre-vann (4:1:1) er R_f ca. 0,7, og ved bruk av abenzen-etylacetat (2:1) er R_f ca. 0,1.

Oudenon i en konsentrasjon på 100 mcg/cm^3 viser ingen inhibisjon med hensyn til vekst av følgende bakterier på næringsagar: *S. aureus*, *E. coli* (K12), *S. typhosa*, *S. dysenteriae*, *K. pneumoniae*, *B. anthracis*, *B. subtilis*, *Mycobacterium 607*, og ingen inhibisjon overfor *Pyricularia oryzae*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium chrysogenum* på en glykoseagar. Det viser inhibisjon overfor *Pyricularia oryzae* ved $12,5 \text{ mcg/cm}^3$, når denne fungus gror i ris-saft-løsning ved pH 5,0.

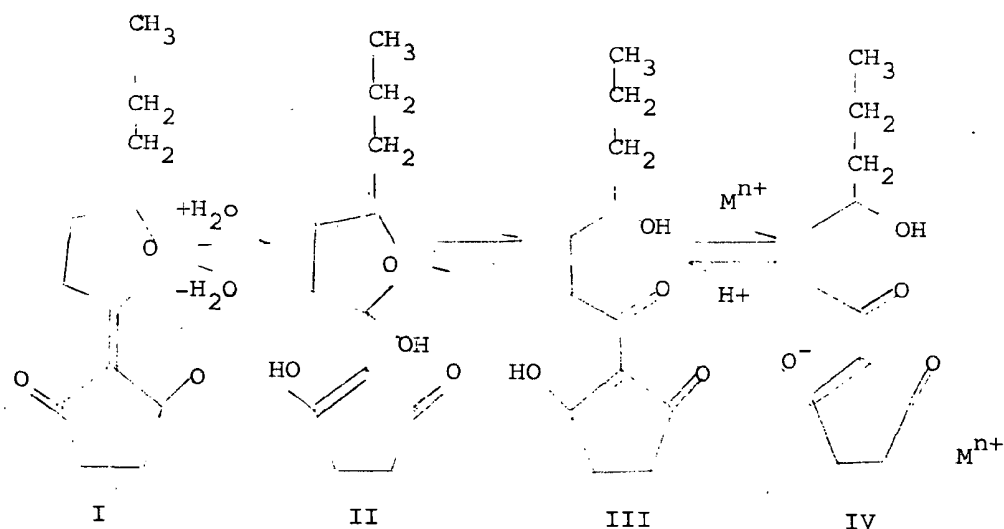
Forbindelsen som har formelen $C_{12}H_{16}O_3$, og som smelter ved 75-80°C har ikke vært kjent. Forbindelsen har en lav toksisk virkning på dyr. Når oudenon ble oppløst i destillert vann (pH 2,3) og administrert til mus var LD_{50} 138 mg/kg ved intravenøs injeksjon, 163 mg/kg ved intraperitoneal injeksjon, 100 mg/kg ved subcutanøs injeksjon og 1100 mg/kg ved oral administrasjon. Når oudenon ble oppløst i destillert vann og nøytralisert, var LD_{50} 1270 mg/kg ved intravenøs injeksjon, 1310 mg/kg ved intraperitoneal injeksjon, 1400 mg/kg ved subcutanøs injeksjon og 2200 mg/kg ved oral administrasjon. Ved oral eller intraperitoneal administrasjon av 160 mg/kg, 40 mg/kg eller 10 mg/kg oudenon daglig i 30 dager, fikk man ingen symptomer på toksisitet, men blodtrykket ble nedsatt.

Virkningen av oudenon på tyrosin-hydrolase ble undersøkt ved hjelp av følgende metode: reaksjonsblandingen inneholdt 0,1 μmol L-tyrosin- C^{14} ($1,1 \times 10^5 \text{ cpm}$), 1 μmol 2-amino-4-hydroksy-6,7-dimetyl-tetrahydropteridin, 0,1 cm^3 tyrosin-hydrolase-løsning (1 mg som protein/ cm^3), 200 μmol acetat-buffer med pH 6,0, 100 μmol merkapt-*o*-etanol, 100 mcg, 50 mcg, 25 mcg, 12,5 mcg eller 0 mcg oudenon i 1,0 cm^3 . Ved 30°C og etter 15 min. ble

3,4-dihydroksyfenylalanin- c^{14} separert ved hjelp av aluminium-
 oksyd-kromatografi og testet med hensyn til radioaktiviteten.
 Ved denne test ble følgende inhibisjons-% ved følgende konsen-
 trasjoner av oudenon bestemt: 74,1% ved 100 mcg/cm^3 , 57,6% ved
 50 mcg/cm^3 , 39,0% ved 25 mcg/cm^3 , 30,6% ved $12,5 \text{ mcg/cm}^3$.
 Denne inhibisjon var ikke reversibel ved tilsetning
 av Fe^{++} ved konsentrasjonen $1 \times 10^{-3} \text{ M}$. Når resultatene insettes
 i Lineweaver-Burk-ligningen vil man kunne se at oudenon ikke
 er konkurransedyktig med tyrosin og konkurransedyktig med
 2-amino-4-hydroksy-6,7-dimetyltetrahydropteridin.

Strukturen (I, som vist nedenfor) for i heksan krystallisert
 oudenon ble bestemt. Som strukturformelen viser, har oudenon ingen
 karboksyl-gruppe, men det har syrekarakter som tidligere beskrevet.
 Som beskrevet nedenfor har saltene av oudenon formelen $(\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_4)_n \text{ M}$
 (M danner M^{n+} ion).

Det er nå sikkert at oudenon kan ha følgende strukturformler
 (I, II, III, IV).



(M^{n+} betyr alkali- eller jordalkali-metallioner, f.eks. Ca^{++} kan skrives M^{2+}).

Denne oppfinnelse omfatter fremgangsmåte for fremstilling av alle ovenfor beskrevne oudenon-former. Ved biosyntese av oudenon, eksisterer oudenon i kulturløsningen hovedsaklig som II, III og IV, og det eksisterer hovedsaklig som I når det befinner seg i ekstraktet til et organisk løsningsmiddel som er ikke-blandbart med vann. Ifølge nærværende oppfinnelse omfatter fremgangsmåten også fremstilling av alkali- og jordalkali-metallsalter. Ifølge nærværende oppfinnelse kan man således ved å utgå fra forbindelsene I, II, III, og som vist ovenfor, fremstille de nevnte salter av oudenon.

Ifølge nærværende oppfinnelse kan man til en løsning av oudenon tilsette uorganiske eller organiske alkali- eller jordalkali-metall-forbindelser, hvilke lett frigjør resp. metallioner. Vann kan tilsettes, hvis nødvendig, og saltene av oudenon fremstilles enten ved å fjerne løsningsmiddelet eller ved krystallisasjon. F.eks. tilsettes natrium-2-etylheksoat til en oppløsning av oudenon i etylacetat, og natrium-oudenon faller ut i form av krystaller; til oudenon, som er omdannet til II og III i vann, tilsettes $KHCO_3$ til pH 6,0 fåes, og kalium-oudenon krystalliserer ut ved fordampning av løsningsmiddelet under tilsetning av n-butanol, som understøtter fordampningen; til oudenon, som er omdannet til II og III i vann, tilsettes bariumhydroksyd til pH 6,0 fåes, og fordampning med tilsatt n-butanol gir krystallinsk barium-oudenon. Som det fremgår av maskima ved ultrafiolett-absorbsjon av oudenon i vann og med 1/15M fosfatbuffer med pH 7,0 ifølge ovenstående beskrivelse, og som det fremgår av ovenstående beskrivelse av saltene med ovenstående molekylformler, reagerer oudenon med vann under dannelsen av forbindelsene II og III.

Salter av oudenon har følgende egenskaper: Natrium-oudenon: hvitt krystallpulver, smp. $145-148^{\circ}C$; beregnet analyse for $C_{12}H_{17}O_4Na$: C 58,05, H 6,90, O 25,77, Na 9,26; funnet: C 57,79, H 7,32, O 24,96, Na 8,77.

Kalium-oudenon: Hvite krystaller, smp. 116-117°C; beregnet analyse for $C_{12}H_{17}O_4K$: C 54,51, H 6,48, O 24,20 K 14,78; funnet: C 55,73, H 6,77, O 23,6, K 13,37.

Kalsium-oudenon: hvite krystaller, smp. 167-169°C; beregnet analyse for $(C_{12}H_{17}O_4)_2Ca$: C 58,76, H 6,98, O 26,09, Ca 8,15; funnet: C 58,40, H 7,15, Ca 8,19.

Magnesium-oudenon: hvite krystaller, smp. 252-255°C; beregnet analyse for $(C_{12}H_{17}O_4)_2Mg$: C 60,70, H 7,21, Mg 5,01; funnet: C 60,53, H 7,62, Mg 5,15.

Barium-oudenon: hvite krystaller, smp. 135-138°C; beregnet analyse for $(C_{12}H_{17}O_4)_2Ba$: C 49,03, H 5,82, O 21,77, Ba 23,36; funnet C 49,24, H 6,01, O 20,00, Ba 22,91.

Natrium-, kalium-, kalsium- eller magnesium-oudenon, som i vann gir et pH på ca. 6-7, kan anvendes for oral administrasjon eller injeksjon.

Hydroksylering av tyrosin er det hastighetsbegrensende trinnet for norepinephrine-biosyntesen. Derfor resulterer inhibisjonen av tyrosin-hydrolase i en inhibering av norepinephrin-syntesen in vivo, hvilket resulterer i en senkning av blodtrykket. Hvis norepinephrin-syntesen i hjernecellene reduseres, oppviser det en sedativ virkning. Injeksjonen av en større dose oudenon til mus eller rotter forårsaket ingen søvn, og den sedative virkningen kunne ikke iakttas. Det antas derfor at hjerne-blod-barrieren inhiberer penetrering av oudenon til hjernecellene. Som allerede beskrevet vil den daglige injeksjonen eller daglige orale administrasjonen av oudenon til rotter senke blodtrykket. Den hypotensive virkningen kan bedre markeres når oudenon administreres til genetisk hypertensive rotter. Når 6,25 mg/kg ble intraperitonealt injisert i en rotte med 183 mm blodtrykk og en annen rotte med 193 mm blodtrykk, ble blodtrykket senket til hhv. 115-145 mm og 150-170 mm i løpet av 1-22 timer etter injeksjonen. Når 3,13 mg/kg ble injisert i rotter med 173 mm blodtrykk, ble trykket redusert til 140-148 mm i løpet av 1-22 timer etter injeksjonen. Når 25 mg/kg ble intraperitonealt

131030

injisert i en rotte med 150 mm blodtrykk, ble trykket redusert til 140-163 mm i løpet av 1-22 timer etter injeksjonen. Den daglige orale administrasjonen av oudenon (3,1 mg/kg, 6,25 mg/kg, 12,5 mg/kg, 25 mg/kg) i tre dager viste en markert reduksjon av blodtrykket. Det resulterte i 20-30% reduksjon, og denne reduksjon holdt seg fem dager etter den siste orale administrasjonen.

Oudenon inhiberer tyrosin-hydrolase og reduserer blodtrykket. Derfor vil kombinasjonen med andre hypotensive midler forårsake sterkere virkning. Spesielt kombinasjonen med reserpin forårsaker sterk virkning.

Eksempel 1

Stammen 10 F, som var dyrket på et skråagar-substrat bestående av 2,0% glukose, 0,5% tørr-gjær og 1,5% agar, ble innpodet i fire flasker med sagmugg-substrat. Sagmugg-substratet ble tilberedt på følgende måte: 10 g sagmugg, (fra *Magnolia hypoleuca*) ble tilsatt 60 cm³ av en blanding av 2,0% glukose og 0,5% tørr-gjær, og dette ble overført til en 500 cm³ flaske og sterilisert 20 min. ved 120°C. Inkuberingen ble foretatt ved 27°C i 14 dager. 250 cm³ av substratet, som besto av 2,0% glukose og 0,5% tørr-gjær, ble tilsatt hver flaske og rystet. Den således tilberedte suspensjonen fra fire flasker ble innpodet i 150 l substrat som besto av 2,0% glukose, 0,5% pepton, 0,3% tørrgjær, 0,3% KH₂PO₄, 0,1% MgSO₄·7H₂O, og som var overført til en fermenterings-beholder på 400 l og sterilisert 20 min. ved 120°C. Fermenteringen skjedde under omrøring, 200 omdr./min., og luftning med 150 l steril luft pr. min. ved 27°C. pH var 5,68 ved starten, 5,1 etter 45 timer, 4,6 etter 55 timer, 4,35 etter 65 timer, 4,8 etter 83 timer og 4,7 etter 96 timer. Sukkermengden ble redusert suksessivt, og mengden var 0,53% etter 96 timer. Mengden oudenon i kultur-filtratet: 19,5 mcg/cm³ etter 40 timer, 91 mcg/cm³ etter 65 timer, 94 mcg/cm³ etter 71 timer, 605 mcg/cm³ etter 80 timer. Fermenteringen ble avsluttet etter 97 timer, og ved hjelp av saltsyre ble kulturens pH regulert til 3,0. Ved filtrering beholdt man 110 l filtrat. Det inneholdt 607 mcg/cm³ oudenon. Mycel-skorpen veide 4,1 kg og inneholdt 2,0 g oudenon. Kultur-filtratet tilsattes 100 l n-butanol. Dette ble blandet og separert, hvor-

etter 50 l n-butanol igjen ble tilsatt. Butanol-ekstraktene ble forenet (sluttvolumet var 166 l) og inneholdt 49,8 g oudenon. Det forenede butanol-ekstraktet ble konsentrert til en sirup ved hjelp av destillasjon under redusert trykk. Sirupen ble oppløst i 800 cm^3 av en blanding av benzen-etylacetat (volumforholdet 2:1), og løsningen fikk passere gjennom en silica-gel-søyle (1,75 kg silica-gel ble oppslemmet i benzen-etylacetat). Søylen diameter var 4 cm. 6 l benzen-etylacetat (2:1) fikk strømme gjennom søylen og deretter 6 l benzen-etylacetat (1:1). Deretter ble søylen tilført 30 l benzen-etylacetat (1:2). Man erholdt et eluat som inneholdt 28,6 g (1100 mcg/cm^3) oudenon. Konsentrasjon av eluatet ved destillering under redusert trykk ga en sirup som veide 40 g. Sirupen tilsattes 3 l varm heksan, og ved avkjøling erholdt man 17 g oudenon-krystaller. Krystallisasjon av oudenon fra moderluten ga ytterligere 8 g oudenon.

Oudenon i mycelkaken ble ekstrahert med 8 l metanol, og ekstraktet ble konsentrert til 1,5 l ved destillering under redusert trykk. Ved hjelp av saltsyre ble deretter pH regulert til 3,0, og det ble så ekstrahert med 1,5 l og deretter med 0,75 l n-butanol. Butanol-ekstraktene ble forenet og konsentrert til sirup, og sirupen ble oppløst i 100 cm benzen-etylacetat (2:1), og dette ble deretter kromatografert ved hjelp av 120 g silica-gel i søylen. Med samme fremgangsmåte, som ovenfor beskrevet, får man ytterligere 1,0 g oudenon.

Eksempel 2

Mycelsuspensjonen av den oudenon-produserende stammen ble fremstilt etter den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåten, dvs. dyrkning av stammen 10 F på sagmugg-substrat. 10 cm^3 av suspensjonen ble innpodet i 125 cm^3 substrat, og dette ble overført til en 500 cm^3 stor flaske. Denne inneholdt 0,2% glukose, 0,5%, pepton, 0,3% tørr-gjær, 0,3% KH_2PO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, og kulturen ble rystet 11 dager ved 27°C . På denne måte erholdt man 1000 cm^3 kultur-konsentrat (310 mcg/cm^3). Dette fikk passere en søyle med "IRA-400". 50 cm^3 av harpiksen var tilført en søyle med en diameter på 2 cm. Destillert vann (100 cm) ble tilført søylen og deretter 350 cm^3 0,1N HCl. Eluate inneholdt 250 mg

oudenon. Til eluatet tilsettes 350 cm^3 og 100 cm^3 n-butanol suksessivt, og konsentrasjonen av butanol-ekstraktet ved hjelp av destillasjon under redusert trykk ga en sirup. Sirupen ble oppløst i benzen, og heksan ble tilsatt for å felle ut oudenon. På denne måter erholdt man 150 mg oudenon-krystaller.

Eksempel 3

Stammen 10 F ble dyrket ifølge den i eksempel 1 beskrevne metoden. Fermenteringen ble stoppet etter 96 timer. Kultur-filtratet inneholdt 500 mcg/cm^3 oudenon, og mycelkaken i 1 cm^3 av kulturen inneholdt 80 mcg. Ved hjelp av HCl ble 100 l av dette kultur-konsentratet stilt til pH 2,5, og deretter ble det ekstrahert med hhv. 100 l og 50 l n-butanol. Butanolekstraktene ble forenet (inneholdt 52 g oudenon) og konsentrert til en sirup ved destillasjon under redusert trykk. Oudenon i sirupen ble ekstrahert ved hjelp av hhv. 4 l og 1 l etylacetat. Etylacetat-ekstraktene ble forenet og tilsatt til 1,5 l vann. Under blandingen ble bunnsjiktets pH ved hjelp av 10N NaOH stilt til 7,0 og vannsjiktet ble atskilt. Vannsjiktet inneholdt 41 g oudenon. Ved hjelp av HCl ble vannsjiktets pH stilt til 3,0, og oudenon ble ekstrahert med hhv. 3 l og 1 l etylacetat. Etylacetat-sjiktene ble forenet og inndampet til en sirup. Sirupen ble løst i 3 l varm heksan og deretter avkjølt. Utbyttet oudenon-krystaller var 18 g, og ytterligere 11 g oudenon-krystaller ble erholdt etter konsentrasjonen av moderluten.

Eksempel 4

650 mg oudenon-krystaller (smp. $77.5-78.5^\circ\text{C}$) ble oppløst i 20 cm^3 etylacetat. Denne løsningen ble tilsatt 4 cm^3 av en oppløsning av natrium-2-etylheksoat i metylisobutylketon (45.2% v/v). Dette ble omrørt 65 min. ved romtemperatur. Natrium-oudenon, som falt ut, ble filtrert og vasket med 5 cm^3 etylacetat. Deretter ble det tørket og utbyttet ble 670 mg natrium-oudenon, smp. $145-148^\circ\text{C}$. Dets vandige løsnings viste pH 6.0, og det var løselig i vann, metanol og etanol, men uløselig i etylacetat, benzen og aceton.

Eksempel 5

Rå krystaller av oudenon (1.18 g, ssmp. $74-76^\circ\text{C}$) ble oppløst i

25 cm³ etylacetat, og 0.25 cm³ destillert vann ble tilsatt. Til denne løsningen ble det tilsatt 2.65 cm³ av en oppløsning av natrium-2-etylheksoat i metylisobutylketon (45.2% v/v). Det hele ble omrørt to timer ved romtemperatur, hvorefter det ble ytterligere omrørt en time ved 10°C. Natrium-oudenon, som falt ut, ble fraskilt og vasket med 5 cm³ etylacetat. Deretter ble det tørket, og utbyttet ble 1.35 g natrium-oudenon-krystaller. $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ved 346 mμ var i nøytral løsning 853, og $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ved 285 mμ var 765 i sur løsning.

Eksempel 6

30 gram sirup som var fremstilt fra fermenteringsvæsken fra dyrkning av den produserende stamme ved hjelp av n-butanol og destillasjon under redusert trykk, og som inneholdt den aktive oudenon-forbindelse i en mengde på 12 g, ble oppløst i 400 cm³ etylacetat, og til denne løsningen ble det tilsatt 70 cm³ av en oppløsning av natrium-2-etylheksoat i metylisobutylketon (45.2% v/v). Etter 60 min. omrøring ved romtemperatur ble det over natten henstilt i et kaldt rom. Natrium-oudenon-krystallene ble vasket med 40 cm³ etylacetat og tørket, og på denne måten fikk man 10.7 g natrium-oudenon. $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ved 246 mμ var 842 i nøytral vandig løsning, og $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ved 285 mμ var 760 i sur løsning. 2.0 g av dette natrium-oudenon (IV, Mⁿ⁺ er Na⁺) ble oppløst i 40 cm³ destillert vann og ekstrahert med 40 cm butylacetat. Det ble utrystet 10 min. ved pH 2.0 med 3N HCl, og butylacetat-sjiktet ble avskilt. Den samme fremgangsmåten ble gjentatt, og butylacetatekstraktene ble forenet og avvannet med natriumsulfat. Dette ble konsentrert til en sirup under redusert trykk. Fra sirupen ble oudenon utkrystallisert i 100 cm³ cykloheksan. 1 gram oudenon-krystaller ble erholdt (smpt. 76-78°C).

Eksempel 7

2.08 g oudenon-krystaller ble oppløst i 50 cm³ destillert vann, og 1.0 g KHCO₃ ble tilsatt. pH ble derved 6.0. Til denne løsningen ble det tilsatt 150 cm³ n-butanol, og blandingen ble destillert under redusert trykk. Man fikk derved krystaller, og ytterligere 100 cm³ n-butanol ble tilsatt og destillasjonen gjentatt. De erholdte hvite krystallene ble filtrert, vasket med n-butanol og tørket. Man erholdt derved 2.39 g kalium-oudenon-

131060

krystaller, smp. 116-117 °C. 10 mg/cm³ av løsningen viste pH på 6.95. $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ i 99% metanol ved 246 m μ var 592, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ i nøytral vandig løsning ved 246 m μ var 788 og $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ i sur løsning ved 285 m μ var 672.

Eksempel 8

Ifølge den i eksempel 7 beskrevne fremgangsmåten, men ved bruk av 185 mg kalsium-hydroksyd i stedet for kalium-bikarbonat, ble det av 1.04 g oudenon fremstilt 0.89 g kalsium-oudenon.

Eksempel 9

Ifølge den i eksempel 7 beskrevne fremgangsmåten, men ved bruk av 787 mg Ba(OH)₂·8H₂O i stedet for kalium-bikarbonat, ble det av 1.04 g oudenon fremstilt 1.28 g barium-oudenon.

Eksempel 10

Ifølge den i eksempel 7 beskrevne fremgangsmåten, men ved å bruke 145 mg magnesium-hydroksyd i stedet for kalium-bikarbonat, ble det av 1.04 g oudenon fremstilt 0.64 g magnesium-oudenon.

Eksempel 11

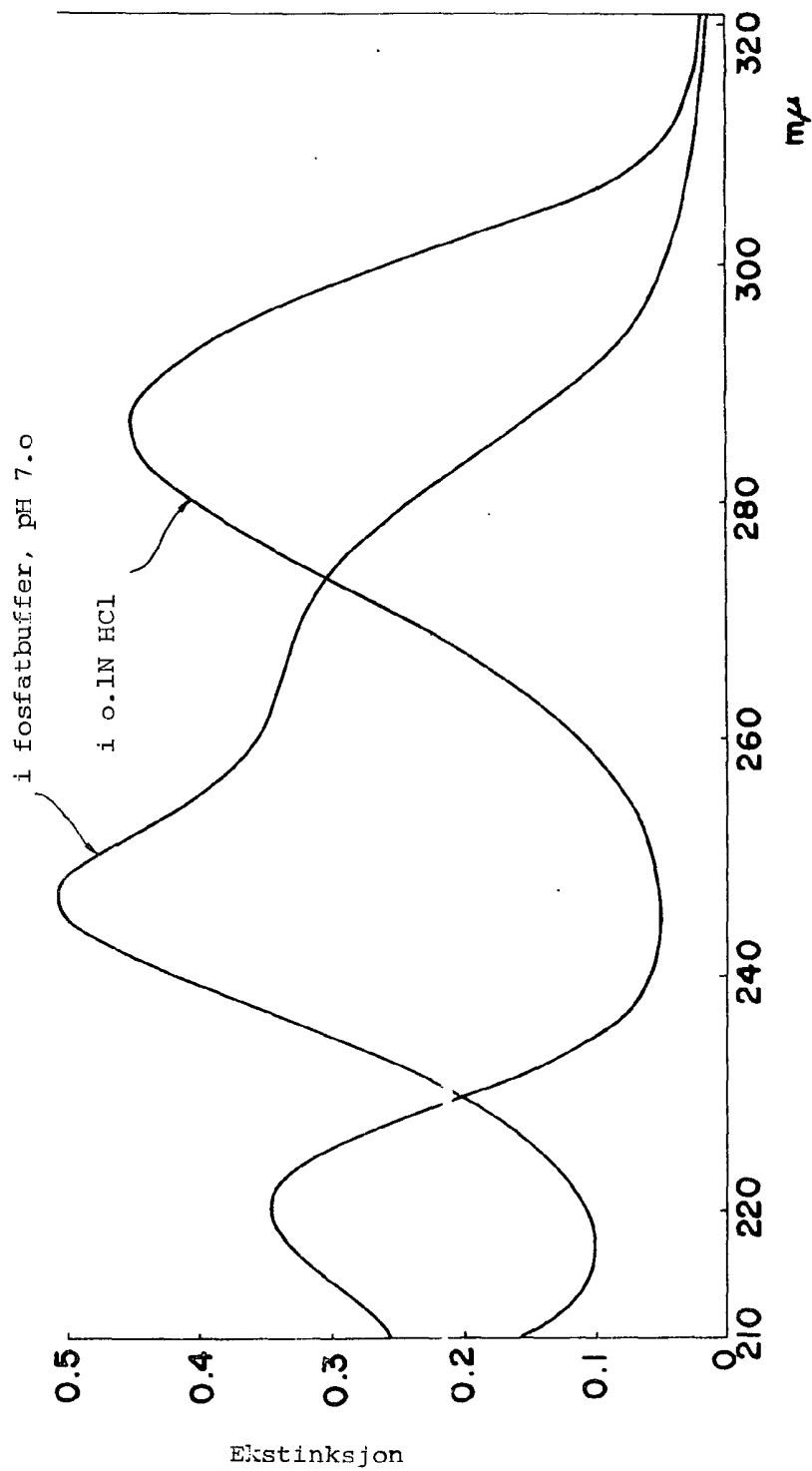
Ifølge den i eksempel 7 beskrevne fremgangsmåten, men ved å bruke 420 mg natrium-bikarbonat i stedet for kalium-bikarbonat, ble det av 1.04 g oudenon fremstilt 1.2 g natrium-oudenon.

P a t e n t k r a v

Fremgangsmåte for fremstilling av en ny hypotensiv forbindelse kalt oudenon og alkali- eller jordalkali-metallsalter derav, k a r a k t e r i s e r t v e d at man dyrker soppstammen Oudemansiella radicata ATCC nr. 20295 i vandig karbohydrat-løsning, som inneholder nitrogenholdig næringsstoff, under submers, aerob betingelse, gjenvinner oudenon fra dyrkningsmediet, og, hvis ønsket, overfører oudenon til dets alkali- eller jordalkali-metallsalter.

Fig. 1

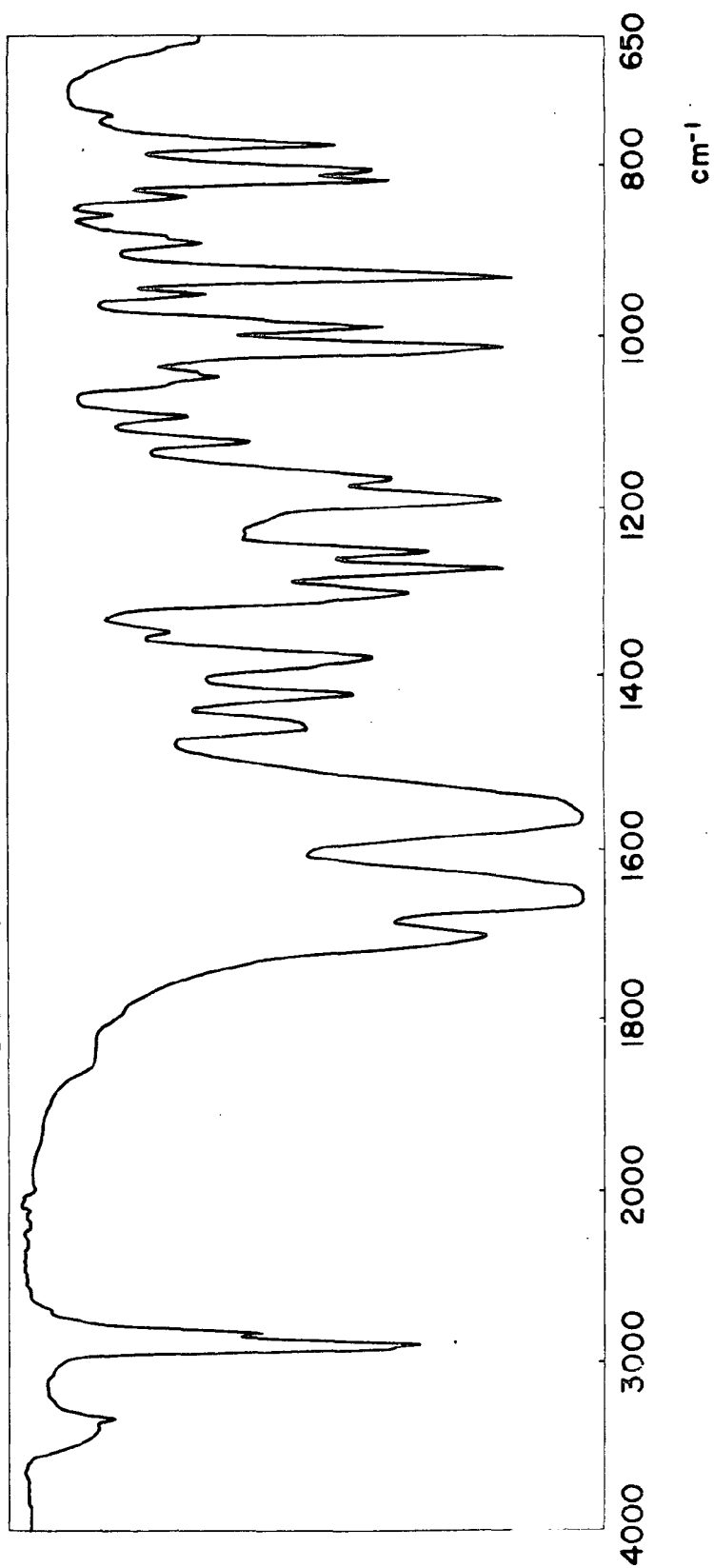
UV-spektra av oudenon (5 mcg/ml)
i nöytral (fosfatbuffer, pH 7.0) og
sur lösning (0.1N HCl)



131080

Fig . 2

Infrarött absorptions-spektrum av oudenon (KBr)



131080

Fig . 3

