



[8] (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT 57781

C (45) Patentti myönnetty 10 10 1980
Patent meddelat
(51) Kv.lk.³/Int.Cl.³ C 12 P 19/12, C 07 D 493/22

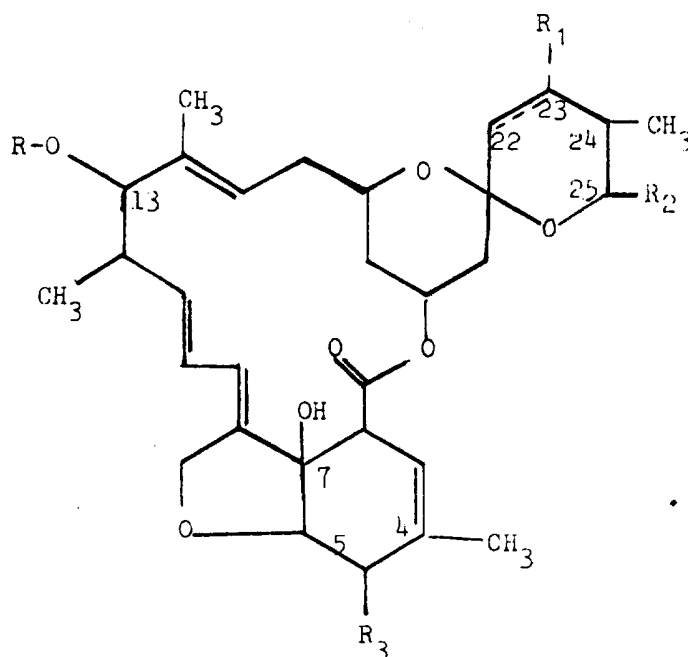
SUOMI—FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

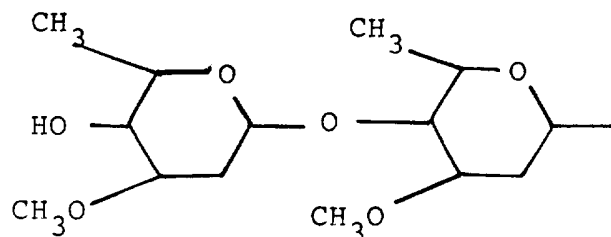
(21) Patentihakemus — Patentansöknin	771124
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	07.04.77
(23) Aikupäivä — Giltighetsdag	07.04.77
(41) Tulut julkiseksi — Blivit offentlig	20.10.77
(44) Nähtävöksiäminen ja kuuljulkaisu pvm. — Ansökan utlagd och utskriften publicerad	30.06.80
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	19.04.76
USA(US)	678328

- (71) Merck & Co., Inc., 126 E. Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey, USA(US)
- (72) Georg Albers-Schonberg, Princeton, New Jersey, Richard William Burg, Murray Hill, New Jersey, Thomas William Miller, Carteret, New Jersey, Robert Eugene Ormond, Edison, New Jersey, Hyman Wallick, Springfield, New Jersey, USA(US)
- (74) Oy Kolster Ab
- (54) Menetelmä antihelminttisesti vaikuttavien C-076-yhdisteiden valmistamiseksi - Förfarande för framställning av C-076-föreningar med antihelmin-tisk verkan

Keksinnön kohteena on menetelmä antihelminttisesti vaikuttavien C-076-yhdisteiden valmistamiseksi, joilla on kaava



jossa R on α -L-oleandrosyyli- β -L-oleandrosyyli-ryhmä, jolla on kaava



katkoviiva esittää yksinkertaista tai kaksoissidosta; R_1 on hydroksi, joka on läsnä vain silloin, kun katkoviiva tarkoittaa yksinkertaista sidosta, R_2 on propyyli tai butyyli ja R_3 on metoksi tai hydroksi.

Keksinnön mukaan C-076-yhdisteitä valmistetaan siten, että viljellään aerobisesti C-076-yhdisteitä tuottavaa *Streptomyces avermitilis*-kantaa ATCC 31267 ATCC 31271 tai ATCC 31272 vesipitoisessa ravintoväliaineessa, joka sisältää hiilen ja typen assimiloituvia lähteitä ja epäorgaanisia suoloja, lämpötilavälillä noin 20-40°C ja pH-arvossa noin 5,0-9,0, C-076-yhdisteet otetaan talteen, edullisesti suodattamalla fermentointiväliaine, uuttamalla huovasto veden kanssa sekoittuvalla orgaanisella liuottimella, haihduttamalla orgaaninen liuotin ja uuttamalla jäännös veden kanssa sekoittumattomalla orgaanisella liuottimella.

Streptomyces avermitilis tuottaa vähintään kahdeksaa erilaista lähisukuista uutta yhdistettä. Niitä nimitetään tässä seuraavasti: C-076 Ala, Alb, A2a, A2b, Bla, Blb, B2a ja B2b. Kaikilla on selvä antihelminttinen aktiviteetti. Niitä voidaan valmistaa fermentoimalla, ja ne saadaan talteen olennaisesti puhtaina kuten alla kuvataan.

US-patenttijulkaisusta 3,950,260 on jo tunnettu antibiootin aglykonirunko. Keksinnön mukaisesti valmistetut yhdisteet eroavat kuitenkin olennaisesti mainitussa patenttijulkaisussa kuvatusta yhdisteistä. Niinpä keksinnön mukaisesti valmistetuissa yhdisteissä on disakkaridisivuketju ja niissä on jäljellä 13-hydroksiryhmä, jotka puuttuvat tunnetuista yhdisteistä. Lisäksi niissä on joko 22,23-kaksoissidos tai 23-hydroksiryhmä, jotka myös puuttuvat tunnetuista yhdisteistä. Edelleen niissä on 25-asemassa butyyli- tai propyyli-ryhmä, kun taas tunnetuissa yhdisteissä on tässä asemassa metyyli- tai etyyli-ryhmä.

Taksometristen tutkimusten perusteella näitä C-076-yhdisteitä tuottamaan pystyvät mikro-organismit kuuluvat Streptomyces-suvun uuteen lajiin, jota nimitetään Streptomyces avermitilis. Yksi tällainen maaperästä eristetty viljelmä on merkillä MA-4680 firman Merck & Co., Inc., Rahway, New Hersey, viljelmäkokoelmassa. Tämän viljelmän C-076-yhdisteitä tuottava näyte on talletettu laitoksen Fermentation Section of the Northern Utilization Research Branch, U.S. Department of Agriculture at Peoria, Illinois, pysyvään viljelmäkokotelmaan numerolla NRRL 8165. NRRL 8165 näyte on myös talletettu laitoksen American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, pysyvään viljelmäkokotelmaan, jossa sillä on numero ATCC 31,267, ja josta se on vapaasti saatavana.

Streptomyces avermitilis'in viljelytunnukset esitetään seuraavassa:

Morfologia: sporoforit muodostavat ilmahuovaston sivuhaaroina spiraaleja. Spiraalit ovat kiinteitä, mutta avautuvat viljelmän vanhetessa. Itiöt ovat yli 15 itiön ketjuina ja muodoltaan 970-kertaisella suurennuksella tarkasteltaessa tavallisesti pyöreästä soikeanmuotoiseen. Itiönmuodostusta havaitaan kaurajauhoagarilla, glyseroli-asparagiiniagarilla, epäorganiset suolat-tärkkelysagarilla ja muna-albumiiniagarilla. Itiön pinta on elektromikroskooppi-kuvassa sileä.

Kaurajauhoagar:

Vegetatiivinen kasvu: käänteinen -erittäin tummanruskea

Ilmahuovasto: jauhemainen, ruskehtavanharmaa (4li)^{xx}, jossa seassa valkeata.

Liukoinen pigmentti: ruskea

Czapek-Dox-agar (sakkarooosi-nitraattiagar)

Vegetatiivinen kasvu: heikko, väritön

Ilmahuovasto: niukka, harmahtava

Liukoinen pigmentti: vaaleanharmahtavan nahanruskea

Muna-albumiiniagar:

Vegetatiivinen kasvu: nahanruskea

Ilmahuovasto: kohtuullinen, vaaleanharmahtavankeltaisenruskea (3ge)^{xx}, jossa seassa valkeata

Liukoinen pigmentti: vaaleankellertävän nahanruskea

Glyseroli-asparagiiniagar:

Vegetatiivinen kasvu: käänteinen - kellertävänruskea

Ilmahuovasto: jauhemainen, ruskehtavanharmaa (4li)^{xx}, jossa seassa valkeata

Liukoinen pigmentti: vaalea, kellertävänruskea

Epäorgaaniset suolat-tärkkelysagar:

Vegetatiivinen kasvu: käänteinen - harmahtavan kellertävänruskea

Ilmahuovasto: jauhemainen, vaaleanruskehtavanharmaa (41g)^{xx},

kärjissä tummempaa ruskehtavanharmaata (41i)^{xx}

Liukoinen pigmentti: vaalean kellertävänruskea

Hiivauute-dekstroosi - suolat-agar:

Vegetatiivinen kasvu: käänteinen - tummanruskea

Ilmahuovasto: kohtuullinen, ruskehtavanvalkea

Liukoinen pigmentti: ruskea

Hiivauute-mallasuuteagar:

Vegetatiivinen kasvu: käänteinen - tummanruskea

Ilmahuovasto: kohtuullinen, ruskehtavanvalkea

Liukoinen pigmentti: ruskea

Peptoni-rauta-hiivauuteagar:

Vegetatiivinen kasvu: tummanruskea

Ilmahuovasto: ei ole

Liukoinen pigmentti: tummanruskeasta mustaan

Melaniini: positiivinen

H₂S-tuotto: positiivinen

Ravintoagar:

Vegetatiivinen kasvu: nahanruskea

Ilmahuovasto: niukka, harmahtava

Liukoinen pigmentti: vaaleanruskea

Ravintotärkkelysagar:

Vegetatiivinen kasvu: nahanruskea

Ilmahuovasto: niukka, harmahtavanvalkea

Liukoinen pigmentti: vaaleanruskea

Tärkkelyksen hydrolyysi: hyvä

Perunatulppa:

Vegetatiivinen kasvu: nahanruskea

Ilmahuovasto: ruskea, jonka seassa harmahtavanvalkeata

Liukoinen pigmentti: harmahtavanruskea

Loeffler'in veriseerumi:

Vegetatiivinen kasvu: harmahtavan nahanruskea

Ilmahuovasto: ei ole

Liukoinen pigmentti: kasvualusta muuttuu hieman ruskehtavaksi

Nesteytyminen: ei esiinny

Ravintotyrosiiniagar:

Vegetatiivinen kasvu: käänteinen - tummanruskeasta mustaan

Ilmahuovasto: niukka, harmahtava

Liukoinen pigmentti: tummanruskea

Tyrosiinin hajaantuminen: ei esiinny

Hiilen hyväksikäyttö:

Pridham-Gottlieb-perusväliaine + 1 % hiilenlähdettä;

+ = kasvaa; - = ei kasvua negatiiviseen kontrolliin (ilman hiili-
lähdettä) verrattuna.

Glukoosi	+
Arabinoosi	+
Selluloosa	-
Fruktoosi	+
Inositoli	+
Laktoosi	+
Maltoosi	+
Mannitoli	+
Mannoosi	+
Raffinoosi	+
Ramnoosi	+
Sakkaroosi	+
Ksyloosi	+

Ravintogelatiiniagar:

Vegetatiivinen kasvu: nahanruskea

Ilmahuovasto: niukka, harmahtavanvalkea

Liukoinen pigmentti: vaaleanruskea

Gelatiinin nesteytyminen: hyvä

Gelatiinipistoympäys:

Vegetatiivinen kasvu: ruskea rengas

Ilmahuovasto: ei ole

Liukoinen pigmentti: vihertävänruskea

Gelatiinin nesteytyminen: täydellinen

Rasvatonmaitoagar:

Vegetatiivinen kasvu: tummanruskea

Ilmahuovasto: ei ole

Liukoinen pigmentti: tummanruskea

Kaseiinin hydrolyysi: hyvä

Lakmusmaito:

Vegetatiivinen kasvu: tummanruskea kasvurengas

Ilmahuovasto: ei ole

Väri: tummanruskea

Koaguloituminen ja/tai peptonisoituminen: täydellinen peptonisoituminen; alkaa muuttua alkaliseksi (pH 8,1)

Rasvaton maito:

Vegetatiivinen kasvu: tummanruskea kasvurengas

Ilmahuovasto: ei ole

Liukoinen pigmentti: tummanruskea

Goaguloituminen ja/tai peptonisoituminen: täydellinen peptonisoituminen; alkaa muuttua alkaliseksi (pH 8,0)

Lämpötila-alue: (hiivauute-dekstroosi + epäorgaaniset suolat-agarilla)

28°C - hyvä vegetatiivinen kasvu ja ilmahuovasto

37°C - hyvä vegetatiivinen kasvu ja ilmahuovasto

50°C - ei kasvua

Hapentarve: (pistoviljelmä hiivauute-dekstroosi + epäorgaaniset suolat-agarilla) aerobinen

Kaikki koetulokset on saatu 3 viikon viljelyn jälkeen 28°C:ssa, jollei muuta ilmoiteta. Kaikkien väliaineiden pH oli noin neutraali (6,8-7,2).

Värinumero (xx) viittaa teokseen Color Harmony Manual, 1958, 4. painos, Container Corporation of America, Chicago, Illinois.

Streptomyces avermitilis kannan vertailu tunnettuihin Streptomyces kantoihin

Streptomyces avertimilis kannan tärkeimmät viljelytunnukset ovat seuraavat: ilmahuovasto ruskehtavanharmaa; itiöketjut spiraalimaisia; itiöt sileäpintaisia; tuottaa melanoidipigmenttejä; kykenee standardiolosuhteissa käyttämään hyväkseen hiilipitoisia yhdisteitä, kuten glukoosia, arabinoosia, fruktoosia, inosifolia, laktoosia, maltoosia, mannitolia, mannoosia, raffinoosia, ramnoosia, sakkaroosia ja ksyloosia; ei muodosta punaisia voimakkaan keltaisia, purppuranpunaisia tai sinisiä liukoisia pigmenttejä tai vegetatiivista kasvua.

Verrattaessa Streptomyces avermitilis kantaa kirjallisuudesta tunnettuihin Streptomyces kantoihin, havaitaan, että yhdeksällä kannalla on samat yleiset piirteet kuin Streptomyces avermitilis kannalla. Näiden kantojen kirjallisia kuvauksia ja sporoforien morfologisia kuvia tutkittiin lähemmin seuraavien julkaisujen avulla: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. painos, toimittajat R. E. Buchanan ja N. E. Gibbons, 1974, Williams & Wilkins Company, Baltimore, Md.; Shirling, E. B. ja David Gottlieb, Cooperative description of type cultures of Streptomyces, Part II, Int. J. Syst. Bacteriol. 18: 69-189 (1968), Part III, Int. J. Syst. Bacteriol. 18: 279-392 (1968), Part IV, Int. J. Syst. Bacteriol. 19: 391-512 (1969), Part V, Int. J. Syst. Bacteriol. 22: 265-394 (1972).

Kantojen *Streptomyces collinus*, *bottropensis*, *diastatochromogenes*, *luteogriseus*, *griseosporeus*, *naganishii*, *neyagawaensis*, *olivochromogenus* ja *resistomycificus* morfologia oli spiraalimainen, mutta poikkesi selvästi *Streptomyces avermitilis* kannan morfologiasta. *Streptomyces avermitilis* kannan itiöketjut ovat pitkiä, tiiviitä kierukoita, kun taas edellä esitettyjen kantojen itiöketjut olivat lyhyitä ja niissä oli useita huonosti kehittyneitä spiraaleja, koukkuja, silmukoita, kierukoita, epätäydellisiä spiraaleja tai silmukoita, avoimia spiraaleja ja usein kiemuraisia itiöketjuja, joissa ei ollut spiraaleja.

Tietyissä elatusaineissa, joissa *Streptomyces avermitilis* kannan itiönmuodostus oli runsasta, kantojen *Streptomyces naganishii* ja *olivochromogenus* itiönmuodostus oli huonoa. Kantojen *Streptomyces griseosporeus*, *luteogriseus* ja *naganishii* ilmahuovasto oli vaaleanpunertavanharmaata, kellertävänharmaata tai harmahtavan valkoista kun taas *Streptomyces avermitilis* kannan ilmahuovasto on tummanruskehtavanharmaata.

Streptomyces avermitilis kanta erosi yhden tai useamman tärkeän piirteen osalta kaikista niistä yhdeksästä kannasta, jotka muistuttivat sitä eniten, joten viljelmäämme voidaan pitää uutena *Streptomyces* kantana.

Vertaamalla edellä esitettyjä tuloksia teoksessa Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8. painos) esitettyihin tunnettuihin mikro-organismeihin havaitaan merkitseviä eroja, jotka osoittavat, että keksinnön mukainen mikro-organismi on luokiteltava uudeksi lajiksi. Tähän perustuen sille on annettu nimi *Streptomyces avermitilis*.

Yllä oleva kuvaus esittää *Streptomyces avermitilis*-kannan, jota voidaan käyttää C-076-yhdisteiden tuottamiseen. Esimerkkinä yllä kuvatun mikro-organismin mutantista on *Streptomyces avermitilis* MA 4848-kanta, joka eristettiin *Streptomyces avermitilis* MA 4680-kannasta UV-säteilytyksen jälkeen. Tämä viljelmä on sekä lyofilisoituna että jäädytettynä talletettu laitoksen American Type Culture Collection pysyvään viljelmäkokoomaan, jossa niille on vastaavasti annettu numerot 31272 ja 31271. Käytettäessä tätä jäädytettyä mikro-organismiymppiä on saatu jonkin verran korkeampia C-076:n fermentointisaantoja.

C-076-yhdisteitä tuotetaan aerobisessa fermentoinnissa sopivassa

vesipitoisissa ravintoväliaineissa alempana kuvatuissa olosuhteissa sitä tuottavalla *Streptomyces avermitilis*-kannalla. Tässä prosessissa C-076:n valmistamiseksi sopivat käytettäväksi useiden antibioottien valmistuksessa käytetyt vesipitoiset väliaineet.

Tällaiset ravintoväliaineet sisältävät sellaisia hiilen ja typen lähteitä, joita mikro-organismi pystyy yhteyttämään, ja tavallisesti pieniä määriä epäorgaanisia suoloja. Lisäksi fermentointiväliaine saattaa sisältää sellaisia metallihivenaineita, joita mikro-organismit tarvitsevat kasvaakseen. Näitä on tavallisesti riittävässä määrin ravintolähteenä käytetyissä hiilen ja typen lähteissä, mutta niitä voidaan myös haluttaessa lisätä erikseen ravintoväliaineeseen.

Yhteyttävän hiilen lähteeksi ravintoväliaineisiin sopivat yleensä hiilihydraatit, kuten sokerit, esimerkiksi dekstroosi, sakkaroosi, maltoosi, laktoosi, dekstraani, sereloosi tms., ja tärkkelykset. Tarkka hiilen lähtökäyttömäärä väliaineessa riippuu osaksi muista väliaineen aineosista, kuitenkin yleensä hiilihydraattimäärä noin 0,5-5 paino-% väliaineessa on todettu sopivaksi. Näitä hiilen lähteitä voidaan käyttää yksinään, tai niitä voidaan yhdistää useampia samaan väliaineeseen.

Streptomyces avermitilis pystyy helposti käyttämään hyväksi C-076:n yhdisteiden tuottamiseksi erilaisia typen lähteitä, kuten hiivahydrolysaatteja, hiiva-autolysaatteja, soijajauhoa, kaseinihydrolysaatteja, hiivauutteita, maissinliuotusliemiä, tislaamon liukenevia aineita, puuvillasienjauhoa, lihauutetta jne. Eri typen lähteitä voidaan käyttää yksinään tai yhdistelminä noin 0,2-6 paino-%:n määrinä väliaineesta.

Viljelyväliaineeseen sisällytetyt epäorgaaniset ravintosuolat ovat sellaisia tavallisesti käytettyjä suoloja, joista saadaan natrium-, kalium-, magnesium-, ammonium-, kalsium-, fosfaatti-, sulfaatti-, kloridi-, karbonaatti-ioneja ym. Käytetään myös hivenmetalleja, kuten kobolttia, mangaania, rautaa jne.

Seuraavassa on esimerkkejä *Streptomyces avermitilis*-kantojen kasvatukseen sopivista väliaineista C-076-yhdisteiden tuottamiseksi.

Väliaine A

Maissijauho	20,0 g
Tislaamon liukeneva aine	10,0 g
Soijajauho	15,0 g

Natriumsitraatti	4,0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
Polyglykoli P 2000	2,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
Tislattu vesi	1000 ml
pH 6,5	

Väliaine B:

Liukoinen tärkkelys	20,0 g
Maissin liuotusliemi	15,0 g
Sereloosi	5,0 g
Soijajauho	4,0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4,0 g
Maissijauho	1,0 g
Soijaöljy	2,5 ml
KH_2PO_4	0,3 g
CaCO_3	6,0 g
Tislattu vesi	1000 ml
pH 6,7	

Väliaine C:

Tomaattitahna	40,0 g
Kaurajauho	15,0 g
Tislattu vesi	1000 ml
pH 6,0	

Väliaine D:

Kaurajauho	20,0 g
Tomaattitahna	20,0 g
Tislattu vesi	1000 ml
pH 5,5	

Väliaine E:

Dekstroosi	10,0 g
Peptoni (Difco Laboratories Detroit, Michigan)	5,0 g
Hiiva-autolysaatti (Ardamine pH, Yeast Products Inc., Paterson, New Jersey)	3,0 g
NaCl	12,7 g
KCl	0,72 g
$\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,035 g

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	5,32 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,73 g
Tislattu vesi	1000 ml
pH 7,4	

Fermentointi käyttäen C-076-yhdisteitä tuottavia mikro-organismeja voidaan suorittaa lämpötila-alueella noin 20° - noin $40^{\circ}C$. Parhaiden tulosten saavuttamiseksi se suoritetaan tavallisesti noin 24° - noin $30^{\circ}C$:ssa. Edullisin lämpötila on $27-28^{\circ}C$. Ravintoväliaineen pH C-076-yhdisteiden tuottamiseksi voi vaihdella noin 5,0:sta 9,0:aan, edullisesti pH on noin 6,5-7,5.

Pienessä mittakaavassa fermentointi suoritetaan tavallisesti viemällä sopiva määrä ravintoväliainetta pulloon noudattaen tällöin tunnettua steriilitekniikkaa, ymppäämällä pulloon joko C-076-yhdisteitä tuottavan *Streptomyces avermitilis*-kannan itiöitä tai vegetatiivista solukasvustoa, sulkemalla pullo löysästi vanutukolla ja antamalla fermentaation jatkua tasaisessa huoneen lämpötilassa noin $28^{\circ}C$:ssa pyörivässä ravistimessa noin 3-10 vrk. Suuremmassa mittakaavassa fermentointi suoritetaan edullisesti sopivissa, sekoittimilla ja ilmanjohtolaitteilla varustetuissa tankeissa. Ravintoväliaine valmistetaan tankissa, ja steriloinnin jälkeen siihen ympäntään sopivan C-076-yhdisteitä tuottavan *Streptomyces avermitilis*-kannan vegetatiivista solukasvustoa. Fermentaatio saa jatkua noin $24-37^{\circ}C$:ssa 1-8 vrk. jolloin ravintoväliainetta sekoitetaan ja/tai ilmastetaan. Ilmastuksen aste riippuu useista eri tekijöistä, kuten fermenttorin koosta, sekoitusnopeudesta jne. Yleensä suuressa mittakaavassa suoritetuissa fermentoinneissa sekoitetaan noin 95-150 kierr./min., ja ilmaa johdetaan noin $0,06-0,57 \text{ m}^3/\text{min}$.

Keksinnön mukaisesti saatuja yhdisteitä, joista käytetään yleisnimitystä C-076, esiintyy *Streptomyces avermitilis*-fermentaation päätyttyä pääasiassa huovastossa, josta ne voidaan ottaa talteen ja erottaa eri yhdisteiksi alla kuvatulla tavalla. *Streptomyces avermitilis*'in tuottamista C-076-yhdisteistä on eristetty 4 suuremmassa määrin ja 4 vähäisemmässä määrin esiintyvää komponenttia. Nämä 8 eri komponenttia on nimetty seuraavasti: C-076 Ala, Alb, A2a, A2b, Bla, Blb, B2a ja B2b. Pääkomponenteilla on identifiointinimityksessä liite "a" ja vähäisemmillä komponenteilla liite "b". Rakenteellisen eron "a"- ja "b"-yhdisteiden välillä uskotaan olevan sama jokaisella neljällä parilla.

Odotetusti ei pääasiallisia C-076-yhdisteitäkään kaikkia muodostu tässä kuvatussa fermentaatiossa yhtä suuria määriä. Yleisesti on havaittu,

että A1-yhdisteiden osuus on noin 20-30 paino-% koko tuotetusta C-076-kompleksista, A2-yhdisteiden osuus on noin 1-20 % ja B1- ja B2-yhdisteiden osuus on kummankin noin 25-35 %. "a"-sarjan yhdisteiden ja "b"-sarjan yhdisteiden painosuhde on noin 85:15 - 99:1.

C-076-sarjan yhdisteiden erottaminen fermentaatioliemestä ja yksittäisten komponenttien erotus suoritetaan liuotinuutolla ja kromatografiafraktionnilla erilaisia kromatografiamenetelmiä ja liuotinsysteemejä käyttäen.

C-076-yhdisteet ovat huonosti liukenevia veteen ja hyvin liukenevia orgaanisiin liuottimiin. Tätä ominaisuutta voidaan sopivasti käyttää hyväksi niiden talteenottamiseksi fermentaatioliemestä. Eräässä talteenottomenetyksessä koko fermentaatioliemi suodatetaan, ja vesipitoinen suodos hyljätään. Märkä huovastokakku uutetaan sitten sopivalla orgaanisella liuottimella. Mikä tahansa orgaaninen liuotin sopii käytettäväksi, kuitenkin on edullista käyttää veden kanssa sekoittuvaa orgaanista liuotinta, kuten asetonia, metanolia, etanolia tms. Yleensä mahdollisimman suuren saannon kannalta on edullista suorittaa useampia uuttoja. Liuotin poistaa huovastosta aktiiviset C-076-yhdisteet sekä myös muita aineita, joilta puuttuu C-076:n antihelminttinen aktiviteetti. Jos liuotin on veden kanssa sekoittuva, se poistaa märästä huovastosta myös veden. Uutetut huovastot voidaan hyljättä. Liuotinuutteet haihdutetaan orgaanisen liuottimen poistamiseksi ja uuteaan useita kertoja toisella liuottimella. Kun ensimmäisessä uutossa käytetään veden kanssa sekoittuvaa liuotinta, niin toisessa uutossa käytetään edullisesti veden kanssa sekoittumatonta liuotinta, kuten kloroformia, metyleenikloridia, hiilitetrakloridia, etyyliasetaattia, metyylietyyliketonia, metyyli-isobutyryliketonia tms. Viimeksi saadut uutteet kuivataan ja väkevöidään tunnetulla tavalla, jolloin saadaan jäännös, joka sisältää C-076-yhdisteitä sekoittuneina muiden aineiden kanssa. Tämä fraktio sopivimmin kromatografoidaan sitten aktiivisten C-076-yhdisteiden erottamiseksi muusta aineksesta ja myös eri C-076-yhdistiden erottamiseksi toisistaan. C-076-yhdisteiden kromatografiseen puhdistukseen käytetyt menetelmät ovat alalla yleisesti tunnettuja. Esimerkkejä tällaisista kromatografiamenetelmistä ovat pylväskromatografia, jossa käytetään esim. piihappogeeliä, alumiinimoksidia, dekstraanigeelejä tms., ja eluointiin erilaisia liuottimia ja/tai kahden tai useamman liuottimen yhdistelmiä vaihtelevissa suhteissa. Nestekromatografiaa käytetään C-076-yhdisteiden toteamiseen, ja korkeapainenestekromatografiaa voidaan käyttää sellaisten puhtaiden fraktioiden eristämiseen, jotka sisältävät yhtä tai useampaa näistä yhdisteistä.

Samoin ohutkerroskromatografiaa voidaan käyttää erillisten C-076-yhdisteiden toteamiseen ja eristämiseen. Käyttämällä yllä mainittuja menetelmiä sekä muita alan ammattimiehelle tunnettuja menetelmiä saadaan C-076-yhdisteiden puhdistettuja yhdistelmiä sekä myös erillisiä C-076-yhdisteitä. Aktiivisten C-076-yhdisteiden läsnäolo todetaan analysoimalla eri kromatografiafraktioiden antihelminttinen aktiviteetti sekä yhdisteiden spektritunnuksista (kuten UV- ja IR-spektrit), kuten alla kuvataan.

Eri C-076-yhdisteiden spektri- ja muut fysikaaliskemialliset tunnusluvut on esitetty seuraavassa taulukossa I. Nämä yhdisteet ovat erittäin hyvin liukenevia useimpiin tavallisiin orgaanisiin liuottimiin ja huonosti veteenliukenevia.

Taulukossa I esitetyt ultraviolettipektriluvut saatiin metanoli-liuoksesta 1 cm kvartsiselleissä laitteella Cary Model 15 Ultraviolet Spectrometer. Yhdisteen väkevyys oli noin 25 $\mu\text{g/ml}$. Vaikka UV-absorptio on esitetty määrätylle "a"-sarjan yhdisteelle, se on tosiasiasa sellaisen "a"-sarjan yhdisteen absorptio, joka sisältää vähäisen määrän "b"-sarjan yhdistettä. "a"- ja "b"-sarjat eroavat toisistaan ainoastaan alempialkyyli-substituentissa olevan $-\text{CH}_2$ -ryhmän suhteen, joka ero ei liity kromoforiin. Ultravioletti absorptio ilmaisee lähinnä kyseessä olevan yhdisteen tyydyttymättömyyden asteen ja luonteen. Optinen kääntökyky määritettiin standardimenetelmällä käyttäen Karl Zeiss polarimetriä. Konsentraatiotekijä (c) on ilmoitettu yhdisteen $\%$ -pitoisuutena kyseisessä liuottimessa.

Taulukko I

	Ala	Alb	A2a	A2b	B1a	B1b	B2a	B2b
Molekyylikaava	$C_{49}H_{74}O_{14}$	$C_{48}H_{72}O_{14}$	$C_{49}H_{76}O_{15}$	$C_{48}H_{74}O_{15}$	$C_{48}H_{72}O_{14}$	$C_{47}H_{70}O_{14}$	$C_{48}H_{74}O_{15}$	$C_{47}H_{72}O_{15}$
Optinen kääntökyky	$+68,5^{\circ} \pm 2^{\circ}$		$+48,8^{\circ} \pm 2^{\circ}$		$+55,7^{\circ} \pm 2^{\circ}$		$+38,3^{\circ} \pm 2^{\circ}$	
$[\alpha]_D^{27}$ (CHCl ₃)	(C=0,77)		(C=1,64)		(C=1,06)		(C=0,87)	
Molekyylipaino	886	872	904	890	872	858	890	876
(määritetty massa-spektrometrisesti)								
UV-absorptiospektri	237		237		237		237	
$\lambda_{\max}(\text{m}\mu)$	(28,700;		(28,800;		(29,120;		(27,580;	
(ϵ ; log ϵ)	4,458)		4,459)		4,464)		4,441)	
	243		243		243		243	
	(31,275;		(31,740;		(31,850;		(30,590;	
	4,495)		4,501)		4,503)		4,486)	
	252		252		252		252	
	(20,290;		(20,425;		(20,510;		(20,060;	
	4,307)		4,310)		4,431)		4,302)	

Alla olevassa taulukossa II on esitetty C-076-yhdisteiden A1a, A2a, B1a ja B2a ^{13}C NMR-spektri-luvut. Spektrit on saatu laitteella Varian Nuclear Magnetic Spectrometer Model CFT-20 deuteroidussa kloroformiliuoksessa käyttäen sisäisenä standardina tetrametyylisilaaania. Kussakin tapauksessa on ilmoitettu näytteen liuoksen tilavuus ja väkevyys ja sen jälkeen kemialliset siirrot tetrametyylisilaanin suhteen kullekin yhdisteelle miljoonasosina (ppm). Kemialliset siirrot on ilmoitettu yhdelle hiiliatomille, jollei muuta ilmoiteta kemiallisen siirron perässä suluissa.

Taulukko II

A1 (0.6 ml. 16%)

12,0, 13,0, 15,1, 16,4, 17,7, 18,4, 19,2, 20,3, 27,5,
30,6, 34,3 (3C), 35,2, 36,6, 39,7, 40,5, 45,7, 56,4
(2C), 57,7, 67,3, 68,2 (2C), 68,4 (2C), 74,9, 76,1,
77,0, 77,5, 78,3, 79,4, 80,6 (2C), 82,0, 95,0, 95,3,
98,5, 118,4 (2C), 119,7, 124,9, 127,3, 135,2, 136,0,
136,1, 137,6, 139,9, 173,8.

A2 (0.6 ml. 16%)

11,8, 12,4, 13,8, 15,1, 17,7, 18,4, 19,9, 20,3, 27,3,
34,3 (3C), 35,2, 35,8, 36,5, 39,8, 40,8, 41,2, 45,7,
56,4 (2C), 57,7, 67,3, 67,7, 68,2 (3C), 69,9, 70,8,
76,1, 77,0, 77,6, 78,3, 79,4, 80,6 (2C), 81,8, 94,9,
98,6, 99,7, 117,7, 118,4, 119,7, 124,9, 135,7, 136,1,
137,6, 140,0, 173,7.

Taulukko II (jatkoa)B1 (0,3 ml. 163)

12,0, 12,9, 15,1, 16,4, 17,7, 18,4, 19,9, 20,2, 27,5,
30,6, 34,3 (3C), 35,2, 36,6, 39,8, 40,5, 45,7, 56,4 (2C),
67,3, 67,8, 68,2 (2C), 68,4 (2C), 75,0, 76,1, 78,3,
79,4 (2C), 80,5 (2C), 82,0, 95,0, 95,8, 98,5, 118,1,
118,4, 120,4, 124,8, 127,9, 135,2, 136,2, 137,9 (2C),
139,7, 173,6.

B2 (0,6 ml. 163)

11,8, 12,4, 13,8, 15,1, 17,7, 18,4, 19,9, 20,2, 27,3,
34,4 (3C), 35,2, 35,8, 36,5, 39,8, 40,3, 41,2, 45,8,
56,4 (2C), 67,3, 67,7 (2C), 68,3 (3C), 69,9, 70,9,
76,1, 78,3, 79,4 (2C), 80,5 (2C), 81,8, 94,9, 98,6,
99,7, 117,7, 118,0, 120,4, 124,8, 135,7, 138,0 (2C),
139,8, 173,5.

Kahdeksan C-076-yhdisteen tyypilliset massaspektropeikit on esitetty taulukossa III. Ensimmäisellä rivillä on kunkin yhdisteen molekyyli-ionin massan suhde varaukseen (m/e), ja muut luvut ilmoittavat kunkin yhdisteen pääasiallisten osien massavaraussuhteen. Samalla vaakarivillä olevat massa-varaussuhteet osoittavat kunkin yhdisteen analogisten osien massa-varaussuhdetta. Massavaraussuhteet, jotka on ilmoitettu kokonaislukuina, saatiin laitteella LKB Mass Spectrometer Model LKB-9000. Massa-varaussuhteet, jotka on ilmoitettu neljän desimaalin tarkkuudella, saatiin laitteella High Resolution Varian Mass Spectrometer Model MAT-731.

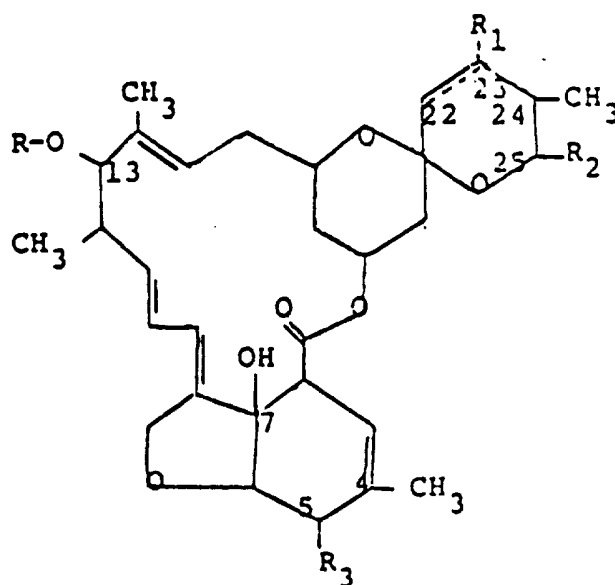
Taulukko III

Tyypilliset massaspektripiktit

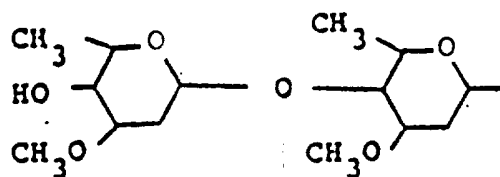
Ala	Alb	A2a	A2b	B1a	B1b	B2a	B2b
886.5072	872	904	890	872	850	890	876
742.4229	728	760	746	728	714	746	732
580.3406	566.3265	598	584	566	552	584	570
548.3136	534	566	552	548.3131	534	566	552
456.2386	442	456	442	456	442	456	442
305.2120	291.1962	323.2225	309.2070	305	291	323	309
		305	291			305	291
275.1292	275	275	275	261.1139	261	261	261
257.1382	257	257	257	257	257	257	257
221.1527	207	239.1637	225	221	207	239	225
193.1587	179.1429	211.1691	197.1542	193	179	211	197
199.1101	199	199	199	199	199	199	199
169.1226	155	179.1076	179	169	155	179	179
145.0867	145	145	145	145	145	145	145
137.0954	137	137	137	137	137	137	137
127.0754	127	127	127	127	127	127	127
113.0604	113	113	113	113	113	113	113
95.0496	95	95	95	95	95	95	95
87.0444	87	87	87	87	87	87	87

Liitteenä olevat kuviot 1-8 ovat tarkkoja jäljennöksiä neljän C-076-yhdisteen IR- ja NMR-spektreistä. Kuvioissa 1-4 on C-076-yhdisteiden Ala, A2a, Bla ja B2a IR-spektrit. Kuvioissa 5-8 on C-076-yhdisteiden Ala, A2a, Bla ja B2a NMR-spektrit. IR-spektrit saatiin laitteella Perkin Elmer Spectrometer Model 421 kloroformiliuoksessa. NMR-spektrit saatiin deuteroidussa kloroformissa laitteella Varian Nuclear Magnetic Resonance Spektrometer Model HA-100, ja spektreissä näkyvät kemialliset siirrot ovat miljoonasosina (ppm), jolloin sisäisenä standardina on käytetty tetrametyylisilaania.

Koetulosten, mukaanlukien tässä kuvatut tutkimukset ja mittaukset, perusteella C-076-yhdisteillä uskotaan tasossa esitettynä olevan seuraava rakennekaava:



jossa R on α -L-oleandrosyyli- α -L-oleandrosyyli-ryhmä, jolla on kaava:



ja jossa katkoviiva esittää yksinkertaista tai kaksoissidosta; R₁ on hydroksi, joka on läsnä vain silloin, kun katkoviiva tarkoittaa yksinkertaista sidosta; R₂ on propyyli tai butyyli ja R₃ on metoksi tai hydroksi.

Taulukossa IV on esitetty eri yhdisteiden rakennekaavat edellä olevaan perustuen.

Taulukko IV

	R_1	R_2	R_3
Ala	kaksoissidos	butyyli	$-OCH_3$
Alb	kaksoissidos	propyyli	$-OCH_3$
A2a	$-OH$	butyyli	$-OCH_3$
A2b	$-OH$	propyyli	$-OCH_3$
B1a	kaksoissidos	butyyli	$-OH$
B1b	kaksoissidos	propyyli	$-OH$
B2a	$-OH$	butyyli	$-OH$
B2b	$-OH$	propyyli	$-OH$

Kuten voidaan odottaa, sellaiset keksinnön mukaiset yhdisteet, joissa R_2 on butyyli ("a-sarjan" yhdisteet) ja vastaavat yhdisteet, joissa R_2 on propyyli ("b-sarjan" yhdisteet) käyttäytyvät samalla tavoin useimmissa talteenottovaiheissa, kuten liuotinuutossa. Kussakin "a"- ja "b"-yhdisteparissa "a"-yhdistettä on suurempi määrä, joka on tavallisesti noin 85-99 % "a"- ja "b"-yhdisteiden seoksen määrästä. Propyyliyhdisteet on osoitettu yhdisteiden massaspektreillä, joissa massapiikeillä, jotka edustavat butyyli-ryhmän sisältäviä osia, on seuranaan piikit, joiden massa on 14 yksikköä (eli yksi CH_2 -ryhmä) alempi. Lisäksi Alb-komponenttien yhdisteiden erottamiseen Ala-komponenteista on käytetty korkeapainenespekromatografiaa, ja näin saadaan Alb-yhdisteen massaspektri on varmistettu korkearesoluutiomassaspektrometrisesti (katso taulukko III).

Keksinnön mukaisilla uusilla yhdisteillä on merkitsevä antihelminttinen teho, ja niitä voidaan käyttää ihmis- ja eläinlääketieteessä sekä maanviljelyssä antihelmintteinä, insektisideinä ja akaricideina.

Tauti tai tautiryhmä, jota yleisesti nimitetään helmintiaasiksi, johtuu isäntäeläimen saamasta loismatotartunnasta, eli helmintti-tartunnasta. Helmintiaasi muodostaa vallitsevan ja vakavan taloudellisen ongelman kotieläinhoidossa, kuten sikojen, lampaiden, hevosten, nautakarjan, vuohien, koirien, kissojen ja siipikarjan hoidossa. Helminteistä matojen ryhmään kuuluvat nematodit aiheuttavat usein laajalti levinneitä ja vakavia infektioita eri eläinlajeissa. Yllä mainituissa eläimissä yleisimmin esiintyviä nematodisukuja ovat:

Haemonchus, Trichostrongylus,
Ostertagia, Nematodirus, Cooperia, Ascaris, Bunostomum,
Oesophagostomum, Chabertia, Trichuris, Strongylus,
Trichonema, Dictyocaulus, Capillaria, Heterakis,
Toxocara, Ascaridia, Oxyuris, Ancylostoma, Uncinaria,
Toxascaris ja Parascaris.

Jotkut näistä, kuten Nematodirus, Cooperia ja Oesophagostomum, esiintyvät lähinnä suolistossa, kun taas toiset, kuten Haemonchus ja Ostertagia esiintyvät pääasiassa mahalaukussa, ja toiset, kuten Dictyocaulus, esiintyvät keuhkoissa. Lisäksi jotkut loiset pesiytyvät kehon muihin kudoksiin ja elimiin, kuten sydämeen ja verisuoniin, ihonalaisiin ja lymfakudoksiin. Helmintiaasin nimellä tunnetut loistartunnat johtavat isäntäeläimen anemian, aliravistumukseen, heikkouteen, painohäviöön, suolistoalueen ja muiden kudosten ja elimien seinämien vakavaan vaurioitumiseen ja saattavat hoitamattomina johtaa kuolemaan. Keksinnön mukaisilla C-076-yhdisteillä on yllättäen korkea teho näitä loisia vastaan, lisäksi ne ovat aktiivisia koirien Difofilaria-tartuntaa jyrksijöiden Nematospiroides-, Syphacia, Aspiculuris-tartuntaa, lintujen ja muiden eläinten artropodi-ektoparasiittoja, kuten puutäitä, punkkeja, täitä, kirppuja, lihakärpäsiä, lampaiden Lucilia-lajia, purevia hyönteisiä ja sellaisia sisääntunkeutuvia kaksisiipisten toukkia vastaan, kuin Hypoderma-lajia nautakarjalla ja Gastrophilus-lajia hevosilla ja Cuterebra-lajia nautakarjalla ja Gastrophilus-lajia hevosilla ja Cuterebra-lajia jyrksijöillä.

Keksinnön yhdisteet ovat tehokkaita myös ihmisillä esiintyviä loisia vastaan. Mahasuolistoalueen tavallisimmat loislajit ihmisillä ovat: Ancylostoma, Necator, Ascaris, Strongyloides, Trichinella, Capillaria, Trichuris ja Enterobius. Muita lääketieteellisesti tärkeitä mahasuolistoalueen ulkopuolella esiintyviä loissukuja, jotka esiintyvät veressä tai muissa kudoksissa ja elimissä ovat rihmamadot, kuten Wuchereria, Brugia, Onchocerca, Loa, Dracunculus ja sisälmysmatojen Strongyloides ja Trichinella eri kehitysvaiheet. Yhdisteillä on arvoa myös ihmisellä esiintyviä artropodiloisia vastaan, ihmistä häiritseviä purevia ja muita kaksisiipisiä hyönteisiä vastaan.

Yhdisteet tehoavat myös kotiloisiin, kuten torakoihin, Blatella-lajiin, vaatekoihin, Tineola-lajiin, turkiskuoriaisiin, Attagenus-lajiin ja huonekärpäseen (Musca domestica).

Yhdisteet tehoavat myös varastoidussa viljassa esiintyviin tuholaisiin, kuten Trilobium-lajiin, Tenebrio-lajiin, ja viljakasveilla esiintyviin tuholaisiin, kuten lehtipunkkeihin (Tetranychus-laji), lehtitäihin (Acyrtiosiphon-laji), vaeltaviin suorasiipisiin, kuten heinäsiirkkoihin, ja kasvisolukossa eläviin hyönteisten eri kehitysasteisiin. Yhdisteitä voidaan käyttää nematosideina maaperän nematodeja ja kasviloisia, kuten Meloidogyne-lajia vastaan, millä saattaa olla merkitystä maanviljelyksessä.

Keksinnön yhdisteitä käytettäessä C-076-yhdisteet voidaan eristää ja puhdistaa ja käyttää sellaisina. Voidaan myös käyttää yhden tai useamman eri C-076-yhdisteen seosta. Ei ole tarpeen täysin erottaa eri C-076-yhdisteitä, jotka on saatu fermentointiliemestä puhdistamalla. Yleensä saadaan seos, joka sisältää kahta tai useampaa C-076-yhdistettä, mutta josta muut ei-lähisukuiset yhdisteet on poistettu. Tällaista seosta voidaan käyttää tässä kuvatulla tavalla loistautien ehkäisyyn ja käsittelyyn. Tällainen seos sisältää tavallisesti C-076-yhdisteitä epätasasuhteissa, mutta kaikkien yhdisteiden ollessa antihelminttisesti aktiivisia seoksen antihelminttinen aktiviteetti voidaan tarkalleen määrittää. Varsinkin saattaa olla tarpeetonta erottaa "b"-yhdisteitä läheisistä "a"-yhdisteistä. Näiden yhdisteiden erona on ainoastaan 25-kohdassa olevan sivuketjun pituus. Näiden lähisukuisten yhdisteiden erotusta ei tavallisesti suoriteta, koska "b"-yhdistettä on läsnä vain sangen pieni %-määrä.

Keksinnön mukaisia C-076-yhdisteitä voidaan käyttää myös sellaisia maanviljelytuholaisia vastaan, jotka aiheuttavat vahinkoa viljalle viljelyn tai varastoinnin aikana. Yhdisteitä käytetään tunnetulla tavalla ruiskutuksina, pölytyksinä, emulsioina yms., kasvavalle tai varastoidulle viljalle tämän suojaamiseksi tuholaisia vastaan.

C-076-yhdisteiden antihelminttivaikutus voidaan määrittää antamalla oraalisti ravinnon mukana erillisen C-076-yhdisteen, C-076-yhdisteseoksen, väkevöidyn uutteen tms. näyte hiirelle, joka 3 päivää aikaisemmin oli tarutettu *Nematospiroides dubius*-loisella. 11, 12 ja 13 päivää lääkityksen alusta tutkitaan hiiren ulostetta *N.dubius*-munien löytämiseksi, ja seuraavana päivänä hiiri tapetaan ja ohutsuolessa oleva likimääräinen matojen lukumäärä lasketaan. Yhdiste on aktiivinen, kun munien ja matojen lukumäärä on selvästi laskenut infektoituun, lääkitsemättömään kontrolliin verrattuna.

Seuraavien esimerkkien tarkoituksena on valaista keksintöä sen paremmaksi ymmärtämiseksi.

Väliainekoostumukset:

Väliaine 1

Dekstroosi	20 g
Peptoni	5 g
Lihaute	5 g
Primaarihiiva	3 g
NaCl	5 g
CaCO ₃ (pH-säädön jälkeen)	3 g
Tislattu vesi	1000 ml
pH 7,0	

Väliaine 2

Tomaattitahna	20 g
Modifioitu tärkkelys (CPC)	20 g
Primaarihiiva	10 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,005 g
Tislattu vesi	1000 ml
pH 7,2-7,4	

Esimerkki 1

Lyofilisoitu *Streptomyces avermitilis* MA-4680 putki avataan aseptisesti ja sisältö suspendoidaan tulpallisessa 250 ml Erlenmeyer-pullossa olevaan 50 ml:aan väliainetta 1. Pulloa ravistellaan 3 päivää 28°C:ssa pyörivässä ravistuskoneessa 220 kierr./minuutissa kiertoradan läpimitan ollessa 5 cm. 0,2 ml tätä ymppiväliainetta käytetään väliaineen 3 vinoviljelmän

ymppinä. Ympättyä vinoviljelmää inkuboidaan 28°C:ssa 10 päivää ja säilytetään sitten 4°C:ssa, kunnes sitä käytetään vielä neljän väliaine 3:n vinoviljelmän ymppinä. Näitä viljelmiä inkuboidaan pimeässä 8 päivää. Yhtä niistä käytetään 3:ssa 250 ml:n Erlenmeyer-pullossa olevan 50 ml:n ymppiväliaineen n:o 4 ymppäämiseen. Ymppipulloja ravistellaan 2 päivää 27-28°C:ssa pyörivässä ravistuskoneessa 220 kierr./minuutissa kiertoradan läpimitan ollessa 5 cm. Pullojen sisällöt yhdistetään, ja yhdistettyä lientä käytetään ymppäämään (5 % ymppiä) tulpilla varustetuissa 250 ml:n Erlenmeyer-pulloissa olevat erilaiset tuotantoväliaineet (40 ml kutakin). Väliainetta 2, 5 ja 6 sisältäviä pulloja inkuboidaan 4 päivää 28°C:ssa ravistellen pyörivässä ravistuskoneessa 220 kierr./minuutissa kiertoradan läpimitan ollessa 5 cm. Saatu C-076-pitoinen liemi otetaan talteen, ja siitä määritetään antihelminttinen aktiviteetti. Kaikissa tapauksissa 6,2 ml täyslientä ja linkoamalla 25 ml:sta täyslientä saatu kiinteä aine olivat täysin aktiivisia hiiren *N.dubius*-helmintti-infektiossa.

Väliaine 3 (vinoviljelmäväliaine)

Dekstroosi	10,0 g
Bacto-asparagiini	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Bacto-agar	15,0 g
Tislattu vesi	1000 ml
pH 7,0	

Väliaine 4 (ymppiväliaine)

Liukeneva tärkkelys	10,0 g
Ardamine pH	5,0 g
NZ Amine E	5,0 g
Lihauute	3,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
Sereloosi	1,0 g
Na ₂ HPO ₄	0,190 g
KH ₂ PO ₄	0,182 g
CaCO ₃	0,5 g
Tislattu vesi	1000 ml
pH 7,0-7,2	

Väliaine 5

Tomaattitahna	40,0 g
Kaurajauho	10,0 g
Sereloosi	10,0 g

Maissinliotusliemi	5,0 g
Hivenaineseos	10,0 g
Tislattu vesi	1000 ml

pH 6,8

Hivenaineseos

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1000 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1000 mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25,0 mg
CaCl_2	100,0 mg
H_2BO_3	56,0 mg
$(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	19,0 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200,0 mg
Tislattu vesi	1000 ml

pH

Väliaine 6

CPC teollinen modifioitu tärkkelys (tuottaja CPV Corp.)	40,0 g
Tislaamon liukeneva aine	7,0 g
Autolysoitu hiiva (Ardamine pH, tuottaja: Yeast Products Inc.)	5,0 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	50,0 mg
Tislattu vesi	1000 ml

pH 7,3

Esimerkki 2

0,5 x 1,0 cm suuruinen silmukallinen yhtä esimerkissä 2 väliaineesta 3 valmistettua vinoviljelmää käytetään ymppäämään 250 ml:n tulpallisessa Erlenmeyer-pullossa oleva 50 ml ymppiväliainetta n:o 4. Ymppipulloa ravistellaan 1 päivä 27-28°C:ssa pyörivässä ravistuskojeessa kierrosluvulla 220 kierr./min. kiertoradan läpimitan ollessa 5 cm. Ymppipulloa säilytetään sitten 4°C:ssa, kunnes sitä käytetään. Pullon sisältöä käytetään ymppäämään (5 % ymppeä) 20:ssä 250 ml:n tulpattomassa Erlenmeyer-pullossa oleva 40 ml väliainetta n:o 2. 4 päivän inkuboinnin jälkeen 28°C:ssa pyörivässä ravistuskoneessa 220 kierr./minuutissa kiertoradan ollessa 5 cm, 19 pullon sisältö yhdistetään. Yhdistetty, C-076-pitoinen ferementaatioliemi suodatetaan, jolloin saadaan 500 ml suodosta ja 84 g huovastoa. 78 g huovastoa uutetaan 150 ml:lla asetonia sekoittaen 0,5 tunnin ajan, sitten suodatetaan. Suodatinkakku pestään 50 ml:lla asetonia, ja suodos ja pesunesteet yhdistetään ja väkevöidään 46,5 ml:ksi. 30 ml:aan väkevöitetä lisätään laimeata kloorivetyhappoa pH:n säätämiseksi 4:ään, ja sitten uutetaan 3 kertaa 30 ml:lla kloroformia. Uutteet kuivataan suodattamalla kuivan

Infusorial Earth-kerroksen (Super-Cel) lävitse, yhdistetään ja haihdutetaan kuiviin tyhjöissä. Öljymäinen C-076-jäännös, joka painaa 91,4 mg, liuotetaan kloroformiin niin, että saadaan 3 ml liuosta, joka vastaa 1 %:ia viljelyliemen tilavuudesta. Tällä talteenottomenetelmällä saatu C-076 on täysin aktiivinen hiirien *N.dubius*-infektiota vastaan. Lisäksi kloroformiuutolla saadaan täysliemen 70-kertainen C-076-yhdisteen puhdistustulos.

Esimerkki 3

Vaihe A

250 ml:n tulpalliseen Erlenmeyer-pulloon, joka sisältää 50 ml väliainetta 7, ympätään *Streptomyces avermitilis* MA-4680:a jäädytetystä pullosta. Inkuboidaan 24 tuntia 28°C:ssa pyörivässä ravituskoneessa kierrosnopeudella 160 kierr./minuutissa kiertoradan läpimitan ollessa 5 cm.

Väliaine 7

Dekstroosi	1 g
CPC teollinen modifioitu tärkkelys	10 g
Lihaute	3 g
NZ Amine E	5 g
Autolysoitu hiiva (Ardamine pH)	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
Na ₂ HPO ₄	0,19 g
KH ₂ PO ₄	0,182 g
CaCO ₃	0,5 g
Tislattu vesi	1000 ml
pH 7,0-7,2	

Vaihe B

Kahteen 2 litran tulpalliseen Erlenmeyer-pulloon, jotka kumpikin sisältävät 500 ml väliainetta 7, ympätään 10 ml vaiheen A pullon sisältöä. Väliaineita inkuboidaan 24 tuntia 20°C:ssa pyörivässä ravituskoneessa kierrosnopeudella 160 kierr./minuutissa kiertoradan läpimitan ollessa 5 cm.

Vaihe C

756 litran ruostumattomasta teräksestä valmistettuun fermenttoriin, joka sisältää 467 litraa väliainetta 8, lisätään 1 litra vaiheen B fermentointiväliainetta sellaisenaan. Fermenttoria sekoitetaan 96 tuntia 28°C:ssa kierrosnopeudella 130 kierr./minuutissa samalla johtaen ilmaa 28 l/min.

Väliaine 8

Tomaattitahna	20 g/l
Primaarihiiva N.F.	10 g/l
Tärkkelys, modifioitu, CPC	20 g/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5 mg/l
Polyglykoli 2000	0,321 ml/l
Tislattu vesi	q.s.
pH 7,2-7,4	

Tämän ajan kuluttua 15,5 l kasvatuslientä suodatetaan ja C-076-pi-toinen huovasto pestään vedellä. Märän huovaston (2,268 g) uuttamiseksi sitä sekoitetaan yhdessä asetonin kanssa (3 l). Seos suodatetaan, suodos väkevöidään 1550 ml:ksi, ja pH säädetään laimealla HCl:llä 4,0:ksi. Tämä liuos uutetaan 3 kertaa saman suuruisilla tilavuuksilla kloroformia. Kloroformiuutteet kuivataan suodattamalla Infusorial Earth-kerroksen (Super-Cel) lävitse, ne yhdistetään ja haihdutetaan kuiviin tyhjöissä. Jäännöksenä saatu C-076-öljy painaa 5,12 g 3,3 mg on täysin aktiivista hiirien *N.dubius*-infektiota vastaan.

4,69 g tätä öljyä liuotetaan 142 ml:aan kloroformia ja kromatografoidaan pylväällä, joka sisältää 90 g kloroformin kanssa pakattua piihappogeeliä. Pylvään kehitys suoritetaan 1400 ml:lla kloroformia. Pylväs eluoidaan sitten kloroformi/etanoliseoksella (49:1), ja 5 ml:n fraktioita kerätään 145. Sitten pylväs eluoidaan kloroformi/etanoliseoksella (19:1), ja kerätään fraktiot 146-226, 5 ml kukin. Fraktiot 49-72 yhdistetään ja haihdutetaan kuiviin, jolloin saadaan 200 mg öljyä (A). Fraktiot 79-184 yhdistetään ja haihdutetaan kuiviin, jolloin saadaan 291 mg öljyä (B). 400 µg kumpaakin fraktiota on täysin aktiivinen hiiren *N.dubius*-infektiota vastaan. Nämä kaksi fraktiota (A ja B) analysoidaan erikseen piihappogeelillä ohutkerroskromatografialevyillä (Quanta/Gram QIF-levyt, saatavana firmasta Quanta/Gram Inc., Fairfield, New Jersey). Levyt kehitetään kloroformi/metanoliseoksella (19:1). Täplien ultraviolettiaktiivisuus analysoidaan, ja kummankin fraktion yhdellä täplällä on C-076-yhdisteiden tyyppillinen UV-absorptio (katso taulukko I). Fraktion A täplällä, jonka R_f on 0,83, ja fraktion B täplällä, jonka R_f on 0,57, on tällainen absorptio. Edellinen vastaa C-076 A-yhdisteitä ja jälkimmäinen C-076-B-yhdisteitä.

198 mg yllä saatua öljyä (A) kromatografoidaan kloroformipakatulla piihappogeelillä (80 g), eluoidaan kloroformia/metanoliseoksella (199:1), kunnes on koottu 520 ml, sitten kloroformi/metanoliseoksella (99:1), jolloin kootaan aina 10 ml:n fraktioita. Fraktioista 630-720 ml saadaan 30,4 mg,

fraktioista 730-950 ml 78,4 mg ja fraktioista 950-1040 ml 20 mg öljymäistä ainetta. Fraktiot 1 ja 2 sisälsivät C-076-A-komponentteja ja ne olivat täysin aktiivisia tasoilla 1,0, 0,5 ja 0,25 mg niitä kokeiltaessa hiirien *N.dubius*-infektiossa.

Esimerkki 4

Vaihe A

250 ml:n tulpalliseen Erlenmeyer-pulloon, joka sisältää 50 ml väliainetta 8, ympätään jäädytetty pullollinen *Streptomyces avermitilis* MA 4680. Inkuboidaan 28°C:ssa 24 tuntia pyörivässä ravistuskoneessa kierrosnopeudella 160 kierr./minuutissa kiertoradan läpimitan ollessa 5 cm.

Vaihe B

2 litran tulpalliseen Erlenmeyer-pulloon, joka sisältää 500 ml väliainetta 8, ympätään 10 ml vaiheen A pullon sisältöä. Väliainetta inkuboidaan 28°C:ssa 24 tuntia pyörivässä ravistuskoneessa kierrosnopeudella 160 kierr./minuutissa kiertoradan läpimitan ollessa 5 cm.

Vaihe C

189 litran ruostumattomasta teräksestä valmistettuun Fermenttoriin, joka sisältää 160 litraa väliainetta 9, lisätään 500 ml vaiheesta B saatua ymppiä. Fermenttoria inkuboidaan 24 tuntia 28°C:ssa sekoittaen 150 kierr./minuutissa ja johtaen ilmaa 85 l/min.

Väliaine 9

Dekstroosi	1 g/l
Maissitärkkelys	10 g/l
Lihauute	3 g/l
Autolysoitu hiiva (Ardamine pH)	5 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g/l
Na ₂ HPO ₄	0,10 g/l
KH ₂ PO ₄	0,182 g/l
CaCO ₃	0,5 g/l
Tislattu vesi	q.s.
pH 7,0-7,2	

Vaihe D

756 litran ruostumattomasta teräksestä valmistettuun fermenttoriin, joka sisältää 467 l väliainetta 6, lisätään 43 l vaiheesta C saatua ymppiä. Fermenttoria inkuboidaan 144 tuntia 28°C:ssa sekoittaen 130 kierr./min.

Vaihe E

Tämän ajan kuluttua koko liemi suodatetaan, C-076-pitoinen suodatinkakku pestään vedellä. Suodatinkakku lietetään 120 litraan asetonia,

sekoitetaan 30 minuuttia, sitten suodatetaan ja kiinteä aine pestään 30 litralla asetonia. Asetonipesunesteet yhdistetään ja haihdutetaan alennetussa paineessa 40 litraksi. Väkevöitteen pH säädetään laimealla kloorivetyhapolla 4,0:ksi. Väkevöite uutetaan 3 kertaa samankokoisilla kloroformitilavuuksilla. Kloroformiuutteen kuivataan suodattamalla kuivan Infusorial Earth-kerroksen (Super-Cel) lävitse. Uutteiden mentyä Super-Cel-kerroksen lävitse ne yhdistetään. Yhdistetyt uutteet väkevöidään alennetussa paineessa 4 litraksi. Kloroformiväkevöite suodatetaan ja eluoidaan kloroformilla 2,4 kg piihappogeeliä kloroformissa sisältävässä pylväässä, jolloin kootaan 8 3,5 litran fraktiota. Sitten pylväs eluoidaan kloroformi/metanoliseoksella (49:1), jolloin kootaan jälleen 8 3,5 litran fraktiota (fraktiot 9-16). Fraktio n:o 3 haihdutetaan kuiviin, jolloin saadaan 76 g öljymäistä ainetta, joka sisältää huomattavan määrän C-076-yhdisteitä.

97 % tätä ainetta liuotetaan 685 ml:aan metyleenikloridia ja kromatografoidaan 800 g:lla piihappoa (Mallinckrodt Chemical Co., 100 mesh, seulottu uudelleen 80 meshin seulalla). Pylväs (läpimitta 7,62 cm, korkeus 36 cm) kehitetään noin 7,5 litralla metyleenikloridi/bentseeniseosta (7:3) ja sen jälkeen 2,25 litralla 5 % isopropanolia sisältävää metyleenikloridi/bentseeniseosta (7:3). 5 % isopropanolia sisältävällä metyleenikloridi/bentseeniseoksella eluoitu fraktio, joka sisältää vahvasti värillisen vyöhykkeen, sisältää olennaisesti kaiken C-076-materiaalin, kuten ohutkerroskromatografian avulla (esimerkissä 5 kuvatulla tavalla) määritettiin. Tämä fraktio (500 ml) haihdutetaan ja kromatografoidaan uudelleen 105 g:lla piihappogeeliä metyleenikloridissa (pylvään läpimitta 3,7 cm, korkeus 18 cm). Pylväs kehitetään 100 ml:n annoksilla metyleenikloridia, jotka sisältävät 5, 10 ja 20 % eetteriä. Eluoimalla edelleen 20 % eetteriä sisältävällä metyleenikloridilla saadaan 2 värillistä vyöhykettä. Näiden vyöhykkeiden välillä olevat fraktiot sisältävät käytännöllisesti katsoen kaiken C-076-materiaalin, kuten ohutkerroskromatografialla voidaan todeta.

C-076-pitoinen fraktio kromatografoidaan uudelleen 59 g:lla piihappogeeliä (pylvään läpimitta 3,7 cm ja korkeus 11 cm) metyleenikloridissa. Pylväs kehitetään 10 % eetteriä sisältävällä metyleenikloridilla. Ensimmäisen aineksen alettua eluoitua kerätään 70 ml:n fraktio ja sen jälkeen 26 kpl 5-6 ml:n fraktioita. Fraktiot 3-26 yhdistetään, jolloin saadaan 1,35 g materiaalia, joka analysoidaan ohutkerroskromatografialla (piihappogeelilevyt, Analtech GF 254, kehitys 5 % isopropanolia sisältävällä metyleenikloridilla). Yhdiste, jonka Rf on tässä systeemissä 0,28, on C-076 A1.

Pylväs eluoidaan sitten 20 % eetteriä sisältävällä metyleenikloridilla (200 ml) ja senjälkeen 50 % eetteriä sisältävällä metyleenikloridilla (800 ml). Tällöin eluoituu pieni määrä C-076 A1/A2-seosta ja sitten kaikki C-076 A2. C-076 A2-fraktion kokonaishaihdutusjäännös on 800 mg.

Edelleen eluoimalla 5 % isopropanolia sisältävällä metyleenikloridilla saadaan C-076 B1-absorption perusteella. C-076 B1:llä ja A2:lla on sangen samantyyppiset Rf-arvot ohutkerroskromatografiassa piihappogeelillä (Analtech GF 254) 5 % isopropanolia sisältävää metyleenikloridia käytettäessä. Nämä komponentit voidaan kuitenkin selvästi erottaa käytettäessä samoilla levyillä kehittämiseen 15 % isopropanolia sisältävää heksaania.

Koko C-076 A1-fraktio viedään 14:lle piihappogeelilevylle (Analtech HF 254, 20 x 20 cm, kerrospaksuus 500 μ). Levyt kehitetään 10 % isopropanolia sisältävällä heksaanilla. Vyöhyke, joka sisältää C-076 A1:n, poistetaan levyistä, uutetaan eetterillä, haihdutetaan ja viedään jälleen 6 levylle ja kehitetään 5 kertaa 5 % isopropanolia sisältävällä heksaanilla. C-076 A1 poistetaan jälleen levyiltä ja kromatografoidaan uudelleen, kehitetään puhtaalla eetterillä, jolloin saadaan olennaisen puhtasta C-076-A1. Tämän näytteen IR- ja NMR-spektrit on esitetty kuvioissa 1 ja 5 sekä taulukossa II.

C-076 A2-fraktio kromatografoidaan 10:llä piihappogeelilevyllä (Analtech HF 254), kehitetään 5 kertaa 15 % isopropanolia sisältävällä heksaanilla, jolloin saadaan olennaisen puhtasta C-076 A2-yhdistettä. Tämän näytteen IR- ja NMR-spektrit on esitetty kuvioissa 2 ja 6 sekä taulukossa II.

C-076 B1-fraktio kromatografoidaan 2 levyllä (samat kuin yllä) 15 % isopropanolia sisältävällä heksaanilla, jolloin saadaan 55 mg olennaisen puhtasta C-076 B1-yhdistettä. Tämän näytteen NMR-spektri on esitetty kuviossa 7 ja taulukossa II.

Esimerkki 5

Esimerkissä 4 kuvattu fermentointi toistetaan kahdesti, ja elatusliemet yhdistetään kokonaisuudessaan. Yhdistetyn liemen käsittely suoritetaan esimerkissä 4 kuvatulla tavalla, jolloin saadaan 3,3 l kloroformiuutetta, joka sisältää 60 mg/ml kuiva-ainetta, ja jonka C-076-pitoisuus on ohutkerroskromatografian mukaan 0,5 %.

3 litraa tätä kloroformiuutetta kromatografoidaan 2400 g:lla piihappogeeliä (Davidson Grade 62) kloroformissa. Pylväs 9,5 x 122 cm kehitetään 8:lla 3800 ml:n annoksella kloroformia (fraktiot 1-8) ja sitten

8:lla 3800 ml:n annoksella kloroformi/metanoliseosta (49:1, fraktiot 9-16). Yksittäiset fraktiot analysoidaan ohutkerroskromatografialla (piihappogeelilevyt, Quanta/Gram QIF), kehitys kloroformi/metanolilla 19:1. Fraktiot 9-11, 12-13 ja 14 haihdutetaan kukin kuiviin, jolloin saadaan fraktioista 9-11 6,63 kiinteätä ainetta, joka sisältää C-076 A-komponentteja, fraktioista 12-13 24,91 g kiinteätä ainetta, joka sisältää C-076 B-komponentteja, ja fraktiosta 14 4,71 g kiinteätä ainetta, joka sisältää C-076 B-komponentteja.

Fraktioiden 12-14 materiaali (29,62 g) yhdistetään, liuotetaan 100 ml:aan metyleenikloridia ja kromatografoidaan 400 g:lla pihappogeeliä (Davidson Grade 62) metyleenikloridissa. Pylväs eluoidaan 1500 ml:lla metyleenikloridi/2-propanoliseosta (99:1), 1500 ml:lla metyleenikloridi/2-propanolia (49:1), 2000 ml:lla metyleenikloridi/2-propanolia (19:1) ja 1000 ml:lla metyleenikloridi/2-propanolia (9:1). Eluenttitilavuuksista 5500-6000 ml (2,56 g) ja 6000-6500 ml (5,03 g) saadut haihdutusjäännökset lihotetaan 25 ml:aan metyleenikloridia ja kromatografoidaan 60 g:lla pihappogeeliä heksaanissa. Esiajot suoritetaan 70 ml:lla heksaania ja 100 ml:lla heksaani/dietyylieetteriseosta (4:1) ja pylväs kehitetään sitten 600 ml:lla heksaani/dietyylieetteriseosta keräten 200 ml:n fraktioita, ja lopuksi eluoidaan 700 ml:lla eetteriä keräten 100 ml:n fraktioita. Eluenttitilavuuksista 400-600 ml saadaan 2,035 g C-076 B1-pitoista kiinteätä ainetta, tilavuuksista 600-1100 saadaan 0,881 g C-076 B1/B2-komponentteja sisältävää kiinteätä ainetta, ja tilavuuksista 1100-1500 ml saadaan 0,381 g C-076 B2-pitoista kiinteätä ainetta.

C-076 B1/B2-komponenttiseos liuotetaan sitten 4,2 ml:aan metanoli/vesiseosta (4:1) ja kromatografoidaan C18 Porasil-pylväällä (Bondapak-37-75 mikronia) samassa liuottimessa. Käytetty käänteisfaasikorkeapainepylväs (polaarisemmat komponentit eluoituvat ensin) on 1,2 m korkea ja 16 mm läpimittainen, ja eluointi suoritetaan nopeudella 800 ml/tunti keräten 21,3 ml:n fraktioita. C-076-yhdisteet havaitaan monitorin avulla fraktioiden UV-absorptiosta. C-076 B2 saadaan fraktioista 24-37 ja C-076 B1-fraktioista 51-70, jolloin saadun B2:n määrä on 195,4 mg ja B1:n määrä 137 mg.

Kumpikin näyte kromatografoidaan sitten erikseen 4 g:lla pihappogeeliä (Davidson Grade 62) metyleenikloridissa. Pylväät eluoidaan 35 ml:lla metyleenikloridi/metanoliseosta (9:1). Kummastakin pylvästä saadut eluutin viimeiset 20 ml kootaan ja haihdutetaan kuiviin, jolloin saadaan vastavasti 155,3 mg C-076 B2-yhdistettä ja 90 mg C-076 B1-yhdistettä.

Sitten 50 mg C-076 B1-komponenttia ja 100 mg C-076 B2-komponenttia kromatografoidaan preparatiivisilla piihappogeelilevyillä (Analtech HF 254), kehitetään 12 % isopropanolia sisältävällä heksaanilla ja sitten eetterillä, jolloin saadaan olennaisen puhtaat C-076 B1- ja C-076-B2-komponentit. Näin saatujen C-076 B1:n ja C-076 B2:n IR-spektrit on esitetty kuvioissa 3 ja 4. Saadun C-076 B2:n NMR-spektri on esitetty kuviossa 8.

Esimerkki 6

250 ml:n tulpalliseen Erlenmeyer-pulloon, joka sisältää 50 ml seuraavaa väliainetta

Laktoosi	2,0 %
Tislaamon liukeneva aine	1,5 %
Autolysoitu hiiva, Ardamine pH	0,5 %
pH ennen sterilointia	7,0

ympätään *Streptomyces avermitilis* MA 4848-kantaa sisältävä jäädytetty pullollisella ja inkuboidaan pyörivässä ravistuskoneessa kierrosnopeudella 150 kierr./minuutissa 28°C:ssa 24 tuntia.

10 ml yllä saatua fermentointiväliainetta käytetään ympäätämään 500 ml samaa väliainetta 2 litran tulpallisessa Erlenmeyer-pullossa. Fermentointiväliainetta inkuboidaan sitten pyörivässä ravistuskoneessa kierrosnopeudella 150 kierr./minuutissa 28°C:ssa 24 tuntia.

Kaikki edellä saatu väliaine käytetään ympäätämään 467 litraa väliainetta 756 litran ruostumattomasta teräksestä valmistetussa fermenttorissa. Väliaineen koostumus:

Laktoosi	2,0 %
Tislaamon liukeneva aine	1,5 %
Autolysoitu hiiva, Ardamine pH	0,5 %
Polyglykoli 2000	0,32 ml/l
pH ennen sterilointia	7,0

Fermentointiväliainetta inkuboidaan 28°C:ssa 40 tuntia johtaen ilmaa 283 l/min. ja sekoittaen nopeudella 130 kierr./min.

230 l yllä saatua väliainetta käytetään ympäätämään 4310 l väliainetta 5670 litran ruostumattomasta teräksestä valmistetussa fermenttorissa. Väliaineen koostumus on seuraava:

Dektroosi	4,5 %
Peptonisoitu maito	2,4 %
Autolysoitu hiiva, Ardamine pH	0,25 %
Polyglykoli 2000	2,5 ml/l
pH ennen sterilointia	7,0

Fermentointia jatketaan 144 tuntia 26°C :ssa puhaltaen ilmaa $1,5 \text{ m}^3/\text{min}$. ja sekoittamalla kierrosnopeudella 120 kierr./min.

Fermentointiliemi suodatetaan, ja suodatinkakku pestään noin 550 litralla vettä, suodos ja pesunesteet hyljätään. Suodatinkakku sekoitetaan noin 1500 litraan asetonia, ja noin tunnin sekoituksen jälkeen suodatetaan. Suodatinkakku pestään noin 150 litralla asetonia ja 40 litralla deionoitua vettä, jolloin saadaan noin 2000 litraa uutetta.

Edellä oleva fermentointi ja uutto toistetaan samassa mittakaavassa, jolloin saadaan uusi 2000 l:n erä asetoniuutetta, joka yhdistetään ensimmäisen uutteen kanssa, ja yhdistetty uute haihdutetaan noin 800 litraksi. Väkevöitteen pH säädetään väkevällä kloorivetyhapolla noin 4,7:ään, ja siihen lisätään noin 800 l metyleenikloridia. Yhdistettyjä liuottimia sekoitetaan noin 4 tuntia, sitten ne erotetaan. Vesikerrokseen lisätään jälleen 800 l metyleenikloridia, ja sekoitetaan noin 4 tuntia. Kerrokset erotetaan, ja kumpaakin metyleenikloridiuutetta käsitellään erikseen 10 kg:lla Super-Celiä ja suodatetaan. Kumpikin uute haihdutetaan yhteistilavuuteen noin 60 l.

Esimerkki 7

Edellisestä esimerkistä saatu 60 l C-076-pitoista metyleenikloridiliuosta haihdutetaan kuiviin tyhjössä, jäännökseen lisätään 60 l metanolia ja sitten haihdutetaan kuiviin. Tämä suoritetaan 3 kertaa kaiken metyleenikloridin poistamiseksi. Lopullisen metanoliväkevöitteen tilavuus on noin 36 l. Metanoliliuos saa seistä yön yli, ja sitten se suodatetaan. Suodatinkakku pestään 40 litralla uutta metanolia ja metanolisuodokset ja pesunesteet yhdistetään. Metanoliliuokseen viedään 95 l etyleeniglykolia ja 130 l heptaania. 2-kerroksista liuosta sekoitetaan 5 minuuttia, ja alempi kerros (etyleeniglykoli ja metanoli) erotetaan. Heptaaniliuos pestään seoksella, jossa on 20 l etyleeniglykolia ja 6,3 l metanolia. 5 minuutin sekoittamisen jälkeen alempi kerros erotetaan ja yhdistetään ensimmäiseen etyleeniglykoli-metanoliuutteeseen. Etyleeniglykoli/metanoliuutteeseen lisätään samansuuruisen vesimäärä (noin 150 l), joka sisältää 79 g NaCl/l. Tämä liuos uutetaan 150 litralla etyylietteriä sekoittaen 5 minuuttia. Eetterikerros pestään 75 litralla vettä ($1/2$ tilavuutta) ja sekoitetaan 5 minuuttia, minkä jälkeen kerrokset erotetaan. Tämä toimenpide toistetaan vielä 2 kertaa (loppu-
vesi sisältää 20 g NaCl/l), jolloin saadaan 110 litran lopullinen eetterikerrostilavuus. Eetterikerros väkevöidään tyhjössä mahdollisimman pieneen tilavuuteen, jolloin väkevöinnin aikana lämpötila pidetään 25°C :n alapuolella. Jäännökseen lisätään 40 l metyleenikloridia, ja liuos haihdutetaan kuiviin.

Tämä toistetaan, ja lopullinen jäännös haihdutetaan tyhjössä 50°C:ssa kuiviin.

Esimerkki 8

30 cm läpimittaiseen pylvääseen viedään metyleenikloridissa 34 kg:n kerros aktivoitua alumiiniumoksidia ja sitten 34 kg:n kerros aktiivihiihtä. Edellisestä esimerkistä saatu jäännös liuotetaan metyleenikloridiin 34 litraksi, ja liuos viedään pylvääseen ja eluoidaan 34 litralla metyleenikloridia. Nämä fraktiot hyljätään. Sitten pylväälle viedään 3 % isopropanolia sisältävä metyleenikloridi (20,8 l isopropanolia ja 660 l metyleenikloridia) ja eluoidaan noin 200 litran fraktioita. Yhdistetyt isopropanoli-metyleenikloridifraktiot haihdutetaan tyhjössä noin 20 litran tilavuuteen haudelämpötilan ollessa 60°C. Hauteen lämpötila lasketaan noin 45°C:seen, ja uute haihdutetaan kuiviin tyhjössä. Jäännös liuotetaan seokseen, jossa on 10 osaa metyleenikloridia, 10 osaa heksaania ja 1 osa metanolia, 15 litran kokonaistilavuudeksi. Tämä liuos viedään suoraan Sephadex LH-20-pylvääseen seuraavassa esimerkissä.

Esimerkki 9

30 cm läpimittaiseen pylvääseen viedään metanolissa 36 kg Sephadex LH-20 (saatavana firmasta Pharmacia Fine Chemicals, 800 Centennial Avenue, Piscataway, New Jersey 08854), ja pylväs pestään liuottimella, jossa on 10 osaa metyleenikloridia, 10 osaa heksaania ja 1 osa metanolia. Esimerkin 8 C-076-liuoksen 1/4 viedään pylvääseen ja pylväs eluoidaan nopeudella 250 ml/min. Kaksi 20 litran esifraktiota kerätään ja hylätään, sitten kerätään 20 2 litran C-076-yhdisteitä sisältävää fraktiota ja sitten vielä yksi 20 litran jälkifraktio, joka hyljätään. Fraktioissa 1-8 on C-076 A-yhdisteitä ja fraktioissa 9-20 C-076 B-yhdisteitä.

Esimerkki 10

Esimerkin 9 menetelmä toistetaan samassa mittakaavassa vielä 3 kertaa, ja kaikki C-076 B-pitoiset fraktiot (fraktiot 9-20) yhdistetään ja haihdutetaan kuiviin, jolloin saadaan 818 g raakaa C-076 B-komponenttiseosta. Näytteessä on 55 % C-076 B1- ja 39 % C-076 B2-yhdistettä. 680,5 g tätä näytettä liuotetaan 2 litraan metyleenikloridia, ja liuos pannaan 22 litran kolmikaulapyöröpohjakolviin, ja siihen lisätään 13,6 l metanolia. Metyleenikloridi poistetaan tislamalla. Lisätään 13,6 l etyleeniglykolia samalla kun metanoli tislataan pois alennetussa paineessa. Tislausnopeus pidetään sellaisena, että liuoksen lämpötila ei alita 65°C:ta. Kun etyleeniglykolin lisäys on päättynyt, liuos jäähdytetään 5°C:seen ja pidetään siinä 16 tuntia. Kiteet suodatetaan ja pestään 1 litralla kylmää etyleeni-

glykolia. Kiteet liuotetaan sitten jälleen 2 litraan metyleenikloridia, ja liuos pannaan 22 litran kolmikaulapyöröpohjakolviin. Yllä kuvattu menettely toistetaan kaksi kertaa. Ensimmäisellä kerralla käytetään sekä metanolia että etyleeniglykolia 12,5 l kumpaakin ja toisella kerralla kumpaakin 13,6 l. Lopuksi saadut kiteet pestään 1 litralla kylmää etyleeniglykolia ja 1 litralla vettä. Kiteet liuotetaan 4 litraan bentseeniä ja kuivataan suodattamalla natriumsulfaattikerroksen lävitse. Bentseeniliuos väkevöidään 2 litraksi ja lyofilisoidaan, jolloin saadaan 24,1 g valkeata jauhetta, joka sisältää 98 % C-076 B1- ja 1 % C-076 B2-komponenttia.

Kahdesta ensimmäisestä kiteytyksestä saadut emäliuokset (22 l) yhdistetään ja laimennetaan 22 litralla vettä. Vesiliuokset uutetaan 60 litralla tolueenia ja sitten jälleen 15 litralla tolueenia. Tolueeniuutteet pestään 48 litralla vettä. Orgaaninen faasi suodatetaan Super-Cel-kerroksen lävitse jäännösveden poistamiseksi ja haihdutetaan, jolloin saadaan 336 g kiinteätä ainetta, joka sisältää 79 % C-076 B2- ja 16 % C-076 B1-yhdistettä.

Esimerkki 11

Esimerkin 9 neljästä Sephadex LH-20-pylväästä saadut fraktiot 1-8, jotka sisältävät C-076 A-yhdisteitä, yhdistetään. Seoksen korkeapainestekromatografia-analyysillä saadaan selville, että seos sisältää 252 g C-076 A2a, 16 g A2b, 94 g Ala ja 24 g Alb-yhdistettä. Materiaali liuotetaan liuotinsysteemiin heksaani:tolueeni:metanoli (6:1:1), ja liuos viedään Sephadex LH-20-pylvääseen, jolla on samat mitat kuin esimerkissä 9. Fraktioita kootaan 250 ml/min., 20 litran esifraktio hylätään. Edelleen eluoimalla saadaan vielä 2 20 litran esifraktiota, jotka myös hylätään. 50 4 litran C-076-pitoista fraktiota. Fraktiot 3-8 sisältävät pääasiassa C-076 A1-komponentteja (40,2 g Ala ja 6,7 g Alb), ja fraktiot 29-36 sisältävät C-076 A2-yhdisteitä (117,2 g A2a ja 7,35 g A2b). Fraktiot 9-28 sisältävät C-076 A1- ja A2-yhdisteiden seosta.

Esimerkki 12

150 g:n C-076 B1-näyte esimerkistä 10 liuotetaan 3 litraan liuotinseosta heksaani:tolueeni:metanoli (3:1:1). Liuos viedään yllä olevassa seoksessa Sephadex LH-20-pylvääseen (pylvään dimensiot ovat samat kuin esimerkissä 9), ja fraktioita kootaan 250 ml/min. Aluksi kootaan 2 20 litran annosta liuotinseosta, jotka hylätään sitten 10 litran esifraktio, joka hylätään. Tämän jälkeen saadaan 30 2 litran fraktiota, jotka sisältävät C-076-yhdisteitä. Fraktiot 1-13 ja 25-30 hylätään. Fraktiot 14-16 yhdistetään, ja ne sisältävät 80 g C-076-yhdistettä pääasiassa B1a:ta. Fraktiot 22-24 yhdistetään ja ne (6,7 g) sisältävät pääasiassa C-076 B1b:tä. Fraktiot 17-21 sisältävät C-076 B1a:n ja B1b:n seosta.

Yllä saadut fraktiot 17-21 yhdistetään, väkevöidään ja viedään sitten Sephadex LH-20-pylvääseen samassa liuotinsysteemissä kuin yllä. Otetaan 3 20 litran esifraktiota, jotka hyljätään. Sitten kerätään C-076-pitoisia fraktiota seuraavasti 5 2 litran fraktiota (fraktiot 1-5), 20 1 litran fraktiota (fraktiot 6-25) ja 10 2 litran fraktiota (fraktiot 26-35). Fraktiot 1-15 hyljätään, fraktiot 16-21 sisältävät 13,5 g C-076 Bla:ta ja 0,4 g C-076 Blb:tä, fraktiot 22-26 sisältävät 44 g C-076 Bla:ta ja 0,13 g C-076 Blb:tä. Fraktiot 27-30 sisältävät 10,2 g C-076 Bla:ta ja 0,8 g C-076 Blb:tä.

Esimerkki 13

Kaikkien kahdeksan C-076-komponentin seos kromatografoidaan korkeapainenestekromatografiapylväällä (4 mm x 30 cm), joka on täytetty 10 μ n Bondapak C₁₈ piihappogeelillä (Waters Associates Inc., Maple Street, Milford, Massachusetts 01757). Eluointi suoritetaan vakiolämpötilassa 40°C metanoli/vesiseoksella 85:15 (v/v). Virtausnopeudella 1,2 ml/min. saadaan kaikki 8 yhdistettä erilleen, ja eluutiotilavuudet, jotka mainituissa vakioolosuhteissa ovat yhdisteille tyypilliset, ovat seuraavat:

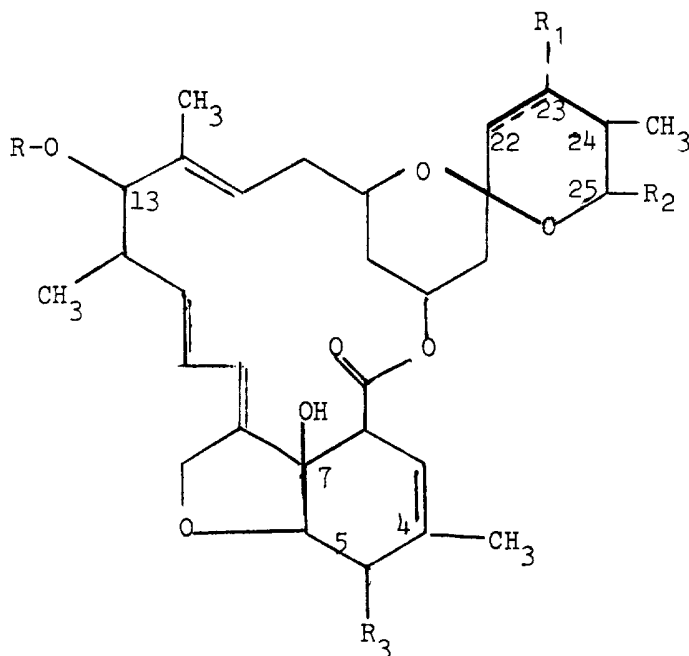
	Eluutiotilavuus (Ve) ml
C-076 B ₂ b	5,90
C-076 B ₂ a	6,52
C-076 A ₂ b	7,12
C-076 A ₂ a	7,88
C-076 B ₁ b	8,36
C-076 B ₁ a	9,60
C-076 A ₁ b	10,24
C-076 A ₁ a	11,88

C-076 "b"-komponenttien erotus vastaavista "a"-komponenteista suoritetaan käyttäen esim. korkeapainenestekromatografiaa. C-076 Ala:n ja Alb:n seos, jossa arvion mukaan on 30 μ g C-076 Alb:tä, liuotetaan 30 μ l:aan absoluuttista metanolia, ja liuos viedään 3 x 250 mm suuruiseen

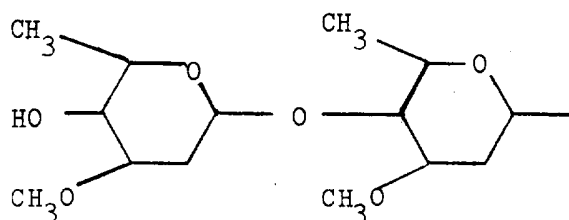
korkeapainenestekromatografiapylvääseen, joka sisältää Spherisorb 5 micron ODS-hartsia (Spectra Physics). Pylväs eluoidaan metanoli/vesiseoksella 85:15 0,15 ml/min. Eluutiota seurataan mittaamalla eluentin UV-absorptio, ja eri komponentit kootaan UV-monitorin poistoaukon kautta. Saadaan 30 µg C-076 Alb-komponenttia, joka analysoidaan massaspektrometrillä. Tämän näytteen massaspektri on esitetty taulukon III toisessa sarakkeessa.

Patenttivaatimus:

Menetelmä antihelminttisesti vaikuttavien C-076-yhdisteiden "avermectins" valmistamiseksi, joilla on kaava



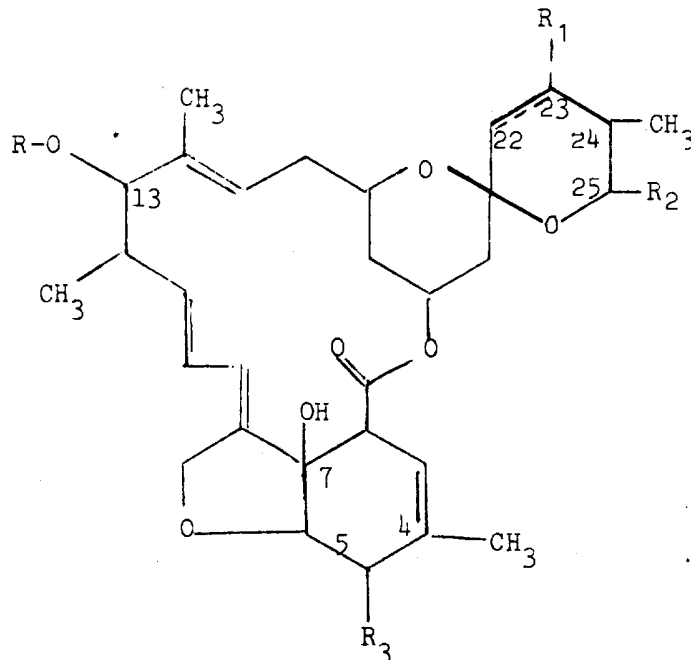
jossa R on α -L-oleandrosyyli- α -L-oleandrosyyli-ryhmä, jolla on kaava



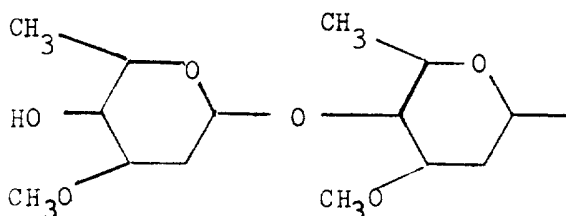
katkoviiva esittää yksinkertaista tai kaksoissidosta; R_1 on hydroksi, joka on läsnä vain silloin, kun katkoviiva tarkoittaa yksinkertaista sidosta, R_2 on propyyli tai butyyli ja R_3 on metoksi tai hydroksi, t u n n e t t u siitä, että viljelylään aerobisesti C-076-yhdisteitä tuottavaa *Streptomyces avermitilis*-kantaa ATCC 31267 ATCC 31271 tai ATCC 31272 vesipitoisessa ravintoväliaineessa, joka sisältää hiilen ja typen assimiloituvia lähteitä ja epäorgaanisia suoloja, lämpötilavälillä noin 20-40°C ja pH-arvossa noin 5,0-9,0, C-076-yhdisteet otetaan talteen, edullisesti suodattamalla fermentointiväliaine, uuttamalla huovasto veden kanssa sekoitettavalla orgaanisella liuottimella, haihduttamalla orgaaninen liuotin ja uuttamalla jäännös veden kanssa sekoittumattomalla orgaanisella liuottimella.

Patentkrav:

Förfarande för framställning av antihelminthiskt verkande C-076-föreningar "avermectins" med formeln



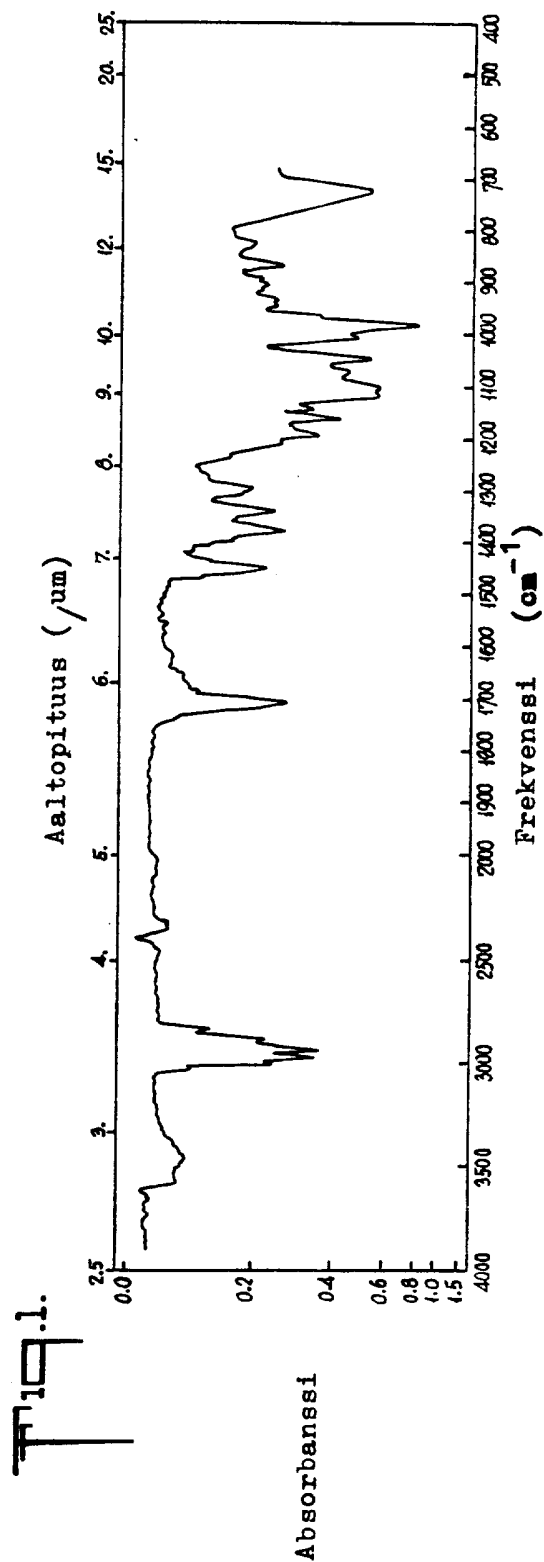
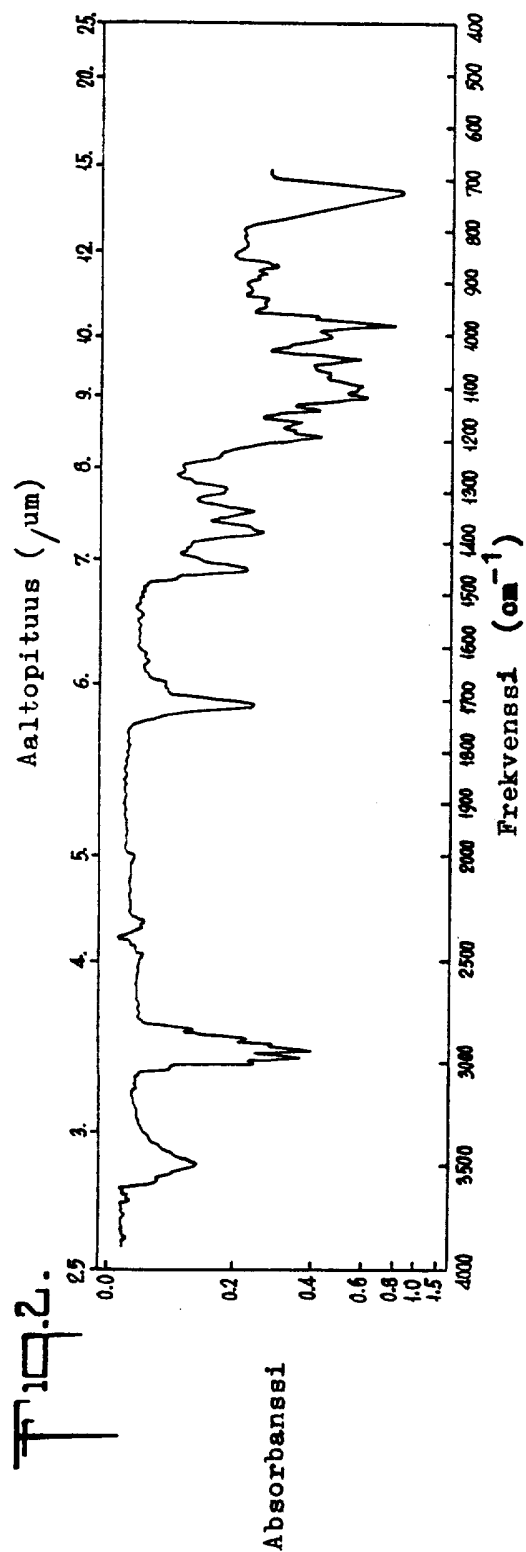
där R är en α -L-oleandrosyl- α -L-oleandrosylgrupp med formeln

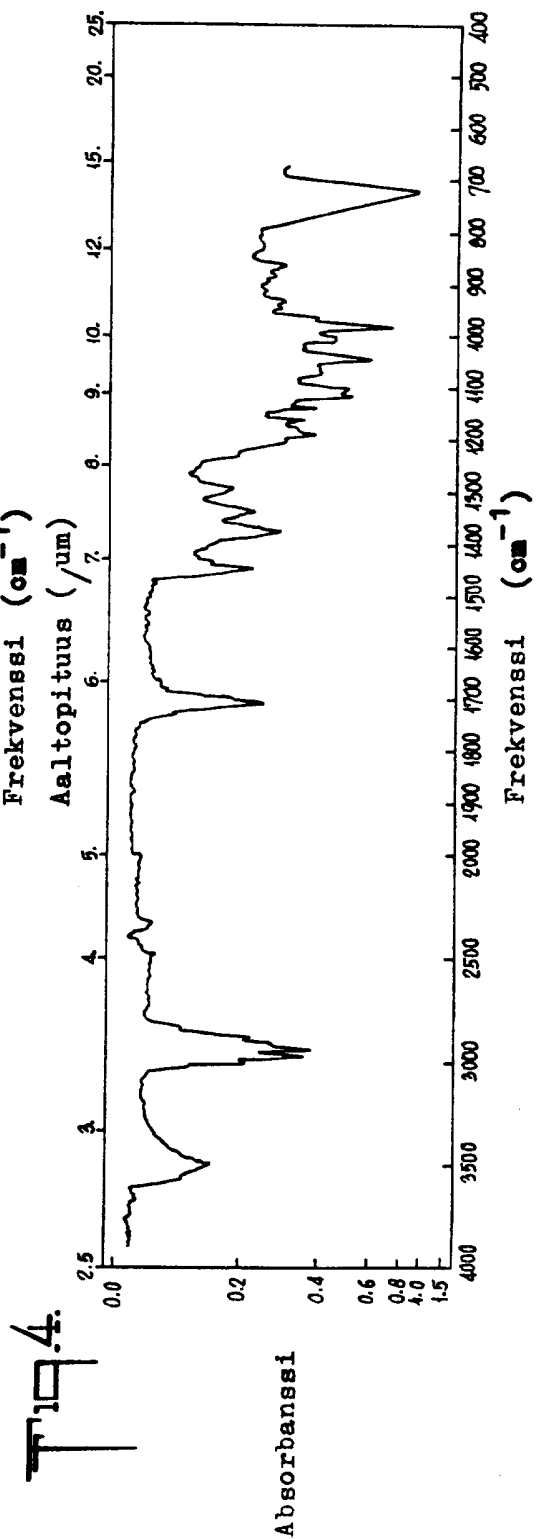
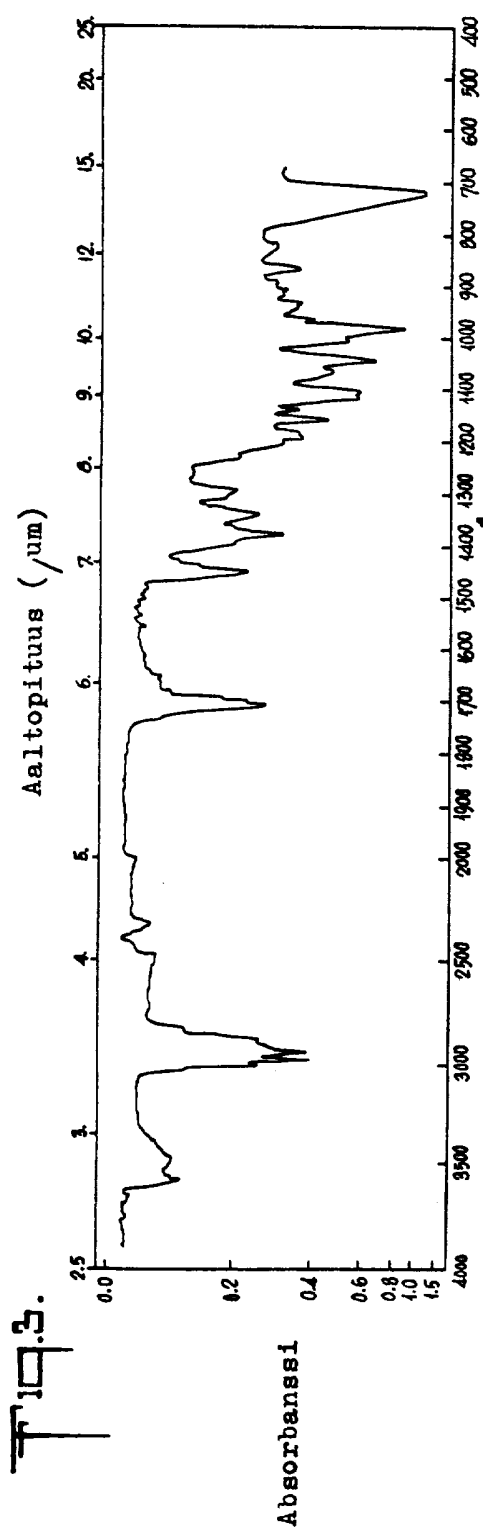


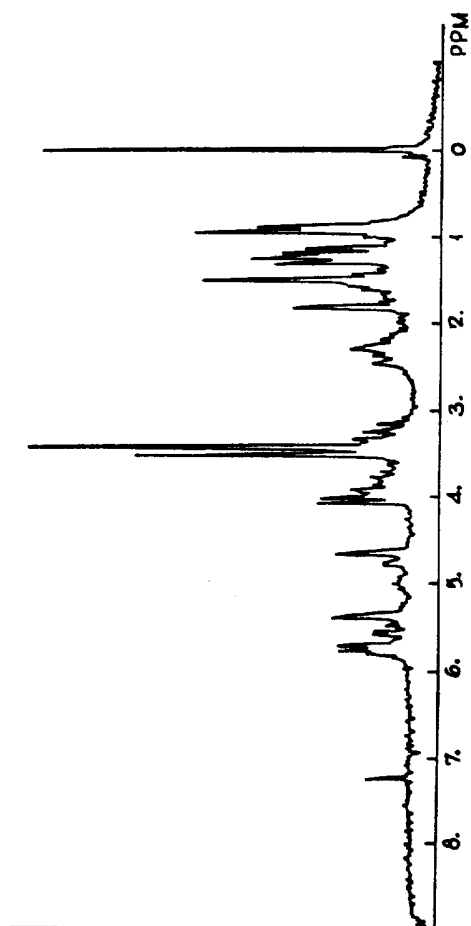
den streckade linjen betecknar en enkel- eller dubbelbindning, R_1 är hydroxi, som är närvarande endast då den streckade linjen avser en enkelbindning, R_2 är propyl eller butyl och R_3 är metoxi eller hydroxi, k ä n n e t e c k n a t därav, att en C-076-föreningar producerande stam av *Streptomyces avermitilis* aerobiskt odlas i ett ATCC 31267 ATCC 31271 eller ATCC 31272 vattenhaltigt näringsmedium, som innehåller assimilerbara kol- och kvävekällor samt oorganiska salter, i ett temperaturområde av ca. 20-40°C och vid ett pH-värde av ca. 5,0-9,0, C-076-föreningarna utvinns, företrädesvis genom filtrering av fermenteringsmedlet, extraktion av myceliet med ett med vatten blandbart organiskt lösningsmedel, avdunstning av det organiska lösningsmedlet och genom extraktion av resten med ett med vatten oblandbart organiskt lösningsmedel.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

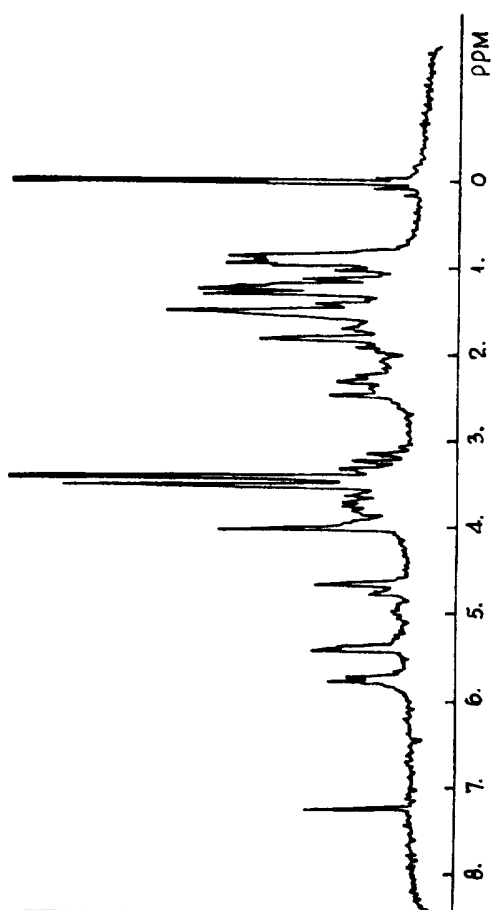
Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: USA(US) 3 950 360 (C 07 D 313/00).



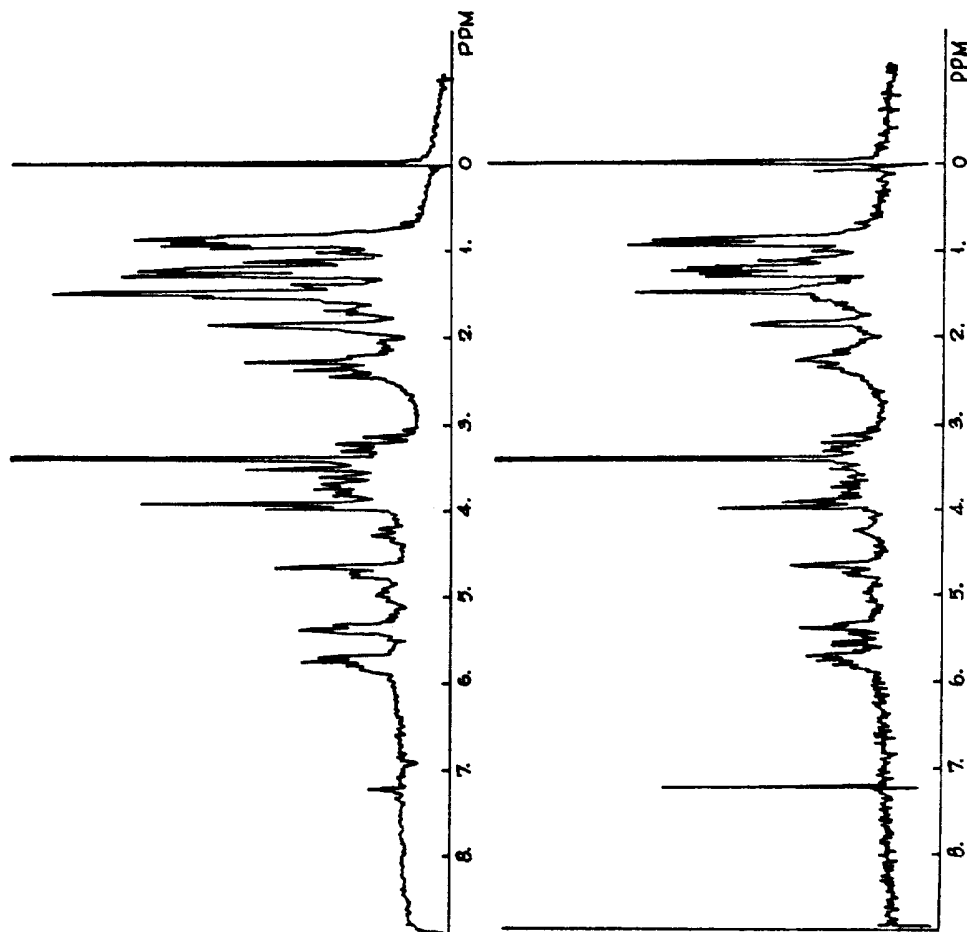




19.5.



19.6.



T19.8.

T19.7.