



Patentdirektoratet

TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 5913/88

(51) Int.Cl.6

C 12 P 17/06

(22) Indleveringsdag: 25 okt 1988

(41) Alm. tilgængelig: 27 apr 1989

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 28 jul 1997

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 26 okt 1987 US 113563

(73) Patenthaver: \*Pfizer Inc.; 235 East 42nd Street; New York; New York, US

(72) Opfinder: Edward Joseph \*Tynan, III; US

(83) Deponering af mikroorganismer Udløv.t.exp.

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard, Lehmann & Ree A/S

(54) Mikrobiologisk fremgangsmåde til fremstilling af UK-61689 og mikroorganismestammer, der kan anvendes ved fremgangsmåden

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

5913-88

Fremstilling af UK-61689, en sur polycyclisk ether, som er et antibiotikum med anticoccidial virkning, som hidtil kun har været tilgængelig ved selektiv sur hydrolyse af UK-58852, ved gæring af *Actinomadura roseorufa* mutantstammer karakteriseret ved evnen til at producere UK-61689 med gæring, i et vandigt næringsmedium indeholdende assimilerbare kilder til carbon, nitrogen og uorganiske salte under submerse aerobe gæringsbetingelser. Opfindelsen omfatter også *Actinomadura roseorufa* med identificeringsegenskaberne af ATCC 53666, ATCC 53665, ATCC 53664 og ATCC 53674.

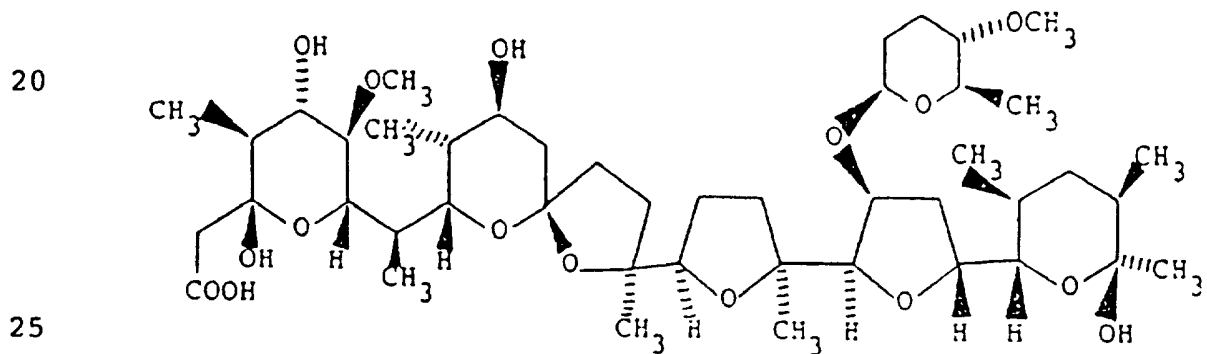
Denne opfindelse angår en mikrobiologisk fremgangsmåde til fremstilling af UK-61689, en sur polycyclisk ether, som er et nyttigt anticoccidialt antibiotikum, der tidligere kun har været tilgængeligt ved kemiske midler.

5 Nærmere bestemt angår opfindelsen gæringsfremstilling af UK-61689 ved dyrkning af mutanter af *Actinomadura roseorufa* ATCC 53666, samt *Actinomadura roseorufa*-mutanterne ATCC 53665, ATCC 53674 og ATCC 53664.

10 EP-A-0 169 011, offentliggjort d. 22. januar 1986, beskriver fremstillingen af UK-58852, et polycyclisk ether-antibiotikum, ved dyrkning af *Actinomadura roseorufa* Huang sp. nov., ATCC 39697, i et vandigt næringsmedium under submerse aerobe betingelser.

15

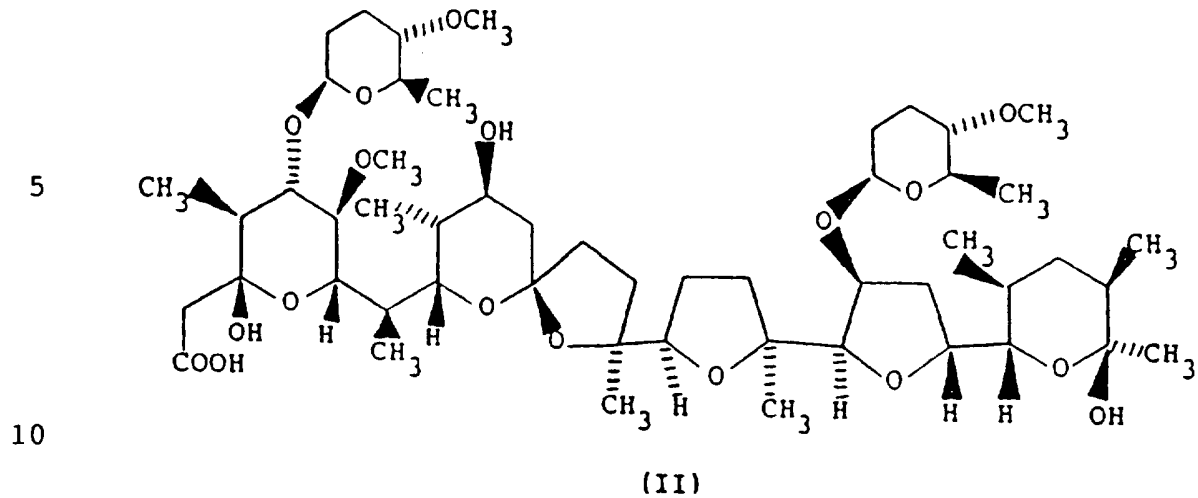
UK-61689, en sur polycyclisk monoglycon-ether har formelen (I)



(I)

30 Dens fremstilling ved selektiv sur hydrolyse af UK-58852, en polycyclisk diglycon-ether med formelen (II)

35



er beskrevet i EP-A-0 255 335. Den deri beskrevne fremgangsmåde omfatter sur hydrolyse af UK-58852, fortrinsvis under anvendelse af lige mange ækvivalenter af p-toluen-sulfonsyre og af natriumsaltet af UK-58852 i acetonitril/vand som opløsningsmiddel ved stuetemperatur.

Fremstillingen af UK-58852, som selv er et effektivt antibiotikum, især anticoccidialt middel, er som nævnt beskrevet i EP-A-0 169 011. Den fremstilles ved submers aerob gæring i vandigt næringsmedium af *Actinomadura roseorufa* Huang sp. nov. ATCC 39697. Ved gæringen produceres også sammen med UK-58852 to beslægtede mindre betydende komponenter, der hver for sig er antibiotisk effektive til bekæmpelse af coccidiosis. De to mindre betydende komponenter, betegnet som CP-70 228 og CP-70 828, har en formel svarende til den ovenstående formel (II), hvori henholdsvis R er H og R<sup>1</sup> CH<sub>3</sub>, og R og R<sup>1</sup> begge er methyl.

Denne opfindelse angår en mikrobiologisk fremgangsmåde til fremstilling af UK-61689, som er en sur polycyklisk ether, der er værdifuld som antibiotikum og et kraftigt anticoccidialt middel, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man dyrker mutanter af *Actinomadura rose-*

orufa ATCC 53666 i et vandigt næringsmedium under, fortrinsvis submerse, aerobe betingelser. Den angår desuden specielt mutanterne ATCC 53674 og 53665, afledt fra *Actinomadura roseorufa* ATCC 53666, som er karakteristiske ved deres evne til at producere UK-61689 sammen med UK-58852, og en mutant af ATCC 53665, som er karakteristisk ved dens evne til at producere UK-61689 i det væsentlige fri for UK-58852, hvilken sidstnævnte mutant har identifikationssegenskaberne af *Actinomadura roseorufa* ATCC 53664.

10

Mikroorganismene, der producerer UK-61689 og UK-58852, blev opnået ved mutation af en hidtil ukendt stamme af *Actinomadura roseorufa*, betegnet FD-27684 (ATCC 53666), der blev isoleret fra en jordprøve opsamlet i landsbyen Yamae, Kamamoto, Japan. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG) blev anvendt som muterende middel. Enkelte kolonier af den behandlede mikroorganisme blev derpå undersøgt for produktion af UK-61689. Den almene procedure omfattede dyrkning af ATCC 53666 i et vandigt næringsmedium under submerse aerobe betingelser med rystning ved en temperatur på 28 °C. Valget af medium for vækststadiet er ikke kritisk. Et medium bestående af cerelose (10,0 g), majsstivelse (5,0 g), majsstøbevand (5,0 g), "NZ Amine YTT" (5,0 g) (handelsnavn for enzymatisk nedbrydning af casein, Humko Sheffield Chemical Co., Inc.) og cobaltchlorid (0,002 g) suspenderes i 1 liter vand, pH-værdien indstilles til 7,0 med natriumhydroxid, og mediet (800 ml) fyldes på en Fernbach-kolbe. Efter sterilisation ved autoklaving podes kolber med et skråsubstrat eller frosne vegetative mycelier, og derpå inkuberes med omrøring på en ryster med ca. 200 omdr./min og ved en temperatur på 28 °C i 8 dage. Derpå udtages en 50 ml aliquot, og myceliet homogeniseres med en Teflon-pestil-vævsknuser efterfulgt af ultralyd-fragmentering. Det fragmenterede mycelium blev derpå centrifugeret, vasket frit for medium, derpå resuspenderet i 50 ml frisk medium i en 300

ml Erlenmeyer-kolbe og inkuberet under rystning ved 32 °C i 2 timer, hvorefter cellerne igen blev centrifugeret, vasket fri for medium med sterilt vand og suspenderet i 50 ml tris(hydroxymethyl)aminomethanmalat-puffer pH 9,0.

5 Aliquoter af denne suspension blev derpå behandlet med det mutagene middel NTG i koncentrationer på 750-1500 µm/ml i 1 time på en roterende vandbaseryster ved 250-300 omdr./min og en temperatur på 34 °C. Efter behandlingen blev cellerne fra centrifugeret, vasket fri for mutagenet

10 med sterilt vand og suspenderet i kolber med frisk vækstmedium, som blev dyrket under rystning ved 32 °C i et rysteskab ved 200 omdr./min. Efter 3 dage blev myceliefremvæksten homogeniseret og ultralydbehandlet. Aliquoter af det ultralydbehandlede materiale blev rækkefortyndet,

15 udsuget på skåle med fast næringsmedium, og skålene inkuberet ved 28 °C, indtil de kolonidannende enheder var af tilstrækkelig størrelse til overførsel til skråsubstrater. Et egnet medium til skåle og skråsubstrater er ATCC Medium No. 172 med "N-Z Amine" type A (Humko Sheffield Chemical Co., Inc.) sænket til 1,0 g/l. De podede skrå-

20 substrater fik lov at vokse ved 28 °C i 10-14 dage, hvorefter de var parat til prøvning. Dette blev gjort ved podning af 300 ml Erlenmeyer-kolber indeholdende 25 ml af et egnet medium (ét sådant indeholder 45,0 g cerelose,

25 10,0 g sojamel, 15,0 g majsstøbevand, 0,1 g MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0,1 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,002 g cobaltchlorid og 3,0 g calciumcarbonat i 1 liter vand og med mediets pH-værdi indstillet til 7,0). Efter sterilisation ved autoklavering i 30 minutter ved 121 °C blev kolberne podet med individuelle

30 skråvækstsuspensioner og inkuberet under rystning ved 28 °C på en New Brunswick ryster i 7 dage. Mutantkulturen FD-28454 (ATCC 53674) blev detekteret ved undersøgelse af methylisobutylketonextrakter af høstede hele dyrknings-

væsker efter sprøjtning af udviklede tyndtlagskromatografiske plader (silicagel) med vanillinreagens og opvarmning til 100 °C i 5 minutter. Udviklingssystemet var sam-

35

mensat af 9 dele chloroform til 1 del methanol, hvilket gav Rf-værdier på ca. 0,3 for UK-61689 og ca. 0,65 for UK-58852. Den således opnåede mutantkultur producerer en blanding af UK-61689 og UK-58852. Forholdet mellem UK-  
5 61689 og UK-58852 viser sig at variere noget afhængigt af gæringsbetingelserne. De morfologiske og dyrkningsmæssige egenskaber af den således opnåede mutant er i det væsentlige dem, der er beskrevet i denne beskrivelse for *A. roseorufa* ATCC 53666. Den adskillende egenskab for denne  
10 mutant er dens evne til at producere en blanding af UK-61689 og UK-58852, hvori UK-61689 er det overvejende produkt. Dyrkning af mutanten og isolering af den antibiotiske forbindelse UK-61689 kan gennemføres under betingelser  
15 gæringer, som gav polyether-antibiotika; se f.eks. US patentskrift nr. 4 361 649. Dyrkningen finder fortrinsvis sted i vandige næringsmedier under fortrinsvis submerse aerobe betingelser med omrøring ved en temperatur på 24-36 °C. Næringsmedier, som er anvendelige til dyrkningen,  
20 inkluderer en kilde til assimilerbart carbon, såsom sukkerstoffer, stivelser og glycerol, en kilde til organisk nitrogen, såsom casein, enzymatisk nedbrydning af casein, sojabønneemel, bomuldsfrømel, jordnøddemel, hvedegluten, sojamel, kødmel og fiskemel. En kilde til vækststoffer,  
25 såsom "grain solubles", fiskemel, bomuldsfrømel og gærextrekt, såvel som mineralsalte, såsom natriumchlorid og calciumcarbonat, og sporelementer, såsom jern, magnesium, kobber, zink, cobalt og mangan, kan også anvendes med fordelagtige resultater. Hvis der opstår overdreven skumning under gæringen, kan der sættes antiskummidler, såsom vegetabiliske olier eller siliconer, til gæringsmediet. Beluftning af mediet i beholdere til submers vækst holdes fortrinsvis ved hastigheden 1/2-2 volumener steril luft pr. volumen gæringsvæske pr. min, tvunget ind i  
30 dyrkningsvæsken igennem en spreder. Omrøring kan oprettholdes ved hjælp af omrørere, som er almindeligt kendte

for fagfolk inden for gæringsfaget. Omrøringshastigheden afhænger af den anvendte type omrører. En rystekolbe køres sædvanligvis ved 150-300 slag pr. min, medens en fermentor sædvanligvis køres ved 300-1700 omdr./min.

5 Aseptiske betingelser må selvfølgelig opretholdes under overførslen af organismen og under hele dens vækst.

Podemateriale til fremstilling af antibiotikummet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan opnås ved anvendelse af vækst fra en skråkultur eller Roux-flasker podet med kulturen eller en optøet myceliesuspension af kulturen. Et fast medium, som er egnet til indledende vækst af organismen på skråsubstrater og i Roux-flasker, er ATCC Medium No. 172. Det væskemedium, som er nævnt tidligere ved mutationsundersøgelsen, er egnet til fremstilling af det vegetative mycelium for frysning. Væksten kan anvendes til at pode enten rystekolber eller podebeholdere, eller podebeholderne kan podes fra rystekolberne. Maximal vækst i rystekolberne når sædvanligvis på 4-8 dage, medens podemateriale i submerse podebeholdere sædvanligvis vil være i den mest gunstige periode i løbet af 4-5 dage.

Antibiotikumproduktionens fremadskriden under gæringen kan kontrolleres kvalitativt ved tyndtlagskromatografi efter visualisering ved sprøjtning med vanillinreagens som tidligere beskrevet, eller den udviklede plade kan også overhældes med hjerne-hjerte-infusions-agar podet med *Bacillus subtilis* og inkuberes ved 37 °C i 16 timer for at visualisere antibioticaene. Tyndtlagskromatografi er også et nyttigt redskab til analyse af sammensætningen af rå og rensede materialer ekstraheret fra gæringsvæsken. En HPLC-metode under anvendelse af en 10 cm x 4,6 mm micropore C<sub>18</sub>-kolonne og en mobil fase af 0,01 M ammoniumcarbonatopløsning/acetonitril/methanol i volumenforholdet 40:200:760 under anvendelse af en refraktivt-index-

detektor til at kvantificere mængden af UK-61689 og medproduceret UK-58852 i gæringsvæsker.

Den antibiotiske forbindelse UK-61689 produceret ved  
5 gæringen af de her beskrevne mutanter akkumuleres i myceliet og i dyrkningsvæsken og kan fraskilles og udvindes ved ekstraktion af den høstede hele ufiltrerede gæringsvæske med et organisk opløsningsmiddel, såsom chloroform, ethylacetat, methyisobutylketon eller butanol, ved den  
10 naturligt herskende pH-værdi. Alternativt kan man for at undgå alvorlige emulsionsproblemer skille myceliet fra og ekstrahere både det og den klarede væske hver for sig med et organisk opløsningsmiddel. Opløsningsmidelextrakterne koncentrerer derpå til en tynd sirup, og ren UK-61689 op-  
15 nås ved kromatografi.

En typisk fremgangsmåde til fraskillelse og udvinding af antibiotikummet er som følger: hele væsken fra gæringen af mutanten blev ekstraheret med methyisobutylketon. Ind-  
20 dampning af ekstrakten i vakuum gav en rødlig olie, som blev opløst i ethylacetat og hældt på en kolonne af silicagel. Silicagelkolonnen blev derpå elueret med ethylacetat, og eluenterne undersøgt ved tyndtlagskromatografi. Fraktioner indeholdende UK-61689 blev kombineret og ind-  
25 dampet til tørhed. Den således opnåede UK-61689 kan renses yderligere ved krystallisation fra diisopropylether.

Forbindelsen UK-61689 kan udvindes fra gæringen i forbindelse med myceliet ved inddampning af hele væsken ved  
30 kendte metoder, herunder sprøjtetørring, eller ved adskillelse af myceliet fra væsken ved filtrering eller centrifugering. De således opnåede mycelieprodukter omfatter UK-61689 på myceliets overflade og i mellemrummene deri, hvilket gør myceliet til en nyttig bærer for UK-  
35 61689.

Et enkelt-koloni-isolat, betegnet FD-28474, af den ovenfor beskrevne mutant FD-28454 (ATCC 53674) blev selv underkastet mutagenese med NTG ifølge den procedure, der er beskrevet ovenfor til fremstilling af FD-28454. Denne procedure gav en yderligere mutant (FD-28499), som udviste de morfologiske og dyrkningsmæssige egenskaber af Actinomadura roseorufa ATCC 53666 og selvfølgelig af den først fremstillede mutant. Imidlertid adskiller denne mutant (FD-28499) sig fra mutanterne FD-28454 og 28474 derved, at den producerer UK-61689 i det væsentlige fri for (dvs. < 1 %) UK-58852. Mutanten FD-28499 dyrkes på samme måde som den først beskrevne mutant (FD-28454), og forbindelsen UK-61689 udvindes fra gæringen som tidligere beskrevet.

15

Den sidstnævnte mutant, identificeret i Pfizer Inc.'s kultursamling som FD-28499, samt mutanterne FD-28454 og FD-28474 og udgangs-mikroorganismen FD-27684 er blevet deponeret under Budapest-traktatens bestemmelser i the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA, en anerkendt deponeringsinstitution, som yder permanent opretholdelse af deponeringerne og let adgang dertil for offentligheden, hvis der udstedes patent på grundlag af denne ansøgning. De er blevet givet betegnelserne Actinomadura roseorufa ATCC 53664, ATCC 53674, ATCC 53665 og ATCC 53666.

25

Taxonomiske undersøgelser af FD-27684, FD-28474 og FD-28499 blev udført af L. H. Huang, som gav de følgende beskrivelser.

30

Hver af kulturerne blev podet fra en skråkultur ind i ATCC nr. 172 væske og dyrket i 4 dage ved 28 °C på en ryster. Den blev derpå centrifugeret i 20 minutter, vasket 3 gange med steril destilleret vand og udsået på

35

medier, som almindeligvis anvendes til identifikation af medlemmer af Actinomycetales.

Kulturerne blev inkuberet ved 28 °C, og resultaterne blev  
5 aflæst til varierende tider, men mest almindeligt efter  
14 dage. Farverne er beskrevet i almindelig terminologi,  
men eksakte farver blev bestemt ved sammenligninger med  
farvemærkater fra Color Harmony Manual, Fourth edition.  
Fremgangsmåden til hel-celle-aminosyre-analyse er den,  
10 der er beskrevet i Becker et al., Appl. Microbiol., 12,  
421-423, 1964. Hel-celle-sukkerstoffer blev analyseret  
ved de fremgangsmåder, der er beskrevet i Lechevalier, J.  
Lab. Clin. Med. 71, 934-944, 1968; og i Stanek and Rob-  
erts, Appl. Microbiol. 28, 226-231, 1974. Til sammenlig-  
15 ningsformål anvendtes typekulturen af Actinomadura rose-  
orufa ATCC 39697.

Identifikationsmedier, som blev anvendt til karakteriser-  
ing af kulturerne, og referencer vedrørende deres sammen-  
20 sætning er som følger:

1. Trypton-gærekstrakt-væske - (ISP no. 1 medium, Difco).
2. Gærekstrakt-malt ekstrakt-agar - (ISP no. 2 medium,  
25 Difco).
3. Havremel-agar - (ISP no. 3 medium, Difco).
4. Uorganisk-salt-stivelse-agar - (ISP no. 4 medium, Difco).
5. Glycerol-asparagin-agar - (ISP no. 5 medium, Difco).
- 30 6. Pepton-gærekstrakt-jern-agar - (ISP no. 6 medium, Difco).
7. Czapek-sucrose-agar - S.A. Waksman, The Actinomy-  
cetes, Vol. 2, medium no. 1, s. 328, 1961.
8. Glucose-asparagin-agar - ibid, medium no. 2, s. 328.
- 35 9. Bennett's Agar - ibid, medium no. 30, s. 331.
10. Emerson's Agar - ibid, medium no. 28, s. 331.

11. Næringsagar - *ibid*, medium no. 14, si. 330.
12. Gordon og Smith's tyrosin-agar - R.E. Gordon og M.M. Smith, *J. Bacteriol.* 69: 147-150, 1955.
13. Casein-agar - *ibid*.
- 5 14. Calciummalat-agar - S. A. Waksman, *Bacteriol. Rev.* 21: 1-29, 1957.
15. Gelatin - R. E. Gordon and J. M. Mihm, *J. Bacteriol.* 73: 15-27, 1957.
16. Stivelse - *ibid*.
- 10 17. Organisk nitrat-væske - *ibid*.
18. Dextrose-nitrat-væske - S. A. Waksman, *The Actinomycetes*, Vol. 2, medium no. 1, side 328, 1961, med 3 g dextrose i stedet for 30 g sucrose og agar udeladt.
19. Kartoffel-gulerod-agar - M. P. Lechevalier, *J. Lab. and Clinical Med.* 71: 934-944, 1968, men der anvendes kun 30 g kartofler, 2,5 g gulerødder og 20 g agar.
- 15 20. 2 % vandværksvand-agar.
21. Gauze's no. 1 mineral-agar - G. F. Gauze et al., *Problems in the Classification of Antagonistic Actinomycetes*, English Ed., side 13, 1957.
- 20 22. Gauze's no. 2 organisk-agar - *ibid*.
23. Skummetmælk - Difco.
24. Celluloseudnyttelse - a) H. L. Jensen, *Proc. Linn. Soc. N.S.W.* 55: 231-248, 1930. b) M. Levine and H. W. Schoenlein, *A Compilation of Culture Media*, medium no. 2511, 1930.
- 25 25. Udnyttelse af organiske syrer - R. E. Gordon et al., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24: 54-63, 1974.
26. Syreproduktion udfra carbonhydrater - *ibid*.
- 30 27. Hydrolyse af hippurat og æsculin - *ibid*.
28. Nedbrydning af adenin, hypoxanthin, xanthin og urinstof - *ibid*.
29. Resistens over for lysozym - *ibid*.
30. Carbonhydratudnyttelse - C-2 Medium, H. Nonomura and Y. Ohara, *J. Ferment. Technol.* 49: 887-894, 1971.
- 35

31. Temperaturområde - ATCC medium 172 i ATCC Culture Collection Catalogue, 15th ed., side 608, 1982.

Beskrivelse af kulturen FD-27684

- 5
- Gærekstrakt-maltekstrakt-agar: vækst god, lyserød til rød (6 1/2ia, 7ia, 6ia), hævet, rynket, med hvidt luftmycelium; underside rød (7ia); intet opløseligt pigment.
- 10 Havremel-agar: vækst moderat, flødefarvet (2ca), let hævet, glat eller forekommende som isolerede kolonier; luftmycelium intet til sparsomt, hvidt; underside flødefarvet (2ca); intet opløseligt pigment.
- 15 Uorganiske salte-stivelse-agar: vækst ringe til moderat, farveløs til flødefarvet (2ca), tynd, glat; luftmycelium intet til sparsomt, hvidt; underside samme som overflade; intet opløseligt pigment.
- 20 Glycerol-asparagin-agar: vækst ringe til moderat, flødefarvet (2ca), med lyserøde til røde prikker (6ea, 6 1/2ga); luftmycelium intet til sparsomt, hvidt; underside farveløs til flødefarvet (2ca), med røde prikker; intet opløseligt pigment.
- 25 Czapek-sucrose-agar: vækst ringe til moderat, flødefarvet (2ca), med lyserøde til røde prikker (5ea, 6 1/2ia); luftmycelium intet til sparsomt, hvidt; underside farveløs til flødefarvet (2ca); intet opløseligt pigment.
- 30 Glucose-asparagin-agar: vækst moderat til god, lyserød til rød (6 1/2ga, 6 1/2na), hævet, glat, granulær til rynket; luftmycelium hvidt til blegt lyserødt (6ea); underside rød (6 1/2ga, 6 1/2ia); opløseligt pigment blegt gulligt (3ca).
- 35

Gordon og Smith's tyrosin-agar: vækst moderat til god, lyserød-orange (5ea), moderat hævet, rynket; luftmycelium intet til sparsomt, hvidt; underside samme som overflade; opløseligt pigment gulligt (2lc).

5

Calciummalat-agar: vækst spredt, farveløs, tynd, glat, intet luftmycelium; underside farveløs; intet opløseligt pigment.

10 Casein-agar: vækst moderat til god, lyserød-orange til orange (4ia, 5ia), moderat hævet, rynket, intet luftmycelium; underside gullig til blegt lyserød (3ga, 5ea); med brunt (3lc) opløseligt pigment.

15 Bennett's agar: vækst god, rød til mørkerød (6 1/2ne, 6 1/2ng), hævet, rynket; luftmycelium hvidt til lyserødt (6ea); underside rød (6 1/2 lc); med brunt (3ne) opløseligt pigment.

20 Emerson's agar: vækst god til udmærket, orange (5la, 5na), hævet, rynket, med hvidt luftmycelium; underside orange (5ic); intet opløseligt pigment.

25 Nærings-agar: vækst moderat, blegt orange (5ea, 5ga), let hævet, glat eller forekommende som isolerede kolonier, intet luftmycelium; underside blegt orange (5ga); intet opløseligt pigment.

30 Gelatine-agar: vækst moderat til god, blegt orange (4ga), moderat hævet, glat til rynket; luftmycelium sparsomt, hvidt; underside blegt orange (4ga); intet opløseligt pigment.

35 Stivelse-agar: vækst moderat til god, blegt orange (5ga), moderat hævet, glat til rynket; luftmycelium sparsomt,

hvidt; underside samme som overflade; intet opløseligt pigment.

Kartoffel-gulerod-agar: vækst ringe til moderat, flødefarvet til blegt lyserød (2ca, 4ca), tynd til let hævet; luftmycelium sparsomt, hvidt; underside flødefarvet til blegt lyserød (4ca); intet opløseligt pigment.

Vandværksvand-agar: vækst ringe, farveløs til flødefarvet (1 1/2ca), tynd, glat; luftmycelium sparsomt, hvidt; underside samme som overflade; intet opløseligt pigment.

Gauze's mineralmedium 1: vækst moderat, lyserød til rød (5ca, 6la), med røde prikker (6lc), svagt hævet, glat; luftmycelium intet til sparsomt, hvidt; underside samme som overside; intet opløseligt pigment.

Gauze's organisk medium 2: vækst moderat til god, lyserød-orange (5ga), moderat hævet, svagt rynket; luftmycelium sparsomt, hvidt; underside samme som overflade; intet opløseligt pigment.

Morfologiske egenskaber: efter 7 ugers inkubation fandtes ingen sporer på noget af de anvendte medier. På kartoffel-gulerod-agar blev der imidlertid produceret hyphe opsvulmninger terminalt, lateralt eller intercalarisk, og de var enkelte og glatte. De var kugleformede, ovale til eliptiske, og målte 1,2-2,5  $\mu\text{m}$  i diameter eller 1,2-2,2 x 0,9-1,8  $\mu\text{m}$ . Lignende strukturer fandtes også på gærekstrakt-maltekstrakt-agar, havremel-agar, vandværksvand-agar, gelatine-agar, Czapek-sucrose-agar og Gauze's mineralmedium 1.

Biokemiske egenskaber: melanin produceres ikke; hydrogen-sulfid produceres ikke; gelatine smeltes; stivelse hydrolyses ikke; nitrat reduceres til nitrit; svag vækst på

Jensen's cellulosevæske, men ingen vækst på Levine og Schoenlein's cellulosevæske; ingen nedbrydning på begge cellulosevæsker; koagulering og peptonisering på mælk; fordøjelse af calciummalat negativ; tyrosinfordøjelse positiv; caseinfordøjelse positiv.

Carbonhydratudnyttelse: glucose, rhamnose og sucrose udnytted; arabinose, fructose, inositol, mannitol, raffinose og xylose udnytted ikke.

10

De positive prøvninger inkluderede: udnyttelse af acetat, propionat og pyruvat; syreproduktion ud fra glycolose, rhamnose, maltose og trehalose.

15 De følgende prøvninger var negative: nedbrydning af adenin, xanthin, hypoxanthin og urinstof; hydrolyse af æsculin og hippurat; resistens over for lysozym; udnyttelse af benzoat, citrat, dextrin, lactat, malat, mucat, oxalat, phenol og succinat; syreproduktion ud fra arabinose, fructose, inositol, mannitol, raffinose, sucrose, xylose, adonitol, cellobiose, dulcitol, erythritol, galactose, glycerol, lactose, mannose, melezitose, melibiose,  $\alpha$ -methyl-D-glucosid, ribose, salicin, sorbitol, sorbose og stivelse.

25

Hel-celle-analyse: Hel-celle-hydrolysaterne indeholder meso-diaminopimelinsyre, galactose, glucose, madurose, ribose og rhamnose.

30 Temperaturrelationer:

<u>21 °C</u>	<u>28 °C</u>	<u>37 °C</u>	<u>45 °C</u>
Moderat vækst	God vækst	Moderat vækst	Ingen vækst

35

Kulturen FD-27684 er karakteriseret ved den manglende evne til at producere melanin; det lyserøde, lyserød-orange, orange til røde substratmycelium; og tilstedeværelsen af meso-diaminopimelinsyre og madurose som helcelle-komponenter. Til trods for en lang inkubationsperiode på op til 7 uger producerede kulturen ikke sporer, selv om der blev produceret hyphe opsvulmninger på nogle medier. Dette kan tilskrives slægten *Actinomadura*.

10 Kulturen FD-27684 lignede *Actinomadura roseorufa* Huang ATCC 39697 (se EP offentliggørelsesskrift nr. 169 011) i de fleste af dyrkningsegenskaberne og næsten alle de biokemiske egenskaber. På gelatine-agar og stivelse-agar var kolonier af FD-27684 blegt orange snarere end blegt  
15 flødefarvede. På tyrosin-agar og Emerson's agar viste de noget strejf af orange snarere end brunt. Kulturen FD-27684 koagulerede mælk i modsætning til *A. roseorufa*. Disse forskelle var mindre betydelige, og derfor anses kulturen FD-27684 som en ny stamme af *A. roseorufa*.

20 Sammenlignet med udgangskulturen FD-27684 producerede mutanten FD-28474 mindre luftmycelium på gærekstrakt-malt-ekstrakt-agar Bennett's agar, Gauze's organisk medium 2, gelatine-agar og stivelse-agar. Kolonier af mutanten var  
25 flødefarvede snarere end orange på Emerson's agar og var blegt lyserøde snarere end flødefarvede til blegt lyserøde på kartoffel-gulerod-agar. Mutanten producerede hydrogensulfid i modsætning til dens udgangsstamme. Alle de andre dyrkningsegenskaber og biokemiske egenskaber var  
30 identiske. Således betragtes mutanten FD-28474 som en ny stamme af *Actinomadura roseorufa*.

Sammenlignet med kulturen FD-28474, hvorfra den var afledt, delte mutanten FD-28499 næsten alle dennes dyrkningsegenskaber og alle dens biokemiske egenskaber. Mutanten adskilte sig kun fra kulturen FD-28474 ved de  
35

mørkebrune snarere end mørkerøde kolonier på gærekstrakt-  
maltekstrakt-agar og ved tilstedeværelsen af nogle ly-  
serøde prikker på Gauze's organisk medium 2. Således be-  
trages mutanten FD-28499 som en ny stamme af Actino-  
5 madura roseorufa.

FD-28454 blev ikke underkastet taxonomisk undersøgelse.  
Da den imidlertid var afledt fra en stamme af Actino-  
madura roseorufa og ved mutation frembragte en stamme af  
10 Actinomadura roseorufa, betragtes den som en stamme af  
Actinomadura roseorufa.

Den antibiotiske forbindelse UK-61689 udviser inhiberende  
virkning over for væksten af et antal Gram-positive mi-  
15 kroorganismer. I tabel I nedenfor er resultaterne af in  
vitro prøvninger sammenfattet. Til denne prøvning podes  
hver organisme i en række reagensglas indeholdende næ-  
ringsmedium og varierende koncentrationer af UK-61689 for  
at bestemme den minimale koncentration af forbindelsen i  
20 g/ml, som inhiberer væksten af organismen over et tidsrum  
på 24 timer (MIC).

Tabel IAntibakteriel aktivitet

5	<u>Organisme</u>	<u>Stamme nr.</u>	<u>MIC µg/ml</u>
	Clostridium perfringens	10A006	50
		10A009	12,5
10	Actinomyces pyogenes	14D002	50
		14D008	50
		14D011	50
	Treponema hyodysenteriae	94A001	3,12
15		94A002	3,12
		94A007	1,56
		94A008	1,56

Effektivitetsdata for UK-61689 og dens salte over for

20 coccidieinfektioner hos kyllinger blev opnået på følgende måde. Grupper på 3-5 10 dage gamle, patogenfrie hvide Leghorn hanekyllinger blev fodret med blødfoderdiæt indeholdende UK-61689 eller dens natrium- og/eller kaliumsalt ensartet dispergeret deri. Efter at have været på denne

25 ration i 24 timer blev hver kylling podet per os med oocyster af den bestemte art af Eimeria, som skulle prøves. Andre grupper på 3-5 10 dage gamle kyllinger blev fodret med en lignende blødfoderdiæt uden UK-61689 eller dens salte. De blev også inficeret efter 24 timer og tjente

30 som inficerede kontroller. Endnu en gruppe på 3-5 10 dage gamle kyllinger blev fodret med den samme blødfoderdiæt uden UK-61689 og blev ikke inficeret med coccidier. Disse tjente som normale kontroller. Resultaterne af behandlingen blev bedømt efter 5 dage i tilfælde af E. acervulina

35 og 6 dage for alle andre udfordringer.

De kriterier, der anvendtes til at måle anticoccidial aktivitet, bestod af læsionspoint fra 0 til 4 for *E. tenella* efter J. E. Lynch, "A New Method for the Primary Evaluation of Anticoccidial Activity," *Am. J. Vet. Res.*, 22, 324-326, 1961; og fra 0 til 3 for de andre arter baseret på en modifikation af det pointsystem, som er udformet af J. Johnson and W. H. Reid, "Anticoccidial Drugs. Lesion Scoring Techniques in Battery and Floor Pen Experiments in Chicks," *Exp. Parasit.*, 28, 30-36, 1970. Et konstant forhold blev etableret ved at dividere læsionsbedømmelsen for hver behandlet gruppe med læsionsbedømmelsen for den inficerede kontrol.

UK-61689 og dens kationiske salte udviser udmærket aktivitet over for coccidieinfektioner hos fjerkræ. Når de inkorporeres i kyllingers kost i niveauer på 15-120 ppm, er disse forbindelser effektive til bekæmpelse af infektioner, som skyldes *Eimeria tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. brunetti* og *E. necatrix*.

Til anvendelse ved behandling af coccidiosis hos fjerkræ indgives forbindelsen ifølge opfindelsen oralt i en egnet bærer. Hensigtsmæssigt udføres lægemiddeltilførslen simpelthen i drikkevandet eller i fjerkræfoderet, således at en terapeutisk dosering af midlet indtages med den daglige vand- eller foderration. Midlet kan udmåles direkte i drikkevand, fortrinsvis i form af et flydende, vandopløseligt koncentrat (såsom en vandig opløsning af et vandopløseligt salt) eller sættes direkte til foderet som sådan eller i form af en præmix eller et koncentrat. En præmix eller et koncentrat af et terapeutisk middel i en bærer anvendes almindeligvis til inklusionen af midlet i foderet. Egnede bærere er flydende eller faste efter ønske, såsom vand, forskellige mel, f.eks. sojabønneoliemel, hørfrøoliemel, majscolbemel og mineralblandinger som dem, der almindeligvis anvendes i fjerkræfodere. En særlig ef-

fektiv bærer er fjerkræfoderet selv; dvs. en lille portion fjerkræfoder. Endvidere kan myceliet anvendes som bæreren. Bæreren letter ensartet fordeling af de aktive materialer i det færdige foder, med hvilket præmixen  
5 blandes. Dette er vigtigt, fordi der kun kræves små mængdeforhold af de omhandlede kraftige midler. Det er vigtigt, at forbindelserne blandes grundigt i præmixen og derefter i foderet. I denne henseende kan midlet dispergeres eller opløses i et egnet olieagtigt medium, såsom  
10 sojabønneolie, majsolie, bomuldsfrøolie og lignende, eller i et flygtigt organisk opløsningsmiddel og derpå blandes med bæreren. Det vil indses, at mængdeforholdene af aktivt materiale i koncentratet kan undergå bred variation, eftersom mængden af midlet i det færdige foder  
15 kan indstilles ved blanding af den passende mængde præmix med foderet til opnåelse af et ønsket niveau af terapeutisk middel.

Koncentrater af høj styrke kan af foderproducenten blandes med proteinholdige bærere, såsom sojabønneoliemel og  
20 andre mel, som beskrevet ovenfor til dannelse af koncentrerede supplementer, som er egnede til direkte fodring af fjerkræ. I sådanne tilfælde får fjerkræet lov at indtage den sædvanlige kost. Alternativt kan sådanne koncentrerede supplementer sættes direkte til fjerkræfoderet  
25 til dannelse af et næringsmæssigt afbalanceret færdigt foder indeholdende et terapeutisk effektivt niveau af den ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede forbindelse. Blandingerne blandes grundigt ved standardprocedurer, såsom i en dobbeltskålsblander, for at sikre ho-  
30 mogenitet.

Det vil selvfølgelig være klart for fagmanden, at anvendelsesniveauerne af den her beskrevne forbindelse vil  
35 variere under forskellige omstændigheder. Kontinuert lægemiddeltilførsel på lavt niveau under vækstperioden,

dvs. under de første 6-12 uger for kyllinger, er en effektiv profylaktisk foranstaltning. Ved behandlingen af allerede eksisterende infektioner kan højere niveauer være nødvendige for at overvinde infektionen. Anvendelsesniveauet i foder vil almindeligvis være i området 15-120 ppm. Når midlet indgives i drikkevand, vil niveauet være det, som vil tilvejebringe den samme daglige dosis af lægemidlet, dvs. 15-120 ppm, udregnet på grundlag af vægtforholdet mellem det gennemsnitlige daglige foderforbrug og den gennemsnitlige daglige vandindtagelse.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen belyses nærmere ved de følgende eksempler.

15 Eksempel 1

A. Fremstilling af inoculum

Der fremstilledes et sterilt vandigt medium med den følgende sammensætning:

<u>Ingredienser</u>	<u>g/l</u>
Cerelose	10,0
Majsstivelse	5,0
25 Majsstøbevand	5,0
"NZ Amine YTT"*	5,0
Cobaltchlorid	0,002

30 \*(Handelsnavn for enzymatisk nedbrydning af casein, Humko Sheffield Chemical Co. Inc.).

Efter at pH-værdien var indstillet til 7,0, blev mediet (800 ml) fyldt i 2800 ml Fernbach-kolber, tilproppet med vat, forsynet med papirhætte og steriliseret ved autoklavering i 60 minutter ved 121 °C (103 kPa). Efter afkøling blev mediet podet med en vegetativ celledensuspension.

sion fra en skråkultur af FD-28454 (ATCC 53674). Kolberne blev rystet ved 28 °C på en rotationsryster med en forskydning på 3,8-6,4 cm og 150-200 slag/min i 6 dage.

5 B. Gæring og isolering af UK-61689

En Fernbach-kolbe indeholdende 800 ml af den dyrkede kultur blev anvendt til at pøde en 14 liters gæringsbeholder indeholdende 8 liter sterilt medium med den følgende sammensætning, hvortil der var sat 4 ml silicone-antiskumme-  
10 middel:

	<u>Ingredienser</u>	<u>g/l</u>
	Cerelose	45,0
15	Sojamel	10,0
	Majsstøbevand	15,0
	Blodmel	5,0
	Majsmel	5,0
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,1
20	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1
	COCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,002
	Calciumcarbonat	3,0
	pH indstillet til 6,9-7,0	

25 Gæringen blev udført ved 30 °C under omrøring med 500 omdr./min og beluftning med 0,75 volumen luft pr. volumen væske pr. min, indtil der var produceret væsentlig aktivitet. UK-61689/UK-58852 i væsken og udvindingsstrømmene blev visualiseret ved anvendelse af silicagel-tyndtlags-  
30 kromatografi-plader udviklet med et system bestående af 9:1 chloroform/methanol. Pladerne blev sprøjtet med vanillinreagens (6 g vanillin i 100 ml ethanol og 3 % koncentreret H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) og opvarmet til 100 °C i 5 minutter. UK-61689 viser sig som en rødlig blå plet. Alternativt blev  
35 pladen overhældt med agar podet med B. subtilis, hvortil der var sat 0,4 ml af 5 % opløsning af 2,3,5-triphenyl-

2H-tetrazoliumchlorid, og inkuberet ved 37 °C i 16 timer for at visualisere antibiotikummet som et farveløst område mod en rød baggrund.

5 Hele væsken blev derpå ekstraheret med methylisobutylketon, og opløsningsmidlet blev afdampet til opnåelse af 14,4 g remanens. Dette materiale blev kromatograferet på en 6 x 100 cm kolonne pakket med silicagel G (partikelstørrelse svarende til maskevidde 63-212 µm, Woelm) i  
10 ethylacetat. Kolonnen blev udviklet med ethylacetat med en strømningshastighed på ca. 20 ml/min. Der blev taget fraktioner på hver 10 ml.

Fraktionerne blev undersøgt ved tyndtlagskromatografi på  
15 "Analtech silica gel GF" plader udviklet med 9:1 chloroform/methanol og visualiseret ved sprøjtning med vanillinreagens og opvarmning.

Fraktionerne indeholdende UK-61689 blev kombineret (totalvolumen omkring 200 ml) og omrørt med ca. 2 g "Darco G60" i 15 minutter. Efter fjernelse af kullet ved filtrering blev filtratet (ethylacetat) vasket med 5 % dibasisk-natriumphosphatpuffer indstillet til pH 10,0 med 1 N NaOH-opløsning. Efter adskillelse blev ethylacetatlaget  
25 tørret over vandfrit natriumsulfat og derpå inddampet under vakuum. Den viskøse olie, som blev tilbage efter indampningen, blev opløst i et lille volumen heptan, hvorpå der skete krystallisation. Krystallerne blev opsamlet ved filtrering og tørret under vakuum, hvilket gav 1,4 g UK-  
30 61689 som natriumsaltet; smp. 167 °C; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) i ppm:

179,16, 107,54, 103,21, 97,80, 97,01, 87,02, 84,65,  
84,28, 82,39, 82,10, 80,92, 80,28, 79,96, 77,62, 77,11,  
76,60, 74,91, 74,65, 73,15, 70,19, 67,74, 66,94, 59,07,  
35 56,84, 45,49, 39,92, 39,00, 36,55, 33,88, 33,79, 33,63,

33,51, 33,21, 32,51, 32,33, 30,63, 27,64, 26,98, 26,91,  
26,16, 23,25, 18,43, 17,53, 17,00, 12,13, 11,05, 10,47.

Fraktionerne indeholdende UK-58852 blev kombineret, be-  
5 handlet med ca. 2 g "Darco G60" som ovenfor og derpå kon-  
centreret. Remanensen blev suspenderet i hexan og batch-  
behandlet med silicagel på en filtertragt. Absorberings-  
midlet blev vasket med hexan og derpå elueret med chloro-  
form og ethylacetat. Ethylacetatfraktionen blev koncen-  
10 treret, remanensen rekromatograferet på silicagel, og  
produktet krystalliseret fra heptan, hvilket gav UK-58852  
som et hvidt fast stof.

#### Eksempel 2

15 Proceduren fra eksempel 1 blev fulgt, men under anven-  
delse af FD-28499 (ATCC 53664) i stedet for FD-28454  
(ATCC 53674). HPLC af methylisobutylketonekstrakten af  
hele væsken gav UK-61689 i det væsentlige fri for (< 1 %)   
20 UK-58852. Dens TLC-opførsel var identisk med den, der er  
rapporteret i eksempel 1 for UK-61689.

Syreformen af UK-61689 fremstilles ved omrøring af en  
chloroformopløsning af natriumsaltet med et lige så stort  
25 volumen vand og sænkning af pH-værdien til 3,0 med phos-  
phorsyre. Derpå adskilles faserne, og chloroformet afdam-  
pes under vakuum, hvilket giver UK-61689 som den frie  
syre.

#### 30 Eksempel 3

FD-28474 (ATCC 53665) blev gæret ifølge proceduren fra  
eksempel 1, undtagen at gæringsmediet ikke indeholdt  
majsstøbevand eller blodmel. De hele væsker fra fire så-  
35 danne forgøringer blev kombineret og filtreret. Filtratet  
og myceliet blev hver for sig ekstraheret med methyl-

isobutylketon (3 x 200 ml). Ekstrakterne blev kombineret og koncentreret under reduceret tryk til en olie (18,5 g). Olien blev optaget i acetone (200 ml), og opløsningen delt i to lige store volumener (I og II).

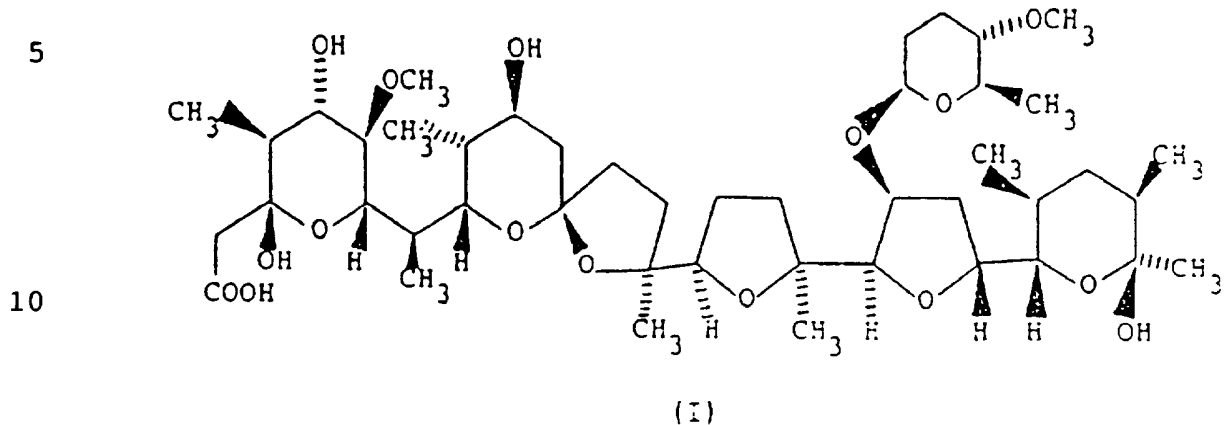
5

pH-værdien af volumen I blev indstillet til 12 ved til-sætning af vandig natriumhydroxidopløsning (20 %). Den alkaliske opløsning blev derpå filtreret og koncentreret til en olie under reduceret tryk. Der sattes acetone (10 ml), heptan (79 ml) og vand (39 ml) til olien, hvilket gav mørkebrune krystaller. Genopslæmning af krystallerne i heptan gav lysebrune krystaller (2 g) omfattende 75 % UK-61689 og 5 % UK-58852 ved HPLC-prøvning.

15 Volumen II blev koncentreret til en olie under reduceret tryk, og olien opløst i ethylacetat (100 ml). Den blev derpå underkastet kolonnekromatografi over silicagel (500 g) under anvendelse af ethylacetat som elueringsmiddel. De UK-61689-rige fraktioner blev kombineret og koncentre-  
20 ret til en olie. Olien blev optaget i acetone (10 ml)/heptan (110 ml), og de resulterende krystaller af UK-61689 blev frafiltreret og tørret. (1,2 g). UK-58852 blev ikke udvundet.

## PATENTKRAV:

1. Fremgangsmåde til fremstilling af forbindelsen UK-61689 med formlen (I)



kendetegnet ved, at *Actinomadura roseorufa*  
 15 ATCC 53665, ATCC 53674 eller ATCC 53664 gæres i et van-  
 digt næringsmedium indeholdende assimilerbare kilder til  
 carbon, nitrogen og uorganiske salte under submerse aer-  
 obe gæringsbetingelser, indtil der er akkumuleret en  
 væsentlig mængde af forbindelsen i helvæsken.

20

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet  
 ved, at forbindelsen udvindes.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, kendetegnet  
 25 ved, at forbindelsen med formlen (I) udvindes fra gær-  
 ringsvæsken i forbindelse med mycelium.

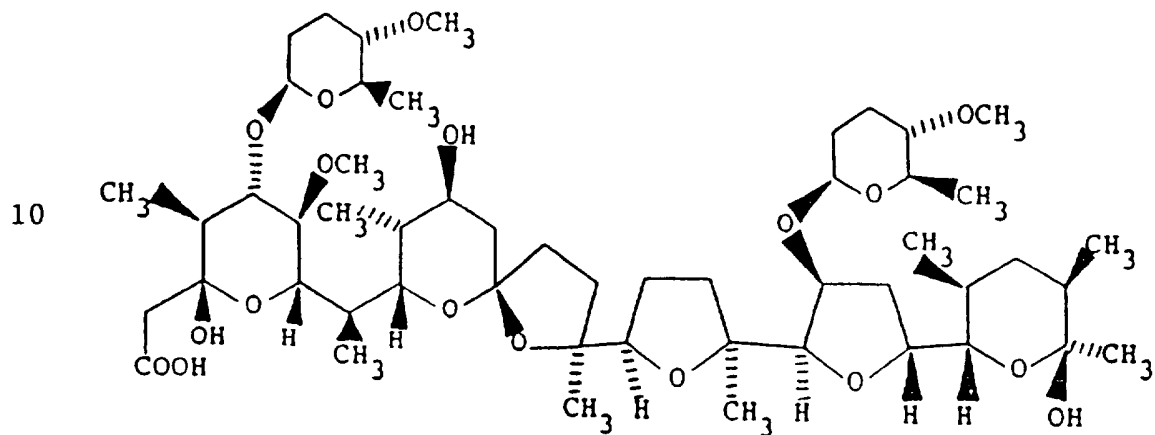
4. Fremgangsmåde ifølge krav 2, kendetegnet  
 ved, at der dyrkes *Actinomadura roseorufa* ATCC 53665 el-  
 30 ler ATCC 53674.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 2, kendetegnet  
 ved, at der dyrkes *Actinomadura roseorufa* ATCC 53664.

35 6. *Actinomadura* ATCC 53665 eller ATCC 53674.

7. *Actinomadura roseorufa* ATCC 53664.

8. *Actinomadura roseorufa*, k e n d e t e g n e t ved dens evne til at producere UK-61689 som defineret i krav 1 i det væsentlige fri for UK-58852 med formelen:



(II)

ved dyrkning i et vandigt næringsmedium indeholdende assimilerbare kilder til carbon, nitrogen og uorganiske salte under submerse aerobe gæringsbetingelser.

20

9. Anticoccidialt præparat, k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter UK-61689 i forbindelse med mycelium fremstillet ved en fremgangsmåde ifølge krav 1.

25

10. Hidtil ukendt stamme tilhørende slægten *Actinomadura*, k e n d e t e g n e t ved, at den er opnået ved mutering af *Actinomadura roseorufa* ATCC 53666 og, når den gæres i et vandigt næringsmedium omfattende en tilgængelig kilde til carbon, nitrogen og uorganiske salte under aerobe betingelser, producerer UK-61689 som defineret i krav 1.

30

11. Hidtil ukendt stamme tilhørende slægten *Actinomadura*, k e n d e t e g n e t ved, at den er opnået ved mutering af *Actinomadura roseorufa* ATCC 53665 og, når den gæres i et vandigt næringsmedium omfattende en tilgængelig kilde til carbon, nitrogen og uorganiske salte under aerobe

35

betingelser, producerer UK-61689 i det væsentlige fri for UK-58852, idet UK-61689 og UK-58852 er som defineret i krav 1 og 8.