



(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT (11) 149336 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVESENEN

- (21) Patentansøgning nr.: 1400/80
(22) Indleveringsdag: 01 apr 1980
(41) Alm. tilgængelig: 08 okt 1980
(44) Fremlagt: 05 maj 1986
(86) International ansøgning nr.: -
(30) Prioritet: 07 apr 1979 GB 7912298

(51) Int.Cl.4: C 12 P 21/00
C 07 G 11/00

- (71) Ansøger: *GRUPPO LEPETIT S.P.A.; Milano, IT.
(72) Opfinder: Bruno *Cavalleri; IT, Hermes *Pagan; IT, Giancarlo *Volpe; IT.

(74) Fuldmægtig: Kontor for Industriel Eneret

- (54) Fremgangsmåde til fremstilling af antibiotikum
A/16686 eller syreadditionssalte deraf
(57) Sammendrag:

- B) letopløseligt i vand og dimetylformamid, opløseligt i C₁₋₄ alkanoler, uopløseligt i ætyleter, petroleumsæter og benzen
C) elementæranalyse
Ca. 52% C; 6,3% H; 10% N, 5,4% Cl, heraf 4,7% Cl-ion, rest 13
I) efter sur hydrolyse i 6N saltsyre ved 110°C i 6 timer viser aminosyreanalyse følgende genkendte aminosyrer: ornithin, asparaginsyre, threonin, glycin, alanin, leucin, fenylalanin, p-hydroxyfenylglycin og (hydroxy- og klorsubstitueret fenyl)-glycin.

1400-80

Fremstilling af et hidtil ukendt glykopeptid-antibiotikum, benævnt antibiotikum A/16686, eller farmaceutisk acceptable syreadditionssalte deraf, ved dyrkning af en hidtil ukendt stamme af slægten Actinoplanes, benævnt Actinoplanes sp. ATCC 33076 i nærværelse af assimilerbare kulstof- og nitrogenkilder og næringssalte og udvinding af antibiotikumet fra både mediet og myceliemassen.

Dette antibiotikum er særlig virksomt mod grampositive mikroorganismer.

Antibiotikum A/16686 er et glycopeptidantibiotikum, der består af en hovedkomponent som udgør 70-80%, medens resten er mindst to mindre komponenter.

Hydrokloridet af antibiotikum A/16686 har bl.a. følgende egenskaber:

- A) hvidt krystallinsk materiale med smp. 224-225°C

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af et hidtil ukendt antibiotisk stof, der arbitrært i nærværende beskrivelse betegnes A/16686, eller syreadditionssalte deraf. Fremgangsmåden består ifølge op-
5 findelsen i at man dyrker den hidtil ubeskrevne mikroorganismestamme *Actinoplanes* sp. ATCC 33076 under aerobe submerse betingelser i et dyrkningsmedium indeholdende en assimilerbar kilde til kulstof, en assimilerbar kilde til nitrogen og uorganiske salte, hvorpå man udvinder antibioti-
10 ket og om ønsket omdanner det til et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt deraf eller frigør antibiotiket i basisk form fra et dannet syreadditionssalt deraf. Stoffet og dets syreadditionssalte er egnet til anvendelse som antibakterielt middel.

15 Antibiotikum A/16686 er et glykopeptid-antibiotikum med basisk karakter, der som nævnt er i stand til at danne syreadditionssalte.

For enkeltheds skyld bruges i nærværende beskrivelse betegnelsen "antibiotikum A/16686" til antibiotiket både
20 i form af antibiotikum A/16686 som fri base og i form af dets fysiologisk acceptable syreadditionssalte.

Antibiotikum A/16686 inhiberer in vitro væksten af visse pathogene bakterier, navnlig grampositive sådanne. Desuden giver parenteral indgift af antibiotikum A/16686 en høj
25 grad af beskyttelse mod eksperimentelt fremkaldte infektioner hos mus.

Som anført foran vindes antibiotikum A/16686 ved dyrkning af en hidtil ukendt stamme af slægten *Actinoplanes*. En kultur af denne stamme, der isoleredes fra en jordprøve sam-
30 let ved Vaghalbod (Indien) er den 30. januar 1979 deponeret hos den permanente kultursamling ATCC (American Type Culture Collection), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, hvor den har fået accessionsnummeret ATCC 33076.

Egenskaberne af *Actinoplanes* sp. ATCC 33076 anføres i
35 det følgende.

Morfologi

Stammen vokser vel på forskellige medier og har orange-
farvet substratmycelium. Den frembringer ikke pigment. Der
mangler altid luftmycelium. En mikroskopisk undersøgelse af
5 det vegetative mycelium viser grenede hyfer med en diameter
på ca. 1 μ . Sporangier dannes sparsomt og kun på kartoffel-
agar, og de er kugledannede med meget uregelmæssig overflade
og en diameter fra 5,0-9,0 μ . Sporeafgivelse iagttages efter
10 brud på sporangiumsvæg. De subsfæriske sporer er bevægelige
og har en diameter på 1,0-1,5 μ . Analyse af cellevægskomponen-
terne viser meso-diaminopimelinsyre og et suktermønster af
type D (Lechevalier et al., Chemical composition as a criterium
in the classification of Actinomycetes. Adv. Applied Micro-
biology, 14, 1971. Academic Press N.Y.).

15

Kulturkarakterer

Nedenstående tabel I viser kulturkaraktererne for
Actinoplanes ATCC 33076 dyrket på forskellige standardmedier
foreslået af Shirling og Gottlieb (Intern. J. System. Bact.
20 16, 313-340, 1966) og andre medier anbefalet af Waksman (The
Actinomycetes, bind II, The Williams and Wilkins Co. 1961).
Kulturkaraktererne bestemtes efter 6-14 dages inkubering ved
30°C.

Tabel IKulturkarakterer

Nummeret på nogle af kulturmedierne refererer til dem der angives af Shirling og Gottlieb i Methods for characterization of Streptomyces species - Intern. J. System. Bact. 5 16, 313-340, 1966.

Kulturmedium	Kulturkarakter
10 Medium nr. 2 (gærekstrakt-maltagar)	rigelig vækst, rynket overflade, lysebrun 12 H 12
Medium nr. 3 (havremelsagar)	sparsom vækst, tynd, lysorange 9 B 6
Medium nr. 4 (uorganiske salte-stivelsesagar)	moderat vækst, skorpet overflade, orange 11 L 12
15 Medium nr. 5 (glycerol-asparaginagar)	sparsom vækst, hyalin
Medium nr. 6 (pepton-gær-ekstrakt-jernagar)	sparsom vækst, hyalin til lysebrun
20 Medium nr. 7 (tyrosinagar)	sparsom vækst, glat overflade, brun 5 D 11
Havremelsagar (ifølge Waksman)	rigelig vækst, rynket overflade, orange til brun 12 C 10
Hickey og Tresners agar	rigelig vækst, skorpet overflade, orange 11 G 8
25 Czapeks glukoseagar	moderat vækst, skorpet overflade, orange 11 G 8

Tabel I (fortsat)

Kulturmedium	Kulturkarakter
Glukose-asparaginagar	sparsom vækst, skorpet overflade, lysorange 11 F 6
5 Næringsagar	moderat vækst, glat overflade, orange 11 G 8
Kartoffelagar	rigelig vækst, rynket overflade, ravfarvet-brun 12 E 10
10 Bennets agar	rigelig vækst, rynket overflade, orange 11 C 8
Kalciummalatagar	moderat vækst, glat overflade, lysorange 10 C 6
Skummetmælksagar	rigelig vækst, rynket overflade, orange 9 C 2
15 Czapeks agar	moderat vækst, skorpet overflade, orange 10 D 7
Æg-agar	moderat vækst, glat overflade, hyalin til lysorange
20 Pepton-glukoseagar	rigelig vækst, rynket overflade, orange 11 G 11
Agar	meget sparsom vækst, glat overflade, hyalin
Loefflers serum	meget sparsom vækst, glat overflade, orange
25 Kartoffel	sparsom vækst, skorpet, lysebrun
Gelatine	sparsom vækst, lysorange,
Cellulose	meget sparsom vækst, tynd, hyalin

Udnyttelse af kulstofkilder

30 Tabel II viser udnyttelse af kulstofkilder undersøgt i overensstemmelse med Pridham og Gottliebs metode (J. Bact. 56, 107, 1948).

Tabel II

	Kulstofkilde	Udnyttelse
	Inositol	-
	Fruktose	+
5	Rhamnose	+
	Mannitol	-
	Xylose	+
	Raffinose	-
	Arabinose	+
10	Cellulose	-
	Sakkarose	+
	Glukose	+
	Mannose	+
	Laktose	-
15	Salicin	+

+ = positiv udnyttelse

- = ingen vækst

Fysiologiske egenskaber

Tabel III viser de fysiologiske karakterer for stammen.

20

Tabel III

	Prøve	Resultat
	Stivelseshydrolyse	positiv
	H ₂ S-dannelse	positiv
	Tyrosinase-reaktion	negativ
25	Kasein-hydrolyse	positiv
	Opløseliggørelse af kalciummalat	negativ
	Gelatinesmeltning	positiv
	koagulering af lakmusmælk	positiv
30	Peptonisering af lakmusmælk	negativ
	Nedbrydning af cellulose	negativ

Til fremstilling af antibiotikum A/16686 dyrkes stammen *Actinoplanes* sp. ATCC 33076 under aerobe betingelser i et vandigt næringsmedium indeholdende en assimilerbar kilde til kulstof, en assimilerbar kilde til nitrogen og uorganiske salte. Dette dyrkningsmedium kan være et hvilket som helst af et antal næringsmedier der sædvanligvis bruges ved gæringer, men visse medier foretrækkes. Således er fx foretrukne kulstofkilder glukose, fruktose, mannose, sakkarose og lignende sukkerarter. Foretrukne nitrogenkilder er sojamel, pepton, kødekstrakt, gærekstrakt, trypton, aminosyrer og lignende komplekse kilder. Blandt de uorganiske salte der kan inkorporeres i dyrkningsmediet er de sædvanlige opløselige salte med evne til at give ioner af natrium, kalium, jern, zink og kobolt, magnium, kalcium, ammonium, klorid, karbonat, sulfat, nitrat og deslige. Som regel fordyrkes den antibiotikumproducerende stamme i en rystekolbe, hvorefter denne kultur bruges til at pøde krukkefermentorer til produktion af væsentlige mængder antibiotikum A/16686. Det medium der bruges til forkulturen kan være det samme som det der bruges til større gæringer, men der kan også bruges andre medier.

Den A/16686-producerende stamme kan dyrkes ved temperaturer mellem ca. 20°C og ca. 37°C og dyrkes fortrinsvis ved en temperatur på omkring 28-30°C.

Under gæringen kan antibiotikumproduktionen følges ved at man undersøger prøver af gæringssuppen eller af ekstrakter af myceliefaststoffet for antibiotisk aktivitet.

Organismer der vides at være følsomme for antibiotikum A/16686 er nyttige til dette formål. En særlig nyttig prøveorganisme er *Sarcina lutea*. Biobestemmelsen udføres hensigtsmæssigt ved agar-diffusionsmetoden på agarplader. Maximal produktion af antibiotisk aktivitet forekommer i almindelighed mellem 3. og 5. dag. Det antibiotikum der frembringes under gæringen med stammen *Actinoplanes* sp. ATCC 33076 findes både i gæringsmediet og i myceliemassen. Udvinning af antibiotikum A/16686 kan derfor udføres ved særskilt ekstraktion af medium og mycelium.

Ekstraktion af myceliemassen udføres bedst med metanol, men andre lavtkogende alkanoler og kloroform egner sig også.

Antibiotikum A/16686 udvindes som råprodukt fra ekstraktionsopløsningsmidlet ved rutineprocedurer. Analogt ekstraheres også mediet, fortrinsvis med n-butanol, og der vindes en yderligere mængde rå antibiotikum A/16686 ved fældning fra denne opløsning. Rensning af det rå antibiotikum A/16686 opnås derefter ved at man behandler det produkt der er udvundet fra ekstraktionsopløsningsmidlerne med en opløsning af kloroform/ætanol/vand 4:7:2, hvorefter man fraskiller det dannede olieagtige produkt og udhælder det i vand. Denne behandling bevirker størkning af produktet som udvindes ved filtrering og renses yderligere ved søjlekromatografi på silikagel under eluering med en blanding af acetonitril og 0,01N HCl 1:1. Antibiotikum A/16686, som ved denne fremgangsmåde udvindes i form af hydrokloridet, udsaltes derefter ved kromatografering på en tværbundet dextrangelkolonne.

Alle trin af den ovenfor beskrevne rensningsproces overvåges ved tyndlagskromatografi med anvendelse af et passende opløsningsmiddelsystem såsom et basisk opløsningsmiddelsystem, fx n-propanol/n-butanol/N-ammoniumhydroxyd 2:3:4 (øvre fase) eller metanol/10% vandigt ammoniumacetat/10% ammoniumhydroxyd 10:9:1, hvori et hvilket som helst syreadditionssalt af antibiotikum A/16686 omdannes til den fri base. Alle de foran nævnte trin tager derfor sigte på at isolere rent antibiotikum A/16686, karakteriseret ved en særlig Rf-værdi i det særlige anvendte opløsningsmiddelsystem.

Der kan hensigtsmæssigt også anvendes andre rensningsmetoder som indebærer konventionelle ekstraktions- og adsorptionsprocedurer. Disse alternative metoder kan let udformes, trin for trin, ved at man overvåger rensningens fremadskriden ved tyndlagskromatografi som beskrevet foran. Når man følger TLC-pletten for antibiotikum A/16686 med en given Rf-værdi vil det således være klart for den sagkyndige hvilke operationer der hensigtsmæssigt kan udføres for at isolere rent antibiotikum A/16686.

Eventuelt kan rent antibiotikum A/16686-hydroklorid, vundet på den måde der er beskrevet foran, derefter omdannes til den tilsvarende fri base eller til et andet fysiologisk acceptabelt syreadditionssalt på i og for sig sædvanlig måde.

Antibiotikum A/16686 er et antimikrobielt middel og det er særlig aktivt mod grampositive mikroorganismer. Aktivitetspektret in vitro for antibiotikum A/16686 er vist summarisk i nedenstående tabel IV, hvor MIC står for mindste
5 inhiberende koncentration (i µg/ml).

Tabel IV

Organisme	MIC (µg/ml) Antibiotikum A/16686
Staphylococcus aureus ATCC 6538	0,16
10 Staphylococcus aureus ATCC 9144	0,16
Staphylococcus aureus Tour	0,31
Staphylococcus 10B Ciba	0,08
S. epidermidis ATCC 12228	0,08
S. saprophyticus NCTC 7292	0,16
15 M. flavus ATCC 10240	0,016
S. lutea ATCC 9341	0,02
Streptococcus pyogenes C 203 SKF 13400	0,01
Streptococcus pneumoniae Felton UC 41	0,05
Streptococcus faecalis ATCC 7080	0,31
20 S. foecium ATCC 10541	0,08
S. agalactiae ATCC 7077	0,02
S. mutans ATCC 27607	0,08
C. diphtheriae var.mitis ATCC 11051	0,31
C. xerosis NCTC 9755	0,02
25 Bacillus subtilis ATCC 6633	0,062
B. cereus var.mycoides ATCC 11778	0,08
C. perfringens ISS 30543	0,16
P. acnes ATCC 6919	0,4
P. acnes ATCC 6922	0,8
30 P. acnes ATCC 25746	0,4

Nedenstående tabel V viser resultater af forsøg hvor antibiotikum A/16686 blev afprøvet mellem forskellige klinisk isolerede stammer af Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae og Streptococcus faecalis.

Antibiotikum A/16686 har vist sig at have forholdsvis lav toxicitet ved afprøvning på forsøgsdyr. Fx er LD₅₀-værdien når det antibiotiske stof indgives intraperitonealt hos mus mellem ca. 500 og ca. 750 mg/kg.

5 Antibiotikum A/16686 skal derfor bruges som antibakterielt middel, og med denne anvendelse sigtes til alle industrielt anvendelige aspekter af en sådan anvendelse, herunder inkorporering af antibiotikum A/16686 i farmaceutiske præparater.

10 Sådanne farmaceutiske præparater, egnet til oral, lokal eller parenteral administration, fremstilles på de sædvanlige måder der er velkendt for de kyndige i farmaceutisk teknik og videnskab. Eksempler på sådanne præparater er beskrevet fx i Remington's Pharmaceutical Sciences 15. udgave, 15 1975, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania. Disse former omfatter tabletter, kapsler, pulvere, salver, flydende opløsninger, opløsninger til injektion og lignende. Dosisenheden kan indeholde fra 0,5-99 og fortrinsvis fra 0,5-80% af den virksomme bestanddel. Den daglige dosis må bestemmes 20 under hensyn til en række faktorer såsom legemsvægt, infektionsorganismen, infektionens alvor og indgiftsmåden og -hyppigheden.

Til mere fuldstændigt at belyse fremgangsmåden ifølge opfindelsen henvises til de efterfølgende eksempler.

25 Eksempel 1

Gæring af stammen Actinoplanes sp. ATCC 33076

En kultur af Actinoplanes sp. ATCC 33076 dyrkes som forkultur ved rystekolbedyrkning i et medium med følgende sammensætning:

30	kødekstrakt	3 g/l
	gærekstrakt	5 g/l
	trypton	5 g/l
	opløselig stivelse	24 g/l
	glukose	1 g/l
35	CaCO ₃	4 g/l
	postevand	1 liter

Kolberne rystes i ca. 96 timer ved 28-30°C og derefter bruges forkulturen (1 liter) til podning af krukkefermentorer der hver indeholder 10 liter af følgende næringsmedium:

	kødekstrakt	40 g
5	pepton	40 g
	gærekstrakt	10 g
	natriumklorid	25 g
	sojamel	100 g
	glukose	250 g
10	CaCO ₃	50 g
	postevand	10 liter

Gæringsportionerne inkuberes aerobt under omrøring ved 28-30°C. Med mellemrum bestemmes den antibiotiske aktivitet mikrobiologisk ved agar-diffusionsmetoden med *Sarcina lutea* som testorganisme. Den maksimale aktivitet nås efter 72-120 timers gæring.

Eksempel 2

Udvinding af antibiotikum A/16686

En fuld gæringssuppe (170 liter) fremstilles som beskrevet i eksempel 1 afkøles til 10°C og bringes til pH 3,5 ved hjælp af 18% HCl. Det resulterende sure medium filteres ved anvendelse af filterhjælp ("Clarcel Flow-Ma"), og myceliekagen vaskes med vand. Derefter behandles det filtrerede medium og myceliet videre hver for sig.

a) 30 liter metanol bruges til at ekstrahere myceliemassen som efter filtrering ekstraheres på ny med en blanding af metanol og vand (30 liter metanol plus 5 liter vand). Det udtømte mycelium kasseres og de to metanolekstrakter koncentrerer under vakuum ved en temperatur på under 40°C for at give 6 liter vandigt koncentrat. Dette vandige koncentrat ekstraheres med 3 portioner på hver 10 liter n-butanol, og de forenes og koncentrerer til et ringe rumfang under vakuum.

Dette koncentrat sættes til petroleumsæter og det resulterende bundfald fraskilles ved dekantering og sættes til en yderligere portion petroleumsæter. Bundfaldet fraskilles ved

filtrering og tørres under vakuum ved stuetemperatur, hvorved der vindes 80 g antibiotikum A/16686 som et råmateriale med en MIC mod *S. pneumoniae* UC 41 på 0,1 µg/ml.

b) Det filtrerede medium plus vaskevæsker (165 liter) afkøles til 10°C og reguleres til pH 3,5 ved tilsætning af 2,5 liter koncentreret HCl. Den vundne opløsning ekstraheres med 80 liter n-butanol og den organiske ekstrakt koncentreret derefter under vakuum ved en temperatur på under 35°C, hvorved der fremkommer 6 liter butanolkoncentrat. Dette koncentrat sættes til petroleumsæter og det vundne bundfald, der fraskilles ved dekantering, sættes til en yderligere portion petroleumsæter. Det faste stof fraskilles ved filtrering og tørres under vakuum ved stuetemperatur, og der vindes 26,3 g rå antibiotikum A/16686 med en MIC mod *S. pneumoniae* UC 41 på 0,8 µg/ml.

Eksempel 3

Rensning af antibiotikum A/16686

47,7 g rå antibiotikum A/16686 vundet i eksempel 2 a) behandles med 1,4 liter af en blanding af kloroform/ætanol/vand 4:7:2 (rumfang), og det derved dannede olieagtige produkt skilles fra opløsningen ved dekantering. Yderligere 70 ml af ovennævnte blanding sættes herefter til det olieagtige produkt og adskillelsen gentages. Ved behandling af det olieagtige produkt med 440 ml vand størkner det, og det fraskilles ved centrifugering og filtrering.

a) Det faste stof som fraskilles suspenderes i 170 ml vand, opløses ved tilsætning af 400 ml metanol og filtreres. Derefter afdampes opløsningsmidlerne under vakuum ved tilsætning af n-butanol ved en temperatur der aldrig er højere end 35°C, og der opnås et butanolkoncentrat på ca. 50 ml. Ved tilsætning af 500 ml diætylæter danner der sig et bundfald som fraskilles ved filtrering og tørres under vakuum ved stuetemperatur, hvorved der vindes 1,012 g temmelig rent antibiotikum A/16686 med en MIC over for *S. pyogenes* på 0,025 µg/ml. Det på denne måde

vundne, temmelig rene antibiotikum A/16686 underkastes derefter følgende rensningsprocesser:

1,58 g af nævnte antibiotikum A/16686, karakteriseret ved en MIC mod *S. pyogenes* på 0,025 µg/ml, opløses i acetonitril/vand 1:1 og den resulterende opløsning anbringes på en kolonne indeholdende 430 g silikagel 60 ("Merck" 0,06-0,2 mm), præpareret i samme blanding. Kolonnen fremkaldes ved at man først bruger samme blanding af acetonitril og vand og opsamler 70 fraktioner på hver 20 ml, og derefter eluerer med en blanding af lige rumfang acetonitril og N/100 HCl, hvoraf man opsamler yderligere 290 fraktioner på hver 20 ml. Elueringen af kolonnen overvåges ved tyndlagskromatografi på 60 F₂₅₄ silikagelplader og ved bedømmelse af fraktionerne mod *Sarcina lutea*. Fraktionerne nr. 130 til 265 forenes og opløsningsmidlerne afdampes under vakuum med n-butanol, hvorved der vindes et n-butanolkoncentrat på 20 ml. Dette residualrumfang udhældes i en stor mængde ætylater og det dannede bundfald fraskilles ved filtrering og tørres under vakuum ved stuetemperatur over P₂O₅, hvorved der vindes 1,015 g antibiotikum A/16686.

0,67 g af denne substans opløses i 24 ml vand og 76 ml metanol. Den resulterende opløsning anbringes på en 3,0 x 62,0 cm stor kolonne indeholdende 220 g "Sephadex"® LH-20, præpareret i metanol/vand 7:3 (rumfang). Kolonnen fremkaldes ved samme blanding under opsamling af fraktioner på 10 ml. Fraktionerne nr. 24 til 32 forenes og opløsningsmidlerne afdampes under vakuum ved en temperatur på under 35°C med n-butanol til et residual-butanolrumfang på ca. 10 ml. Denne opløsning sættes til ætylater for at udfælde det ønskede rene antibiotikum A/16686. Bundfaldet fraskilles ved filtrering, vaskes med ætylater og tørres under vakuum over P₂O₅ ved stuetemperatur, og der vindes 0,26 g rent antibiotikum A/16686.

b) Filtratet stripes under vakuum ved en temperatur på under 35°C ved tilsætning af n-butanol til frembringelse af et n-butanolkoncentrat på 50 ml. Ved tilsætning af petroleumsæter danner der sig et bundfald som fraskilles ved filtrering og tørres under vakuum ved stuetemperatur, hvorved der fremkommer 42,9 g delvis rensset antibiotikum A/16686, kendetegnet

ved en MIC-værdi mod *Streptococcus pyogenes* på 0,2 µg/ml. Dette antibiotiske stof suspenderes i 2,5 liter vand og opløses ved tilsætning af 1N NaOH indtil pH 7. Derefter ekstraheres den dannede vandige opløsning med 3 portioner på hver 5 liter n-butanol, og efter at være blevet vasket med vand koncentrerer denne organiske fase til 200 ml under vakuum ved en temperatur på under 35°C.

Ved tilsætning af diætylæter til koncentratet danner der sig et bundfald som filtreres og tørres under vakuum ved stuetemperatur. Det tørrede produkt opløses i 160 ml af det øvre lag af en blanding af n-propanol/n-butanol/1N ammoniumhydroxyd 2:3:4 (rumfang). Den resulterende opløsning anbringes på en 100 cm høj kolonne med en diameter på 7,5 cm og indeholdende 1,7 kg silikagel 60 ("Merck" 0,06-0,2 mm), tilberedt i ovennævnte opløsningsmiddelblanding. Kolonnen fremkalder ved hjælp af samme blanding under opsamling af fraktioner på 300 ml. Elueringen af kolonnen overvåges ved tyndlagskromatografi. Fraktionerne nr. 21 til 26 forenes og stripes under vakuum ved en temperatur på under 35°C med n-butanol, hvorved der fremkommer et n-butanolkoncentrat på 50 ml. Ved tilsætning af diætylæter danner der sig et bundfald som fraskilles ved filtrering, vaskes med diætylæter og tørres under vakuum over P₂O₅ ved stuetemperatur. Der vindes et udbytte på 1,875 g temmelig rent antibiotikum A/16686, som derefter renses yderligere på samme måde som beskrevet foran under a).

Antibiotikum A/16686 er i form af hydrokloridet et hvidt krystallinsk materiale som er svagt hygroskopisk og som smelter ved 224-226°C. Det er meget opløseligt i vand og dimetylformamid, opløseligt i metanol, ætanol, propanol og butanol, men uopløseligt i ætylæter, petroleumsæter og benzen. Elementæranalyse af antibiotikum A/16686-hydroklorid, i forvejen tørret ved 140°C under en inert atmosfære, viser følgende tilnærmede procentuelle sammensætning, fremkommet som gennemsnit af flere analyser: kulstof 51,73%, hydrogen 6,34%, nitrogen 9,96%, klor (totalindhold) 5,84%, kloridioner 4,74%, rest 1%. Det infrarøde spektrum i nujol er vist på fig. 1. Følgende absorptionsmaxima er konstateret: 3290-3070, 2930 og 2860 (nujol), 1765, 1630, 1510, 1455, 1375 (nujol), 1230,

1175, 1130, 1065, 1030, 1015, 980, 840 og 820 cm^{-1} .

Det ultraviolette absorptionsspektrum ses i fig. 2

og har følgende absorptionsmaxima:

- 5 a) i metanol 232 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 178$) og 265 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 107$);
 b) i metanol indeholdende 0,1N HCl: 231 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 167$)
 og 270 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 96$);
 c) i metanol indeholdende 0,1N NaOH: 250 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 232$)
 og 295 nm (skulder);
 10 d) i metanol indeholdende pH 7,38 puffer: 231 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 167$) og 270 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 96$).

De ultraviolette absorptionsspektre blev konstateret ved hjælp af et "Beckmann" DK-2 spektrofotometer.

Antibiotikum A/16686-hydroklorid har en optisk drejning, $[\alpha]_D^{24}$, på $+49,7^\circ$ ($c = 0,43\%$ i DMF).

15 Antibiotikum A/16686 udviser følgende karakteristiske reaktioner:

	ninhydrin (3% ætanolisk opløsning)	negativ
	ninhydrin (3% ætanolisk opløsning + natriumacetat)	positiv
20	1% FeCl_3 - 1% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (vandig opløsning)	positiv (grøn)
	Molisch's reaktion	positiv
	Fehling's reaktion	negativ
	Biuret-reaktion	positiv
25	Anthron-reaktion	positiv
	Millon's reaktion	negativ
	Koncentreret H_2SO_4	negativ
	Vandigt KMnO_4	positiv

30 Rf-værdierne for antibiotikum A/16686 ved papirkromatografi med forskellige elueringssystemer og *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 som organisme til opdagelsen anføres i følgende tabel.

Tabel VII

Kromatografisk opførsel af antibiotikum A/16686 ("Whatman" nr. 1 papir; nedadløbende kromatografering, Rm 40 cm, mængder: 20 µg af forbindelsen opløst i vandig metanol (2 mg/ml)).

	Elueringssystem	Rf-værdi
5	1) n-butanol mættet med Sørensen's puffer pH 6,0	0,00
	2) n-butanol mættet med vand indeholdende 2% p-toluensulfonsyre	0,00
10	3) n-butanol mættet med vand indeholdende 2% ammoniumhydroxyd	0,00
	4) Sørensen's puffer, pH 6,0, mættet med n- butanol	0,05
	5) n-butanol/metanol/vand 4:1:2	0,43
15	6) ætylacetat mættet med vand	0,00
	7) n-butanol/eddikesyre/vand 2:1:1	0,52
	8) n-butanol/pyridin/vand 4:3:7	0,87

Rf-værdierne for antibiotikum A/16686 i forskellige tyndlags-kromatografisystemer er anført i tabel VIII. Betingelserne var følgende: Rm: ca. 140 mm. Mængder: 2-5 µl af en opløsning (1 mg/ml) af forbindelsen i acetonitril/vand 1:1. Synliggørelse: a) bioautografering på agarplader podet med *Bacillus subtilis* ATCC 6633; b) karbonisering ved opvarmning med α -naftol-svovlsyre; c) joddamp; d) klor-toluidin-reagens; 20 e) UV-lys ved 254 nm.

System 1) til 7): Silikagel 60 F₂₅₄ plader ("Merck"); synliggørelse a, e; b, c, d, e.

System 8) og 9): Silikagel 60 F₂₅₄ silaniseret ("Merck"); synliggørelse e.

30 System 10) og 11): Cellulose F plader ("Merck"); synliggørelse a.

Tabel VIII

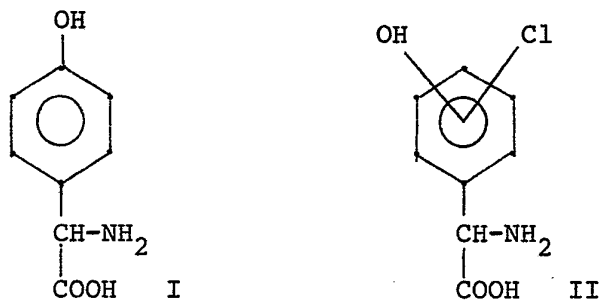
Elueringsystem (rumfangsforhold)	Rf-værdi
1) n-propanol/n-butanol/N ammoniumhydroxyd 2:3:4 (øvre fase)	0,15
5 2) n-butanol/eddikesyre/vand 4:2:5	0,61
3) n-butanol/ætanol/0,1N saltsyre	0,61
4) kloroform/ætanol/10% eddikesyre 4:7:2	0,00
5) n-butanol/eddikesyre/vand 4:1:5	0,17
10 6) metanol/10% vandigs ammoniumacetat/10% ammoniumhydroxyd 10:9:1	0,52
7) n-butanol/pyridin/vand/eddikesyre 6:4:3:1	0,45
8) metanol/10% vandigt ammoniumacetat/10% ammoniumhydroxyd 10:9:1	0,11
9) 0,25M vandigt NaH_2PO_4 /acetonitril 1:1	0,68
15 10) metanol/10% vandigt ammoniumacetat 1:1	0,65
11) n-butanol/eddikesyre/vand 4:2:5	0,77

Som bestemt ved højpålidelige kromatografiteknikker består antibiotikum A/16686, isoleret og rensat som beskrevet i eksempel 3, af en hovedkomponent som andrager 70-80%, mens de resterende 30-20% kan tilskrives mindst to mindre komponenter.

Antibiotikum A/16686-hydroklorid, isoleret som beskrevet i de foregående eksempler, er hydrokloridet af et klorholdigt basisk glykopeptid som afviger fra antibiotika hørende den klassiske glykopeptidgruppe ved at indeholde klor og i arten af dets aminosyrekomponenter. Aminosyreanalyse af antibiotikum A/16686 efter sur hydrolyse i 6N saltsyre ved 110°C 6 timer viste ved hjælp af en aminosyre-autoanalysator, tilstedeværelse af følgende aminosyrer: ornitin (118 µg/mg = 0,58 µM/mg), asparaginsyre (29,2 µg/mg = 0,22 µM/mg), treonin (68 µg/mg = 0,57 µM/mg), glycin (25 µg/mg = 0,33 µM/mg), alanin (29 µg/mg = 0,32 µM/mg), leucin (41 µg/mg = 0,31 µM/mg) og fenylalanin (42 µg/mg = 0,25 µM/mg).

Der opdagedes yderligere fire toppe ved anvendelse af kolonnen til neutrale og sure aminosyrer. To af disse fire aminosyrer blev identificeret ved hjælp af gaskromatografi-

massespektrometri efter omdannelse til deres tilsvarende metylester-trifluoracetylderivater, og de blev tilskrevet følgende strukturer:



5 Eksempel 4

Isolering af den fri base

Ved behandling af en opløsning af 0,05 g antibiotikum A/16686-hydroklorid i 3 ml vand og 8 ml ætanol med 2 ml 1,2-epoxybutan danner der sig et bundfald som efter henståen ved en lav temperatur i 1 døgn fraskilles ved centrifugering, vaskes med ætanol og tørres over P_2O_5 under vakuum ved stuetemperatur, hvorved der vindes 0,016 g af den tilsvarende fri base.

Behandling af denne fri basiske form af antibiotikum A/16686 med en farmaceutisk acceptabel, uorganisk eller organisk syre fører til dannelse af det tilsvarende syreadditions-salt. Eksempler på farmaceutisk acceptable syrer er ugiftige syrer som egner sig til dannelse af terapeutisk anvendelige salte og som i og for sig kendes i teknikken, fx saltsyre, brombrintesyre, svovlsyre, fosforsyre, salpetersyre, vinsyre, eddikesyre, ravsyre, mælkesyre, glutaminsyre og metansulfonsyre.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde til fremstilling af antibiotikum A/16686 i form af den fri base eller et fysiologisk acceptabelt syre-additionssalt deraf, hvilket antibiotikum i form af hydrokloridet har følgende egenskaber:
- 5 A) er et hvidt krystallinsk materiale med smp. 224-226°C,
B) er letopløseligt i vand og dimetylformamid, opløseligt i metanol, ætanol, propanol og butanol og uopløseligt i ætyl-æter, petroleumsæter og benzen,
- 10 C) har tilnærmelsesvis den elementære sammensætning 51,73% C, 6,34% H, 9,96% N, 5,84% Cl (ialt), 4,74% Cl-ion og 1% rest,
- D) Infrarødt absorptionsspektrum i nujol som vist i fig. 1 og med følgende konstaterbare absorptionsmaxima: 3290-3070,
15 2930 og 2860 (nujol), 1765, 1630, 1510, 1455, 1375 (nujol), 1230, 1175, 1130, 1065, 1030, 1015, 980, 840 og 820 cm⁻¹,
- E) ultraviolet absorptionsspektrum som vist i fig. 2 og med følgende absorptionsmaxima:
- a) i metanol: 232 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 178$) og 265 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 107$),
20 b) i metanol indeholdende 0,1N HCl: 231 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 167$) og 270 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 96$),
c) i metanol indeholdende 0,1N NaOH: 250 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 232$) og 295 nm (skulder), og
d) i metanol indeholde pH 7,38 puffer: 231 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 167$) og 270 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 96$),
25 F) optisk drejning $[\alpha]_D^{24} = +49,7^\circ$ (c = 0,43% i DMF),
G) følgende karakteristiske reaktioner:
- | | |
|--|---------|
| ninhydrin (3% ætanolisk opløsning) | negativ |
| ninhydrin (do | |
| 30 + natriumacetat) | positiv |
| 1% FeCl ₃ - 1% K ₃ Fe(CN) ₆ | positiv |
| | (grøn) |
| Molish | positiv |
| Fehling | negativ |
| 35 Biuret | positiv |
| Anthron | positiv |

	Millon	negativ
	konc. H_2SO_4	negativ
	$KMnO_4$	positiv
	H) følgende papirkromatografi-værdier på "Whatman" nr. 1	
5	papir med <i>S. aureus</i> ATCC 6538 som opdagelsesorganisme:	
	1) n-butanol mættet med Sørensen puffer pH 6,0	0,00
	2) n-butanol mættet med vand med 2% p-toluensulfonsyre	0,00
10	3) n-butanol mættet med vand med 2% ammoniumhydroxyd	0,00
	4) Sørensen puffer, pH 6,0, mættet med n-butanol	0,05
	5) n-butanol/metanol/vand 4:1:2	0,43
	6) ætylacetat mættet med vand	0,00
	7) n-butanol/eddikesyre/vand 2:1:1	0,52
15	8) n-butanol/pyridin/vand 4:3:7	0,87
	I) følgende Rf-værdier ved forskellige tyndlagskromatografisystemer:	
	1) n-propanol/n-butanol/N ammoniumhydroxyd 2:3:4 (øvre fase)	0,15
20	2) n-butanol/eddikesyre/vand 4:2:5	0,61
	3) n-butanol/ætanol/0,1N saltsyre	0,61
	4) kloroform/ætanol/10% eddikesyre 4:7:2	0,00
	5) n-butanol/eddikesyre/vand 4:1:5	0,17
25	6) metanol/10% vandigt ammoniumacetat/10% ammoniumhydroxyd 10:9:1	0,52
	7) n-butanol/pyridin/vand/eddikesyre 6:4:3:1	0,45
	8) metanol/10% vandigt ammoniumacetat/10% ammoniumhydroxyd 10:9:1	0,11
	9) 0,25M vandigt NaH_2PO_4 /acetonitril 1:1	0,68
30	10) metanol/10% vandigt ammoniumacetat 1:1	0,65
	11) n-butanol/eddikesyre/vand 4:2:5	0,77
	1) til 7) på silikagel 60 F ₂₅₄ plader; 8), 9) på silikagel 60 F ₂₅₄ silaniseret og 10), 11) på cellulose F plader,	
35	J) aminosyreanalyse efter sur hydrolyse i 6N saltsyre ved 110°C i 6 timer visende mindst følgende genkendte aminosyrer: ornitin, asparaginsyre, treonin, glycin, alanin, leucin, fenylalanin, p-hydroxyfenylglycin og hydroxy, klor-substitueret fenylglycin,	

k e n d e t e g n e t ved at man dyrker mikroorganismestammen Actinoplanes sp. ATCC 33076 under aerobe submerse betingelser i et dyrkningsmedium indeholdende en assimilerbar kilde til kulstof, en assimilerbar kilde til nitrogen og uorganiske salte, hvorpå man udvinder antibiotiket og om ønsket omdanner det til et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt deraf eller frigør antibiotiket i basisk form fra et dannet syreadditionssalt deraf.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at man udvinder antibiotiket ved ekstraktion af dyrkningsmediet og af myceliet, hver for sig, med et organisk opløsningsmiddel udvalgt blandt lavtkogende alkanoler og kloroform, behandler det antibiotiske stof udvundet fra ekstraktionsopløsningsmidlerne med en blanding af kloroform/ætanol/vand 4:7:2, udhælder det derved udskilt² olieagtige produkt i vand, fraskiller det størknede produkt og renser det yderligere ved søjlekromatografi på silikagel under eluering med en blanding af lige dele acetonitril og 0,01N HCl, hvorved antibiotikum A/16686-hydroklorid udvindes, der derpå om ønsket udsaltes ved kromatografering på en tværbundet dextrangel-kolonne, hvorpå antibiotikum A/16686-hydroklorid om ønsket omdannes til den tilsvarende fri base eller til et andet fysiologisk acceptabelt syreadditionssalt på i og for sig kendt måde.

Fremdragne publikationer:

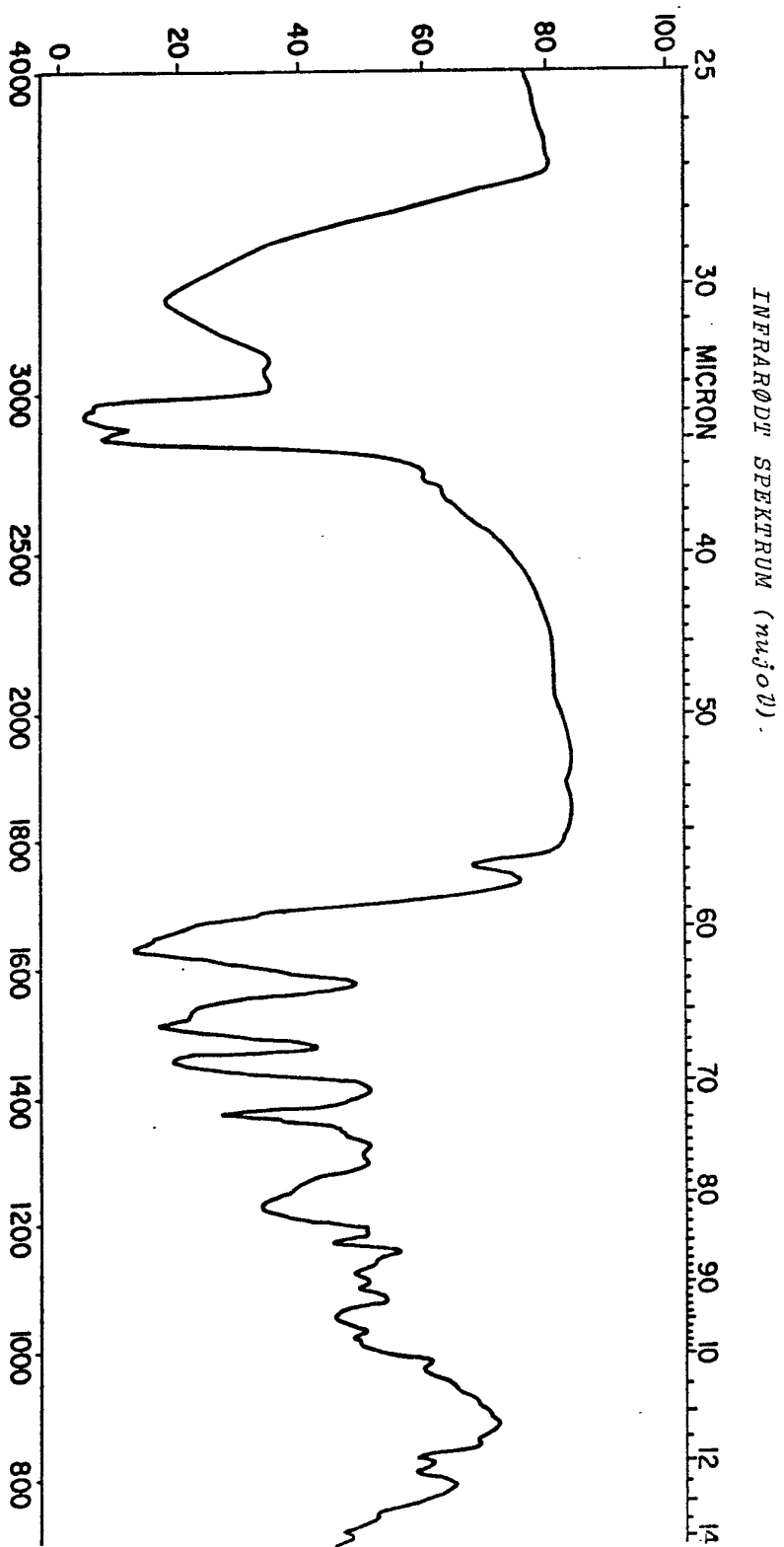


FIG. 1

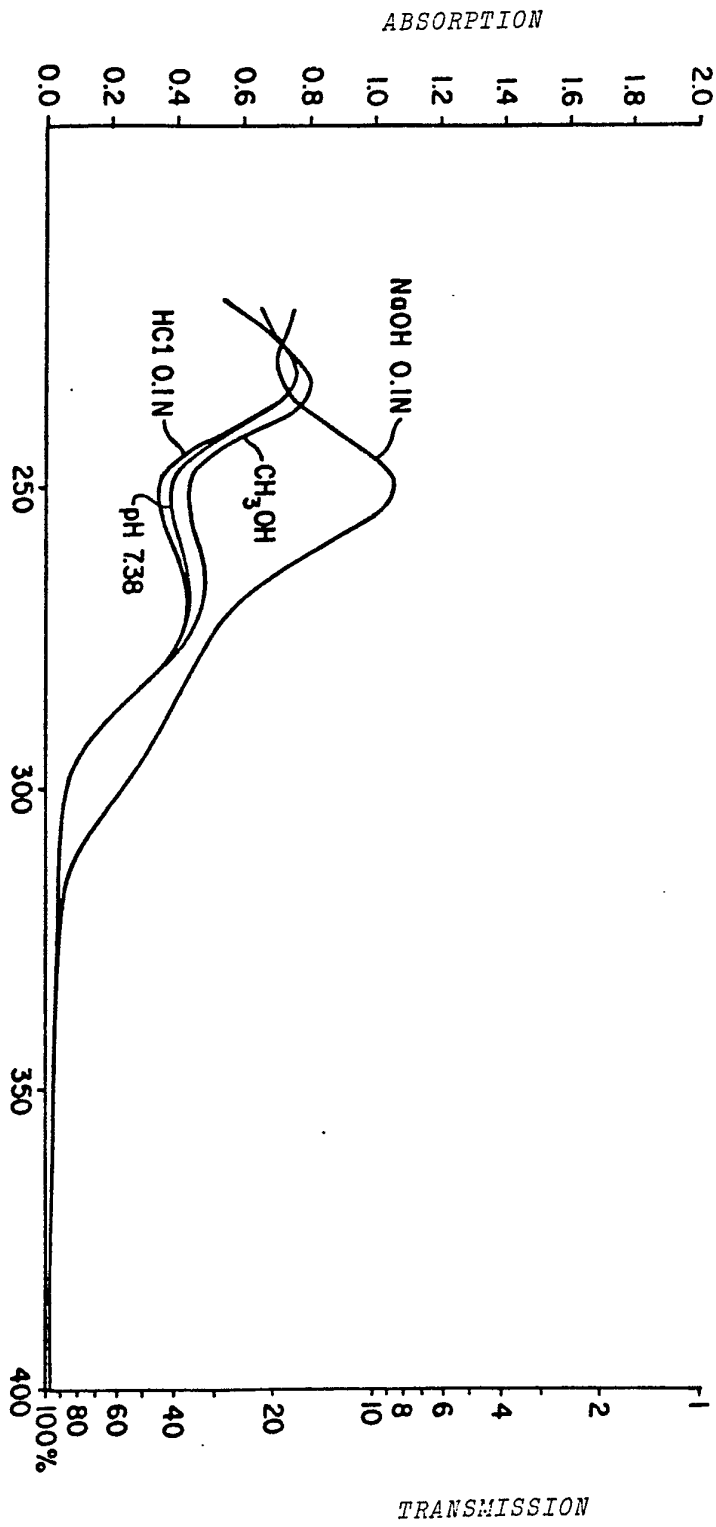


FIG. 2