



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 234 031 A5

4(51) C 12 P 17/18

## AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 P / 274 208 6  
 (31) 593160  
 593162  
 593152  
 593159

(22) 18.03.85  
 (32) 26.03.84  
 26.03.84  
 26.03.84  
 26.03.84

(44) 19.03.86  
 (33) US

(71) siehe (73)

(72) Lee, Taikwang M., TW; Borders, Donald B., US; Goodman, Joseph J., US; Testa, Raymond T., US; Maiese, William M., US; Labeda, David P., US; Kantor, Sidney, US; Kennett, Jr., Robert L., US; Carter, Guy T., US

(73) American Cyanamid Co., Stamford, Conn. 06904-0060/1937 West Main Street, US

(54) Verfahren zur Herstellung von neuen Antibiotika LL-D 42067 $\alpha$  und LL-D 42067 $\beta$

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von neuen Antibiotika LL-D 42067 $\alpha$  und LL-D 42067 $\beta$  (NRRL 15734), die zur Verhütung, Behandlung oder Bekämpfung von Protozoen-Infektionen bei Warmblütern geeignet sind. Bevorzugt sind sie zur Bekämpfung von Kokzidiose geeignet. Erfindungsgemäß geht man so vor, daß eine aerobe Fermentation des Organismus *Actinomadura*, Unterart *Simaoensis*, der die identifizierenden Merkmale von NRRL 15734 oder eines Mutanten davon erzeugenden Antibiotikums LL-D 42067 $\alpha$  oder LL-D 42067 $\beta$  hat, in einem sterilen flüssigen Nährsubstrat, das assimilierbare Quellen von Kohlenstoff, Stickstoff und anorganischen Anionen- und Kationssalzen enthält, vorgenommen wird, bis eine nennenswerte Menge von LL-D 42067 $\alpha$  oder LL-D 42067 $\beta$  im Nährsubstrat erzeugt ist, und anschließend das Antibiotikum daraus gewonnen wird.

## Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von neuen Antibiotika LL-D 42067 $\alpha$  und LL-D 42067 $\beta$ , **gekennzeichnet dadurch**, daß eine aerobe Fermentation des Organismus *Actinoadura madurae*, Unterart *Simaoensis*, der die identifizierenden Merkmale von NRRL 15734 oder eines Mutanten davon erzeugenden Antibiotikums LL-D 42067 $\alpha$  oder LL-D 42067 $\beta$  hat, in einem sterilen flüssigen Nährsubstrat, das assimilierbare Quellen von Kohlenstoff, Stickstoff und anorganischen Anionen- und Kationssalzen enthält, vorgenommen wird, bis eine nennenswerte Menge von LL-D 42067 $\alpha$  oder LL-D 42067 $\beta$  im Nährsubstrat erzeugt ist, und anschließend das Antibiotikum daraus gewonnen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Fermentationskultur 90 bis 200 Stunden lang unter steriler Belüftung und Bewegung bei einer Temperatur von 24 bis 32 °C und einem pH-Wert von 7,0 bis 8,6 gehalten wird, woraufhin die Maische geerntet und das Antibiotikum extrahiert wird.

Hierzu 9 Seiten Zeichnungen

## Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von neuen Antibiotika LL-D 42067 $\alpha$  und LL-D 42067 $\beta$ , die zur Verhütung, Behandlung oder Bekämpfung von Protozoen-Infektionen bei Warmblütern geeignet sind.

## Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die oben genannten Antibiotika sind neu. Sie dienen insbesondere zur Bekämpfung von Kokzidiose.

Kokzidiose ist eine der wichtigsten parasitischen Protozoen-Krankheiten, die der fleischverarbeitenden Industrie Probleme bereitet. Durch sie werden erheblich höhere Verluste in der Geflügelindustrie als durch andere Protozoenkrankheiten hervorgerufen, und sie ist ebenfalls die Ursache für beträchtliche wirtschaftliche Verluste unter den verschiedensten Farm-, Haus- und Wildtieren.

Diese Krankheit wird durch Protozoen-Parasiten hervorgerufen, welche die Wirtstiere infizieren und bei diesen zu Gewichtsverlusten führen sowie ihre Futteraufnahmeleistung verringern, so daß diese in vielen Fällen eingehen. Bei Geflügel sind diese Protozoen-Parasiten im allgemeinen von der Gattung *Eimeria*, sechs Arten, von denen nachgewiesen wurde, daß sie die primären Ursachen für diese Krankheit bei Geflügel sind. Diese sechs Arten sind: *Eimeria tenella*, *Eimeria natrix*, *Eimeria mivati*, *Eimeria maxima*, *Eimeria brunetti* und *Eimeria acervulia*.

Obwohl von der Kokzidiose seit vielen Jahren bekannt ist, daß sie eine der wichtigsten Krankheiten ist, die der fleischverarbeitenden Industrie Schwierigkeiten bereitet, so konnte doch bisher noch keine vollkommen zufriedenstellende Methode zur Bekämpfung dieser Krankheit zur Verfügung gestellt werden.

## Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein neuartiges Mittel zur Bekämpfung von Protozoen-Infektionen bei Warmblütlern, vor allem bei den fleischverarbeitenden Tieren wie Geflügel, Schweinen, Rindern, Kaninchen und Schafen, zur Verfügung zu stellen.

## Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung neuer, für den obigen Zweck geeigneter Antibiotika bereitzustellen.

Die neuen Antibiotika haben die Bezeichnung LL-D 42067 $\alpha$  und LL-D 42067 $\beta$  (NRRL 15734).

Erfindungsgemäß geht man so vor, daß eine aerobe Fermentation des Organismus *Actinomadura madurae*, Unterart *Simaoensis*, der die identifizierenden Merkmale von NRRL 15734 oder eines Mutanten davon erzeugenden Antibiotikums LL-D 42067 $\alpha$  oder LL-D 42067 $\beta$  hat, in einem sterilen flüssigen Nährsubstrat, das assimilierbare Quellen von Kohlenstoff, Stickstoff und anorganischen Anionen und Kationssalzen enthält, vorgenommen wird, bis eine nennenswerte Menge des Antibiotikums LL-D 42067 $\alpha$  oder LL-D 42067 $\beta$  im Nährsubstrat erzeugt ist, und anschließend das Antibiotikum daraus gewonnen wird.

Zweckmäßig wird die Fermentationskultur 90 bis 200 Stunden lang unter steriler Belüftung und Bewegung bei einer Temperatur von 24 bis 32 °C und einem pH-Wert von 7,0 bis 7,6 gehalten, woraufhin die Maische geerntet und das Antibiotikum extrahiert wird.

Das als LL-D 42067 $\alpha$ , NRRL 15734 bezeichnete Antibiotikum hat die Strukturformel I.

Das als LL-D 42067 $\beta$ , NRRL 15734 bezeichnete Antibiotikum hat die Strukturformel II.

In den beiliegenden Zeichnungen zeigen:

Fig. 1: Charakteristische Ultraviolett-Absorptionsspektren von der als LL-D 42067 $\alpha$ , NRRL 15734 bezeichneten Verbindung.

Fig. 2: Charakteristisches Infrarot-Absorptionsspektrum von der als LL-D 42067 $\alpha$ , NRRL 15734 bezeichneten Verbindung.

Fig. 3: Charakteristisches magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum von der als LL-D 42067 $\alpha$ , NRRL 15734 bezeichneten Verbindung in CDCl<sub>3</sub>-Lösung.

Fig. 4: Charakteristisches magnetisches Kohlenstoff-13-Kernresonanzspektrum von der als LL-D 42067 $\alpha$ , NRRL 15734 bezeichneten Verbindung in DMSO-Lösung.

Fig. 5: Charakteristische chemische Protonen-zu-Kohlenstoff-13 Umlagerungskorrelation von der als LL-D 42067 $\alpha$ , NRRL 15734 bezeichneten Verbindung. DMSO-Lösung.

Fig. 6: Charakteristische Ultraviolett-Absorptionsspektren von der als LL-D 42067 $\beta$ , NRRL 15734 bezeichneten Verbindung.

Fig. 7: Charakteristisches Infrarot-Absorptionsspektrum von der als LL-D 42067 $\beta$ , NRRL 15734 bezeichneten Verbindung.

Fig. 8: Charakteristisches magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum von der als LL-D 42067 $\beta$ , NRRL 15734 bezeichneten Verbindung in CHCl<sub>3</sub>-Lösung.

Fig. 9: Charakteristisches magnetisches Kohlenstoff-13-Kernresonanzspektrum von der als LL-D 42067 $\beta$ , NRRL 15734 bezeichneten Verbindung in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CDCl<sub>3</sub>-Lösung.

Es wurde entdeckt, daß die oben genannten Antibiotika besonders wirksam für die Bekämpfung von Kokzidiose sind, die durch *Eimeria*-Arten bei fleischliefernden Tieren, besonders bei Geflügel wie Hühnern, Truthühnern, Enten, Gänsen, Wachteln und Fasanen sowie bei Rindern, Schafen, Schweinen und Kaninchen hervorgerufen wurde.

Es wird auch behauptet, daß sich die erfindungsgemäßen Antibiotika enthaltenden Zusammensetzungen als wirksam für die Bekämpfung von Malaria, Toxoplasmose und Sarkosporidiose bei Warmblütlern erweisen werden, weil sie Verursacher dieser Krankheiten Protozoen-Infektionen sind und diese biologisch mit *Eimeria* verwandt sind.

In der Praxis dienen die neuen Antibiotika, also zur Verhütung, Bekämpfung oder Behandlung von Protozoen-Infektionen wie Kokzidiose bei Warmblütlern, und zwar in Form von Zusammensetzungen, die eine prophylaktisch, pharmazeutisch oder therapeutisch wirksame Menge der als LL-D 42067 $\alpha$  oder LL-D 42067 $\beta$ , NRRL 15734 bezeichneten antibiotischen Verbindung oder eines pharmazeutisch und pharmakologisch annehmbaren Salzes davon enthalten.

Obwohl die Verabreichung der Verbindung gegen Kokzidiose im allgemeinen am zweckmäßigsten in oder mit dem Futter oder in dem Trinkwasser erfolgt, kann die oben genannte Verbindung oder ein pharmazeutisch und pharmakologisch annehmbares Salz davon auch einzelnen Wirten in Form von Tabletten, Arzneitränken, Gelen, Kapseln oder dergleichen oder durch Injektion in Form einer Base, eines Gels, Pellets oder einer Lösung verabreicht werden. Diese zuletzt genannten Verabreichungsmethoden sind natürlich für die Behandlung großer Tiergruppen weniger praktisch, sind aber durchaus für die Anwendung bei kleineren Gruppen oder auf einer individuellen Basis geeignet.

Wenn das Antibiotikum, LL-D 42067 $\alpha$  oder LL-D 42067 $\beta$  zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung von Kokzidiose bei Geflügel angewandt wird, dann sind im allgemeinen etwa 0,1 ppm bis 10,0 ppm und vorzugsweise 0,5 ppm bis 3,0 ppm des Antibiotikums LL-D 42067 $\alpha$  oder LL-D 42067 $\beta$ , das dem Geflügel im Futter oder im Trinkwasser verabreicht wird, für die Verhütung, Bekämpfung oder Inhibition von Kokzidiose bei diesen Tieren wirksam.

Wie oben erwähnt, kann das Antibiotikum LL-D 42067 $\alpha$  oder LL-D 42067 $\beta$ , oder ein pharmazeutisch und pharmakologisch annehmbares Salz davon ebenfalls als prophylaktische, pharmazeutische oder therapeutische Behandlung zur Bekämpfung, Verhütung oder Inhibition von Protozoen-Infektionen bei anderen Warmblütlern wie Rindern, Schafen und Schweinen eingesetzt werden. Im allgemeinen reichen etwa 1,0 ppm bis 100 ppm, und vorzugsweise 5 ppm bis 50 ppm, des Antibiotikums zur Bekämpfung von Protozoen-Infektionen wie Kokzidiose bei diesen größeren Tieren aus.

Ein brauchbares, mit Arzneistoffen versetztes Geflügelfutter wird gewöhnlich durch gründliches Vermischen von etwa 0,0001 Ma.-% bis etwa 0,0005 Ma.-% des Antibiotikums LL-D 42067 $\alpha$  oder LL-D 42067 $\beta$  mit einem ernährungswissenschaftlich abgestimmten Geflügelfutter, wie zum Beispiel dem in den folgenden Beispielen genannten Kückenfutter, zubereitet.

Mit Arzneistoffen versetztes Rinder-, Schaf- oder Schweinefutter kann in der gleichen Weise, wie oben für das Geflügelfutter beschrieben wurde, zubereitet werden, nur werden dafür 0,0001 Ma.-% bis 0,01 Ma.-% des Antibiotikums mit dem Futter für Rinder, Schafe oder Schweine vermischt.

Bei der Verwendung der erfindungsgemäß hergestellten Verbindung für die Verhütung oder Bekämpfung von Kokzidiose wird der antiookzidiale Wirkstoff im allgemeinen zunächst als Tierfuttermischung zubereitet. Die Vormischung enthält im allgemeinen einen verhältnismäßig hohen Prozentanteil des Antiookzidialmittels und wird normalerweise mit dem Tierfutter unmittelbar vor der Verabreichung vermischt. Auf Wunsch kann die Futtermischung auch als Zusatz auf die tägliche Futterration der Tiere aufgestreut werden.

Für die praktische Anwendung brauchbare Futtermischungen oder -konzentrate können durch Vermischen von etwa 0,1 bis 5,0 Ma.-% des oben beschriebenen Antibiotikums, oder eines pharmazeutisch und pharmakologisch annehmbaren Salzes davon, mit etwa 99,9 bis 95 Ma.-% eines geeigneten Trägerstoffes oder Verdünnungsmittels hergestellt werden. Für die Verwendung als Ergänzung für die Futterzusatzzusammensetzungen geeignete Trägermittel umfassen folgende: Luzernemehl, Sojabohnenmehl, Baumwollsaamenölmehl, Leinsamenölmehl, Natriumchlorid, Calciumcarbonat, Calciumsulfat, Maismehl, Zuckerrohrmelasse, Harnstoff, Knochenmehl, Maiskolbenmehl, Reishülsenmehl und dergleichen. Das Trägermittel fördert eine im wesentlichen gleichmäßige Verteilung des Wirkstoffes in dem fertigen Futter, in das der Zusatz eingemischt wird. Es erfüllt somit eine wichtige Funktion, weil es die einwandfreie Verteilung des Wirkstoffes, z. B. etwa 0,1 ppm bis 100 ppm, im gesamten Futter gewährleistet. Diese Menge ist 0,00001 bis 0,01 Ma.-% Wirkstoffe im fertigen Futter äquivalent. In der Praxis werden normalerweise ein oder mehrere Pfund Vermischung je Tonne Futter zugegeben, um die verlangte Menge des Antibiotikums im fertigen Futter zu erreichen.

Wenn die Ergänzung oder die Vormischung als aufgestreuter Zusatz für das Futter verwendet wird, dann trägt sie gleichfalls zur gleichmäßigen Verteilung des Wirkstoffes auf der Oberseite des zubereiteten Futters bei.

Da die erfindungsgemäß hergestellten Verbindungen und ihre pharmazeutisch und pharmakologisch annehmbaren Salze in Wasser verhältnismäßig unlöslich sind, empfiehlt es sich bei der Verabreichung der Verbindungen im Trinkwasser der Tiere im allgemeinen, die aktiven Verbindungen in einem organischen Lösungsmittel wie Methanol, Ethanol, Aceton, DMSO, Ölsäure, Linolsäure, Propylenglycol oder dergleichen aufzulösen und mit der Lösung eine kleine Menge eines oberflächenaktiven Mittels und/oder Dispergiermittels zu vermischen, um das Auflösen und/oder Dispergieren des Wirkstoffes in dem Trinkwasser der Tiere sicherzustellen.

Wenn die Behandlung einer geringen Anzahl von größeren fleischliefernden Tieren zur Bekämpfung einer Protozoen-Infektion erforderlich ist, empfiehlt es sich, das Antibiotikum LL-D 42067 $\alpha$  oder LL-D 42067 $\beta$  oder ein pharmazeutisch oder pharmakologisch annehmbares Salz davon täglich dem Wirtstier oral in Form eines mit Arzneistoffen versehenen (medizinischen) Gels zu verabreichen.

Das medizinische Gel kann durch Vermischen einer medizinischen Geliermittelpase mit einer wäßrigen Pufferphase unter reduziertem Druck von 25 bis 50 mm Hg bei Umgebungstemperatur von 20°C bis 60°C hergestellt werden. Das Geliermittel wird so hergestellt, daß in bezug auf die fertige Formulierung etwa 0,004 bis etwa 4,5 Ma.-% des Antibiotikums LL-D 42067 $\alpha$  oder LL-D 42067 $\beta$  oder eines pharmazeutisch oder pharmakologisch annehmbaren Salzes davon in 14 bis 31 Ma.-% Propylenglycol, in bezug auf die fertige Formulierung, und etwa 15 bis 50 Ma.-% des Geliermittels bei 60 bis 80°C gelöst oder dispergiert werden. Alternativ kann die Geliermittelpase auch vollkommen bei Umgebungstemperatur wie anschließend beschrieben hergestellt werden.

Die Geliermittelpase kann auch so hergestellt werden, daß 0,004 Ma.-% bis etwa 4,5 Ma.-% des Antibiotikums LL-D 42067 $\alpha$  oder LL-D 42067 $\beta$  oder eines pharmazeutisch oder pharmakologisch annehmbaren Salzes davon mit 15 bis 50 Ma.-% Geliermittel, und vorzugsweise 15 bis 34 Ma.-%, der Formulierung in 14 bis 30 Ma.-% Propylenglycol 15 Minuten bis eine Stunde lang unter einem reduzierten Druck von 25 bis 50 mm Hg bei Raumtemperatur aufgeschlämmt werden. Bei dem gewählten Geliermittel handelt es sich um ein nichtionisches oberflächenaktives Mittel mit der Struktur  $\alpha$

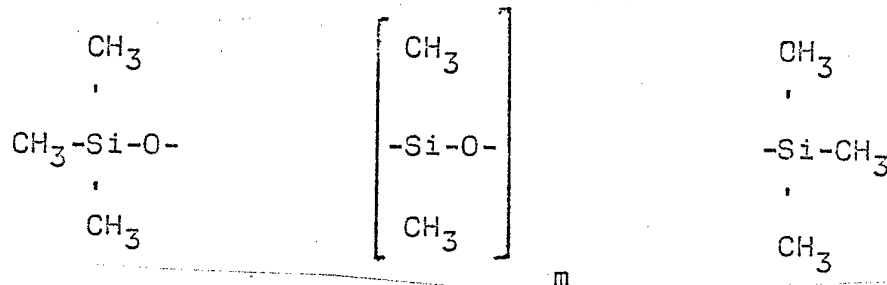
-Hydro- $\Omega$ -hydroxy-poly(oxyethylen)-poly(oxypropylen)-poly(oxyethylen)-Blockcopolymer, mit einer mittleren relativen Molekülmasse von 12500, einem Schmelzpunkt von 56°C, einer Brookfield-Viskosität von 3100 bei 77°C, einer Oberflächenspannung bei einer 0,1%igen wäßrigen Lösung von 40,6 Dyna/cm (gemessen mit einem du Nouy-Tensiometer).

Eine wäßrige Pufferlösung kann dann durch Lösen von 1,5 Ma.-% Zitronensäure und 1,0 Ma.-% Trinatriumcitrat in etwa 3 Ma.-% bis etwa 25 Ma.-%, und vorzugsweise 6 bis 12 Ma.-%, der fertigen Formulierung in entionisiertem oder destilliertem Wasser, das in Mengen von etwa 15 Ma.-% bis etwa 50 Ma.-% und vorzugsweise von 35 bis 45 Ma.-% der Formulierung verwendet wird, hergestellt

werden. Diese gepufferte Lösung sorgt für einen pH-Wertbereich, in dem eine langfristige chemische Beständigkeit der Bestandteile der Gelformulierung erzielt wird, z. B. pH-Wert 3 bis 3,5.

Wahlweise Bestandteile, die in die oben erläuterte Lösung in diesem Stadium eingebaut werden können, sind:

- Benzylalkohol, der in Mengen von etwa 0,5 Ma.-% bis etwa 1,5 Ma.-%, und vorzugsweise von 1,5 Ma.-%, der Formulierung als antimikrobielles Konservierungsmittel zugesetzt wird.
- Der gelbe Farbstoff C.I. Acid Yellow Nr. 23; („Tartrazine“; F.D. und C Gelb Nr. 5; 4,5-Dihydro-5-oxo-1-(4-sulfophenyl)-4-[(sulfophenyl)azo]-1H-pyrazol-3-carbonsäuretratriumsalz), verwendet als Färbemittel in Mengen von etwa 0,01 Ma.-% bis etwa 0,03 Ma.-% und vorzugsweise 0,01 Ma.-% der Formulierung;
- Ein Antischaummittel, das aus einem Gemisch von Dimethylpolysiloxanen der Formel:



und Silicagel besteht, worin der berechnete Mittelwert von  $m$  200 bis 350 beträgt und es sich bei dem Gemisch um eine wasserhelle, viskose, öltartige Flüssigkeit handelt;  $d = 0,965 - 0,970$ ;  $n_D^{25}$  etwa 1,404; Viskosität etwa 60000 Centistoke, verwendet in Mengen von etwa 0,001 bis 0,02 Ma.-% und vorzugsweise 0,02 Ma.-% der Formulierung.

Das medizinische Gel wird so hergestellt, daß einfach entweder die oben genannten Geliermittelphasen und die wäßrige Lösung eine halbe bis zwei Stunden lang unter einem reduzierten Druck von 10 bis 100 mm Hg, und vorzugsweise von 25 bis 50 mm Hg, bei Umgebungstemperatur von 20°C bis 60°C vermischt werden, ohne daß zusätzliches Erhitzen oder Kühlen erforderlich ist. Durch diese Verfahrensweise entsteht ein luftfreies Gel, das für die Verabreichung genauer Volumendosis Mengen von Antikokzidium geeignet ist. Wenn eine sorgfältige Kontrolle der Volumendosierung der zu verabreichenden Wirkstoffe nicht erforderlich ist, und wenn das Vorhandensein von Luft in dem Gel in der fertigen Formulierung akzeptabel ist, kann die Herstellung bei einem Druck bis zu und einschließlich Luftdruck vorgenommen werden.

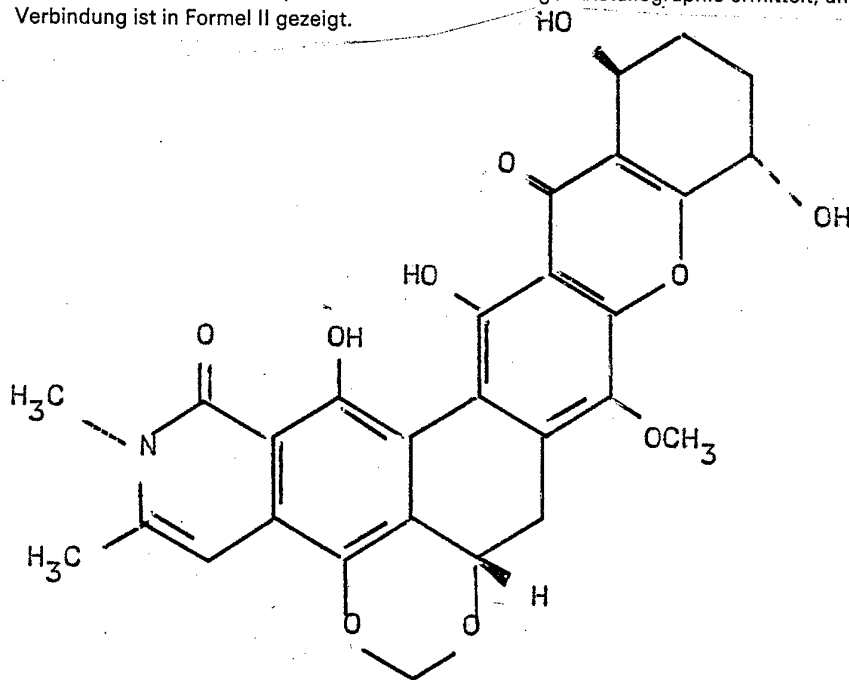
Mit Hilfe des obigen Verfahrens kann ein typisches erfindungsgemäßes Gel durch Lösen von 4,5 g des Antibiotikums LL-D 42067 $\alpha$  (oder 4,5 g des Antibiotikums LL-D 42067 $\beta$ ), 1,5 g Zitronensäuremonohydrat, 1,0 g Natriumcitratdihydrat, 1,5 g Benzylalkohol und 0,01 g des gelben Farbstoffes C.I. Acid Yellow Nr. 23 in 42 g Wasser hergestellt werden. Als nächstes wird eine Lösung von 28 g des obigen Geliermittels in 21,99 g Propylenglykol durch Vermischen bei 60°C zubereitet. Dann werden die Lösungen unter einem Druck von 25 bis 50 mm Hg miteinander vermischt, bis bei 20°C bis 60°C ohne zusätzliches Erwärmen oder Kühlen ein homogenes Gemisch gewonnen wird. Der Gelatinierungstemperaturbereich des gebildeten Gels liegt zwischen -15°C und -18°C, die Viskosität des Gels beträgt  $0,51 \times 10^{-6}$  und das Wasser:Gelierzmittel-Verhältnis 1,5:1,0.

Wenn 6,3 Gramm dieses medizinischen Gels täglich einem jungen 90,8-kg-Mastochsen oral verabreicht werden, erhält der Ochse annähernd 3 mg/kg Körpergewicht/Tag des gegen Protozoen wirksamen Antibiotikums LL-D 42067 $\alpha$  oder des Antibiotikums LL-D 42067 $\beta$ .

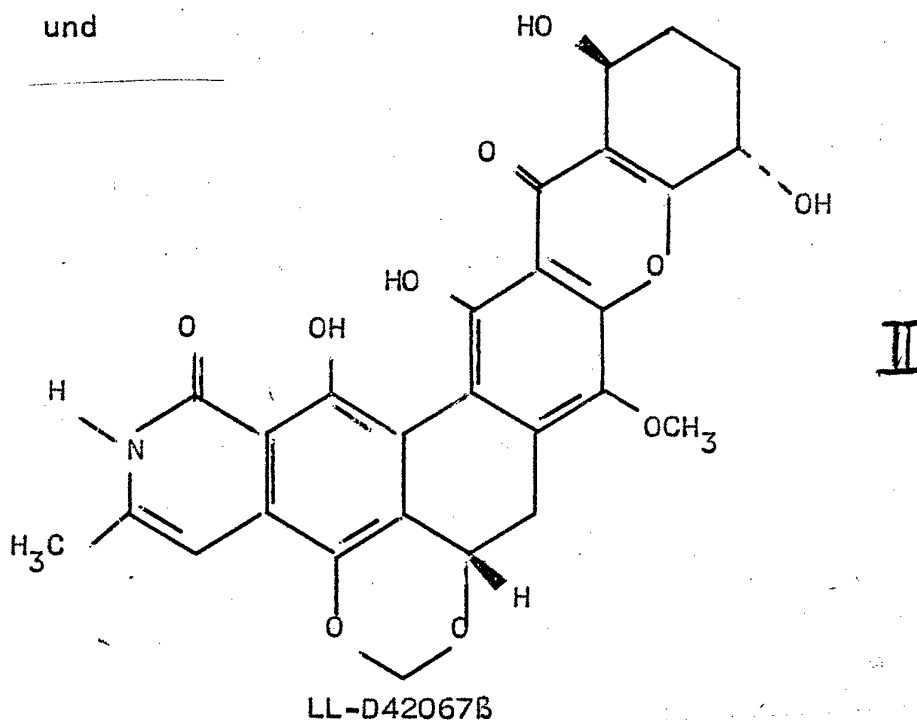
In der Praxis reichen im allgemeinen etwa 0,03 mg/kg/Tag bis etwa 3,0 mg/kg/Tag zur Bekämpfung von Protozoen-Infektionen bei Rindern, Schafen und Schweinen. Bei kleineren Haustieren werden Mengen von nur 0,003 mg/kg Körpergewicht pro Tag angewendet.

Die Struktur von LL-D 42067 $\alpha$  wurde mit Hilfe der Röntgenkristallographie ermittelt, und die relative Stereochemie dieser Verbindung ist aus Formel I ersichtlich.

Die Struktur von LL-D 42067 $\beta$  wurde mit Hilfe der Röntgenkristallographie ermittelt, und die relative Stereochemie dieser Verbindung ist in Formel II gezeigt.



und



Die physikalisch-chemischen Merkmale von LL-D 42067 $\alpha$  werden im folgenden beschrieben:

- 1) Relative Molekülmasse: 535 (FAB-MS);
- 2) Molekülformel:  $C_{28}H_{25}NO_{10}$ ;
- 3) Spezifische optische Drehung:  $[\alpha]_D^{26} = +836 \pm 40^\circ$  (C 0,3, DMF);
- 4) Ultraviolett-Absorptionsspektren: wie in Fig. I dargestellt

UV<sup>CH<sub>3</sub>OH</sup> = 215 nm ( $\epsilon$  13 200)  
 MAX 254 nm ( $\epsilon$  15 000)  
 320 nm ( $\epsilon$  5 100)  
 395 nm ( $\epsilon$  11 400)

UV<sup>0,1N HCl</sup> = 213 nm ( $\epsilon$  27 100)  
 MAX 253 nm ( $\epsilon$  34 500)  
 321 nm ( $\epsilon$  12 200)  
 374 nm ( $\epsilon$  21 100)  
 389 nm ( $\epsilon$  22 900)

UV<sup>0,1N NaOH</sup> = 217 nm ( $\epsilon$  42 100)  
 MAX 253 nm ( $\epsilon$  13 900)  
 312 nm ( $\epsilon$  5 700)  
 395 nm ( $\epsilon$  10 700)

- 5) Infrarotabsorptionsspektrum: wie in Fig. II dargestellt (KBr Scheibe): 1650, 1598, 1543, 1470, 1440, 1260, 1195, 1020  $cm^{-1}$ ;
- 6) Magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum ( $CDCl_3$ ): wie in Fig. III dargestellt und in Tabelle I beschrieben;
- 7) Magnetisches Kohlenstoff-13-Kernresonanzspektrum (DMSO): wie in Fig. IV dargestellt und in Tabelle II beschrieben, und
- 8) Chemische Protonen-zu-Kohlenstoff-13-Umlagerungskorrelationskarte (DMSO): wie in Fig. V dargestellt.

Die physikalisch-chemischen Merkmale von LL-D 42067 $\beta$  werden anschließend beschrieben:

- 1) Relative Molekülmasse: 521 (FAB-MS);
- 2) Molekülformel:  $C_{27}H_{23}NO_{10}$ ;
- 3) Spezifische optische Drehung:  $[\alpha]_D^{26} = +77 \pm 10^\circ$  (C 0,165, DMF);
- 4) Ultraviolett-Absorptionsspektren: wie in Fig. VI dargestellt:

UV<sup>CH<sub>3</sub>OH</sup> = 212 nm ( $\epsilon$  28 200)  
 MAX 253 nm ( $\epsilon$  33 200)  
 318 nm ( $\epsilon$  13 200)  
 378 nm ( $\epsilon$  19 700)  
 393 nm ( $\epsilon$  21 700)

UV<sup>0,1N HCl</sup> = 211 nm ( $\epsilon$  13 900)  
 MAX 253 nm ( $\epsilon$  18 200)  
 318 nm ( $\epsilon$  7 140)  
 372 nm ( $\epsilon$  9 950)  
 388 nm ( $\epsilon$  10 500)

UV<sup>0,1 NaOH</sup> = 216 nm ( $\epsilon$  31 200)  
 MAX 251 nm ( $\epsilon$  11 700)

- 5) Infrarotabsorptionsspektrum: wie in Fig. VII dargestellt (KBr Scheiben): 3400, 1646, 1620, 1545, 1463, 1252, 1195, 1020  $cm^{-1}$ ;
- 6) Magnetisches Protonen-Kernresonanzspektrum ( $CDCl_3$ ): wie in Fig. VIII dargestellt und in Tabelle III beschrieben;
- 7) Magnetisches Kohlenstoff-13-Kernresonanzspektrum ( $CD_3OD/CDCl_3$ ): wie in Fig. IX dargestellt und in Tabelle IV beschrieben.

Tabelle 1

Protonen-NMR-Daten von LL-D42067 $\alpha$ 

| $\delta^*$ | Anzahl Wasserstoff** | Multiplizität*** | J (Hz)      |
|------------|----------------------|------------------|-------------|
| 1,88       | 2                    | m                |             |
| 2,34       | 2                    | m                |             |
| 2,45       | 3                    | s                |             |
| 2,58       | 1                    | m                |             |
| 3,62       | 3                    | s                |             |
| 3,72       | 1                    | d,d              | 4,64, 14,22 |
| 3,88       | 3                    | s                |             |
| 4,80       | 2                    | m                |             |
| 5,08       | 1                    | m                |             |
| 5,32       | 1                    | d                | 5,81        |
| 5,55       | 1                    | d                | 5,81        |
| 6,70       | 1                    | s                |             |
| 12,76      | 1                    | s                |             |
| 13,58      | 1                    | s                |             |

\*  $\text{CDCl}_3$ , ppm unterhalb von TMS\*\* Spektrum in  $\text{DMSO}-d_6$  zeigt zwei zusätzliche Absorptionen bei 4,55 (s) und 5,91 (d) ppm

\*\*\* s = Singulett; d = Dublett; t = Triplett; m = Multiplett

Tabelle II

Kohlenstoff-13-NMR-Daten von LL-D42067 $\alpha$ 

| Kohlenstoff | Chemische Umlagerung (PPm)* | Kohlenstoffart |
|-------------|-----------------------------|----------------|
| 1           | 20,4                        | $\text{CH}_3$  |
| 2           | 25,4                        | $\text{CH}_2$  |
| 3           | 25,8                        | $\text{CH}_2$  |
| 4           | 29,0                        | $\text{CH}_2$  |
| 5           | 40,4                        | $\text{CH}_3$  |
| 6           | 58,5                        | CH             |
| 7           | 61,6                        | $\text{CH}_3$  |
| 8           | 63,3                        | CH             |
| 9           | 71,7                        | CH             |
| 10          | 90,4                        | $\text{CH}_2$  |
| 11          | 100,0                       | CH             |
| 12          | 109,2                       | q**            |
| 13          | 109,7                       | q              |
| 14          | 111,0                       | q              |
| 15          | 113,7                       | q              |
| 16          | 119,0                       | q              |
| 17          | 125,8                       | q              |
| 18          | 126,6                       | q              |
| 19          | 134,9                       | q              |
| 20          | 135,3                       | q              |
| 21          | 136,1                       | q              |
| 22          | 141,3                       | q              |
| 23          | 147,9                       | q              |
| 24          | 151,1                       | q              |
| 25          | 152,5                       | q              |
| 26          | 165,4                       | q              |
| 27          | 165,6                       | q              |
| 28          | 182,3                       | q              |

\*  $\text{DMSO}-d_6$ , ppm unterhalb von TMS

\*\* q = quaternär

Tabelle III

Protonen-NMR-Daten von LL-D42067 $\beta$ 

| $\delta^*$ | Anzahl Wasserstoff | Multiplizität** | J (Hz)    |
|------------|--------------------|-----------------|-----------|
| 1,88       | 2                  | m               |           |
| 2,30       | 2                  | m               |           |
| 2,38       | 3                  | s               |           |
| 2,57       | 2                  | m               |           |
| 3,69       | 1                  | d,d             | 4,5, 14,3 |
| 3,87       | 3                  | s               |           |
| 4,79       | 1                  | m               |           |
| 4,81       | 1                  | d,d             | 4,5, 12,7 |
| 5,06       | 1                  | m               |           |
| 5,32       | 1                  | d               | 5,8       |
| 5,53       | 1                  | d               | 5,8       |
| 6,54       | 1                  | s               |           |
| 10,1       | 1                  | s               |           |
| 12,8       | 1                  | s               |           |
| 12,9       | 1                  | s               |           |

\*  $\text{CDCl}_3$ , ppm unterhalb von TMS

\*\* s = Singulett; d = Dublett, m = Multipllett

Tabelle IV

Kohlenstoff-13-NMR-Daten von LL-D42067 $\beta$ 

Kohlenstoff      Chemische Umlagerung (ppm)\*

|    |       |
|----|-------|
| 1  | 19,1  |
| 2  | 25,9  |
| 3  | 26,9  |
| 4  | 29,7  |
| 5  | 62,0  |
| 6  | 62,2  |
| 7  | 65,0  |
| 8  | 72,8  |
| 9  | 91,1  |
| 10 | 100,1 |
| 11 | 110,5 |
| 12 | 110,6 |
| 13 | 111,7 |
| 14 | 114,7 |
| 15 | 119,2 |
| 16 | 127,2 |
| 17 | 128,8 |
| 18 | 136,1 |
| 19 | 136,3 |
| 20 | 137,0 |
| 21 | 138,1 |
| 22 | 148,9 |
| 23 | 151,9 |
| 24 | 153,0 |
| 25 | 165,3 |
| 26 | 167,2 |
| 27 | 183,6 |

\*  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ , ppm unterhalb von TMS

Die als LL-D42067 $\alpha$  und LL-D42067 $\beta$  bezeichneten erfindungsgemäßen gegen Protozoen wirksamen Verbindungen werden während der unter gesteuerten Bedingungen vorgenommenen Züchtung eines neuen Stammes einer neuen Unterart von *Actinomadura madurae* gebildet. Die neuen Stämme werden in einer Kultursammlung der Medical Research Division, American Cyanamid Company, Pearl River, New York, als Kultur Nummer LL-D42067 $\alpha$  und LL-D42067 $\beta$  aufbewahrt. Lebensfähige Kulturen dieser neuen Mikroorganismen wurden im Patent Culture Collection Laboratory, Northern Regional Research Center, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois 61604, hinterlegt und in die dortige Dauersammlung eingereiht. Sie stehen der Öffentlichkeit in dieser Hinterlegungsstelle unter der Zugangsnummer NRRL 15734 frei zur Verfügung.

Kulturen LL-D42067 $\alpha$  und LL-D42067 $\beta$  wurden aus einer Bodenprobe von San Simao, Brasilien, isoliert. Die Kulturen wurden taxonomisch klassifiziert und als neue Unterart von *Actinomadura madurae* identifiziert und als *Actinomadura madurae* Unterart *Simaoensis* bezeichnet.

In Übereinstimmung mit den Methoden, die von Shirling und Gottlieb (Intern. J. System. Bacteriol., 16:313–340 [1966]) und Gordon, u. a., (Intern. J. System. Bacteriol., 24:54–63 [1974]) ausführlich dargelegt wurden, wurden Beobachtungen über die züchterischen, physiologischen und morphologischen Merkmale der Kultur angestellt. Die chemische Zusammensetzung der Zellwände der Kulturen wurde mit Hilfe des Verfahrens von Lechevalier, u. a., (Adv. Appl. Microbiol., 14:47–72 [1971]) bestimmt. Einzelheiten sind in den Tabellen V bis VII enthalten, und eine allgemeine Beschreibung der Kulturen folgt unten. Die unterstrichenen beschreibenden

Farben wurden von Kelly und Judd (Nat. Bur. Stand. Spec. Publ., 440 [1976]) und den begleitenden Centroid-Farbkarten vom Intersociety Color Council, National Bureau of Standards entnommen.

#### Züchtungsmerkmale

In Tabelle V werden die Züchtungscharakteristika der Kulturen LL-D42067 auf verschiedenen Agar-Nährsubstraten beschrieben, die unter den vom International Streptomyces Project Committee (anschließend als „ISP“ bezeichnet) empfohlenen ausgewählt wurden.

#### Mikromorphologie

Die mikroskopische Untersuchung des Stammes ergab, daß er kurze Ketten von Konidien auf Lufthyphen bildet, die leicht hakenförmig zu kurzen Spiralen (bis zu drei Windungen) gebogen sind. Bei Beobachtungen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie erwiesen sich die Sporenoberflächen als glatt, wodurch sich dieses Isolat von *A. verrucosopora* unterscheidet.

#### Zellwandzusammensetzung

Analysen der ganzen Zellen ergaben, daß der Stamm meso-Diaminopimelinsäure (DAP) und den Zucker 3-Q-Methyl-A221D-galactose (Madurose) enthält; damit gehört er zum Gesamtzellmuster Typ B. Die Zellwandzusammensetzung war vom Typ III (meso DAP, Glutaminsäure, Alain, Muraminsäure und Glucoseamin) und das Phospholipidmuster vom Typ PIV (Phosphatidylethanolamin und/oder Methylethanolamin plus unbekannte glucoseamin-enthaltende Phospholipide). Durch diese Angaben wird die Zuordnung des Stammes zur Gattung *Actinomadura* bestätigt. Der PIV-Phospholipid-Typ ist für *A. madurae* nicht typisch, das normalerweise PI ist.

#### Physiologische Reaktionen

Die physiologischen Reaktionen der Stämme LL-D42067 $\alpha$  und LL-D42067 $\beta$  wurden unter Anwendung des ISP-Systems, Shirling und Gottlieb (Intern. J. Syst. Bacteriol., 16:313–340 [1966]) und des Gordon-Tests, Gordon, u. a. (Intern. J. Syst. Bacteriol., 24:54–63 [1974]) untersucht. Das Verwertungsmuster des Stammes auf ISP-Kohlehydrat-Nährsubstraten wird in Tabelle VI zusammen mit denen anderer Mitglieder der Gattung, die ähnlich reagieren, wiedergegeben. Kultur LL-D42067 ähnelt den *Actinomadura madurae* und *Actinomadura verrucosopora* Gruppen. Wie oben erläutert wurde, unterscheidet sie sich jedoch von *Actinomadura verrucosopora* durch glatte Sporenwände. Ein Vergleich der Reaktionen von *Actinomadura madurae* (Angaben von Gordon; siehe obigen Literaturhinweis) und LL-D42067 bei der Gordon-Test-Reihe, die in Tabelle VII zusammengefaßt sind, ergab nur Unterschiede in der Amylaseproduktion und Säure von Glycerol und Raffinose. Da festgestellt wurde, daß die Amylaseproduktion und die Raffinoseverwertung in *Actinomadura madurae* variabel sind (Goodfellow, N., u. a., J. Gen. Microbiol., 112:95–111 [1969]), bleibt die Glycerolreaktion der einzige physiologische Unterschied von LL-D42067 von diesem Taxon.

Da der Stamm LL-D42067 in allen seinen beurteilten Eigenschaften, bis auf seine Glycerolreaktionen und sein PIV-Phospholipidmuster, der gleiche wie *Actinomadura madurae* ist, wurde er als Unterart dem Taxon *Actinomadura madurae* zugeordnet und als *Actinomadura madurae* Unterart *Simaoensis* bezeichnet.

Tabelle V

Züchtungscharakteristika von LL-D42067 *Actinomadura madurae* Unterart *Simaoensis* auf morphologischen ISP-Nährsubstraten

| Agarmedium                       | Luftmyzel             | Vegetativel Myzel          | Lösliches Pigment |
|----------------------------------|-----------------------|----------------------------|-------------------|
| Hefeextrakt, Malzextrakt (ISP 2) | weiß, spärlich        | Mittel-orange-braun – 153* | keins             |
| Anorganische Salze (ISP 4)       | farblos               | farblos                    | keins             |
| Glucose-Asparagin (ISP 5)        | farblos               | farblos                    | keins             |
| Hafermehl (ISP 3)                | spärlich<br>rosa-weiß | Hell-orange-braun – 152*   | keins             |

\* I = ISCC-Farbkarten

Tabelle VI

Vergleich der Kohlenhydratverwertungsreaktionen von LL-D42067 mit verwandten *Actinomadura* spp.

| Kohlehydrat | LL-D42067 | <i>A. madurae</i> | <i>A. verrucosopora</i> |     |
|-------------|-----------|-------------------|-------------------------|-----|
|             |           | (a)               | (a)                     | (b) |
| L-Arabinose | +         | +                 | +                       |     |
| D-Fructose  | +         | +                 | +                       |     |
| D-Inositol  | –         | variabel          | variabel                |     |
| D-Mannitol  | +         | +                 | +                       |     |
| Raffinose   | –         | –                 | –                       |     |
| Rhamnose    | +         | +                 | +                       |     |
| Sucrose     | +         | +                 | +                       |     |
| D-Xylose    | +         | +                 | +                       |     |

(a) Goodfellow, M., u. a., J. Gen. Microbiol., 112:95–111 (1979)

(b) Nonomura, H., und O'Hara, Y., J. Ferm. Technol., 49:904–912 (1971)

**Tabelle VII**  
**Gordon-Test-Reaktionen von LL-D42067**

|                             | LL-D42067 | A. madurae<br>(Gordon-Werte*) |
|-----------------------------|-----------|-------------------------------|
| <b>Abbau/Umwandlung von</b> |           |                               |
| Casein                      | +         | +(98)                         |
| Xanthin                     | -         | -                             |
| Hypoxanthin                 | +         | +(98)                         |
| Tyrosin                     | +         | +(91)                         |
| Adenin                      | -         | -                             |
| <b>Erzeugung von</b>        |           |                               |
| Amylase                     | -         | +                             |
| Gelatinase                  | +         | +                             |
| Phosphatase                 | -         | ND                            |
| Nitrat-Reductase            | +         | +(98)                         |
| Urease                      | -         | -                             |
| Esculinase                  | +         | +(98)                         |
| <b>Züchtung auf/in</b>      |           |                               |
| 5%igem Natriumchlorid       | -         | ND                            |
| Salicylat                   | -         | ND                            |
| Lysozym-Kulturlösung        | -         | -(91)                         |
| <b>Verwertung</b>           |           |                               |
| Acetat                      | +         | +                             |
| Benzoat                     | -         | -(94)                         |
| Citrat                      | -         | +(83)                         |
| Lactat                      | +         | ND                            |
| Malat                       | +         | +(84)                         |
| Mucat                       | -         | -                             |
| Oxalat                      | -         | ND                            |
| Propionat                   | -         | ND                            |
| Pyruvat                     | +         | ND                            |
| Succinat                    | +         | +(83)                         |
| Tartrat                     | -         | -                             |
| <b>Züchtung bei</b>         |           |                               |
| 10°C                        | -         | -                             |
| 45°C                        | +         | -(66)                         |
| 53°C                        | -         | -                             |
| <b>Säure von</b>            |           |                               |
| Adonitol                    | +         | +(91)                         |
| Arabinose                   | +         | +                             |
| Cellobiose                  | +         | +                             |
| Dextrin                     | +         | ND                            |
| Dulcitol                    | -         | -                             |
| Erythritol                  | -         | -                             |
| Fructose                    | +         | ND                            |
| Galactose                   | +         | +(84)                         |
| Glucose                     | +         | +                             |
| Glycerol                    | -         | +                             |
| Inositol                    | -         | +(60)                         |
| Lactose                     | -         | +(55)                         |
| Maltose                     | -         | +(53)                         |
| Mannitol                    | +         | +                             |
| Mannose                     | +         | +(94)                         |
| Melibiose                   | -         | -                             |
| $\alpha$ -Methyl-D-glucosid | -         | -                             |
| Raffinose                   | variabel  | -                             |
| Rhamnose                    | +         | +                             |
| Salicin                     | +         | ND                            |
| Sorbitol                    | -         | -                             |
| Sucrose                     | + ND      | -                             |
| Trehalose                   | +         | +(96)                         |
| Xylose                      | +         | +                             |
| $\beta$ -Methyl-D-xylosid   | +         | ND                            |

\* Prozentangaben von Reaktion aufweisenden Kulturen in Klammern, wenn nicht 100 %  
 ND = nicht bestimmt

Für die Herstellung dieses neuartigen antibakteriellen und antiparasitischen Mittels ist die Erfindung nicht auf diesen speziellen Organismus oder auf Organismen beschränkt, die den obigen Züchtungs- und mikroskopischen Merkmalen vollkommen entsprechen, die nur zur Erläuterung angeführt werden. Tatsächlich ist erwünscht und beabsichtigt, die Verwendung natürlich vorkommender Mutanten dieses Organismus sowie induzierte Mutanten, die von diesem Organismus durch verschiedene mutationsauslösende, dem Fachmann bekannte Mittel, wie Stickstoffsengas-Einwirkung, Röntgenbestrahlung, Ultraviolettbestrahlung, N'-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin, Actinophagen und dergleichen erzeugt werden, mit einzubeziehen. Gleichfalls ist es erwünscht und beabsichtigt, intra- und intraspezifische genetische Rekombinanten, die durch dem Fachmann bekannte genetische Techniken wie beispielsweise Konjugation, Transduktion und genetische Manipulationstechniken erzeugt werden, mit einzubeziehen.

Das antimikrobielle in vitro Spektrum von LL-D42067 $\beta$  wurde mit Hilfe der Agarplatten-Verdünnungsmethode mit Mueller-Hinton-Agar und einem Inokulum jedes Testorganismus von annähernd  $10^4$  koloniebildenden Einheiten, die durch das Steers, Replikationsgerät geliefert wurden, bestimmt. Die geringste inhibierende Konzentration (MIC) in mcg/ml wurde als die niedrigste Konzentration von LL-D42067 $\beta$  definiert, die das sichtbare Wachstum nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden bei 35°C inhibierte.

Die in Tabelle VIII zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß LL-D42067 $\beta$  gegen grampositive Bakterien aktiv und mäßig aktiv gegen Hefearten war.

**Tabelle VIII**

**Antimikrobielles Spektrum von LL-D42067 $\beta$**

| Testorganismus                     |              | MIC (mcg/ml) |
|------------------------------------|--------------|--------------|
| <i>Candida albicans</i>            | CA 300       | 512          |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>    | Y 15         | 512          |
| <i>Mycobacterium smegmatis</i>     | ATCC 607     | 512          |
| <i>Bacillus subtilis</i>           | ATCC 6633    | 4            |
| <i>Bacillus cereus</i>             | LL Nr. 4     | $\leq 0,06$  |
| <i>Enterococcus</i>                | OSU 75-1     | 1            |
| <i>Enterococcus</i>                | SM 77-15     | 2            |
| <i>Streptococcus faecalis</i>      | ATCC 29212   | 1            |
| <i>Streptococcus mutans</i>        | ATCC 27352-1 | 0,25         |
| <i>Streptococcus mutans</i>        | BHI (b)      | 0,25         |
| <i>Streptococcus sanguis</i>       | G9B (a)      | 0,5          |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>  | CMC 83-56    | 0,5          |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>  | ATCC 12228   | 0,25         |
| <i>Staphylococcus aureus</i>       | Smith        | 0,5          |
| <i>Staphylococcus aureus</i>       | LL Nr. 14    | 0,5          |
| <i>Staphylococcus aureus</i>       | LL Nr. 27    | $\leq 0,06$  |
| <i>Staphylococcus aureus</i>       | LL Nr. 45    | 0,12         |
| <i>Staphylococcus aureus</i>       | ATCC 25923   | 0,25         |
| <i>Micrococcus luteus</i>          | PC 1001      | $\leq 0,06$  |
| <i>Escherichia coli</i>            | Nr. 311      | 512          |
| <i>Escherichia coli</i>            | ATCC 25922   | 512          |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | STFD 79-17   | 512          |

Das Antibiotikum LL-D42067 $\beta$  ist aufgrund seiner antibakteriellen und antiparasitischen Aktivitäten von Nutzen. Das Antibiotikum kann zum Beispiel für die Vernichtung von bakterieller Darmflora, als örtliches antibakterielles Mittel oder Antiseptikum gegen grampositive Bakterien und als allgemeines Desinfektionsmittel für Oberflächen wie Instrumente verwendet werden. Es kann auch als Antiprotozoen-Mittel bei der Behandlung von Malaria mit Erfolg angewandt werden. Neben seiner antimikrobiellen und antiparasitischen Wirksamkeit ist LL-D42067 $\beta$  auch als Antikokzidiose-Mittel bei Geflügel wirksam.

Bei therapeutischer Anwendung kann die erfindungsgemäße Verbindung in Form einer herkömmlichen pharmazeutischen, für den vorgesehenen Zweck geeigneten Zusammensetzung verabreicht werden. Derartige Zusammensetzungen können für die orale oder örtliche Verabreichung geeignet formuliert werden. Der Wirkstoff kann vermischt mit einem nichttoxischen pharmazeutisch annehmbaren Trägermittel kombiniert sein, wobei der Trägerstoff die verschiedensten Formen je nach der für die vorgesehene Verabreichung, z. B. oral oder örtlich, festgelegten Herstellungsart aufweisen kann.

**Allgemeine Fermentationsbedingungen**

Die Züchtung von *Actinomadura madurae* Unterart *Simaoensis* NRRL 15734 kann in einer breiten Palette von flüssigen Kultur Nährsubstraten vorgenommen werden. Für die Erzeugung dieses neuartigen Antibiotikums LL-D42067 $\alpha$  brauchbare Nährsubstrate enthalten eine assimilierbare Kohlenstoffquelle wie Dextrin, Sucrose, Melasse, Glycerol usw.; eine assimilierbare Stickstoffquelle wie Protein, Proteinhydrolysat, Polypeptide, Aminosäuren, Maisquellwasser, usw.; und anorganische Anionen und Kationen wie Kalium, Natrium, Ammonium, Calcium, Sulfat, Carbonat, Phosphat, Chlorid usw. Spurenelemente wie Bor, Molybdän, Kupfer usw. werden als Verunreinigungen von anderen Bestandteilen des Nährsubstrats zugeführt. Die Belüftung in Tanks und Flaschen erfolgt dadurch, daß sterile Luft durch oder auf die Oberfläche des Fermentationsmediums geblasen wird. Zur weiteren Bewegung in den Tanks dienen mechanische Schnellrührer. Bei Bedarf kann ein Antischaummittel wie Siliconöl zugesetzt werden.

**Allgemeine Verfahrensweise für die Isolierung von LL-D42067 $\alpha$  und LL-D42067 $\beta$**

Das Antibiotikum LL-D42067 $\alpha$  wird aus der Fermentationsbrühe durch Filtration durch Diatomeenerde gewonnen, in ein Lösungsmittel wie Methylenchlorid extrahiert und durch Säulenchromatographie auf Silicagel gereinigt, wobei das System Hexan:Ethylacetat (80:20) zur Entfernung unerwünschter Fette und anschließend Methylenchlorid:1%ige Essigsäure in Methanol (9:1) zur Gewinnung eines Rohproduktes verwendet werden.

Dieses rohe LL-D42067 $\alpha$  wird dann mit Hilfe von Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie auf einer Umkehrphasensäule unter Verwendung des Systems Acetonitril:Wasser:Essigsäure (60:40:0,1) gereinigt.

Das Antibiotikum LL-D42067 $\beta$  wird aus der Vollerntemaische durch Filtration durch ein Mittel wie Diatomeenerde, Extraktion in ein Lösungsmittel wie Ethylacetat, Einengung zu einem Sirup, Aufteilung zwischen Heptan und Methanol und Einengung der Methanphase zu einem Rückstand gewonnen. Dieser Rückstand wird mit Hexan trituriert, dann zu einem Rückstand eingeeengt, der in einem Gemisch von gleichen Teilen Acetonitril und Wasser gelöst und dann eingedampft wird, um ein Präzipitat zu erhalten. Dieses Präzipitat wird durch präparative Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) unter Verwendung des Systems Acetonitril:Wasser:Essigsäure (3000:6000:5) gereinigt. Die aktiven Fraktionen werden zusammen genommen, zu einer wäßrigen Suspension eingedampft und mit Ethylacetat extrahiert, das zur Gewinnung von reinem LL-D42067 $\beta$  verdampft wird.

#### Ausführungsbeispiele:

##### Beispiel 1

##### Herstellung von Inokulum

Es wurde ein typisches Nährsubstrat für die Zeichnung des primären Inokulums nach folgender Formel hergestellt:

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| Glucose                 | 1,0 % |
| Dextrin                 | 2,0 % |
| Hefeextrakt             | 0,5 % |
| N-Z Amin <sup>®1)</sup> | 0,5 % |
| Calciumcarbonat         | 0,1 % |
| Wasser qs               | 100 % |

<sup>1)</sup> Ein Pankreas-Digest von Casein, eingetragenes Warenzeichen von Sheffield Chemical, Norwich, New York

Dieses Nährsubstrat wurde auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt und anschließend sterilisiert. Eine 100-ml-Portion dieses sterilen Nährsubstrates wurde in einem 500-ml-Kolben mit Myzelstückchen von einer Agar-Schräggkultur von *Actinomyces madurae* Unterart *Simaoensis* NRRL 15734 geimpft. Das Nährsubstrat wurde danach auf eine Drehschüttelmaschine gestellt und 48 bis 72 Stunden lang bei 28°C mit 210 U/min kräftig geschüttelt. Dieses primäre Inokulum wurde zum Impfen von 12 Litern des gleichen sterilen Nährsubstrates verwendet, das anschließend 48 Stunden lang bei 28°C zur Gewinnung des sekundären Inokulums gezüchtet wurde.

##### Beispiel 2

##### Fermentation

Es wurde ein Fermentationsmedium folgender Formulierung hergestellt:

|                 |       |
|-----------------|-------|
| Sucrose         | 3,0 % |
| Sojabohnenmehl  | 1,5 % |
| Maisquellwasser | 0,5 % |
| Calciumcarbonat | 0,5 % |
| Wasser qs       | 100 % |

Das Fermentationsmedium wurde sterilisiert und mit dem sekundären Inokulum von Beispiel 1 in einer Menge von 12 Litern je 300 Liter Fermentationsmedium geimpft. Die Fermentation wurde bei 28°C mit einem sterilen Luftstrom von 200 Litern je Liter Maische je Minute und Belüftung durch einen mit 230 U/min betriebenen Schnellrührer 135 bis 159 Stunden lang vorgenommen, worauf die Maische geerntet und durch Diatomeenerde filtriert wurde.

##### Beispiel 3

##### Isolierung von LL-D42067 $\alpha$

Die Fermentationsfiltrate von drei nach der Beschreibung in Beispiel 2 durchgeführten Fermentationen wurden zusammen genommen, so daß eine Gesamtmenge von 1800 Litern mit einem pH-Wert von 7,5 gewonnen wurde, und wurden mit 900 Litern Methylchlorid extrahiert. Die organische Phase wurde unter Vakuum eingeeengt und ergab 84,1 g Rückstand. Eine 75,2-g-Portion dieses Rückstandes wurde in 300 ml Hexan:Ethylacetat (80:20) suspendiert und konnte in eine mit Silicagel-Trockenfüllung versehene Glassäule (2 Zoll  $\times$  20 Zoll) einsickern. Die Säule wurde mit insgesamt 4 Litern des gleichen Lösungsmittelgemischs eluiert, um Fette und Siliconöl zu entfernen, und wurde anschließend mit 4 Litern Methylchlorid:1%ige Essigsäure in Methanol (9:1) eluiert, wobei 15-ml-Fraktionen gesammelt wurden. Die Fraktionen wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie analysiert. Das Antibiotikum LL-D42067 $\alpha$  wurde als gelber Fleck ( $R_f = 0,5$ ) bei dem gleichen Lösungsmittelsystem sichtbar. Die Fraktionen 31 bis 60, die am meisten von dem Antibiotikum enthielten, wurden vereinigt und unter Vakuum eingeeengt und ergaben 11,1 g eines roten Rückstandes.

Eine 5,5-g-Portion des obigen Rückstandes wurde durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie fraktioniert (Prep LC System-500, Prep PAK-500/C18 Patrone, Acetonitril:Wasser:Essigsäure (600:400:0,28), 100 ml/Minute, 5,5 g/30 ml Injektion). Es wurden dreißig 200-ml-Fraktionen gesammelt. Die analytische Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographieanalyse der Fraktionen ergab, daß der größte Teil von LL-D42067 $\alpha$  in Fraktion 5 vorhanden war. Fraktion 5 wurde über Nacht stehengelassen. Die entstandenen gelben Kristalle wurden durch Abdekantieren der Mutterlauge (die aufgehoben wurde) gesammelt, und durch Waschen der Kristalle mit der mobilen Phase und Lufttrocknung wurden 11 mg LL-D42067 $\alpha$  in Form von gelben Kristallen gewonnen.

Die Mutterlauge wurde durch langsame Eindampfung konzentriert. Das resultierende Präzipitat wurde durch Zentrifugieren gesammelt und ergab 377 mg LL-D42067 $\alpha$  in Form eines amorphen gelben Feststoffes.

Die analytischen HPLC-Bedingungen waren wie folgt:

|                                            |                                                              |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Säule:                                     | $\mu$ Bondapak C18, 3,9 mm $\times$ 30 cm, Waters Associates |
| Mobile Phase:                              | Acetonitril:Wasser:Essigsäure (400:600:0,28)                 |
| Detektor:                                  | UV 254 nm und UV 365 nm, 0,2 AUFS                            |
| Strömungsgeschwindigkeit:                  | 1,0 ml/Minute                                                |
| Retentionsvolumen von LL-D42067 $\alpha$ : | 11,5 ml.                                                     |

#### Beispiel 4

##### Herstellung des Inokulums

Ein typisches Nährsubstrat für die Züchtung der verschiedenen Stufen von Inokulum wurde nach folgender Formel hergestellt:

|                 |       |
|-----------------|-------|
| Dextrose        | 1,0 % |
| Dextrin         | 2,0 % |
| Hefeextrakt     | 0,5 % |
| NZ Amin A®      | 0,5 % |
| Calciumcarbonat | 0,1 % |
| Wasser qs       | 100 % |

NZ Amin A® (Ein Pankreas-Digest von Casein; eingetragenes Warenzeichen von Sheffield Chemical, Norwich, New York). Dieses Nährsubstrat wurde sterilisiert. Eine 100-ml-Portion dieses sterilen Nährsubstrates wurde in einem Kolben mit Myzelstückchen von einer Agar-Schräggkultur von *Actinomyces madurae* Unterart *Simaoensis* NRRL 15734 geimpft. Das Nährsubstrat wurde anschließend auf einer Drehschüttelmaschine 48 bis 72 Stunden lang bei 28°C kräftig bewegt, wodurch das primäre Inokulum gewonnen wurde. Dieses primäre Inokulum wurde dann zum Impfen von 10 Litern des obigen sterilen Nährsubstrats verwendet, das anschließend 48 Stunden lang bei 28°C gezüchtet wurde und das sekundäre Inokulum ergab. Dieses sekundäre Inokulum wurde danach zur Impfung von 250 Litern des obigen, in einem Behälter befindlichen sterilen Nährsubstrates verwendet, das 48 Stunden lang bei 28°C mit einem Strom steriler Luft von 200 Litern pro Minute zur Gewinnung des tertiären Inokulums gezüchtet wurde.

#### Beispiel 5

##### Fermentation

Es wurde eine Fermentationslösung folgender Formulierung hergestellt:

|                 |       |
|-----------------|-------|
| Sucrose         | 3,0 % |
| Sojabohnenmehl  | 1,5 % |
| Maisquellwasser | 0,5 % |
| Calciumcarbonat | 0,5 % |
| Wasser qs       | 100 % |

Dieses Substrat wurde sterilisiert und anschließend mit 125 Litern tertiärem Inokulum, das nach der Beschreibung in Beispiel 1 hergestellt wurde, je 3000 Liter der obigen sterilen Fermentationslösung geimpft. Die Fermentation wurde bei 28°C mit einem sterilen Luftstrom von 6,6 Litern je Liter Maische und Bewegen durch einen mit 110 U/min betriebenen Schnellrührer und Zugabe eines Silicon-Antischaummittels 137 Stunden lang vorgenommen, worauf die Maische geerntet wurde.

#### Beispiel 6

##### Isolierung von LL-D42067β

Eine Gesamtmenge von 4500 Litern geernteter Maische, die aus zwei im wesentlichen nach der Beschreibung in Beispiel 2 vorgenommenen Fermentationen stammte, wurde mit 1 % ihres Volumens Diatomeenerde zusammengebracht, eine Stunde lang vermischt, und anschließend wurde der pH-Wert mit konzentrierter Chlorwasserstoffsäure auf  $3,0 \pm 0,3$  eingestellt. Ethylacetat wurde in einer dem halben Maischevolumen entsprechenden Menge zugesetzt, und dieses Gemisch wurde 3 Stunden lang gerührt. Diatomeenerde wurde in einer 5 % des Maischevolumens entsprechenden Menge zugegeben, und das Gemisch wurde filtriert. Die Ethylacetatphase des Filtrates wurde abgetrennt, mit 5%igem wässrigem Natriumhydrogencarbonat gewaschen und anschließend zu einem Sirup konzentriert. Dieses Material wurde auf Heptan:Methanol (2:1) aufgeteilt. Die 4,5 Liter Methanolphase wurde zu einem Rückstand eingeeengt, der mit Hexan trituriert wurde. Das Hexan wurde dekantiert und der Rückstand bis zur Trockne eingeeengt. Dieses Material wurde mit Hilfe der präparativen Umkehrphasen-HPCL unter folgenden Bedingungen gereinigt: (Mit 300 g auf Silica basierendem Octadecyl-(C)-gebundenem Phasenfüllmaterial (Abmessungen 5,7 cm x 30 cm), eingetragenes Warenzeichen von Wiley Associates, Inc., Milford, Mass.)

|                           |                                                     |
|---------------------------|-----------------------------------------------------|
| Säule:                    | Eine einzige PrepPak® – 500/C <sub>18</sub> Patrone |
| Mobile Phase 1:           | Acetonitril:Wasser:Essigsäure (8 000:12 000:10)     |
| 2:                        | Acetonitril:Wasser:Essigsäure (3 000:6 000:5)       |
| Strömungsgeschwindigkeit: | 50 ml/Minute                                        |
| Fraktionierung:           | 200 ml/Fraktion                                     |
| Probenbelastung:          | 2 bis 3 g je 30 ml Injektion                        |

Bei Verwendung der mobilen Phase 1 wurde LL-D42067β in den Fraktionen 7 bis 10 gefunden. Diese Fraktionen wurden zusammengekommen und unter Vakuum zur Entfernung der Hauptmasse von Acetonitril eingedampft. Die resultierende wässrige Suspension wurde mit einem gleichen Volumen Ethylacetat behandelt. Die Ethylacetatphase wurde abgetrennt und nacheinander mit gleichen Volumen von 5%igem wässrigem Natriumhydrogencarbonat, 0,10 N Chlorwasserstoffsäure und zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und zu einem Feststoff eingedampft. Dieser Feststoff wurde erneut unter Verwendung der mobilen Phase 2 chromatographiert. In dieser mobilen Phase war LL-D42067β in den Fraktionen 15 bis 21 vorhanden, die zusammengekommen und wie oben beschrieben behandelt wurden und reines LL-D42067β in Form eines gelben Feststoffes ergaben.

#### Beispiel 7

##### Beurteilung von Testverbindungen als Antikokzidiosemittel

Die Brauchbarkeit der Antibiotika LL-D42067α und LL-D42067β als Antikokzidiosemittel bei Kücken wird durch die folgenden Versuche demonstriert.

Das bei dem Versuch verabreichte Geflügelfutter war wie folgt:

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| Vitamin-Aminosäure-Vormischung        | 0,5 %   |
| Spurenminerale                        | 0,1 %   |
| Natriumchlorid                        | 0,3 %   |
| Calciumhydrogenphosphat               | 1,2 %   |
| Gemahlener Kalk                       | 0,5 %   |
| Stabilisiertes Fett                   | 4,0 %   |
| Dehydratisierte Luzerne, 17 % Protein | 2,0 %   |
| Maisglutenmehl, 41 % Protein          | 5,0 %   |
| Menhaden-Fischmehl, 60 % Protein      | 5,0 %   |
| Sojabohnenölmehl, 44 % Protein        | 30,0 %  |
| Gemahlener Gelbmais, fein bis         | 100,0 % |

Die Vitamin-Aminosäure-Vormischung in der obigen Futterzusammensetzung wird nach folgender Formulierung hergestellt. Die Mengenangaben beziehen sich auf Einheiten je Kilogramm der fertigen Futterzusammensetzung.

|                               |                  |
|-------------------------------|------------------|
| Butyliertes Hydroxytoluen     | 125,0 mg         |
| d1-Methionin                  | 500,0 mg         |
| Vitamin A                     | 3 300,0 I. U.    |
| Vitamin D <sub>3</sub>        | 1 100,0 I. C. U. |
| Riboflavin                    | 4,4 mg           |
| Vitamin E                     | 2,2 I. U.        |
| Niacin                        | 27,5 mg          |
| Pantothenensäure              | 8,8 mg           |
| Cholinchlorid                 | 500,0 mg         |
| Folsäure                      | 1,43 mg          |
| Menadionnatriumhydrogensulfat | 1,1 mg           |
| Vitamin B <sub>12</sub>       | 11,0 mcg         |
| Gemahlener Gelbmais, fein bis | 5,0 g            |

Ein gemischtes Inokulum von 5000 sporulierten Oozysten von *Eimeria acervulina* und eine ausreichende Anzahl von Oozysten von *Eimeria tenella*, um eine Sterblichkeit von 60 % bis 75 % bei unbehandelten Kontrolltieren hervorzurufen, wurde Eintags-Küken durch direkte Impfung in den Kropf aller Küken verabreicht. Die Küken erhielten während der gesamten Versuchsdauer freien Zugang zu Futter und Wasser. Zwei Tage vor der Impfung erhielten die verschiedenen Kückengruppen medizinisches Futter, das verschiedene Anteile des Präparates enthielt. Sieben Tage nach der Impfung wurden die Versuche abgebrochen und die Küken wurden gewogen, sezirt und ihre Darmkanäle auf krankhafte Veränderungen hin untersucht. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle enthalten. Diese Ergebnisse zeigen, daß eine bessere Überlebenschance infizierter Küken erzielt wird, wenn 0,2 ppm bis 5,0 ppm des Antibiotikums den infizierten Küken mit ihrem Futter verabreicht werden. Diese Werte zeigen ebenfalls eine beträchtliche Verringerung der auf *E. tenella* und *E. acervulina* zurückzuführenden krankhaften Veränderungen.

**Tabelle 9**

**Beurteilung des Antibiotikums LL-D42067 $\alpha$  als Antikokzidiosemittel bei Küken**

| Verbindung                               | Konzentration<br>im Futter, ppm | Anzahl der Küken<br>zu Beginn | Prozent<br>Überlebende | Prozent Küken<br>mit verringerten Läsionen |                      |
|------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------|--------------------------------------------|----------------------|
|                                          |                                 |                               |                        | <i>E. tenella</i>                          | <i>E. acervulina</i> |
| LL-D42046 $\alpha$                       | 5,0                             | 5                             | 60                     | 100                                        | 100                  |
| LL-D42067 $\alpha$                       | 2,5                             | 5                             | 100                    | 100                                        | 100                  |
| LL-D42067 $\alpha$                       | 1,25                            | 5                             | 100                    | 80                                         | 80                   |
| LL-D42067 $\alpha$                       | 0,75                            | 5                             | 100                    | 40                                         | 60                   |
| LL-D42067 $\alpha$                       | 0,4                             | 5                             | 100                    | 0                                          | 0                    |
| LL-D42067 $\alpha$                       | 0,2                             | 5                             | 80                     | 0                                          | 0                    |
| Infizierte unbehandelte<br>Kontrolltiere | 0,0                             | 20                            | 25                     | 0                                          | 0                    |
| LL-D42067 $\alpha$                       | 1,0                             | 4                             | 100                    | 100                                        | 100                  |
| LL-D42067 $\alpha$                       | 0,75                            | 5                             | 100                    | 100                                        | 100                  |
| LL-D42067 $\alpha$                       | 0,50                            | 5                             | 100                    | 100                                        | 100                  |
| LL-D42067 $\alpha$                       | 0,25                            | 5                             | 80                     | 20                                         | 60                   |
| Infizierte unbehandelte<br>Kontrolltiere | 0,0                             | 20                            | 40                     | 0                                          | 0                    |

Tabelle 10

Beurteilung des Antibiotikums LL-D42067 $\beta$  als Antikokzidiosemittel bei Kücken

| Verbindung                            | Konzentration<br>im Futter, ppm | Anzahl der Kücken<br>zu Beginn | Prozent<br>Überlebende | Prozent Kücken<br>mit verringerten Läsionen<br>E. tenella |
|---------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------------|
| LL-D42046 $\beta$                     | 5,0                             | 5                              | 80                     | 100                                                       |
| LL-D42067 $\beta$                     | 2,5                             | 5                              | 100                    | 100                                                       |
| LL-D42067 $\beta$                     | 1,00                            | 5                              | 80                     | 80                                                        |
| LL-D42067 $\beta$                     | 0,75                            | 5                              | 60                     | 40                                                        |
| LL-D42067 $\beta$                     | 0,5                             | 5                              | 40                     | 0                                                         |
| Infizierte unbehandelte Kontrolltiere | 0,0                             | 20                             | 35                     | 0                                                         |

## Beispiel 8

## Beurteilung von Testverbindungen als Antikokzidiosemittel bei Kücken

Der Wert des Antibiotikums LL-D42067 $\alpha$  wird anhand seiner antikokzidialen Wirksamkeit gegen eine Reihe von Kokzidiaarten, die Krankheiten bei Kücken hervorrufen, durch den folgenden Versuch demonstriert.

Das Achtzigfache der empfohlenen Konzentration eines handelsüblichen Antikokzidiose-Impfstoffes, der gemischte Arten von *Eimeria* enthielt, wurde durch direkte Einimpfung in den Kropf aller Kücken verabreicht. Zum Zeitpunkt der Impfung hatten die Kücken ein Alter von 10 Tagen. Zwei Tage vor der Impfung wurde den verschiedenen Kückengruppen medizinisches Futter mit verschiedenen Anteilen des Präparates verabreicht. Sechs Tage nach der Impfung wurde der Versuch abgebrochen, und der Darmkanal der Kücken wurde auf krankhafte Veränderungen hin untersucht. Je nach dem Vorhandensein oder dem Fehlen von krankhaften Veränderungen und deren Schwere wurde jedes Kücken mit von 0 bis 4 je Tier reichenden Punkten bewertet, multipliziert mit der Anzahl der Tiere je Gruppe. Die prozentuale Verringerung von krankhaften Veränderungen wurde wie folgt berechnet:

$$100 - \frac{\text{Behandlungsbewertung (zusammengefaßt)}}{\text{Kontrollbewertung (zusammengefaßt)}} \times 100$$

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle XI aufgeführt. Diese Ergebnisse zeigen, daß auf fünf Arten von *Eimeria* zurückzuführende krankhafte Veränderungen bei Kücken verhindert oder erheblich vermindert werden können, wenn eine Menge von nur 0,2 ppm des Präparates dem Futter zugesetzt wird.

Tabelle 11

Beurteilung des Antibiotikums LL-D42067 $\alpha$  bei der Bekämpfung von Kokzidiose bei Kücken

| Verbindung                                  | Menge im<br>Futter, ppm | Anzahl der Kücken<br>zu Beginn | Prozentuale Verringerung von Läsionen |                 |                |                |              |
|---------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|-----------------|----------------|----------------|--------------|
|                                             |                         |                                | E.<br>tenella                         | E.<br>acervulia | E.<br>brunetti | E.<br>necatrix | E.<br>maxima |
| LL-D42067                                   | 1,25                    | 15                             | 100                                   | 95              | 100            | 100            | 100          |
| LL-D42067                                   | 1,0                     | 15                             | 100                                   | 91              | 100            | 100            | 100          |
| LL-D42067                                   | 0,75                    | 15                             | 74                                    | 86              | 100            | 100            | 100          |
| LL-D42067                                   | 0,40                    | 15                             | 52                                    | 62              | 89             | 100            | 72           |
| LL-D42067                                   | 0,20                    | 15                             | 31                                    | 24              | 65             | 82             | 0            |
| Infizierte<br>unbehandelte<br>Kontrolltiere | 0,0                     | 15                             | 7,7*                                  | 14*             | 9,3*           | 1,7*           | 11,7*        |

\* Durchschnittliche Läsionseinstufung je Gruppe der Kontrollkücken.

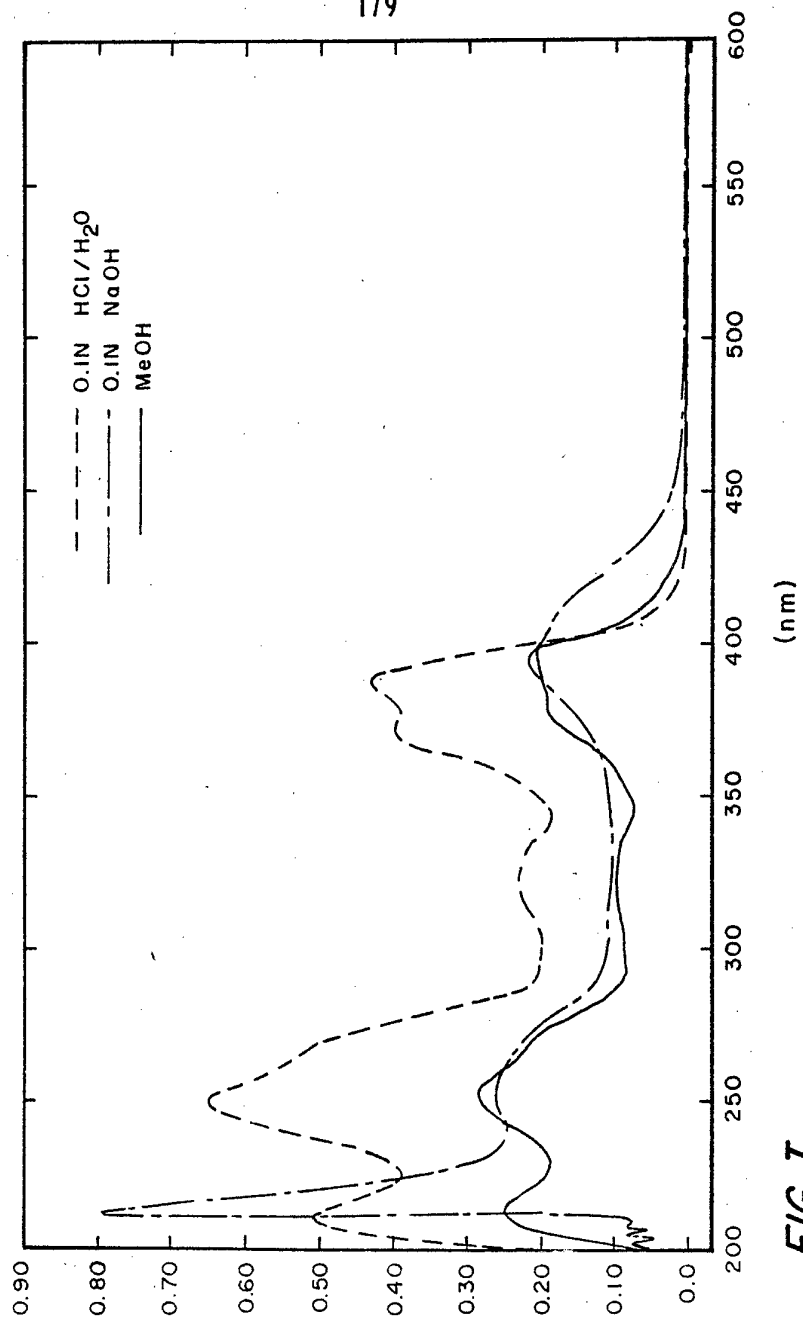


FIG. I

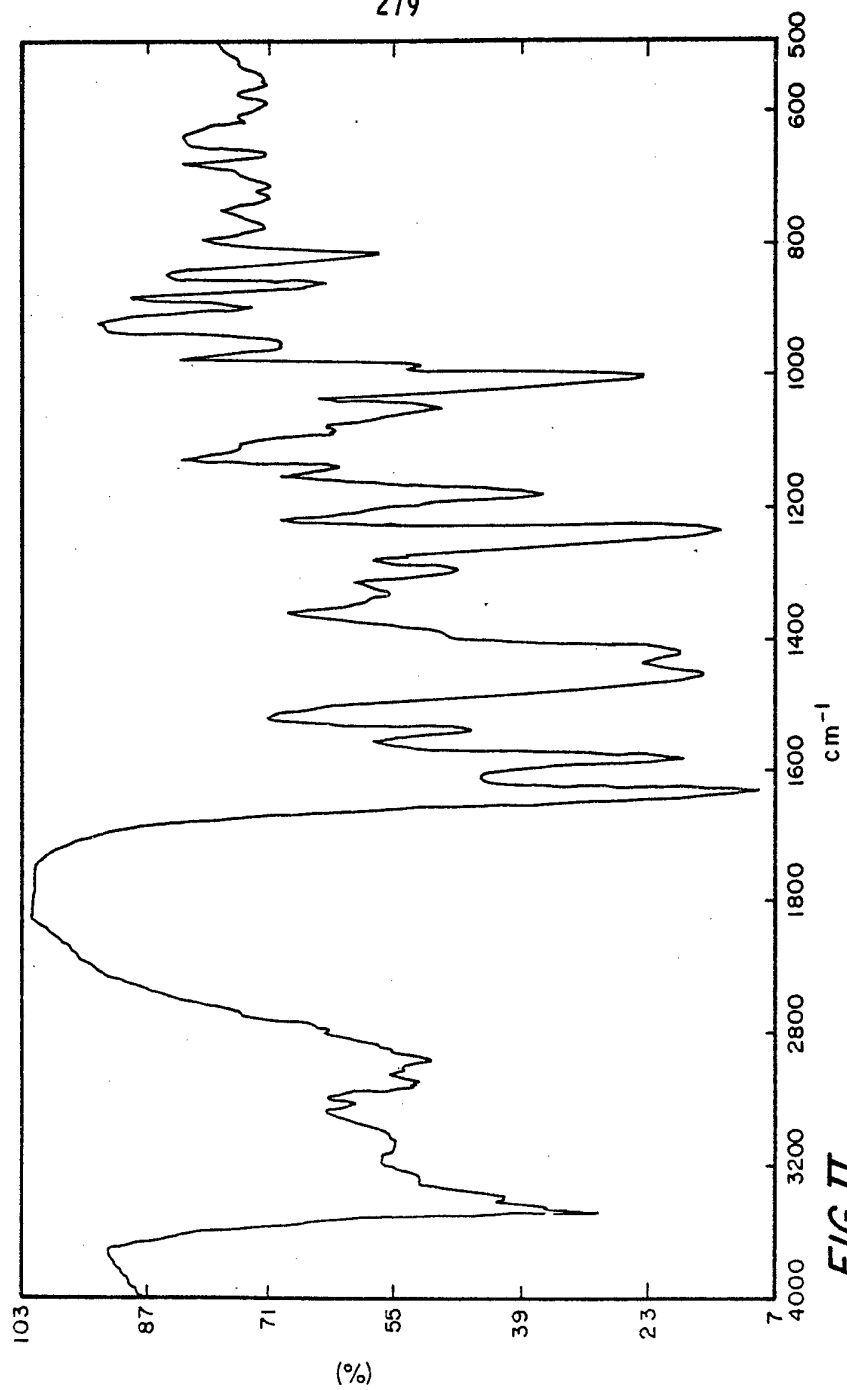
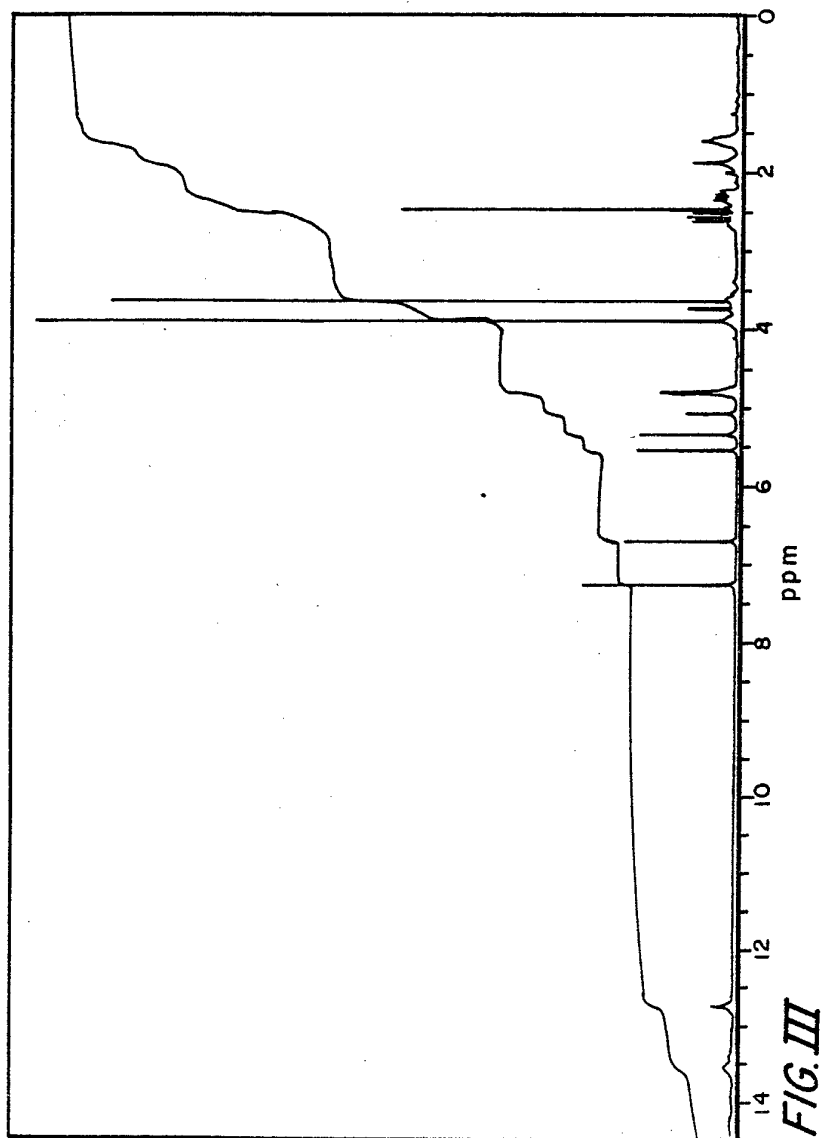


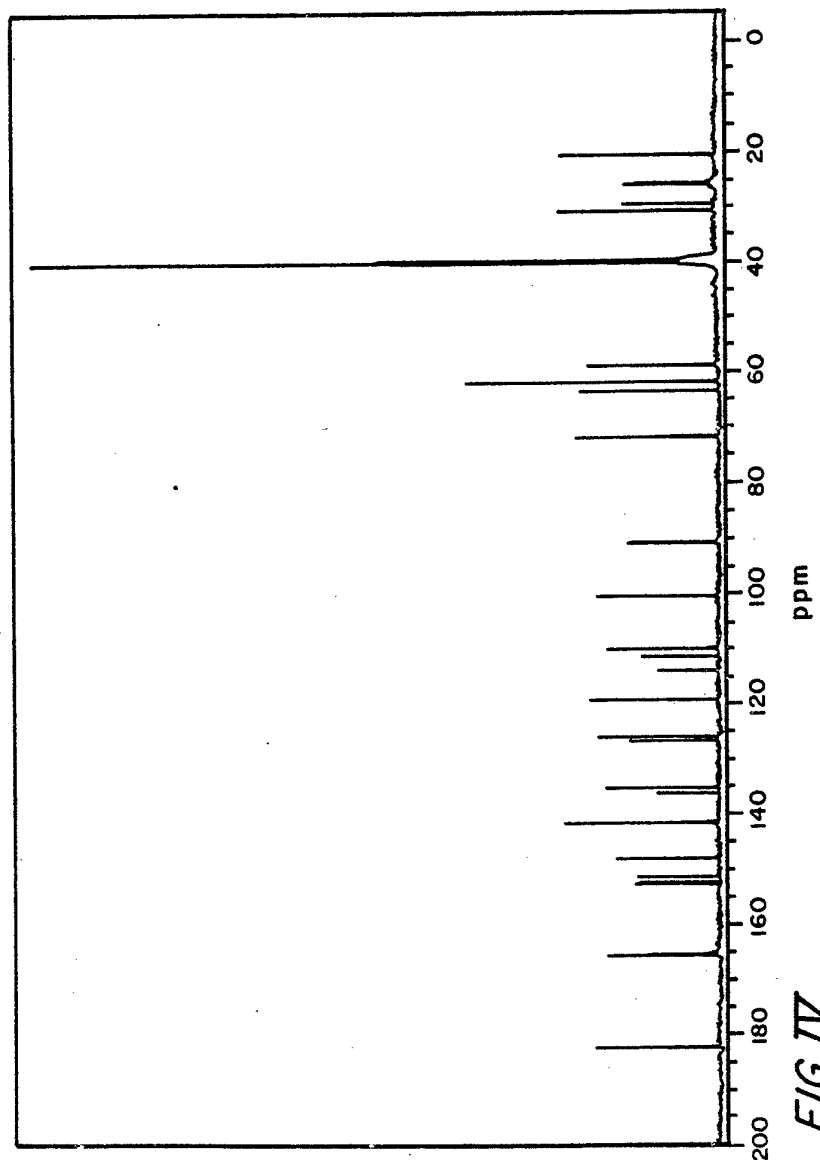
FIG. II

3/9

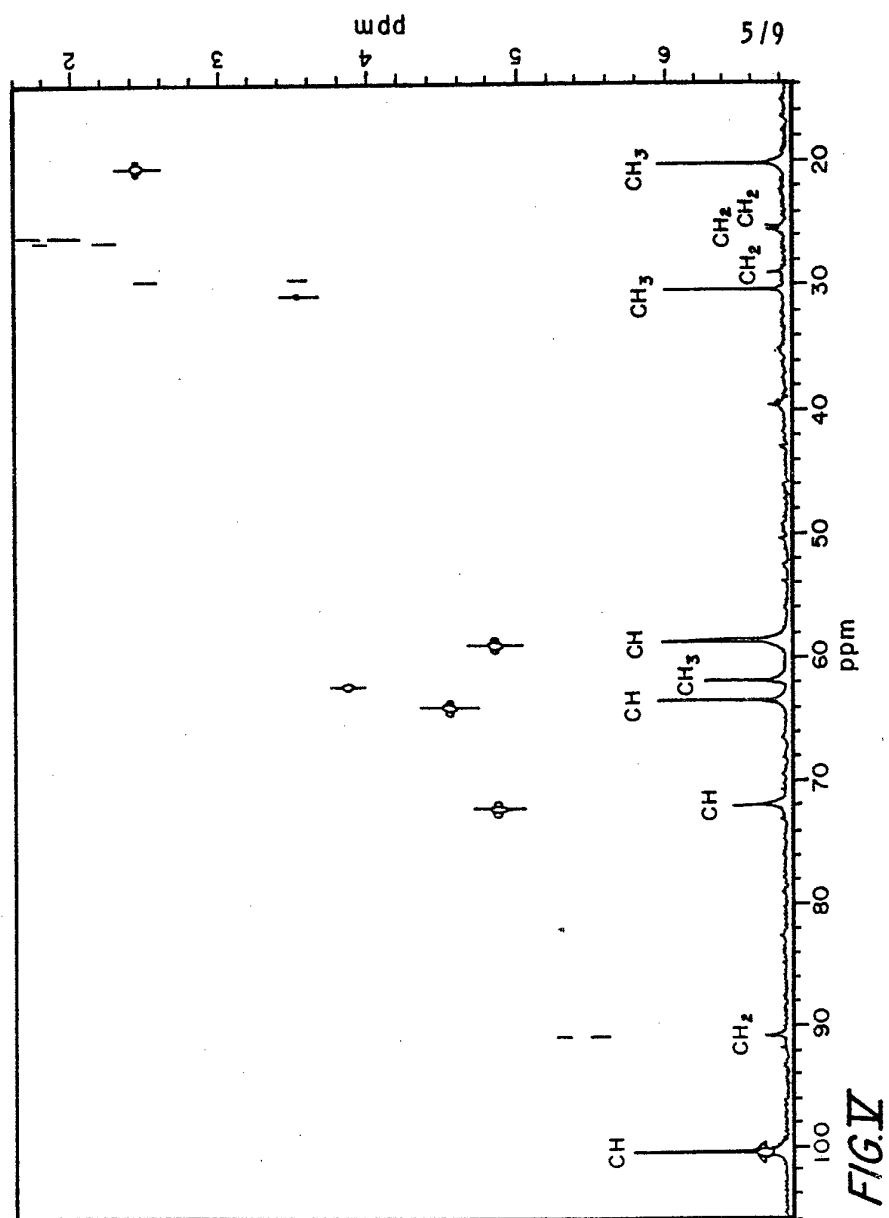


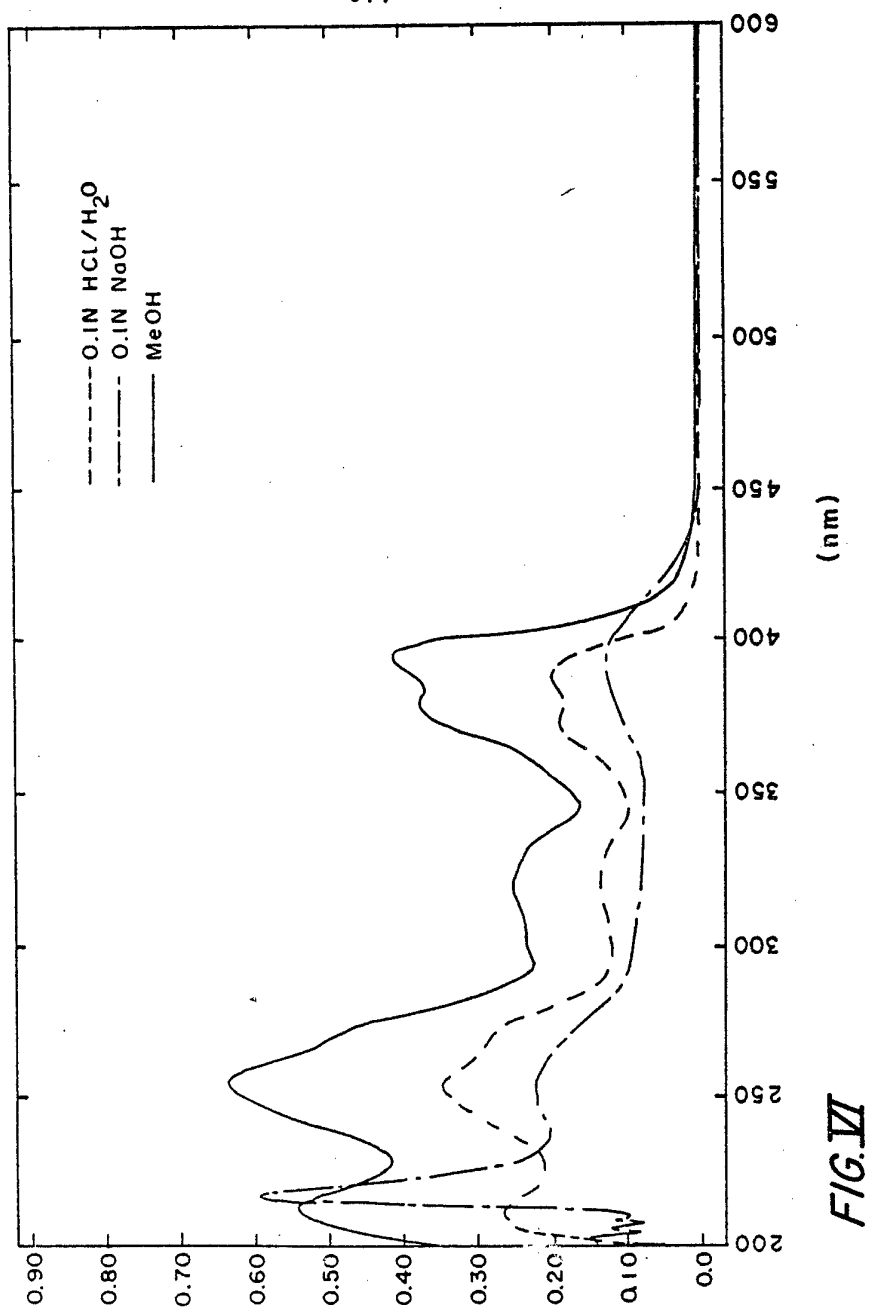
94 525- 255830

4/9



245.95- 255830





7/9

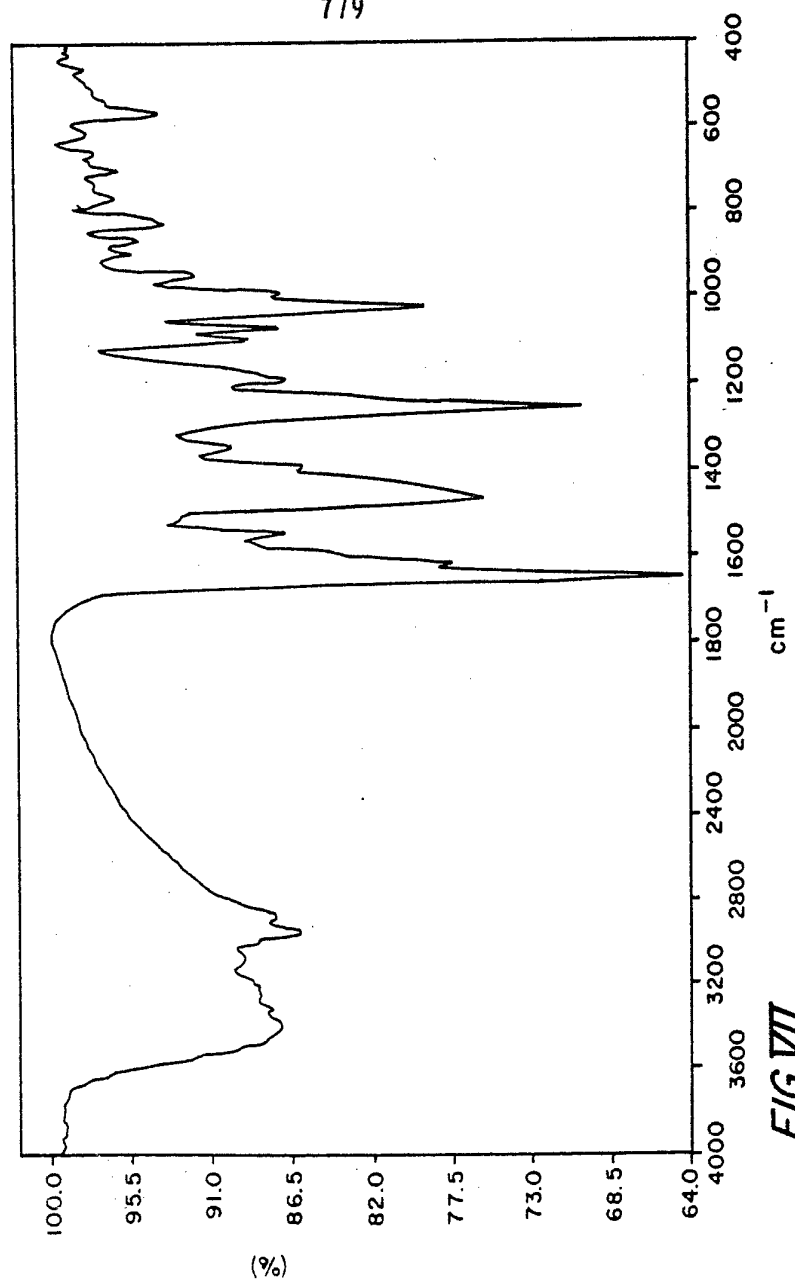


FIG. VII

24545- 255830

8/9

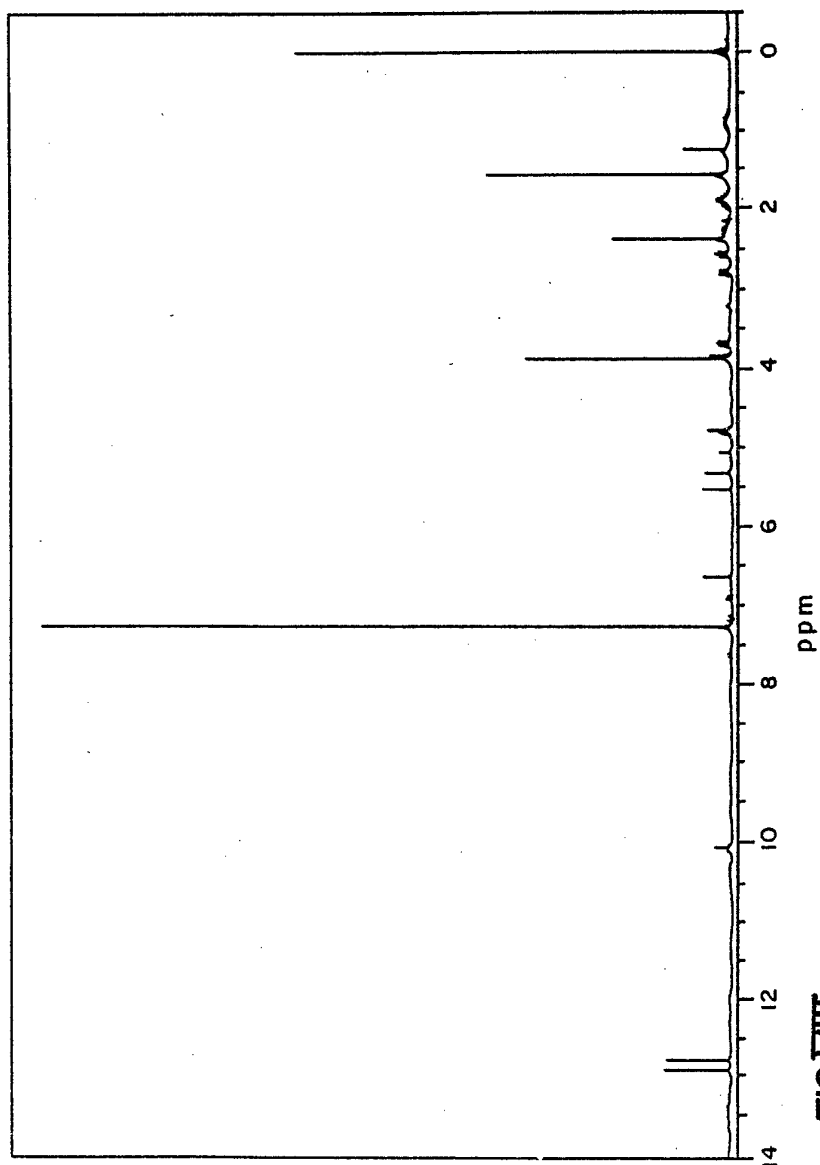


FIG. VIII

9/9

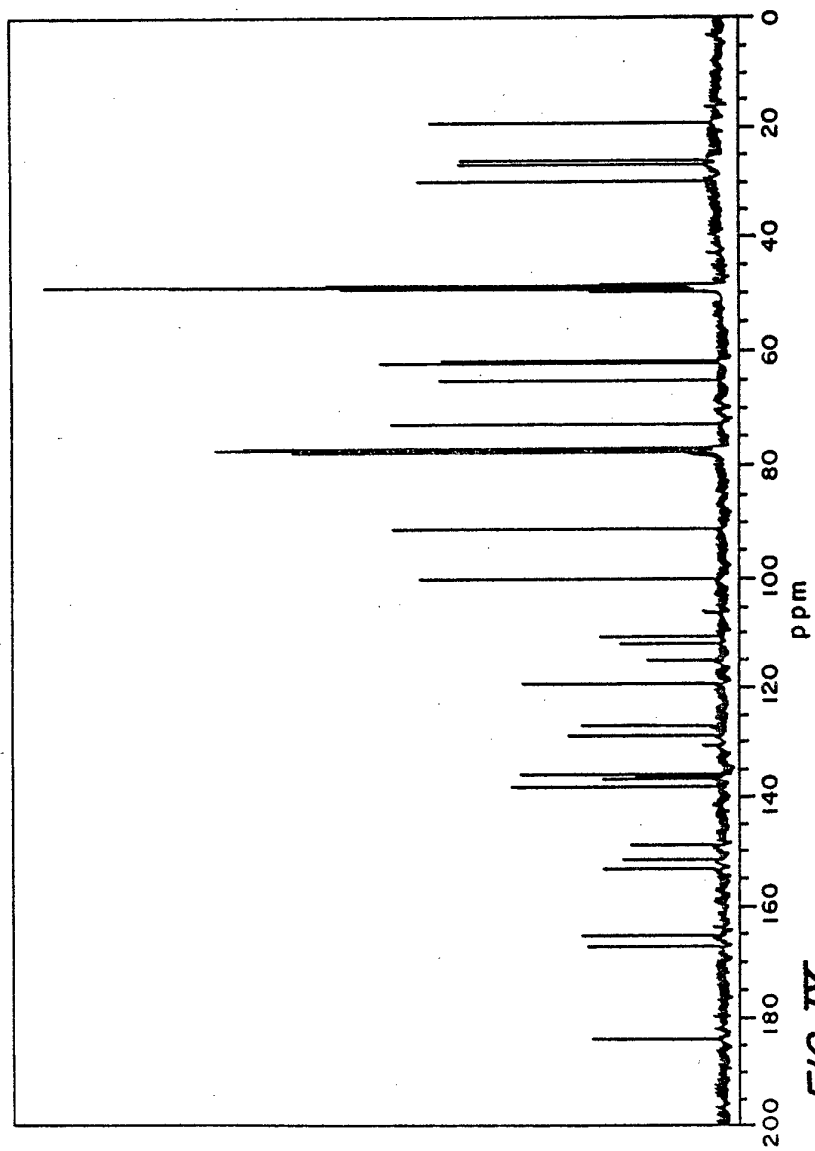


FIG. IX