



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤ Int. Cl.³: C 07 D 487/04
C 12 P 17/18



Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

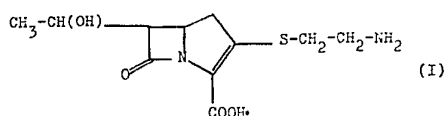
⑪

625 803

⑳ Gesuchsnummer:	14599/76	㉗ Inhaber:	Merck & Co., Inc., Rahway/NJ (US)
㉑ Anmeldungsdatum:	19.11.1976		
㉓ Priorität(en):	24.11.1975 US 634560	㉘ Erfinder:	Jean Kahan-Sawyer, Rahway/NJ (US) Frederick Marvin Kahan, Rahway/NJ (US)
㉔ Patent erteilt:	15.10.1981		
㉕ Patentschrift veröffentlicht:	15.10.1981	㉙ Vertreter:	Bovard & Cie., Bern

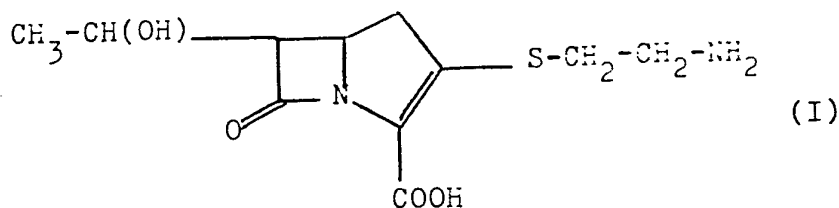
⑤④ **Verfahren zur Herstellung von Thienamycin und dessen Isomeren Desacetyl-890 A₁ und 890 A₃.**

⑤⑦ Thienamycin der Strukturformel I oder dessen als Verbindung 890 A₁ bzw. 890 A₃ bezeichnete Iso-
mer wird mit einer Amidohydrolase in Berührung ge-
bracht, die im Stande ist, die N-Acetylgruppe zu hydro-
lisieren. Das für die Herstellung des Antibiotikums Thien-
amycin neue Verfahren ermöglicht auch die Herstellung
der neuen Antibiotika Desacetyl-890 A₁ und Des-
acetyl-890 A₃. Diese Antibiotika haben ein sehr
breites Wirkungsspektrum und sind hochgradig
wirksam sowohl gegen gram-negative wie auch gram-
positive Mikroorganismen. Sie eignen sich für die An-
wendung in der Human- und Veterinärmedizin wie
auch für industrielle Verwendungszwecke.

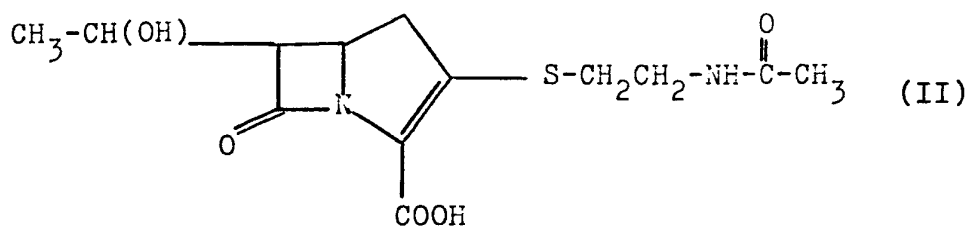


PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von Thienamycin der Strukturformel



oder von dessen als Desacetyl-890 A₁ und Desacetyl-890 A₃ bezeichneten Isomeren, dadurch gekennzeichnet, dass man N-Acetylthienamycin der Strukturformel



oder dessen als Verbindung 890 A₁ bzw. 890 A₃ bezeichnetes Isomer in innige Berührung mit einer Amidohydrolase bringt, die imstande ist, die N-Acetylgruppe zu hydrolysieren.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Amidohydrolase eine N-Acetylthienamycin-Amidohydrolase verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Amidohydrolase eine N-Acetylthienamycin-Amidohydrolase verwendet.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Amidohydrolase verwendet, die durch einen Amidohydrolase erzeugenden Stamm des Mikroorganismus *Protaminobacter ruber* erhalten wurde.

5. Verfahren nach Anspruch 4 zur Herstellung von Thienamycin, dadurch gekennzeichnet, dass man N-Acetylthienamycin in innige Berührung mit dem von *Protaminobacter ruber* erzeugten Enzym-N-Acetylthienamycin-Amidohydrolase bringt.

6. Verfahren nach Anspruch 4 zur Herstellung von Desacetyl-890 A₁, dadurch gekennzeichnet, dass man die Verbindung 890 A₁ in innige Berührung mit dem von *Protaminobacter ruber* erzeugten Enzym N-Acetylthienamycin-Amidohydrolase bringt.

7. Verfahren nach Anspruch 4 zur Herstellung von Desacetyl-890 A₃, dadurch gekennzeichnet, dass man die Verbindung 890 A₃ in innige Berührung mit dem von *Protaminobacter ruber* erzeugten Enzym N-Acetylthienamycin-Amidohydrolase bringt.

Die Entdeckung der bemerkenswerten antibiotischen Eigenschaften von Penicillin hat grosses Interesse auf diesem Gebiet wachgerufen, das zur Auffindung vieler anderer wertvoller antibiotischer Stoffe geführt hat; solche Antibiotica sind z.B. andere Penicilline, Streptomycine, Bacitracin, Tetracycline, Chloramphenicol, Erythromycine und dergleichen. Im allgemeinen erstreckt sich die antibakterielle Aktivität eines jeden dieser Antibiotica auf gewisse klinisch wichtige pathogene Bakterien. So wirken einige hauptsächlich nur gegen gram-positive Arten von Bakterien. Im Verlaufe der weitverbreiteten Anwendung bisher bekannter Antibiotica zur Behandlung von bakteriellen Infektionen hat die erworbene Resistenz zum Auftauchen schwieriger Resistenzprobleme geführt.

Daher haben die Mängel der bekannten Antibiotica eine weitere Forschung zur Auffindung anderer Antibiotica angeregt, die gegen einen weiteren Bereich von Krankheitserregern sowie auch gegen resistente Stämme besonderer Mikroorganismen aktiv sind.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung neuer und wertvoller Antibiotica zur Verfügung zu stellen, die in hochgradig wirksamer Weise das Wachstum verschiedener gram-negativer und gram-positiver Mikroorganismen hemmen, das auf enzymatischer Desacetylierung der Verbindungen 890 A₁ und 890 A₃ beruht und auch zum Desacetylieren von N-Acetylthienamycin geeignet ist.

Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemässe Verfahren gelöst, das im Patentspruch 1 definiert ist.

Geeignete Quellen für eine Amidohydrolase, die imstande ist, die N-Acetylgruppe zu hydrolysieren, sind Aminohydrolase erzeugende Stämme des Mikroorganismus *Protaminobacter ruber*. Das durch *Protaminobacter ruber* erzeugte Enzym ist N-Acetylthienamycin-Amidohydrolase, ein Vertreter der Untergruppe von Enzymen, die gemäss der empfohlenen Enzymnomenklatur der «International Union of Pure and Applied Chemistry» und der «International Union of Biochemistry» als E. C. 3.5.1 bezeichnet wird.

Die nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten neuen antibiotischen Stoffe, die hier als Desacetyl-890 A₁ und Desacetyl-890 A₃ bezeichnet werden, sowie auch das gleichermassen erhältliche Thienamycin können in verdünnter Form als rohes Konzentrat und in reiner Form vorliegen.

Der Mikroorganismus, der imstande ist, das Desacetylierungsverfahren durchzuführen, wurde aus einer Bodenprobe isoliert und auf Grund von klassifizierenden Untersuchungen als zu der Species *Protaminobacter ruber* gehörend identifiziert. In der Kultursammlung von Merck & Co., Inc., Rahway, N.J., ist er mit MB-3528 bezeichnet worden. Eine Kultur des Mikroorganismus ist am 21. November 1975 unbeschränkt permanent in der Kultursammlung der Northern Regional Research Laboratories, Northern Utilization Research and Development Division, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, hinterlegt worden und hat die Kennzeichnungsnummer NRRL B-8143 erhalten.

Die morphologischen Eigenschaften und die Kultureigenschaften von *Protaminobacter ruber* NRRL B-8143 sowie die

Einzelheiten über die Ausnutzung von Kohlenstoff und Stickstoff und die biochemischen Reaktionen des Mikroorganismus sind nachstehend angegeben:

Morphologie

Die Zellen sind stabförmig mit abgerundeten Enden, 0,9–1,2 × 2,3–4,6 µ gross und kommen einzeln oder in Paaren vor. 24 und 48 Stunden alte Zellen werden gram-negativ mit einem körnigen Aussehen gefärbt. Die Körner, besonders die polaren Körner werden von Sudanschwarz B schwarz gefärbt. Die Zellen sind bei 28°C beweglich, aber bei 37°C ist die Beweglichkeit fraglich.

Kulturmerkmale

Kolonien auf Nähragar sind zunächst dünn, punktförmig, halbtransparent und farblos; dann werden sie niedrig-konvex, undurchsichtig, glatt, randvollständig (edge entire), in der Konsistenz etwas trocken und rosa bis rosarot pigmentiert.

Kulturen in Nährbrühe sind gleichmässig trüb ohne Häutchen.

Die Pigmenterzeugung ist von Licht oder den untersuchten Temperaturen (28°C und 37°C) unabhängig. Das Pigment ist in Aceton löslich, in Wasser oder Chloroform aber unlöslich.

Bei 28°C erfolgt das Wachstum auf Nähragar und Hirn-Herz-Aufguss-Agar unter aeroben Bedingungen etwas langsam, aber gut; bei 37°C ist das Wachstum mässig bis gut, aber langsamer; bei 50°C findet kein Wachstum statt.

Ausnutzung von C- und N-Quellen

Bei Verwendung eines basalen Salzmediums mit Ammoniumsulfat als N-Quelle ist das Wachstum mit Arabinose gut,

mit Xylose mässig und mit Dextrose, Fructose, Mannose, Rhamnose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Cellulose, Inosit und Mannit schlecht.

N-Acetylthanolamin kann als einzige C- und N-Quelle verwendet werden.

In OF-Basalem Medium (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) wird aus Dextrose oder Lactose unter aeroben oder anaeroben Bedingungen keine Säure und kein Gas gebildet.

Biochemische Reaktionen

Die biochemischen Reaktionen beruhen auf Standardmethoden, die im «Manual of Microbiological Methods», herausgegeben von der Society of American Bacteriologists, Verlag McGraw-Hill Book Co., New York, 1957, beschrieben sind.

Katalase – positiv

Oxidase – negativ

Stärke wird nicht hydrolysiert

Casein wird nicht hydrolysiert

Gelatine wird nicht verflüssigt

Lackmusmilch bleibt in der Konsistenz unverändert, wird aber nach 7 Tagen etwas alkalisch

Indol – negativ

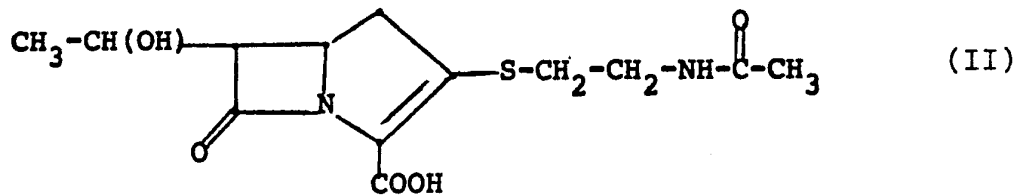
H₂S – negativ

Nitrate werden nicht reduziert

Urease – positiv

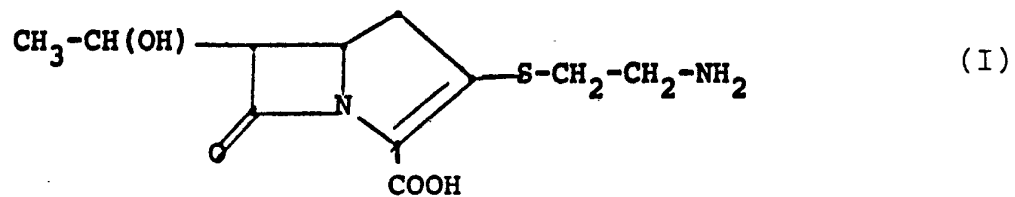
Lysin- und Ornithindecaboxylase – negativ.

N-Acetylthienamycin, 890A₁ und 890A₃ sind die Bezeichnungen für Isomere des Antibiotiums der Strukturformel



N-Acetylthienamycin, seine Beschreibung und ein Verfahren zur Herstellung desselben sind in der USA-Patentanmeldung Serial Nr. 634 301 und die Verbindungen 890A₁ und 890A₃, ihre Beschreibung und Verfahren zur Herstellung derselben sind in der USA-Patentanmeldung Serial No. 634 300 offenbart.

Die neuen erfindungsgemäss hergestellten Antibiotica nämlich Desacetyl 890A₁ und Desacetyl 890A₃, sind Isomere von Thienamycin der Strukturformel



und werden durch enzymatische Hydrolyse von 890A₁ bzw. 890A₃ mit Hilfe einer Amidohydrolase hergestellt, die beispielsweise in Species des Genus Protaminobacter vorkommt.

Eine für die N-Desacetylierung von N-Acetylthienamycin, 890A₁ und 890A₃ besonders geeignete Amidohydrolase ist N-Acetylthienamycin-Admidohydrolase.

Es wurde eine überraschende Homologie zwischen N-Acetylthanolamin und N-Acetylthienamycin gefunden, indem Extrakte von Mikroorganismen mit dem bisher noch nicht beschriebenen Enzym N-Acetylthanolamin-Amidohydrolase in vielen Fällen imstande sind, N-Acetylthienamycin zu hydrolysieren. Ferner wurde gefunden, dass Amidohydrolasen, die imstande sind, N-Acetylthienamycin zu hydrolysieren, auch die Fähigkeit haben, die Verbindungen 890A₁ und 890A₃ in ihre

neuen Desacetylformen überzuführen. Zur Gewinnung solcher Mikroorganismen kann man diejenigen Stämme auswählen, die imstande sind, für ihr Wachstum N-Acetylthanolamin auszunutzen, und diese Mikroorganismen dann auf die Anwesenheit von N-Acetylthienamycin-Amidohydrolase untersuchen.

Das Antibioticum Thienamycin, welches nach dem erfindungsgemässen N-Desacetylierungsverfahren aus N-Acetylthienamycin erhalten wird, ist ein wertvolles Antibioticum. Seine Beschreibung, Herstellung und gewerbliche Verwertbarkeit sind in der USA-Patentanmeldung Serial Nr. 526 992 offenbart. Die Antibiotica Desacetyl-890A₁ und Desacetyl-890A₃ sind neue und wertvolle Antibiotica.

Ein Merkmal der Erfindung ist die neue Desacetylierung

von N-Acetylthienamycin. Es gibt zwei Quellen für N-Acetylthienamycin. N-Acetylthienamycin wird durch Fermentation einer Flüssigkeit mit dem Mikroorganismus *Streptomyces cattleya* NRRL-8057 hergestellt. Dieser Mikroorganismus erzeugt ausserdem Thienamycin, welches dann chemisch N-acetyliert werden kann.

Auf Grund umfangreicher klassifizierender Untersuchungen wurde der aus einer Bodenprobe isolierte Mikroorganismus *Streptomyces cattleya* als Actinomycete identifiziert und in der Kultursammlung von Merck & Co., Inc., Rahway, N.J., als MA-4297 bezeichnet. Eine Kultur dieses Mikroorganismus ist permanent in der Kultursammlung der Northern Regional Research Laboratories, Northern Utilization Research and Development Division, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, hinterlegt worden und hat die Kennzeichnungsnummer NRRL 8057 erhalten.

Die gemäss der Erfindung hergestellten Verbindungen Desacetyl-890A₁ und Desacetyl-890A₃ sind wertvolle Antibiotica, die gegen die verschiedensten gram-positiven und gram-negativen Bakterien aktiv sind und daher sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin Verwendung finden. Die Verbindungen können als antibakterielle Arzneimittel zur Behandlung von Infektionen verwendet werden, die durch gram-positive oder gram-negative Bakterien verursacht werden. z.B. gegen *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* und *Pseudomonas aeruginosa*. Die antibakteriellen Mittel können ferner als Zusatz zu Tierfutter, zum Konservieren von Nahrungsmitteln und als Desinfektionsmittel verwendet werden. Zum Beispiel können sie in wässrigen Mitteln in Konzentrationen von 0,1 bis 100 Teilen Antibioticum je Million Teile Lösung oder vorzugsweise in Konzentrationen von 1 bis 10 Teilen Antibioticum je Million Teile Lösung verwendet werden, um das Wachstum von schädlichen Bakterien auf ärztlichen und zahnärztlichen Ausrüstungsgegenständen zu zerstören und zu hemmen, sowie als Bactericide für technische Anwendungszwecke, z.B. in Anstrichfarben auf wässriger Basis, in dem Siebwasser von Papierfabriken und zur Hemmung des Wachstums schädlicher Bakterien.

Die beschriebenen Antibiotica können in den verschiedenen pharmazeutischen Präparaten als alleinige Wirkstoffe oder in Kombination mit einem oder mehreren anderen Antibiotica oder mit einem oder mehreren pharmakologisch aktiven Stoffen verwendet werden. Als Beispiel für den erstgenannten Fall kann ein Aminocyclitol-Antibioticum, wie Gentamicin, mit den beschriebenen Antibiotica gemeinsam dargereicht werden, um die Möglichkeit des Auftretens von resistenten Organismen auf ein Minimum zu beschränken. Als Beispiel für den letzteren Fall kann man Diphenoxylat und Atropin in Dosenformen für die Behandlung von Magen-Darmerkrankungen kombinieren. Die Antibiotica können in Form von Kapseln, Tabletten, Pulvern, flüssigen Lösungen oder als Suspension oder Elixiere verwendet werden. Sie können oral, lokal, intravenös oder intramuskulär dargereicht werden.

Tabletten und Kapseln für die orale Darreichung können in Einheitsdosisform vorliegen und herkömmliche Streckmittel, wie Bindemittel, z.B. Sirup, Akazienharz, Gelatine, Sorbit, Tragantharz oder Polyvinylpyrrolidon; Füllstoffe, wie Lactose, Zucker, Maisstärke, Calciumphosphat, Sorbit oder Glycin; Gleitmittel, z.B. Magnesiumstearat, Talkum, Polyäthylenglykol, Siliciumdioxid; den Zerfall fördernde Mittel, z.B. Kartoffelstärke oder unbedenkliche Netzmittel, wie Natriumlaurylsulfat, enthalten. Die Tabletten können nach an sich bekannten Methoden beschichtet sein. Oral darzureichende flüssige Präparate können in Form von wässrigen oder öligen Suspensionen, Lösungen, Emulsionen, Sirupen, Elixieren usw. oder als trockenes Produkt zum Anmischen mit Wasser oder anderen Trägern vor der Verwendung vorliegen. Solche flüssigen

Präparate können herkömmliche Zusätze, wie Suspendiermittel, z.B. Sorbitsirup, Methylcellulose, Glucose/Zuckersirup, Gelatine, Hydroxyäthylcellulose, Carboxymethylcellulose, Aluminiumstearatgel oder hydrierte geniessbare Fette, Emulgiermittel, z.B. Lecithin, Sorbitanmonooleat oder Akazienharz; nicht-wässrige Träger, wie geniessbare Öle, z.B. Mandelöl, fraktioniertes Kokosnussöl, ölige Ester, Propylenglycol oder Äthylalkohol; Konservierungsmittel, z.B. p-Hydroxybenzoesäuremethyl- oder -propylester oder Sorbinsäure, enthalten. Zäpfchen enthalten z.B. herkömmliche Zäpfchenbasen, wie Kakaobutter oder andere Glyceride.

Mittel für die Injektion können in Einheitsdosisform in Ampullen oder in Mehrfachdosisform in Behältern unter Zusatz von Konservierungsmitteln vorliegen. Die Mittel können die Form von Suspensionen, Lösungen, Emulsionen in öligen oder wässrigen Trägern aufweisen und Formulierungsmittel, wie Suspendier-, Stabilisier- und/oder Dispergiermittel enthalten. Der Wirkstoff kann auch in Pulverform vorliegen und vor der Verwendung mit einem Träger, z.B. sterilem, pyrogenfreiem Wasser, angemacht werden.

Die Mittel können auch in für die Absorption durch die Schleimhäute der Nase und des Rachens oder der Bronchialgewebe geeigneter Form vorliegen, z.B. als Pulver oder flüssige Sprüh- oder Inhaliermittel, Pastillen, Rachenanstrichmittel usw. Zur Behandlung der Augen oder Ohren können die Präparate als einzelne Kapseln, in flüssiger oder halbflüssiger Form oder als Tropfen usw. verwendet werden. Für die lokale Applikation können sie in hydrophoben oder hydrophilen Basen als Salben, Cremes, Lotionen, Anstrichmittel, Pulver usw. vorliegen.

Ausser einem Träger können die Mittel andere Bestandteile, wie Stabilisatoren, Bindemittel, Oxidationsverzögerer, Konservierungsmittel, Gleitmittel, Suspendiermittel, die Viscosität beeinflussende Mittel oder Geschmacksstoffe und dergleichen, enthalten.

In der Veterinärmedizin, wie bei der Behandlung von Hühnern, Kühen, Schafen, Schweinen und dergleichen, können die Mittel z.B. als Präparate zum Injizieren in die Brust formuliert werden, die auf Langzeitwirkung abgestellt sind oder den Wirkstoff schnell in Freiheit setzen.

Die darzureichende Dosis richtet sich weitgehend nach dem Zustand des zu behandelnden Tieres, dem Gewicht desselben und der Art der Infektion, der Art und Häufigkeit der Darreichung, wobei die parenterale Darreichung bei allgemeinen Infektionen und die orale Darreichung bei Darminfektionen bevorzugt wird.

Zur Behandlung von bakteriellen Infektionen beim Menschen können die beschriebenen Verbindungen oral oder parenteral nach herkömmlichen Methoden für die Behandlung mit Antibiotica in Mengen von 2 bis 600, vorzugsweise 5 bis 100 mg/kg/Tag dargereicht und vorzugsweise in Einzeldosen unterteilt und z.B. drei- bis viermal pro Tag dargereicht werden. Es können Einheitsdosisformen verwendet werden, die z.B. 25, 250, 330, 400 oder 1000 mg Wirkstoff zusammen mit physiologisch unbedenklichen Trägern oder Streckmitteln enthalten. Die Dosisseinheiten liegen zweckmässig in Form von flüssigen Präparaten, wie Lösungen oder Suspensionen, oder als feste Stoffe in Tabletten oder Kapseln vor. Die optimale Dosis richtet sich für jeden einzelnen Fall nach Art und Schwere der Infektion, wobei für die Behandlung von Kindern kleinere Dosen angewandt werden; alle derartigen Bemessungsregeln sind dem Fachmann bekannt.

Das Antibioticum Thienamycin kann in der gleichen Weise dargereicht werden wie die Antibiotica Desacetyl-890A₁ und Desacetyl-890A₃.

Analysenverfahren auf Antibiotikum N-Acetylthienamycin Die nachstehenden prozentualen Konzentrationsangaben sind gewichtsmässig, wenn nichts anderes angegeben ist.

I. Bioanalyse

Analysen auf die antibakterielle Aktivität werden nach der folgenden Scheibendiffusionsmethode unter Verwendung von *Vibrio percolans* ATCC 8461 oder *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P als Prüforganismus durchgeführt.

Platten mit *Vibrio percolans* ATCC 8461 werden folgendermassen hergestellt:

Eine gefriergetrocknete Kultur von *Vibrio percolans* ATCC 8461 wird in 15 ml eines sterilen Mediums suspendiert, welches 8 g/l «Difco»-Nährbrühe und 2 g/l Hefeextrakt in destilliertem Wasser enthält (nachstehend als NBYE abgekürzt). Die Kultur wird über Nacht in einer rotierenden Schüttelmaschine bei 28°C inkubiert. Diese Kultur wird verwendet, um die Oberfläche von Schrägröhrchen zu beimpfen, die 1,5 % Agar in NBYE enthalten, und die beimpften Schrägröhrchen werden über Nacht bei 28°C inkubiert und dann im Kühlschrank aufbewahrt.

Die aus einer einzigen gefriergetrockneten Kultur hergestellten gekühlten Schrägröhrchen werden für einen Zeitraum bis zu 4 Wochen nach ihrer Herstellung folgendermassen verwendet: Eine Öse mit Impfgut aus dem Schrägröhrchen wird in einem 250 ml-Erlenmeyerkolben in 50 ml NBYE dispergiert. Die Kultur wird über Nacht in einer rotierenden Schüttelmaschine bei 28°C inkubiert und dann auf eine Dichte verdünnt, die eine 50%ige Lichtdurchlässigkeit bei 660 nm ergibt. 33,2 ml dieser verdünnten Kultur werden zu einem Volumen von 1 l NBYE zugesetzt, das 15 g Agar enthält und auf 46°C gehalten wird. Das beimpfte, agarhaltige Medium wird in Petrischalen aus Kunststoff von 100 × 15 mm in Mengen von 5 ml je Schale gegossen, gekühlt und bis zu einem Zeitpunkt von 5 Tagen vor der Verwendung auf 2 bis 4°C gehalten.

Platten mit *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P werden folgendermassen hergestellt:

Eine über Nacht entwickelte Kultur des Analysenorganismus *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P in Nährbrühe, die 0,2 % Hefeextrakt enthält, wird mit 0,2 % Hefeextrakt enthaltender Nährbrühe zu einer Suspension mit einer optischen Durchlässigkeit von 55 % bei einer Wellenlänge von 660 nm verdünnt. Diese Suspension wird zu «Difco»-Nähragar zugesetzt, das durch 2,0 g/l «Difco»-Hefeextrakt ergänzt worden ist und sich auf einer Temperatur von 47 bis 48°C befindet, wobei man eine Mischung erhält, die 33,2 ml der Suspension je Liter Agar enthält. 5 ml dieser Suspension werden in Petrischalen von 85 mm Durchmesser gegossen und diese Platten werden gekühlt und bis zur Verwendung (höchstens 5 Tage) auf 4°C gehalten.

Proben des zu analysierenden Antibioticums werden mit Phosphatpufferlösung vom pH-Wert 7 verdünnt. Filterpapierscheiben mit einem Durchmesser von 6,35 oder 12,7 mm werden in die Testlösung getaucht und auf die Oberfläche der Analysenplatten gelegt. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert, worauf man den Durchmesser der Hemmzone in Millimeter bestimmt. Der Durchmesser der Hemmzone in Millimeter bestimmt die relative Stärke.

II. Durch Hydroxylamin auslöschbare Extinktion

Der Anteil der bei 301 nm gemessenen Extinktion, der auf den Gehalt unreiner Proben an dem Antibioticum zurückgeführt werden kann, wird durch selektive Auslöschung dieser Extinktion (unter gleichzeitiger Inaktivierung der antibiotischen Aktivität) durch Reaktion mit verdünntem Hydroxylamin bestimmt.

Proben, die das zu untersuchende Antibioticum enthalten, werden in 0,01-molarer Kaliumphosphatpufferlösung (pH-Wert 7) so hergestellt, dass sie eine anfängliche A_{301} zwischen 0,1 und 1,0 aufweisen. Frisch hergestelltes, neutralisiertes Hydroxylamin ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl} + \text{NaOH}$ bis zu einem End-pH-

Wert von 7) wird bis zu einer Endkonzentration von 10-mmolar zugesetzt, worauf man die Reaktion bei Zimmertemperatur mindestens 30 Minuten lang ablaufen lässt. Wenn man den so erhaltenen A_{301} -Wert von der ursprünglichen Ablesung (nach Korrektur für die Verdünnung durch das zugesetzte Reagens) subtrahiert, erhält man die durch Hydroxylamin auslöschbare Extinktion. Lösungen von reinem N-Acetylthienamycin zeigen eine durch Hydroxylamin auslöschbare Extinktion von 96,0 %.

Analysenverfahren für Thienamycin

I. Bioanalyse

Analysen der antibakteriellen Aktivität werden, falls nichts anderes angegeben ist, nach der folgenden Scheibendiffusionsmethode durchgeführt. Die Analysenplatten werden hergestellt wie vorstehend für die Analyse von N-Acetylthienamycin beschrieben.

Proben des zu analysierenden Antibioticums werden mit Phosphatpufferlösung vom pH-Wert 7 verdünnt. Filterpapierscheiben mit einem Durchmesser von 12,7 mm werden in die Testlösung getaucht und auf die Oberfläche der Analysenplatten gelegt; zwei Scheiben einer jeden Probe werden normalerweise einander gegenüber auf eine Platte aufgelegt. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert, und die Hemmzone wird in Millimeter Durchmesser gemessen. Die in Millimeter gemessene Hemmzone bestimmt die relativen Stärken oder, wenn sie mit einem gereinigten Bezugsstandard, wie Cephalothin, verglichen sind, die Stärke des Antibioticums in Einheiten/ml. Die Aktivitätseinheit hat Cephalothin-Standardlösungen von 8, 4, 2 und 1 γ /ml zur Grundlage. Eine Einheit ist als diejenige Menge definiert, die der Berechnung zufolge die gleiche Hemmung erzeugt wie 1 γ Cephalothin je Milliliter, wobei diese Hemmzone einen Durchmesser zwischen 16 und 21 mm aufweist.

II. Durch Hydroxylamin auslöschbare Extinktion

Der Anteil der bei 297 nm gemessenen Extinktion, der auf den Gehalt unreiner Proben an dem Antibioticum zurückgeführt werden kann, wird durch die selektive Auslöschung dieser Extinktion (unter gleichzeitiger Inaktivierung der antibiotischen Aktivität) durch Reaktion mit verdünntem Hydroxylamin bestimmt.

Proben werden in 0,01-molarer Kaliumphosphatpufferlösung (pH-Wert 7,0) so hergestellt, dass sie eine anfängliche A_{297} zwischen 0,05 und 2,0 aufweisen. Frisch hergestelltes, neutralisiertes Hydroxylamin ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl} + \text{NaOH}$ bis zu einem End-pH-Wert von 7) wird bis zu einer Endkonzentration von 10-mmolar zugesetzt, worauf man die Reaktion bei Zimmertemperatur mindestens 30 Minuten lang ablaufen lässt. Wenn man den so erhaltenen A_{297} -Wert von der ursprünglichen Ablesung (nach Korrektur für die Verdünnung durch das zugesetzte Reagens) subtrahiert, erhält man die durch Hydroxylamin auslöschbare Extinktion. Lösungen von reinem Thienamycin zeigen eine durch Hydroxylamin auslöschbare Extinktion von 94,5 %.

Analysenmethoden für 890A₁ und 890A₃

I. Mikrobiologische Analyse

Eine Agarplatten-Scheibendiffusionsmethode wird angewandt, wobei entweder *Vibrio percolans* ATCC 8461 oder *Salmonella gallinarum* MB-1287 als Prüforganismus verwendet wird. Eine gereinigte Probe des Antibioticums 890A₁ wird als Standard verwendet.

Platten, die *Vibrio percolans* ATCC 8461 enthalten, werden hergestellt, wie vorstehend unter I. Bioanalyse von N-Acetylthienamycin beschrieben.

Die *Salmonella gallinarum* MB-1287 enthaltenden Platten werden folgendermassen hergestellt:

Ein verschlossenes Rohr, das gefrorene und gefriergetrocknete Zellen von *Salmonella gallinarum* MB-1287 in Mager-

milch enthält und unter Vakuum verschlossen worden ist, wird geöffnet und auf 15 ml Hirn-Herz-Aufgussbrühe aufgeimpft. Man lässt die Zellen ohne Schütteln bei 37°C über Nacht wachsen, und die Kultur wird auf Schrägröhrchen aufgeimpft, die 0,8% BBL-Nährbrühe + 0,2% «Difco»-Hefeextrakt + 1,5% Agar enthalten. Nach dem Wachstum über Nacht bei 37°C wird eine Öse der Kultur aus dem Schrägröhrchen in einen Kolben übertragen, der 50 ml 0,8%ige Nährbrühe + 0,2%igen Hefeextrakt enthält. Der Kolben wird über Nacht geschüttelt, und 1 l von 0,8% Nährbrühe + 0,2% Hefeextrakt + 1,5% Agar, der zuvor sterilisiert und auf 48°C gekühlt worden ist, wird mit 20 ml dieser Kultur beimpft. Das beimpfte NBYE-Agar wird sofort in Petrischalen aus Kunststoff von 100 × 15 mm (5 ml je Schale) gegossen, und die Platten werden bis zur Verwendung auf 0 bis 3°C gehalten.

Filterpapierscheiben von 12,7 mm Durchmesser werden in die zu analysierende Lösung getaucht und auf das Agar aufgelegt. Nach einer anderen Methode können die Scheiben beladen werden, indem man 0,1 ml der Lösung auf eine trockene Scheibe aufpipettiert und die Scheibe dann auf das Agar auflegt. Nach geeigneter Inkubation (für *Salmonella gallinarum* MB-1287 9 bis 18 Stunden lang bei 37°C, für *Vibrio percolans* ATCC 8461 12 bis 24 Stunden lang bei 25°C) wird der Durchmesser der Hemmzone gemessen. Falls erforderlich, werden Verdünnungen der zu analysierenden Lösungen in 0,05-molarem Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert 7,4; nachstehend als KPB abgekürzt) oder in entmineralisiertem Wasser hergestellt.

Die Stärke wird folgendermassen berechnet: Ein Gefälle wird bestimmt, indem man die Zonendurchmesser einer Lösung des Antibioticums 890A₁ oder 890A₃ und einer vierfachen Verdünnung dieser Lösung (in KPB) misst. Zwei Scheiben einer jeden Konzentration werden auf einer einzigen Platte analysiert, und die mittlere Zonengrösse wird bei einer jeden Konzentration bestimmt. Das Gefälle ist gleich der Hälfte der Differenz der Mittelwerte der Zonengrössen. Die Stärke wird dann nach der folgenden Gleichung berechnet:

Stärke (Einheiten/ml) =

$$(\text{Stärke des Standards}) \times \text{Verdünnung} \times 10 \left(\frac{[D - D_s] \log 2}{\text{Gefälle}} \right)$$

In der obigen Gleichung bedeuten D den mittleren Durchmesser der von der unbekannten Probe gebildeten Zonen, D_s den mittleren Durchmesser der Standardzonen und «Verdünnung» den Grad, zu dem die unbekannte Probe vor der Analyse verdünnt worden ist. Wenn kein Standard verwendet wird, nimmt man D_s als 25 mm und die Grösse (Stärke des Standards) als 1 Einheit/ml an, wenn als Prüforganismus *Vibrio percolans* ATCC 8461 verwendet wird. Es wird bestimmt, dass reines 890A₁ eine Stärke von 250 Einheiten je Einheit der durch Hydroxylamin auslöschbaren Extinktion bei 300 nm hat, wenn es als Standard verwendet wird. Dementsprechend beträgt die Stärke des Antibioticums 890A₃ 31 Einheiten je Einheit der durch Hydroxylamin auslöschbaren Extinktion bei 300 nm.

Für Analysen auf Platten mit *Salmonella gallinarum* MB-1287 wird das Gefälle in der gleichen Weise wie mit *Vibrio percolans* ATCC 8461 bestimmt. Wenn kein Standard verwendet wird, werden nur relative Stärken berechnet. Wenn kein Gefälle gemessen wird, wird ein Wert von 2,3 mm angenommen. Die Stärkeberechnungen werden, wie bei der Analyse mit *Vibrio percolans* ATCC 8461, durchgeführt. Wenn kein 890A₁-Standard verwendet wird, kann man mit einer Kontrolle von Penicillin G bei 250 γ/ml arbeiten, um nachzuweisen, dass die Empfindlichkeit der Organismen im normalen Bereich liegt.

II. Analysenmethode zur Bestimmung von «890-Analyseneinheiten»

Man arbeitet nach der herkömmlichen Scheiben-Plattenanalysemethode mit Scheiben von 12,7 mm Durchmesser. Man arbeitet mit routinemässig vergossenen 10 ml pro Platte, beimpft mit *Vibrio percolans* (ATCC 8461) und verwendet als Standard Cephaloridin. Vier Konzentrationen von Cephaloridin, nämlich 3,12, 6,25, 12,5, und 25 γ/ml, bilden den Standard, wobei die Konzentration von 12,5 γ/ml als Bezugslösung verwendet wird. Die Zonendurchmesser auf einer 5-ml-Platte für den Standard sind die folgenden:

Konzentration, γ/ml	Zonendurchmesser, mm
3,12	16,8
6,25	22,3
12,5	25,0
25	29,6

Eine Einheit ist als diejenige Menge des Antibioticums definiert, die auf einer 5 ml-Platte eine Hemmzone von 25 mm erzeugt. Daher wird bei dieser Analyse eine Konzentration an Cephaloridin von 12,5 γ/ml als einer Einheit von 890A äquivalent angesehen. Da das Gefälle der Linie für Cephaloridin 4,0 beträgt, werden die Berechnungen der Stärke einer Probe unter Verwendung eines Gefälles von 4,0 vorgenommen.

III. Hydroxylaminreaktion

Die beiden Antibiotica 890A₁ und 890A₃ reagieren mit Hydroxylamin unter Bildung eines Stoffes, der die Extinktion bei 300 nm stark vermindert. Dies liefert eine Grundlage für die quantitative Analyse auf die Antibiotica 890A₁ und 890A₃.

Die zu analysierende Lösung wird in einer Kaliumphosphatlösung (pH-Wert 7,4) auf 0,05-molar eingestellt, indem man ¹/₂₀ Raumteil einer Lösung von 0,8-molar K₂HPO₄ und 0,2 molar KH₂PO₄ zusetzt. Dann setzt man ¹/₁₀₀ Raumteil 1-molar Hydroxylaminhydrochlorid zu und bestimmt in Zeitabständen von ¹/₂ bis 2 Minuten die Extinktion bei 300 nm. Die Umsetzung wird bei 22 bis 28°C durchgeführt. Man nimmt eine kinetische Reaktion erster Ordnung an und bestimmt die Halbwertszeit aus der Abnahme der Extinktion während der ersten 10 Minuten. Aus dieser Halbwertszeit wird der Zeitpunkt geschätzt, über den hinaus keine weitere Abnahme der Extinktion beobachtet werden sollte, und die Beobachtungen werden über diesen Zeitpunkt hinaus fortgeführt. Wenn keine weitere Abnahme über diesen Zeitpunkt hinaus beobachtet wird, wird die gesamte Abnahme der Extinktion (korrigiert für den Verdünnungseffekt und die Extinktion des Hydroxylamins) als «durch Hydroxylamin auslöschbare Extinktion bei 300 nm» festgesetzt (nachstehend abgekürzt als HAEA₃₀₀). Wenn über diesen Zeitpunkt hinaus eine Abnahme der Extinktion stattfindet, wird die Geschwindigkeit der Abnahme der Hintergrundextinktion berechnet und die beobachtete Abnahme zu diesem Zeitpunkt für die Abnahme der Hintergrundextinktion korrigiert, wobei angenommen wird, dass die Abnahme der Hintergrundextinktion linear mit der Zeit verläuft. Der korrigierte Wert wird dann als HAEA₃₀₀ verzeichnet.

Die Anzahl der HAEA₃₀₀-Einheiten ist gleich dem Wert von HAEA₃₀₀, multipliziert mit dem Volumen in ml.

Verfahren zum Isolieren von N-Acetylthienamycin-Amidohydrolase erzeugenden Organismen

Man stellt eine Suspension von 1 g fruchtbarem Rasenboden in 100 ml steriler Phosphatpuffer-Kochsalzlösung der folgenden Zusammensetzung her:

Phosphatpuffer-Kochsalzlösung

NaCl	8,8 g
1-molarer Phosphatpuffer, pH-Wert 7,5*	10 ml
destilliertes Wasser	1000 ml

* 1-molarer Phosphatpuffer, pH-Wert 7,5
16 ml 1-molare KH_2PO_4 -Lösung werden mit 84 ml 1-molarer K_2HPO_4 -Lösung gemischt. Der pH-Wert des Phosphatpuffers wird durch Zusatz von etwas 1-molarer KH_2PO_4 -Lösung oder 1-molarer K_2HPO_4 -Lösung auf 7,5 eingestellt.

Anteile dieser 1%igen Stammbodensuspension werden verwendet, um 10fache, 100fache und 1000fache Verdünnungen herzustellen.

Anteile der Stammsuspension zu je 1 ml bzw. Anteile der 10fachen, 100fachen und 1000fachen Verdünnungen zu je 1 ml werden zu je 2 ml steriler, 1,0%iger Agarlösung bei 48°C zugesetzt. Die Gemische werden schnell über die Oberfläche von sterilen Petrischalen von 85 mm Durchmesser gegossen, die je 20 ml Medium A der folgenden Zusammensetzung enthalten:

Medium A

KH_2PO_4	3,0 g
K_2HPO_4	7,0 g
MgSO_4	0,1 g
destilliertes Wasser	1000 ml
N-Acetylthanolaminlösung*	8,5 ml

* N-Acetylthanolaminlösung
N-Acetylthanolamin wird mit Wasser auf das 10fache verdünnt und membransterilisiert. Diese Lösung wird nach der Autoklavbehandlung zugesetzt.
Für feste Medien setzt man 20 g Agar zu.

Die Petrischalen werden 18 Tage lang bei 28°C inkubiert. Gut isolierte Kolonien werden ausgewählt und auf Medium B aufgestrichen. Medium B hat die folgende Zusammensetzung:

Medium B

Tomatenbrei	40 g
Gemahlene Hafermehl	15 g
destilliertes Wasser	1000 ml

pH-Wert mit NaOH auf 6 eingestellt.

Für feste Medien werden 20 g Agar zugesetzt.

Einzelne Klone werden ausgewählt und 2 Tage lang bei 28°C auf Schrägröhrchen von Medium B gezüchtet.

Ein Teil der Schrägröhrchenkultur wird verwendet, um einen 250 ml-Erlenmeyerkolben, der 50 ml Medium A enthält, einen 250 ml-Erlenmeyerkolben, der 50 ml ergänztes Medium B enthält (ergänzt nach der Autoklavbehandlung durch 0,4 ml einer membransterilisierten Lösung von mit Wasser auf das 10fache verdünntem N-Acetylthanolamin), und einen 250 ml-Erlenmeyerkolben, der 50 ml Medium C enthält, zu beimpfen. Medium C hat die folgende Zusammensetzung:

Medium C

Dextrose	20 g
Pharmamedia	8 g
5 Maisquellwasser (auf Nassbasis)	5 g
destilliertes Wasser	1000 ml
ph-Wert mit NaOH oder HCl auf 7 eingestellt	
N-Acetylthanolaminlösung*	8,5 ml

10 * N-Acetylthanolaminlösung
N-Acetylthanolamin wird mit Wasser auf das 10fache verdünnt und membransterilisiert. Diese Lösung wird nach der Autoklavbehandlung zugesetzt.

15

Die Kolben werden 4 Tage lang bei 28°C mit 220 U/min (Hub 5,1 cm) geschüttelt. 30 ml eines jeden Kolbeninhalts werden 15 Minuten lang bei 8000 U/min zentrifugiert. Der überstehende Teil wird entfernt, so dass nur genug hinterbleibt, um eine dicke Suspension von Zellen und Mediumfeststoffen zu bilden. Die Hälfte der Suspension wird in einem Branson-Beschallungsgerät, Modell LS-75, mit einer 12,7 mm-Sonde der Ultraschallbehandlung unterworfen, um die Zellen zu zerreißen. Die Ausgangsleistung wird auf die Stellung Nr. 4 eingestellt, und man arbeitet mit vier aufeinanderfolgenden Beschallungstakten zu je 15 Sekunden, wobei die Suspension während und zwischen den einzelnen Beschallungsvorgängen in Eiswasser gekühlt wird. Um das Ganzzellenpräparat oder das Beschallungsprodukt auf N-Acetylthienamycin-Amidohydrolaseaktivität zu untersuchen, werden Anteile beider Suspensionen analysiert, indem man je 5 µl dieser Suspensionen mit Lösungen inkubiert, die 20 µl einer Lösung von 1,586 mg N-Acetylthienamycin je ml 10-mmolarer Kaliumphosphatpufferlösung (pH-Wert 7) und 10 µl 0,2-molare Kaliumphosphatpufferlösung (pH-Wert 7,4) enthalten. Kontrollversuche werden einerseits mit Antibiotikum und Puffer allein und andererseits mit Zellsuspensionen durchgeführt, die kein Antibiotikum enthalten. Nach dem Inkubieren dieser Gemische über Nacht bei 28°C werden 2 µl-Anteile entnommen und auf mit Cellulose beschichtete Dünnschichtchromatographieplatten (TCL-Platten) aufgebracht, die dann mit einem Gemisch aus 70 Vol.-% Äthylalkohol und 30 Vol.-% Wasser entwickelt werden. Nach dem Trocknen an der Luft werden die TLC-Platten 5 Minuten lang auf Analysenplatten von *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P aufgelegt. Die TLC-Platten werden entfernt und die Analysenplatten über Nacht bei 37°C inkubiert.

50 Die Analysenplatten werden hergestellt, wie vorstehend beschrieben.

Die Aktivität an N-Acetylthienamycin-Amidohydrolase in den inkubierten Gemischen ergibt sich aus einem bioaktiven Bereich bei R_f 0,44–0,47, der auf Thienamycin zurückzuführen ist. Das nicht-umgesetzte, bioaktive N-Acetylthienamycin erscheint bei R_f 0,7–0,89. Dieses Verfahren ermöglicht die Isolierung von N-Acetylthanolamin-Amidohydrolase erzeugenden Mikroorganismen mit N-Acetylthienamycin-Amidohydrolaseaktivität.

Beispiel 1

65 Desacetylierung von N-Acetylthienamycin

Man stellt eine Suspension von 1 g fruchtbarem Rasenboden in 100 ml steriler Phosphatpuffer-Kochsalzlösung der folgenden Zusammensetzung her:

Phosphatpuffer-Kochsalzlösung

NaCl	8,8 g
1-molarer Phosphatpuffer, pH-Wert 7,5*	10 ml
destilliertes Wasser	1000 ml

* 1-molarer Phosphatpuffer, pH-Wert 7,5
16 ml 1-molare KH_2PO_4 -Lösung werden mit 84 ml 1-molarer K_2HPO_4 -Lösung gemischt. Der pH-Wert des Phosphatpuffers wird durch Zusatz von etwa 1-molarer KH_2PO_4 -Lösung oder 1-molarer K_2HPO_4 -Lösung auf 7,5 eingestellt.

Anteile dieser 1%igen Stammbodensuspension werden verwendet, um 10fache, 100fache und 1000fache Verdünnungen herzustellen.

Anteile der Stammsuspension zu je 1 ml bzw. Anteile der 10fachen, 100fachen und 1000fachen Verdünnungen zu je 1 ml werden zu je 2 ml steriler, 1,0%iger Agarlösung bei 48°C zugesetzt. Die Gemische werden schnell über die Oberfläche von sterilen Petrischalen von 85 mm Durchmesser gegossen, die je 20 ml Medium A der folgenden Zusammensetzung enthalten.

Medium A

KH_2PO_4	3,0 g
K_2HPO_4	7,0 g
MgSO_4	0,1 g
destilliertes Wasser	1000 ml
N-Acetylthanolaminlösung*	8,5 ml

* N-Acetylthanolaminlösung
N-Acetylthanolamin wird mit Wasser auf das 10fache verdünnt und membransterilisiert. Diese Lösung wird nach der Autoklavbehandlung zugesetzt.
Für feste Medien setzt man 20 g Agar zu.

Die Petrischalen werden 18 Tage lang bei 28°C inkubiert. Eine gut isolierte Kolonie wird ausgewählt und auf eine Petrischale mit Medium B aufgestrichen. Medium B hat die folgende Zusammensetzung:

Medium B

Tomatenbrei	40 g
Gemahlenes Hafermehl	15 g
destilliertes Wasser	1000 ml

pH-Wert mit NaOH auf 6 eingestellt.

Für feste Medien setzt man 20 g Agar zu.

Ein einzelner Klon wird ausgewählt und 2 Tage lang bei 28°C auf einem Schrägröhrchen mit Medium B gezüchtet. Ein Teil der Kultur dieses Schrägröhrchens wird auf die Oberfläche von sechs mit Medium B hergestellten Schrägröhrchen aufgestrichen. Diese Schrägröhrchen werden 2 Tage lang bei 28°C inkubiert. Diese Kultur ist als Protaminobacter ruber identifiziert und in der Kultursammlung von Merck & Co., Inc. Rahway, New Jersey, unter der Bezeichnung MB-3528 niedergelegt worden.

Ein Teil der Schrägröhrchenkultur von Protaminobacter ruber MB-3528 wird verwendet, um einen 250 ml-Erlenmeyerkolben zu beimpfen, der 50 ml Medium C der folgenden Zusammensetzung enthält:

Medium C

Dextrose	20 g
Pharmamedia	8 g
5 Maisquellwasser (auf Nassbasis)	5 g
destilliertes Wasser	1000 ml
pH-Wert mit NaOH oder HCl auf 7 eingestellt	
N-Acetylthanolaminlösung*	8,5 ml

* N-Acetylthanolaminlösung
10 N-Acetylthanolamin wird mit Wasser auf das 10fache verdünnt und membransterilisiert. Diese Lösung wird nach der Autoklavbehandlung zugesetzt.

Der Kolben wird 4 Tage lang bei 28°C mit 220 U/min (Hub 15 5,1 cm) geschüttelt. 25 ml des Kolbeninhalts werden 15 Minuten lang bei 8000 U/min zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird entfernt, und die Zellen auf der Oberfläche der Mediumfeststoffe werden in 0,5 ml 0,05-molare Kaliumphosphatpufferlösung (pH-Wert 7,4) hineingeschabt. Die so erhaltene Suspension wird in einem Branson-Beschallungsgerät, Modell LS-75, mit einer 12,7 mm-Sonde bei der Einstellung 20 Nr. 4 der Ultraschallbehandlung unterworfen, um die Zellen zu zerreißen. Man arbeitet mit vier Beschallungstakten zu je 15 Sekunden und kühlt die Suspension während und zwischen 25 den einzelnen Behandlungsperioden in Eiswasser. 10 µl des Beschallungsproduktes werden mit 25 µl einer Lösung gemischt, die 840 µg/ml N-Acetylthienamycin in 10-molarer Kaliumphosphatpufferlösung (pH-Wert 7) enthält, und über Nacht bei 28°C inkubiert. Es werden Kontrollversuche einerseits mit Antibioticum und Puffer allein und andererseits mit 30 beschallten Zellen und Puffer ohne Antibioticum durchgeführt. Nach dem Inkubieren über Nacht bei 28°C werden je 2 µl auf mit Cellulose beschichtete TLC-Platten aufgebracht, die mit einem Gemisch 70 Vol.-% Äthylalkohol und 30 Vol.-% 35 Wasser entwickelt werden. Nach dem Trocknen an der Luft werden die TLC-Platten 5 Minuten lang auf Analysenplatten von Staphylococcus aureus ATCC 6538P aufgelegt.

Die Analysenplatten werden hergestellt, wie vorstehend unter I. Bioanalyse für N-Acetylthienamycin beschrieben.

40 Die TLC-Platten werden entfernt und die Analysenplatten über Nacht bei 37°C inkubiert. Ausser dem bioaktiven Fleck für nicht-umgesetztes N-Acetylthienamycin bei R_f 0,7–0,89 beobachtet man einen bioaktiven Fleck bei R_f 0,44–0,47, der auf Thienamycin zurückzuführen ist. Die Kontrollinkubationsmischungen von Antibioticum + Puffer, beschallter Zellsuspension + Puffer und einer Probe von Antibioticum + Puffer, zu der die beschallte Zellsuspension erst unmittelbar vor der 45 TLC-Analyse zugesetzt worden ist, zeigen kein bioaktives Material bei R_f 0,44–0,47.

Beispiel 2

Desacetylierung von 890A₁

Ein Teil der Schrägröhrchenkultur von Protaminobacter ruber MB-3528 wird verwendet, um einen 250 ml-Erlenmeyerkolben zu beimpfen, der 50 ml Medium C der folgenden 55 Zusammensetzung enthält:

Medium C

Dextrose	20 g
Pharmamedia	8 g
60 Maisquellwasser (auf Nassbasis)	5 g
destilliertes Wasser	1000 ml
pH-Wert mit NaOH oder HCl auf 7 eingestellt	
N-Acetylthanolaminlösung*	8,5 ml

65 * N-Acetylthanolaminlösung
N-Acetylthanolamin wird mit Wasser auf das 10fache verdünnt und membransterilisiert. Diese Lösung wird nach der Autoklavbehandlung zugesetzt.

Der Kolben wird 4 Tage lang bei 28°C mit 220 U/min (Hub 5,1 cm) geschüttelt. 25 ml des Kolbeninhalts werden 15 Minuten lang bei 8000 U/min zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird entfernt, und die Zellen auf der Oberfläche der Mediumfeststoffe werden in 0,5 ml 0,05-molare Kaliumphosphatpufferlösung (pH-Wert 7,4) hineingeschabt. Die so erhaltene Suspension wird in einem Branson-Beschallungsgerät, Modell LS-75, mit einer 12,7 mm-Sonde bei der Einstellung Nr. 4 der Ultraschallbehandlung unterworfen, um die Zellen zu zerreißen. Man arbeitet mit vier Beschallungstakten zu je 15 Sekunden und kühlt die Suspension während und zwischen den einzelnen Behandlungsperioden in Eiswasser. 10 µl des Beschallungsproduktes werden mit 25 µl einer 890A₁-Lösung gemischt, die 4,85 mit Hydroxylamin auslöschbare optische Dichteinheiten bei 300 nm je ml enthält. Kontrollversuche werden einerseits mit Antibioticum und Puffer allein und andererseits mit der beschallten Zellensuspension mit Puffer, aber ohne Antibioticum, durchgeführt. Nach der Inkubation über Nacht bei 28°C werden Anteile zu je 5 µl auf eine mit Cellulose beschichtete TLC-Platte aufgebracht, die mit einem Gemisch 70 Vol.-% Äthanol und 30 Vol.-% Wasser entwickelt wird. Nach dem Trocknen an der Luft wird die TLC-Platte 5 Minuten lang auf eine Analysenplatte von *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P aufgelegt.

Die Analysenplatten werden hergestellt, wie vorstehend beschrieben.

Die TLC-Platte wird entfernt und die Analysenplatte über Nacht bei 37°C inkubiert. Ausser dem Fleck bei R_f 0,7–0,89 für das unveränderte bioaktive 890A₁ wird ein neuer bioaktiver Fleck bei R_f 0,44–0,47 beobachtet, der auf Desacetyl-890A₁ zurückzuführen ist. Kontrollinkubationsmischungen aus Antibioticum + Puffer sowie aus beschallten Zellen + Puffer ergeben kein bioaktives Material bei R_f 0,44–0,47.

Beispiel 3

Desacetylierung von 890A₃

Das Antibioticum 890A₃ wird nach dem in Beispiel 2 für die Desacetylierung von 890A₁ beschriebenen Verfahren desacetyliert.

Beispiel 4

Herstellung von Desacetyl-890A₁

Sechs 250 ml-Erlenmeyer-Impfkolben, die je 50 ml Medium C enthalten, werden mit einem Teil einer Schrägröhrchenkultur von *Protaminobacter ruber* MB-3528 beimpft. Medium C hat die folgende Zusammensetzung:

Medium C	
Dextrose	20 g
Pharmamedia	8 g
Maisquellwasser (auf Nassbasis)	5 g
destilliertes Wasser	1000 ml
ph-Wert mit NaOH oder HCl auf 7 eingestellt	
N-Acetyläthanolaminlösung*	8,5 ml

* N-Acetyläthanolaminlösung

N-Acetyläthanolamin wird mit Wasser auf das 10fache verdünnt und membransterilisiert. Diese Lösung wird nach der Autoklavbehandlung zugesetzt.

Die Kolben werden einen Tag lang bei 28°C mit 220 U/min (Hub 5,1 cm) geschüttelt.

42 2-Liter-Produktionskolben, die je 400 ml Medium C enthalten, werden mit je 7 ml der Kultur aus diesen Impfkolben beimpft. Diese Produktionskolben werden 6 Tage lang bei 28°C mit 220 U/min (Hub 5,1 cm) geschüttelt. Der Kolbeninhalt wird vereinigt und 15 Minuten lang mit 8000 U/min zentri-

fugiert. Die Zellen werden von dem Klumpen der Mediumfeststoffe abgeschabt und mit 0,05-molarer Kaliumphosphatpufferlösung (pH-Wert 7,4) zu einem Endvolumen von 1600 ml angemacht. Diese Suspension wird wiederum 15 Minuten lang mit 8000 U/min zentrifugiert. Die Zellen werden wieder von dem Klumpen der Mediumfeststoffe abgeschabt und mit 0,05-molarer Kaliumphosphatpufferlösung (pH-Wert 7,4) zu einem Endvolumen von 160 ml angemacht. Diese Suspension wird auf 5°C gekühlt, und Anteile von je 15 ml werden nacheinander der vorstehend beschriebenen Ultraschallbehandlung in 15 Sekunden-Takten unterworfen, bis keine weitere Abnahme der Trübung beobachtet wird, wenn eine 500fache Verdünnung der Suspension in Phosphatpuffer-Salzlösung der folgenden Zusammensetzung hergestellt wird:

Phosphatpuffer-Kochsalzlösung

NaCl	8,8 g
1-molarer Phosphatpuffer, pH-Wert 7,5*	10 ml
destilliertes Wasser	1000 ml

* 1-molarer Phosphatpuffer, pH-Wert 7,5

16 ml 1-molare KH₂PO₄-Lösung werden mit 84 ml

1-molarer K₂HPO₄-Lösung gemischt. Der pH-Wert des Phosphatpuffers wird durch Zusatz von etwas 1-molarer KH₂PO₄-Lösung oder 1-molarer K₂HPO₄-Lösung auf 7,5 eingestellt.

Zu 1 l 0,005-molarer Kaliumphosphatpufferlösung (pH-Wert 7,4) werden 250 mg Antibioticum 890A₁ zugesetzt. Dieses Gemisch wird mit 160 ml des Beschallungsextraktes von *Protaminobacter ruber* versetzt, der N-Acetylthienamycin-Amidohydrolase enthält. Das Gemisch wird 20 Stunden lang langsam mit einem Magnetrührer bei 28°C gerührt. Dann wird das Gemisch bei 10 000 g 15 Minuten lang zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit entfernt, auf 5°C gekühlt und mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 4,5 ± 0,2 eingestellt. Die Trennung des Desacetyl-890A₁ von dem nicht-hydrolysierten Antibioticum und von anderen Bestandteilen des Reaktionsgemisches wird folgendermassen durchgeführt, wobei man eine Scheibendiffusions-Bioanalyse gegen *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P und Messungen der mit Hydroxylamin auslöschbaren Extinktion bei 297 nm (wie unter der Überschrift «Analysenverfahren für Thienamycin» beschrieben) anwendet, um die Leistung der Reinigungsverfahren zu überwachen.

Das angesäuerte, zentrifugierte Reaktionsgemisch wird mit einer Geschwindigkeit von 12 ml/min an 120 ml «Dowex»-50×4 in der Natriumform (300–840 µ) adsorbiert. Das Adsorbat wird mit 120 ml entmineralisiertem Wasser gewaschen und dann mit einer Geschwindigkeit von 6 ml/min mit 2%iger wässriger Pyridinlösung eluiert. Sobald 75 ml Eluat durch die Kolonne gelaufen sind, werden die folgenden 240 ml vereinigt, auf 25 ml eingeeengt und das Konzentrat auf einen pH-Wert von 7 eingestellt.

Die 25 ml Konzentrat werden mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min an 25 ml «Dowex»-1×2-Harz in der Chloridform (150–300 µ) adsorbiert. Das Harz wird mit der gleichen Geschwindigkeit mit entmineralisiertem Wasser eluiert. Nach Durchlauf von 25 ml durch die Kolonne werden die folgenden 50 ml vereinigt, auf einen pH-Wert von 7 neutralisiert und zu 10 ml eingeeengt. Dieses Konzentrat wird mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 6,3 eingestellt und in ein Bett von «Dowex»-50×8-Harz (37–74 µ) in der 2,6-Lutidiniumform eingegeben, das einen Durchmesser von 1 cm und eine Höhe von 50 cm aufweist und zuvor mit 0,1-molarem 2,6-Lutidinatpuffer (pH-Wert 6,3) ins Gleichgewicht gebracht worden ist. Man eluiert mit dem Puffer mit einer Geschwindigkeit von

1 ml/min. Sobald 25 ml Eluat aus der Kolonne ausgelaufen sind, werden die folgenden 35 ml vereinigt und gefriergetrocknet.

Die gefriergetrockneten Feststoffe werden in 0,5 ml 0,1-molarem 2,6-Lutidinacetatpuffer (pH-Wert 7,0) gelöst. Die Lösung wird in eine Kolonne mit «Bio-Gel» P-2 (37–74 μ) eingegeben, die einen Durchmesser von 1 cm und eine Höhe von 50 cm hat und zuvor mit diesem Puffer ins Gleichgewicht gebracht worden ist. Dann wird das Gel mit dem gleichen Puffer mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min entwickelt. Nach dem Durchlauf von 25 ml Eluat durch die Kolonne werden die folgenden 10 ml vereinigt und gefriergetrocknet.

Die gefriergetrockneten Feststoffe werden in 4 ml destilliertem Wasser gelöst und in eine Kolonne mit einem Durchmes-

ser von 1,7 cm eingegeben, die mit 90 ml vorgewaschenem XAD-2 beschickt und bei 5°C mit destilliertem Wasser ins Gleichgewicht gebracht worden ist. Vor der Verwendung wird das XAD-2 nacheinander mit 1) 5 Raumteilen 1n NaOH und
5 anschliessend mit entmineralisiertem Wasser, bis der Ablauf neutral reagiert, 2) 5 Raumteilen 1n HCl und anschliessend mit entmineralisiertem Wasser, bis der Ablauf neutral reagiert, 3) je 5 Raumteilen Methanol, Aceton, 0,001-molarer Tetranatrium-EDTA-Lösung und schliesslich destilliertem Wasser
10 gewaschen. Nach dem Aufgeben der Probe giesst man zwei Anteile zu je 2 ml destilliertem Wasser nach. Die Kolonne wird mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/min mit destilliertem Wasser gewaschen. Das Eluat wird in Fraktionen zu je 4 ml aufgefangen. Die Fraktionen 25 bis 58 werden vereinigt und
15 gefriergetrocknet; man erhält Desacetyl-890A₁.