

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT (11) 145504 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN



(21) Ansøgning nr. 1639/77

(51) Int.Cl.³ C 12 P 17/18

(22) Indleveringsdag 13. apr. 1977

C 07 D 487/04

(24) Løbedag 13. apr. 1977

(41) Alm. tilgængelig 29. okt. 1977

(44) Fremlagt 29. nov. 1982

(86) International ansøgning nr. -

(86) International indleveringsdag -

(85) Videreførelsesdag -

(62) Stamansøgning nr. -

(30) Prioritet 28. apr. 1976, 680831, US

(71) Ansøger MERCK & CO. INC., Rahway, US.

(72) Opfinder Patrick Joseph Cassidy, US: Robert Thomas Goegelman,
US: Edward Olley Stapley, US: Sebastian Hernandez, ES.

(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Hofman-Bang & Boutard.

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af
det antibiotiske stof 890A₂
og/eller det antibiotiske stof
890A₅ og farmaceutisk acceptable
salte deraf.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte antibiotiske stoffer 890A₂ og/eller 890A₅ med den i krav 1 angivne almene formel eller farmaceutisk acceptable salte deraf, hvilke forbindelser er effektive til at inhibere væksten af forskellige gram-negative og gram-positive mikroorganismer.

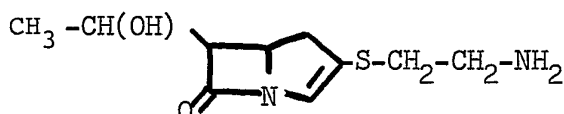
Opdagelsen af penicillinets bemærkelsesværdige antibiotiske egenskaber har stimuleret forskningen på dette område, hvorved der er fundet mange andre værdifulde antibiotiske stoffer, såsom andre penicilliner, cephalosporiner, streptomycin, bacitracin, tetracycliner, chloramphenicol og erythromyciner. I almindelighed

0
+
3
3
4
1
5

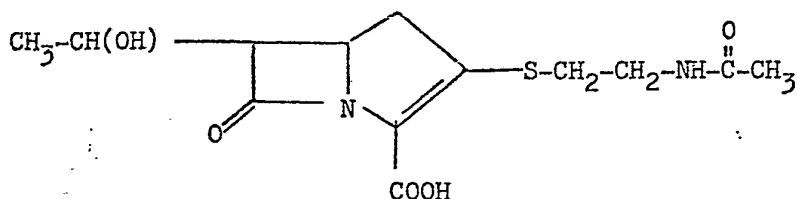
er den antibakterielle aktivitet af hvert af disse antibiotiske stoffer begrænset, således at visse klinisk vigtige pathogene bakterier ikke hæmmes. F.eks. er nogle principielt kun aktive over for gram-positive bakterier. Erhvervet resistens under den omfattende anvendelse af eksisterende antibiotiske stoffer til behandling af bakterieinfektioner har endvidere forårsaget alvorlige resistensproblemer.

Som følge af manglerne ved de hidtil kendte antibiotiske stoffer har man søgt at finde andre antibiotika, som vil være aktive over for et større område af pathogener samt over for resistente stammer af særlige mikroorganismer.

Under denne forskning har man opdaget antibiotiske stoffer tilhørende thienamycin-gruppen, hvortil de ifølge opfindelsen fremstillede antibiotiske stoffer hører. Fra beskrivelsen til dansk patentansøgning nr. 5280/75 kendes således en fremgangsmåde til fremstilling af det antibiotiske stof thienamycin med formlen



ved dyrkning af en stamme af *Streptomyces Cattleya*. Fra beskrivelsen til dansk patentansøgning nr. 4971/76 kendes en fremgangsmåde til fremstilling af antibiotikum 890A₁ og/eller antibiotikum 890A₃, som er isomere forbindelser med formlen



Ved dyrkning af en stamme af *Streptomyces flavogriseus*.

Det har nu vist sig, at stammer af arten *Streptomyces flavogriseus* danner ovennævnte hidtil ukendte antibiotiske stoffer 890A₂ og 890A₅, og fremgangsmåden ifølge opfindelsen er i overensstemmelse hermed ejendommelig ved det i kravets kendetegnende del anførte. Anvendelige stammer er deponeret uden restriktioner for tilgængelighed i kultursamlingen tilhørende Northern Regional Laboratories,

Northern Utilization Research and Development Division, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Ill. og er registreret under henholdsvis nr. NRRL 8139 og 8140. *Streptomyces flavogriseus* NRRL 8139 og NRRL 8140 producerer begge antibiotika 890A₂ og 890A₅, som er isoleret i praktisk taget ren form fra gæringsvæsken.

De morfologiske og dyrkningsmæssige egenskaber for *Streptomyces flavogriseus* NRRL 8139 fremgår af efterfølgende tabel.

Morphologi - Sporophorer er forgrenede, lige til buede kæder af sporer, danner totter. Kæderne er mere end 10 sporer i længde. Sporerne er sfæriske til ovale - 0,9 μ x 1,2 μ (970x).

Dyrkningsmæssige egenskaber

Hvedemel agar

Vegetativ vækst - Bagside gullig tan, pergamentlignende vækst;
Luftmycelium - Lysegråt kantet med medium gråt
Opløseligt pigment - Intet.

Czapek Dox agar (saccharose nitrat agar)

Vegetativ vækst - Bagside brun kantet med mørkebrun;
Luftmycelium - Medium gråt, fløjlsagtigt;
Opløseligt pigment - Svag brunfarvning af medium.

Æg albumin agar

Vegetativ vækst - Bagside gullig tan kantet med brunt;
Luftmycelium - Medium gråt blandet med gulliggråt (2dc) og grågult (2db);
Opløseligt pigment - Lyst gullig tan.

Glycerol asparagin agar

Vegetativ vækst - Bagside gullig tan, flad, spredt;
Luftmycelium - Fløjlsagtig, lysegråt med stærk gullig tone til gråt (2dc);

Opløseligt pigment - Intet.

Uorganiske salte-stivelse agar

- Vegetativ vækst - Bagside - brun;
Luftmycelium - Medium gråt, fløjlsagtigt;
Opløseligt pigment - Lyst gullig tan.
- Gærekstrakt-dextrose + salte agar
Vegetativ vækst - Bagside brun kantet med meget mørkebrunt;
Luftmycelium - Mørkegråt blandet med lysegråt, fløjlsagtigt;
Opløseligt pigment - Intet.
- Gærekstrakt-maltekstrakt agar
Vegetativ vækst - Bagside-mørkebrun;
Luftmycelium - Mørkegråt, fløjlsagtigt;
Opløseligt pigment - Intet.
- Skummet mælk agar
Vegetativ vækst - Tan;
Luftmycelium - Sparsomt, gråligt;
Opløseligt pigment - Svag brunfarvning af medium;
Hydrolyse af casein - God.
- Lakmusmælk
Vegetativ vækst - Moderat vækstring, mørk tan;
Luftmycelium - Intet;
Farve - Purpur;
Koagulation og/eller peptonisation - Komplet peptonisation;
bliver alkalisk, pH = 8,2.
- Skummet mælk
Vegetativ vækst - Moderat vækstring, tan;
Luftmycelium - Intet;
Opløseligt pigment - Tan;
Koagulation og/eller peptonisation - Komplet peptonisation,
bliver alkalisk, pH = 8,0.
- Tyrosin agar
Vegetativ vækst - Bagside mørkebrun;
Luftmycelium - Mørkegråt;
Opløseligt pigment - Svag brunfarvning af medium;
Dekomponering af tyrosin - Ingen.
- Pepton-jern-gærekstrakt agar
Vegetativ vækst - Tan;
Luftmycelium - Sparsomt, gråligt;
Opløseligt pigment - Intet;
Melanin - Intet;
H₂S-produktion - Ingen.

Næringsagar

Vegetativ vækst - Bagside lysegrålig brunkantet med mørkere gråbrunt;

Luftmycelium - Lysegråt kantet med mørkegråt;

Opløseligt pigment - Intet.

Næringsstivelseagar

Vegetativ vækst - Tan kantet med gråt

Luftmycelium - Medium gråt kantet med mørkegråt;

Opløseligt pigment - Intet;

Hydrolyse af stivelse - God

Næringsgelatineagar

Vegetativ vækst - Farveløs kantet med mørkegråt;

Luftmycelium - Grålig-hvidt;

Opløseligt pigment - Intet;

Smeltning af gelatine - God.

Kartoffelstykker

Vegetativ vækst - God vækst, kraftig rynket;

Luftmycelium - Gråt til grønlig-gråt;

Opløseligt pigment - Svag brunfarvning af medium.

Loefflers blodserum

Vegetativ vækst - cremefarvet;

Luftmycelium - Intet;

Opløseligt pigment - Intet;

Smeltning - Ingen.

Gelatinestik

Vegetativ vækst - cremefarvet;

Luftmycelium - Intet;

Opløseligt pigment - Intet;

Smeltning af gelatine - God.

Alle de ovenfor rapporterede observationer blev taget efter tre ugers dyrkning ved 28° C, med mindre andet er anført. pH-værdierne af medierne, som anvendtes ved disse studier, var tilnærmelsesvis neutrale, nemlig pH = 6,8 - 7,2. De anvendte farvebetegnelser er i overensstemmelse med definitionerne i Color Harmony Manual, 4. udgave (1958), Container Corporation of America, Chicago, Illinois.

Streptomyces flavogriseus NRRL 8139 blev også prøvet for evnen til at udnytte eller assimilere forskellige carbonhydrater. Til dette formål blev mikroorganismen dyrket på et basalt syntetisk medium

(Pridham and Gottlieb) indeholdende 1% af carbonhydratet ved 28° C i tre uger. pH-værdien af de anvendte medier var tilnærmelsesvis neutral (6,8 - 7,2). Tabel I viser udnyttelsen af disse carbonhydratkilder af *Streptomyces flavogriseus* NRRL 8139, idet + angiver god vækst, $\pm$ dårlig vækst og - ingen vækst på det pågældende carbonhydrat.

TABEL I

Glucose	+	Maltose	+
Arabinose	+	Mannitol	+
Cellulose	-	Mannose	+
Fructose	+	Raffinose	-
Inositol	-	Rhamnose	+
Lactose	+	Saccharose	$\pm$
Xylose	+		

Mængden af vækst ved forskellige temperaturer og oxygenbehovet af mikroorganismen er følgende:

Temperaturområde (Gærekstrakt-dextrose + saltagar);

28° C - God

37° C - God vegetativ vækst; ikke lufthyfer

50° C - Ingen vækst

Oxygen-behov (Stikkultur i gærekstrakt-dextrose + saltagar);

Aerob

De morphologiske og dyrkningsmæssige egenskaber for *Streptomyces flavogriseus* NRRL 8140 fremgår af efterfølgende tabel.

Morphologi - Sporophorer er forgrenede, lige til buede kæder af sporer, danner totter. Kæderne er mere end 10 sporer i længden. Sporerne er sfæriske til ovale - 0,9 μ x 1,2 μ (970x).

Dyrkningsmæssige egenskaber

Havremelagar

Vegetativ vækst - Bagside gullig tan kantet med mørkebrunt;

Luftmycelium - Lysegråt kantet med medium gråt;

Opløseligt pigment - Intet.

Czapek Dox agar (saccharose nitrat agar)

Vegetativ vækst - Bagside brun kantet med mørkebrunt;

Luftmycelium - Medium gråt, fløjlsagtigt;
Opløseligt pigment - Intet.

Æg albumin agar

Vegetativ vækst - Bagside grålig tan med sektioner af kraftig
gullig tan;
Luftmycelium - Sektioner af medium gråt, grålig hvidt og gullig
gråt (2dc);
Opløseligt pigment - Meget lys tan.

Glycerol asparagin agar

Vegetativ vækst - Gullig tan;
Luftmycelium - Sparsomt, gråligt;
Opløseligt pigment - Intet.

Uorganiske salte-stivelse agar

Vegetativ vækst - Bagside gråligt cremefarvet;
Luftmycelium - Medium gråt, fløjlsagtigt;
Opløseligt pigment - Intet.

Gærekstrak-dextrose + salte agar

Vegetativ vækst - Bagside - mørkebrun;
Luftmycelium - Mørkegråt blandet med lysegråt, fløjlsagtigt;
Opløseligt pigment - Intet.

Gærekstrakt-maltekstrakt agar

Vegetativ vækst - Bagside mørkebrun;
Luftmycelium - Mørkegråt, fløjlsagtigt;
Opløseligt pigment - Intet.

Pepton-jern-gærekstrakt agar

Vegetativ vækst - Tan;
Luftmycelium - Intet;
Opløseligt pigment - Intet;
Melanin - Intet;
H₂S-produktion - Ingen.

Næringsagar

Vegetativ vækst - Lys tan;
Luftmycelium - Intet.
Opløseligt pigment - Intet.

Næringsstivelseagar

Vegetativ vækst - Cremefarvet;
Luftmycelium - Intet;
Opløseligt pigment - Intet;
Hydrolyse af stivelse - God.

Næringsgelatine agar

- Vegetativ vækst - Cremefarvet;
- Luftmycelium - Intet;
- Opløseligt pigment - Intet;
- Smeltning af gelatine - God.

Gelatinestik

- Vegetativ vækst - Tan;
- Luftmycelium - Intet;
- Opløseligt pigment - Intet;
- Smeltning af gelatine - komplet.

Skummetmælk agar

- Vegetativ vækst - Tan;
- Luftmycelium - Intet;
- Opløseligt pigment - Intet;
- Hydrolyse af casein - God.

Lakmusmælk

- Vegetativ vækst - Tan vækstring;
- Luftmycelium - Intet;
- Farve - brunlig purpur;
- Koagulation og/eller peptonisation - Komplet peptonisation,
bliver alkalisk, pH = 8,0.

Skummetmælk

- Vegetativ vækst - Tan, moderat vækstring;
- Luftmycelium - Intet;
- Opløseligt pigment - Lysebrunt;
- Koagulation og/eller peptonisation - Komplet peptonisation,
bliver alkalisk pH = 8,5.

Kartoffelstykker

- Vegetativ vækst - God, tanfarvet;
- Luftmycelium - Meget sparsomt, hvidligt;
- Opløseligt pigment - Intet.

Loefflers blodserum

- Vegetativ vækst - Cremefarvet;
- Luftmycelium - Intet;
- Opløseligt pigment - Intet;
- Smeltning - Ingen.

Tyrosinagar

- Vegetativ vækst - Tan;
- Luftmycelium - Intet;
- Opløseligt pigment - Svag brunfarvning af mediet;

Dekomponering af tyrosin - Meget svag.

Alle ovennævnte observationer blev gjort efter tre ugers dyrkning ved 28° C, medmindre andet er anført. pH-værdien af medierne var tilnærmelsesvis neutral, nemlig 6,8 - 7,2. De anvendte farvebetegnelser er i overensstemmelse med definitionerne i Color Harmony Manual, 4. udgave (1958), Container Corporation of America, Chicago, Illinois.

Streptomyces flavogriseus NRRL 8140 blev også prøvet for evne til at udnytte eller assimilere forskellige carbonhydrater. Til dette formål blev mikroorganismen dyrket i et basalt syntetisk medium (Pridham and Gottlieb) indeholdende 1% af carbonhydratet ved 28° C i tre uger. pH-værdien af de anvendte medier var tilnærmelsesvis neutral (6,8 - 7,2). Tabel II viser udnyttelsen af disse carbonhydratkilder af *Streptomyces flavogriseus* NRRL 8140, idet + angiver god vækst, ± dårlig vækst og - ingen vækst på det pågældende carbonhydrat.

TABEL II

Glucose	+	Maltose	+
Arabinose	+	Mannitol	+
Cellulose	-	Mannose	+
Fructose	+	Raffinose	±
Inositol	±	Rhamnose	+
Lactose	+	Saccharose	±
Xylose	+		

Mængden af vækst ved forskellige temperaturer og oxygenbehovet for mikroorganismen fremgår af følgende:

Temperaturområde (Gærekstrakt-dextrose + saltagar);

28° C - God

37° C - Moderat vegetativ vækst, ikke lufthyfer

50° C - Ingen vækst

Oxygen-behov (Stikkultur i gærekstrakt-dextrose + saltagar);

Aerob

Som carbonkilde i næringsmediet anvendes i almindelighed carbonhydrater, såsom f.eks. dextrose, glucose, fructose, maltose, saccharose, xylose og mannitol, samt stivelse, f.eks. dextrin, korn, f.eks. havre, rug, majsstivelse, majsmel og lignende, alene eller i kombination. Den nøjagtige mængde carbonhydratkilde i det anvendte medium afhænger delvis af mediets øvrige bestanddele, men i almindelighed er det hensigtsmæssigt at anvende carbonhydrat i en mængde mellem 1% og 6% efter vægt af mediet. Disse carbonkilder kan anvendes enkeltvis, eller flere sådanne carbonkilder kan forenes i mediet. I almindelighed kan benyttes mange proteinholdige stoffer som nitrogenkilde ved gæringsprocessen. Egnede nitrogenkilder omfatter f.eks. gærhydrolysater, primær gær, sojabønneemel, bomuldsfrømel, hydrolysater af casein, majsstøbevæske, distiller's solubles eller tomatpasta. Kilderne for nitrogen, enten alene eller i kombination, anvendes i mængder mellem 0,2% og 6% efter vægt af det vandige medium.

Blandt uorganiske næringssalte, som kan forekomme i dyrkningsmediet, er de sædvanlige salte, som kan give ioner af natrium, kalium, ammonium, calcium, magnesium, fosfat, sulfat, chlorid og carbonat. Også spormetaller, såsom cobalt, mangan og jern, bør være til stede.

Gæringen udføres ved temperaturer mellem 20° og 37° C; for optimale resultater foretrækkes det dog at udføre gæringen ved temperaturer mellem 23° og 28° C. Begyndelses-pH-værdien af næringsmediet ved dyrkning af *Streptomyces flavogriseus* til fremstilling af antibiotika 890A₂ og 890A₅ kan variere fra 6,0 til 8,0.

Selv om de antibiotiske stoffer 890A₂ og 890A₅ produceres både ved overfladekulturer og neddykkede kulturer, udføres gæringen i neddykket tilstand.

Ved gæring i lille målestok er det hensigtsmæssigt at pøde et egnet næringsmedium med den udvalgte kultur, som derefter overføres til et produktionsmedium, hvorpå gæringsprocessen bringes til at forløbe ved konstant temperatur på ca. 28° C i et rysteapparat i flere dage.

Gæringen indledes i en steril kolbe af næringsmedium ved et eller flere podningstrin. Næringsmediet til podning kan være enhver eg-

net kombination af carbon- og nitrogenkilder. Podeflasken rystes ved konstant temperatur ved ca. 28° C i en dag, eller indtil væksten er tilfredsstillende, og en del af den dannede vækst anvendes til podning enten af næste podningstrin eller af produktionsmediet. Hvis der anvendes flere podetrin, udvikles de i det væsentlige på samme måde, d.v.s. indholdet af kolben fra sidste podningstrin anvendes til podning af produktionsmediet. De podede kolber rystes ved konstant temperatur i flere dage, og efter afslutningen af dyrkningsperioden bliver kolbeindholdet centrifugeret eller filtreret.

Ved arbejde i stor målestok foretrækkes det at udføre gæringen i en egnet tank, der er udstyret med omrører og luftningsorganer for gæringsmediet. Ved denne metode indføres næringsmediet i en tank, som steriliseres ved opvarmning til temperaturer op til 120° C. Efter afkøling bliver det steriliserede medium podet med en forud dyrket podekultur, og gæringen bringes til at forløbe i et tidsrum på f.eks. 1 - 6 dage under omrøring og/eller luftning af næringsmediet, medens temperaturen opretholdes ved 24° til 28° C. Denne metode til fremstilling af antibiotika 890A₂ og 890A₅ er særlig egnet til fremstilling af store mængder antibiotika.

Fysiske og kemiske egenskaber for antibiotika 890A₂ og 890A₅

Egenskaber af antibiotikum 890A₂

Antibiotikum 890A₂ er et surt stof, som bevæger sig mod den positive pol ved elektroforese ved neutralt pH.

Natriumsaltet af antibiotikum 890A₂ er et hvidt pulver, som lyophiliseres fra vandig opløsning, og som er let opløseligt i vand.

Det ultraviolette absorptionsspektrum har maxima ved 308 og 228 nm og et minimum ved 262 nm. E% ved 308 nm af natriumsaltet af antibiotikum 890A₂ i vand ved neutral pH er vurderet til større end 490. Forholdet mellem absorptionsværdierne, A_{308}/A_{260} , er 1,91, og A_{308}/A_{228} er 1,02 for de bedst opnåede prøver; tegn på små mængder urenheder, som resterer i disse prøver, antyder at forhold-

dene kan være en smule højere for en prøve af særlig renhed.

Mere end 80% af absorptionen ved 308 nm kan fjernes ved omsætning med hydroxylamin, og en tilsvarende formindskelse observeres ved reaktion med cystein. Absorptionen ved 260 nm efter sådanne reaktioner forøges med ca. en fjerdedel af størrelsen af A_{308} -formindskelsen. Under betingelserne beskrevet i sektionen med overskriften Bioforsøg III til bestemmelse af $HAEA_{308}$ -værdier viser reaktionskinetikken sig at være af første orden med en halveringstid ved stuetemperatur mellem 0,5 og 1,5 minutter.

I efterfølgende tabel er anført 100 MHz-NMR-signaler for $890A_2$ -natriumsalt i D_2O i forhold til den interne standard, natrium-2,2-dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat, i det efterfølgende anført som DSS; kemiske skift er angivet i ppm, og koblingskonstanten i Hz; den tilsyneladende multiplicitet er anført.

1,33 (d, $J=6$, CH_3-CH); 2,07 (s, $CH_3C=O$);
 3,15 (m, $C-CH_2-C$); 3,69 (m, $>CH-C=O$);
 $\sim 4,3$ ($>CHN$ og $>CH-OH$), 6,09 og 7,12 (dubletter, $J=13,5$,
 $S-CH=CH-N$).

Den antibiotiske aktivitet for $890A_2$, målt på *Vibrio percolans* ATCC 8461 som beskrevet i sektionen med overskriften Bioforsøg I, er ca. 180 enheder pr. $HAEA_{308}$ -enhed

Egenskaber for antibiotikum $890A_5$

Antibiotikum $890A_5$ er et surt stof, som bevæger sig mod den positive pol ved elektroforese ved neutral pH.

Natriumsaltet er et hvidt pulver, når det lyophiliseres af en vandig opløsning.

Det ultraviolette absorptionsspektrum har maxima ved 308,5 og 228 nm og et minimum ved 262 nm. E% ved 308,5 nm af en opløsning af natriumsaltet af antibiotikum $890A_5$ i vand ved neutral pH er bedømt til 490 for en ren prøve. Forholdet mellem absorptionerne A_{308}/A_{260} er 2,0, og forholdet A_{308}/A_{228} er 1,3. Mere end 90% af absorptionen ved 308 nm kan fjernes ved omsætning med hydroxylamin,

hvorved fås et produkt med forøget absorption ved 260 nm. Størrelsen af A_{260} -forøgelsen er ca. en fjerdedel af A_{308} -formindskelsen. Kinetikken af A_{308} -formindskelsen under de beskrevne betingelser for måling af HAEA₃₀₈ viser sig at være af første orden, idet halveringstiden ved stuetemperatur ligger mellem 1 og 3 minutter.

Det cirkulære dichroisme-spektrum af 890A₅ har et positivt maximum ved 304 nm med en specifik ellipticitet på 7189 grader-ml pr. decimeter-gram, et nulpunkt for ellipticitet ved 257,5 nm og et negativt minimum ved 220 nm med en specifik ellipticitet på -21,218 grader-ml pr. decimeter-gram. Ved beregning af disse værdier blev koncentrationen af 890A₅ bedømt ud fra absorptionen ved 308 nm under anvendelse af en E%-værdi på 490 ved den nævnte bølgelængde.

I efterfølgende tabel er anført 100 MHz-NMR-signaler for 890A₅-natriumsalt i D₂O i forhold til den interne standard DSS; kemiske skift er angivet i ppm, og koblingskonstanterne i Hz; de tilsyneladende multipliciteter er angivet.

1,29 (d, J= 6,2, $\underline{\text{CH}}_3\text{-CH}$); 2,05 (s, $\text{CH}_3\text{-C=O}$);
 3,09 (app. d af d, $\text{C-}\underline{\text{CH}}_2\text{-C}$); 3,41 (d af d, J= 5,0,
 3,0, >CH-C=O); 4,16 (m, >CH-N og >CH-OH); 6,00
 og 7,11 (doubletter, J= 13,8, S-CH=CH-N).

Den antibiotiske aktivitet af 890A₅, målt på Vibrio percolans ATCC 8461, er 12 enheder pr. HAEA₃₀₈-enhed.

Massespektral-Analyse af 890A₂ og 890A₅

Massespektraldata for 890A₅ er opnået på trimethylsilyl-derivater fremstillet af ammoniumsalte af det antibiotiske stof med bis-trimethylsilyltrifluoracetamid i dimethylformamid. Omdannelse af natriumsaltet af det antibiotiske stof til ammoniumsaltene udføres ved anvendelse af ammoniumsaltet af en sur ionbytterharpiks.

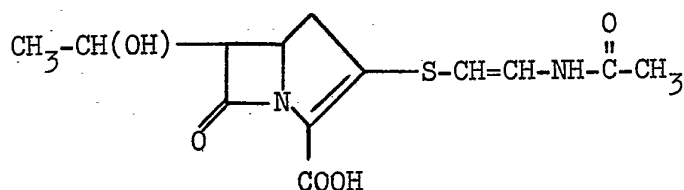
Trimethyl-silylering af 890A₂ og 890A₅ resulterer i tre forskellige derivater: et di- og et tri-methylsilyl-derivat (M.V. 456 og 528, respektivt) og en lille mængde tetra-trimethylsilyl-derivat af et

hydrolyseret produkt (M.V. 618), hvori β -lactam-ringen er åben.

Værdierne for de vigtigste massespektrale fragmenter er givet nedenfor:

di-trimethylsilyl-derivat: 441; 229; 298 og 84;
tri-trimethylsilyl-derivat: 513; 371 og 156;
tetra-trimethylsilyl-derivat (kun signal med lav resolution observeret): 618 og 603.

Antibiotika 890A₂ og 890A₅ er isomere med molekylstrukturen:



Antibiotika 890A₂ og 890A₅ karakteriseres yderligere ved de følgende antibiotiske spektrum-profiler.

Prøven til bestemmelse af den antibiotiske spektrum-profil for antibiotikum 890A₂ udføres ved mætning af papirskiver med en diameter på 6,35 mm i en opløsning af antibiotikum 890A₂ i 5% methanol ved en koncentration på 5 μ g/ml, lufttørring af de mættede papirskiver og anbringelsen af disse på overfladen af 100 x 15 mm petriplader indeholdende 5 ml podet næringsagar plus 0,2% gærekstrakt.

Prøven til bestemmelse af den antibiotiske spektrum-profil for antibiotikum 890A₅ udføres ved anvendelse af en 0,015 ml dråbe af en 33 μ g/ml vandig opløsning af det antibiotiske stof på overfladen af en 100 x 15 mm petriplade indeholdende 5 ml podet næringsagar plus 0,2% gærekstrakt. Resultaterne, udtrykt som diameter i millimeter af inhiberingszonen, fremgår af tabel III.

Spektrene for antibiotikum 890A₂ og 890A₅ er næsten ens, bortset fra resistensen af 890A₅ mod en inaktivering med Difco penicilli-

nase og med lactamase(r) produceret af en cephalosporin C-resistent stamme af *Vibrio percolans* (MB-2566). Resultaterne angiver også, at antibiotikum 890A₂ er væsentligt mere aktivt end 890A₅.

TABEL III

In Vitro Antibakteriell Spektrum-Profil (ASP) af Antibiotika 890A₂ og 890A₅

<u>Organisme</u>	<u>Merck No.</u>	<u>ATCC No.</u>	<u>Inhib. Zone Diam., mm</u>	
			<u>890A₂ - 5 µg./ml.</u>	<u>890A₅ - 33 µg./ml.</u>
<u>Bacillus sp.</u>	MB-633	--	40	18
<u>Proteus vulgaris</u>	MB-1012	--	11	23
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	MB-979	--	0	0
<u>Serratia marcescens</u>	--	990	23	29
<u>Staphylococcus aureus</u>	--	6538 P	34	34
<u>Bacillus subtilis</u>	--	6633	42	27
<u>Sarcina lutea</u>	--	9341	42	40
<u>Staphylococcus aureus</u>	MB-698	--	30	35
<u>Streptococcus faecalis</u>	MB-753	--	12	0
<u>Alcaligenes faecalis</u>	--	213	34	25
<u>Brucella bronchiseptica</u>	--	4617	29	22
<u>Salmonella gallinarum</u>	MB-1287	--	33	26
<u>Vibrio percolans</u>	--	8461	31	32
<u>Xanthomonas vesicatoria</u>	MB-815	--	29	20

TABEL III (fortsat)

<u>Proteus vulgaris</u>	--	21100	30	27
<u>Escherichia coli</u>	MB-1418	--	32	27
<u>Pseudomonas stutzeri</u>	--	11607	19	14
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	MB-1264	--	31	27
<u>Aerobacter aerogenes</u>	MB-835	--	27	24
<u>Erwinia atroseptica</u>	--	4466	26	21
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	MB-2824	--	13	0
<u>Corynebacterium pseudodiph.</u>	--	9742	35	33
<u>Escherichia coli</u>	--	9637	29	24
<u>Streptococcus faecium</u>	MB-2820	--	22	0
<u>Streptococcus agalactiae</u>	MB-2875	--	32	27
<u>Vibrio percolans</u> resistant to ceph. C)	MB-2566	--	11	35
<u>Proteus vulgaris</u> (episome) ^a	MB-2112	--	33	23
<u>Proteus mirabilis</u>	MB-3126	--	22	20
<u>Staphylococcus aureus</u> (res. methicillin)	MB-2949	--	11	15
<u>Vibrio percolans</u> + 2 x 10 ⁵ units/ml. penicillinase	MB-1272	--	7	40
<u>Vibrio percolans</u> + <u>Aerobacter</u> <u>Lactamase</u>	MB-1272	--	31	36

a dette episom giver resistens mod tetracyclin, chloramphenicol, kanamycin og streptomycin ved en koncentration på 20 µg/ml og neomycin ved en koncentration på 25 µg/ml og sulfapræparater.

Antibiotikum 890A₂ udviser in vivo aktivitet mod gram-negative og gram-positive organismer og er derfor velegnet til bekæmpelse af bakterieinfektioner på dyr og mennesker. Ved bestemmelse af in vivo aktiviteten opløses antibiotikum 890A₂ i 0,15 M NaCl, 0,01 M natriumphosphat, pH = 7,0, og fortyndes med vand til opnåelse af fem firdobbelte koncentrationer af lægemiddel for afprøvning. Hvide schweiziske hunmus med en middelvægt på 21 g blev inficeret intraperitonealt med prøveorganismen suspenderet i væsken. Antallet af injicerede organismer blev bestemt ved standard pladetælling. På infektionstidspunktet og 6 timer senere blev nogle af musene behandlet intraperitonealt med det antibiotiske stof. Fem mus blev anvendt for hver koncentration af lægemidlet. Yderligere to mus, ikke inficerede, blev behandlet med det antibiotiske stof til bestemmelse af, hvorvidt mængden af injiceret stof var giftigt. Kontroller på fem mus hver med flere fortyndinger af den inficerede kultur blev benyttet ved hver prøve for at beregne det antal organismer, som var dødelig for 50 % af de inficerede, ikke-behandlede mus (LD₅₀). Denne beregning blev foretaget med overlevelsesdata den syvende dag efter infektion, på hvilket tidspunkt mængden af lægemiddel, som beskytter 50 % af de inficerede mus (ED₅₀) også blev beregnet.

Alle dyr, som blev inficeret på denne måde og ikke blev behandlet med antibiotikum, døde inden for 48 timer efter infektionen. Effektiviteten af det antibiotiske stof 890A₂ med en aktivitet på 59 enheder/ml over for *Salmonella schottmuellari* MB-2837 fremgår af det efterfølgende:

Enh/ml. ^a	Rute	ED ₅₀ x doser enh.
59	ip	19

^a1 enh/ml er defineret under overskriften Bioforsøg I.

Antibiotika 890A₂ og 890A₅ er værdifulde antibiotiske stoffer, som er aktive over for forskellige gram-positive og gram-negative bakterier og derfor finder anvendelse i den humane og veterinære medicin. Forbindelserne anvendes alene eller i kombination med hinanden som antibakterielt lægemiddel for be-

handling af infektioner forårsaget af gram-positive eller gram-negative bakterier, f.eks. over for Staphylococcus aureus, Proteus mirabilis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae og Salmonella schottmuellari. De omhandlede antibakterielle stoffer kan også anvendes som tilsætningsmidler til dyrefoder, til konservering af foderstoffer og som desinfektionsmidler. F.eks. kan de anvendes i vandige præparater i koncentrationer fra 0,1 til 100 dele af antibiotikum pr. milliondel opløsning eller fortrinsvis i koncentrationer fra 1 til 10 dele antibiotikum pr. million del opløsning for at ødelægge og inhibere væksten af skadelige bakterier på medicinske og dentale instrumenter og som baktericider til industriel anvendelse f.eks. i vandholdige malinger og i industrivand til papirmøller til inhibering af væksten af de skadelige bakterier.

De antibiotiske stoffer, som fremstilles ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, kan anvendes i forskellige farmaceutiske præparater som eneste aktive bestanddel eller i kombination enten med et eller flere antibiotiske stoffer eller med et eller flere farmakologisk aktive stoffer. Som eksempel på det førstnævnte kan nævnes et aminocyclitol-antibiotikum, såsom gentamycin, der kan indføres for at formindske fremkomsten af resistente organismer. Som eksempel på sidstnævnte kan diphenoxylat og atropin kombineres i dosisform til behandling af gastroenteritis. De antibiotiske stoffer kan anvendes i kapselform eller som tabletter, pulvere eller flydende opløsninger eller som suspensioner eller eliksirer. De kan indgives oralt, topisk, intravenøst eller intramuskulært. Yderligere kan antibiotika 890A₂ og 890A₅ anvendes i indbyrdes kombination.

Dosisstørrelsen afhænger af sådanne forhold som patientens vægt, infektionens art, indgiftsmåden og hyppigheden, idet den parenterale indgift foretrækkes ved almindelige infektioner, medens den orale indgift foretrækkes ved infektioner i fordøjelsesorganerne.

Ved behandling af bakterieinfektioner på mennesker indgives forbindelserne oralt eller parenteralt på i og for sig kendt måde i mængder fra 2 til 600 mg/kg/dag og fortrinsvis fra 5 til 100 mg/kg/dag, fortrinsvis opdelt i flere doser, f.eks. tre til fire gange daglig. De kan indgives i enhedsdoser, f.eks. 100, 330, 400 eller 1000 mg aktiv bestanddel med passende fysiologisk acceptable bære-medier eller fortyndingsmidler. Doserne har form af flydende præ-

parater, såsom opløsninger eller suspensioner, eller i fast form, såsom tabletter eller kapsler.

De ugiftige farmaceutisk acceptable salte af 890A₂ og 890A₅, er f.eks. farmakologisk acceptable salte dannet af uorganiske og organiske baser, herunder f.eks. metalsalte afledt af alkalimetall- eller jordalkalimetallhydroxider, carbonater eller bicarbonater, såsom afledt af natrium, kalium, ammonium og calcium, samt salte afledt af primære, sekundære eller tertiære aminer, såsom monoalkylaminer, dialkylaminer, trialkylaminer, lavere alkanolaminer, di-lavere-alkanolaminer, lavere alkylendiaminer, N,N-diaralkyl-lavere-alkylendiaminer, aralkylaminer, amino-substituerede lavere alkanoler, N,N-di-lavere alkylamino-substituerede lavere alkanoler, amino-, polyamino- og guanidino-substituerede lavere alkansyrer og nitrogen-holdige heterocycliske aminer. Repræsentative eksempler omfatter salte afledt af natriumhydroxid, ammoniumhydroxid, natriumcarbonat, natriumbicarbonat, kaliumcarbonat, kaliumhydroxid, calciumcarbonat, trimethylamin, triethylamin, piperidin, N-ethylpiperidin, morpholin, quinin, lysin, protamin, arginin, procain, ethanolamin, morfin, benzylamin, ethylendiamin, N,N'-dibenzylethylendiamin, diethanolamin, piperazin, dimethylaminoethanol, 2-amino-2-methyl-1-propanol, theophyllin og N-methylglucamin.

Saltene af de omhandlede forbindelser fremstilles på i og for sig kendt måde. F.eks. kan monosaltene, såsom mononatriumsaltet, fås ved behandling af et ækvivalent natriumhydroxid med et ækvivalent af produktet (I) i et egnet opløsningsmiddel. Også blandede salte med divalente kationer kan fremstilles ved at kombinere et mol af en divalent base med et mol af produktet (I) plus et ækvivalent af endnu en syre. I stedet kan salte fås ved behandling af et ækvivalent af en base med en divalent kation, såsom calciumhydroxid, med et ækvivalent af produktet (I). Saltene er farmakologisk acceptable ikke-giftige derivater, som kan anvendes som aktiv bestanddel i passende enhedsdoser. Disse kan også forenes med andre lægemidler til fremstilling af præparater med et bredt aktivitetsspektrum.

Gæringsvæsker indeholdende antibiotika 890A₂ og 890A₅ fremstillet ved den beskrevne dyrkning har aktiviteter fra

2 til 170 enheder pr. ml, når de prøves ved skive-diffusionsprøven under anvendelse af *Vibrio percolans* (ATCC 8461). De i disse gæringsvæsker indeholdte antibiotiske stoffer 890A₂ og 890A₅ kan udvindes og renses på flere måder. En sådan fremgangsmåde omfatter adsorption af antibiotika 890A₂ og 890A₅ på en stærkt basisk anionbytterharpiks. Typisk for sådanne stærkt basiske anionbytterharpikser er sådanne, som har en styren-divinyl-benzen-matrix, f.eks. polystyren-nucleær kvaternær ammonium-harpiks Dowex 1 x 2 (fremstillet af Dow Chemical Co., Midland, Michigan) på chlorid-cyclus. Andre repræsentative medlemmer af denne klasse af stærkt basiske ionbytterharpikser omfatter følgende: Duolite A-40, A-42, A-101, A-102 og A-114 (fremstillet af Chemical Process Co., Redwood City, California). Amberlite IRA-400, IRA-401 og IRA-410. I stedet kan anvendes en svagt basisk anionbytterharpiks, såsom Amberlite IRA-68. (Amberlite fremstilles af Rohm and Haas, Washington Square, Philadelphia 5, Pennsylvania).

Det adsorberede antibiotikum elueres let fra anionbytterharpiksen med saltopløsninger i 50 % (v/v) vandig methanol. Det således opnåede eluat kan om ønsket renses yderligere ved andre rensningsprocedurer. Således kan eluatet renses ved inddampning og gennemledning gennem en kolonne, der er pakket med en acrylester-polymer af intermediær polaritet, såsom XAD-7 eller 8, eller gennem en kolonne pakket med en polystyren, ikke-polær, hydrophob tværbundet divinyl-benzen-polymer, såsom XAD-1, 2 og 4, fortrinsvis XAD-2. (XAD-1, 2, 4, 7 og 8 fremstilles af Rohm and Haas, Washington Square, Philadelphia 5, Pennsylvania). Ved denne proces sker en delvis adskillelse af antibiotikum 890A₂ og 890A₅. Fraktioner med højt indhold af 890A₂ og fraktioner med højt indhold af 890A₅ opsamles hver for sig. Disse opsamlede fraktioner renses yderligere.

En metode til at opnå yderligere rensset antibiotikum 890A₂ og 890A₅ består i anvendelsen af gel-filtrering gennem polyacrylamid-gel med en porestørrelse, som udelukker molekyler med en molekylvægt større end 1800, såsom Bio-Gel P-2 (fremstillet af Bio.Rad, Richmond, California). Andre geler, såsom Sephadex G-10, kan også anvendes til afsaltning.

Den foretrukne procedure, hvorved antibiotika 890A₂ og 890A₅ kan

fås af høj renhed ud fra gæringsvæskerne, omfatter en centrifugering eller filtrering af væsken til fjernelse af faste stoffer; en adsorption af filtratet på en anionbytterharpiks, såsom Dowex-1 x 2 på chlorid-cyclus, og eluering med 3 % NaCl i 50 % (v/v) vandig methanol, som både koncentrerer og delvis renses de antibiotiske stoffer; passage over en kolonne af passende præpareret XAD-2, der tilbageholder de antibiotiske stoffer, hvorved Dowex-1 x 2 eluatet renses og afsaltes. Yderligere vil antibiotikum 890A₅ holdes mere tilbage end antibiotikum 890A₂, således at de to antibiotika delvis adskilles. Fraktionerne med højt indhold af 890A₂ og 890A₅ samles og renses yderligere. Chromatografi på en Dowex-1 x 2 minus 400 mesh harpiks under eluering med natriumchlorid og/eller ammoniumchlorid i 50 % vandig methanol, giver et produkt befriet for de fleste UV-absorberende urenheder (ammoniumchlorid anvendes til at opnå nogen pufringskapacitet i elueringsmidlet); og en afsaltning på Bio-Gel P-2 eller Sephadex G-10 fjerner hovedparten af saltet indført ved Dowex-1 x 2 chromatografi.

Når væske med lav aktivitet behandles ved ovennævnte procedure, kan slutmaterialet have en betydelig mængde (mere end 50%) af tilbageværende urenheder. Disse urenheder kan reduceres ved endnu en cyclus af chromatografi på Dowex-1 x 2, minus 400 mesh, med eluering med en opløsning indeholdende natriumchlorid og 50% isopropanol. Det er tilrådeligt ved isolering af antibiotisk stof fra væsker med lav aktivitet at udføre endnu en chromatografi med XAD-2. Derved opnås en yderligere rensning, fjernelse af resterende salt og delvis adskillelse af antibiotikum 890A₂ fra 890A₅. 890A₅ eluerer senere end 890A₂, og de to kan adskilles ved deres forskellige forhold af bioaktivitet til HAEA₃₀₈. Sådanne fraktioner, som demonstrerer et forhold af bioaktivitet mod *Vibrio percolans* ATCC 8461 til HAEA₃₀₈ på 180 bioaktivitetsenheder pr. HAEA₃₀₈-enhed indeholder antibiotikum 890A₂, og sådanne fraktioner, som udviser et forhold for bioaktivitet mod *Vibrio percolans* ATCC 8461 til HAEA₃₀₈ på 12 bioaktivitetsenheder pr. HAEA₃₀₈-enheder indeholder antibiotikum 890A₅.

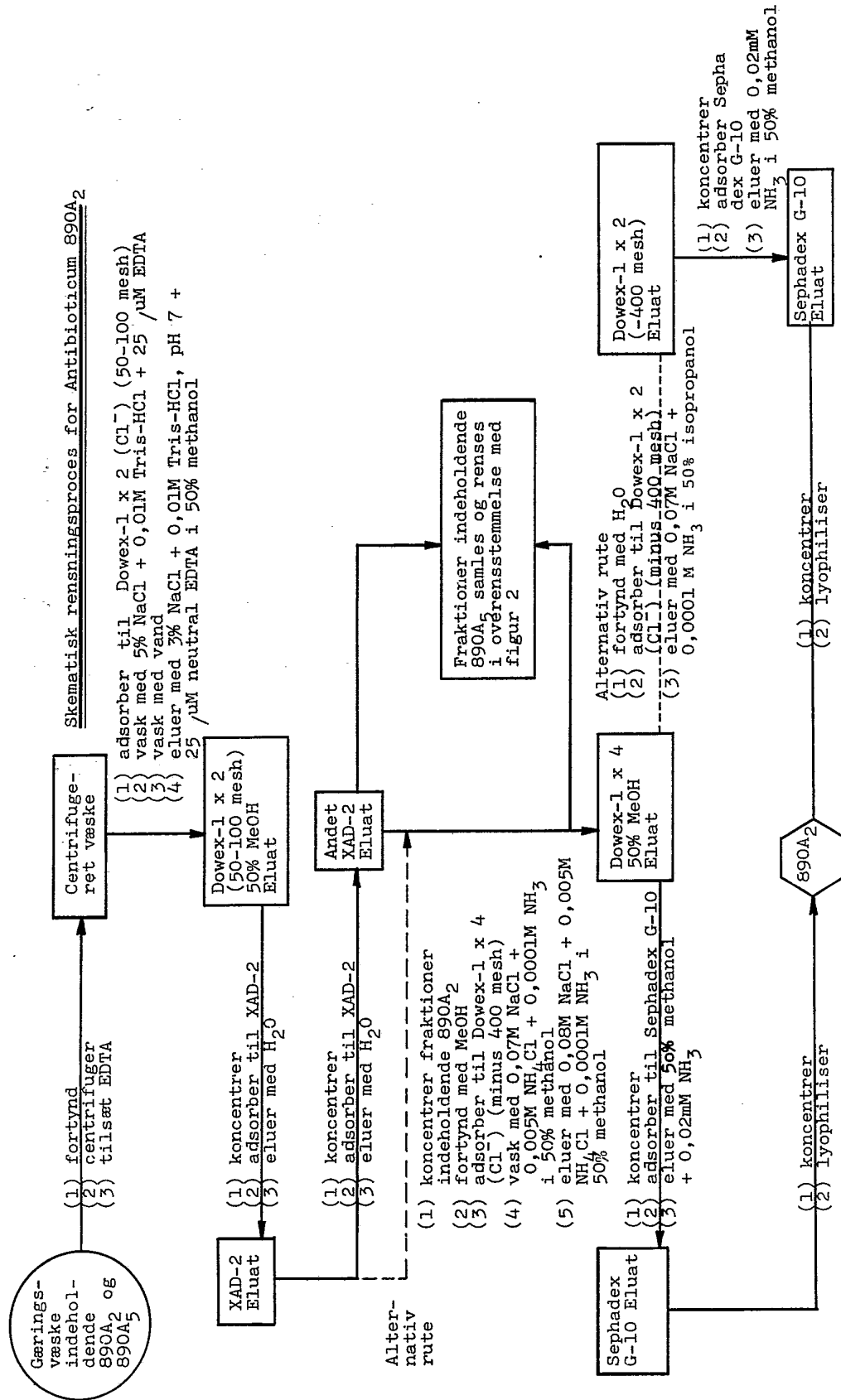
Ved rensning ved søjlechromatografi bliver i almindelighed kun de fraktioner af de eluerede rumfang, som indeholder antibiotikum

på mindst 30% af renheden for den reneste fraktion, kombineret til yderligere rensning. Kriterier for renhed er forholdet bioaktivitet/ A_{220} , A_{308}/A_{260} og $HAEA_{308}/A_{220}$; og, ved afsaltningsprocedurer, ledningsevne. Ved hvert chromatografisk trin måles således A_{220} , A_{260} , A_{308} og bioaktiviteten af de pågældende fraktioner. Om muligt måles også $HAEA_{308}$, og ved afsaltning måles ledningsevnen. Kriterier for afgørelse af hvilke fraktioner, der skal forenes i de efterfølgende operationer, kan reguleres noget til opnåelse af større udbytte på bekostning af renheden eller omvendt kan der opnås højere renhed på bekostning af udbyttet.

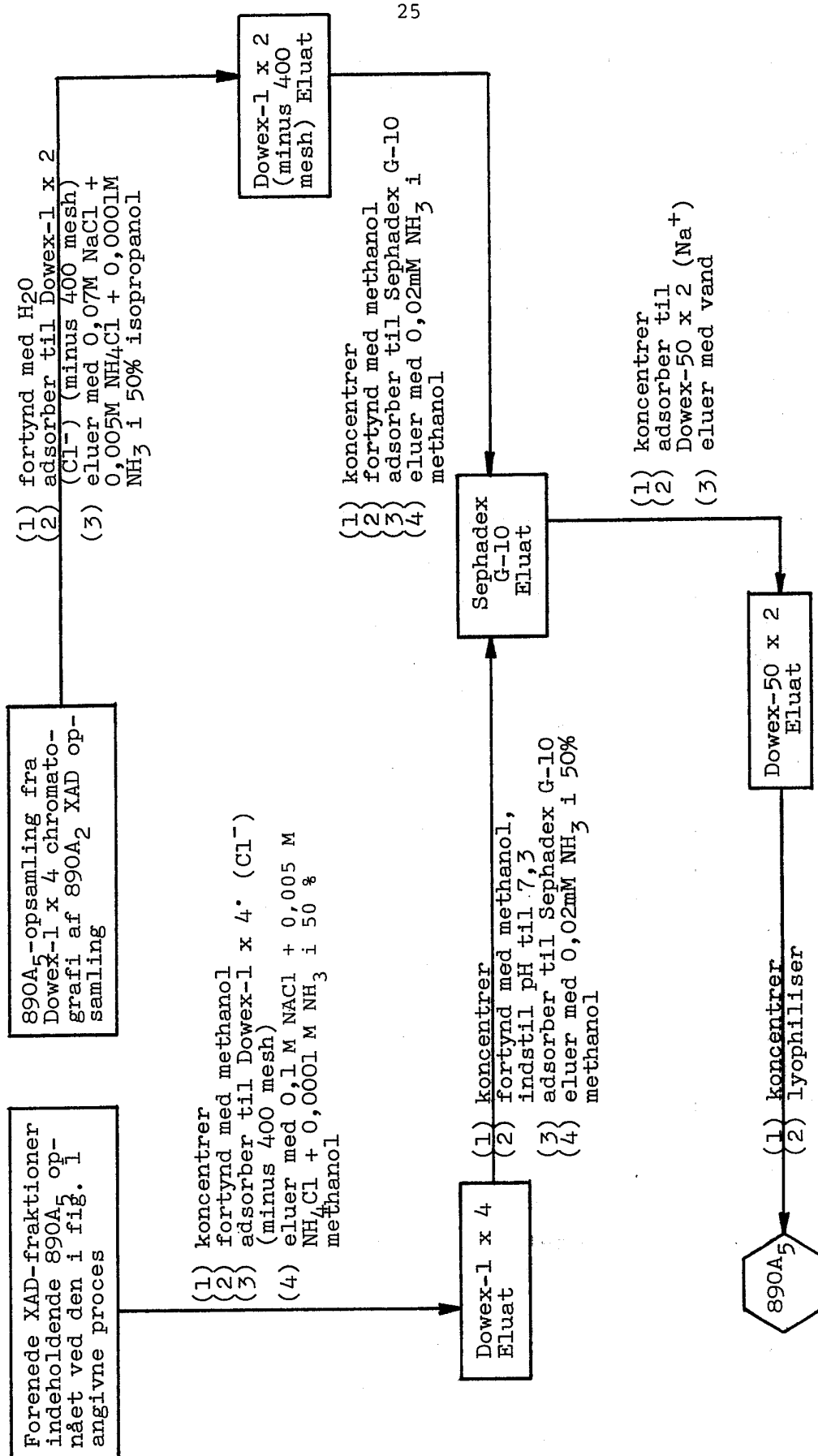
I laboratorieskala (mindre end 20 liter prøverumfang) udføres alle chromatografiske trin med undtagelse af XAD-2 chromatografien i et koldt miljø ved 2-5°C. XAD-2 chromatografi udføres ved stuetemperatur, med mindre andet er angivet. pH-værdien af antibiotiske opløsninger, som skal opbevares, indstilles på 7-8 ved forsigtig tilsætning af fortyndet natriumhydroxidopløsning eller saltsyre. Vandige opløsninger opbevares i køleskab eller fortrinsvis i isvand, og 50% methanolopløsninger opbevares ved -20°C.

Ved rensning forud for et XAD-2 chromatografi indstilles opløsninger sædvanligvis til 25 μ M i EDTA ved tilsætning af en 1/4000 rumfang af en opløsning af 0,1 M Na_2EDTA , som er neutraliseret til pH-værdi på 7,0 ved tilsætning af natriumhydroxid (0,1 M "neutral EDTA").

I det efterfølgende er vist et diagram over rensningsproceduren for opnåelse af antibiotika 890A₂ og 890A₅.



Skematisk rensningsproces for Antibiotikum 890A₅



Prøveprocedure for Antibiotika 890A₂ og 890A₅

1. Bioforsøg

En agar-plade skive-diffusionsmetode anvendes med enten *Vibrio percolans* ATCC 8461 eller *Salmonella gallinarum* MB-1287 som prøve-organisme. En rensset prøve af antibiotikum 890A₁ anvendes som standard. Antibiotikum 890A₁ fremstilles ved proceduren nedenfor.

Plader indeholdende *Vibrio percolans* ATCC 8461 fremstilles på følgende måde:

En lyophiliseret kultur af *Vibrio percolans* ATCC 8461 suspenderes i 15 ml af et steriliseret medium indeholdende 8 g/liter Difco næringsvæske og 2 g/liter gæreksrakt i destilleret vand "næringsvæske-gæreksrakt" (i det efterfølgende betegnet NBYE). Kulturen dyrkes i 18 timer i et roterende rysteapparat ved 28°C. Denne kultur anvendes til podning af overfladen af skråkulturer indeholdende 1,5% agar i NBYE, og de podede skråkulturer dyrkes i 18 timer ved 28°C og opbevares derpå i et køleskab.

De afkølede skråkulturer fremstilles ud fra en enkelt lyophiliseret kultur og anvendes i op til fire uger fra fremstillingen på følgende måde: En podenål med podemateriale fra skråkulturen dispergeres i 50 ml NBYE indeholdt i en 250 ml Erlenmeyer kolbe. Kulturen dyrkes i 18 timer i et roterende rysteapparat ved 28°C og fortyndes herefter til en koncentration, som giver 50% transmission ved 660 nm. En 33,2 ml portion af denne fortyndede kultur sættes til 1 liter NBYE indeholdende 15 g agar og opretholdt ved 46°C. Det podede agarholdige medium hældes i 100 x 15 mm petriskåle af plast, 5 ml pr. skål, afkøles og opretholdes ved 2-4°C i op til fem dage forud for anvendelsen.

Plader indeholdende *Salmonella gallinarum* MB-1287 fremstilles på følgende måde:

Et tilsneltet prøverør indeholdende celler af *Salmonella gallinarum* MB-1287 i skummet mælk, som er blevet frosset og lyophiliseret og

tilsmeltet under vacuum, åbnes og podes i 15 ml hjerne-hjerte-infusionsvæske. Cellerne bringes til at vokse uden rystning ved 37°C i 18 timer, og kulturen podes på skråkultur af 0,8% BBL næringsvæske + 0,2% Difco gæreksrakt + 1,5% agar. Efter vækst i 18 timer ved 37°C overføres en podenål af kulturen fra skråkulturen til en kolbe indeholdende 50 ml 0,8% næringsvæske + 0,2% gæreksrakt. Kolben rystes i 18 timer, og 20 ml af denne kultur podes i 1 liter 0,8% næringsvæske + 0,2% gæreksrakt + 1,5% agar, som er steriliseret og afkølet til 48°C. Den podede NBYE-agar hældes straks i 100 x 15 mm petriskåle af plast, 5 ml pr. skål, og pladerne opretholdes ved 2-4°C indtil anvendelsen.

Skiver af filtrerpapir med en diameter på 12,7 mm dyppes i opløsningen, som skal prøves, og anbringes på agarpladen. I stedet kan skiverne vådes ved påføring med en pipette af 1/10 ml af opløsningen på en tør skive, som derefter anbringes på agarpladen. Diameteren for inhiberingszonen måles efter en passende dyrkning (9-18 timer ved 37°C for *Salmonella gallinarum* MB-1287 eller 12-24 timer ved 25°C for *Vibrio percolans* ATCC 8461). Om fornødent foretages fortynding af opløsningerne, som skal afprøves, i 0,05 M kaliumphosphatpuffer, pH 7,4 "kaliumphosphatpuffer" (i det efterfølgende omtalt som KPB), eller i afioniseret vand.

Beregninger af aktiviteten udføres på følgende måde: en hældning bestemmes ved måling af zonediametrene af en opløsning af antibiotikum 890A₂ eller 890A₅ og en firdobbelt fortynding (i KPB) af denne opløsning. To skiver af hver koncentration prøves på en enkelt plade, og den gennemsnitlige zonestørrelse ved hver koncentration måles. Hældningen er lig med halvdelen af forskellen mellem middelzonestørrelserne. Aktiviteterne beregnes derefter af følgende formel: Aktivitet (enh./ml) =

(Aktivitet af Standard) x fortynding x $10^{\left(\frac{[D-D_s] \log 2}{\text{hældning}}\right)}$, hvor D er middeldiameteren af zoner dannet af den ukendte, D_s er middeldiameteren af standardzonen, og "fortynding" er den grad, hvortil den ukendte blev fortyndet før prøven. Hvis der ikke anvendes nogen standard, antages D_s at være 25 mm, og (aktivitet af standard) tages som 1 enhed/ml, når målingen udføres på *Vibrio percolans* ATCC 8461. Rent 890A₁ er defineret til en aktivitet på 250 enheder

pr. hydroxylamin-udslukkelig absorptionsenheder ved 300 nm, anvendt som standard.

For prøve på *Salmonella gallinarum* MB-1287 plader bestemmes en hældning på samme måde som for *Vibrio percolans* ATCC 8461 plader. Når der ikke anvendes nogen standard, beregnes kun relative aktiviteter. Hvis ingen hældning er målt, antages en værdi på 2,3 mm. Beregning af aktiviteten udføres som for *Vibrio percolans* ATCC 8461 prøver. Hvis ingen 890A₁ standard anvendes, kan benyttes en kontrol af penicillin G ved 250 µg/ml for at verificere, at sensitiviteten af organismen ligger i det normale område.

Rystekolbeproduktion af antibiotikum 890A₁

Et prøverør af en lyophiliseret kultur af *Streptomyces flavogriseus* NRRL 8140 åbnes separat, og indholdet suspenderes i et rør indeholdende 1,5 ml sterilt medium A med følgende sammensætning:

Medium A

Gærekstrakt	10,0 g
Glucose	10,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
Phosphatpuffer	2 ml
Destilleret H ₂ O	1000 ml

Phosphatpufferopløsning

KH ₂ PO ₄	91,0 g
Na ₂ HPO ₄	95,0 g
Destilleret H ₂ O	1000 ml

Denne suspension anvendes til podning af en 250 ml triple-luftet Erlenmeyer podekolbe med 54 ml podemedium B med følgende sammensætning:

Medium B

Autolyseret gær (Ardamine +)	10,0 g
Glucose	10,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
Phosphatpuffer	2 ml
Destilleret H ₂ O	1000 ml

pH: indstilles til 6,5 med NaOH
+ Ardamine: Yeast Products Corporation

Phosphatpufferopløsning

KH ₂ PO ₄	91,0 g
Na ₂ HPO ₄	95,0 g
Destilleret H ₂ O	1000 ml

Podetkolben tilproppes med bomuld og rystes i 30 timer ved 28°C ± 1°C i en gyrotorisk ryster ved 220 omdrejninger pr. minut (50 mm slaglængde).

Halvtreds 250 ml ikke-luftede koniske produktionskolber, hver indeholdende 40 ml produktionsmedium C, podes med 1 ml væsken fra hovedkolben. Produktionskolben tilproppes med vat.

Medium C

Tomatpasta	20,0 g
Primær gær	10,0 g
Dextrin (Amidex)	20,0 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5,0 mg
Destilleret H ₂ O	1000 ml

pH: indstilles til 7,2-7,4 med NaOH

Efter podning dyrkes produktionskolberne ved 28°C ± 1°C under omrystning i en gyrotorisk ryster ved 220 omdrejninger pr. minut (50 mm slaglængde) i 3 dage. Kolberne prøves for aktivitet over for standard *Vibrio parvulus* ATCC 8461 prøveplader ved hjælp af 12,7

mm prøveskiver dyppet i centrifugeret gæringsvæskeprøver. Prøver blev fortyndet med 0,05 M phosphatpuffer, pH = 7,4. Resultaterne er angivet i det efterfølgende:

Dyrkningens varighed, timer	72
pH	6,4
Vibrio percolans (1/100 fortynding) prøve	23 mm
890 prøve, enh./ml	103

De 890A enheder/ml bestemmes som angivet i sektionen under overskriften "II. Prøveprocedure for bestemmelse af 890 prøveenheder".

Hele gæringsvæsken centrifugeres i 200 ml portioner i polycarbonatflasker ved 9000 omdrejninger pr. minut i 15 minutter til opnåelse af 1600 ml forenet væske med en aktivitet på 104 enh./ml. Herefter sættes 0,5 ml 0,1 M neutral EDTA.

Den centrifugerede gæringsvæske adsorberes på en Dowex-1 x 2 (Cl-), 50-100 mesh kolonne, dimensioner af laget 3,8 x 22 cm, ved en strømningshastighed på 6 til 20 ml/min. Kolonnen skylles med 100 ml afioniseret vand og elueres med 1 liter afioniseret vand indeholdende 50 g natriumchlorid, 0,02 M Tris HCl-puffer, pH = 7,0 og 25 µM neutralt EDTA, ved en strømningshastighed på 6 ml/min. Der opsamles fraktioner på 10 ml.

Antibiotikum 890A₁ fremkommer i fraktionerne 13 til 81 med et maksimum i fraktionerne 25 til 33, talt fra første påføring af salteluat. Fraktionerne 24 til 41 med det højeste forhold for bioaktivitet/A₂₂₀ forenes til yderligere forarbejdning. De forenede fraktioner har i alt 29.000 enheder eller 17% af den påførte bioaktivitet.

Dowex-eluatet koncentrerer til 10 ml, pH værdien indstilles på 6,5 med fortyndet saltsyre, og koncentratet påføres en kolonne af XAD-2, dimensioner af laget 3,3 x 36 cm, som forud er vasket med 2 liter af hver af 60% vandig acetone, afioniseret vand og 5% (w/v) natriumchlorid i afioniseret vand. Prøven elueres med afioniseret vand med en strømningshastighed på 6 ml/min. Fraktioner på 40 til 260 ml opsamles. Den antibiotiske aktivitet fremkommer i fraktionerne

6 til 14, der strækker sig fra 220 til 2560 ml elueret rumfang. Maximum forekommer i fraktionerne 9 og 10, der strækker sig fra 370 til 590 ml elueret rumfang. Fraktionerne 9 til 12, svarende til 370 til 1060 ml elueret rumfang, har det højeste forhold A_{300}/A_{220} , og disse forenes til yderligere forarbejdning. Disse fraktioner har 36.600 enheder, svarende til 126% af den tilsyneladende påførte aktivitet.

De forenede fraktioner 9 til 12 inddampes til 100 ml, og koncentratet påføres en kolonne af Dowex-1 x 4 (Cl-), minus 400 mesh, dimensioner af laget 2,2 x 41 cm, ved en strømningshastighed på 2 ml/min. Kolonnen skylles med 60 ml afioniseret vand og elueres med 3 liter 0,07 M NaCl + 0,005 M NH_4Cl + 0,0001 M NH_3 i afioniseret vand ved en strømningshastighed på 2 ml/min. Der opsamles fraktioner på 10,8 ml, begyndende fra den første påføring af eluent.

Hovedtoppen af antibiotikum 890A₁ findes i fraktionerne 181 til 217 med et maximum i fraktion 198. Fraktionerne 186 til 210, indeholdende i alt 114 absorptionsenheder ved 300 nm, opsamles.

De samlede fraktioner inddampes til 4,0 ml, og pH værdien indstilles på 7,3 ved tilsætning af 16 μ liter 1 M NaOH. Koncentratet påføres en kolonne af Bio-Gel P-2, 200-400 mesh, dimensioner af laget 2,15 x 70 cm, og det vaskes med 3 x 1 ml afioniseret vand og elueres med afioniseret vand ved 0,96 ml/min. Der opsamles fraktioner på 3,85 ml.

Hovedtoppen af antibiotikum 890A₁ fremkommer i fraktionerne 24 til 44 med et maximum ved fraktionerne 33 og 34. Fraktionerne 27 til 38, der har det højeste forhold A_{300}/A_{245} , forenes til lyophilisering. Disse forenede fraktioner har i alt 72 A_{300} -enheder.

For at udføre lyophiliseringen inddampes de koncentrerede fraktioner til 3,0 ml, og pH værdien af koncentratet indstilles på 7,5 ved tilsætning af 10 μ liter 0,1 M NaOH. Prøven opdeles i to fraktioner på hver 1,50 ml, og portionerne hurtigfryses separat og lyophiliseres fra 14 ml glasampuller med skruelåg. Hver prøve indeholder 1,73 mg 890A₁ svarende til 35,8 A_{300} -enheder.

II. Prøveprocedure for bestemmelse af "890 prøveenheder"

En konventionel agarpladeskive-diffusionsmetode anvendes med *Vibrio percolans* ATCC 8461 som prøveorganisme. Cephaloridin anvendes som standard. Plader indeholdende *Vibrio percolans* ATCC 8461 fremstilles på følgende måde. En kultur af *Vibrio percolans* ATCC 8461 inkuberes i en næringsvæske-gæretrakt i 18 timer i et roterende rysteapparat ved 28°C og fortyndes derefter til en tæthed på 60% transmission ved 660 nm. En 33,2 ml portion af denne fortyndede kultur sættes til 1 liter af et medium sammensat af næringsagar + 0,2% gæretrakt opretholdt ved 46°C. Det podede agarholdige medium hældes i 100 x 15 mm petriskåle af plast, 10 ml pr. skål, afkøles og opretholdes ved 2-4°C i op til fem dage forud for anvendelsen.

Koncentrationen af cephaloridin, som er ækvivalent med 1 enhed/ml af 890A bestemmes ved prøve på plader fremstillet som ovenfor angivet, men indeholdende 5 ml podet medium pr. plade på følgende måde. Fire koncentrationer af cephaloridin udgør standarden - 3,12, 6,25, 12,5 og 25 mcg pr. ml med 12,5 mcg pr. ml som referenceopløsning. Zonediametrene på en 5 ml plade for standarden er følgende:

<u>Konc. (mcg/ml)</u>	<u>Zone-diameter (mm)</u>
3,12	16,8
6,25	22,3
12,5	25,0
<u>25</u>	29,6

En enhed defineres som mængden af antibiotisk stof pr. ml, der producerer en 25 mm inhiberingszone på en 5 ml plade som beskrevet i ovennævnte sektion I. Ved denne prøve betragtes derfor en koncentration på 12,5 mcg pr. ml cephaloridin som ækvivalent med 1 enhed 890A pr. ml. Da hældningen af linien for cephaloridin er 4,0, udføres beregninger af aktiviteten af en prøve ved hjælp af en hældning på 4,0.

III. Hydroxylamin-reaktion

Begge antibiotika 890A₂ og 890A₅ reagerer med hydroxylamin og producerer et stof med stærkt formindsket absorption ved 308 nm. Dette giver basis for en kvantitativ prøve af antibiotika 890A₂ og 890A₅.

Opløsningen, som skal prøves, indstilles på 0,05 M kaliumphosphat, pH = 7,4 ved tilsætning af 1/20 rumfang af en opløsning indeholdende 0,8 M K₂HPO₄ og 0,2 M KH₂PO₄. Ti 1/100 rumfang af 1 M hydroxylaminhydrochlorid tilsættes, og absorptionen ved 308 nm måles med intervallet på 1/2 til 2 minutter. Reaktionen udføres ved stuetemperatur. Kinetisk reaktion af første orden antages, og en halveringstid er bedømt for absorptionsformindskelsen i løbet af de første 10 minutter. Ud fra denne halveringstid er der beregnet den tid, efter hvilken ingen yderligere absorptionsformindskelse vil kunne iagttages, og observationerne fortsættes ud over den tid. Hvis der ikke iagttages nogen formindskelse ud over denne tid, bliver den totale absorptionsformindskelse (korrigeret for fortyndingseffekt og absorption af hydroxylaminen) taget som "Hydroxylamin-udslukkelig absorption ved 308 nm (HAEA₃₀₈)". Hvis absorptionsformindskelse iagttages efter denne tid, beregnes størrelsen af baggrundsabsorptionsformindskelsen, og den iagttagne formindskelse på dette tidspunkt korrigeres for baggrundsformindskelse, idet man antager, at baggrundsformindskelsen er lineær med tiden. Den korrigerede værdi angives derefter som HAEA₃₀₈.

Værdien for HAEA₃₀₈-enheder er lig med HAEA₃₀₈ multipliceret med rumfanget i ml.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen skal i det efterfølgende illustreres nærmere ved hjælp af nogle udførelseseksempler.

EKSEMPEL 1

Produktion af blanding indeholdende Antibiotika 890A₂ og 890A₅

Et prøverør af lyophiliseret kultur af *Streptomyces flavogriseus*

NRRL 8139 åbnes aseptisk, og indholdet suspenderes i et rør indeholdende 0,8 ml steril Davis-salt-opløsning med følgende sammensætning:

Davis-salte

Natriumcitrat	0,5 g
K_2HPO_4	7,0 g
KH_2PO_4	3,0 g
$(NH_4)_2SO_4$	1,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g
Destilleret H_2O	1000 ml

Denne suspension anvendes til at pøde 4 skråkulturer af sterilt medium A med følgende sammensætning:

Medium A

Dextrose	10,0 g
Pepton	5,0 g
Gæreextrakt	3,0 g
NaCl	12,705 g
KCl	0,72 g
$FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$	0,0351 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	5,32 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,728 g
Destilleret H_2O	1000 ml

pH = 7,4 (før sterilisation)

Agar	25,0 g
------	--------

De podede skråkulturer dyrkes i 1 uge ved 27-28°C og opretholdes ved 4-6°C indtil anvendelsen 10 dage senere. En halv portion af overfladevæksten af en af disse skråkulturer anvendes til podning af luftede 250 ml koniske kolber indeholdende 50 ml medium B med følgende sammensætning:

Medium B

Gær-autolysat (⁺ Ardamine)	10,0 g
Glucose	10,0 g
Phosphatpuffer *	2,0 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50 mg
Destilleret H ₂ O	1000 ml

pH: indstilles på 6,5 med HCl eller NaOH

⁺Ardamine: Yeast Products Corporation

*Phosphatpufferopløsning

KH ₂ PO ₄	91,0 g
Na ₂ HPO ₄	95,0 g
Destilleret H ₂ O	1000 ml

Tre podekolber podes for at give tilstrækkeligt podemateriale til tolv 2-liters produktkolber, som anvendtes til denne portion. Podekolberne rystes i 1 dag ved 28°C i et rysteapparat ved 220 omdr./min. (50 mm slaglængde). Kolberne fjernes fra rysteren og opbevarede i en dag ved 4°C. Indholdet af disse podekolber anvendes til podning af tolv 2 liter ikke-luftede koniske produktionskolber (7 ml podemateriale pr. kolbe) indeholdende 250 ml af produktionsmedium C med følgende sammensætning:

Medium C

Tomatpasta	20,0 g
Primær gær	10,0 g
Dextrin (Amidex)	20,0 g
Afioniseret H ₂ O	1000 ml

pH-værdien indstilles på 7,3 ved hjælp af natriumhydroxid

Efter podning dyrkes produktionskoblerne ved 24°C under omrystning i et rysteapparat ved 220 omdr./min. (50 mm slaglængde) i fire dage og fem timer. Efter dette tidsrum indhøstes kolberne og materialet prøves for aktivitet ved hjælp af standard *Salmonella gallinarum* MB 1287 og *Vibrio percolans* ATCC 8461 forsøgsplader under anvendelse af 12,7 mm prøveskiver dyppet i de centrifugerede væskeprøver. Resultaterne er anført i efterfølgende tabel:

<u>Prøve på dyrkningsvæske</u>	
Dyrkningens varighed (timer)	101
pH	7,1
<i>Salmonella gallinarum</i> (mm zone)	31
<i>Vibrio percolans</i> (mm zone)	43

Gæringsvæsken centrifugeres. Til det klare centrifugat, 2,2 liter ved pH = 6,8, sættes 22 mg (ethylendinitrilo)tetraeddikesyre, og pH-værdien indstilles på 7,2. Det således indstillede centrifugat adsorberes på 150 ml Dowex 1 x 2 harpiks på Cl⁻-cyclus ved 15 ml/min., idet afløbsstrømmen opsamles som én fraktion. Adsorbatet vaskes med 150 ml afioniseret vand indeholdende 10 µg/ml (ethylendinitrilo)tetraeddikesyre og vaskes derefter med 5% natriumchloridopløsning indeholdende 10 µg/ml (ethylendinitrilo)tetraeddikesyre, idet der opsamles 5 x 75 ml fraktioner.

Den 5% natriumchlorid-elueringsopløsning efterfølges af en 60 ml fortrængningsvask med afioniseret vand, hvorefter antibiotika 890A₂ og 890A₅ elueres med 90% (v/v) methanol; 3% ammoniumchlorid (w/v); 10% vand (v/v) indeholdende 10 µg/ml (ethylendinitrilo)tetraeddikesyre, idet der opsamles 5 x 75 ml fraktioner. Fraktionerne prøvedes over for *Vibrio percolans*, ATCC 8461, og resultaterne er anført nedenfor som procent af udgangs-bioaktivitet:

<u>Fraktion</u>	<u>Udbytte</u>
Tilførsel	100%
Afløb	0
Vandfortrængningsvask	1%
MeOH/NH ₄ Cl eluat-fraktioner 1 til 3	24%

EKSEMPEL 2Rystekolbe-produktion af antibiotikum 890A₂

Et rør af lyophiliseret kultur af *Streptomyces flavogriseus* NRRL 8139 åbnes aseptisk, og indholdet suspenderes i et rør indeholdende 0,8 ml sterile Davis-salte med følgende sammensætning:

Davis-salte

Natriumcitrat	0,5 g
K ₂ HPO ₄	7,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
Destilleret H ₂ O	1000 ml

Denne suspension anvendes til podning af fire skråkulturer af sterilt medium A med følgende sammensætning:

Medium A

Glycerol	20,0 g
Primær gær	5,0 g
Fiskemel	15,0 g
Destilleret H ₂ O	1000 ml
Agar	20,0 g

pH: indstilles på 7,2 med NaOH

De podede skråkulturer dyrkes i en uge ved 27-28°C og opbevares derefter ved 4-6°C indtil anvendelsen (ikke længere end 21 dage).

En 1/3 portion af væksten fra en skråkultur anvendes til podning af en luftet 250 ml konisk kolbe. Ialt fire skråkulturer anvendes til podning af tolv kolber. Hver kolbe indeholdende 50 ml medium B har følgende sammensætning:

Medium B

Gær-autolysat (⁺ Ardamine)	10,0 g
Glucose	10,0 g
Phosphatpuffer [*]	2,0 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50,0 mg
Destilleret H ₂ O	1000 ml

pH: indstilles til 6,5 med HCl eller NaOH

⁺Ardamine: Yeast Products Corporation

^{*}Phosphatpuffer-opløsning

KH ₂ PO ₄	91,0 g
Na ₂ HPO ₄	95,0 g
Destilleret H ₂ O	1000 ml

Podokolberne rystes i en dag ved 27-28°C i et rysteapparat ved 220 omdr./min. (50 mm slaglængde). Kolberne og indholdet opbevaredes stationært i en dag ved 4°C.

Fireogfyrre 2 liters koniske produktionskolber, hver indeholdende 200 ml medium C, podes med 8 ml pr. kolbe af væksten af podokolberne. Medium C har følgende sammensætning:

Medium C

Tomatpasta	20,0 g
Primær gær	10,0 g
Dextrin (Amidex)	20,0 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5,0 mg
Destilleret H ₂ O	1000 ml

pH: indstilles på 7,2-7,4 med NaOH

Efter podning dyrkes produktionskolberne ved 24°C under oprystning på et rysteapparat ved 212 omdr./min. (50 mm slaglængde) i fire dage og fem timer. Kolberne indhøstes og prøves for aktivitet under anvendelse af standard *Salmonella gallinarum* MB 1287 og *Vibrio percolans* ATCC 8461 prøveplader med 12,7 mm prøveskiver dyppet i centrifugerede væskeprøver. Prøverne fortyndes om nødvendigt med 0,02 M phosphatpuffer, pH = 7,0. Resultaterne er følgende:

Dyrkningens varighed (timer)	101
pH	7,2
Salmonella gallinarum (mm zone)	35
Vibrio percolans 1/10 dil (mm zone)	25
890 prøve-enhed	121

Ialt 7,0 l af den samlede gæringsvæske fra denne gæring afkøles til 3°C og centrifugeres i 200 ml portioner ved 9000 omdr./min. i 15 minutter hver. Til den forenede ovenstående væske sættes 1,7 ml 0,1 M neutralt EDTA, og portionen opretholdes ved 3 °C.

Ovennævnte gæring gentages under identiske betingelser med den ændring, at de fireogfyrre 2 liter koniske kolber podes med 7 ml pr. kolbe med vækst fra podekolberne. pH-værdien og prøveresultaterne er følgende:

Dyrkningens varighed (timer)	101
pH	7,3
Salmonella gallinarum (mm zone)	38
Vibrio percolans 1/10 dil (mm zone)	27
890 prøve-enh.	92,8

Ialt 7,4 l af den samlede gæringsvæske fra denne gæring afkøles til 3°C og centrifugeres i 200 ml portioner ved 9000 omdr./min. i 15 minutter hver. Til den forenede ovenstående væske sættes 1,8 ml 0,1 M neutralt EDTA. Den ovenstående væske fra de centrifugerede gæringsvæsker, stammende fra de to ovennævnte gæringer i dette eksempel, forenes til et totalt rumfang på 13 l og en aktivitet på 80 enheder/ml ved prøve på Vibrio percolans ATCC 8461.

Den forenede væske føres gennem en kolonne af Dowex-1 x 2 (Cl⁻), 50-100 mesh, med lagdimensioner 4,7 cm x 50 cm, ved en strømningshastighed på 60 ml pr. minut. Kolonnen vaskes med 1 liter afioniseret vand og elueres med 5 liter 5% (w/v) natriumchloridopløsning indeholdende 0,01 M Tris-HCl-puffer, pH=7,0, og 25 µM neutral EDTA, ved en strømningshastighed på 50 ml pr. minut.

Kolonnen vaskes med 500 ml afioniseret vand, og antibiotika 890A₂ og 890A₅ elueres med 2 liter 3% natriumchlorid + 0,01 M tris-HCl, pH=7,0, + 25 μ M neutral EDTA i 50% methanol ved en strømningshastighed på 40 ml/minut. Fraktioner på 220 ml opsamles.

Den antibiotiske aktivitet, bedømt ved en prøve på *Salmonella gallinarum* MB 1287, viser sig i fraktionerne 4 til 8 med et maximum i fraktion 5. Fraktionerne 4 til 8 indeholder 9% af den oprindelige i gæringsvæsken tilstedeværende aktivitet.

Fraktionerne 4 til 7 forenes, inddampes til 150 ml ved rotationsfordampning under reduceret tryk og fortyndes til 250 ml ved tilsætning af 200 ml afioniseret vand. Prøven påføres en kolonne (5 cm x 25 cm) af XAD-2, som var vasket forud med 3 liter hver af 30% (v/v) acetone, afioniseret vand og 5% (w/v) natriumchlorid. Kolonnen elueres med 500 ml afioniseret vand ved 20 ml/min. efterfulgt af 500 ml 60% (v/v) vandig acetone. Fraktioner på hver 160 ml opsamles. Antibiotisk aktivitet, bestemt ved prøven på *Salmonella gallinarum* MB 1287, ses i fraktionerne 1 til 5 med et maximum ved fraktionerne 3 og 4.

Fraktion 4, den første acetoneholdige fraktion, inddampes til 10 ml under reduceret tryk og fortyndes med 90 ml afioniseret vand. Denne prøve påføres en kolonne (5 cm x 25 cm) XAD-2, som var vasket forud med 3 liter hver af 60% (v/v) acetone, afioniseret vand og 5% (w/v) natriumchlorid. Kolonnen elueres med afioniseret vand med en strømningshastighed på 20 ml pr. minut. Der opsamles fraktioner fra 140 til 190 ml. Antibiotisk aktivitet, bestemt ved prøven på *Salmonella gallinarum* MB 1287, påvises i fraktionerne 2 til 7 med et maximum i fraktion 4. Fraktionerne 3, 4 og 5 forenes og sættes til fraktion 3 fra den i det foregående afsnit beskrevne XAD-kolonne. De forenede fraktioner indeholder 26 400 bio-prøve-enheder, bestemt ved prøve på *Vibrio percolans* ATCC 8461, lig med 2,5% af udgangsaktiviteten.

De forenede XAD-2 fraktioner 3 fra første XAD-kolonne og fraktionerne 3,4 og 5 fra den anden XAD-kolonne inddampes under reduceret tryk til 25 ml, og derpå tilsættes 25 ml afioniseret vand, og 50 ml methanol tilsættes. Den methanoliske opløsning adsorberes på en

kolonne (2,15 x 26,4 cm) af Dowex-1 x 4 (Cl^-), minus 400 mesh, som er indstillet på ligevægt med 50% vandig methanol (v/v). Kolonnen elueres med 1,44 liter 0,07 M natriumchlorid + 0,005 M ammoniumchlorid + 0,0001 M ammoniak i 50% methanol ved en strømningshastighed på 2 ml pr. minut. Fraktioner på 12,1 ml opsamles. Elueringen fortsættes med 2 liter 0,08 M natriumchlorid + 0,005 M ammoniumchlorid + 0,0001 M ammoniak i 50% methanol, idet der opsamles fraktioner på hver 11,7 ml.

En top for UV absorption ved 300 nm påvises i fraktionerne 138 til 162 med et maximum i fraktionerne 149-150. Absorptionen ved 305 nm observeres som udslukkelig i en grad på 77% ved reaktion med L-cystein ved et neutralt pH. Fraktionerne 145 til 155, indeholdende antibiotikum 890A₂, opsamles og inddampes til 2,4 ml, indeholdende ialt 70,5 A₃₀₀-enheder.

Den koncentrerede prøve påføres en kolonne (2,2 x 70 cm) af Bio-Gel P-2, 200-400 mesh, som er vasket med 1 liter afioniseret vand. Prøven henstilles til afdrypning til lagets niveau, og remanensen vaskes med 2 skylninger på hver 1 ml afioniseret vand. Kolonnen elueres med afioniseret vand med en hastighed på 1 ml pr. minut. Fraktioner på 2 til 3,5 ml opsamles.

Hovedtoppen for absorption ved 308 nm påvises i fraktionerne 64 til 72, umiddelbart forud for og ikke fuldstændig adskilt fra natriumchloridet. Fraktionerne 66 og 67 forenes, indeholdende 27 absorptionsenheder af antibiotikum 890A₂ ved 308 nm og fra 29 til 43 mg natriumchlorid (bedømt ved ledningsevnen). Disse forenede fraktioner inddampes til 1,5 ml under reduceret tryk og lyophiliseres til opnåelse af 43,7 mg faste stoffer.

EKSEMPEL 3

Præparation af antibiotika 890A₂ og 890A₅

Et rør af lyophiliseret kultur af *Streptomyces flavoviridis* NRRL 8139 åbnes aseptisk og indholdet suspenderes i et rør indeholdende 0,8 ml sterile Davis salte med følgende sammensætning:

Davis-salte

Natriumcitrat	0,5 g
K_2HPO_4	7,0 g
KH_2PO_4	3,0 g
$(NH_4)_2SO_4$	1,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g
Destilleret H_2O	1000 ml

Denne suspension anvendes til podning af fire skråkulturer af medium A med følgende sammensætning:

Medium A

Glycerol	20,0 g
Primær gær	5,0 g
Fiskemel	15,0 g
Destilleret H_2O	1000 ml
Agar	20,0 g

pH: indstilles på 7,2 med NaOH

De podede skråkulturer dyrkes i en uge ved 27-28°C og opbevares ved 4-6°C, indtil de anvendes (ikke længere end 21 dage).

10 ml af medium B med følgende sammensætning:

Medium B

Gær-autolysat (⁺ Ardamine)	10,0 g
Glucose	10,0 g
Phosphatpuffer *	2,0 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	50 mg
Destilleret H_2O	1000 ml

pH: indstilles på 6,5 med HCl eller NaOH

⁺Ardamine: Yeast Products Corporation

*Phosphatpufferopløsning

KH_2PO_4	91,0 g
Na_2HPO_4	95,0 g
Destilleret H_2O	1000 ml

overføres aseptisk til en af disse skråkulturer, sporene og luftmycelium skrubes over i suspensionen, og 3,3 ml af denne suspension anvendes til podning af 2 liter luftede koniske kolber indeholdende 500 ml medium B. Denne podekolbe rystes ved 28°C i et rysteapparat ved 160 omdr./minut (50 mm slaglængde) i 36 timer, i hvilket tidsrum væksten er tilfredsstillende.

Væksten fra disse podekolber anvendes til podning af en 189 liter podetank af rustfrit stål indeholdende 160 liter medium B. Denne tank drives ved 28 °C under en omrøringshastighed på 150 omdr./min. og en luftstrøm på 85 liter pr. minut i 24 timer. Antiskummiddel, polyglycol 2000 (Dow Chemical Corp.), anvendes om nødvendigt, men højst i en mængde på 0,1%. Der gennemføres følgende pH-bestemmelse:

Alder, timer	<u>0</u>	<u>12</u>
pH	6,3	6,35

43 liter af væksten i denne podetank anvendes til podning af en 756 liter gæringstank af rustfrit stål indeholdende 467 liter medium C med følgende sammensætning:

Medium C

Tomatpasta	20,0 g
Primær gær	10,0 g
Dextrin (Amidex)	20,0 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5,0 mg
Destilleret H ₂ O	1000 ml

pH: indstilles på 7,2-7,4 med NaOH

Denne tank drives ved 25°C under en omrøringshastighed på 250 liter pr. minut i 92 timer. Mere antiskummiddel, polyglycol 2000, tilsettes om nødvendigt, men højst i en mængde på 0,1%. Antibakterielle prøver udføres på *Salmonella gallinarum* MB 1287, *Vibrio parcolans* ATCC 8461, og følgende data opnås:

Alder, timer:	0	12	24	36	48	60	72	84	92
pH	6,6	6,7	6,65	6,3	6,0	6,4	6,15	6,5	6,5
MB-1287 mm	--	--	--	S	--	19	26	28	32
ATCC 8461 mm (1-10)	--	--		S	--	21	24	26	30
890A enh./ml				NA	NA	6,8	13,5	24,9	24,3

890A-enheder/ml bestemmes som angivet i sektionen med overskriften "II. Prøveprocedure for bestemmelse af 890 prøveenheder".

470 liter væske afkøles til 5°C og centrifugeres gennem en Titan P-9 centrifuge. 22 kg Celite sættes til 378 liter fra-centrifugeret væske, og suspensionen filtreres gennem en Shriver 46 cm filterpresse. 344 liter filtrat adsorberes til kolonnen indeholdende 26,5 liter Dowex-1 x 2 (Cl⁻), 50-100 mesh, og kolonnen vaskes med 37,8 liter afioniseret vand efterfulgt af 114 liter 5% natriumchlorid + 0,01 M Tris-HCl puffer, pH = 7,0 + 25 µM neutralt EDTA i afioniseret vand. Efter en yderligere vask med 18,7 liter afioniseret vand elueres antibiotika 890A₂ og 890A₅ med 95 liter 3% natriumchlorid + 0,01 M Tris-HCl puffer, pH = 7,0 + 25 µM neutralt EDTA i 50% (v/v) vandig methanol. 18,7 liter fraktioner opsamles.

Den antibiotiske aktivitet bestemmes ved prøve over for *Salmonella gallinarum* MB 1287 og påvises i fraktionerne 1 til 5 med et maximum i fraktion 3. Fraktionerne 2 og 3 indeholdende 10,9% af aktiviteten i den påførte gæringsvæske forenes og inddampes til 7,6 liter under reduceret tryk. Den koncentrerede prøve fortyndes med 30 liter afioniseret vand og inddampes igen til 7,6 liter under reduceret tryk til fjernelse af resterende methanol.

De 7,6 liter koncentrat påføres en kolonne indeholdende 37,8 liter XAD-2, som forud er vasket med 190 liter 60% vandig acetone efterfulgt af 190 liter afioniseret vand og 190 liter 5% natriumchloridopløsning. Kolonnen elueres med 142 liter afioniseret vand. Tre fraktioner på hver 9,5 liter efterfulgt af seks fraktioner på 19 liter opsamles. Aktiviteten bestemt ved prøve på *Salmonella gallinarum* MB 1287 plader påvises i fraktionerne 1 til 6 med maximal aktivitet i fraktion 2. Fraktionerne 2 til 5, indeholdende 64% af den aktivitet, som påførtes XAD-kolonnen eller 520 000 enheder, opsamles.

Fraktionerne 2 til 5 inddampes til 120 ml ved inddampning under reduceret tryk. pH-værdien indstilles på 6,5, og koncentratet påføres en kolonne (7 x 50 cm) XAD-2, som er vasket med 8 liter 60% vandig acetone efterfulgt af 4 liter afioniseret vand og 8 liter 5% natriumchlorid i afioniseret vand. Prøven henstilles til afdrypning til lagets niveau, og kolonnen skylles med tre 20 ml portioner afioniseret vand, idet der henstilles hver gang til afdrypning. Det antibiotiske stof elueres med 6 liter afioniseret vand med en strømningshastighed på 40 ml pr. minut. Otte fraktioner på 200 ml efterfulgt af elleve fraktioner på 400 ml opsamles. Den antibiotiske aktivitet, bestemt ved prøve med *Salmonella gallinarum* MB 1287 plader, påvises i fraktionerne 3 til 18 med et maximum af aktivitet i fraktion 8.

Fraktion 8 til 12 med det højeste forhold af bioaktivitet/ A_{220} og med 225 000 bioaktivitetsenheder, bestemmes ved en prøve over for *Salmonella gallinarum* MB 1287 og forenes for yderligere behandling.

De forenede fraktioner inddampes under reduceret tryk til 50 ml, og 50 ml methanol tilsættes. Prøven påføres en kolonne af Dowex-1 x 4 (Cl^-), minus 400 mesh, lagdimensioner 2,2 x 40 cm, som forud er vasket med 50% methanol. Kolonnen elueres med 2 liter 0,07 M natriumchlorid + 0,005 M ammoniumchlorid + 0,0001 M ammoniak i 50% vandigt methanol med en strømningshastighed på 2 ml pr. minut. Der opsamles fraktioner på 12 ml.

To ulige toppe af bioaktivitet, bestemt ved prøve over for *Salmonella gallinarum* MB 1287 iagttages i afløbet, svarende til to toppe af materialet med et absorptionsmaximum ved 308 nm. Hovedparten af absorptionen ved 308 nm i begge toppe er udslukkelig ved reaktion med hydroxylamin.

Den første top, indeholdende $890A_2$, påvises i fraktionerne 98 til 136, og den anden top, indeholdende $890A_5$, påvises i fraktionerne 136 til 158. Fraktionerne 112 til 130 forenes til opnåelse af $890A_2$ Dowex-koncentrat, og fraktionerne 138 til 148 forenes til opnåelse af $890A_5$ Dowex-koncentrat. $890A_2$ -portionen renses yderligere ved afsaltning på Sephadex G-10.

Fraktionerne 112 til 130 indeholdende 890A₂ indampes under reduceret tryk til 5,5 ml, og konzentratet påføres en kolonne (2,15 x 70 cm) Sephadex G-10 og elueres med afioniseret vand ved en strømningshastighed på 1 ml pr. minut. Der opsamles fraktioner på hver 2,85 ml. Bioaktiviteten bestemt ved prøve over for *Salmonella gallinarum* MB 1287 fremkommer i fraktionerne 60 til 98. Fraktionerne 78 til 90 har det højeste forhold A_{308}/A_{260} , og disse samles til lyophilisering. pH-værdien af de samlede fraktioner er 4,1, og der indstilles til 7,8 ved tilsætning af 8 μ l 1 M ammoniak. Portionen indeholder 52 A₃₀₈-enheder med et forhold A_{308}/A_{260} på 0,76, hvilket viser en væsentlig nedbrydning af det antibiotiske stof under denne procedure.

De samlede fraktioner 78 til 90 indampes til 1,69 ml under reduceret tryk. To 0,1 ml prøver udtages og lyophiliseres separat i små koniske reaktionsampuller af glas. Resten lyophiliseres i en 14 ml med skruelåg forsynet ampul af glas, hvorved opnås 1,29 mg faste stoffer indeholdende 890A₂.

EKSEMPEL 4

Præparation af 890A₅

Et rør af lyophiliseret kultur af *Streptomyces flavogriseus* NRRL 8139 åbnes aseptisk, og indholdet suspenderes i et rør indeholdende 0,8 ml sterile Davis-salte med følgende sammensætning:

Davis-salte

Natriumcitrat	0,5 g
K ₂ HPO ₄	7,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
Destilleret H ₂ O	1000 ml

Denne suspension anvendes til podning af fire skråkulturer af medium A med følgende sammensætning:

Medium A

Glycerol	20,0 g
Primær gær	5,0 g
Fiskemel	15,0 g
Destilleret H ₂ O	1000 ml
Agar	20,0 g

pH: indstilles til 7,2 med NaOH

De podede skråkulturer dyrkes i 1 uge ved 27-28 °C og opbevares derefter ved 4-6 °C indtil anvendelsen (ikke længere end 21 dage).

10 ml medium B med følgende sammensætning:

Medium B

Gær-autolysat (⁺ Ardamine)	10,0 g
Glucose	10,0 g
Phosphatpuffer *	2,0 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50 mg
Destilleret H ₂ O	1000 ml

pH: indstilles til 6,5 med HCl eller NaOH

⁺Ardamine: Yeast Products Corporation

* Phosphatpuffer-opløsning

KH ₂ PO ₄	91,0 g
Na ₂ HPO ₄	95,0 g
Destilleret H ₂ O	1000 ml

overføres aseptisk til en af disse skråkulturer, sporerne og luftmyceliet skræbes over i suspensionen, og denne suspension anvendes til podning af tre 2 liter luftede koniske kolber indeholdende 500 ml medium B i en mængde på 3,3 ml pr. kolbe. Disse podekolber rystes ved 28 °C i et rysteapparat ved 160 omdr./min. (50 mm slaglængde) i 36 timer, efter hvilket tidsrum væksten er tilfredsstillende.

500 ml væksten fra disse podede kolber anvendes til podning af en 189 liter podetank af rustfrit stål indeholdende 160 liter

medium B. Denne tank drives ved 28 °C med en omrøringshastighed på 150 omdr./min. og en luftstrøm på 85 liter pr. minut i 24 timer. Der anvendes et antiskummemiddel, polyglycol 2000 (Dow Chemical Corp.) om nødvendigt, men højst i en mængde på 0,1%. Der udføres følgende pH-bestemmelser:

Alder, timer	0	24
pH	6,1	5,6

43 liter af dyrkningsmediet i denne podetank anvendes til podning af en 756 liter gæringsbeholder af rustfrit stål indeholdende 460 liter medium C, der har følgende sammensætning:

Medium C

Tomatpasta	20,0 g
Primær gær	10,0 g
Dextrin (Amidex)	20,0 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5,0 mg
Destilleret H ₂ O	1000 ml

pH: indstilles på 7,2-7,4 med NaOH,

som er steriliseret 60 minutter ved 120°C. Denne tank drives ved 25°C med en omrøringshastighed på 160 omdr./min. og en luftstrøm på 283 liter pr. minut i 144 timer. Mere antiskummemiddel, polyglycol 2000, tilsættes om nødvendigt, dog i en mængde på højst 0,1%. Antibakterielle prøver udføres på *Salmonella gallinarum* MB 1287. *Vibrio percolans* ATCC 8461 med følgende data:

Alder i timer

pH	6,2	6,2	6,3	7,0	7,3	7,7	8,2
MB 1287 mm		T	26,5	28	33,5	32,5	31,5
MB 1272 mm (1-10 dil.) -		0	21,5	26,5	35	31,5	33
890A enh./ml		- NA	6,4	16,5	16,7	22,5	19,5

De 890A enh./ml bestemmes som angivet i sektionen med overskriften "II. Prøveprocedure for bestemmelse af "890 prøveenheder".

387 liter gæringsvæske afkøles til 5°C og centrifugeres gennem en Titan P-9 centrifuge. 18 liter Celite sættes til 290 liter af den

centrifugerede væske, og suspensionen filtreres gennem en Shriver 45 cm filterpresse. 234 liter af filtratet adsorberes til en kolonne indeholdende 27 liter Dowex-1 x 2 (Cl^-), 16-100 mesh, og kolonnen vaskes med 38 liter afioniseret vand efterfulgt af 114 liter 5% natriumchlorid + 0,01 M Tris-HCl-puffer, pH = 7,0 + 25 μM neutralt EDTA.

Efter endnu en vask med 19 liter afioniseret vand elueres antibiotika 890A₂ og 890A₅ med 133 liter 3% natriumchlorid + 0,01 M tris-HCl, pH = 7,0 + 25 μM neutralt EDTA i 50% methanol. Fraktioner på hver 19 liter opsamles.

Bioaktiviteten, bestemt ved prøve over for *Salmonella gallinarum* MB 1287, fremkommer i fraktionerne 1 til 7 med et maximum i fraktion 3.

Fraktionerne 3 til 7 indeholdende 18% af den påførte aktivitet koncentrerer under reduceret tryk til 9,5 liter, og koncentratet påføres en kolonne indeholdende 38 liter XAD-2, som forud er vasket med 380 ml af hver af 60% (v/v) vandig acetone, afioniseret vand og 5% natriumchlorid i afioniseret vand. Antibiotika 890A₂ og 890A₅ elueres med 133 liter 25 μM neutralt EDTA i afioniseret vand. En fraktion på 19 liter efterfulgt af 4 fraktioner på 9,5 liter og 4 fraktioner på 19 liter opsamles. Bioaktiviteten, bestemt ved prøve over for *Salmonella gallinarum* MB 1287, fremkommer i fraktionerne 3 til 9 med et maximum i fraktion 4.

Fraktionerne 3 til 6 indeholdende 18% af aktiviteten af filtreret væske forenes og inddampes under reduceret tryk til 122 ml, og koncentratet indstilles på en pH-værdi på 6,45 ved tilsætning af 5 ml 1 M saltsyre. Koncentratet påføres en kolonne (7,9 x 60 cm) af XAD-2, som forud er vasket med 16 liter af hver af 60% vandig acetone, afioniseret vand og 5% natriumchlorid i afioniseret vand. Antibiotika 890A₂ og 890A₅ elueres med 8 liter afioniseret vand med en strømningshastighed på 50 ml pr. minut. Fraktioner på 200 til 1000 ml opsamles.

Bioaktiviteten, bestemt ved prøve over for *Salmonella gallinarum* MB 1287, fremkommer i fraktionerne 5 til 20, der er fra 1900 til 7700 ml elueret rumfang. Værdierne for A₂₂₀ og HAEA₃₀₄ måles ligeledes på fraktionerne 9 til 20. Fraktionerne 9 til 12 har 261 til

286 bioaktivitetsenheder pr. HAEA₃₀₄-enhed, og fraktionerne 16 til 20 har 23-28 enheder/HAEA₃₀₄-enhed, og fraktionerne 13 til 16 har mellemliggende værdier, hvilket viser en væsentlig separation af antibiotika 890A₂ og 890A₅ på denne kolonne. Fraktionerne 15 til 19, indeholdende hovedparten af 890A₅, opsamles til yderligere rensning.

De opsamlede fraktioner 15 til 19 inddampes under reduceret tryk til 250 ml. Til koncentratet sættes 250 ml methanol, og prøven påføres ved en strømningshastighed på 2 ml pr. minut på en kolonne (3,4 x 50 cm) Dowex-1 x 4 (Cl-) minus 400 mesh, som var vasket med 50% methanol. Kolonnen elueres med 8 liter 0,1M NaCl + 0,005 M NH₄Cl + 0,0001M NH₃ i 50% methanol med en strømningshastighed på 2 ml per minut. Der opsamles fraktioner på 10 ml.

Antibiotikum 890A₅ elueres i fraktioner 505 til 605 med et maximum i fraktion 550. Fraktionerne 520 til 580 samles, og en 300 ml portion heraf inddampes til 4 ml under reduceret tryk. Til koncentratet sættes 6 ml methanol og 25 μ l 1 M NaOH til opnåelse af en endelig pH værdi på 7,3.

Det således indstillede koncentrat påføres en kolonne (2,2 x 70 cm) af Sephadex G-10, som er indstillet på ligevægt med 0,02 mM NH₃ i 50% methanol. Kolonnen elueres med 0,02 mM NH₃ i 50% methanol med en strømningshastighed på 1 ml pr. minut.

890A₅ elueres i fraktionerne 38 til 88 med et maximum i fraktionerne 39 og 40. Fraktionerne 40 til 68 forenes, og pH indstilles fra 6,3 til 6,8 med 1 M NaOH. De opsamlede fraktioner 40 til 68 inddampes til 4 ml under reduceret tryk, og 80 μ l af 1 M NaOH til-sættes under indampning til opretholdelse af pH på mellem 7,0 og 7,3. Til de dannede 4 ml koncentrat sættes 20 μ l 1 M NaOH, hvorved pH-værdien blev 7,4.

Koncentratet renses yderligere ved påføring på en kolonne (3,4 x 46 cm) Dowex-50 x 2 (Na+), 200-400 mesh, som er vasket med 4 liter 0,2 mM NaOH efterfulgt af 800 ml afioniseret vand. Det antibiotiske stof elueres med afioniseret vand med en strømningshastighed på 4,1 ml pr. minut. Der opsamles fraktioner på 8,2 ml.

Antibiotiket fremkommer i fraktionerne 22 til 27 med et maximum i fraktion 23. Fraktionerne 23 til 25 opsamles, og de indeholder 152 A_{308} -enheder med et forhold A_{308}/A_{260} på 2,00. Ledningsmålingerne angiver tilstedeværelsen af 70 $\mu\text{mol NaCl}$ i de opsamlede fraktioner.

En 4 ml portion af de opsamlede Dowex-50 fraktioner 23-25 omdannes til ammonium-formen ved gennemledning over en kolonne (0,7 cm x 12 cm) Dowex-50 x 2 (NH_4^+), 200-400 mesh, som er vasket i 100 ml 0,1 mM NH_3 efterfulgt af 10 ml afioniseret vand. Prøven elueres med afioniseret vand, idet der opsamles fraktioner på 1 til 2 ml. Alle fraktioner med A_{308} større end 1 forenes til opnåelse af i alt 6 ml med $A_{308} = 30$. Denne prøve inddampes under reduceret tryk til 0,725 ml og to 50 μl portioner pipetteres separat i 2 koniske 0,5 ml reaktions-ampuler og lyophiliseres.

Trimethyl-silylering af antibiotika 890A₅ resulterer i 3 forskellige derivater: et di- og et tri-methylsilyl-derivat (molvægt henholdsvis 456 og 528) og en lille mængde af et tetra-trimethylsilyl-derivat af et hydrolyseret produkt (molvægt 618), hvor β -lactam-ringen er åbnet.

Værdierne for de vigtigste massespektrale fragmenter er angivet i det efterfølgende:

di-trimethylsilyl-derivat: 441; 299; 298 og 84
tri-trimethylsilyl-derivat: 513; 371 og 156;
tetra-trimethylsilyl-derivat (kun signal med lav resolution observeret): 618 og 603.

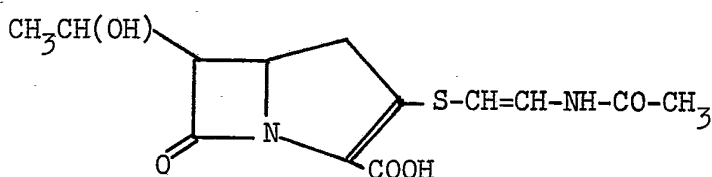
En 18,6 ml portion af de samlede Dowex-50 fraktioner 23-25 inddampes til 3 ml under reduceret tryk, og en 1,96 ml portion fryses og lyophiliseres i en 14 ml glas-ampul til opnåelse af 2,73 mg faste stoffer indeholdende en blanding af antibiotikum 890A₅ og natriumchlorid. Da ledningsevnen af fraktionerne 23-25 angiver, at 45% af de faste stoffer bestod af natriumchlorid, kan E% af 490 ved 308 nm beregnes for en saltfri prøve af 890A₅ ud fra et observeret E% af 272. De 1,0 ml rest fra 3,0 ml koncentrat lyophiliseres separat for NMR analyse.

I det efterfølgende er angivet 100 MHz-NMR-signaler for 890A₅ natriumsalt i D₂O i forhold til den internationale standard DSS; kemiske skift er angivet i ppm og koblingskonstanten i Hz; den tilsyneladende multiplicitet er angivet.

1,29 (d, J=6,2, CH₃-CH); 2,05 (s, CH₃C=O); 3,09 (app. d af d, C-CH₂-C); 3,41 (d af d, J=5,0, 3,0, CH-C=O); 4,16 (m, >CH-N og >CH-OH); 6,00 og 7,11 (dubletter, J=13,8, S-CH=CH-N).

P a t e n t k r a v :

1. Fremgangsmåde til fremstilling af det antibiotiske stof 890A₂ og/eller det antibiotiske stof 890A₅ med formlen



hvor antibiotikum 890A₂ og 890A₅ er isomere forbindelser, eller farmaceutisk acceptable salte deraf, k e n d e t e g n e t ved, at en stamme af Streptomyces flavogriseus dyrkes i et vandigt næringsmedium indeholdende assimilerbare kilder for carbon, nitrogen og uorganiske salte under neddykkede aerobe betingelser, hvorefter det eller de antibiotiske stoffer udvindes, om ønsket i form af salte.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at mikroorganismen er Streptomyces flavogriseus NRRL 8139.

Fremdragne publikationer: