

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 143713 B



- (21) Ansøgning nr. 4972/76 (51) Int.Cl.³ C 12 P 17/18
C 07 D 487/04
(22) Indleveringsdag 3. nov. 1976
(24) Løbedag 3. nov. 1976
(41) Alm. tilgængelig 22. maj 1977
(44) Fremlagt 28. sep. 1981
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 21. nov. 1975, 634301, US

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

(72) Opfinder Jean Sawyer Kahan, US: Frederick Marvin Kahan, US:
Robert Thomas Goegelman, US: Edward Olley Stapley, US: m. fl.
(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Hofman-Bang & Boutard.
-

- (54) Fremgangsmåde til fremstilling af
et antibiotisk stof N-acetyl-thi-
enamycin og salte deraf.

Den foreliggende opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af det hidtil ukendte antibiotiske stof N-acetyl-thienamycin med den i krav 1 angivne formel I og ikke-giftige farmaceutisk acceptable salte deraf. Disse forbindelser er aktive over for både Gram-positive og Gram-negative bakterier.

Opdagelsen af penicillinets antibiotiske egenskaber har i høj grad stimuleret interessen for dette område, hvilket har resulteret i opdagelsen af mange andre værdifulde antibiotiske stoffer, såsom: andre penicilliner, cephalosporiner, streptomycin, bacitracin, tetracycliner, chloramphenicol og erythromycin. Ingen af disse antibiotika er aktive over for samtlige klinisk vigtige pathogene bakterier. For eksempel er nogle hovedsagelig kun aktive over for Gram-positive bakterier. Endvidere har en erhvervet resistens

UK 143713 B

som følge af en omfattende anvendelse af kendte antibiotika til behandling af bakterieinfektioner givet anledning til alvorlige resistensproblemer.

Manglerne ved kendte antibiotika har derfor stimuleret yderligere forskning for at finde andre antibiotika, som er aktive over for et større område af patogener samt over for resistente stammer af særlige mikroorganismer.

Den foreliggende opfindelse har til formål at fremstille et hidtil ukendt antibiotisk stof, der i det efterfølgende kaldes N-acetyl-thienamycin.

Dette er opnået ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, der er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 1 anførte.

Det omhandlede antibiotiske stof, N-acetyl-thienamycin, fremstilles altså ved dyrkning under kontrollerede betingelser af mikroorganismen *Streptomyces cattleya*. Ved dyrkning af *Streptomyces cattleya* i næringsmedium opstår desuden thienamycin. Fremstillingen af thienamycin ved gæring af *Streptomyces cattleya* er beskrevet i dansk fremlæggeskrift nr. 138 663.

Baseret på omfattende taxonomiske studier af *Streptomyces cattleya* der er isoleret af en jordprøve, er denne mikroorganisme identificeret som en actinomycet. En kultur heraf er deponeret i den permanente kultursamling hos Northern Regional Research Laboratories, Northern Utilization Research and Development Division, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Ill., under registreringsbetegnelsen NRRL 8057.

De morphologiske og dyrkningsmæssige egenskaber for *Streptomyces cattleya* fremgår af efterfølgende tabel 1.

TABEL 1

Morphologi - Sporophorerne er kompakte spiraler, der fremkommer som side- og terminale grene på luftmycelium. Sporerne er ellipsoidiske til cylindriske i form, $0,9\mu \times 1,2\mu$ i størrelse, forekommer i kæder på mere end 10.

Dyrkningssegenskaber

Tomat-pasta-havremel-agar

Vegetativ vækst - bagside tan, flad, udbredt;

Luftmycelium - orkidé (10 gc) blandet med hvidt;

Opløseligt pigment - intet.

Czapek Dox-agar (saccharose-nitratagar)

Vegetativ vækst - farveløs, flad, spredt;

Luftmycelium - sparsomt, lyserødt hvidt;

Opløseligt pigment - intet.

Ægalbumin-agar

Vegetativ vækst - tan med grå-orkidé nuance, flad, spredt;

Luftmycelium - orkidé (10 gc) blandet med lysere nuancer af orkidé og noget hvidt;

Opløseligt pigment - intet.

Glycerol-asparagin-agar

Vegetativ vækst - bagside-tan med grå-lyserød nuance, flad, spredt;

Luftmycelium - orkidé (10 gc) blandet med noget hvidt;

Opløseligt pigment - intet.

Gærekstrakt-glucose + saltagar

Vegetativ vækst - tan med grå-lyserød nuance;

Luftmycelium - orkidé (10 gc) blandet med lyserød-hvidt;

Opløseligt pigment - intet.

Gærekstrakt-maltekstrakt-agar

Vegetativ vækst - tan;

Luftmycelium - orkidé (10 gc) blandet med lyserødt-hvidt;

Opløseligt pigment - intet.

Pepton-jern-gærekstrakt-agar

Vegetativ vækst - tan;
Luftmycelium - intet;
Opløseligt pigment - svag brunfarvning af medium;
Melanin - negativ;
H₂S-produktion - negativ.

Næringsagar

Vegetativ vækst - lys tan;
Luftmycelium - intet;
Opløseligt pigment - intet.

Næringsstivelsesagar

Vegetativ vækst - creme til tan;
Luftmycelium - intet;
Opløseligt pigment - intet;
Hydrolyse af stivelse - moderat.

Næringsgelatine-agar

Vegetativ vækst - cremefarvet;
Luftmycelium - intet;
Opløseligt pigment - intet;
Smeltning af gelatine - moderat.

Gelatinestikkulturer

Vegetativ vækst - tan;
Luftmycelium - intet;
Opløseligt pigment - intet;
Smeltning af gelatine - moderat.

Kartoffelstykker

Vegetativ vækst - moderat, tan;
Luftmycelium - sparsomt, grålig-lyserød-hvidt;
Opløseligt pigment - intet.

Loeffler's blodserum

Vegetativ vækst - cremefarvet;
Luftmycelium - intet;
Opløseligt pigment - intet;
Smeltning - ingen.

Skummetmælk-agar

Vegetativ vækst - tan;
Luftmycelium - sparsomt, hvidligt;
Opløseligt pigment - svag brunfarvning af medium;
Hydrolyse af casein - positiv.

Lakmusmælk

Vegetativ vækst - tan til brun;
Luftmycelium - intet;
Farve - intet opløseligt pigment, lakmusindikator bliver blålig;
Koagulering og/eller peptonisering - partiel peptonisering,
bliver alkalisk.

Skummetmælk

Vegetativ vækst - tan;
Luftmycelium - intet;
Opløseligt pigment - intet;
Koagulering og/eller peptonisering - partiel peptonisering,
bliver alkalisk.

Tyrosin-agar

Vegetativ vækst - tan;
Luftmycelium - blanding af orkidé (10 gc) og hvidt;
Opløseligt pigment - intet;
Dekomponering af tyrosin - positiv.

Alle ovennævnte målinger og iagttagelser blev udført efter tre ugers dyrkning ved 28°C, med mindre andet er bemærket. pH-værdien af de ved disse undersøgelser anvendte medier var tilnærmelsesvis neutral, nemlig pH = 6,8-7,2. Farvebetegnelserne i beskrivelsen er i overensstemmelse med definitionerne i Color Harmony Manual, 4. udgave (1958), Container Corporation of America, Chicago, Illinois.

Streptomyces cattleya blev også afprøvet for evnen til at udnytte eller assimilere forskellige carbonhydrater. Til dette formål blev mikroorganismen dyrket på et syntetisk grundmedium (Pridham and Gottlieb) indeholdende 1% af carbonhydratet ved 28°C i tre uger. pH-værdien af det anvendte medium var tilnærmelsesvis neutral (6,8 - 7,2). Tabel 2 viser udnyttelsen af disse carbonhydratkilder af *Streptomyces cattleya*: + indikerer god vækst, ± dårlig vækst og - ingen vækst for det pågældende carbonhydrat.

TABEL 2

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

Mængden af vækst ved forskellige temperaturer, oxygenkravet og mikroorganismens indvirkning på nitrat er følgende:

Temperaturområde (gærekstrakt-glucose + salt-agar)

28°C - God

37°C - Moderat

50°C - Ingen vækst

Oxygenkrav (stikkultur i gærekstrakt-glucose + salt-agar)

Aerobisk

Nitratreduktion - positiv.

Det antibiotiske stof N-acetyl-thienamycin dannes ved aerob gæring af et egnet næringsmedium under kontrollerede betingelser efter podning med mikroorganismen *Streptomyces cattleya*. Til denne gæring anvendes de sædvanlige vandige medier, som også benyttes ved fremstilling af andre antibiotiske stoffer. Sådanne medier indeholder kilder for carbon, nitrogen og uorganiske salte, som assimileres af mikroorganismen.

I almindelighed kan anvendes carbonhydrater, såsom sukkerstoffer, f.eks. glucose, fructose, maltose, saccharose, xylose og mannitol, og stivelser, såsom korn, f.eks. havre, rug, majsstivelse og majs-mel, enten alene eller i kombination som kilder for assimilerbar carbon i næringsmediet. Den nøjagtige mængde carbonhydrat i mediet afhænger delvis af de øvrige bestanddele af mediet, men sædvanligvis anvendes carbonhydrat i en mængde mellem 1 og 6 vægtprocent af mediet. Sådanne carbonhydratkilder kan anvendes enkeltvis, eller flere kan kombineres i mediet. I almindelighed kan anvendes mange forskellige proteinholdige materialer som nitrogenkilde ved gæringsprocessen. Egnede nitrogenkilder er for eksempel gær-hydrolysater, primær gær, sojabønne-mel, bomuldsfrøolie, hydrolysater af kasein, majsstøbevæske, distiller's solubles eller tomatpasta. Nitrogenkilderne anvendes enten alene eller i kombination i mængder fra 0,2 til 6 vægtprocent af næringsmediet.

Dyrkningsmediet skal endvidere indeholder uorganiske næringssalte, der indeholder natrium-, kalium-, ammonium-, calcium-, phosphat-, sulfat-, chlorid- og carbonationer. Endvidere må mediet indeholde spormetaller, såsom cobalt, mangan, jern og magnesium.

Fermenteringen udføres ved temperaturer mellem 20 og 37°C, men optimale resultater opnås ved temperaturer mellem 22 og 30°C. Næringsmediets pH-værdi ved dyrkningen af *Streptomyces cattleya* under fremstilling af N-acetyl-thienamycin kan variere mellem 6,0 og 8,0.

Selv om der kan dannes N-acetyl-thienamycin både ved overfladekulturer og neddykkede kulturer, foretrækkes det at udføre fermenteringen i neddykket tilstand.

Ved gæring i lille målestok er det hensigtsmæssigt at pøde et egnet næringsmedium med den antibiotikum-producerende kultur, hvorefter der overføres til et produktionsmedium, således at gæringen kan forløbe ved konstant temperatur på 24°C under rystning i flere dage.

Fermenteringen indledes i en steril kolbe indeholdende mediet efter et eller flere trin til udvikling af podekulturer. Næringsmediet hertil er enhver egnet kombination af carbon- og nitrogenkilder. Podekolben rystes ved konstant temperatur på ca. 28°C i en eller to dage, eller indtil væksten er tilfredsstillende, og en del af den dannede vækst anvendes til podning af enten endnu et trin podekultur eller til produktionsmediet. Hvis der anvendes mellemtrins-podekolber, udvikles de på samme måde; det vil sige en del af indholdet af kolben fra sidste podetrin anvendes til podning af produktionsmediet. De podede kolber rystes ved konstant temperatur i flere dage, og efter afslutning af inkubationsperioden bliver indholdet af kolberne centrifugeret eller filtreret.

For fremstilling i stor stil foretrækkes det at udføre fermenteringen i egnede tanke, der er udstyret med omrører og organer til luftning af gæringsmediet. Ved denne metode oparbejdes næringsmediet i tanken, der steriliseres ved opvarmning til temperaturer på cirka 120°C . Efter afkøling podes det steriliserede medium med en forud dyrket podekultur af produktionsmediet, og fermenteringen bringes til at forløbe et tidsrum, f.eks. 3-5 dage under omrystning og/eller luftning af næringsmediet, medens temperaturen holdes på ca. 24°C . Denne metode til fremstilling af N-acetyl-thienamycin er særlig velegnet til fremstilling af store mængder antibiotisk stof.

Fysiske og kemiske egenskaber for N-acetyl-thienamycin

Et NMR-spektrum ved 100 MHz for N-acetyl-thienamycin viser følgende toppe:

- δ 1,27, d, 3H, J $\approx$ 6,5;
- δ 1,98, s, 3H;
- δ 2,94 m, 2H;

δ 3,17, m, 2H;
 δ 3,38, t, 2H, $J \approx 6,5$;
 δ 3,38, m, 1H;
 δ 4,20, m, 2H.

NMR-spektret af en kombineret opløsning af N-acetyl-thienamycin dannet ved fermentering og ved acetylering af thienamycin kan ikke skelnes fra hinanden i de enkelte opløsninger. Af λ max-afhængigheden på pH-værdien er bestemt et pK_a på $3,3 \pm 0,1$ for COOH-gruppen i N-acetyl-thienamycin.

Ved papir-elektroforese i 0,1M kaliumphosphat-puffer, pH = 7, under anvendelse af Schleicher og Schuell nr. 2043-B-papir med en spændingsgradient på 50 v/cm, vil både N-acetyl-thienamycin opnået ved fermentering og opnået ved acetylering af thienamycin vandre 2,7 cm mod anoden i løbet af 20 minutter ved 10°C. Det antibiotiske stof lokaliseres ved bioautografi på *Vibrio percolans*, ATCC 8461 (uden mellemliggende tørring af papiret), og vandringsen måles fra påføringspunktet til centret for zoneinhibering.

Tyndtlagskromatografi ved hjælp af cellulose-overtrukne ark og et opløsningsmiddel bestående af ethanol:vand, 70:30 afslører et R_f for N-acetyl-thienamycin opnået ved gæring og opnået ved acetylering af thienamycin på 0,7, bestemt ved bioautografi på *Vibrio percolans*, ATCC 8461. R_f -værdien refererer til afstanden fra begyndelsespunktet til centret for bioaktivitet divideret med afstanden fra begyndelsespunktet til opløsningsmiddel-fronten.

IR-spektret for N-acetyl-thienamycin fremgår af tegningen.

N-acetyl-thienamycin udviser endvidere den i det efterfølgende beskrevne antibiotiske spektrum-profil. Ved prøven anvendes Bauer-Kirby-skivediffusionsmetoden, som kun er modificeret ved anvendelse af 2 mm dybde af agarpladerne. Resultaterne, udtrykt ved diameteren i millimeter af zoneinhibering, fremgår af tabel 3. Denne tabel indeholder den antibiotiske spektrum-profil for N-acetyl-thienamycin og for det materiale, som er opnået ved acetylering af thienamycin.

TABEL 3

Test-organisme	Merck nr.	ATCC nr.	Antibiotisk resistens ^x	N-Acetyl-thienamycin ^a 9,85 µg/disc ^{xx}	N-Acetyl-thienamycin ^b 10,35 µg/disc ^x
Staphylococcus aureus	MB2985 MB2314	-	- P	37 37	37 37
Bacillus subtilis	MB 964	6633	-	43	44,5
Escherichia coli	MB2884 MB2964 MB2482	- - -	- P,C P	31,5 28,5 28	31,5 29,5 28
Klebsiella pneumoniae	MB2921 MB2922	- -	P P	28 27	28,5 30
Enterobacter cloacae	MB2646 MB2647	- -	P,C -	26,5 29	27 29
Proteus mirabilis	MB2830	-	P,C	25	26
Proteus morganii	MB2833	-	P,C	25,5	25
Serratia	MB2840	-	P,C	27	27
Pseudomonas aeruginosa	MB2824 MB2835 MB3286	- - -	P,C P,C P,C	23 11 (uklar) 0	24 11 (uklar) 0

^xP = Penicilliner er repræsenteret af ampicillin

C = Cephalosporiner er repræsenteret af cephalothin

^{xx}Vægtberegninger baseret på et antaget E₁^{1%} cm, 301 nm = 290 og en hydroxylamin-udslukkelighed på 96% for rent materiale

^a fremstillet ved fermentering af Streptomyces cattleya

^b fremstillet ved acetylering af thienamycin

N-Acetyl-thienamycin udviser aktivitet in vivo over for Gram-negative og Gram-positive organismer og er derfor velegnet til kontrollering af bakterieinfektioner på mennesker og dyr. Ved bestemmelsen af aktiviteten in vivo opløses N-acetyl-thienamycin i og fortyndes med 0,01M natriumphosphat, pH = 7,0, til opnåelse af fem firedobbelte koncentrationer af det aktive stof til afprøvning. Hvide schweiziske hunmus med en gennemsnitsvægt på 21 g blev inficeret intraperitonealt med prøveorganismen suspenderet i væsken. Antallet af organismer, som blev injiceret, blev bestemt ved en standard-plade-tælle-teknik. Ved infektionstidspunktet og seks timer senere blev nogle af musene behandlet intraperitonealt med det antibiotiske stof. Fem mus blev anvendt ved hver koncentration af det afprøvede lægemiddel. Kontrolprøver på fem mus for hver af flere fortyndinger af den inficerede kultur blev medtaget i hver prøve for at beregne antallet af organismer, som var dødelige over for 50% af de inficerede, ubehandlede mus (LD_{50}). Denne beregning blev gjort under anvendelse af overlevelsesdata på den syvende dag efter infektion, på hvilket tidspunkt mængden af lægemiddel, som skulle beskytte 50% af de inficerede mus (ED_{50}) også blev beregnet.

Alle dyrene, som modtog denne påvirkning og ikke blev behandlet med det antibiotiske stof, døde inden for 48 timer efter infektionen. Effektiviteten af N-acetyl-thienamycin fremgår af tabel 4:

TABEL 4

Effektivitetsstudier (mus)^a

Organisme	LD_{50}	Behandlings- vej - dosis	ED_{50} mg/kg dosis ^c
Staphylococcus aureus 2949	13	i.p. x 2 ^b	0,050

^aCD-1, hunmus, legemsvægt 21 g

^bIndicerer behandling på tidspunkt for infektion og igen 6 timer senere

^cVægt af N-acetyl-thienamycin baseret på bedømt $E_{1\%}^{1\%}$ 1 cm, 301 nm = 290 og hydroxylamin-udslukkelighed af 96% rent materiale.

N-Acetyl-thienamycin er et værdifuldt antibiotisk stof, der er aktivt over for forskellige Gram-positive og Gram-negative bakterier og finder derfor anvendelse i den humane og veterinære medicin. De ifølge opfindelsen fremstillede forbindelser kan anvendes som antibakterielt lægemiddel til behandling af infektioner, som er forårsaget af Gram-positive eller Gram-negative bakterier, f.eks. over for *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* og *Enterobacter cloacae*. Det ifølge opfindelsen dannede antibiotiske stof kan yderligere anvendes som tilsætningsmiddel til foderstoffer til dyr, til præservering af foderstoffer og som desinfektionsmidler. For eksempel kan det anvendes i vandige kompositioner i koncentrationer fra 0,1 til 100 dele eller fortrinsvis i koncentrationer på 1-10 dele af det antibiotiske stof pr. milliondele opløsning for at forhindre og inhibere væksten af skadelige bakterier på medicinske og dentale instrumenter og som baktericid til industriel anvendelse, f.eks. i vandholdige malinger og i papirmølle vand til inhibering af væksten af skadelige bakterier.

Det ifølge opfindelsen fremstillede antibiotiske stof kan anvendes i form af forskellige farmaceutiske præparater som eneste aktive bestanddel eller i kombination med et eller flere andre antibiotika eller med et eller flere farmakologisk aktive stoffer. Som eksempel på førstnævnte kan nævnes et aminocyclitol-antibiotikum såsom gentamycin, der kan tilsættes for at udvide det antimikrobielle spektrum og mindske enhver chance for udvikling af resistente organismer. Som eksempel på sidstnævnte kan nævnes diphenoxylat og atropin, der kan kombineres i dosisformer til terapi af gastroenteritis. Det antibiotiske stof kan anvendes i kapselform eller som tabletter, pulvere eller flydende opløsninger eller som suspensioner eller elixirer. Det kan indgives oralt, topisk, intravenøst eller intramuskulært.

Ved behandling af bakterieinfektioner kan den omhandlede forbindelse indgives oralt eller parenteralt på i og for sig kendt måde i mængder fra 2 til 600 mg/kg/dag, fortrinsvis 5-100 mg/kg/dag, hensigtsmæssigt fordelt tre eller fire gange pr. dag. Der kan således benyttes enhedsdoser, f.eks. indeholdende 25, 250, 400,

800 eller 1.000 mg aktiv bestanddel med egnede fysiologisk acceptable bærermedium eller fortyndingsmiddel. Dosisenhederne har form af flydende præparater, såsom opløsninger eller suspensioner, eller faste stoffer i tabletter eller kapsler. Det vil forstås, at den optimale dosis i ethvert givet tilfælde vil afhænge af arten og styrken af infektionen, som skal behandles, og at mindre doser anvendes til pædiatrisk anvendelse efter lægens forskrift.

Der kan fremstilles ugiftige, farmaceutisk acceptable salte af N-acetyl-thienamycin, f.eks. farmakologisk acceptable salte, som er dannet med uorganiske og organiske baser, herunder metalsalte afledt af alkalimetall- eller jordalkalimetallhydroxider, carbonater eller bicarbonater, såsom 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.

De omhandlede salte kan fremstilles på i og for sig kendt måde. For eksempel fås monosaltene, såsom mononatriumsaltet, ved behandling af et ækvivalent natriumhydroxid med et ækvivalent af forbindelsen (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 en anden 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). De omhandlede salte er farmakologisk acceptable ugiftige derivater, der kan anvendes

som aktiv bestanddel i egnet farmaceutisk form. Endvidere kan de kombineres med andre lægemidler til dannelsen af præparater med et bredt aktivitetsspektrum.

De ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede fermenteringsvæsker indeholder antibiotisk stof med aktiviteter mellem 0,1 og 4 µg pr. ml. Antibiotiske præparater kan renses, og det antibiotiske stof kan udvindes på forskellige måder. En sådan metode består i at føre den filtrerede væske indeholdende N-acetylthienamycin, fortrinsvis indstillet til en pH-værdi mellem 4 og 5, gennem en kolonne af stærk kationbytterharpiks. Eksempler på sådanne harpikser er sulfonat-typen med styren-divinylbenzenmatrix, f.eks. polystyren nucleær sulfonsyre-harpiks Dowex 50 x 2 (fremstillet af Dow Chemical Co., Midland, Michigan), på natriumcyclus. Andre repræsentative medlemmer af denne gruppe stærkt kationbytterharpikser er Dowex 50 x 4, Dowex 50 x 8 (fremstillet af Dow Chemical Co., Midland, Michigan), Amberlite IR 120 (fremstillet af Rohm & Haas Co., Philadelphia, Pennsylvania), Duolite C25D (fremstillet af Chemical Process Co., Redwood City, California), Permutit Q (fremstillet af Permutit Co., Birmingham, New Jersey), Ionac C-249 (fremstillet af Ionac Chemical Co., Birmingham, New Jersey) og Amberlite 200.

Afløbet fra kationbytterharpiksen indeholdende det antibiotiske N-acetylthienamycin kan om ønsket renses yderligere ved andre rensningsmetoder. Det bemærkes, at thienamycin forbliver adsorberet på den stærke kationbytterharpiks. I overensstemmelse hermed kan disse to antibiotika adskilles klart.

En sådan procedure består i at adsorbere N-acetylthienamycin på en stærk basisk anionbytterharpiks. Typiske eksempler på sådanne stærkt basiske anionbytterharpikser er sådanne, som har en styren-divinylbenzen-matrix, f.eks. polystyren nucleær kvaternær ammoniumharpiks Dowex 1 x 2 (fremstillet af Dow Chemical Co., Midland, Michigan), på chloridcyclus. Andre repræsentative stærkt basiske anionbytterharpikser er 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 (fremstillet af Rohm and Haas, Washington Square, Philadelphia 5, Pennsylvania).

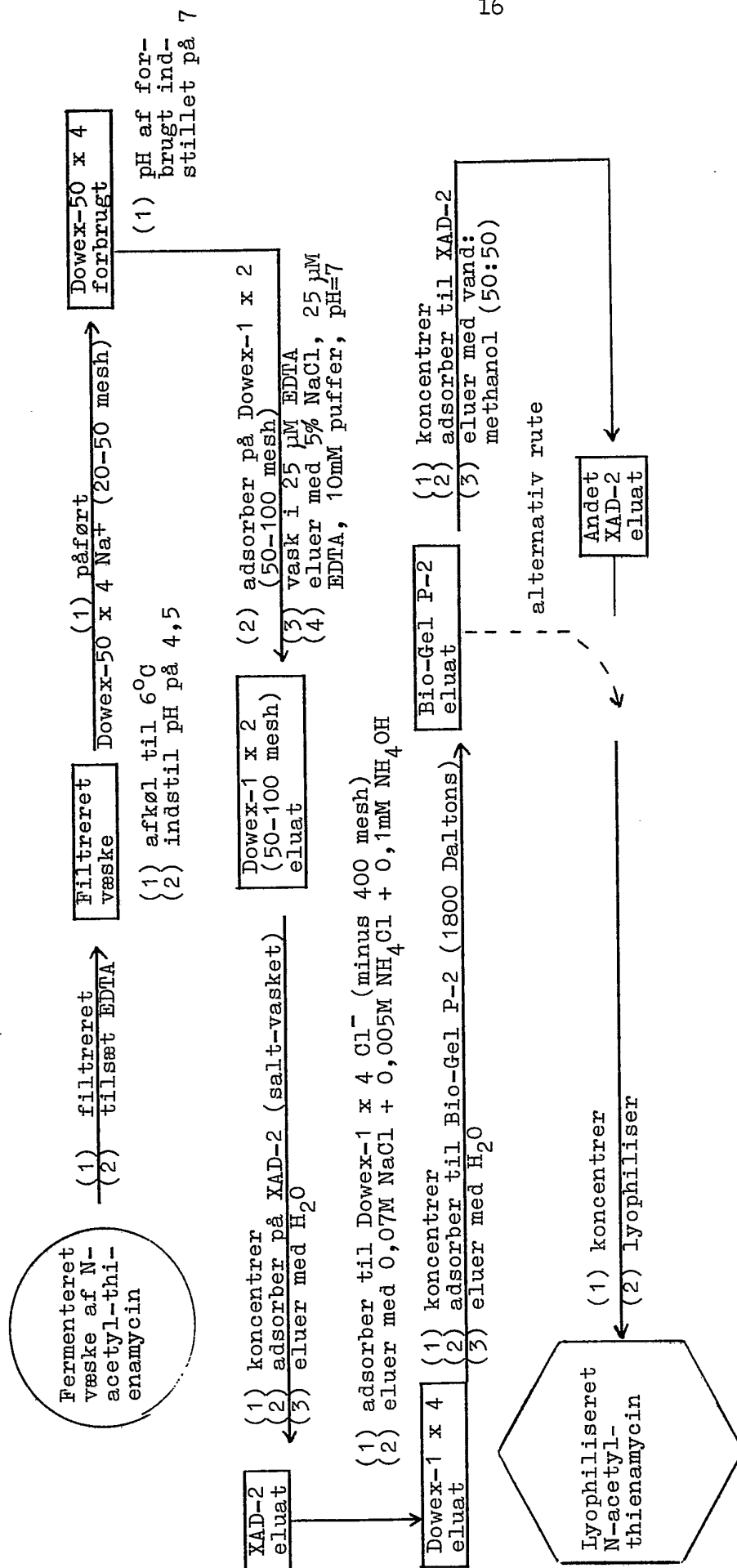
Det i eluatet indeholdte N-acetyl-thienamycin kan renses yderligere, hvis eluatet føres gennem en kolonne, der er pakket med en acrylesterpolymer med intermediær polaritet, såsom XAD-7 eller 8, eller gennem polystrene, ikke-polær, hydrofobe tværbundne divinylbenzen-polymere, såsom XAD-1, 2 og 4, fortrinsvis XAD-2. (XAD-1, 2, 4, 7 og 8 fremstilles af Rohm and Haas, Washington Square, Philadelphia 5, Pennsylvania).

En metode til at fremstille yderligere rensset N-acetyl-thienamycin består i at foretage 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).

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres i det efterfølgende ved hjælp af nogle eksempler. Efterfølgende tabel 5 illustrerer således et processkema for rensningen af N-acetyl-thienamycin.

TABEL 5

Oversigt over rensningsprocesser for antibiotikum N-Acetyl-thienamycin



Prøveprocedure for antibiotikum N-acetyl-thienamycin

I. Bioforsøg

Prøver af antibakteriel aktivitet udføres ved den i det efterfølgende beskrevne skive-diffusionsmetode under anvendelse af enten *Vibrio percolans* ATCC 8461 eller *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P som prøveorganisme.

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

En lyophiliseret kultur af *Vibrio percolans* ATCC 8461 suspenderes i 15 ml af et sterilt medium indeholdende 8 g/l Difco næringsvæske og 2 g/l gærekstrakt i destilleret vand (i det efterfølgende omtalt som NBYE). Kulturen dyrkes i 18 timer på 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 derefter i et køleskab.

De afkølede skråkulturer fra en enkelt lyophiliseret kultur anvendes i op til fire uger efter fremstillingen på følgende måde: Med en podenål overføres podemateriale fra skråkulturen og dispergeres i 50 ml NBYE i en 250 ml konisk kolbe. Kulturen dyrkes i 18 timer i et roterende rysteapparat ved 28°C og fortyndes derefter 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 opretholdes ved 46°C. Det podede agarholdige medium hældes i 100 x 15 mm petri-skåle af plastik, 5 ml pr. skål, afkøles og opretholdes ved 2-4°C i op til 5 dage før anvendelsen.

Plader indeholdende *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P fremstilles på følgende måde: En 18 timer gammel vækst af prøveorganismen, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, i næringsvæske plus 0,2% gærekstrakt fortyndes med næringsvæske plus 0,2% gærekstrakt til en suspension med 55% transmission med en bølgelængde på 660 nm. Denne suspension sættes til Difco-næringsagar, suppleret med 2,0 g/l Difco gærekstrakt ved 47°C til 48°C til fremstilling af en

blanding indeholdende 33,2 ml af suspensionen pr. liter agar. 5 ml af denne suspension hældes i Petri-skåle med en diameter på 85 mm, og de dannede plader afkøles og opretholdes ved 4°C indtil anvendelsen (maksimalt 5 dage).

Prøver af det antibiotiske stof fortyndes til en passende koncentration i phosphatpuffer ved pH = 7. Skiver af filterpapir, 6,35 eller 12,7 mm i diameter, dyppes i prøveopløsningen og anbringes på overfladen af prøvepladerne. Pladerne inkuberes ved 37°C i 18 timer, og inhiberingszonen måles som mm diameter. Inhiberingszonen målt i mm bestemmer de relative aktiviteter.

II. Hydroxylamin-udslukkelig absorption

Forholdet mellem absorption målt ved 301 nm, som kan skyldes indholdet af antibiotisk stof i den urene prøve, bestemmes ved selektiv udslukning af denne absorption (med sammenhørende inaktivering af antibiotisk aktivitet) efter reaktion med fortyndet hydroxylamin.

Prøver indeholdende antibiotisk stof fremstilles i 0,01M kaliumphosphat-puffer ved pH = 7 og med en oprindelig A_{301} mellem 0,1 og 1,0. Frisk fremstillet neutraliseret hydroxylamin ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ plus NaOH til en endelig pH-værdi på 7) sættes til en slutkoncentration på 10mM, og reaktionen bringes til at forløbe ved stuetemperatur i mindst 30 minutter. Det dannede A_{301} subtraheres fra den oprindelige aflæsning (efter korrektion for fortynding med tilsat reagens) og giver hydroxylamin-udslukkelig absorption. Opløsninger af rent N-acetyl-thienamycin udviser en hydroxylamin-udslukkelig absorption på 96,0 %.

EKSEMPEL 1

Et rør med lyophiliseret kultur af *Streptomyces cattleya* NRRL 8057 åbnes aseptisk, og indholdet suspenderes i et rør indeholdende 0,7 ml steril 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

En 0,2 ml portion af denne suspension anvendes til podning af en skråkultur af Medium A (plus agar) med følgende sammensætning:

Medium A

Gær autolysat (Ardamin ^x)	10,0 g
Glucose	10,0 g
⁺ Phosphat-puffer	2,0 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 g
Destilleret H_2O	1000 ml

pH indstilles på 6,5 med NaOH

^xArdamin: Yeast Products Corporation

⁺Phosphat-puffer-opløsning

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

Til skråkulturer: tilsæt agar - 25,0 g/l.

Den podede skråkultur inkuberes i 28 dage ved 28°C og henstilles derefter ved 4°C.

En portion af sporerne og luftmyceliet for denne skråkultur anvendes til podning af en luftet 250 ml konisk podekolbe indeholdende 50 ml af Medium A (uden agar). Denne podekolbe rystes ved 28°C i et rysteapparat ved 220 omdrejninger pr. minut (50 mm slaglængde) i 2 dage, efter hvilket tidspunkt væksten er tilfredsstillende.

Femten 250 ml koniske kolber, hver indeholdende 40 ml Medium B, podes med 1 ml pr. kolbe af væksten fra podekolben. Medium B

har følgende sammensætning:

Medium B

Majsmel	20,0 g
Distiller's Solubles	10,0 g
Sojabønneemel	15,0 g
Natriumcitrat	4,0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
^{xx} Polyglycol 2000	0,25% pr. vol.
Destilleret H_2O	1000 ml
pH: indstilles på 6,5 med NaOH	
^{xx} Polyglycol 2000: Dow Chemical Co.	

Disse 15 produktionskolber rystes ved 28°C på et rysteapparat ved 220 omdrejninger pr. minut (50 mm slaglængde) i 53 timer. En opsamlet portion (efter 50 timer) af væsken fra 15 kolber blandes sammen, og en portion heraf centrifugeres for prøve. Forud for prøven indstilles pH-værdien af den centrifugerede væske til 6,5 fra 5,9 med natriumhydroxid.

Prøver udførtes på Staphylococcus aureus ATCC 6538P og Vibrio percolans ATCC 8461 prøveplader med 12,7 mm skiver, dyppet i den centrifugerede væske.

Prøveresultaterne er følgende:

ATCC 6538P aktivitet (mm zone)	ATCC 8461 aktivitet (mm zone)
39/44 SH	35/44 SH

SH = svagt uklart

200 ml af den filtrerede væske indstilles på en pH-værdi på 8,0 og adsorberes på 10 ml Dowex 1 x 2 harpiks på chloridcyclus ved 2 ml/min., idet afløbet opsamles i 10 x 20 ml fraktioner.

Adsorbatet elueres med 90% methanol; 10% vand; 3% ammonium-chlorid v/v/w, idet eluatet opsamles i 10 x 5 ml fraktioner. Eluatfraktionerne 1-6 kombineres og inddampes i vakuum til fjernelse af methanolen. Koncentratet prøves ved skive-diffusions-proceduren med en 12,7 mm skive indeholdende 100 µl antibiotisk opløsning over for *Staphylococcus aureus* MB-2985, hvorved opnås en zonediameter på 28 mm.

Prøveplader af MB-2985 fremstilles på følgende måde:

En 18 timer gammel kultur af MB-2985, dyrket i hjerne-hjerte-infusionsmedium ved 37°C under omrystning fortyndes 20.000 gange og skylles over på overfladen af 10 ml hjerne-hjerte-infusions-agar i en 85 mm diameter Petri-skål. Skiver på 12,7 mm i diameter indeholdende 100 µl antibiotisk opløsning anbringes på pladerne, som derefter inkuberes i 18 timer ved 37°C. Inhiberings-zonerne aflæses i mm.

EKSEMPEL 2

Et rør af lyophiliseret kultur af *Streptomyces cattleya* NRRL 8057 åbnes aseptisk, og indholdet anvendes til podning af en luftet 250 ml konisk podekolbe indeholdende 50 ml Medium A med følgende sammensætning:

Medium A

Gær-autolysat (Ardamin ^x)	10,0 g
Glucose	10,0 g
⁺ Phosphat-puffer	2,0 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
Destilleret H ₂ O	1000 ml
pH: indstilles på 6,5 med NaOH	

^xArdamin: Yeast Products Corporation

⁺Phosphat-puffer-opløsning

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

Denne podekolbe rystes ved 28°C på et rysteapparat ved 220 omdrejninger pr. minut (50 mm slaglængde) i 2 dage, hvorved der opnås en tilfredsstillende vækst.

15 250 ml koniske kolber, hver indeholdende 40 ml Medium B, podes med 1 ml pr. kolbe af væksten fra podekolben. Medium B har følgende sammensætning:

Medium B

Majsmel	20,0 g
Distiller's Solubles	10,0 g
Sojabønneemel	15,0 g
Natriumcitrat	4,0 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,01 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
^{xx} Polyglycol 2000	0,25% pr. vol.
Destilleret H ₂ O	1000 ml
pH: indstilles på 6,5 med NaOH	
^{xx} Polyglycol 2000: Dow Chemical Co.	

Disse kolber rystes ved 28°C på et rysteapparat ved 220 omdrejninger pr. minut (50 mm slaglængde) i 3 dage, idet der foretages prøver under fermentationen. Prøverne udføres på standard *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P og *Vibrio percolans* ATCC 8461 prøveplader ved hjælp af 12,7 mm skiver, dyppet i den fracentrifugerede væske. pH-værdien af denne væske indstilles forud for prøven som angivet i efterfølgende tabel. Resultaterne er følgende:

Alder (timer)	<u>48</u>	<u>53</u>	<u>72</u>
ATCC 6538P aktivitet	33 /39h	31 /38h	21 /27h
ATCC 8461 aktivitet	35sh/46h	36sh/44h	33sh/38h
pH, initieel	5,2	5,1	4,8
pH, indstillet	6,1	6,2	6,9

sh = svagt uklar

h = uklar

Efter 53 timers forløb opsamles væskerne, der filtreres til opnåelse af 590 ml filtrat ved en pH-værdi på 5,9. pH-værdien af filtratet indstilles på 7,0, og 5,9 mg ethylendinitril-tetraeddikesyre (EDTA) tilsættes.

580 ml af det ovennævnte filtrat ved en pH-værdi på 7,0 adsorberes på 130 ml Dowex 1 x 2 harpiks på chloridcyclus, hvorved afløbet opsamles i 2 x 290 ml fraktioner. Adsorbatet vaskes derefter med 130 ml afioniseret vand. Det vaskede adsorbat opbevares i et kulderum i 18 timer og elueres derefter med 5% natriumchloridopløsning, idet der opsamles 6 x 50 ml fraktioner.

Udbyttet i procent af den oprindelige bioaktivitet, bestemt ved skive-plade-metoden, fremgår af følgende tabel:

	<u>Vibrio percolans</u>	<u>Staphylococcus aureus</u>
<u>Fraktion</u>	ATCC 8461	ATCC 6538P
Eluatfraktioner 1-5	26%	1%

Det antibiotiske stof N-acetyl-thienamycin påvises i fraktionerne 1-5 af NaCl-eluatet. Fraktion 4 prøves ved skive-diffusionsproceduren med 12,7 mm diameter skive indeholdende 100 µl antibiotisk opløsning over for Staphylococcus aureus MB 2985, hvorved der fås en zone på 29 mm. Plader indeholdende MB-2985 fremstilles ved den i eksempel 1 angivne proces.

EKSEMPEL 3

Et rør af lyophiliseret kultur af Streptomyces cattleya NRRL 8057 åbnes aseptisk, og indholdet suspenderes i 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 (plus agar) med følgende sammensætning:

Medium A

Gær-autolysat (Ardamin ^x)	10,0 g
Glucose	10,0 g
⁺ Phosphat-puffer	2,0 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 g
Destilleret H_2O	1000 ml
pH: indstilles på 6,5 med NaOH	

^xArdamin: Yeast Products Corporation

⁺Phosphat-puffer-opløsning

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

Til skråkulturer: tilsættes agar - 25,0 g/l

De podede skråkulturer dyrkes i en uge ved 28°C og opbevares derefter ved 4°C.

Ti ml Medium A (uden agar) overføres aseptisk til en af disse skråkulturer, sporerne og luftmyceliet skræbes over i suspensionen, og 1,2 ml af denne suspension anvendes til podning af tre 2 liter luftede koniske kolber indeholdende 500 ml Medium A (uden agar). Disse podekolber rystes ved 28°C på en ryster ved 160 omdrejninger pr. minut i 24 timer, hvorved væksten er tilfredsstillende.

Væksten af disse pødekolber samles og anvendes til podning af en 756 liter rustfri stål-gæringsbeholder indeholdende 467 liter Medium A (uden agar). Denne tank drives ved 28°C ved en omrørings-hastighed på 130 omdrejninger pr. minut og en luftstrøm på 283 liter pr. minut i 24 timer. Antiskummemiddel, Polyglycol 2000 (Dow Chemical Corp.) anvendes om nødvendigt, men højst i en mængde på 0,1%. Der udføres pH-bestemmelser således:

<u>Alder, timer</u>	<u>0</u>	<u>24</u>
pH	6,3	6,4

454 liter af gæringsmaterialet fra denne podetank anvendes til podning af en 5.670 liter rustfri gæringsbeholder indeholdende 4.082 liter Medium E, hvor Medium E har følgende sammensætning:

Medium E

Cerelose	25,0 g
Majsstøbevæske (våd basis)	15,0 g
Distiller's Solubles	10,0 g
Bomuldsfrømedium (Pharmamedia)	5,0 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
CaCO_3 (efter pH-indstilling)	3,0 g
Polyglycol 2000	0,25%
Vandværksvand	1000 ml

pH: indstilles på 7,3 med NaOH

Denne tank drives ved 24°C med en omdrejningshastighed på 70 omdrejninger pr. minut og en luftstrøm på 1550 liter pr. minut i 138 timer. Mere antiskummemiddel, Polyglycol 2000, tilsættes om fornødent, men højst i en mængde på 0,1%. Der gennemføres antibakterielle prøver med følgende resultat:

<u>Alder</u>	<u>pH</u>	<u>ATCC nr. 6633 (3/8" skiver) (mm)</u>
<u>0</u>	6,9	0
<u>24</u>	6,3	0
<u>36</u>	6,0	0
<u>48</u>	5,9	0
<u>60</u>	6,0	23
<u>72</u>	5,9	--
<u>84</u>	6,0	21
<u>96</u>	6,2	--
<u>108</u>	6,5	35
<u>120</u>	6,7	36
<u>132</u>	6,7	41
<u>138</u>	6,7	39

Gæringsvæsken på 4.082 liter filtreres ved hjælp af en 75 cm filterpresse og tilsat mængdefiltreringshjælpemiddel i en mængde på 4% w/v. 46 g ethylendinitril-tetraeddikesyre (EDTA), natrium-salt, sættes til filtratet. Opløsningen afkøles til 6°C, indstilles på en pH-værdi på $4,5 \pm 0,2$ og opretholdes ved 6°C. Det kolde filtrat indføres i en 480 liter kolonne med Dowex 50 x 4 Na⁺, 20-50 mesh med en hastighed på 48 liter/minut. Efter at et forløb på 1400 liter er passeret, opsamles 18,9 liter afløb, hvis pH-værdi indstilles på 7,08 med natriumhydroxid, og produktet opbevares ved 5°C.

En 3,8 cm kolonne pakket med 300 ml Dowex 1 x 2, 50-100 mesh, harpiks på chloridcyclus fremstilles og vaskes med 600 ml afioniseret vand ved 5°C. 4 liter af det kolde Dowex 50 x 4 afløb føres gennem kolonnen med en hastighed på 30 ml/minut. Kolonnen vaskes med 300 ml 25 µM EDTA. Det antibiotiske stof, N-acetylthienamycin elueres ved 5°C med en hastighed på 15 ml/minut med 900 ml 5% natriumchloridopløsning indeholdende 0,01M kaliumphosphat-puffer, pH = 7,0, og 25 µM EDTA. 14 fraktioner på 75 ml opsamles og prøves for biologisk aktivitet ved skive-diffusionsproceduren. Eluatfraktioner 3-9, der udgør 525 ml, samles og koncentrerer under vakuum til 115 ml. Koncentratet indeholder 65% af det totale bioaktive materiale påført kolonnen af Dowex 1 x 2 Cl⁻.

Eluatkoncentratet fra kolonnen påføres ved 5°C på en 3,8 cm diameter kolonne pakket med 450 ml forvasket XAD-2. Kolonnen forvaskes i rækkefølge med 4 kolonnerumfang:

- 1) 0,001M EDTA
- 2) 1N NaOH
- 3) Afioniseret H₂O
- 4) 1N HCl
- 5) Afioniseret H₂O
- 6) Methanol
- 7) Acetone
- 8) Afioniseret vand og forud for anvendelsen med 2250 ml 5% NaCl-opløsning indeholdende 25 µM EDTA.

Efter at prøven er påført kolonnen, efterfølges den af to 25 ml portioner vand. Kolonnen udvikles ved 5°C med afioniseret vand ved en strømningshastighed på 10 ml/minut. Den første fraktion indeholder 400 ml, og 11 yderligere fraktioner på 75 ml opsamles. pH-værdien af hver fraktion indstilles til mellem 6,9 og 7,13 med 1N natriumhydroxid eller 1N HCl. Fraktionerne 3-9, indeholdende 46% af det totale bioaktive materiale, der var påført kolonnen XAD-2, forenes til et totalt rumfang på 490 ml. En prøve på 45 ml udtages til bioforsøg ved standard-skive-diffusionsproceduren over for *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. De resterende 445 ml koncentrerer under et vakuum til 50 ml.

De 50 ml XAD-2 eluatkoncentrat pumpes ved 5°C ind i en 1,5 cm kolonne, pakket med 40 ml forvasket Dowex 1 x 4 Cl⁻, minus 400 ved 5°C og en hastighed på 1 ml/min. Dowex 1 x 4 Cl⁻, minus 400 (defineret ved dekantering fra vand) harpiks vaskes kolonnevis forud for anvendelsen med 240 ml 0,2M natriumchloridopløsning indeholdende 0,005 M ammoniumchlorid og 0,1 mM ammoniak med en hastighed på 1 ml/minut og derefter med 120 ml afioniseret vand med samme hastighed.

Efter at prøven er påført kolonnen, efterfølges den af to 5 ml portioner afioniseret vand. Kolonnen udvikles ved 5°C med en hastighed på 0,92 ml/minut med 0,07M natriumchlorid indeholdende 0,005M ammoniumchlorid og 0,1 mM ammoniak. Fraktioner på 8,6

til 9,3 ml opsamles. Fraktionerne opnået efter opsamling af 600 ml eluat og til og med 710 ml forenes, og denne portion indeholder 98% af det totale bioaktive materiale, som blev påført kolonnen af Dowex 1 x 4. Denne portion inddampes under vakuum til 2 ml.

Koncentratet fra Dowex 1 x 4 påføres en 2,2 cm diameter kolonne pakket med 200 ml Bio-Gel P-2, 200-400 mesh, med en udelukkelsesgrænse på 1800 Daltons (defineret forud til anvendelse ved dekantering fra destilleret vand).

Kolonnen af Bio-Gel P-2 vaskes forud for anvendelsen med 225 ml 1M natriumchlorid efterfulgt af 100 ml afioniseret vand. Kolonnen udvikles ved 5°C med afioniseret vand og en strømningshastighed på 1 ml/minut, og 2 ml fraktioner opsamles. Fraktioner fra 104 ml til 128 ml eluat, indeholdende 83% af bioaktiviteten, påført kolonnen af Bio-Gel P-2, kombineres og inddampes til 1,58 ml.

En 50 ml kolonne af XAD-2 (1,6 cm x 27 cm) fremstilles og forvaskes kolonnevis med 200 ml 1 mM EDTA, 1N natriumhydroxid, afioniseret vand, 1N saltsyre, afioniseret vand, methanol, acetone og afioniseret vand. Koncentratet fra Bio-Gel P-2 indeholdende 44,4 hydroxylamin-udslukkelig optisk tæthedsenheder påføres kolonnen med XAD-2 ved 5°C og efterfulgt af to 2 ml portioner afioniseret vand. Kolonnen vaskes med afioniseret vand med en hastighed på 1 ml/minut, indtil UV-absorptionen ved 300 nm af vaskevæskerne er reduceret til 0,060. Kolonnen elueres med 50% methanol i afioniseret vand med en hastighed på 1 ml/minut, og 1 ml fraktioner opsamles. Fraktioner med absorption ved 300 nm over 0,1 forenes og inddampes under vakuum til opnåelse af produktet, N-acetylthienamycin indeholdende 11,6 hydroxylamin-udslukkelige O.D.-enheder.

EKSEMPEL 4

Et rør af lyophiliseret kultur af *Streptomyces cattleay* NRRL 8057 åbnes aseptisk, og indholdet suspenderes i 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 (plus agar) med følgende sammensætning:

Medium A

Gær-autolysat (Ardamin ^x)	10,0 g
Glucose	10,0 g
⁺ Phosphat-puffer	2,0 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 g
Destilleret H_2O	1000 ml

pH: indstilles på 6,5 med NaOH

^xArdamin: Yeast Products Corporation

⁺Phosphat-puffer-opløsning

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

For skråkulturer: tilsættes agar - 25,0 g/l

De podede skråkulturer dyrkes i en uge ved 28°C og opbevares derefter ved 4°C.

Ti ml af Medium A overføres aseptisk til en af disse skråkulturer, sporerne og luftmyceliet skræbes til suspension, og 1,2 ml af denne suspension anvendes til podning af tre 2 liter pufrede koniske kolber indeholdende 500 ml Medium A (uden agar). Disse pødekolber rystes ved 28°C i et rysteapparat ved 160 omdrejninger pr. minut i 24 timer, hvorved der opnås en tilfredsstillende vækst.

Væksten fra disse podekolber samles og anvendes til podning af en 756 liter gæringsbeholder af rustfrit stål indeholdende 467 liter Medium A (uden agar). Denne tank drives ved 28°C med en omdrejningshastighed på 130 omdrejninger pr. minut og en luftstrøm på 283 liter pr. minut i 24 timer. Antiskummiddel, Polyglycol 2000 (Dow Chemical Corporation) anvendes om fornødent, men i en mængde på højst 0,1%. Der udføres pH-bestemmelser med følgende resultat:

Alder, timer	<u>0</u>	<u>24</u>
pH	6,3	6,4

454 liter af væksten fra denne podetank anvendes til podning af en 5.670 liter gæringsbeholder af rustfrit stål indeholdende 4.082 liter Medium E med følgende sammensætning:

Medium E

Cerelose	25,0 g
Majsstøbevand (våd basis)	15,0 g
Distiller's Solubles	10,0 g
Bomuldsfrømedium (Pharmamedia)	5,0 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,01 g
CaCO ₃ (efter pH-indstilling)	3,0 g
Polyglycol 2000	0,25%
Vandværksvand	1000 ml

pH: indstilles på 7,3 med NaOH

Denne tank drives ved 24°C med en omrøringshastighed på 70 omdrejninger pr. minut og en luftstrøm på 1550 liter pr. minut i 138 timer. Yderligere mængder antiskummiddel, Polyglycol 2000, tilsættes om fornødent, men højst i mængder på 0,1%. Der udføres antibakterielle prøver med følgende resultat:

<u>Alder</u>	<u>pH</u>	<u>ATCC nr. 6633 (3/8" skiver) (mm)</u>
<u>0</u>	6,9	0
<u>24</u>	6,3	0
<u>36</u>	6,0	0
<u>48</u>	5,9	0
<u>60</u>	6,0	23
<u>72</u>	5,9	--
<u>84</u>	6,0	21
<u>96</u>	6,2	--
<u>108</u>	6,5	35
<u>120</u>	6,6	36
<u>132</u>	6,7	41
<u>138</u>	6,7	39

Gæringsvæsken på 4.082 liter filtreres ved hjælp af en 65 cm filterpresse under tilsætning af filtreringshjælpemiddel i en mængde på 4% w/v. Der tilsættes 46 g ethylendinitril-tetraæddikesyre (EDTA), natriumsalt til filtratet. Dette afkøles til 6°C, og pH-værdien indstilles på $4,5 \pm 0,2$, hvorefter det opretholdes ved 6°C. Det kolde filtrat påføres en kolonne på 480 liter Dowex 50 x 4 natrium⁺, 20-50 mesh ved 48 liter/minut. Efter at der er passeret et forløb på 1400 liter, opsamles 18,9 liter afløb, hvis pH-værdi indstilles på 7,08 med natriumhydroxid, hvorpå der henstilles ved 5°C.

En 3,8 cm diameter kolonne pakket med 300 ml Dowex 1 x 2, 50-100 mesh, harpiks på chloridcyclus fremstilles og vaskes med 300 ml afioniseret vand ved 5°C. Fire liter koldt afløb fra Dowex 50 x 4 føres gennem kolonnen med en hastighed på 30 ml/minut. Kolonnen vaskes med 350 ml 25 µM EDTA og elueres derefter ved 5°C med 900 ml 5% natriumchloridopløsning indeholdende 0,1M Tris·HCl, pH = 7, og 25 µM EDTA med en hastighed på 15 ml/minut. Fraktioner på 75 ml opsamles og prøves ved skive-diffusionsproceduren over for Staphylococcus aureus ATCC 6538P. Fraktionerne 4-10 indeholdende 47% af den påførte bioaktivitet sættes til 42,5 ml af prøven, som var udtaget fra bio-prøver, fra den første portion XAD-2, beskrevet i eksempel 3. Disse forenede fraktioner indampes under vakuum til 100 ml, og pH-værdien indstilles på 6,32 med saltsyre.

En 3,8 cm diameter kolonne pakket med 450 ml XAD-2 harpiks forvaskes kolonnevis i rækkefølge med 4 kolonnerumfang:

- 1) 0,001M EDTA
- 2) 1N NaOH
- 3) Afioniseret H₂O
- 4) 1N HCl
- 5) Afioniseret H₂O
- 6) Methanol
- 7) Acetone
- 8) Afioniseret vand

og vaskes forud for anvendelsen med 2250 ml 5% natriumchloridopløsning indeholdende 25 μ M EDTA. Ovennævnte koncentrat påføres XAD-2 kolonnen og efterfølges af to 5 ml portioner afioniseret vand. Kolonnen udvikles ved 5°C med en hastighed på 10 ml/minut med afioniseret vand. Den første fraktion indeholder 40 ml, og efterfølgende fraktioner på 75 ml opsamles og prøves ved skivediffusions-proceduren. Fraktionerne 9 til 15 indeholdende 22% af bioaktiviteten, som påførtes XAD-2 kolonnen, samles og inddampes under vakuum til 56 ml.

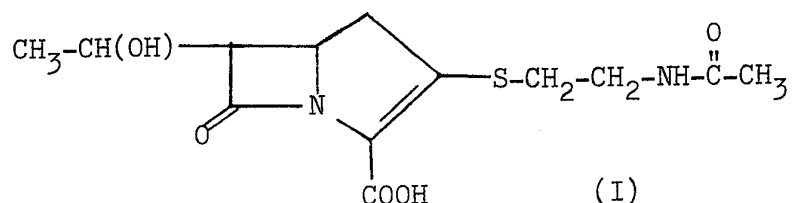
En 21 cm x 1,7 cm kolonne pakket med 40 ml Dowex 1 x 4 Cl⁻, minus 400 mesh (defineret ved dekantering fra vand) vaskes kolonnevis forud for anvendelsen med 240 ml 0,2M NaCl indeholdende 0,005M ammoniumchlorid og 0,1mM ammoniak med en hastighed på 1 ml/minut og derefter med 120 ml afioniseret vand med samme hastighed.

Koncentratet fra XAD-2 påføres kolonnen og efterfølges af to 2 ml portioner afioniseret vand og derefter af to 2 ml portioner elueringspuffer. Kolonnen elueres ved 5°C med en opløsning af 0,07M natriumchlorid indeholdende 0,005M ammoniumchlorid og 0,1mM ammoniak med en hastighed på 1 ml/minut. Fraktioner på 10 ml opsamles og prøves ved skivediffusionsmetoden. Eluatfraktioner fra 524 ml til 647 ml indeholdende praktisk taget 100% af den påførte bioaktivitet forenes og inddampes under vakuum til 2,3 ml. Koncentratet indeholder 36,4 hydroxylamin-udslukkelige optiske tæthedsenheder.

En 2,2 cm x 62 cm kolonne pakket med 225 ml Bio-Gel P-2, 200-400 mesh harpiks med en udelukkelsesgrænse på 1800 Daltons vaskes forud for anvendelsen med 225 ml 1M natriumchloridopløsning efterfulgt af 100 ml afioniseret vand. Koncentratet fra Dowex 1 x 4 påføres kolonnen og efterfølges af to 2 ml afioniseret vand. Kolonnen udvikles ved 5°C med afioniseret vand med en hastighed på 1 ml/minut, og 2 ml fraktioner opsamles og afprøves ved skive-diffusions-proceduren. Fraktioner på 124 ml til 129 ml indeholdende 7,04 hydroxylamin-udslukkelige O.D.-enheder forenes og inddampes under vakuum til 2 ml til opnåelse af en vandig opløsning af produktet, N-acetyl-thienamycin. Fraktioner fra 117 til 123 ml og 130 til 139 ml forenes til opnåelse af en opløsning af produktet, N-acetyl-thienamycin indeholdende 13,7 hydroxylamin-udslukkelige O.D.-enheder.

P a t e n t k r a v:

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et antibiotisk stof N-acetyl-thienamycin med formlen



eller et ikke-giftigt farmaceutisk acceptabelt salt deraf, k e n d e t v e d, at en mikroorganisme af arten *Streptomyces cattleya* dyrkes i et vandigt næringsmedium indeholdende assimilerbare kilder for carbon, nitrogen og uorganiske salte, fortrinsvis under neddykkede aerobe betingelser, hvorefter det dannede N-acetyl-thienamycin udvindes, om ønsket i form af et salt.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t v e d, at den dyrkede mikroorganisme er *Streptomyces cattleya* NRRL 8057.

Fremdragne publikationer:

143713

