



(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **149337 B**

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: **3626/81**
(22) Indleveringsdag: **14 aug 1981**
(41) Alm. tilgængelig: **17 feb 1982**
(44) Fremlagt: **05 maj 1986**
(86) International ansøgning nr.: –
(30) Prioritet: **16 aug 1980 GB 8026758**

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

(71) Ansøger: ***GRUPPO LEPETIT S.P.A.; Milano, IT.**
(72) Opfinder: **Bruno *Cavalleri; IT, Enrico *Selva; IT.**

(74) Fuldmægtig: **Kontor for Industriel Eneret**

(54) **Fremgangsmåde til fremstilling af antibiotikum
A/16686 faktor A₂ samt eventuelt yderligere fak-
tor A₁ og A₃ eller fysiologisk acceptable syread-
ditionssalte deraf**

(57) Sammen drag:

3626-81

Fremstilling af klorholdige antibiotiske stoffer be-
nævnt antibiotikum A/16686 faktorerne A₁, A₂ og A₃ ved dyrk-
ning af den hidtil ukendte antibiotikumstamme *Actinoplanes*
sp. ATCC 33076 under submerse, aerobe betingelser. Efter
dyrkningen kan der navnlig fra myceliemassen udvindes et
kompleks af de tre faktorer, og opfindelsen tager specielt
sigte på fraskillelse af den kvantitative hovedfaktor,
A/16686 faktor A₂, i i hovedsagen ren form. Alle tre fakto-
rer og deres fysiologisk acceptable syreadditionssalte er
især virksomme mod grampositive bakterier, og de kan an-
vendes til at forebygge eller behandle dentalcaries.

DK 149337 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af antibiotikum A/16686 faktor A_2 samt eventuelt yderligere faktor A_1 og A_3 , eller fysiologisk acceptable syreadditionssalte deraf, alle med de senere i nærværende beskrivelse angivne egenskaber.

Fra beskrivelsen til DK patentansøgning nr. 1400/80 må det anses for kendt at fremstille antibiotikum A/16686, der har en række i nævnte beskrivelse nærmere angivne egenskaber, ved at man dyrker mikroorganismestammen *Actinoplanes* sp. ATCC 33076 under aerobe submerse betingelser i et dyrkningsmedium indeholdende en assimilerbar kilde til kulstof, en assimilerbar kilde til nitrogen og uorganiske salte, hvorpå man udvinder antibiotiket og om ønsket omdanner det til et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt deraf eller frigør antibiotiket i basisk form fra et dannet syreadditionssalt deraf.

Det anføres i den nævnte ansøgnings beskrivelse at antibiotikum A/16686 består af en hovedkomponent og to mindre komponenter, men der anføres intet om isolering af de enkelte komponenter og karakterisering af disse.

Det har nu vist sig at hovedkomponenten, der her betegnes faktor A_2 , kan isoleres, og at det desuden er muligt at isolere de to mindre komponenter, her betegnet faktor A_1 og faktor A_3 , og at disse tre komponenter også kan omdannes til syreadditionssalte deraf. Den foreliggende opfindelse angår således fremstilling af disse faktorer og isolering af i det mindste faktor A_2 , men eventuelt tillige af faktorerne A_1 og A_3 .

Ifølge opfindelsen sker fraskillelsen af faktor A_2 særlig effektivt på den i krav 2 angivne måde. Ligeledes ifølge opfindelsen er det særlig fordelagtigt at udføre adskillelsen på den i krav 3 angivne måde.

Med fysiologisk acceptable syreadditionssalte menes salte der også er farmaceutisk acceptable, dvs. salte hvor toxiciteten af forbindelserne som helhed ikke forøges i forhold til ikke-saltformen. Repræsentative og hensigtsmæssige syreadditionssalte indbefatter additionssalte med organiske

og uorganiske syrer såsom saltsyre, brombrintesyre, svovlsyre, fosforsyre, salpetersyre, vinsyre, eddikesyre, ravsyre, mælkesyre, glutaminsyre og metansulfonsyre.

5 De frie baser af A/16686, faktorerne A_1 , A_2 og A_3 kan fremstilles ud fra de tilsvarende syreadditionssalte, eller omvendt kan syreadditionssalte af A/16686 faktorerne A_1 , A_2 og A_3 fremstilles ud fra de tilsvarende frie baser ved fremgangsmåder der alment anvendes på dette område. De frie baser af antibiotikum A/16686 faktor A_1 , A_2 og A_3 vindes ud
10 fra de tilsvarende syreadditionssalte fx ved behandling af en opløsning af syreadditionssaltet med bariumhydroxyd, mens omsætning af de frie baser med den valgte organiske eller uorganiske syre i opløsning i et inert opløsningsmiddel giver det tilsvarende syreadditionssalt.

15 For simpeltheds skyld vil ved diskussion af stof-fernes nytte betegnelsen forbindelse A/16686 i nærværende beskrivelse blive brugt til at referere til en forbindelse udvalgt af den gruppe stoffer der består af A/16686 faktorerne A_1 , A_2 og A_3 og de tilsvarende ugiftige fysiologisk acceptable syreadditionssalte.

20 Forbindelserne A/16686 inhiberer in vitro væksten af visse patogene bakterier, navnlig grampositive; desuden giver parenteral indgift af A/16686-forbindelser i høj grad beskyttelse mod experimentelle infektioner hos mus. Endvidere er A/16686-forbindelser nyttige til prævention og behandling af dentalcaries.

Stammen *Actinoplanes* sp. ATCC 33076 beskrives i de efterfølgende afsnit af nærværende beskrivelse.

Morfologi

30 Stammen vokser godt på forskellige medier med orange farve af substratmyceliet. Den frembringer ikke noget pigment. Luftmycelium er stedse fraværende.

Ved mikroskopisk undersøgelse viser det vegetative mycelium grenede hyfer med en diameter på ca. 1μ . Sporangierne dannes sparsomt, kun på kartoffelagar og er kugleformede
35 med meget uregelmæssige overflader og en diameter fra 5,0-9,0 μ . Sporangieafgivelse iagttages efter brydning af sporangiets væg. De subsfæriske sporer er bevægelige med en diameter på 1,0-1,5 μ . Analyse af cellevægskomponenterne viser

meso-diaminopimelinsyre og sukkermønster af type D (Lechevalier et al., Chemical composition as a criterium in the classification of Actinomycetes. Adv. Applied Microbiology, 14, 1971. Academic Press, New York).

5 Kulturkarakterer

Tabel 1 viser kulturkaraktererne af Actinoplanes ATCC 33076, dyrket på forskellige standardmedier foreslået af Shirling og Gottlieb (Intern. J. system. Bact. 16, 313-340, 1966) og andre medier anbefalet af Waksman (The Actinomycetes, Vol. II; The Williams and Wilkins Co. 1961). Kulturkaraktererne bestemtes efter 6-14 dages inkubering ved 30°C.

Tabel 1

Kulturkarakterer

15 Nummeret på nogle af dyrkningsmedierne refererer til de numre der er givet af Shirling og Gottlieb i Methods for characterization of Streptomyces species; Intern. J. System. Bact. 16, 313-340, 1966.

	Kulturmedium	Kulturkarakterer
20	Medium nr. 2 (gærekstrakt-maltagar)	Rigelig vækst, rynket overfalde, lysebrun 12 H 12
	Medium nr. 3 (havremelsagar)	Sparsom vækst, tynd, lysorange, 9 B 6
25	Medium nr. 4 (uorganiske salte-stivelsesagar)	Moderat vækst, skorpet overfalde, orange 11 L 12
	Medium nr. 5 (glycerol-asparaginagar)	Sparsom vækst, hyalin
	Medium nr. 6 (pepton-gærekstrakt-jernagar)	Sparsom vækst, hyalin til lysebrun
30	Medium nr. 7 (tyrosinagar)	Sparsom vækst, glat overfalde, brun 6 D 11
	Havremelsagar (ifølge Waksman)	Rigelig vækst, rynket overflade, orange til brun 12 C 10

Tabel 1 (fortsat)

	Kulturmedium	Kulturkarakterer
	Hickey og Tresner's agar	Rigelig vækst, skorpet overflade, orange 11 G 8
5	Czapecs glukoseagar	Moderat vækst, skorpet overflade, orange 11 G 8
	Glukose-asparaginagar	Sparsom vækst, skorpet overflade, lyseorange 11 F 6
10	Næringsagar	Moderat vækst, glat overflade, orange 11 G 8
	Kartoffelagar	Rigelig vækst, rynket overflade, ravfarvet-brun 12 E 10
	Bennett's agar	Rigelig vækst, rynket overflade, orange 11 G 8
15	Kalciummalatagar	Moderat vækst, glat overflade, lysorange 10 C 6
	Skummetmælksagar	Rigelig vækst, rynket overflade, orange 9 L 2
20	Czapecs agar	Moderat vækst, skorpet overflade, orange 10 D 7
	Ægagar	Moderat vækst, glat overflade, hyalin til lysorange
	Pepton-glukoseagar	Rigelig vækst, rynket overflade, orange 11 G 11
25	Agar	Meget sparsom vækst, glat overflade, hyalin
	Loefflers serum	Meget sparsom vækst, glat overflade, orange
30	Kartoffel	Sparsom vækst, skorpet, lysebrun
	Gelatine	Sparsom vækst, lysorange
	Cellulose	Meget sparsom vækst, tynd, hyalin

Tal og bogstavkoderne refererer til farven bestemt ifølge
 Maerz og Paul, A dictionary of color, McGraw Hill Inc.,
 New York, 1950.

Kulstofudnyttelse

Tabel 2 viser udnyttelse af kulstofkilder undersøgt i henhold til den måde der er angivet af Pridham og Gottlieb (J. Bact. 56, 197, 1948).

5

Tabel 2

Kulstofkilder	Udnyttelse
Inositol	-
Fruktose	+
Rhammose	+
10 Mannitol	-
Xylose	+
Raffinose	-
Arabinose	+
Cellulose	-
15 Sakkarose	+
Glukose	+
Mannose	+
Laktose	-
Salicin	+

- 20 + = positiv udnyttelse
 - = ingen vækst

Fysiologiske karakterer

Tabel 3 viser stammens fysiologiske karakterer.

Tabel 3

Prøve	Resultater
Stivelseshydrolyse	positiv
Dannelse af H ₂ S	positiv
Tyrosin-reaktion	negativ
Caseinhydrolyse	positiv
30 Opløseliggørelse af kalcium-malat	negativ
Gelatinesmeltning	positiv
Lakmusmælk, koagulering	positiv
Lakmusmælk, peptonisering	negativ
35 Cellulosenedbrydning	negativ

Som i tilfælde af andre organismer undergår karaktererne af den A/16686 faktor A₂-producerende stamme Actinoplanes sp. ATCC 33076 variationer. Fx kan der vindes kunstige varieteter og mutanter af stammen ATCC 33076 ved behandling med forskellige kendte mutagener såsom ultraviolette stråler, røntgenstråler, højfrekvensbølger, radioaktive stråler og kemikalier. Alle naturlige og kunstige varianter og mutanter af ATCC 33076 som har væsentlig sammen egenskaber som denne og derfor hører til denne Actinoplanes-stamme og danner antibiotikum A/16686 faktor A₂ kan bruges i henhold til den foreliggende opfindelse.

Til fremstilling af A/16686-antibiotika dyrkes stammen Actinoplanes sp. ATCC 33076 under aerobe betingelser i et vandigt næringsmedium der indeholder en assimilerbar kilde til kulstof, en assimilerbar kilde til nitrogen og uorganiske salte. Dette dyrkningsmedium kan være et hvilket som helst af et antal forskellige næringsmedier der sædvanligt anvendes i gæringsteknikken, men visse medier foretrækkes. Således er foretrukne kulstofkilder glukose, fruktose, manose, sakkarose og lignende stoffer i forskellige renhedsgrader. Foretrukne nitrogenkilder er sojamel, pepton, kødeks-trakt, gærekstrakt, trypton, aminosyrer og lignende stoffer. Blandt de uorganiske salte der kan inkorporeres i dyrkningsmedierne er de sædvanlige opløselige salte med evne til at frembringe ioner af sådanne grundstoffer og andre komponenter som natrium, kalium, jern, zink, kobolt, magnesium, kalcium, ammonium, klorid, karbonat, sulfat og nitrat. Almindeligvis fordyrkes den antibiotikum-producerende stamme i en rystekolbe, hvorpå kulturen bruges til podning af krukkefermentorer til frembringelse af væsentlige mængder A/16686-antibiotika. Det medium der bruges til forkulturen kan være det samme som det der bruges til gæringer i større målestok, men også andre medier kan bruges.

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

Under gæringen kan antibiotikumproduktionen følges ved analyse af udtagne prøver af gæringsmediet eller af ekstrakter af mycelie-faststoffet med hensyn til antibiotisk aktivitet.

5 Organismer der vides at være følsomme for A/16686-antibiotika er nyttige til dette formål. En særlig hensigtsmæssig prøveorganisme til formålet er *Sarcina lutea* ATCC 9341. Bioanalysen udføres hensigtsmæssigt ved agardiffusionsmetoden på agarplader. Maximal produktion af antibiotisk aktivitet
10 forekommer i almindelighed mellem 3. og 5. dag. De antibiotika der dannes under gæringen af stammen *Actinoplanes* sp. ATCC 33076 findes i hovedsagen i myceliemassen. En foretrukken fremgangsmåde til udvinding af A/16686-antibiotika består derfor i ekstraktion af det fraskilte mycelium. Ekstraktion
15 af myceliemassen udføres bedst med metanol, men andre lavere alkanoler og acetone er også egnede. A/16686-antibiotikerne udvindes fra ekstraktions-opløsningsmidlet ved rutineprocedurer til frembringelse af en blanding af A/16686-antibiotika, A/16686-komplekset. A/16686-komplekset renses videre og derefter
20 adskilles de enkelte faktorer fra hinanden. Adskillelse af A/16686-komplekset i de enkelte komponenter kan opnås ved forskellige vel anerkendte metoder som i det væsentlige indebærer kromatografiske metoder. Til optimal adskillelse af faktorerne foretrækkes reversfase HPLC. Ved en sådan HPLC-
25 adskillelse er en foretrukken kolonne " μ -Bondapack C_{18} ", og foretrukne bevægelige faser er blandinger af vandigt $HCOONH_4$ og CH_3CN i forskellige mængdeforhold. Til fraskillelse i stor målestok af antibiotikum A/16686 faktor A_2 anvendes der fortrinsvis søjlekromatografi. Ved en sådan
30 kolonneadskillelse er den foretrukne adsorbent "Amberlite"® XAD, og foretrukne opløsningsmiddelsystemer er blandinger af vand og acetonitril og blandinger af ammoniumformiat og acetonitril. Fraskillelse af de mindre faktorer A_1 og A_3 ved søjlekromatografi kan udføres, men fordrer påfølgende søjleadskillelse af berigede fraktioner. Også her er "Amberlite"® XAD
35 den foretrukne adsorbent og blandinger af vand og acetonitril samt blandinger af ammoniumformiat og acetonitril de foretrukne opløsningsmiddelsystemer.

A/16686 faktor A₂

A/16686 faktor A₂ er et hvidt amorph pulver som smelter under sønderdeling ved omkring 210-220°C.

5 A/16686 faktor A₂ er opløselig i vand, dimetylformamid, vandig metanol og 0,1N HCl; den er dårligt opløselig i absolut ætanol og i n-butanol; den udfældes fra vandig opløsning ved tilsætning af en opløsning mættet med NaHCO₃.

10 Elementæranalyse af A/16686 faktor A₂, i forvejen tørret ved ca. 140°C under en inert atmosfære, tyder på følgende tilnærmelsesvis procentvise sammensætning (gennemsnitligt): kulstof 54,57%, hydrogen 6,19%, nitrogen 10,88%. Kloranalyse giver følgende procent: klor 1,37%.

15 Det infrarøde absorptionsspektrum for A/16686 faktor A₂ i nujol er vist i tegningens fig. 1. Følgende absorptionsmaxima iagttages: 3290, 2930 og 2860 (nujol), 1765, 1635, 1510, 1455 og 1375 (nujol), 1240, 1175, 1130, 1060, 1015, 975, 840 og 815 cm⁻¹.

20 Det ultraviolette absorptionsspektrum for A/16686 faktor A₂, der er vist i tegningens fig. 2, udviser følgende absorptionsmaxima:

- 20 a) i neutral metanol: 234 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 206$) og 268 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 114$);
b) i metanol indeholdende 0,1N HCl: 233 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 192$) og 271 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 93$);
25 c) i metanol indeholdende 0,1N NaOH: 251 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 275$) og ~ 300 nm (skulder).

30 A/16686 faktor A₂ giver følgende signaler i 270 MHz, ¹H NMR spektrum, fig. 3, registreret i DMF-d₇/D₂O 1:1 (rumfangsdele) opløsning (TMS som intern standard δ 0,00 ppm) på et "Pulse Fourier Transform Bruker WH 270" kryospektrometer:

- i) en gruppe signaler ved 0,5-3 ppm svarende til ca. 51 alifatiske protoner, navnlig dubletter centreret ca. ved 1,53 ppm (J = 7Hz), 1,20 ppm (J = 6Hz) og 1,07 ppm (J = 5Hz);
35 ii) en gruppe signaler ved 3-6,5 ppm svarende til ca. 43 protoner af olefinisk type eller protoner af kulstof bundet til heteroatomer, navnlig en singlet ca. ved 5,62 ppm;

iii) en gruppe signaler ved 6,5-8 ppm svarende til ca. 39 protoner af aromatisk type, navnlig dubletter centreret ca. ved 7,60 ppm ($J = 8$ Hz), ved 7,49 ppm ($J = 8$ Hz) og ved 6,46 ppm ($J = 8$ Hz).

5 Singletterne ved 8, 2,85 og 3,01 ppm og singletten ved 4,73 ppm svarer henholdsvis til DMF og HDO til stede i opløsningsmiddelblandingen.

A/16686 faktor A_2 har en specifik rotation $[\alpha]_D^{20}$ på $+73 \pm 4^\circ$ ($c = 0,49$ i H_2O).

10 R_f -værdierne for A/16686 faktor A_2 i forskellige papirkromatografiske systemer med *Bacillus subtilis* ATCC 6633 som opdagelsesorganisme fremgår af følgende tabel.

Tabel 4

15 Kromatografisk opførsel af A/16686 faktor A_2 "Whatman" nr. 1 papir (nedløbende kromatografering; $R_m = 40$ cm; mængder: 50 μ g af opløsningen opløst i H_2O/CH_3CN 1:1; 2 mg/ml).

	Elueringsystem	R_f -værdi
20	1) n-butanol mættet med Sörensens puffer pH 6,0	0,00
	2) n-butanol mættet med vand indeholden 2% p-toluensulfonsyre	0,00
	3) n-butanol mættet med vand indeholdende 2% ammoniumhydroxyd	0,00
25	4) Sörensens puffer, pH 6,0, mættet med n-butanol	0,05
	5) n-butanol/metanol/vand 4:1:2	0,48
	6) ætylacetat mættet med vand	0,00
	7) n-butanol/eddikesyre/vand 2:1:1	0,44

30 R_f -værdien for A/16686 faktor A_2 i forskellige tyndlagskromatografiske systemer er anført i følgende tabel, idet betingelserne er anført under tabellen.

Tabel 5

35

Elueringssystem (volumenforhold)	R_f -værdi
1) Vandigt 2,5% $HCOONH_4/CH_3CN$ 65:35*	0,36
2) n-butanol/eddikesyre/vand 4:2:5	0,80
3) n-butanol/eddikesyre/vand 4:2:5	0,52
4) n-propanol/n-butanol/1N NH_4OH 2:3:4 (øvre fase)	0,12
5) n-butanol/eddikesyre/vand 4:1:5	0,15

Rm: ca. 140 mm

Mængder: 2-5 µl opløsning (1 mg/ml) i CH₃CN/H₂O 1:1 (rumfang)

Synliggørelse: a) joddampe b) ultraviolet lys ved 254 nm.

- 5 1,2-Silaniseret silikagal 60 F₂₅₄-plader ("Merck");
synliggørelse a,b; 3,4,5-silikagal 60 F₂₅₄-plader ("Merck");
synliggørelse a (* interne standarder: koffein R_f 0,60; corti-
son R_f 0,35; dexametason R_f 0,30).

- 10 A/16686 faktor A₂ udvider følgende karakteristiske
reaktioner:

ninhydrin (3% ætanolisk opløsning)	positiv
Molish	positiv
Biuret	positiv
Millon	negativ
15 1% FeCl ₃ -1% K ₃ Fe(CN) ₆ , vandigt	grøn farve
KMnO ₄ (surt)	positiv
koncentreret H ₂ SO ₄	negativ

- 20 Aminosyreanalyse af A/16686 faktor A₂ efter sur hydro-
lyse med 6N saltsyre ved 110°C i 6 timer viste tilstedeværel-
se af mindst følgende aminosyrer: alanin, leucin, glycin,
asparaginsyre, fenylalanin, ornitin, p-hydroxyfenylglycin
og hydroxy-, klor-substitueret fenylglycin. Analyse af et
syrehydrolysat af A/16686 faktor A₂ efter 2 timer i 2N
H₂SO₄ ved 100°C viser tilstedeværelse af det neutrale kul-
25 hydrat D-mannose.

- 30 HPLC-analyse af antibiotikum A/16686 faktor A₂ under
anvendelse af en "µ-Bondapack C₁₈"-kolonne (3,9 mm indvendig
diameter x 300 mm høj) og en blanding HCOONH₄ 0,025 M/CH₃CN
60:40 (rumfang) som den mobile fase med en strømningshastig-
hed på 2 ml/min. viste at forbindelsen har en retentionstid
(t_R) på 4' 99/100" (interne standarder: antracen t_R 35'
18/100"; α-nitronaftalen t_R 11' 14/100"; toluen t_R 8' 64/100").

A/16686 faktor A₁

- 35 A/16686 faktor A₁ er et hvidt amorft pulver som smel-
ter under sønderdeling ved ca. 210-220°C. Det er meget op-

løseligt i vand, dimetylformamid og vandig metanol; det er opløseligt i metanol og ætanol; men er uopløseligt i ætyl-æter, petroleumsæter og benzen. Elementæranalyse af A/16686 faktor A_1 , i forvejen tørret ved ca. 140°C under en inert atmosfære, viser følgende tilnærmede procentvise sammensætning (gennemsnit): kulstof 50,31%, hydrogen 6,0%, nitrogen 9,92%, rest 6,07%.

Kloranalyse af A/16686 faktor A_1 giver følgende resultat: klor (totalindhold) 1,61%; kloridioner 0,90%.

10 Det infrarøde absorptionsspektrum af A/16686 faktor A_1 i nujol fremgår af tegningens fig. 4.

Følgende absorptionsmaxima iagttages: 3290, 2930 og 2860 (nujol), 1765, 1630, 1510, 1455 og 1375 (nujol), 1260, 1235, 1175, 1150, 1130, 1060, 1015, 975, 840 og 810 cm^{-1} .

15 Det ultraviolette absorptionsspektrum for A/16686 faktor A_1 , der fremgår af tegningens fig. 5, udviser følgende absorptionsmaxima:

- a) i neutral metanol: 233 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 202$) og 266 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 106$);
- 20 b) i metanol indeholdende 0,1N HCl: 232 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 219$) og 270 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 110$);
- c) i metanol indeholdende 0,1N NaOH: 251 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 264$) og ~ 290 nm (skulder).

25 A/16686 faktor A_1 har specifik rotation $[\alpha]_D^{20}$ på $+57 \pm 4^{\circ}$ ($c = 0,51$ i H_2O).

R_f -værdierne for A/16686 faktor A_1 i forskellige pirkromatografiske systemer med *Bacillus subtilis* ATCC 6633 som opdagelsesorganisme fremgår af følgende tabel.

Tabel 6

30 Kromatografisk opførsel af A/16686 faktor A_1 ("Whatman" nr. 1 papir; nedløbende kromatografering; $R_m = 40$ cm; mængde $50\text{ }\mu\text{g}$ af forbindelsen opløst i $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 1:1 (rumfang; 2 mg/ml)).

	Elueringssystem	R _f -værdi
	1) n-butanol mættet med Sörensens puffer pH 6,0	0,00
5	2) n-butanol mættet med vand indeholdende 2% p-toluensulfonsyre	0,00
	3) n-butanol mættet med vand indeholdende 2% ammoniumhydroxyd	0,00
	4) Sörensens puffer pH 6,0, mættet med n- butanol	0,05
10	5) n-butanol/metanol/vand 4:1:2	0,48
	6) ætylacetat mættet med vand	0,00
	7) n-butanol/eddikesyre/vand 2:1:1	0,44

15 R_f-værdierne for A/16686 faktor A₁ i forskellige tynd-
lagskromatografiske systemer er anført i følgende tabel (be-
tingelserne er angivet under tabellen).

Tabel 7

	Elueringssystem (rumfang)	R _f -værdi
	1) vandigt 2,5% HCOONH ₄ /CH ₃ CN 65:36*	0,40
	2) n-butanol/eddikesyre/vand 4:2:5	0,80
20	3) n-butanol/eddikesyre/vand 4:2:5	0,52
	4) n-propanol/n-butanol/1N NH ₄ OH 2:3:4 (øvre fase)	0,12
	5) n-butanol/eddikesyre/vand 4:1:5	0,15

R_m: ca. 140 mm.

25 Mængder: 2-5 µl af en opløsning (1 mg/ml) i CH₃CN/H₂O 1:1
(rumfang).

Synliggørelse: a) joddampe b) ultraviolet lys ved 254 nm.

30 1,2-Silaniseret silikagel 60 F₂₅₄-plader ("Merck"):
synliggørelse a,b; 3,4,5-silikagel 60 F₂₅₄ "Merck": synlig-
gørelse a (* interne standarder: koffein R_f 0,60; cortison
R_f 0,35; dexametason R_f 0,30).

Aminosyreanalyse af A/16686 faktor A₁ efter sur hydro-
lyse i 6N saltsyre ved 110°C i 6 timer viser tilstedeværel-

se af mindst følgende aminosyrer: alanin, leucin, glycin, asparaginsyre, fenylalanin, ornitin, p-hydroxyfenylglycin og hydroxy, klor-substitueret fenylglycin.

5 Analyse af et syrehydrolysat af A/16686 faktor A_1 efter 2 timer i 2N H_2SO_4 ved $100^\circ C$ viste tilstedeværelse af det neutrale kulhydrat D-mannose.

HPLC-analyse af antibiotikum A/16686 faktor A_1 under anvendelse af en " μ -Bondapack C_{18} "-kolonne (3,9 mm indvendig diameter x 300 mm) og en blanding $HCOONH_4$ 0,25 M/ CH_3CN 60/40 (rumfang) som den mobile fase ved en strømningshastighed på 2 ml/min. gav en t_R på 3' 80/100" (interne standarder: antracen t_R 35' 18/100"; α -nitronaftalen t_R 11' 14/100"; toluen 8' 64/100").

A/16686 faktor A_3

15 A/16686 faktor A_3 er et hvidt amorft pulver som smelter under sønderdeling ved ca. $220^\circ C$. Det er meget opløseligt i vand, dimetylformamid og vandig metanol; det er opløseligt i metanol og ætanol men er uopløseligt i ætylæter, petroleumsæter og benzen.

20 Elementæranalyse af A/16686 faktor A_3 , i forvejen tørret ved ca. $140^\circ C$ under en inert atmosfære, viser følgende tilnærmede procentvise sammensætning (gennemsnit): kulstof 48,41%, hydrogen 5,84%, nitrogen 9,09%; rest 9,1%. Kloranalyse giver følgende resultater: totalt klorindhold 1,68%, klorioner 1,16%. Det infrarøde absorptionsspektrum af A/16686 faktor A_3 i nujol fremgår af tegningens fig. 6. Følgende absorptionsmaxima er konstateret: 3290, 2930 og 2860 (nujol), 1765, 1635, 1510, 1455 og 1375 (nujol), 1260, 1240, 1175, 1100, 1060, 1020, 975, 840 og 805 cm^{-1} .

30 Det ultraviolette absorptionsspektrum af A/16686 faktor A_3 , der er vist i tegningens fig. 7, udviser følgende absorptionsmaxima:

- a) i neutral metanol: 234 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 147$) og 267 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 74$);
- 35 b) i metanol indeholdende 0,1N HCl: 232 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 132$) og 270 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 76$);
- c) i metanol indeholdende 0,1N NaOH: 250 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} =$

202), λ 295 nm (skulder).

A/16686 faktor A_3 har specifik rotation, $[\alpha]_D^{20}$, på $+50 \pm 4^\circ$ ($c = 0,48$ i N/100 HCl).

R_f -værdierne for A/16686 faktor A_3 i forskellige papirkromatografiske systemer med *Bacillus subtilis* ATCC 6633 som opdagelsesorganisme fremgår af følgende tabel:

Tabel 8

Kromatografisk opførsel af A/16686 faktor A_3 ("Whatman" nr. 1 papir; nedløbende kromatografering; $R_m = 40$ cm; mængder: 50 μ g af forbindelsen opløst i H_2O/CH_3CN 1:1 (rumfang); 2 mg/ml)).

Elueringsystem	R_f -værdi
1) n-butanol mættet med Sörensens puffer pH 6,0	0,00
2) n-butanol mættet med vand indeholdende 2% p-toluensulfonsyre	0,00
3) n-butanol mættet med vand indeholdende 2% ammoniumhydroxyd	0,00
4) Sörensens puffer pH 6,0 mættet med n-butanol	0,05
5) n-butanol/metanol/vand 4:1:2	0,48
6) ætylacetat mættet med vand	0,00
7) n-butanol/eddikesyre/vand 2:1:1	0,44

R_f -værdien af A/16686 faktor A_3 i forskellige tyndlagskromatografiske systemer fremgår af følgende tabel (idet betingelserne er angivet under tabellen).

Tabel 9

Elueringsystem	R_f -værdi
1) vandigt 2,5% $HCOONH_4/CH_3CN$ 65:35*	0,32
2) n-butanol/eddikesyre/vand 4:2:5	0,80
3) n-butanol/eddikesyre/vand 4:2:5	0,52
4) n-propanol/n-butanol/1N NH_4OH 2:3:4 (øvre fase)	0,12
5) n-butanol/eddikesyre/vand 4:1:5	0,15

R_m : ca. 140 mm

Mængder: 2-5 µl af en opløsning (1 mg/ml) i CH₃CN/
H₂O 1:1. Synliggørelse: a) joddampe b) ultraviolet lys ved
254 nm.

- 1,2-Silaniseret silikagel 60 F₂₅₄-plader ("Merck"):
5 synliggørelse a, b; 3,4,5-silikagel 60 F₂₅₄-plader ("Merck"):
synliggørelse a. (* interne standarder: koffein R_f 0,60;
cortison R_f 0,35; dexametason R_f 0,30).

- Aminosyreanalyse af A/16686 faktor A₃ efter sur hydro-
lyse i 6N saltsyre ved 110°C i 6 timer viste tilstedeværelse
10 af mindst følgende aminosyrer: alanin, leucin, glycin, aspa-
raginsyre, fenylalanin, ornitin, p-hydroxyfenylglycin og
hydroxy, klor-substitueret fenylglycin.

- Analyse af et syrehydrolysat af A/16686 faktor A₃
efter 2 timer i 2N H₂SO₄ ved 100°C viser tilstedeværelse
15 af det neutrale kulhydrat D-mannose.

- HPLC-analyse af antibiotikum A/16686 faktor A₃ under
anvendelse af en "µ-Bondapack C₁₈"-kolonne (3,9 mm indvendig
diameter x 300 mm) og en blanding HCOONH₄ 0,025M/CH₃CN
60/40 (rumfang) som den mobile fase med en strømningshastig-
20 hed på 2 ml/min. gav en t_R på 6' 84/100". (Interne standar-
der: antracen t_R 35' 18/100"; α-nitronaftalen t_R 11' 14/100";
toluen t_R 8' 64/100".

- Antibiotikum A/16686 faktor A₂ såvel som faktorerne
A₁ og A₃ er antimikrobielle midler og er særlig aktive mod
25 grampositive mikroorganismer. Aktivitetsspektret in vitro
for A/16686-antibiotika er angivet i uddrag i nedenstående
tabel 10, hvor MIC står for mindste inhiberende koncentra-
tion.

Tabel 10

Organisme	MIC, µg/ml		
	Faktor A ₁	Faktor A ₂	Faktor A ₃
5 S. aureus ATCC 6538	0,1	0,1	1,6
S. aureus Tour (inoculum 10 ³ /ml)	0,2	0,2	1,6
S. aureus Tour (inoculum 10 ⁶ /ml)	0,4	0,8	3,1
S. aureus Tour (+ 30% okseserum)	0,4	0,8	1,6
S. pyogenes C 203 SKF 13400	0,012	0,012	0,012
10 S. pneumoniae Felton UC 41	0,025	0,025	0,025
S. foecium ATCC 10541	0,1	0,05	0,1
E. coli SKF 12140	>100	>100	>100

A/16686-antibiotikerne har også vist at have en høj aktivitetsgrad in vivo mod forskellige patogene organismer. Effektiviteten af A/16686-antibiotika fremgår tydeligt af tabel 11, der viser ED₅₀-værdierne hos mus mod to forskellige mikroorganismer.

Tabel 11

	ED ₅₀ mg/ml dag subkutan	
	S. pyogenes C 203 SKF 13400	S. pneumoniae Felton UC 41
20 A/16686		
Faktor A ₁	0,041 (0,012-0,064)	0,15 (0,17-0,14)
A/16686		
25 Faktor A ₂	0,048 (0,026-0,070)	0,18 (0,20-0,16)
A/16686		
Faktor A ₃	0,14 (0,096-0,21)	0,41 (0,46-0,36)

A/16686-forbindelser inhiberer også væksten af mikroorganismer som bidrager til udvikling af periodontale sygdomme. Denne vigtige egenskab hos A/16686-forbindelser, bestemt ved hjælp af prøver under anvendelse af et kunstigt Streptococcus mutans ATCC 25175-plaksystem. I disse forsøg iniberede A/16686-forbindelserne plakdannelse ved meget lave koncentrationer. A/16686-forbindelserne kan derfor

bruges til behandling af tilstande som skyldes organismer der er følsomme derfor. Fx kan forbindelserne bruges til behandling af Streptococ- eller Staphylococinfektioner eller til prevention og behandling af opløsningen eller desintegrationen af tandemaljer og dentin på tænderne på grund af dentalcaries.

Ved sådanne behandlinger kan A/16686-forbindelserne bruges som frie baser eller som de tilsvarende ugiftige, fysiologisk acceptable syreadditionssalte. Desuden kan de bruges som enkelte faktorer eller i betragtning af ligheden af deres aktivitetsmønstre, også i form af blandinger af to eller alle disse tre faktorer i et hvilket som helst mængdeforhold.

Til nærmere belysning af fremgangsmåden ifølge opfindelsen henvises til de følgende udførelseseksempler.

Eksempel 1

Gæring med stammen Actinoplanes sp. ATCC 33076

En kultur af Actinoplanes sp. ATCC 33076 fordyrkes ved dyrkning af stammen i rystekolber indeholdende hver 100 ml af et vandigt næringsmedium med følgende sammensætning:

	Kødekstrakt	3 g/l
	Gærekstrakt	5 g/l
	Trypton	5 g/l
25	Opløselig stivelse	24 g/l
	Glukose	1 g/l
	CaCO ₃	4 g/l

Kolberne rystes i ca. 96 timer ved 28-30°C og indholdet udhældes derefter i en krukkefermentor indeholdende 4 liter af samme vegetative medium og fordyrkes i 48 timer ved samme temperatur. 3 liter af denne forkultur bruges derefter til podning af en større krukkefermentor indeholdende 30 liter af samme næringsmedium som ovenfor og fordyrkes aerobt i 24 timer ved 28°C. Til slut bruges 20 liter af denne forkultur til podning af en tankfermentor indeholdende 200 liter af et vandigt næringsmedium med følgende sammensætning:

	Kødekstrakt	4 g/l
	Pepton	4 g/l
	Gærekstrakt	1 g/l
	Natriumklorid	2,5 g/l
5	Sojamel	10 g/l
	Glukose	25 g/l
	CaCO ₃	5 g/l

- Gæringsmediet med indhold inkuberes derefter aerobt under omrøring ved 28-30°C. Med mellemrum bestemmes den antibiotiske aktivitet mikrobiologisk ved agardiffusionsmetoden med *Sarcina lutea* ATCC 9341 som testorganisme. Den maksimale aktivitet opnås efter 72-120 timers gæring.

Fraskillelse af antibiotikum A/16686-komplekset

- 15 Hele gæringsmediet (170 liter) fremstillet som beskrevet foran afkøles til 10°C og bringes til pH 3,5 ved hjælp af 18% HCl. Det resulterende sure medium filtreres ved hjælp af filterhjælp ("Clarcel Flow-Ma"), og mycelieka-
- 20 30 liter metanol bruges til at ekstrahere myceliemassen, som efter filtrering ekstraheres på ny med en blanding af metanol og vand (30 liter metanol + 5 liter vand). Det udpinte mycelium kasseres og de to metanolekstrakter koncentrerer under vakuum ved en temperatur under 40°C til frembringelse af et vandigt koncentrat (6 liter). Dette vandige kon-
- 25 centrat ekstraheres med 3 portioner n-butanol på hver 10 liter og derefter kombineres portionerne og koncentrerer til et ringe rumfang under vakuum.
- 30 Dette koncentrat sættes til petroleumsæter og det resulterende bundfald fraskilles ved dekantering og sættes til en yderligere mængde petroleumsæter. Bundfaldet fraskilles ved filtrering og tørres under vakuum ved stuetemperatur til 80 g antibiotikum A/16686-kompleks som råmateriale med en MIC (mindste inhiberende koncentration) mod *S. pneumoniae*
- 35 UC 41 på 0,1 µg/ml.

Rensning af antibiotikum A/16686-komplekset

a) 47,7 g af det rå antibiotikum A/16686-kompleks, behandles med 1,4 liter af en blanding af
5 kloroform/ætanol/vand 4:7:2 (rumfang) og det derved dannede olieagtige produkt fraskilles fra opløsningen ved dekantering. Yderligere 70 ml af ovennævnte blanding sættes derefter til det olieagtige produkt og fraskillelsen gentages. Ved behandling af det olieagtige produkt med 440 ml vand
10 storkner det og det fraskilles ved centrifugering eller filtrering.

Det fraskilte faste stof suspenderes i 170 ml vand, opløses ved tilsætning af 400 ml metanol og filtreres. Den vandige metanoloopløsnings pH bringes til 3,5 ved tilsætning
15 af 1N HCl og derpå afdampes opløsningsmidlerne under vakuum ved tilsætning af n-butanol ved en temperatur der aldrig overstiger 35°C, hvorved der vindes et butanolkoncentrat på ca. 50 ml. Ved tilsætning af 500 ml diætylæter dannes der et bundfald som fraskilles ved filtrering og tørres under vakuum
20 ved stuetemperatur; der vindes 1,012 g temmelig rent antibiotikum A/16686-kompleks med en MIC mod *S. pyogenes* på 0,025 µg/ml.

b) 1,58 g antibiotikum A/16686-kompleks, vundet som beskrevet foran, opløses i 100 ml af en blanding af lige rumfangsdele acetonitril og H₂O, og den resulterende opløsning
25 anbringes på en kolonne indeholdende 430 g silikagel 60 ("Merck", 0,06-0,2 mm) tilberedt i samme blanding. Kolonnen fremkaldes først ved hjælp af samme acetonitril/vand-blanding og opsamling af 70 fraktioner på hver 20 ml, og derefter
30 ved hjælp af en blanding af lige dele acetonitril og N/100 HCl, hvorefter der opsamles yderligere 290 fraktioner på hver 20 ml.

Eluering af kolonnen overvåges ved tyndlagskromatografi på 60 F₂₅₄ silikagelplader og ved bedømmelse af fraktionerne mod *Sarcina lutea*.
35

Fraktionerne nr. 130-265 forenes og opløsningsmidlerne afdampes under vakuum med n-butanol til frembringelse af et koncentrat af n-butanol på 20 ml. Det resterende rumfang udhældes i en stor mængde ætylæter og det dannede bundfald fraskilles ved filtrering og tørres under vakuum ved 5 stuetemperatur over P_2O_5 , hvorved der vindes 1,015 g antibiotikum A/16686-kompleks.

c) 0,67 g af ovennævnte substans opløses i 24 ml vand og 76 ml metanol. Den resulterende opløsning anbringes på 10 en 3,0 x 62,0 cm kolonne indeholdende 220 g "Sephadex"® LH-20, tilberedt i metanol/vand 7:3. Kolonnen fremkaldes med samme blanding under opsamling af fraktioner på 10 ml. Fraktioner indeholdende antibiotikum A/16686-kompleks forenes og opløsningsmidlerne afdampes under vakuum ved en tempera- 15 tur på under $35^{\circ}C$ med n-butanol til et resterende butanol-rumfang på ca. 10 ml. Denne opløsning sættes til ætylæter til udfældning af rent antibiotikum A/16686-kompleks. Bundfaldet fraksilles ved filtrering, vaskes med ætylæter og tørres under vakuum over P_2O_5 ved stuetemperatur; der vindes 20 0,26 rent antibiotikum A/16686-kompleks.

Det på denne måde vundne antibiotikum A/16686-kompleks er et hvidt, krystallinsk, svagt hygroskopisk materiale som smelter ved $224-226^{\circ}C$. Det er meget opløseligt i vand og dimetylformamid, opløseligt i metanol, ætanol, propanol og 25 butanol, men uopløseligt i ætylæter, petroleumsæter og benzen. Elementæranalyse af det på denne vundne A/16686-kompleks, i forvejen tørret ved $140^{\circ}C$ under en inert atmosfære, viser følgende omtrentlige procentvise sammensætning (som gennem- snit af flere analyser): kulstof 51,73%, hydrogen 6,34%, 30 nitrogen 9,96%, rest 1%. Kloranalyse giver følgende resultater, samlet indhold af klor 5,48%, klorioner 4,74%. Det infrarøde spektrum i nujol udviser følgende absorptionsmaxima (i cm^{-1}): 3290, 3070, 3920 og 2860 (nujol), 1765, 1630, 1510, 1455 og 1375 (nujol), 1230, 1175, 1130, 1065, 1030, 1015, 35 980, 840 og 820.

Det ultraviolette absorptionsspektrum for antibiotikum A/16686-kompleks, udviser følgende absorptionsmaxima:

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

Komplekset har specifik rotation, $[\alpha]_D^{24}$, på $+49,7^\circ$
 10 ($c = 0,43\%$ i DMF).

R_f -værdierne for antibiotikum A/16686-kompleks i forskellige papirkromatografiske systemer under anvendelse af S. aureus ATCC 6538 som detektionsorganisme fremgår af følgende tabel.

15

Tabel 12

Kromatografisk opførsel ("Whatman nr. 1" papir; nedløbende kromatografi; $R_m = 40$ cm; mængder: 20 μg af forbindelsen opløst i vandig metanol (2 mg/ml)) af antibiotikum A/16686-kompleks.

20

Elueringsystem	R_f -værdi
1) n-butanol mættet med Sörensens puffer pH 6,0	0,00
2) n-butanol mættet med vand indeholdende 2% p-toluensulfonsyre	0,00
25 3) n-butanol mættet med vand vand indeholdende 2% ammoniumhydroxyd	0,00
4) Sörensens puffer pH 6,0, mættet med n-butanol	0,05
5) n-butanol/metanol/vand 4:1:2	0,43
30 6) ætylacetat mættet med vand	0,00
7) n-butanol/eddikesyre/vand 2:1:1	0,52
8) n-butanol/pyridin/vand 4:3:7	0,87

35

R_f -værdierne for antibiotikum A/16686-kompleks i forskellige tyndlagskromatografiske systemer fremgår af følgende tabel (betingelserne er angivet under tabellen):

Tabel 13

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

R_m: ca. 140 mm

Mængde: 2-5 µl af en opløsning (1 mg/ml) af forbindelsen i acetonitril/vand 1:1 (rumfang).

20 Synliggørelse: a) bioautografi på agarplader podet med *Bacillus subtilis* ATCC 6633; b) karbonisering ved opvarmning med α-naftolsvovlsyre; c) joddamp; d) klortoluidinreagens; e) ultraviolet lys ved 254 nm.

25 1-7: silikagel 60 F₂₅₄ plader ("Merck"); synliggørelse a, b, c, d, e.

8-9: silikagel 60 F₂₅₄ silaniseret ("Merck"); synliggørelse e.

10,11: cellulose F plader ("Merck"); synliggørelse a, e.

30 HPLC-analyse af antibiotikum A/16686-kompleks, isoleret og rensat som beskrevet, viste tilstedeværelse af tre faktorer benævnt A/16686 faktor A₁, A₂ og A₃, af hvilke hovedfaktoren, der andrager ca. 70-87%, er A/16686 faktor A₂. Resultaterne af HPLC-analysen og de betingelser
35 under hvilke den gennemførtes, er nærmere belyst i følgende tabel (idet toluen, α-nitronaftalen og antracen er blevet anvendt som interne standarder):

Tabel 14

Top nr.	t_R
A ₁	3' 84/100"
A ₂	4' 99/100"
5 A ₃	6' 84/100"
toluen	8' 64/100"
α -nitronaftalen	11' 14/100"
antracen	35' 18/100"

- 10 Kolonne: " μ -Bondapack C₁₈" (3,9 mm ID x 300 mm).
 Mobil fase: HCOONH₄ 0,025M/CH₃CN 60:40 (rumfang).
 Strømning: 2 ml/min.
 Tryk: 2000 psi (140,6 kg/cm²).
 Detektor: UV 254 nm.

Eksempel 2

- 15 Adskillelse af faktorerne A₁, A₂ og A₃ af antibiotikum
 A/16686
- 20 169 mg A/16686-kompleks, vundet som beskrevet i eksem-
 pel 1, opløstes i 6,5 ml 0,01N saltsyre og 10,4 ml destille-
 ret vand. Ved reversfase-HPLC (kolonne: " μ -Bondapack C₁₈"
 (7,8 ml indvendig diameter x 300 mm; en silaniseret silika-
 gel funktionaliseret med C₁₈ alkylgrupper), strømning 4 ml/min.,
 tryk 140,6 kg/cm², mobil fase: 0,025M HCOONH₄/CH₃CN 65:35
 (rumfang)) med gentagne indsprøjtninger af 1 eller 2 ml af
 ovennævnte opløsning opsamledes der fraktioner indeholdende
 25 de enkelte faktorer, og de kontrolleredes yderligere ved
 hjælp af analytisk HPLC. Fraktionerne koncentreredes under
 vakuum ved en temperatur på under 35°C ved tilsætning af
 butanol for at nedsætte skumdannelse. De tilbageværende op-
 løsninger frysetørredes og de vundne faste stoffer blev hver
 30 for sig optaget i destilleret vand og frysetørredes; der
 fremkom 10 mg A/16686 faktor A₁, 95 mg faktor A₂ og 12 mg
 faktor A₃. Ved frysetørring af en saltsyreopløsning af
 A/16686 faktor A₂, vundet som netop beskrevet, vindes det
 tilsvarende hydroklorid som et amorf hvidt pulver der sønder-
 35 deles ved 250°C.

Eksempel 3

Adskillelse af antibiotikum A/16686 faktor A₂

- 100 mg antibiotikum A/16686-kompleks, vundet som beskrevet i eksempel 1 b) (titer: ~ 40%) opløstes i 15 ml 0,1N saltsyre. Den resulterende opløsning anbragtes på en kolonne af "Amberlite"® XAD-2 (136 ml; lejets højde 60 cm; en ikke-funktionaliseret polystyrenharpiks), i forvejen vasket med CH₃CN og med destilleret vand. Kolonnen fremkaldtes med en lineær gradient 0-34 rumfangs% CH₃CN/vand, eluering og op-
- 5 samling af 250 fraktioner på hver 10 ml.
- vejen vasket med CH₃CN og med destilleret vand. Kolonnen fremkaldtes med en lineær gradient 0-34 rumfangs% CH₃CN/vand, eluering og opsamling af 250 fraktioner på hver 10 ml.
- Fraktionerne nr. 185-225, der indeholdt A/16686 faktor
- 15 A₂ alene, forenedes og koncentreredes under vakuum ved en temperatur på under 35°C ved tilsætning af butanol for at nedsætte skumdannelse. Den resulterende opløsning frysetørredes og gav 6,7 mg antibiotikum A/16686 faktor A₂.

Eksempel 4

20 Fraskillelse af antibiotikum A/16686 faktor A₂

- 100 mg antibiotikum A/16686-kompleks, vundet som beskrevet i eksempel 1 a) (titer: 53,5%) opløstes i 10 ml CH₃CN/0,025M vandigt HCOONH₄ 27/73 (rumfang). Den resulterende opløsning anbragtes på en kolonne af "Amberlite"® XAD-2
- 25 (200 ml, lejets højde 52 cm; en ikke-funktionaliseret polystyrenharpiks), i forvejen vasket med først 0,025M HCOONH₄ og derpå med CH₃CN/0,025M HCOONH₄ 27/73 (rumfang). Kolonnen fremkaldtes med en lineær gradient 27-40% CH₃CN/0,025M HCOONH₄ under opsamling af fraktioner på 10
- 30 ml op til 400 ml og derefter af fraktioner på 6 ml til et samlet rumfang elueringsmiddel på 2 liter. De eluerede fraktioner kontrolleredes ved analytisk HPLC, forenedes i henhold til faktorindholdet og trittreredes ved HPLC, hvorved følgende resultater opnåedes:

	Fraktion	% A/16686 faktor A ₁	% A/16686 faktor A ₂	% A/16686 faktor A ₃
	31-41	90,1	9,9	0
	42-50	53,9	46,1	0
5	51-59	17,9	82,1	0
	60-65	4,4	93,7	1,9
	66-75	0	94,2	5,8
	76-80	0	83,7	16,3
	81-99	0	46,1	53,8
10	100-110	0	6,7	93,3

Fraktionerne nr. 60-75, der indeholdt 94% rent antibiotikum A/16686 faktor A₂, koncentreredes under vakuum ved en temperatur på under 35°C ved tilsætning af butanol, og den tilbageværende opløsning frysetørredes, blev optaget i destilleret vand og frysetørret på ny, hvorved der fremkom 19,7 mg A/16686 faktor A₂.

Eksempel 5

Fraskillelse af antibiotikum A/16686, faktor A₁ og A₂

En opløsning af 650 mg A/16686-kompleks, vundet som beskrevet i eksempel 1 a) (titer 53,5%), opløses i en blanding af CH₃CN/0,025M HCOONH₄ 26/74 (rumfang) og den dannede opløsning perkoleredes gennem en kolonne af "Amberlite"® XAD-2 (1900 ml, lejets højde 130 cm), i forvejen vasket med samme opløsningsmiddelblanding og med en strømningshastighed på ca. 9 ml/min.

Der opsamledes et rumfang på 100 ml og derpå fremkaldtes kolonnen med samme opløsningsmiddel ved samme strømningshastighed under opsamling af 300 ml store fraktioner op til 18,3 liter og derefter 500 ml store fraktioner op til et samlet rumfang på 21,3 liter. De eluerede fraktioner kontrolleredes ved analytisk HPLC, forenedes i henhold til faktorindholdet og titreredes ved HPLC, hvorved følgende resultater opnåedes:

A/16686-kom- pleks som vundet i eks. 3 a)				% A/16686 faktor A ₁ *	% A/16686 faktor A ₂ *	% A/16686 faktor A ₃ *	A/16686 faktor A ₁ (mg) **	A/16686 faktor A ₂ (mg) **	A/16686 faktor A ₃ (mg) **	Total (mg)
Fraktion				17,4	71,0	11,6	60,5	246,4	40,3	347
19-24	100	0	0	14,4	-	-	-	-	-	14,4
25-26	80	20	0	8,2	2,1	-	-	-	-	10,3
27	73,8	26,2	0	3,6	1,3	-	-	-	-	4,9
28-31	42,2	57,8	0	9,5	13,1	-	-	-	-	22,6
32-35	15	85	0	4,8	27,2	-	-	-	-	32
36-38	3,4	96,6	0	1,2	33,6	-	-	-	-	34,8
39-48	0	100	0	-	107,1	-	-	-	-	107,1
49-58	0	92,7	7,3	-	40,8	3,2	-	-	-	44,0
59-61	0	70,8	29,2	-	4,0	1,7	-	-	-	5,7
62-63	0	43,5	56,5	-	2,6	3,4	-	-	-	6,0
64,67	0	10,6	89,4	-	3,3	28	-	-	-	31,3

* beregnet på basis af vedkommende topes højder

** bestemt ved sammenligning af højden af vedkommende top med højden af en standardprøve af A/16686 faktor A₂.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde til fremstilling af antibiotikum A/16686 faktor A_2 samt eventuelt yderligere faktor A_1 og A_3 , eller fysiologisk acceptable syreadditionssalte heraf, alle med de i beskrivelsen angivne egenskaber, k e n d e t e g n e t ved at man fra det antibiotiske kompleks A/16686, opnået ved dyrkning af mikroorganismestammen Actinoplanes sp. ATCC 33076 eller en mutant deraf med i det væsentlige samme egenskaber som denne under submerse, aerobe gæringsbetingelser i et vandigt næringsmedium indeholdende assimilerbare kilder til kulstof og nitrogen samt uorganiske salte og udvinding fra kulturen, kromatografisk isolerer antibiotikum A/16686 faktor A_2 og om ønsket yderligere antibiotikum A/16686 faktorerne A_1 og A_3 i form af de frie baser eller fysiologiske acceptable syreadditionssalte deraf.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at antibiotikum A/16686 faktor A_2 fraskilles ved søjlekromatografering under anvendelse af en kolonne af "Amberlite" [®] XAD (en ikke-funktionaliseret polystyrenharpiks) og blandinger af vand og acetonitril som eluerings-system.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at adskillelsen sker ved reversfase-HPLC under anvendelse af en " μ -Bondapack C_{18} " (en silaniseret silikagel funktionaliseret med C_{18} alkylgrupper) og blandinger af vandigt ammoniumformiat og acetonitril i forskellige mængdeforhold som den mobile fase.

Fremdragne publikationer:

DK ansøgning nr. 1400/80 (PL § 2.2.3).

Fig. 1

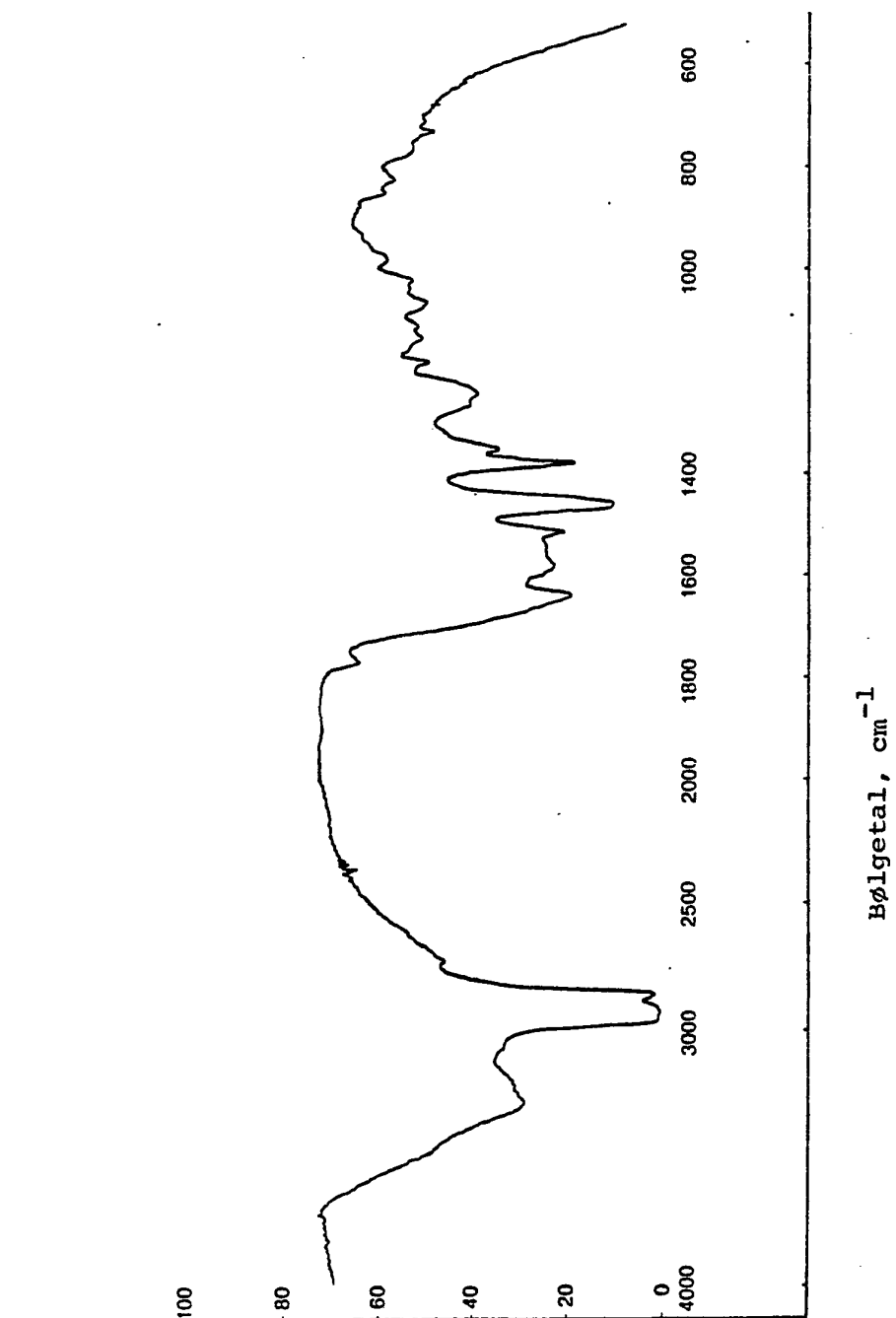


Fig. 2

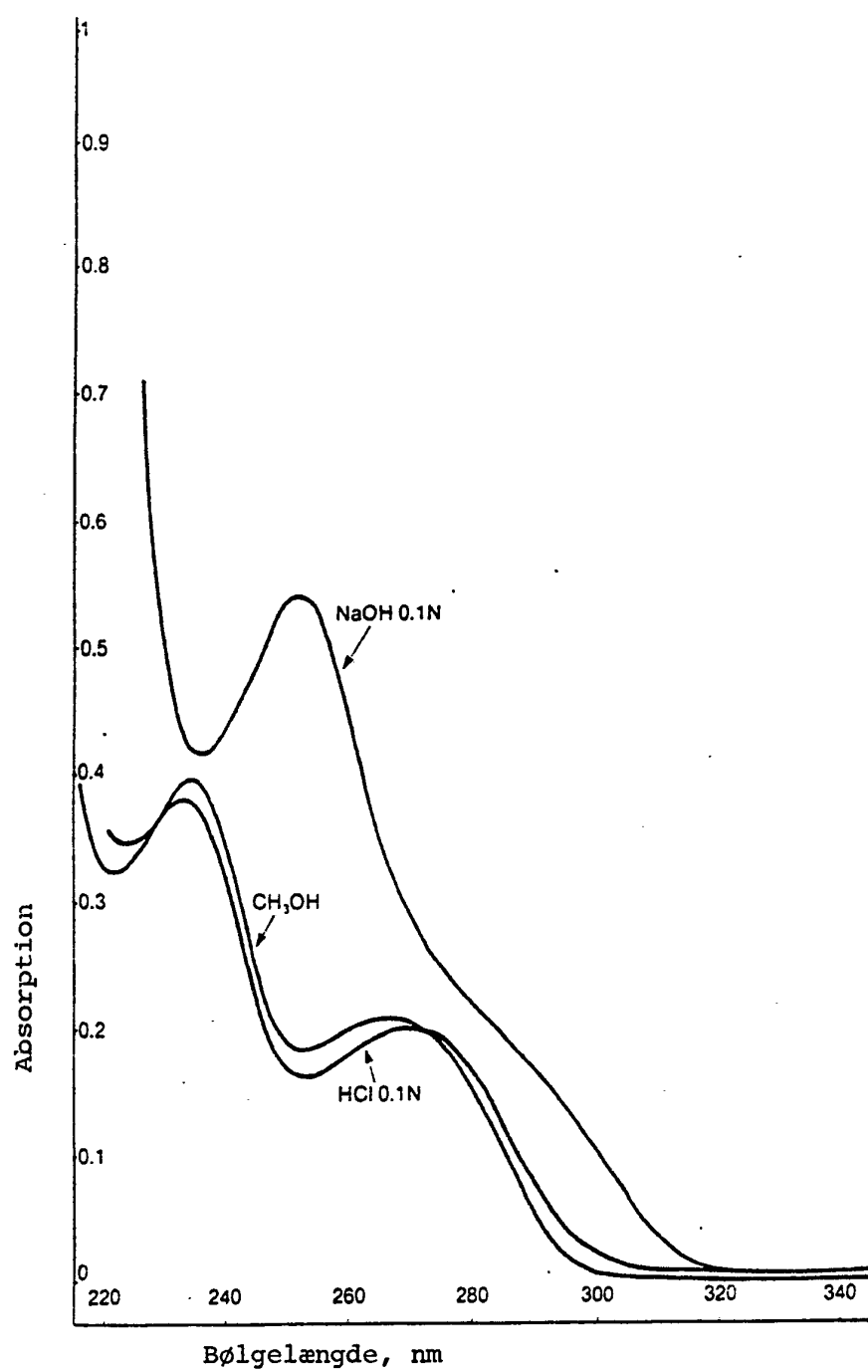


Fig. 3

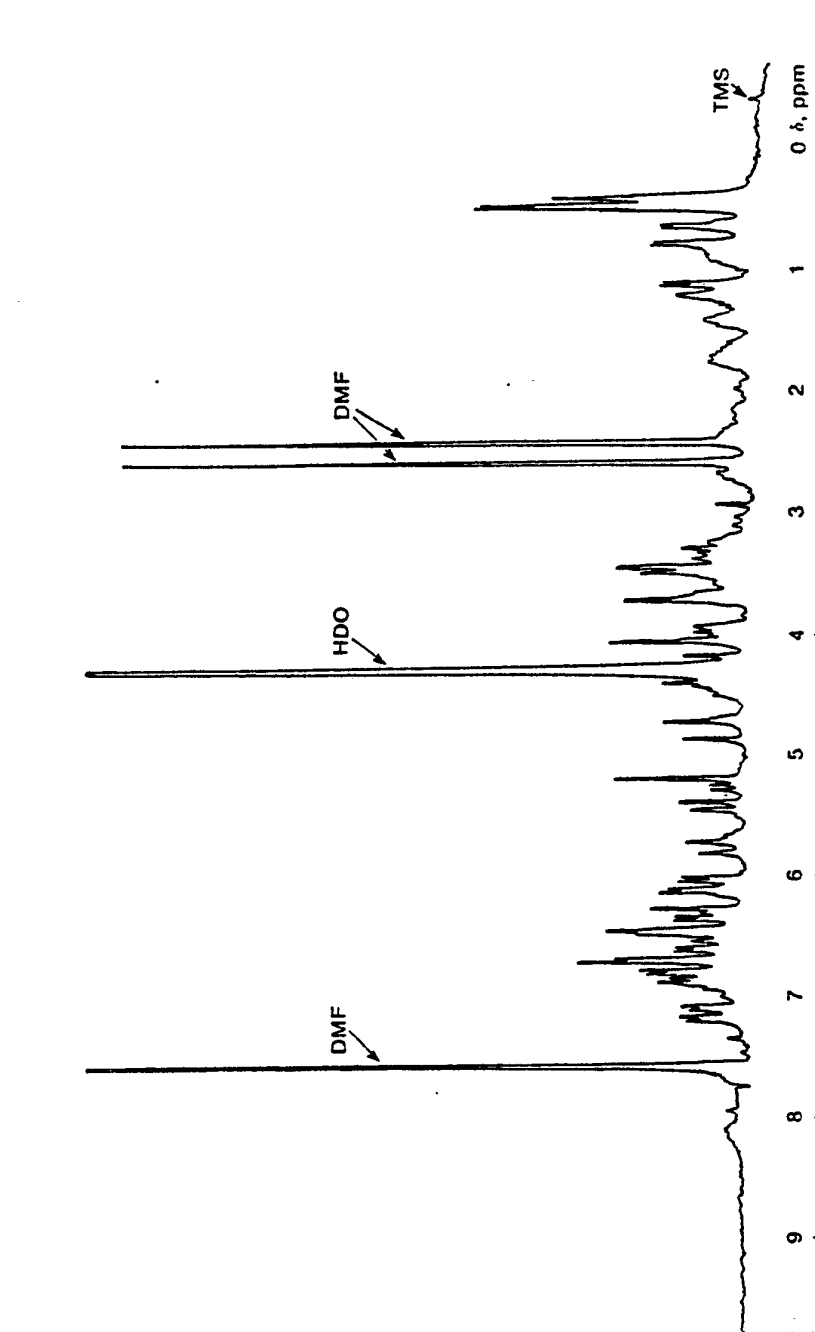
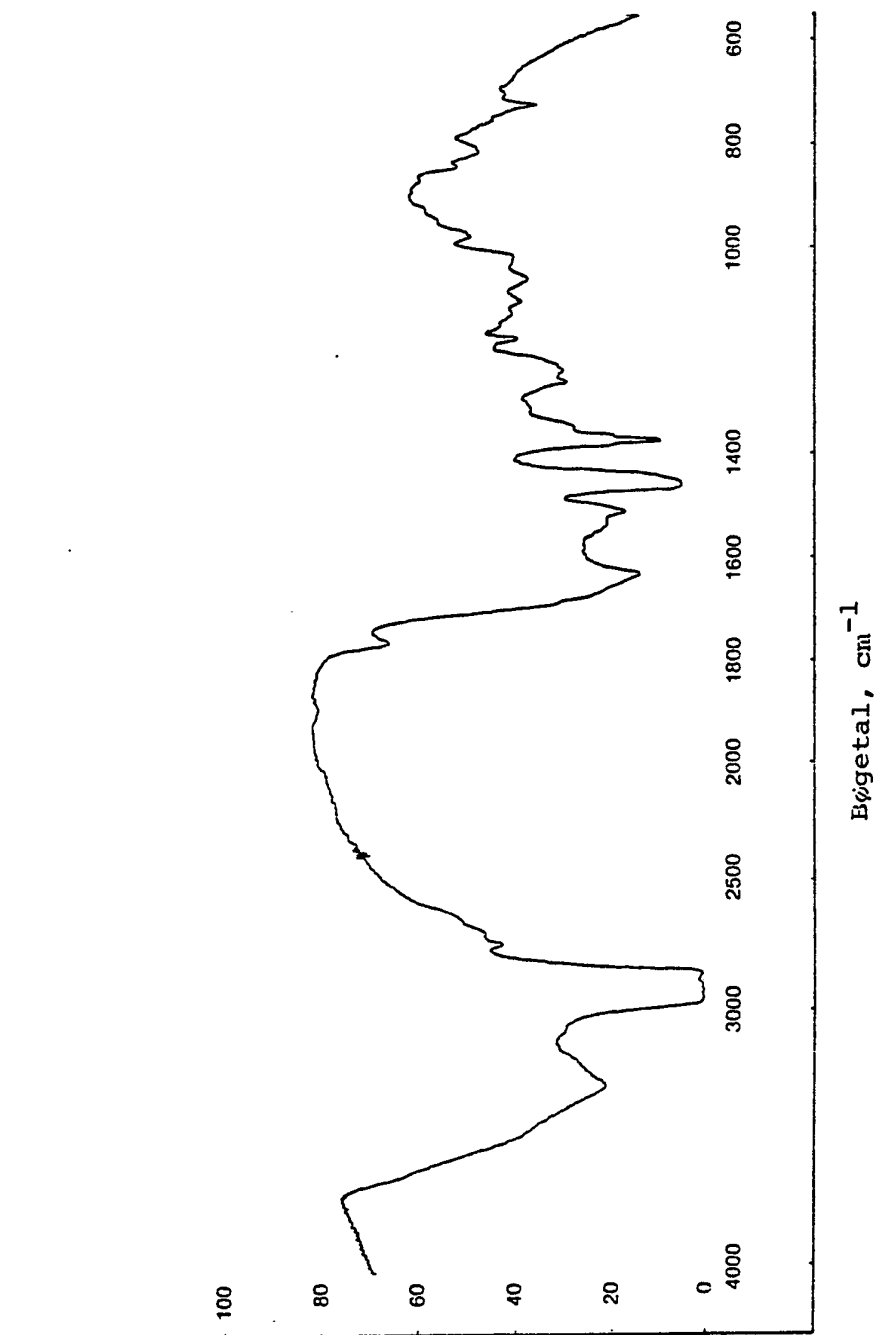


Fig. 4



149337

Fig. 5

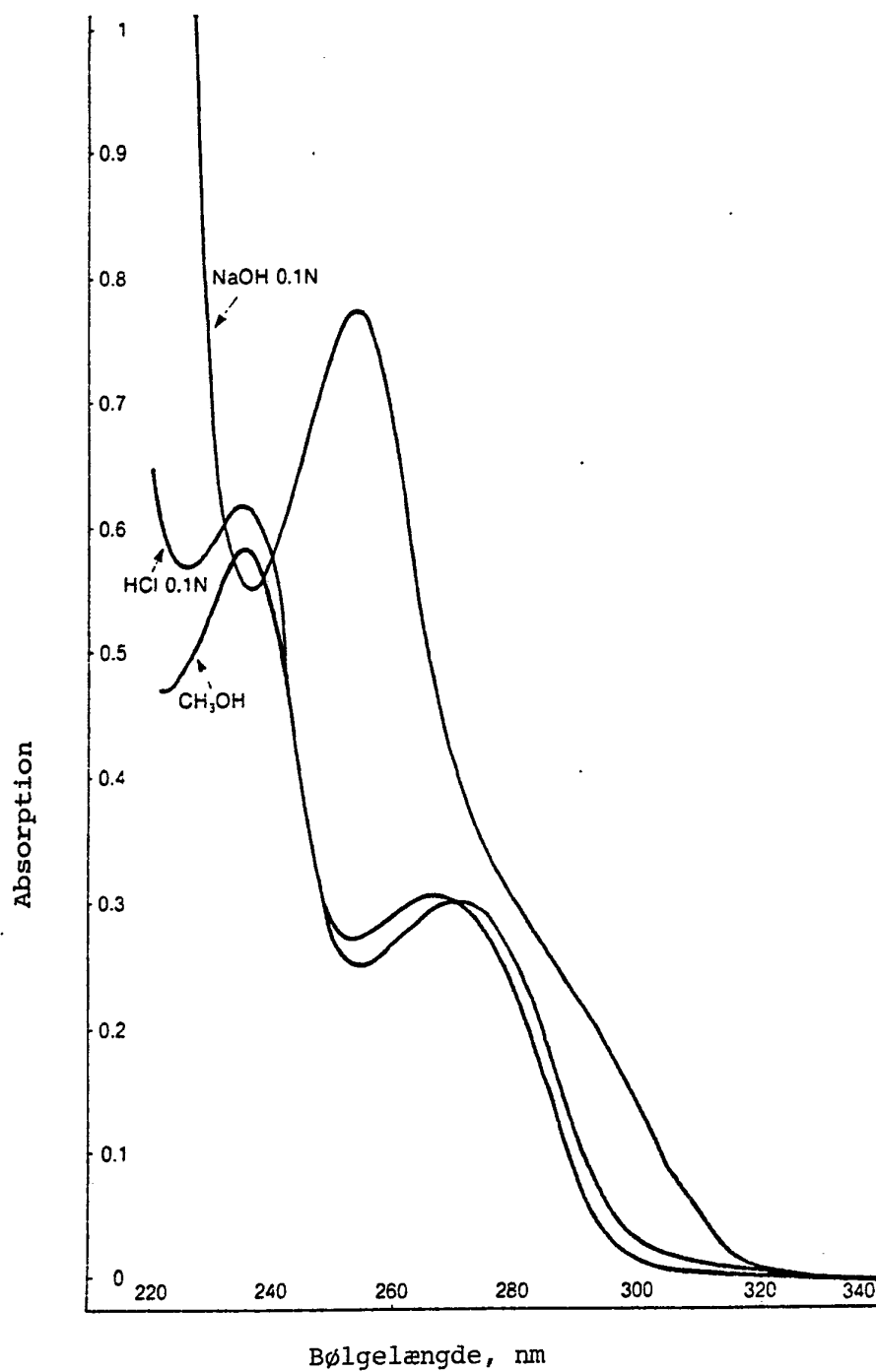


Fig. 6

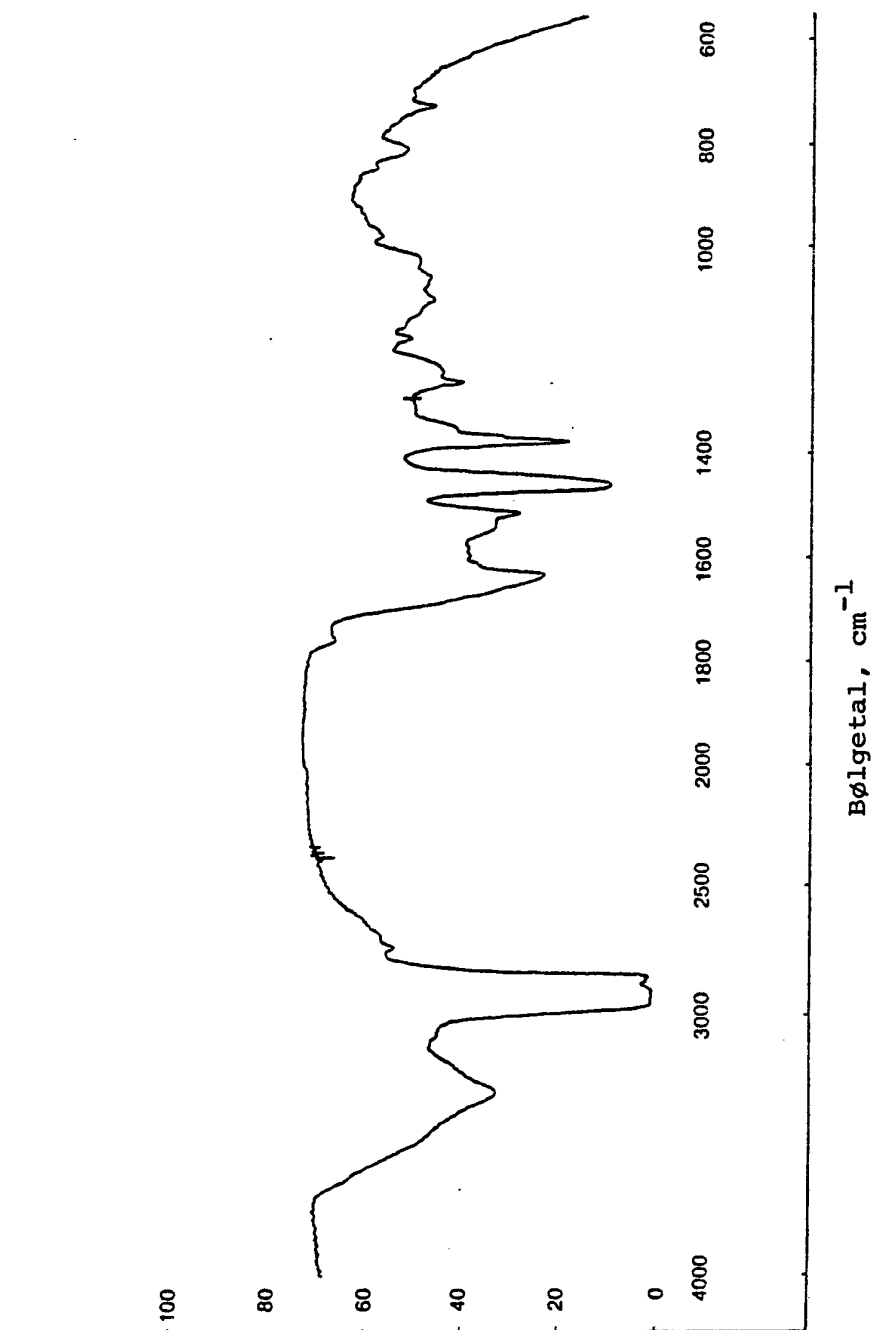


Fig. 7

