

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 820575 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 820575

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12P

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 22.02.1982

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 22.02.1982

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 24.08.1982

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

23.02.1981 US 237,197

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •American Cyanamid Company, 1937 West Main Street Stamford, Conn., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Martin, John Henry Edward James, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Kirby, Jane Parsons, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Borders, Donald Bruce, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 •Fantini, Amedeo Alexander, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

5 •Testa, Raymond Thomas, Cedar Grove, NJ 07009, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Antibiootti LL-B01208 sekä LL-B01208.

Antibiotikum LL- B01208 samt LL- B01208.

Antibiootti LL-B01208 α sekä LL-B01208 β

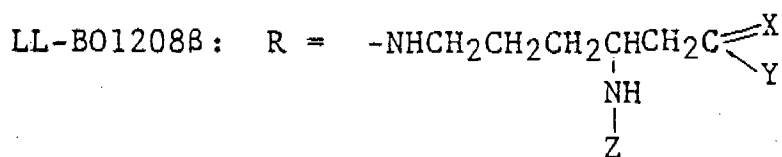
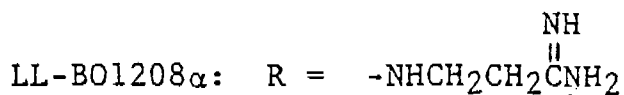
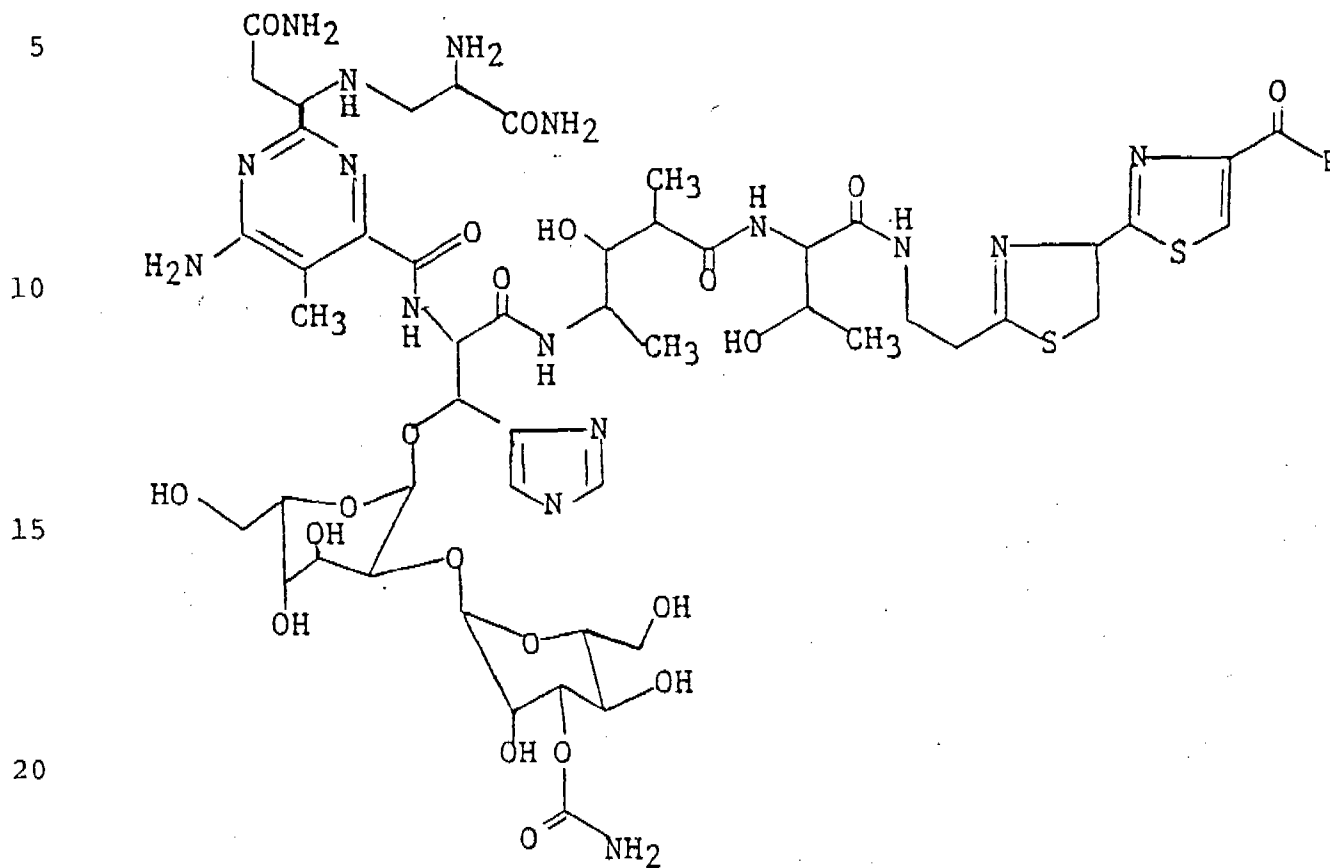
Keksintö koskee kahta uutta bakteerin- ja kasvaimen-
vastaista ainetta, joita on merkitty LL-B01208 α :ksi sekä
5 LL-B01208 β :ksi, sekä niiden tuottamista uuden mikro-orga-
nismin *Streptoverticillium stramineum* tai sen mutanttien
käymisen avulla.

LL-B01208 α ja LL-B01208 β ovat bleomysiini/fleomysii-
niryhmän uusia antibiootteja ja kasvaimenvastaisia aineita.
10 Katso esim. S.M. Hecht (julkaisija), *Bleomycin: Chemical,*
Biochemical and Biological Aspects, Springer-Verlag, New
York, 1979. LL-B01208 α ja LL-B01208 β eroavat muista tämän
ryhmän jäsenistä rakenteensa, kemiallisten ja fysikaalisten
ominaisuuksiensa sekä vaikutustensa suhteen tiettyihin
15 mikro-organismeihin nähden. Läheisin, tunnettu yhdiste on
tallysomyysiini A [M. Koniski et al., *J. Antibiotics* 30:
789 (1977)], joka LL-B01208 :n tavoin sisältää β -lyysiiniä.
Nämä kaksi yhdistettä ovat bleomysiini/fleomysii-
niryhmän ainoat jäsenet, jotka sisältävät tätä tiettyä aminohappoa.
20 Kuitenkin tallysomyysiini A eroaa huomattavasti LL-B01208 β :sta
siinä suhteessa, että tallysomyysiini A sisältää spermidii-
niä sekä lisäosakeriosan ja lisäksi LL-B01208 β käsittää pel-
kistetyn bitiatsolirengasjärjestelmän.

Keksintö koskee uutta mikro-organismia *Strepto-*
25 *verticillium stramineum*ia sekä sen mutantteja, jotka ovat
spontaaneja tai saatu aikaan tavanomaisen mutaatio- tai
yhdistelmätekniikan avulla.

Keksintö koskee kahta uutta bakteerin- tai kasvai-
menvastaista ainetta, joita on merkitty LL-B01208 α :ksi ja
30 LL-B01208 β :ksi, niiden tuottamista käymisen avulla, mene-
telmiä niiden takaisinsaamiseksi sekä väkeväimiseksi raa-
oista liuoksista sekä niiden valmistusmenetelmiä. Nämä
aineet kuuluvat keksinnön piiriin laimeissa muodoissa, raa-
koina väkevöitteinä tai puhtaina, kiteisinä aineina. Alem-
35 pana nimitys LL-B01208 tarkoittaa LL-B01208 α :n ja
LL-B01208 β :n seosta kaikissa suhteissa.

Keksinnön mukaisilla yhdisteillä on seuraava vaadittu rakenne:



30

jossa X, Y ja Z on kukin valittu ryhmästä, johon kuuluvat hiili, typpi, happi sekä vety sekä näiden yhdistelmät ja jolloin X, Y ja Z yhdessä käsittävät kaikkiaan 62 massayksikköä.

Edellä esitetyt, vaaditut rakenteet perustuvat plasmasorptiomassaspektriin ja nopeiden atomien pommitus-

massaspektriin, jotka antavat näennäiset, lasketut molekyyli-ionit, jotka ovat $M^+ = m/e$ 1388 LL-B01208 :lle sekä $M^+ = m/e$ 1472 LL-B01208 :lle; liitteinä olevissa kuvioissa on esitetty kunkin yhdisteen infrapunaspektri (IR), ultraviolettispektri (UV), protonin ydinmagneettinen resonanssispektri (^1H -NMR), C-13 hiilen ydinmagneettinen resonanssispektri (^{13}C -NMR) sekä elektronin törmäysmassaspektri (EIMS):

Kuvio I: LL-B01208 β :n IR-spektri KBr:ssä

Kuvio II: LL-B01208 β :n ^1H -NMR-spektri. 79,5 MHz

10 D_2O :ssa, sisäinen TMS-vertailuarvo ekvivalenttinen

Kuvio III: LL-B01208 β :n ^{13}C -NMR-spektri. 20 MHz

D_2O :ssa, sisäinen TMS-vertailuarvo ekvivalenttinen

Kuvio IV: LL-B01208 β :n UV-spektri. 10 $\mu\text{g/ml}$

H_2O :ssa

15 Kuvio V: LL-B01208 α :n ^{13}C -NMR-spektri. 20 MHz

D_2O :ssa, sisäinen TMS-vertailuarvo ekvivalenttinen

Kuvio VI: LL-B01208 α :n ^1H -NMR-spektri. 79,5 MHz

D_2O :ssa, sisäinen TMS-vertailuarvo ekvivalenttinen

20 Kuvio VII: LL-B01208 β :n silyloidun metyyli-glukosidin EIMS. Glukoosijohdannainen. 4,6 eV, ionilähteen lämpötila 250°C

Kuvio VIII: LL-B01208 β :n silyloidun metyyli-glukosidin EIMS. Mannoosijohdannainen, 46 eV, ionilähteen lämpötila 250°C.

25 Kuvio IX: Treoniinin N-trifluoriasetyyli-n-butyyliesterin EIMS. 46 eV, ionilähteen lämpötila 250°C.

Kuvio X: β -alaniinin N-trifluoriasetyyli-n-butyyliesterin EIMS. 46 eV, ionilähteen lämpötila 250°C.

30 Kuvio XI: 4-amino-3-hydroksi-2-metyylivaleriaanahapon N-trifluoriasetyyli-n-butyyliesterin EIMS. 46 eV, ionilähteen lämpötila 250°C.

Kuvio XII: 2,3-diaminopropionihapon N-trifluoriasetyyli-n-butyyliesterin EIMS. 46 eV, ionilähteen lämpötila 250°C.

35 Kuvio XIII: β -lysiinin N-trifluoriasetyyli-n-butyyliesterin EIMS. 46 eV, ionilähteen lämpötila 250°C.

Taulukossa I on esitetty LL-BOL208 α :n ja LL-BOL208 β :n asetaattisuolojen ^{13}C -NMR-spektrien tärkeiden huippujen kemialliset siirtymät:

Taulukko I

- 5 LL-BOL208 α :n ja LL-BOL208 β :n asetaattisuolojen ^{13}C -NMR-spektrien^a tärkeiden huippujen kemialliset siirtymät

	LL-BOL208 α	LL-BOL208 β
	182,3	182,5
	178,8	178,8
10	178,6	178,6
	177,5	177,5
	173,3	173,5
	173,1	173,3
	172,7	173,1
15	170,4	170,3
	170,2	-
	169,0	169,0
	166,6	166,6
	165,9	165,9
20	164,7	164,6
	159,2	159,2
	153,7	153,7
	149,4	149,3
	138,2	138,2
25	135,8	135,8
	126,7	127,1
	119,1	119,1
	113,4	113,4
	99,4	99,4
30	98,6	98,6
	76,8	76,7
	75,6 (x2)	75,6 (x2)
	74,8	74,7
	74,1	74,2
35	71,5	71,5
	70,4	70,4
	69,6	69,6

Taulukko I (jatkoa)

	LL-B01208 α	LL-B01208 β
	69,2	69,2
	68,5	68,5
5	68,3	68,3
	66,0	66,0
	62,2	62,2
	61,5	61,5
	60,9	60,9
10	60,2	60,2
	58,3	58,3
	53,8	53,9
	-	49,6
	48,7	48,6 (x2)
15	48,3	-
	-	45,8
	43,9	43,8
	-	42,0
	41,4	41,4
20	-	40,3
	39,8	39,8
	38,7	38,7
	37,9	37,9
	34,2	34,2
25	34,0	-
	-	30,3
	24,4	24,5
	-	24,1
	20,1	20,1
30	16,0	16,0
	13,1	13,1
	12,0	12,0

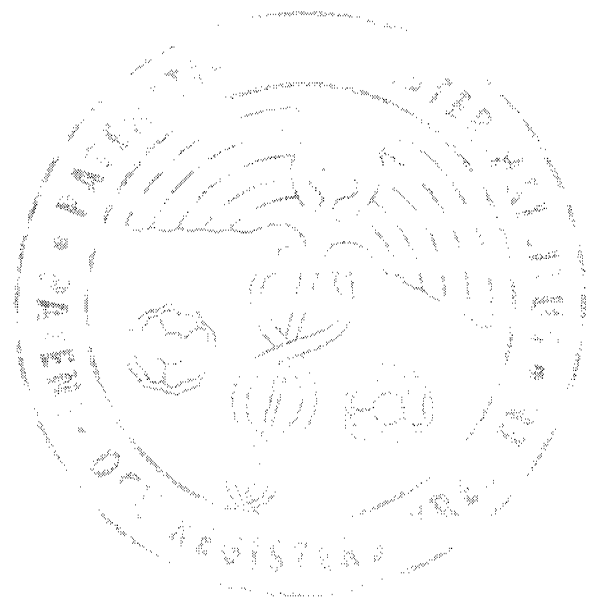
^a50,3 MHz spektrit, jotka on saatu D₂O:ssa, kemialliset
 35 siirtymät miljoonasosia suhteessa tetrametyylisilaaniin.

Keksinnön mukaiset uudet aineet ovat orgaanisia emäksiä ja voivat täten muodostaa happoadditiosuoloja monenlaisten orgaanisten ja epäorgaanisten suoloja muodostavien reagenssien kanssa. Täten happoadditiosuolat muodostetaan sekoittamalla bakteerinvastaista vapaata emästä, joka on neutraalissa liuottimessa hapon kanssa, kuten esim. rikki-, fosfori-, kloorivety-, bromivety-, sulfamidi-, sitruuna-, maleiini-, fumeeri-, viini-, etikka-, bentsoe-, glukoni-, askorbiinihapon yms. kanssa. Keksinnön mukaiset happoadditiosuolat ovat yleensä kiteisiä kiinteitä aineita, liukoisia veteen, metanoliin ja etanoliin, mutta ne ovat liukenemattomia ei-polaarisiin orgaanisiin liuottimiin, kuten esim. dietyylieetteriin, bentseeniin, tolueeniin yms. Keksinnön tarkoituksia varten bakteerinvastaiset vapaat emäkset ovat ekvivalenttisia niiden farmaseuttisesti hyväksyttävien, myrkyttömien happoadditiosuolojen kanssa.

Uusia bakteerinvastaisia aineita LL-B01208 α sekä LL-1208 β muodostuu uuden *Streptovercillium stramineum* sp. nov. kannan kontrolloiduissa olosuhteissa suoritettun viljelyn aikana.

Tämän uuden antibioottia tuottavan mikro-organismin tyypillinen kanta eristettiin ruohoa kasvavan maan näytteestä, joka oli kerätty Etelä-Dakotasta, ja kantaa säilytetään Lederle Laboratories Divisionin viljelmäkoelmas-
sa, American Cyanamid Company, Pearl River, New York 10965, jossa sen viljelmänumero on LL-B01208. Tämän uuden mikro-organismin elävä viljelmä on tallennettu Culture Collection Laboratoryssa, Northern Utilization Research and Development Division, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois 61604 ja on liitetty sen pysyvään kokoelmaan, jossa tämän mikro-organismin tulonumero on NRRL 12292.

Seuraavassa esitetään mikro-organismin *Streptovercillium stramineum* tyypillisen kannan NRRL 12292 yleinen kuvaus, joka perustuu havaittuihin, yleisiin ominaisuuksiin. Havainnot on tehty organismin viljelyominaisuuksien, fysiologisten ja morfologisten piirteiden perusteella Shirlingin ja Gottlieb'in kuvaamien menetelmien



Missing

page/

pages

rilla tuotetaan tummia pigmenttejä. Hiililähteen hyväksikäyttö Pridhamin ja Gottliebin menetelmän mukaisesti, J. Bacteriol. 56: 107-114 (1948) seuraavasti: adnitolin, d-fruktoosin, glyserolin, i-inositolin, d-mannitolin, 5 d-mannoosin sekä dekstroosin hyvä hyväksikäyttö; d-treke-
loosin selvä hyväksikäyttö; ei l-arabinoosin, d-galaktoosin, laktoosin, d-meletsitoosin, d-melibioosin, d-raffinoosin, l-ramnoosin, salisiinin, sakkaroosin sekä d-ksyloosin hyväksikäyttöä. Sietää 7 % natriumkloridia, mutta ei
10 10 % natriumkloridia.

Taulukko II

Streptovercicillium stramineum NRRL 12292:n viljelyominaisuudet
 Inkubointi: 14 päivää Lämpötila: 28°C

Elatusaine	Kasvun määrä	Ilmamyyseeli ja/tai sporit	Liukoinen pigmentti väri	Kääntöpuolen Huomautukset
Kusterin kaurahiutaleagar	Hyvä	Ilmamyyseeli kellahtava muuttuen vaaleannorsunluunväriseksi 2ca sporuloimisalueilla. Itiöiden muodostus voimakasta	Vaalean kellahta- <u>2 hb</u> va	Maissi
Hiiva-mallas-agar	Hyvä	"	Kellahta- <u>va</u>	Hunajankeltainen <u>2 ic</u>
Bennettin agar	Hyvä	"	Vaalean-kellah-tava	Maissi <u>2 hb</u>
Tomaattitahna-kaurajauhoagar	Hyvä	Ilmamyyseeli kellahtava muuttuen vaaleanvehnänväriseksi 2ea sporuloimisalueilla Itiöiden muodostus voimakasta	Kullanruskehta- <u>va</u>	Vaahteran-keltaisesta vaaleanruskeaan <u>3 ng - 4 ng</u>

Taulukko II (jatkoa)

Elatusaine	Kasvun määrä	Ilmamyyseeli ja/tai sporit	Liukoinen pigmentti väri	Kääntöpuolen huomautukset
Hickey & Tresnerin agar	Hyvä	Ilmamyyseeli vaalean-punainen - kellah-tava tullen vaalean-vehnänväriseksi 2ea sporuloimisalueilla. Itiöiden muodostus voimakasta	Kääntöpuolen väri Vaaleankel-Vaahteran keltainen 3 ng	
Asparagiini-dekstroosi-agar	Hyvä	Ilmamyyseeli kellah-tava tullen vaalean-vehnänväriseksi 2ea sporuloimisalueilla. Itiöiden muodostus voimakasta	Ei pigmenttiä Maissi 2 hb	
Czapekin liuosagar	Kohtalaisesta hyvään	Ilmamyyseeli kellah-tava tullen vaalean-vehnänväriseksi 2ea sporuloimisalueilla. Itiöiden muodostus kohtalaista	Ei pigmenttiä	Hyvä elatusaine vertikilien ha-vaitsemiseen
Ravintoagar	Hyvä	Ilmamyyseeli kellah-tava tullen vaalean-vehnänväriseksi 2ea sporuloimisalueilla. Itiöiden muodostus voimakasta	Kullanruskea 4 ng	

Taulukko II (jatkoa)

Elatusaine	Kasvun määrä	Ilmamyseeli ja/tai sporit	Liukoinen pigmentti	Kääntöpuolen väri	Huomautukset
Perunadekstroosi-agar	Hyvä	Ilmamyseeli kellahtava tullen vaaleanvehnänvärisiksi 2ea sporuloimisalueilla. Itiöiden muodostus voimakasta	Ei pigmenttiä	Vaalea vehnä 2 ea	
Benediktin agar	Kohtalaisesta hyvään	Ilmamyseeli valkeahko tullen vaaleanvehnänvärisiksi 2ea sporuloimisalueilla. Itiöiden muodostus kohtalaista	Vaalean-keltainen	Vaalea vaahtera 3 ng	
Riisi-agar	Hyvä	Ilmamyseeli kellahtava tullen vaaleanvehnänvärisiksi 2ea sporuloimisalueilla. Itiöiden muodostus voimakasta	Vaalean-keltaises-ta pigmenttin puuttumiseen	Bambo 2 gc	
Weinsteinin agar	Kohtalainen	Ilmamyseeli valkeahko. Ei itiöiden muodostusta	Kellahtava	Vaahteran keltainen 3 ng	

Taulukko II (jatkoa)

Elatusaine	Kasvun määrä	Ilmamyseeli ja/tai sporit	Liukoinen pigmentti väri	Kääntöpuolen huomautukset
Epäorgaaniset Hyvä suolat-tärkkelysagar		Ilmamyseeli kellahtava tullen vaaleanvähänvärisiksi 2ea sporuloimisalueilla. Itiöiden muodostus voimakasta	Ei pigmenttiä	Hyvä elatusaine vertikilien haittaseemiseen

Muita elatusaineita Streptovercicillia-lajien havainnoimista varten

Bennettin agar (eri kaaviointi)	Hyvä	Ilmamyseeli kellahtava tullen vaaleanvähänvärisiksi 2ca sporuloimisalueilla. Itiöiden muodostus voimakasta	Vaalean-kellahtava	Maissi 2 hb
Kasaminohapot Czapekin agar	Kohtalaisesta hyvään	Ilmamyseeli valkeahkosta kellahtavaan tullen vaaleanvähänvärisiksi 2ca sporuloimisalueilla. Itiöiden muodostus kohtuullista	Ei pigmenttiä	Helmi 3 ba

Taulukko II (jatkoa)

Elatusaine	Kasvun määrä	Ilmamyseeli ja/tai sporit	Liukoinen pigmentti	Kääntöpuolen väri	Huomautukset
Emersonin agar	Kohtalaisesta hyvään	Ilmamyseeli kellahtava tullen vaaleanvähäisenä sunnuntähtiseksi 2ca va sporuloimisalueilla. Itiöiden muodostus kohtalaista	Vaalean-kellahtava	Hunajankeltainen 2 ic	
Glukoosi-asparagiini-agar (ISP # 5)	Hyvä	Ilmamyseeli kellahtava tullen vaaleanvähäisenä sunnuntähtiseksi 2ea sporuloimisalueilla. Itiöiden muodostus voimakasta	Ei pigmenttiä	Vaalea vehnä 2 ea	
Glyseroli-asparagiini-agar (ISP # 5)	Hyvä	"	Ei pigmenttiä	Vaalea vehnä 2 ea	
Epäorgaaniset suolat - tarkkelys (ISP # 4)	Hyvä	"	Ei pigmenttiä	Vaalea, kulanruskea 3 gc	

Taulukko III

Streptovorticillium straminium NRRL 12292:n fysiologiset reaktiot

Lämpötila: 28°C

Elatusaine	Inkubointijakso	Kasvun määrä	Fysiologinen reaktio
Peptoni-rauta-agar	48 tuntia	Hyvä	Tuotettu kohtuullinen määrä melaniini-pigmenttiä
Orgaaninen nit-raattilihaliemi	7 päivää	Hyvä	Ei pelkistetty nitraatteja nitriiteiksi
	14 päivää	Hyvä	Ei pelkistetty nitraatteja nitriiteiksi
Lakmusmaito	7 päivää	Hyvä	Peptisoituminen selvästi hyvään
	14 päivää	Hyvä	Peptisoituminen hyvä
Gelatiini	7 päivää	Hyvä	Osittainen liukeneminen
	14 päivää	Hyvä	Täydellinen liukeneminen
Hiivauute sekä agar (4, 7, 10, 13 %) NaCl	10 päivää		$\bar{\geq}$ 7 % $<$ 10 %

Taulukko IV

Streptoverdicillium straminium NRRL 12292:n hiilen-
lähteen hyväksikäyttö

Inkubointi: 10 päivää Lämpötila: 28°C

	Hiilenlähde	Hyväksikäyttö	Itiöiden muodostus
5	Adonitoli	Hyvä	Hyvä ^{xx}
	l-arabinoosi	Ei	-
	d-galaktoosi	Ei	-
	d-fruktoosi	Hyvä	Vähäinen
10	Glyseroli	Hyvä	Erittäin vähäinen
	i-inositoli	Hyvä	Ei
	Laktoosi	Ei	-
	d-mannitoli	Hyvä	Ei
	d-mannoosi	Hyvä	Hyvä ^{xx}
15	d-melibioosi	Ei	-
	d-raffinoosi	Ei	-
	d-ramnoosi	Ei	-
	Salisiini	Ei	-
	Sakkaroosi	Ei	-
20	d-trehalaasi	Selvä	Ei
	d-ksyloosi	Ei	-
	Dekstroosi	Hyvä	Erittäin vähäinen
	d-meletsitoosi	Ei	-
	Negatiivinen kontrolli	Ei	-
25	^{xx} Hiilenlähteitä, jotka erityisesti tuovat esille itiöiden värin		

On selvää, ettei termi *Streptoverdicillium straminium* rajoitu *Streptoverdicillium stramineum* NRRL 12292:een tai kantoihin, jotka täysin vastaavat yllä esitettyjä kasvu- ja mikroskooppisia ominaisuuksia, jotka ovat ainoastaan annetut valaisevassa tarkoituksessa. Tässä yhteydessä kuvattuun *Streptoverdicillium straminium*in kuuluvat kaikki *Streptoverdicillium stramineum*in kannat, jotka tuottavat antibiootteja LL-B01208^α sekä LL-B01208^β tai niiden yhdistelmiä ja joita ei voi selvästi erottaa *Streptoverdicillium stramineum* NRRL 12292:sta eikä sen alaviljelmistä, joihin sisältyvät sen mutantit sekä variantit. Termiin "mutantit"

kuuluvat tämän organismin luonnolliset (spontaanit) mutantit sekä indusoidut mutantit, jotka on aikaansaatu erilaisin tunnetuin mutageenisin toimenpitein, kuten esim. asettamalla alttiiksi x-sädeäteitylle, UV-säteitylle, typpisnappikaasulle, antinofageille, nitrosamiineille yms. Halutaan ja on tarkoitus lukea mukaan myös väliset ja sisäiset geneettiset yhdistelmät, jotka on tuotettu tunnetuin geneettisin menetelmin, kuten esim. konjugaation, transduktion sekä genetiikan tekniikoiden avulla.

10 Käyminen

Streptovercillium stramineumin viljeleminen voidaan suorittaa monissa nestemäisissä elatusaineissa. Elatusaineet, jotka ovat käyttökelpoisia tuotettaessa näitä uusia bakreetinvastaisia aineita, ovat essimiloituva hiilenlähde, kuten esim. tärkkelys, sokeri, melassi, glyseroli jne.; assimiloituva typen lähde, kuten esim. proteiini, proteiinihydrolysaatti, polypeptidit, aminohapot, maissin liuotusvesi jne.; sekä epäorgaaniset anionit ja kationit, kuten esim. kahvin, natrium, ammonium, kalsium, sulfaatti, 20 karbonaatti, fosfaatti, kloridi jne. Hivenalkuaaineet, kuten esim. boori, molybdeeni, kupari jne. lisätään elatusaineeseen muiden aineosien epäpuhtauksina. Säiliöt ja pullot ilmastetaan puhaltamalla steriiliä ilmaa käymiselatusaineen läpi tai pintaan. Lisäksi säiliöiden ravistelu saadaan aikaan mekaanisen siipirattaan avulla. Tarvittaessa saatetaan lisätä vaahtoamisen estoainetta, kuten esim. lardiöljyä tai silikoni-vaahdonestoainetta.

Ympin valmistus

Streptovercillium stramineumin ravistelupullo- 30 ymppi valmistetaan ymppäämällä 100 ml:n erää steriiliä, nestemäistä elatusainetta 500 ml:n pulloissa siten, että niihin raaputetaan tai pestään itiöitä viljelmän vinopinta-agarilta. Seuraavassa on esimerkki ymppiin soveltuvasta elatusaineesta.

	Maissitärkkelystä	24 g
	Dekstroosia	5 g
	Hiivauutetta	5 g
	Bacto [®] -tryptonia ¹	5 g
5	Lihausuutetta	3 g
	Kalsiumkarbonaattia	4 g
	Vettä	1 000 ml:ksi

(¹Peptoni, Difco-laboratorioiden, Detroit, Michigan, rekisteröity tavaramerkki)

- 10 Näitä pulloja inkuboidaan 23-35°C:ssa, mieluummin 28°C:ssa ravistellen 22-26 tunnin ajan ja sitten niitä käytetään ympäpäämään 12 litraa samaa steriiliä elatusainetta pullossa, joka 28°C:ssa ilmastaen suoritettuna 24 tunnin mittaisen inkuboinnin jälkeen käytetään ympättäessä
- 15 ympäpäämään sijoitettua 300 litran erää samaa elatusainetta. Tätä ympäpiä inkuboidaan 28°C:ssa 24 tunnin ajan sekoittaen siipirattaan avulla nopeuden ollessa 175 kierrosta minuutissa ja siten, että steriiliä ilmaa virtaa 150 litraa minuutissa ja sitten se käytetään käymissäiliöiden
- 20 ympäpäämiseen.

Säiliökäyminen

Seuraavassa esitetään elatusaine, joka soveltuu LL-B01208α:n ja -β:n tuottamiseen käymissäiliöissä.

	Lardiöljy	30 kg
25	Pharmamedia ^{®2}	15 kg
	Maissin liuotusneste	15 kg
	Ammoniumsulfaatti	4,5 kg
	Sinkkisulfaattiheptahydraatti	45 kg
	Kalsiumkarbonaatti	6 kg
30	Vettä	1 500 litraksi

(²Puuvillansiemenöljy, josta rasva on poistettu, rekisteröity tavaramerkki, jonka on toimittanut Trader's Protein Div. of Trader's Oil Mill, Ft. Worth, Texas)

- 35 Kukin säiliö ympätään 3-10 %:lla yllä kuvatulla tavalla valmistettua ympäpiä. Ilmastuksen määrä on 750 litraa ilmaa minuutissa ja seosta sekoitetaan siipirattaan avulla nopeudella 100 kierrosta minuutissa. Lämpötila pidetään

24-35°C:ssa. Käymistä jatketaan 80-120 tunnin ajan, jonka kuluttua massa kootaan.

LL-B01208:n eristäminen

Valvotuissa olosuhteissa, joita edellä on kuvattu, suoritetun käymisen aikana *Streptoverticillium stramineum* sp. nov. tuottaa antibioottia LL-B/1208 (määriteltä seokseksi, jossa on LL-B01208 α :a ja LL-B01208 β :a missä tahansa suhteissa). Tämä antibiootti LL-B01208 saatetaan eristää seuraavasti (kaikki alla kuvatut vaiheet suoritetaan 5-30°C:ssa, mieluummin 20-25°C:ssa, jollei ole toisin mainittu):

Käyminen suoritetaan yllä kuvatulla tavalla ja koottu seos suodatetaan solujen pirstaleiden poistamiseksi. Sitten antibiootti LL-B01208 kootaan ja puhdistetaan tavanomaisiin menetelmin, jotka ovat tuttuja tutkimustyöhön perehtyneille, kuten esim. adsorptio-, pylväs-, kationi-, ohutlevykromatografian tai valikoivan saostamisen avulla.

LL-B01208:n parempana pidetty puhdistus- ja keräysmenetelmä käsittää kootun massan suodoksen pH:n säädön noin 7,0 - 7,5:ksi sekä mainitun suodoksen adsorboinnin kationinvaihtajaan, mikä suoritetaan annoksittain. Sopivia kationinvaihtajia ovat heikosti happamet aineet, joilla on avoin rakenne, kuten esim. CM-Sephadex[®] C-25 (Na⁺), karboksimeytylliselluloosa tai Amberlite IRC-50[®]. CM-Sephadex[®] 25 (Na⁺):a pidetään parempana. Adsorboitunut LL-B01208 eluoidaan käyttäen suurta konsentraatiota suolaa, jolla on suuri ionivahvuus, kuten esim. 7-14 % natriumkloridia (mieluummin noin 8 %) tai noin 7-14 % kaliumkloridia (mieluummin noin 8 %). 8 % natriumkloridia pidetään parempana. Sitten suola poistetaan tavanomaisiin keinoin, joita käytetään vesiliukoisten aineiden suolanpoistoon, kuten esim. adsorptiokromatografian, suurpaineliuoskromatografian tai hartsiseoksella suoritettua kromatografian avulla. Edullinen suolanpoistomenetelmä on adsorptiokromatografia.

Antibiootin suola adsorboidaan sopivaan adsorbenttiin, kuten esim. Amberlite[®] XAD-2:een, rakeiseen hiileen, Amberlite[®] XAD-4:een tai Amberlite[®] XAD-7:ään. Amberlite[®]-

XAD-2 on parempana pidetty adsorbentti. Välitilan suola poistetaan pesemällä vedellä ja sitten LL-B01208 eluoidaan liuoksella, jossa on suhteessa 10:90 - 30:70 (tilavuus/tilavuus) suolatonta vettä: neutraalia, polaarista, veteen sekoittuvaa liuotinta, kuten esim. etanolia, metanolia, asetonia jne. Mieluummin käytetään suhteessa 30:70 vesi: metanoli (tilavuus/tilavuus)-liuosta.

Näin saadusta suolattomasta antibiootti LL-B01208:n eluaatista poistetaan liuotin tyhjöissä, ja se kylmäkuivataan varastointia varten.

Haluttaessa LL-B01208 saatetaan erottaa aineosikseen LL-B01208 α :ksi sekä LL-B01208 β :ksi tavanomaisin menetelmin, kuten esim. pylväs-, adsorptio-, kationi-, ohutlevy-kromatografian tai valikoivan saostuksen avulla. Edulliset LL-B01208 α :n ja LL-B01208 β :n erottamismenetelmät edellä saadusta LL-B01208-seoksesta ovat seuraavat:

LL-B01208 α :n ja LL-B01208 β :n eristäminen

Yllä kuvattu LL-B01208:n suolaton eluentti tai mainitun eluentin kylmäkuivattu osa veteen liuotettuna adsorboidaan kationihartsiin. Esimerkkejä sopivista kationihartseista ovat sellaiset, jotka ovat heikosti happamia ja joilla on avoin rakenne, kuten esim. CM-Sephadex[®] 25 (Na⁺) (edullinen), karboksimeetyyliselluloosa, Amberlite IRC-50 (Na⁺)[®] tai Amberlite ICR-72[®]. Sitten antibiootti LL-B0128 erotetaan komponenteikseen LL-B01208 α sekä LL-B01208 β kromatografian avulla käyttämällä sopivaa korkeaa ionivahvuutta - lineaarista suolagradienttia. Sopivien gradienttien esimerkkejä ovat esim. 0,1M - 2M ammoniumasetatti (0,1M - 1M edullinen), 0,1M - 1M ammoniumformiaatti tai 1-7 % natriumkloridi. Näistä 0,1M - 1M ammoniumasetatti on edullisin. Eluaatin jakeita tarkastellaan antibiootin läsnäolon suhteen käyttäen tavanomaisia, tunnettuja menetelmiä, kuten esim. valonabsorption määrittämistä 290 nm:ssä sekä biologisen aktiivisuuden määrittämistä. LL-B01208 α eluoituu ensin alemmassa suolakonsentraatiossa; sitä seuraa LL-B01208 β suuremmassa suolakonsentraatiossa. Kunkin antibiootin aktiiviset jakeet yhdistetään.

Edullisimmassa menetelmässä komponentit LL-B01208 α ja LL-B01208 β eristetään kromatografian avulla käyttäen erillisiä gradientteja. Tässä menetelmässä eristetään LL-B01208 α LL-B01208 β :sta kehittämällä kromatogrammi CM-Sephadex^R 25(Na⁺):ssa käyttäen 0,1M - 0,4M ammoniumasettaattigradienttia ja kootaan ainoastaan LL-B01208 α . LL-B01208 β eristetään erottamalla se LL-B01208:sta CM-Sephadex^R 25(Na⁺):n avulla käyttäen 0,1 - 1,0M ammoniumasettaattigradienttia ja ainoastaan LL-B01208 β kootaan.

10 LL-B01208 α :n ja LL-B01208 β :n puhdistaminen

Eristämisen jälkeen antibiootit LL-B01208 α sekä LL-B01208 β saatetaan puhdistaa tavanomaisin keinoin, kuten esim. adsorboimalla Amberlite XAD-2^R:een ja eluoimalla siitä yllä kuvatulla tavalla.

15 Edullinen joko antibiootin LL-B01208 α :n tai LL-B01208 β :n eristysmenetelmä on seuraava: suolagradientteliu-
 aatin sopivat jakeet yhdistetään ja kompleksia muodostavaa ainetta lisätään riittävä määrä antibioottikompleksin muo-
 dostamiseksi. Esimerkkejä sopivista kompleksin muodostavista
 20 aineista ovat aineet, jotka muodostavat liukenemattomia sulfideja ja jotka voivat muodostaa kompleksin antibiootin kanssa stabiileilla pH-alueilla, kuten esim. kupari(2)-
 asetaatti, kobolttiasetaatti tai sinkkiasetaatti. Kupari(2)-
 ioni on edullinen aine. Kompleksin muodostavan aineen tar-
 25 vittava määrä voidaan helposti määrittää tunnetulla taval-
 la. Antibioottikompleksista poistetaan suola edellä kuva-
 tulla tavalla ja suolaton antibiootti-metallikompleksi vä-
 kevoidaan tyhjöissä sekä kylmäkuivataan, jolloin saadaan
 sininen kiinteä aine. Tämä kiinteä aine liuotetaan neutraa-
 30 liin, polaariseen, veteen sekoittuvaan liuottimeen, kuten
 esim. tanoliin, metanoliin tai asetoniin. Siihen lisätään
 yhtä suuri tilavuus samaa liuotinta, joka on kyllästetty
 antibioottikompleksin hajottamiseen soveltuvalla yhdisteel-
 lä, kuten esim. rikkivedyllä. Lisätään pieni määrä kirkas-
 35 tavaa ainetta, esim. aktiivihiiltä, piimaata, alumiiniok-
 sidia tai silikageeliä ja seosta sekoitetaan noin 5-30 mi-
 nuuttia, mieluummin noin 15 minuuttia ja sitten se suoda-

- tetaan. Suodos laimennetaan 1/4 - 2 tilavuudella (edullisesti noin 1/3 tilavuudella) vettä ja se väkevöidään tyhjössä, 25-50°C:ssa (edullisesti noin 35°C:ssa), vesijakeeksi, joka sitten suodatetaan erittäin hienon suodattimen, esim. Nalgenen^R päällystämättömän membraanisuodattimen (plain membrane filter) läpi, jonka huokoskoko on 0,20 mikronia, Pall Ultipore^R-membraanisuodattimien tai Pyrex^R-suppiloiden läpi, joissa on erittäin hieno- tai hienohuokoiset levyt (edullinen) sekä kylmäkuivataan.
- 10 Näitä bakteerienvastaisia aineita verrataan in vitro käyttämällä erilaisia gram-positiivisia ja gram-negatiivisia bakteereita standardi agarlaimennusmenetelmässä. Tulokset on ilmoitettu pienimpinä inhiboivina konsentraatioina (mcg) /ul/ml taulukossa V. Bakteerienvastaiset aineet ei-
- 15 vät olleet aktiivisia Pseudomonas-, Enterococcus-sukuja eivätkä anaerobisia bakteereita kohtaan 128 /ug/ml:n tai pienempinä konsentraatioina.

Taulukko V

Organismi Pienin inhiboiva konsentraatio (µg/ml)
 LL-B01208α LL-B01208β

Salmonella sp. Arizona QHC 77-3	2	0,5
" sp. Indiana	1	
" infantis	2	
" sp. Heidelberg	1	
" typhimurium K	1	
Acinetobacter sp. Stamford 7743	32	2
" " K 77-1	64	32
" " K 77-5	16	
" " UR 75-20	32	
" " MAYO 75-10	16	
Staphylococcus aureus SSC 18	4	
" " SSC 80	4	
" " SSC 22	4	
" " SSC 73	8	
" " FU 19-4	8	
" " FU 19-2	8	2
" " SSC 79-18	8	1
Klebsiella sp. Stamford 6404	8	1
" " SSC 78-1	8	1
Enterobacter aerogenes Stamford 6315	16	2
" " K 79-16	8	4
" " K 79-17	4	
" " K 79-18	4	

Taulukko V (jatkoa)

Pienin inhiboiva konsentraatio (ug/ml)
LL-B01208 α LL-B01208/3

Organismi

<u>Enterobacter cloacae</u> Schaeffler 60 " " K 79-16	32. 8	4
<u>Enterobacter agglomerans</u> SM 77-1	8	
<u>Serratia</u> sp. TUL 78-15	128	8
" " QHC 77-2	64	8
" " TUL 78-17	64	
" " UCLA 79-1	64	
" " UCLA 79-3	64	
<u>Proteus morganii</u> Schaeffler 71 " " K 79-25	16 64	8
<u>Proteus rettgeri</u> Schaeffler 72 " " K 77-5 " " N 76-1	2 256	32
<u>Proteus vulgaris</u> SM 77-1 " " K 77-3	32 32	
<u>Escherichia coli</u> Stamford 7037 " " 311 " " Schaeffler 59 " " Stamford 6341 " " K 79-1 " " K 79-4 " " SM 77-16	0,5 2 0,5 1 2 0,5 0,5	0,25 0,25

Taulukko V (jatkoa)

Pienin inhiboiva konsentraatio (µg/ml)
LL-B01208α LL-B01208β

Organismi

Organismi		Pienin inhiboiva konsentraatio (µg/ml)
LL-B01208α		LL-B01208β
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	Schaefer 58	4
"	" 67	4
"	Stamford 6404	4
"	SSC 78-1	4
"	SSC 78-10	8
"	K 79-8	2

Bakteerienvastaiset aineet LL-B01208 α ja LL-B01208 β ovat myös in vivo aktiivisia erilaisia organismeja kohtaan. Nämä uudet bakteerinvastaiset aineet ovat täten erittäin käyttökelpoisia terapeuttisina aineina nisäkkäiden bakteeri-infektioita hoidettaessa.

Näiden uusien bakteerinvastaisten aineiden käyttökelpoisuutta havainnollistaa niiden kyky hillitä hiiren systeemisiä letaalisia infektioita. Näillä uusilla yhdisteillä in vivo on korkea aktiivisuus Klebsiella pneumoniaeta sekä Escherichia colia 311 kohtaan, kun niitä annetaan yksinkertaisina annoksina ihon alle Charles River CD-1 naaraspuolisille hiirille, jotka kukin painavat 20 ± 2 g ja jotka on infektoitu vatsaontelonsisäisesti letaalisella annoksella näitä bakteereita, jotka ovat viiden tunnin TSB-viljelmästä tryptikaasi-soija-elatusaineeseen (TSB) valmistetussa laimennuksessa. Taulukko VI esittää LL-B01208 α :n ja - β :n aktiivisuuden in vivo näitä bakteereita kohtaan.

Taulukko VI

Elossa/hiirien kokonaismäärä, joka on testattu 7
päivää infektion jälkeen

Yksinkertainen ihon-
al. annos (mg/kg)

Klebsiella pneumoniae AD Escherichia coli 311

	LL B01208a	LL B01208β	LL B01209α	LL B01208β
16	5/5		5/5	5/5
8	4/5		0/5	3/5
4	0/5		0/5	0/5
2		5/5		
1		4/5		
0,5		2/5		
0,25		3/5		
		0/5		

Bakteerinvastaisen toimintansa lisäksi nämä aineet ovat tehokkaita lämminveristen eläinten kasvaimien kasvua tukahduttaessa, kuten seuraavien testien tulokset osoittavat.

- 5 Aktiivisuus hiiren B16 tummasolukasvainta vastaan
 Koiraspuoliset hiiret (BDF_1) rokotetaan ihon alle
 0,5 ml:lla 10-%:ista B16 tummasolukasvaimen homogenaattia
 päivänä nolla. Koeyhdisteet annetaan vatsaontelonsisäisesti
 käyttäen ilmoitettuja annoksia kasvaimen istuttamisen jäl-
10 keisinä päivinä 1-9. Kasvaimen koko mitataan päivänä 13
 positiivisena vasteena, jonka ilmaisee 58-%:inen tai sitä
 suurempi kasvaimen koon inhiboituminen kontrolleihin ver-
 rattuna. Kokeen tulokset käyvät ilmi taulukosta VII.

Taulukko VII

Vaikutus hiiren ihon alle istutetun B16 tummasolukasvaimen kasvuun

Yhdiste	Annos (mg/kg)	Elävien lukum.		Kasvaimen paino (g)	Kasvaimen inhibitio %
		Käsitelt. lukum.			
Kontrolli (keittosuolaliuos)		10/10		605	
LL-B01208 α	16	8/10		212	65,0
	8	10/10		217	64,1
	4	10/10		240	60,3
LL-B01208 β	8	9/10		127	79,0
	4	8/10		200	66,9

Kasvaimen kasvun inhiboinnin lisäksi nämä aineet lisäävät elinaikaa lämminverisillä eläimillä, joilla on Bl6 tummasolukasyain. Taulukossa VIII esitetään yllä kuvatus menetelmän mukaisesti suoritettujen kokeiden tulokset, joissa 5 eliniän piteneminen 25 %:lla tai sitä enemmän on katsottu merkittäväksi.

Taulukko VIII

Vaikutus ihonalaista B16 mustasolukasvainta kantavan hiiren elinaikaan

Yhdiste	Annos (mg/kg)	Keskimääräinen elinaika (päiviä)	Elinajan li-sääntymisen %
Kontrolli (keittosuolaliuos)		29,0	
LL-B01208 α	16	38,0	31
	8	41,5	43
	4	46,5	60
LL-B01208 β	4	42,0	45
	2	43,0	48
	1	38,5	33

Aktiivisuus hiirellä esiintyvää Lewisin keuhkosityöpää vastaan.

Hiirelle (BDF_1) annetaan ihon alle 0,5 ml 10-%:ista kasvaimien homogenaattia. Koeyhdisteitä annetaan vatsaonteloon ilmoitetut annokset kasvaimen istuttamisen jälkeisinä päivinä 1-9. Kasvaimien koko mitataan päivänä 13 positiivisena vasteena, jonka ilmaisen 58-%:inen tai sitä suurempi kasvaimen koon inhiboituminen kontrolleihin verrattuna. Kokeen tulokset käyvät ilmi taulukossa IX.

Taulukko IX

Vaikutus kasvaimen kasvuun hiirellä, jolla on ihonalainen lewisin keuhkosyöpä

Yhdiste	Annos (mg/kg)	Elävien lukum.		Kasvaimen paino (g)	Kasvaimen inhibitio %
		Käsitelt.	lukum.		
Kontrolli		9/10		3836	
(suolaliuos)		2/10		0	100
LL-B012088	12	9/10		76	98
	8	9/10		389	90
	4	10/10		928	76
	2	10/10		1103	71
	1				

Sen lisäksi, että nämä aineet inhiboivat kasvaimen kasvua, nämä aineet lisäävät myös elinaikaa lämminverisillä eläimillä, jotka kantavat Lewisin keuhkosityöpää. Taulukossa X esitetään yllä kuvatulla menetelmällä suoritettun

5 kokeen tulokset, joissa eliniän piteneminen 25 %:lla tai enemmän on katsottu merkittäväksi.

Taulukko X

Vaikutus elinikään hiirillä, joissa on Lewisin keuhkosyöpä

Yhdiste	Annos (mg/kg)	Keskim. elinikä (päiviä)	% lisääntyminen elinikässä
Kontrolli (keittosuolaliuos)		26	
LL-B01208/3	8	32	25
	4	33	27
	2	33	27

Keksintöä kuvataan yksityiskohtaisemmin seuraavien erityisesimerkkien avulla.

Esimerkki 1

Rokotevalmiste

5 Rokotteen väliaine valmistettiin seuraavan kaavioinnin mukaisesti:

	Maissitärkkelystä	24 g
	Dekstroosia	5 g
	Hiivauutetta	5 g
10	Bacto [®] -tryptonia	5 g
	Lihauutetta	3 g
	Kalsiumkarbonaattia	4 g
	Vettä	1 000 ml:ksi

Yllä esitetyn steriilin väliaineen, jota oli 100 ml
 15 500 ml:n pullossa, ympäykseen käytettiin Streptovorticillium stramineum NRRL 12292:n agar-vinopinnalta pestyjä tai raaputettuja itiöitä. Pullot pantiin pyöröravistelijaan, ja niitä ravisteltiin voimakkaasti 28°C:ssa 24 tunnin ajan. Syntyvä ymppe siirrettiin 12 litran vetoiseen pulloon, joka
 20 sisälsi samaa steriiliä väliainetta ja sitä inkuboitiin 24 tunnin ajan 28°C:ssa samalla ilmastaen. Saatua elatusainetta käytettiin samaa steriiliä mediumia sisältävän 300 litran vetoisen säiliön ympäämiseen ja inkuboitiin sitten 24 tunnin ajan samanaikaisesti sekoittaen siipirattaan
 25 nopeudella 175 kierrosta minuutissa sekä ilmastaen steriilin ilman avulla, jonka virtausnopeus oli 150 litraa minuutissa ja täten tuotettiin säiliöymppe.

Esimerkki 2

Käyminen

30 Valmistettiin käymiselatusaine seuraavan kaavioinnin mukaisesti:

	Lardiöljy	30 kg
	Pharmamedia [®]	15 kg
	Maissin liuotusneste	15 kg
35	Ammoniumsulfaatti	4,5 kg
	Sinkkisulfaatti-heptahydraatti	45 kg
	Kalsiumkarbonaatti	6 kg
	Vettä	1 500 litraksi

Tätä käymiselatusainetta steriloitiin 120°C:ssa 60 minuutin ajan ja sitten ympätettiin 150 litralla esimerkin 1 mukaan valmistettua säiliöymppiä. Käyminen suoritettiin 28°C:ssa käyttäen vaahdonestoaineena Hodag® FD82:a (silikoni
 5 vaahdonestoaine, Hodag Chemical Corp.:n, Skokie, Illinois, rekisteröity tavaramerkki). Ilmastuksen määrä oli 750 litraa steriiliä ilmaa minuutissa. Seosta ravistettiin siipirattaan avulla, jonka nopeus oli 100 kierrosta minuutissa. Noin 87 tunnin pituisen käymisajan päätyttyä massa koottiin.

10 Esimerkki 3

LL-BOL208α:n ja β:n alustava eristäminen

Käyminen suoritettiin esimerkissä 2 kuvatulla tavalla. 1 500 l koottua massaa yhdistettiin 3 %:n (paino/tilavuus) kanssa Celite® 512:a (piimaa, suodatuksen apu-
 15 aine, Johns-Manville Sales Co:n, Englewood Cliff, N.J., rekisteröity tavaramerkki) sekä suodatettiin laatta- ja kehyspuristimen läpi. Puristuskakku pestiin 150 litralla vettä ja pesuvesi sekä suodos yhdistettiin. pH oli 7,1 eikä säätöä halutulle pH-alueelle 7,0 - 7,5 tarvittu. Anti-
 20 biotit adsorboitiin erissä CM-Sephadex® C-25:een (Na⁺) (karboksyloitu dekstraani ioninvaihtoaaine, Pharmacia Fine Chemicals Div. of Pharmacia, Inc.:n, Piscataway, N.J. rekisteröity tavaramerkki). Hartsia sekoitettiin 1 1/2 tunnin ajan, sitten sen annettiin laskeutua kahden tunnin
 25 ajan ja supernatantti poistettiin lapon avulla ja heitettiin pois. Hartsia pestiin annoksittain 3-5 kertaa vedellä ja lietettiin sitten laskeutuneen hartsin 1/2 tilavuuteen 8 %:ista natriumkloridiliuosta. Seosta sekoitettiin 10 minuutin ajan, sitten se siirrettiin suureen pylvääseen
 30 (0,4572 x 0,588 m), joka oli valmistettu ruostumattomasta teräksestä. "Eräsuola"-("back salt") effluentti koottiin pylväästä maanvetovoiman aikaansaaman virtauksen avulla. Kun liuoksen pinta pylväässä hartsin yläpuolella saavutti hartsin yläpinnan, syötettiin pylvääseen tuoretta 8-%:ista
 35 natriumkloridiliuosta. Koottiin 20 litran suuruiset jakeet. Aktiiviset jakeet määritettiin eläinkokeiden avulla. Nämä, natriumkloridieluutiosta saadut aktiiviset jakeet suoda-

tettiin Amberlite[®]XAD-2 (synteettinen, polymeerinen, ioniton adsorbenssi, Rohm and Haasin, Philadelphia, Pa., rekisteröity tavaramerkki) -hartsin läpi, joka oli 10,2 x 152,4 m:n suuruisessa pylväässä ja pakatun kolonnin tilavuus oli 5 litraa. Tämä hartsi pestiin ionittomalla vedellä ja jakeet koottiin 1-4 litraksi, jotka oli yhdistetty. Sitten hartsi eluoiitiin seoksella, jossa oli 70 % metanolia::30 % suolatonta vettä ja jakeet koottiin neljän litran suuruiseksi yksiköiksi, jotka oli yhdistetty. Kukin näistä yhdistetyistä jakeista väkevöitiin erikseen ja kylmäkuivattiin.

Esimerkki 4

LL-B01208 β :n eristäminen

CM-Sephadex[®]C-25 (Na⁺)-pylväässä kromatografoitiin 9,0 g:n erä kylmäkuivattua ainetta, joka oli saatu esimerkin 3 mukaisen, kuormitetun Amberlite[®]XAD-2-hartsipylvään yhdistetyistä vesieluentiojakeista. Kiinteä aine liuotettiin veteen ja sen annettiin imeytyä pylvääseen. Aine pestiin sitten pylvääseen veden avulla ja pylväs kehitettiin gradientin avulla, jolla oli 0,1M - 1,0M ammoniumasetaattia. Koottiin sarja pylvään jakeita, joiden tilavuus oli 75 ml ja joita tarkasteltiin UV-absorption avulla 202 nm:ssa käyttäen laimennusta 1:20 sekä bioautografian avulla. Yhdistettiin jakeet 74-83, lisättiin 200 mg kupariasetaattia ja yhdistetyistä jakeista poistettiin suolat 300 ml:lla Amberlite[®]XAD-2-hartsia, jolloin saatiin 1 548 mg sinistä kiinteää ainetta. 600 mg:n erä tätä kiinteää ainetta liuotettiin 75 ml:aan metanolia. Lisättiin 75 ml:n erä metanolia, joka oli kyllästetty rikkivedyllä, yhdessä pienen erän kanssa aktiivihiiltä ja seosta sekoitettiin 15 minuutin ajan. Tämä suspensio suodatettiin. Suodos laimennettiin 50 ml:lla vettä ja se väkevöitiin tyhjössä vesijakeeksi, joka sitten suodatettiin erittäin hienon suodattimen läpi. Tämä suodos kylmäkuivattiin, jolloin se antoi 398 mg LL-B01208 β :a, jolla oli seuraavat ominaisuudet:

Mikroanalyysi: C 44,82 H 6,50 N 15,41 S 3,94

Ominaiskiertokyky $[\alpha]_D^{25}$ +17 $\pm$ 2

LL-B01208 β :n absorptiospektri on kuvion I mukainen; protonin magneettinen resonanssispektri on esitetty kuviossa II; C¹³-ydinmagneettinen resonanssispektri on kuvion III mukainen; ja ultraviolettiaabsorptiospektri on esitetty kuviossa IV, kaikki piirrookset ovat liitteinä.

Esimerkki 5

LL-B01208 α :n eristäminen

Esimerkin 3 mukaan täytetyistä Amberlite[®]XAD-2-hartsipylväistä saaduista yhdistetyistä vesi- ja yhdistetyistä metanolieluutiojakeista sekä esimerkissä 2 kuvatuista käymisistä saatujen kylmäkuivattujen valmistaiden sarjat, kaikkiaan 5,552 g, yhdistettiin ja liuotettiin 150 ml:aan vettä. Liuoksen annettiin suodattua CM-Sephadex[®]-25 (Na⁺)-pylvääseen, jonka koko oli 4,5 x 70 cm. Pylväs kehitettiin sitten gradientilla, jossa oli 0,1M - 0,4M ammoniumasetattia. Noin 40 ml:n suuruiset jakeet koottiin ja niitä tarkastettiin LL-B01208 α :n läsnäolon suhteen siten, että optinen tiheys luettiin 202 nm:ssä vedellä suoritettuna 21-kertaisen laimennuksen jälkeen. Yhdistettiin jakeet 62-71 ja niistä poistettiin suolat adsorboimalla ne Amberlite[®]XAD-2-pylvääseen ja elioimalla siitä esimerkissä 4 kuvatulla tavalla. Eluaatit kylmäkuivattiin, jolloin saatiin 387 mg kiinteää ainetta. Tämä kiinteä aine liuotettiin 100 ml:aan metanolia, joka oli kyllästetty rikkivedyllä. Liuosta sekoitettiin pienen erän kanssa aktiivihiiltä 20 minuutin ajan, se suodatettiin, siitä poistettiin liuotin ja se kylmäkuivattiin, jolloin saatiin 303 mg LL-B01208 :a, jolla oli seuraavat ominaisuudet:

Mikroanalyysi: C 43,18 H 5,74 N 15,47 S 3,39

Ominaiskiertokyky $[\alpha]_D^{25} = +19$

LL-B01208 α :n C¹³-ydinmagneettinen resonanssispektri on kuvion V kaltainen ja protonin magneettinen resonanssispektri on esitetty kuviossa VI, molemmat piirrookset ovat liitteinä.

Esimerkki 6

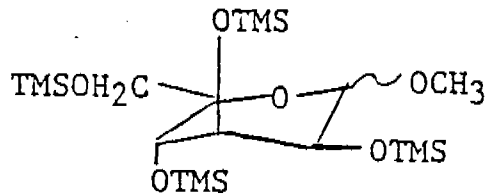
LL-B/1208~~α~~:n ja LL-B01208/β:n silyloidun metyyli-glukosidin kaasukromatografinen/massaspektri

- Yhden mg:n erää LL-B01208/β:a, joka oli yhdessä ml:ssa
- 5 1,5M metanolia sisältävää kloorivetyä, kuumennettiin suljetussa lasiampullissa neljän tunnin ajan 110°C:ssa. Metanoyylisaatti siirrettiin yhden ml:n vetoiseen, suipennettuun pulloon, jossa oli Teflon[®] (Dupont Co., Wilmington, Del.)-päällysteinen kumitiiviste, ja hapan metanoli poistettiin typpivirrassa hiukan lämmittäen ja sen jälkeen
- 10 kylmäkuivattiin 16 tunnin ajan. 100 µ:n erä Tri-Sil "Z" (trimetyylisilyyli-imidatsolia, trimetyylisilyloimisainetta, Pierce Chemical Co.:n, Rockford, I 11, rekisteröity tavaramerkki) lisättiin kylmäkuivattuun jäännökseen ja tämän seoksen annettiin seisoa huoneen lämpötilassa 30 minuutin ajan, ennen kuin se ruiskutettiin kaasukromatografia-alaitteeseen. LL-B01208~~α~~:n silyloitu metyyli-glukosidi valmistettiin samalla tavalla. Kullekin suoritettiin kaasukromatografinen/massaspektri-analyysi seuraavasti:
- 20 Kolonni: 3 % OV-17 (pääasiallisesti 50:50 metyyli:fenyyli-silikonia, Ohi Valley Chemicalsin, Marietta, Ohio, rekisteröity tavaramerkki) 100/120 GCQ:n pinnalla /GAS CROM Q[®] (silanoitu, aktivoitu piimaa-kantaja-aine, Applied Science Laboratories, Inc.:n, State College, PA., rekisteröity tavaramerkki)/ (1,822 m x 2 mm).
- 25 Ohjelma: 140-280°C, 60°C minuutissa.
Helium (kantajakaasu). 30 ml minuutissa; vety: 30 ml minuutissa; ilma: 30 ml minuutissa.
Detektorin lämpötila: 275°C.
- 30 Injektorin lämpötila: 218°C.
Piirturipaperin nopeus: 1/4 tuumaa (0,635 cm) minuutissa.
- Laite: Varian CH-7 massaspektrometri.
- Bleomysiinisulfaatin, tsorbamysiinin (zorbamycin),
- 35 mannoosin ja glukoosin näytteet käsiteltiin tarkalleen samalla tavalla.

Massaspektrin antamien tietojen perusteella LL-BOL208 α :n ja LL-BOL208 β :n silyloitu metyyli-glukosidi sisältää johdannaisen, joka on identtinen bleomysiinin silyloidusta metyyli-glukosidista saadun guloosijohdannaisen kanssa:

5

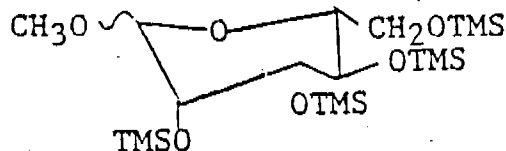
10



Retentioaika 4,6 minuuttia; G.C. intensiteetti 1,2 voltia; laskettu molekyylipaino 482; G.C./MS. LL-BOL208 β :lle kuten liitteiden kuviossa II on esitetty.

Samalla menetelmällä on LL-BOL208 α :n ja LL-BOL208 β :n osoitettu sisältävän mannoosijohdannaisen, joka on identtinen mannoosin silyloidun metyyli-glukosidin kanssa:

20



Retentioaika 5,4 minuuttia; G.C. intensiteetti 3,3 voltia; laskettu molekyylipaino 482; G.C./M.S. LL-BOL208 β :lle, kuten liitteiden kuviossa VIII on esitetty.

Esimerkki 7

LL-BOL208 α :n ja LL-BOL208 β :n happohydrolyysin avulla saatujen aminohappojen N-trifluoriasetyyli-n-butyylimestereiden kaasukromatografi/massaspektri

3 mg:n erä LL-BOL208 β :a, joka oli 3 ml:ssa 6N suolahappoa, kuumennettiin 24 tunnin ajan 110°C:ssa. Happojäännös pestiin useita kertoja vedellä pyöröhaihduttajassa ylimääräisen suolahapon poistamiseksi ja sitten se sijoitettiin suurvakuumiin 16 tunnin ajaksi.

35

N-trifluoriasetyyli-n-butyyliesterin valmistusmenetelmä oli oleellisesti Panadey et al.:n esittämä menetelmä J.A.C.S. 99 (26); 8469-8483 (joulukuu 21, 1977). 0,5 ml:n erä hapan butanolia (2,4 ml asetyylikloridia 10 ml:ssa n-butanolia) lisättiin happohydrolyysituotteeseen ja seosta kuumennettiin 30 minuutin ajan $100 \pm 2^{\circ}\text{C}$:ssa suljetussa lasiampullissa. Tämä puolijohdannainen sijoitettiin suurvakuumiin 16 tunniksi. Kylmäkuivattuun puolijohdannaiseen lisättiin yhden ml:n erä metyleenikloridia ja 0,5 ml trifluorietikkahappoanhydridiä ja seosta kuumennettiin viiden minuutin ajan $150 \pm 2^{\circ}\text{C}$:ssa. Johdos jäähdytettiin 0°C :seen typen alla ja jäljelle jäänyt liuotin poistettiin tarkasti. Lisättiin tuoretta metyleenikloridia, jotta lopulliseksi konsentraatioksi saatiin 1 %. LL-BOL208 α :n N-trifluoriasetyyli-n-butyyliesteri valmistettiin samalla tavalla.

LL-BOL208 α :n ja LL-BOL208 β :n kaasukromatografinen/massaspektrianalyysi suoritettiin seuraavasti:

Kolonne: 3 % OV-17[®] GCQ:ssa (100-120 meshiä) (1,8288 m x 2 mm).

Ohjelma: $80-280^{\circ}\text{C}$, 8°C minuutissa.

Heliumin virtaus: 33 ml minuutissa.

Detektorin lämpötila: 277°C .

Injektorin lämpötila: 215°C .

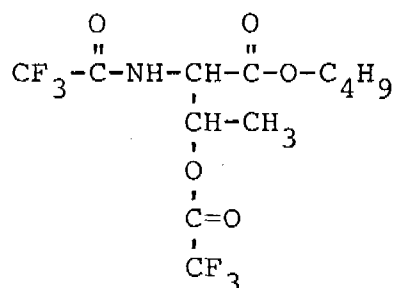
Piirturipaperin nopeus: 1/4 tuumaa (0,635 cm) minuutissa.

Laite: Varian CH-7 massaspektrometri.

β -alaniinin, DL-treoniinin, streptotrisiinin ja bleomysiinisulfaatin näytteet käsiteltiin täsmälleen samalla tavalla.

LL-BOL208 α :n ja - β :n happohydrolyysin avulla saatujen ja N-trifluoriasetyyli-n-butyylieistereinä ilmaistujen aminohappojen massaspektritutkimukset sisältävät seuraavaa:

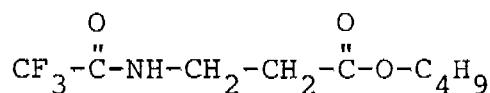
Treoniinijohdannaiset:



5

Retentioaika 4,4 minuuttia; G.C. intensiteetti 8,0
 volttia; laskettu molekyylipaino 367; G.C./M.S. LL-
 B01208/3:lle esitetty liitteiden kuviossa IX.

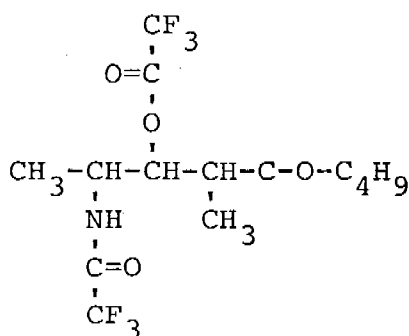
10 β -alaniinijohdannainen:



15 Retentioaika 6,3 minuuttia; G.C. intensiteetti 6,2
 volttia; laskettu molekyylipaino 241; G.C./M.S. LL-
 B01208/3:lle esitetty liitteiden kuviossa X.

4-amino-3-hydroksi-2-metyyllivaleriaanahappojohdan-
 nainen:

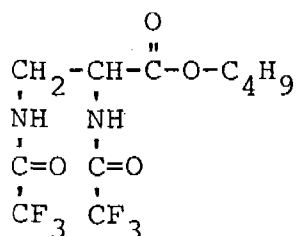
20



25

30 Retentioaika 7,6 minuuttia; G.C. intensiteetti 3,9
 volttia; laskettu molekyylipaino 395; G.C./M.S. LL-
 B01208/3:lle esitetty liitteiden kuviossa XI.

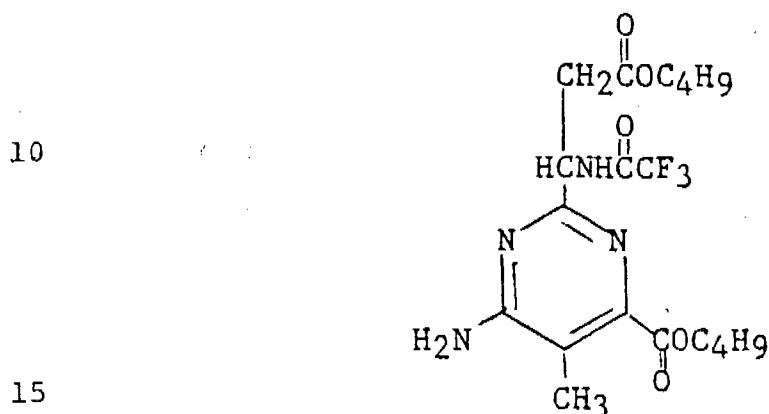
2,3-diaminopropionihappojohdannainen:



35

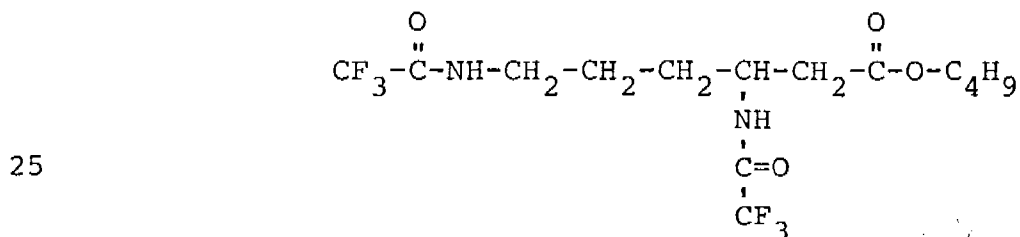
Retentioaika 9,4 minuuttia; G.C. intensiteetti yksi
voltti; laskettu molekyyllipaino 352; G.C./M.S. LL-
BO1208/3:lle esitetty liitteiden kuviossa XII.

5 β -amino- β -(4-amino-6-karboksi-5-metyylipyrinidi-
nyyli)propionihappojohdannainen:



Retentioaika 10 minuuttia; G.C. intensiteetti 6,6
volttia; laskettu molekyyllipaino 448.

20 Lisäksi LL-BO1208/3 sisältää β -lysiini johdannaisen:



Retentioaika 15,6 minuuttia; G.C. intensiteetti 8,1
volttia; laskettu molekyyllipaino 394; G.C./M.S. kuten on
30 esitetty liitteiden kuviossa XIII.

Patenttivaatimukset:

1. Antibiootti LL-B01208 α , t u n n e t t u siitä, että oleellisesti puhtaalla muodolla on seuraavat, mer-
 5 kittävät hiili-13 ydinmagneettisen resonanssispektrin kemialliset siirtymät miljoonasosina suhteessa tetrametyylisilaanin absorptioon:

	182,3	169,0	126,7	71,5	60,9	38,7
	178,8	166,6	119,1	70,4	60,2	37,9
10	178,6	165,9	113,4	69,6	58,3	34,2
	177,5	164,7	99,4	69,2	53,8	34,0
	173,3	159,2	98,6	68,5	48,7	24,4
	173,1	153,7	76,8	68,3	48,3	20,1
	172,7	149,4	75,6	66,0	43,9	16,0
15	170,4	138,2	74,8	62,2	41,4	13,1
	170,2	135,8	74,1	61,5	39,8	12,0

sekä sen farmaseuttisesti hyväksyttävät happoadditiosuolat.

20 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen antibiootti, t u n n e t t u siitä, että suurin piirtein puhtaalla muodolla on:

- a) optinen kiertokyky $[\alpha]_D^{25} +19$;
- b) seuraavat alkuaineanalyysin mukaiset määrät %:na:
- 25 C 43,18, H 5,47, N 15,47, S 3,39;
- c) luonteenomainen hiili-13 ydinmagneettinen resonanssispektri oleellisesti kuviossa V esitetyn spektrin kaltainen;
- d) hydrolyyysisaannot aminohappoja, joihin sisältyvät
- 30 treoniini, β -alaniini, 4-amino-3-hydroksi-2-metyylivaleriaanahappo, 2,3-diaminopropionihappo sekä β -amino- β -(4-amino-6-karboksi-5-metyylipyrimidin-2-yyli)propionihappo; sekä
- e) metanolyyysisaannot guloosia ja mannoosia.

35 3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen antibiootti, t u n n e t t u siitä, että oleellisesti puhtaan muodon luonteenomainen protonin magneettinen resonanssispektri on oleellisesti kuviossa VI esitetyn spektrin kaltainen.

4. Antibiootti LL-B01208 β , t u n n e t t u siitä, että oleellisesti puhtaalla muodolla on seuraavat, merkittävät hiili-13 ydinmagneettisen resonanssispektrin kemialliset siirtymät miljoonasosina suhteessa tetrametyy-

5 lisilaanin absorptioon:

	182,5	159,2	74,7	60,2	37,9
	178,8	153,7	74,2	58,3	34,2
	178,6	149,3	71,5	53,9	30,3
	177,5	138,2	70,4	49,6	24,5
10	173,5	135,9	69,6	48,6	24,1
	173,3	127,1	69,2	45,8	20,1
	173,1	119,1	68,5	43,8	16,0
	170,3	113,4	68,3	42,0	13,1
	169,0	99,4	66,0	41,4	12,0
15	166,6	98,6	62,2	40,3	
	165,9	76,7	61,5	39,8	
	164,6	75,6	60,9	38,7	

ja sen farmaseuttisesti hyväksyttävät, myrkyttömät suolat.

20 5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen antibiootti, t u n n e t t u siitä, että oleellisesti puhtaalla muodolla on:

a) optinen kiertokyky $[\alpha]_D^{25} +17 \pm 2$;

b) seuraavat alkuaineanalyysin mukaiset määrät %:na:

25 C 44,82, H 6,50, N 15,41, S 3,94;

c) luonteenomainen hiili-13 ydinmagneettinen resonanssispektri oleellisesti kuviossa III esitetyn kaltainen;

d) hydrolyysisaannot aminohappoja, joihin sisältyy treoniini, β -alaniini, 4-amino-3-hydroksi-2-metyylivalerianahappo, 2,3-diaminopropionihappo, β -lysiini sekä β -amino- β -(4-amino-6-karboksi-5-metyylipyrimidin-2-yyli)propionihappo; ja

e) metaneolyysin saannot glukoosi ja mannoosi,

35 6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen antibiootti, t u n n e t t u siitä, että oleellisesti puhtaan muodon infrapuna-absorptiospektri on oleellisesti kuviossa I esitetyn spektrin kaltainen, luonteenomainen ultraviolett-

spektri on oleellisesti kuviossa IV esitetyn spektrin kaltainen ja luonteenomainen protonin magneettinen resonanssispektri on oleellisesti, kuten kuviossa II on esitetty.

7. Menetelmä antibiootti LL-B01208 α :n, antibiootti
 5 LL-B01208 β :n tai niiden seosten valmistamiseksi, t u n -
 n e t t u siitä, että siihen sisältyy organismia Strepto-
 verticillium stramineumin tai sen mutanttien aerobinen
 käyminen nestemäisessä elatusaineessa, joka sisältää assi-
 miloituvia hiilen, typen tai epäorgaanisten suolojen läh-
 10 teitä, kunnes huomattava antibiootin aktiivisuus on muo-
 dostunut mainittuun elatusaineeseen ja sitten antibiootti
 otetaan siitä talteen.

8. Mikro-organismi Streptovercicillium stramineumin
 sp. nov. biologisesti puhdas viljelmä, jossa on NRRL 12292:n
 15 identifiointiominaisuudet, t u n n e t t u siitä, että
 mainittu viljelmä voi tuottaa eristettäviä määriä antibi-
 ootti LL-B01208 α :a ja LL-B01208 β :a käymisen avulla vesipi-
 toisessa elatusaineessa, joka sisältää assimiloituvia hii-
 len, typen sekä epäorgaanisten aineiden lähteitä.

9. Mikro-organismi Streptovercicillium stramineumin
 sp. nov. biologisesti puhdas viljelmä, jolla on NRRL 12292:n
 identifiointiominaisuudet, t u n n e t t u siitä, että
 mainittu viljelmä voi tuottaa antibiootti LL-B01208 α :a
 eristettäviä määriä käymisen avulla vesipitoisessa elatus-
 25 aineessa, joka sisältää assimiloituvia hiilen, typen ja
 epäorgaanisten aineiden lähteitä.

10. Mikro-organismi Streptovercicillium stramineum
 sp. nov. NRRL 12292:n puhdas viljelmä, t u n n e t t u
 siitä, että mainittu viljelmä voi tuottaa antibiootti LL-
 30 B01208 :a eristettäviä määriä vesipitoisessa elatusaines-
 sa suoritettavan käymisen avulla elatusaineen sisältäessä
 assimiloituvia hiilen, typen sekä epäorgaanisten aineiden
 lähteitä.

Patentkrav

1. Antibiotikum LL-B01208 α , k ä n n e t e c k -
n a t därav, att den väsentligen rena formen uppvisar
5 nedanstående tydliga nukleärmagnetiska kemiska skiftnin-
gar i resonansspektret för kol-13 i ppm i förhållande till
absorptionen av tetrametylsilan

	182,3	169,0	126,7	71,5	60,9	38,7
	178,8	166,6	119,1	70,4	60,2	37,9
10	178,6	165,9	113,4	69,6	58,3	34,2
	177,5	164,7	99,4	69,2	53,8	34,0
	173,3	159,2	98,6	68,5	48,7	24,4
	173,1	153,7	76,8	68,3	48,3	20,1
	172,7	149,4	75,6	66,0	43,9	16,0
15	170,4	138,2	74,8	62,2	41,4	13,1
	170,2	135,8	74,1	61,5	39,8	12,0

och de farmaceutiskt godtagbara syraadditionssalten därav.

2. Antibiotikum enligt patentkravet 1, k ä n n e -
20 t e c k n a t därav, att den väsentligen rena formen har

a) en optisk rotation $[\alpha]_D^{25}$ av +19;

b) en elementaranalys (i procent) av ca. C, 43,18;
H, 5,47; N, 15,48; S, 3,39;

c) ett karakteristiskt nukleärmagnetiskt resonans-
25 spektrum för kol-13 väsentligen såsom visats i figur V; och

d) vid hydrolys avger aminosyror, vilka inkluderar
treonin, β -alanin, 4-amino-3-hydroxi-2-metylvaleriansyra,
2,3-diaminopropionsyra, och β -amino- β -(4-amino-6-karboxi-
5-metylpyrimidin-2-yl)propionsyra; och

30 e) vid metanolys avger gulos och mannos.

3. Antibiotikum enligt patentkravet 2, k ä n -
n e t e c k n a t därav, att den väsentligen rena formen
har ett karakteristiskt protonmagnetiskt resonansspektrum
väsentligen såsom visats i fig. VI.

35 4. Antibiotikum LL-B01208 β , k ä n n e t e c k -
n a t därav, att den väsentligen rena formen uppvisar

nedanstående tydliga nukleärmagnetiska kemiska skiftningar i resonansspektrer för kol-13 i ppm i förhållande till absorptionen av tetrametylsilan

	182,5	159,2	74,7	60,2	37,9
5	178,8	153,7	74,2	58,3	34,2
	178,6	149,3	71,5	53,9	30,3
	177,5	138,2	70,4	49,6	24,5
	173,5	135,9	69,6	48,6	24,1
	173,3	127,1	69,2	45,8	20,1
10	173,1	119,1	68,5	43,8	16,0
	170,3	113,4	68,3	42,0	13,1
	169,0	99,4	66,0	41,4	12,0
	166,6	98,6	62,2	40,3	
	165,9	76,7	61,5	39,8	
15	164,6	75,6	60,9	38,7	

och de farmaceutiskt godtagbara, giftfria salten därav.

5. Antibiotikum enligt patentkravet 4, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att den väsentligen rena formen har
- 20 a) en optisk rotation $[\alpha]_D^{25}$ av $+17 \pm 2$;
b) en elementaranalys (i procent) av ca. C, 44,82;
H, 6,50; N, 15,41; S, 3,94;
c) ett karakteristiskt nukleärmagnetiskt resonans-
spektrum för kol-13 väsentligen såsom visats i fig. III; och
- 25 d) vid hydrolys avger aminosyror som inkluderar treo-
nin, β -alanin, 4-amino-3-hydroxi-2-metylvaleriansyra, 2,3-
diamino-propionsyra, β -lysin och β -amino- β -(4-amino-6-
karboxi-5-metylpyrimidin-2-yl)propionsyra; och
e) vid metanolys avger gulos och mannos.
- 30 6. Antibiotikum enligt patentkravet 5, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att den väsentligen rena formen har
ett karakteristiskt infrarött absorptionsspektrum väsentli-
gen såsom visats i fig. IV, och ett karakteristiskt proton-
magnetiskt resonansspektrum väsentligen såsom visats i
- 35 fig. II.

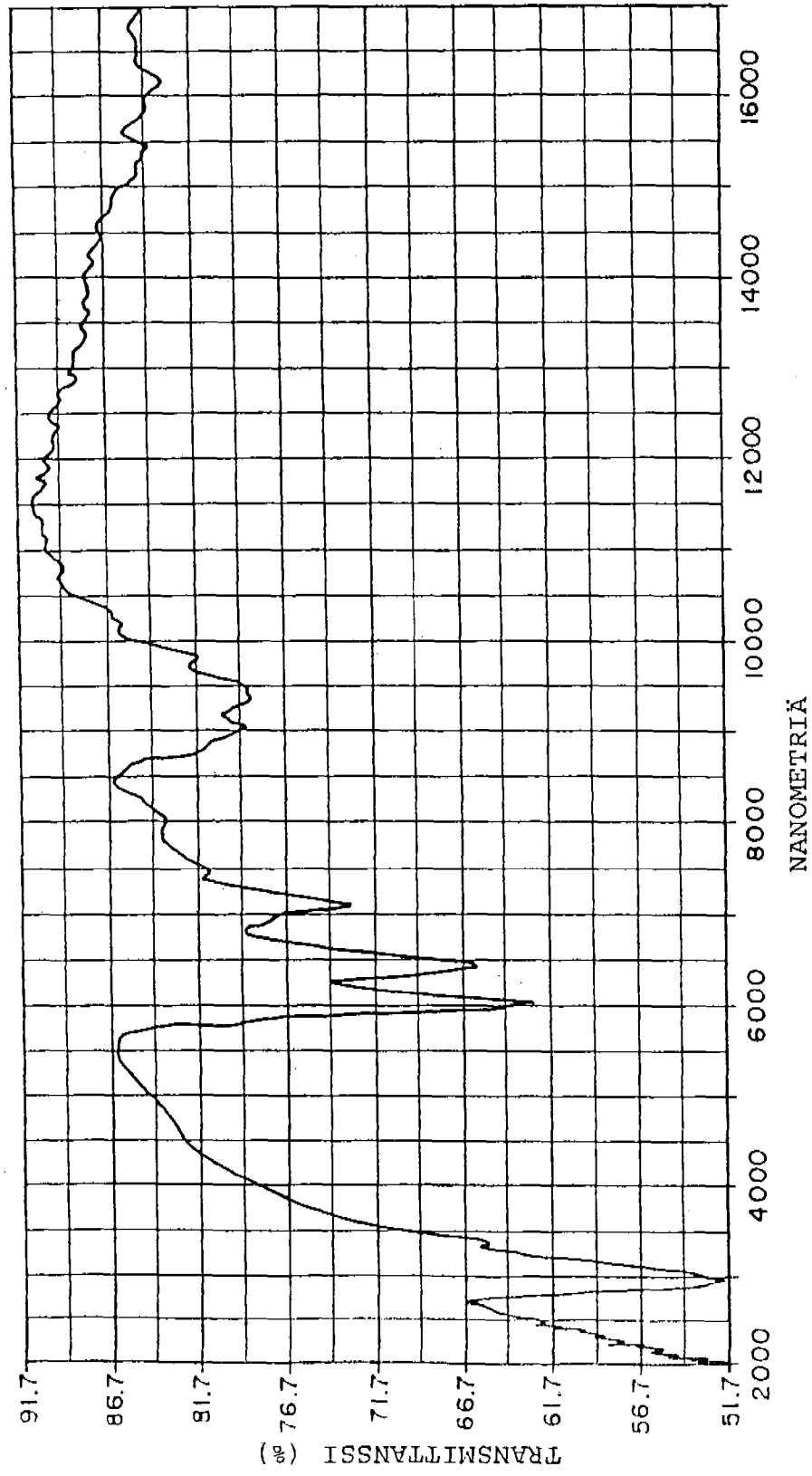
7. Förfarande för framställning av antibiotikum LL-B01208 α , antibiotikum LL-B01208 β eller blandningar därav, k ä n n e t e c k n a t därav, att det omfattar aerobisk fermentering av organismen Streptovercillium stramineum eller mutanter därav i ett vätskemedium, vilket innehåller assimilerbara källor för kol, kväve och oorganiska salt, tills väsentlig antibiotisk aktivitet förlänas det nämnda mediet, varefter antibiotikumet tillvaratages.

8. Biologiskt ren kultur av mikroorganismen Streptovercillium stramineum sp. nov. med identifieringskaraktistiken NRRL 12292, k ä n n e t e c k n a d därav, att den nämnda kulturen förmår producera antibiotika LL-B01208 α och LL-B01208 β i tillvaratagbara mängder vid fermentering i ett vattenhaltigt näringsmedium, vilket innehåller assimilerbara källor av kol, kväve och oorganiska substanser.

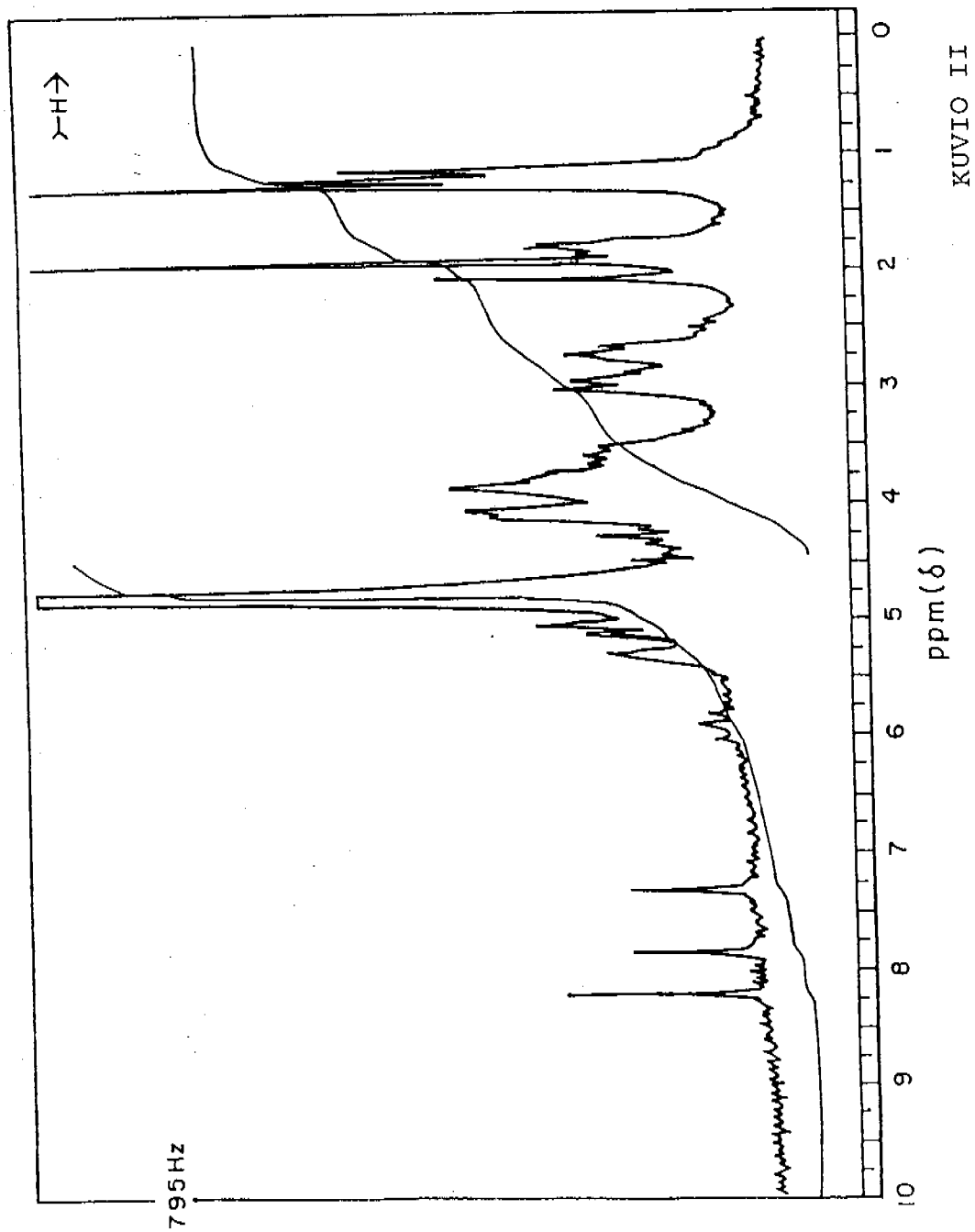
9. Biologiskt ren kultur av mikroorganismen Streptovercillium stramineum sp. nov. med identifieringskaraktistiken NRRL 12292, k ä n n e t e c k n a d därav, att den nämnda kulturen förmår producera antibiotikum LL-B01208 α i tillvaratagbara mängder vid fermentering i ett vattenhaltigt näringsmedium, vilket innehåller assimilerbara källor av kol, kväve och oorganiska substanser.

10. Biologiskt ren kultur av mikroorganismen Streptovercillium stramineum sp. nov. NRRL 12292, k ä n n e t e c k n a d därav, att den nämnda kulturen förmår producera antibiotikum LL-B01208 β i tillvaratagbara mängder vid fermentering i ett vattenhaltigt näringsmedium, vilket innehåller assimilerbara källor av kol, kväve och oorganiska substanser.

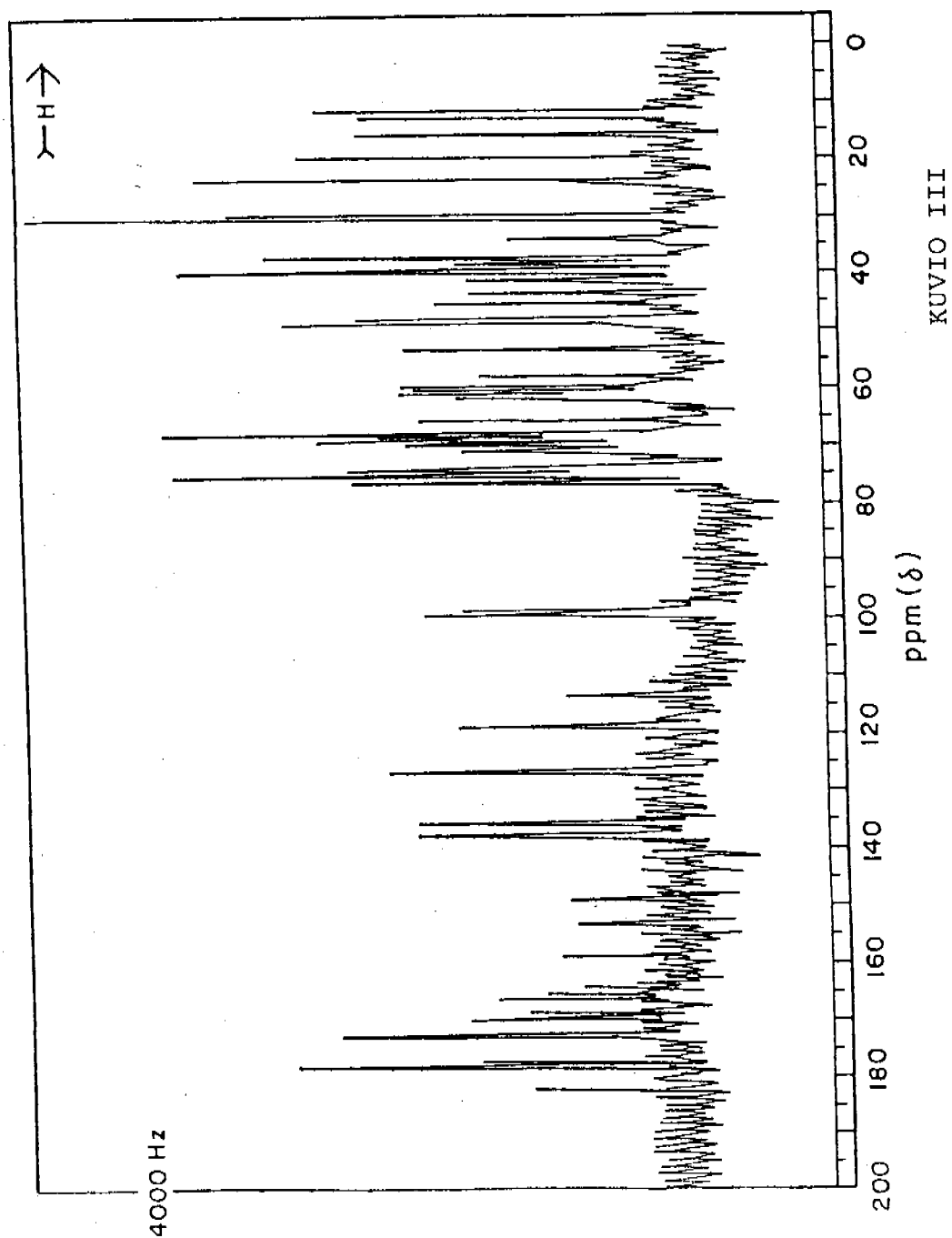
IR-SPEKTRI
LL-B01208β



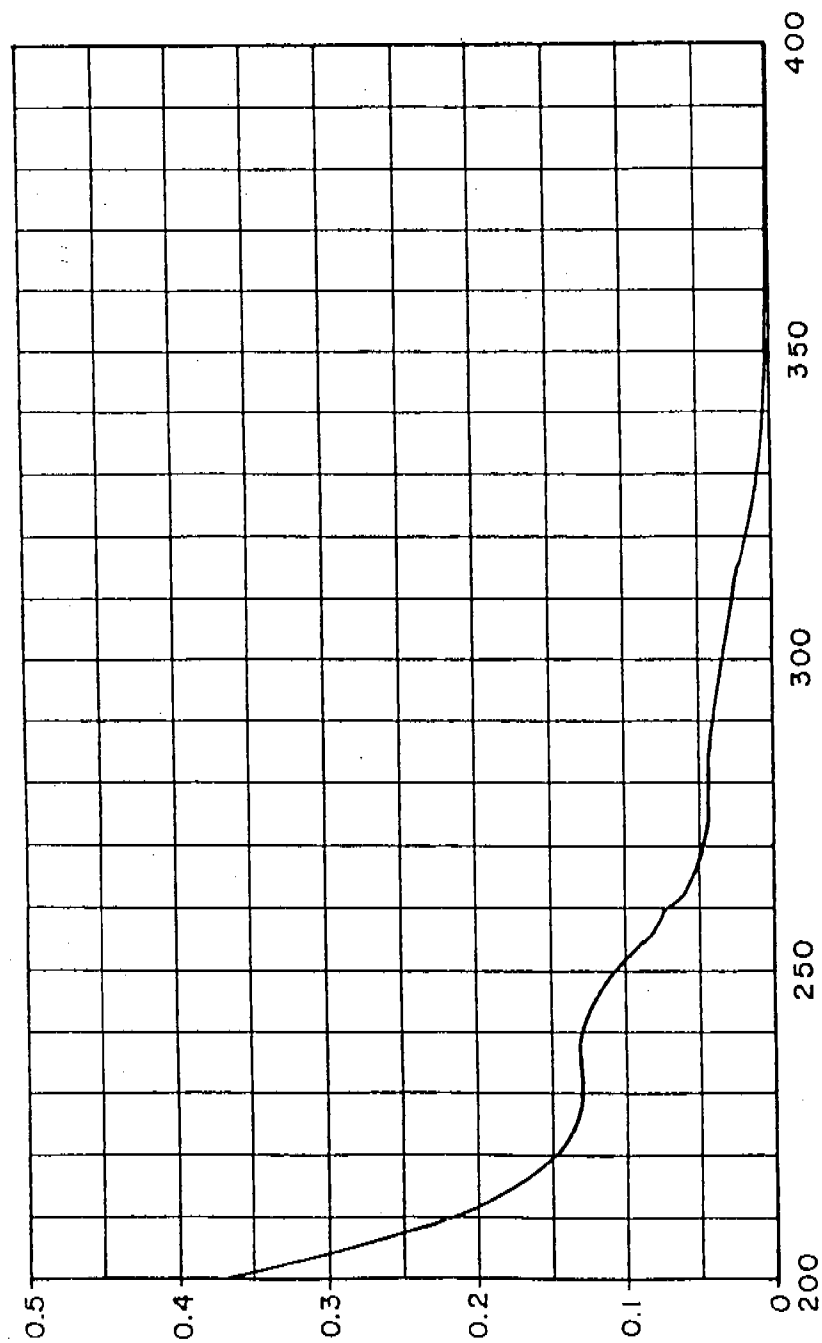
PMR-SPEKTRI
LL-B01208 B



C^{13} -NMR-SPEKTRI
LL-B01208B

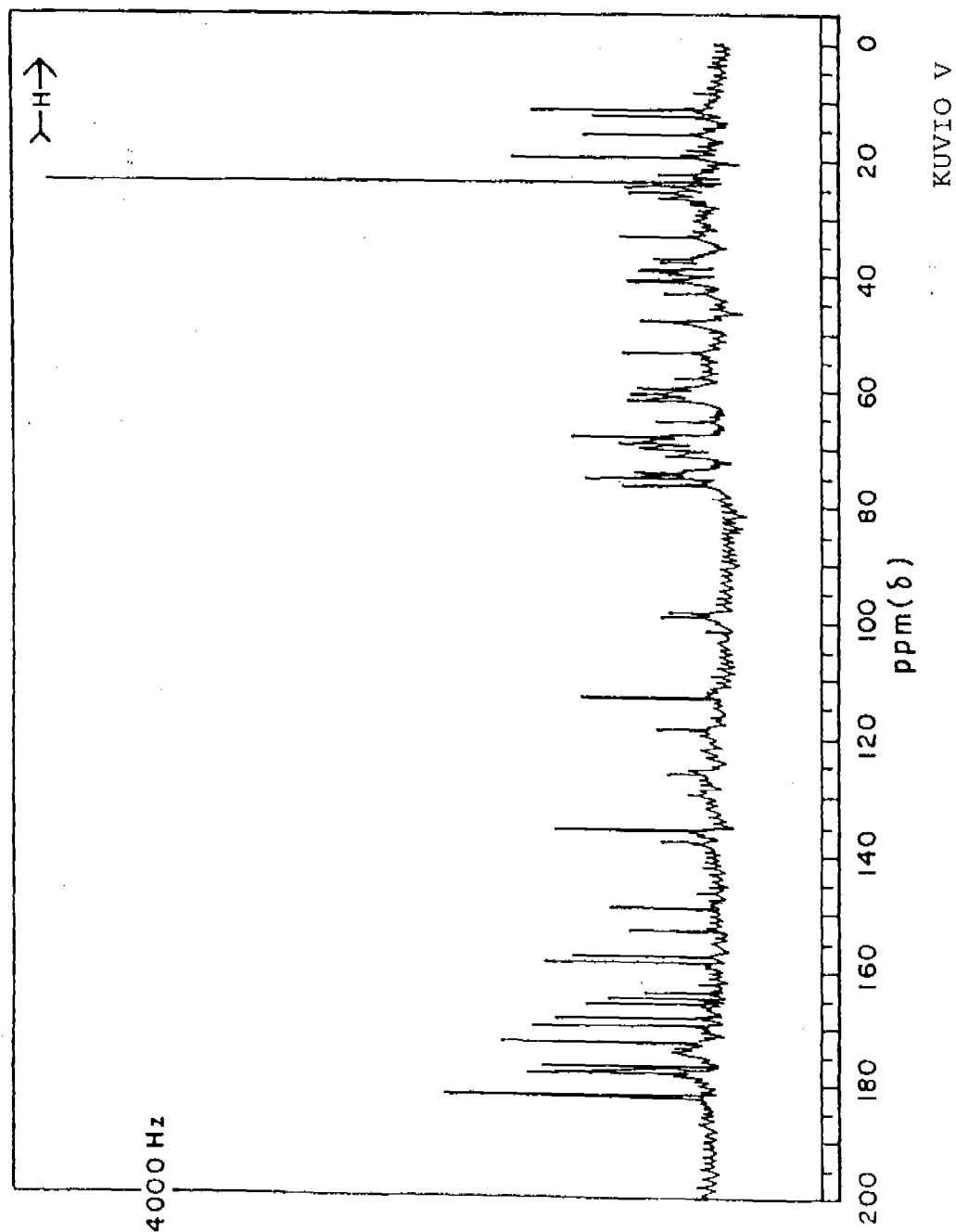


UV-SPEKTRI
LL-B01208 B

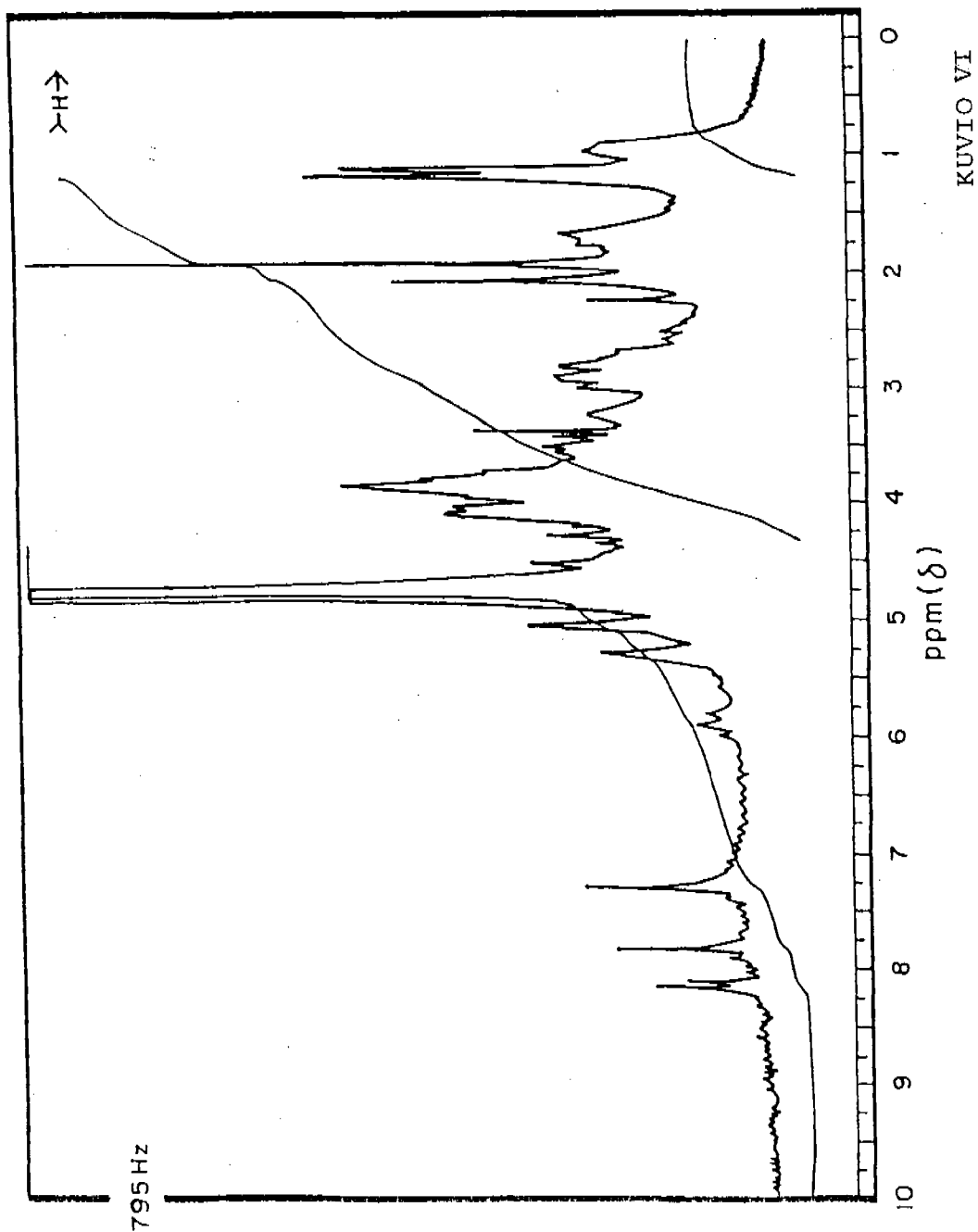


KUVIO IV

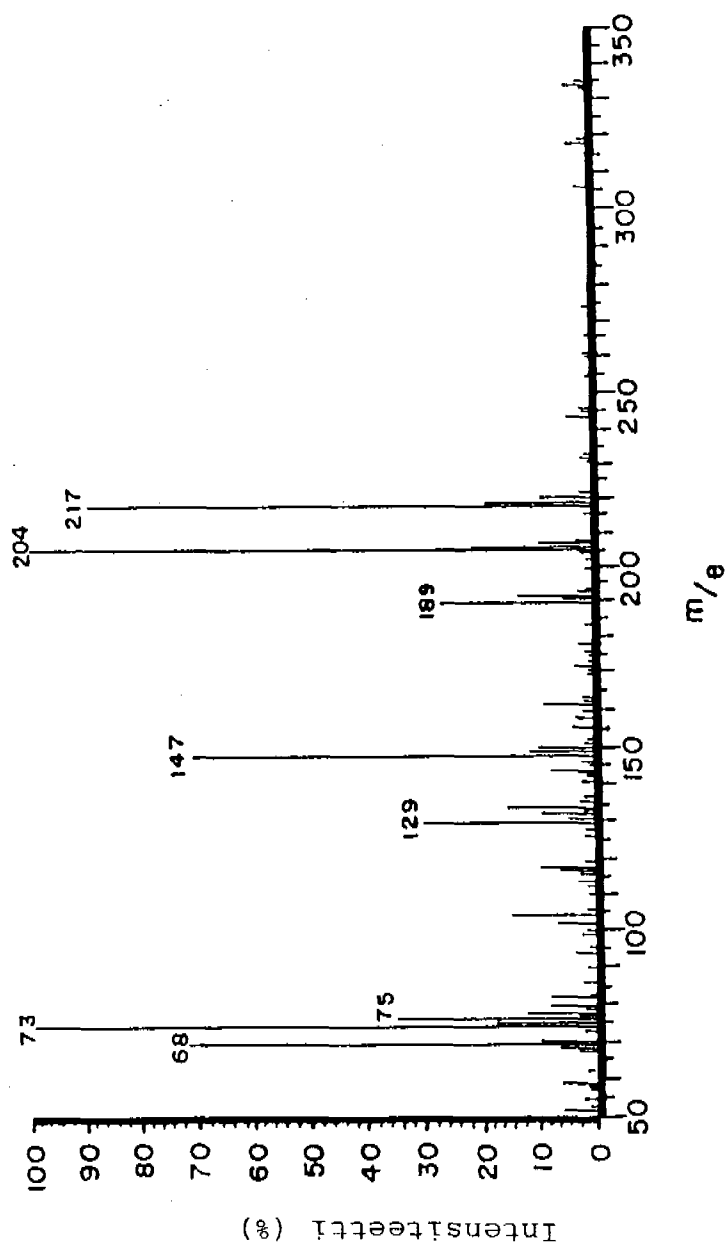
C^{13} -NMR-SPEKTRI
LL-B01208 α



PRM-SPEKTRI
LL-B01208 α

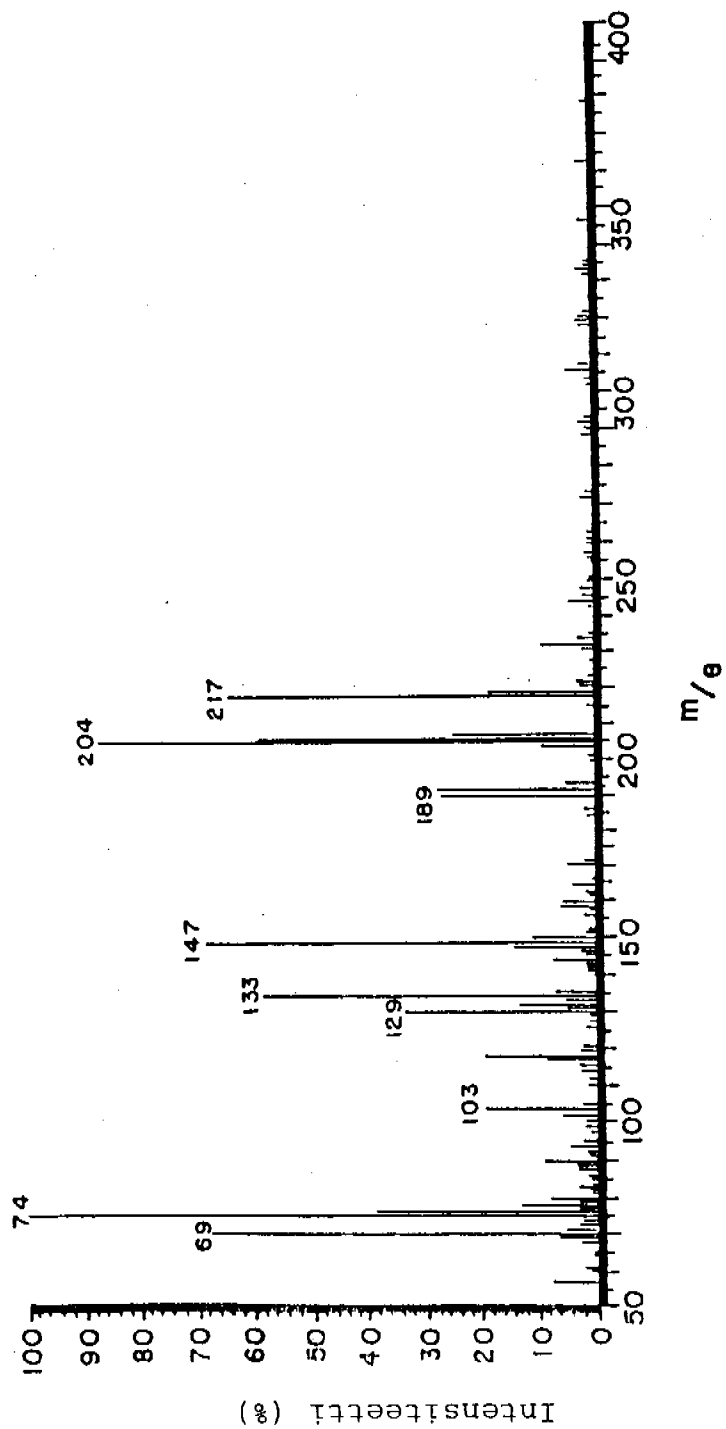


LL-B01208B silyloitu meryylyglykosidi
Glukoosijohdannainen



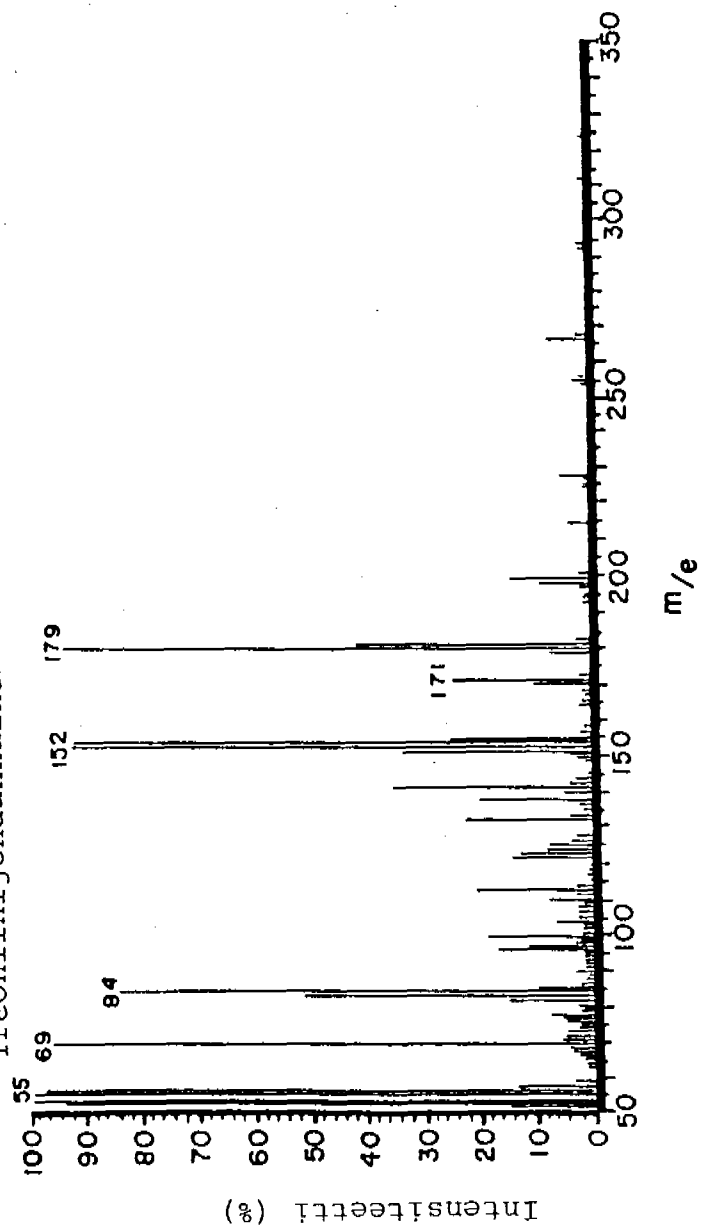
KUVIO VII

LL-801208 β silyloitu metyyli glykosidi
Mannoosijohdannainen



KUVIO VIII

LL-B01208/3:n happamesta hydrolyysistä
 saatujen aminohappojen N-trifluoriasetyyli-n-butyyliesteri
 Treoniini johdannainen



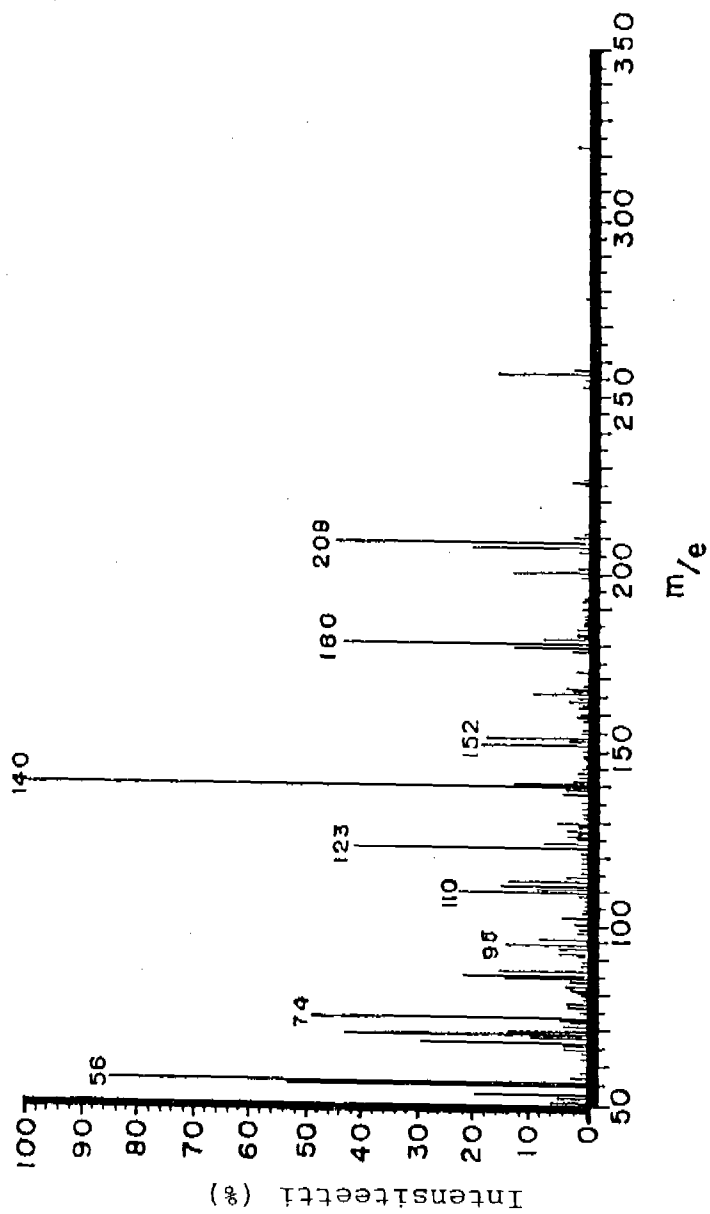
KUVIO IX

LL-B012083:n happamasta hydrolyysistä saatujen
 aminohappojen N-trifluoriasetyyli-n-butyyliesteri
 β-alaniini johdannainen



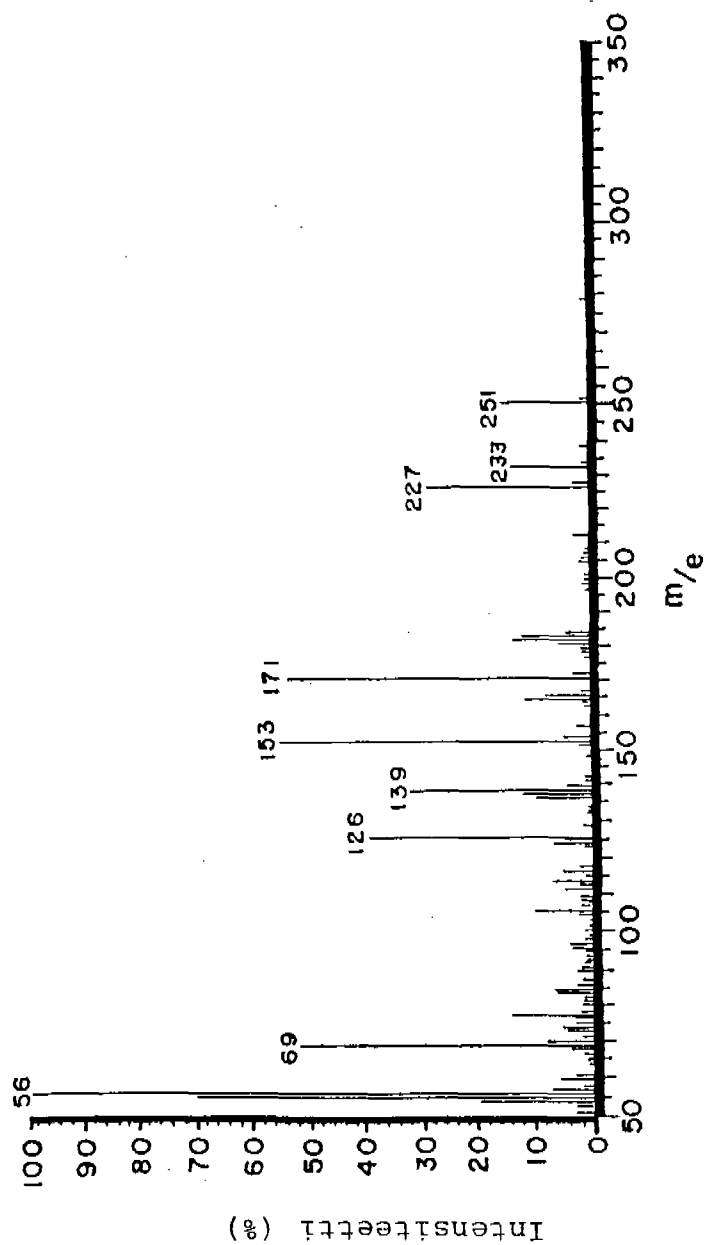
KUVIO X

LL-B01208/2:n happamesta hydrolyysistä saatujen
 aminohappojen N-trifluoriasetyyli-n-butyyliesteri
 4-amino-3-hydroksi-2-metyylivaleriaanahappojohdannainen



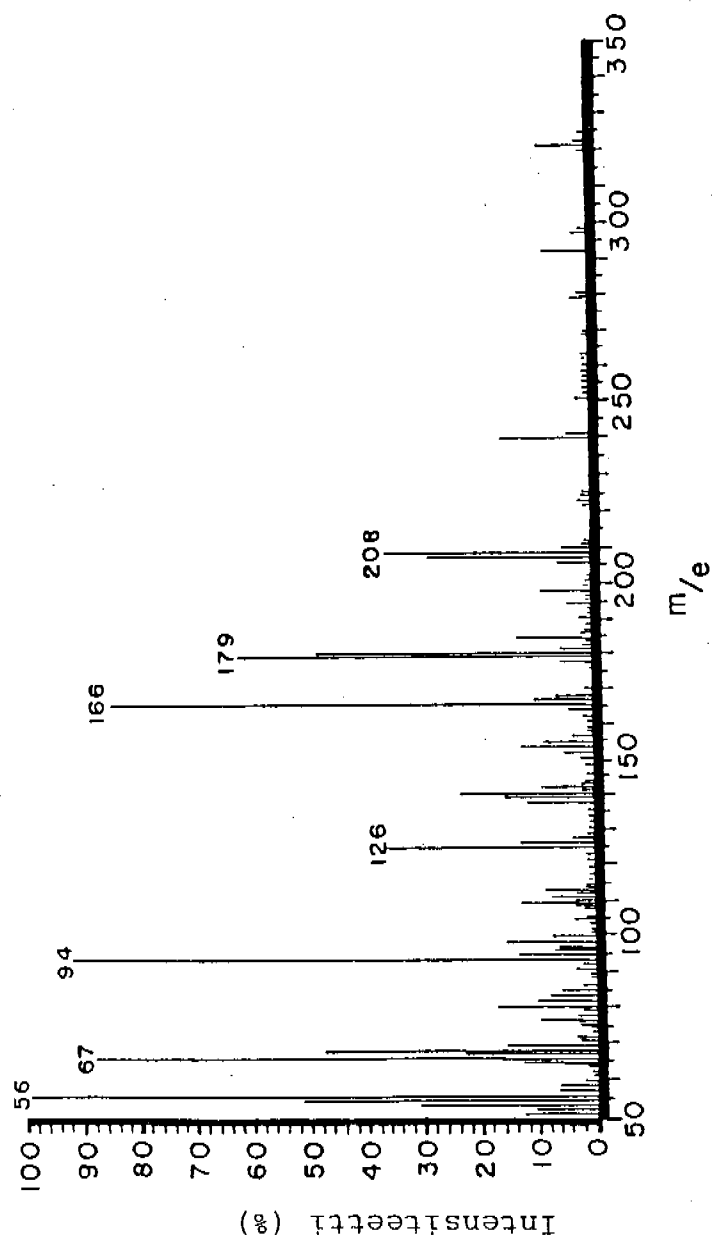
KUVIO XI

LL-B012080:n happamesta hydrolyysistä saatujen
aminohappojen N-trifluoriasetyyli-n-butyyliesteri
2,3-diaminopropionihappojohdannainen



KUVIO XII

LL-B01208/3:n happamesta hydrolyysistä saatujen
aminohappojen N-trifluoriasetyyli-n-butyyliesteri
β-lysiini johdannainen



KUVIO XIII