

(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **150488 B**



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: **2872/78**

(51) Int.Cl.⁴: **C 07 D 498/04**

(22) Indleveringsdag: **26 jun 1978**

(24) Løbedag: **18 apr 1975**

(41) Alm. tilgængelig: **26 jun 1978**

(44) Fremlagt: **09 mar 1987**

(86) International ansøgning nr.: -

(62) Stamansøgning nr.: **1672/75**

(30) Prioritet: **20 apr 1974 GB 17410/74** **21 jun 1974 GB 27715/74** **09 okt 1974 GB 43651/74**
11 dec 1974 GB 53525/74

(71) Ansøger: ***BEECHAM GROUP LIMITED; Beecham House, Great West Road, Brentford, Middlesex, GB.**

(72) Opfinder: **Martin *Cole; GB, Thomas Trefor *Howarth; GB, Christopher *Reading; GB.**

(74) Fuldmægtig: **Plougmann & Vingtoft Patentbureau**

(54) **Fremgangsmåde til isolering af et clavulansyre-salt**

DA 150488 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til isolering af et clavulansyresalt, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at en ved dyrkning vundet uren opløsning af et clavulansyresalt bringes i kontakt med et anionbyttermateriale derfor, hvorefter det ønskede salt af clavulansyre elueres derfra med en vandig opløsning af en tilsvarende elektrolyt, hvorefter overskydende elektrolyt fjernes ved afsaltning. Det er et foretrukket aspekt af opfindelsen, at den urene opløsning er vundet ved dyrkning af en stamme af *Streptomyces clavuligerus*.

Streptomyces clavuligerus er detaljeret beskrevet af Higgins et al., Int. J. Systematic Bacteriology, 21, 326 (1971). Denne streptomycet havde interesse, idet den producerede visse β -lactam-antibiotika

såsom penicillin N, 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-3-carbamoyloxy-methyl-3-cephem-4-carboxylsyre og 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-3-carbamoyloxymethyl-7-methoxy-3-cephem-4-carboxylsyre.

Denne streptomycet er deponeret i Agricultural Research Service Collection under nummer NRRL 3585 og i American Type Culture Collection under nummer ATCC 27064. *Streptomyces clavuligerus* er også omtalt i USA patentskrift nr. 3.770.590 og af Nagarajan et al., J. Amer. Chem. Soc., 93, 2308 (1971), Brannon et al., Antimicrob. Agents Chemother., 1, 237 (1972) og Antimicrob. Agents Chemother. 1, 247 (1972) og Higgins et al., J. Antibiotics, 27, 298 (1974).

β -Lactamaser er enzymer, som åbner β -lactamringen i penicilliner og cephalosporiner, hvorved der fås produkter, som er uden antibakteriel virkning. Disse enzymer produceres af mange bakterier, navnlig af arter eller stammer af *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* og *Staphylococcus*, og er i mange tilfælde forklaringen på resistensen hos visse stammer af sådanne organismer mod nogle penicilliner og cephalosporiner.

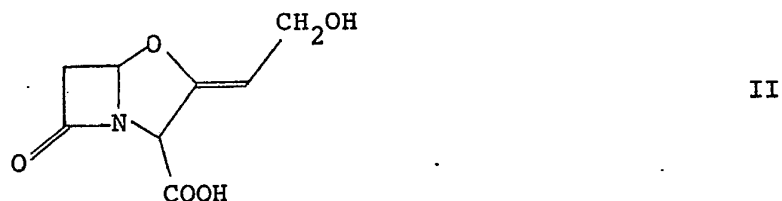
Eksempler på anvendelsen af visse β -lactamase-resistente semi-syntetiske penicilliner og cephalosporiner er β -lactamase-inhibitorer; og synergister for penicilliner og cephalosporiner er tidligere beskrevet i litteraturen, jfr. f.eks. Sutherland et al., Nature, 201 868 (1964); Sabath et al., Nature, 204, 1066 (1964) og O'Callaghan et al., Antimicrob. Agents and Chemotherapy, 1968, 67 (1969). Imidlertid har ingen af de kendte midler voldsom virkning på spektret af de andre antibiotika, som forekommer i blandingen.

Visse actinomycetkulturer er blevet beskrevet som producerende β -lactamase-inhiberende stoffer, som virker synergistisk med penicilliner eller cephalosporiner, f.eks. sådanne kulturer, som er beskrevet i britisk patentskrift nr. 1.363.075, og sådanne, som er beskrevet af Hata et al., J. Antibiotics, 25, 473 (1972) og Umezawa et al., J. Antibiotics, 26, 51 (1973). Ingen af disse β -lactamase-inhibitorer af actinomycetal oprindelse har hidtil været fundet anvendelige i klinikken. Særlig bemærkelsesværdige træk, som adskiller clavulansyre fra andre β -lactamase-inhibitorer af actinomycetal oprindelse, er dens ekstraherbarhed i organiske opløsningsmidler fra kulturfiltrat med pH-værdi 2, dens store stabilitet i menneskeblod og dens bredspektrede antibakterielle og β -lactamase-inhiberende

virksomhed, dens lave molekylvægt og dens høje R_f -værdier ved papirchromatografi under anvendelse af forskellige opløsningsmiddelsystemer.

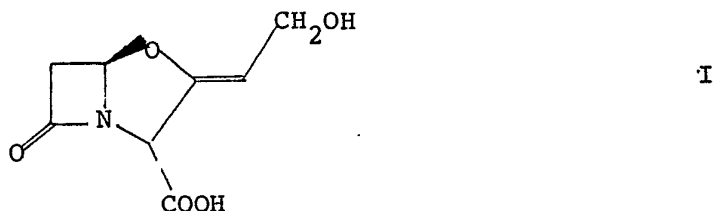
Det har nu vist sig, at den aerobiske dyrkning af *Streptomyces clavuligerus* i sædvanligt næringsmedium ved ca. 25 - 30°C under stort set neutrale betingelser fremkalder et β -lactamase-inhiberende stof, som også har antibakteriel virkning. Dette hidtil ukendte stof kaldes "clavulansyre", og fremstillingen af clavulansyre og salte og estere deraf er beskrevet detaljeret i dansk patent nr. 141.254.

Den forbindelse, som produceres af *Streptomyces clavuligerus*, og som har de ovenfor anførte egenskaber, har formelen II



Clavulansyre kan således benævnes 3-(β -hydroxyethyliden)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo[3,2,0]heptan-2-carboxylsyre.

Stereokemien ved carbonatomerne 5 og 2 i clavulansyren er den samme, som findes hos naturligt forekommende penicilliner og cephalosporiner, således at clavulansyre kan illustreres med strukturformlen I

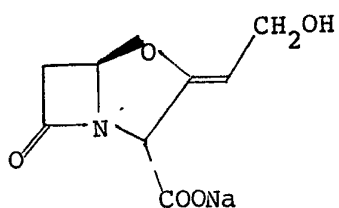


Således er et mere fyldestgørende kemisk navn for clavulansyre Z-(2R,5R)-3-(β -hydroxyethyliden)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo[3,2,0]heptan-2-carboxylsyre.

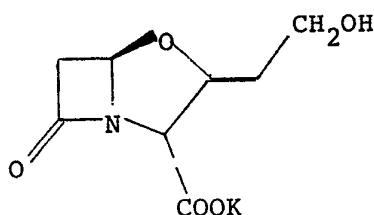
Clavulansyres store nytte kan let forstås, når man indser, at visse stammer af *Klebsiella aerogenes* A, hvis vækst ikke inhiberes ved tilstedeværelse af 125 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin, amoxycillin, carbenicillin eller benzylpenicillin eller ved tilstedeværelse af 10 $\mu\text{g/ml}$ clavulansyre, inhiberes ved tilstedeværelse af mindre end 12,5 $\mu\text{g/ml}$ af de ovenfor anførte penicilliner, når der også forekommer 5 $\mu\text{g/ml}$ clavulansyre. Lignende resultater er iagttaget for kombinationer indeholdende forskellige estere af clavulansyre. F.eks. inhiberes stammer af *Klebsiella aerogenes* A, hvis vækst ikke inhiberes af 125 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin eller af 10 $\mu\text{g/ml}$ clavulansyre-methylester, af mindre end 12,5 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin i nærværelse af 5 $\mu\text{g/ml}$ clavulansyre-methylester. Det har også vist sig, at stammer af *Staphylococcus aureus* Russell, hvis vækst ikke inhiberes ved tilstedeværelse af 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin eller af 5 $\mu\text{g/ml}$ clavulansyre, inhiberes ved tilstedeværelse af mindre end 10 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin i nærværelse af 1 $\mu\text{g/ml}$ clavulansyre. Ved forsøg på hunmus har det vist sig, at blod- og vævsniveauer af clavulansyre på betydelig mere end 5 $\mu\text{g/ml}$ let kan nås ved subcutan administration af 100 mg/kg af natriumsaltet af clavulansyre, og at værdifulde niveauer af clavulansyre kan nås efter oral administration af 100 mg/kg af natriumsaltet af clavulansyre.

Særlig velegnede salte af clavulansyre er farmaceutisk tolerable salte såsom natrium-, kalium-, calcium-, magnesium-, aluminium-, ammonium- og substituerede ammoniumsalte såsom trimethylammonium-, benzathin-, procain- og lignende salte, som sædvanligvis dannes med penicilliner eller cephalosporiner. Ikke-farmaceutisk tolerable salte af clavulansyre er også interessante, da de er værdifulde mellemprodukter ved fremstillingen af estere af clavulansyre, f.eks. kan således lithium- eller sølvsalte af clavulansyre omsættes med benzylbromid til dannelselse af den værdifulde benzylester af clavulansyre.

Salte af clavulansyre synes at være mere stabile end selve syren, og fremgangsmåden ifølge opfindelsen angår isoleringen af disse. Særlig velegnede salte af clavulansyre er natrium- og kaliumsaltene, som har de nedenstående formler III og IV



III



IV

krystallinske former af sådanne salte kan indeholde hydratvand.

Clavulansyre og dens salte er desuden værdifulde mellemprodukter ved fremstilling af antibakterielt virksomme estere som beskrevet i dansk patentskrift nr. 141.254.

Egnede estere af clavulansyre er sådanne, som rent teoretisk er afledt af alkoholer såsom methanol, ethanol, propanol, butanol, 2,2,2-trichlorethanol, 2,2,2-trifluorethanol, benzylalkohol, p-nitrobenzylalkohol, phenol, acetoxymethanol, pivaloyloxymethanol og 2-dimethylaminoethanol.

Som tidligere anført har clavulansyre og salte og estere deraf værdifulde terapeutiske egenskaber. Der kan derfor fremstilles et farmaceutisk præparat, som indeholder clavulansyre eller et salt eller en ester deraf sammen med et farmaceutisk tolerabelt bærestof.

Sådanne præparater foreligger i en form, som er egnet til oral, topisk eller parenteral anvendelse, og de kan anvendes til behandlingen af infektioner hos pattedyr, herunder mennesker.

Injicerbare eller infunderbare præparater af clavulansyre eller salte deraf er særlig velegnede, da høje vævsniveauer af forbindelsen af clavulansyre kan optræde efter administration ved injektion eller infusion. Et foretrukket præparat indeholder clavulansyre eller et salt deraf i steril form.

Enhedsdosispræparater indeholdende clavulansyre eller et salt eller en ester deraf og bearbejdet til oral administration er særlig velegnede.

Under visse betingelser kan effektiviteten af orale præparater af clavulansyre og salte og estere deraf forbedres, hvis sådanne præparater indeholder et pufferstof eller et enterisk overtræksmiddel, således at de omhandlede forbindelser ikke har forlænget kontakt med stærkt sur

mavesaft. Sådanne pufrede eller enterisk overtrukne præparater kan fremstilles i overensstemmelse med sædvanlig farmaceutisk praksis.

Clavulansyren eller salte eller estere deraf kan forekomme i præparatet som eneste terapeutiske middel eller kan forekomme sammen med andre terapeutiske midler såsom et β -lactam-antibiotikum som beskrevet i dansk patentskrift nr. 141.254.

Den urene opløsning af et clavulansyresalt, der anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er fortrinsvis en opløsning, der er fundet ved dyrkning af *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064.

I nærværende beskrivelse betegner udtrykket "dyrkning" den bevidste aerobe vækst af en clavulansyre-producerende organisme i nærværelse af assimilerbare kilder til carbon, nitrogen og mineralsalte. En sådan aerob vækst kan finde sted i et fast eller halvfast næringsmedium eller i et flydende medium, hvor næringsstofferne er opløst eller suspenderet. Dyrkningen kan finde sted på en aerob overflade eller ved submers kultur. Næringsmediet kan være sammensat af complexe næringsstoffer eller kan være kemisk defineret. Vi har fundet medier indeholdende complexe næringsstoffer såsom gærekstrakt eller sojabønne- og særlig velegnede.

Næringsmediet, som kan anvendes til dyrkning af *Streptomyces clavuligerus*, kan indeholde 0,1 - 10% complex organisk nitrogenkilde såsom gærekstrakt, majsstøbevand, vegetabilsk protein, frøprotein, hydrolysater af sådanne proteiner, mælkeproteinhydrolysater, fiske- og kødekstrakter og hydrolysater såsom peptoner. Alternativt kan der anvendes kemisk veldefinerede nitrogenkilder såsom urinstof, amider, enkelte eller blandinger af almindelige aminosyrer såsom valin, asparagin, glutamsyre, prolin og phenylalanin. Carbonhydrater (0,1 - 5%) kan forekomme i næringsmediet, men glucose er i visse medier uønsket, da den har en negativ effekt på udbyttet af den ønskede clavulansyre. Stivelse eller stivelsehydrolysater såsom dextrin, saccharose, lactose eller andre sukkerarter eller glycerol eller glycerolestere kan også anvendes. Carbonkilden kan også være afledt af vegetabiliske olier eller animalske fedtstoffer. Carboxylsyrer og salte deraf kan anvendes som carbonkilde til vækst og produktion af β -lactamase-inhibitorer. Et særlig velegnet, billigt medium er et medium indeholdende sojabønne- ("Arkasoy") plus tørret maltdestillationsvæske ("Scotasol") plus dextrin.

Det kan være nødvendigt at tilsætte antiskummidler såsom "Pluronic L81" for at regulere skumdannelse i visse medier i fermenteringsbeholdere.

Mineralsalte såsom NaCl, KCl, MgCl₂, ZnCl₂, FeCl₃, Na₂SO₄, FeSO₄, MgSO₄ og Na⁺- eller K⁺-salte af phosphorsyre kan sættes til det ovenfor beskrevne medium, især hvis dette er kemisk defineret; CaCO₃ kan tilsættes som en kilde til Ca⁺⁺-ioner eller på grund af sin puffervirkning. Salte af sporgrundstoffer såsom nikkel, cobalt eller mangan kan også tilsættes. Om ønsket kan der tilsættes vitaminer.

Dyrkning af *Streptomyces clavuligerus* finder normalt sted i et temperaturområde på 15 - 40°C, sædvanligvis 20 - 35°C og fortrinsvis 25 - 30°C, og ved en pH-værdi mellem 5 og 8,5, fortrinsvis mellem 6 og 7,5.

Streptomyces clavuligerus kan dyrkes i de ovenfor anførte medier i koniske glaskolber, som luftes ved rystning på et roterende rysteapparat, eller i med preplader forsynede rustfri stålfermenteringsbeholdere, som omrøres med en vingeskiverotor og luftes med et luftindblæsningshoved. Fermenteringen kan også udføres på kontinuerlig måde.

Udgangs-pH-værdien ved fermentationen ligger typisk ved 7,0, og et maksimumudbytte af clavulansyre fås i løbet af 2 - 10 dage ved 20 - 35°C. I en omrørt rustfri stålfermenteringsbeholder under anvendelse af "Arkasoy"/"Scotasol"/"Dextrin"-mediet, som ovenfor anført, er den foretrukne temperatur 26°C, og spidsudbytter af clavulansyre fås i løbet af 5 dage.

Clavulansyre kan ekstraheres fra kulturfiltratet på forskellig måde. Ifølge opfindelsen anvendes en metode, der er baseret på den anioniske natur af metaboliten, ved anvendelse af et anionbyttermateriale. Cellerne af *Streptomyces clavuligerus* fjernes normalt først fra fermenteringsbeholderen ved filtrering eller centrifugering, før isoleringen påbegyndes.

Ved anionbytterharpiksprocessen kan det klarede kulturfiltrat percoleres ved en omtrentlig neutral eller let sur pH-værdi, f.eks. ved pH-værdi 6 - 7, ned over en søjle af en svag eller stærk baseanionbytterharpiks, f.eks. "Amberlite IR 4B" eller "Zerolite FFIP", indtil harpiksen er mættet, og det β -lactamase-inhiberende stof trænger ud fra bunden. Søjlen vaskes derefter med vand og elueres med en vandig opløsning af den til det ønskede salt svarende elektrolyt. Ifølge opfindelsen foretrækkes det, at elektrolyten er natriumchlorid. De β -lactamase-inhiberende fraktioner kan opsamles, sammenhældes, afsaltes og frysetørres, hvorved der fås et råt, fast salt af clavulansyre.

"Amberlite IR 4B" er et eksempel på en svagt basisk anionbytterharpiks med polyamin-aktive grupper og tværbundet polystyren-divinylbenzen-matrix. "Zerolite FFIP" er en stærk basisk anionbytterharpiks med kvaternære ammonium-aktive grupper og en tværbundet polyvinyl-divinylbenzen-matrix. Harpikser, som er i lighed med "Zerolite FFIP", er "Isopor FFIP" og "DeAcidite FFIP SRA.64". Disse harpikser markedsføres af BDH Chemicals Limited, Poole, Dorset, Storbritannien.

Det foretrækkes ifølge opfindelsen, at anionbyttermaterialet er en stærk baseanionbytterharpiks. Et andet foretrukket aspekt af opfindelsen går ud på, at anionbyttermaterialet er en svag baseanionbytterharpiks.

Yderligere rensning af de rå faste stoffer, som er fremstillet på den ovenfor beskrevne måde, kan udføres på mange forskellige måder, men ionbytnings-søjlechromatografi er særlig velegnet, især når der anvendes "Isopor", "DeAcidite FFIP SRA64" eller DEAE-cellulose. "DeAcidite"-søjlen kan gradienteluers med en vandig opløsning af et salt såsom natriumchlorid (0 - 0,5M). Søjlen af DEAE-cellulose i 0,01N phosphatpuffer med pH-værdi 7 kan elueres med en saltopløsning, normalt en NaCl-opløsning (0 - 0,2M NaCl i 0,01M phosphatpuffer, pH-værdi 7). Aktive fraktioner kan påvises ved deres β -lactamase-inhiberende virkning og deres antibakterielle virkning mod *Klebsiella aerogenes* ved et agar-diffusionsforsøg. Fraktionerne med denne aktivitet kan derefter sammenhældes og inddamres til et lille rumfang under vakuum. Dette råpræparat af clavulansyresaltet kan afsaltes ved percolering over en søjle med "Bio Gel P2". ("Bio Gel P2" er et eksempel på en stærkt lipofil harpiks, på hvilken organiske

stoffer kan adsorberes, men som ikke tilbageholder uorganiske salte. "Bio Gel P2" er en polyacrylamidgel, som markedsføres af Bio Rad, 32nd and Griffen Avenue, Richmond, Ca 94804, U.S.A.). Det aktive af-saltede materiale kan derefter inddampes, blandes med ethanol og chromatograferes yderligere på en cellulosesøjle, hvor der som opløsningsmiddel anvendes butanol/ethanol/vand i v/v-vorholdet 4/1/5 topfase.

Fraktioner indeholdende materiale, som inhiberer *Escherichia coli*- β -lactamase, kan sammenhældes, inddampes til tørhed under vakuum, genopløses i vand og frysetørres, hvorved der fås et salt af clavulansyre i form af et hvidt fast stof.

De metoder, som har vist sig mest anvendelige til påvisning af clavulansyre i kulturfiltrater, er papirchromatografi og et bioautografisk påvisningssystem. Clavulansyre kan påvises ved at gøre brug af dens β -lactamase-inhiberende virkning. Tyndtlagschromatografi kan anvendes til at påvise clavulansyre i faste præparater.

Disse påvisnings- og undersøgelsesteknikker beskrives nedenfor.

Clavulansyren eller et salt deraf kan omdannes til en ester ved esterificeringsreaktioner, som nedenfor beskrives. Den foretrukne metode til fremstilling af den ønskede ester af clavulansyre er omsætning af et salt af clavulansyre med et esterificeringsmiddel, f.eks. et reaktivt halogenid eller en sulfonatester. Sådanne reaktioner udføres hyppigt i et organisk opløsningsmiddel med høj dielektricitetskonstant, f.eks. dimethylformamid, dimethylformamid/acetone, dimethylsulfoxid, N-methylacetamid eller hexamethylphosphoramid.

Om ønsket kan saltet af clavulansyre opløses i opløsningsmidler på sædvanlig måde, eller det kan bindes til et polymerbærestof. Egnede bærestoffer til anvendelse ved denne fremgangsmåde er stærke baseanionbytterharpikser, især sådanne, som har en makroretikulær natur, som tillader anvendelsen af ikke-vandige opløsningsmidelsystemer. Det har vist sig, at "Amerblyst A26" er anvendelig til dette formål. Clavulansyresaltet kan adsorberes på harpiksen fra kulturfiltratet, og harpiksen kan derefter suspenderes i dimethylformamid indeholdende natriumiodid, eller det kan elueres fra en søjle med en opløsning af natriumiodid i dimethylformamid eller i en blanding af dimethylformamid og acetone.

Den ester, som fås ved ovennævnte fremgangsmåde, er sædvanligvis af acceptabel renhed, men materialet kan, om ønsket, genchromatografes.

Egnede metoder til esterdannelse omfatter omsætning af et salt af clavulansyre med en forbindelse med den almene formel $Q - R$, hvor Q betegner en let udskiftelig gruppe, og R betegner en organisk gruppe.

Egnede salte af clavulansyre, som kan omsættes med forbindelser $R - Q$, er f.eks. alkalimetalsalte såsom natrium- eller kaliumsalte eller andre sædvanlige salte, f.eks. sølvsaltet.

Egnede grupper Q omfatter sådanne atomer eller grupper, som vides at være udskiftelige med carboxylatanioner, og omfatter chlor-, brom- og iodatomer, sulfonsyreestere såsom OSO_2CH_3 - eller $OSO_2C_6H_4CH_3$ -grupper, aktive estergrupper såsom $OCOH$ - eller $OCOCF_3$ -grupper og andre sædvanlige grupper, som kan udskiftes med nucleofile grupper.

Prøver, som kan anvendes til påvisning af clavulansyre, er udføreligt beskrevet i dansk patentskrift nr. 141.254.

I nedenstående "Beskrivelser" er beskrevet dyrkningen af *Streptomyces clavuligerus*. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er beskrevet nærmere ved nedenstående eksempler 1 - 6, omdannelsen af et clavulansyresalt til en ester er beskrevet i eksempel 7, og data vedrørende den antibakterielle virkning af nogle ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen isolerede salte er beskrevet i eksempel 8 og 9:

Beskrivelse 1.

Dyrkning af *Streptomyces clavuligerus*.

Streptomyces clavuligerus dyrkes ved $26^{\circ}C$ på agarskråkultur indeholdende 1% "Yeatex" (gærekstrakt), 1% glucose og 2% "oxoid" agar nr. 3, pH-værdi 6,8. Et sterilt øje anvendes til at overføre mycelium og sporer fra skråkulturen i 100 ml af et flydende medium i en 500 ml Erlenmeyer-kolbe. Det flydende medium har nedenstående sammensætning:

"Oxoid" maltekstrakt	10 g/liter
"Oxoid" bakteriologisk pepton	10 g/liter
Glycerol	20 g/liter
Ledningsvand	1 liter.

Mediet indstilles på pH-værdi 7 ved tilsætning af natriumhydroxidopløsning, og 100 ml's rumfang fordeles i kolberne, som lukkes med skumpropper før autoklavering ved $1,0545 \text{ kg/cm}^2$ i 20 minutter. En podet kimkolbe rystes i 3 dage ved 26°C på et rotationsrysteapparat med en slaglængde på 5 cm. og en hastighed på 240 omdrejninger/minut. Produktionstrinskolber indeholdende det flydende medium som ovenfor beskrevet podes med 5%'s vegetativt inokulum og dyrkes under samme betingelser som kimkolben. Prøver af kulturfiltrat undersøges for inhibitorvirkning mod β -lactamase fra *Escherichia coli* JT4. Optimal aktivitet fås efter 3 dages forløb. Resultaterne er anført i nedenstående tabel I. En zone af clavulansyre ved R_f -værdi 0,46 afsløres, når kulturfiltratet undersøges ved den papirchromatografiske metode. Væksten i zonens størrelse svarer til væksten i β -lactamase-inhibitorstyrkebestemmelsen.

Streptomyces clavuligerus dyrkes også i 2-liters rystekolber indeholdende 400 ml af medium (produktionstrin) under anvendelse af samme medium og dyrkningsbetingelser som beskrevet tidligere i dette eksempel. I disse større beholdere er organismens vækst langsommere, og den optimale β -lactamase-inhiberende virkning fås 7 - 9 dage efter podningen med den vegetative kim. Resultaterne er også anført i tabel I.

Tabel I.

β -Lactamase-inhiberende virkning af *Streptomyces clavuligerus*.
Vækst i 500 ml's og 2000 ml's kolber.

Fermenteringstid (dage)	% inhibering af <i>Escherichia coli</i> - β -lactamase ved en endelig fortynding på 1/2500 af kulturfiltratet	
	500 ml's rystekolbe	2000 ml's rystekolbe
1	15	-
2	30	-
3	55	-
4	50	10
5	51	21
6	57	36
7	-	51
8	-	53
9	-	50.

Beskrivelse 2.

Dyrkning af *Streptomyces clavuligerus*.

100 ml sterilt vand sættes til en sporekultur, som er dyrket på Bennetts-agar i en Roux-flaske i 10 dage ved 26°C. Der fremstilles en mycelium/sporesuspension, og den anvendes til at pøde 75 liter dampsteriliseret medium med nedenstående sammensætning i ledningsvand:

Dextrin	2	vægt/volumenprocent
"Arkasoy 50"	1	vægt/volumenprocent
10% "Pluronic L81" i sojabønneolie	0,03	volumen/volumenprocent.

pH-Værdien i mediet indstilles på 7,0.

Mediet er i en 100-liters rustfri stålfermenteringsbeholder med prelplader og omrøres af en 19,05 cm's vingeskiverotor ved 140 omdrejninger/minut. Der tilføres steril luft i en mængde på 75 liter/minut, og tanken inkuberes i 72 timer ved 26°C.

Indholdet af kimfermenteringsbeholderen anvendes til at pøde 1500 liter dampsteriliseret medium med nedenstående sammensætning i ledningsvand:

"Arkasoy 50"	1,5 vægt/volumenprocent
Glycerol	1,0 vægt/volumenprocent
KH_2PO_4	0,1 vægt/volumenprocent
10% "Pluronic L81" i sojabønneolie	0,2 volumen/volumenprocent.

pH-Værdien i mediet indstilles på 7,0.

Dette medium indeholdes i en 2000 liters rustfri stålfermenterings-beholder, som fuldstændig er forsynet med preplader, og som omrøres af to 48,4 cm's vingskiverotorer med 106 omdrejninger/minut.

Steril luft ledes ind i en mængde på 1200 liter/minut. Når det er nødvendigt, tilsættes antiskummidler i 25 ml's portioner. (10% "Pluronic L81" i sojabønneolie). Fermenteringen holdes ved 26°C, indtil der er nået et maksimalt udbytte af clavulansyre efter 3 - 5 dages forløb, hvor der er produceret 200 - 300 µg/ml clavulansyre.

Eksempel 1.

Isolering af rått clavulansyre-natriumsalt.

1 liter kulturfiltrat med 53% s inhibering ved 1/2500 i β -lactamase-inhiberingsforsøget og fremstillet som beskrevet i beskrivelse 2 percoleres ned over en 2,54 cm x 15,24 cm søjle af "Permutit Isopore harpiks FF 1P (SRA 62)" i Cl^- -form (markedsført af Permutit Co. Ltd., 632 - 652 London Road, Isleworth, Middlesex, Storbritannien). Kulturfiltratet efterfølges af 300 ml destilleret vand for at vaske søjlen. Eluering af den aktive β -lactamase-inhibitor udføres med 0,2M NaCl-opløsning. Der opsamles 20 ml's fraktioner, og de undersøges i en endelig fortynding på 1/2500 ved β -lactamase-inhiberingsforsøg. Aktive fraktioner sammenhældes og inddampes under vakuum til 20 ml. Denne opløsning afsaltes ved geludelukkelseschromatografi på en "Biorad Biogel P2"-søjle med en diameter på 3,81 cm og et gelleje på 40,64 cm og elueres med 1% n-butanol i vand ("Biogel P2" markedsføres af Biorad Laboratories, 32nd and Griffin Avenue, Richmond, California, U.S.A.). De aktive fraktioner, bestemt ved β -lactamase-inhiberingsforsøget, sammenhældes. Natriumchlorid

elueres efter clavulansyre og bestemmes under anvendelse af sølv-nitratopløsning. De kombinerede aktive fraktioner inddampes og frysetørres.

Af 1 liter kulturfiltrat fås ved den ovenfor angivne behandling 0,45 g rå fast clavulansyreprodukt med en I_{50} -værdi på 0,92 $\mu\text{g/ml}$. Dette faste stof oplagres ved -20°C inden yderligere rensning.

Eksempel 2.

Partiel rensning af rå clavulansyre.

Rå clavulansyrepræparater fremstillet som beskrevet i eksempel 1 renses ved ionbytterchromatografi. 18 g materiale fremstillet som beskrevet i eksempel 1 med en I_{50} -værdi på 1,3 $\mu\text{g/ml}$ (endelig koncentration) opløses i 25 ml destilleret vand og hældes på et 3,81 cm x 40,64 cm leje af "Permutit FF 1P (SRA 62)" harpiks i Cl^- -form. Søjlen elueres med en natriumchloridgradient dannet ved tyngdekrafttilledning af 0,5M natriumchlorid til et blandekar indeholdende 1 liter destilleret vand, som igen ledes til chromatografisøjlen. 10 ml's fraktioner opsamles, og den β -lactamase-inhiberende virkning undersøges under anvendelse af en 1/2500 fortynding af fraktionerne. Aktiviteten elueres efter et hovedfarvebånd mellem fraktionerne 24 og 30. De aktive fraktioner sammenhældes og koncentrerer til 30 ml.

Denne opløsning afsaltes under anvendelse af et 5,08 cm x 45,72 cm leje af "Biorad Biogel P2" og elueres med 1% n-butanol i vand. 20 ml's fraktioner undersøges for clavulansyreindhold under anvendelse af β -lactamaseinhiberingsforsøg. Fraktionerne sættes også på papirsstrimler, og der forstøves med enten "Ehrlich"- eller triphenyltetrazolium-forstøvningsreagenser. Den β -lactamase-inhiberende virkning korreleres med henholdsvis lyserøde og røde pletter, som fremkaldes af disse reagenser. Aktive fraktioner sammenhældes, med undtagelse af sådanne, som indeholder natriumchlorid, og inddampes til tørhed under vakuum. Derved fås 520 mg partielt rensset clavulansyre-natriumsalt med en I_{50} -værdi på 0,2 $\mu\text{g/ml}$ ved standard β -lactamase-inhiberingsforsøget.

Tyndtlagschromatografi (silicagel) af dette clavulansyrepræparat giver følgende R_f -værdier:

n-butanol/ethanol/vand i forholdet 4:1:5 volumen/volumen, topfase, R_f -værdi 0,37;
n-butanol/eddikesyre/vand i forholdet 12:3:5 volumen/volumen, R_f -værdi 0,44;
isopropanol/vand i forholdet 7:3 volumen/volumen, R_f -værdi 0,78.
Disse zoner bestemmes ved påsprøjtning af "Ehrlich"-reagens. 6-Aminopenicillansyre lades løbe med som markeringsstof og bestemmes med samme sprøjtemiddel og har R_f -værdier på henholdsvis 0,38, 0,39 og 0,77.

Eksempel 3.

Isolering af fast clavulansyre-natriumsalt.

Et partielt rensat fast præparat af clavulansyre (500 mg) fremstillet som beskrevet i eksempel 2 hældes på en "Whatman" mikrokrySTALLINSK CC 31-cellulosesøjle med en lejestørrelse på 2,54 cm x 50,80 cm. Det chromatografiske opløsningsmiddel er n-butanol/ethanol/vand i volumen/volumen-forholdet 4:1:5, topfase. Søjlen drives ved 4°C, og der opsamles fraktioner på 4 ml. Fraktionerne undersøges for tilstedeværelse af clavulansyre ved at blive sat på filterpapir og sprøjtet med "Ehrlich" (lyserøde prøver)- eller triphenyltetrazolium (røde prøver)-forstøvningsreagens. Disse pletprøver bekræftes ved β -lactamase-inhiberingsforsøg i en fortynding på 1/1250. Aktive fraktioner sammenhældes og tørres under vakuum på en roterende fordamper. Det faste stof opløses i et ringe volumen destilleret vand og frysetørres. Der fås 40 mg af et hvidt fast præparat af natriumsaltet af clavulansyre med en I_{50} -værdi på 0,08 μ g/ml i β -lactamase-inhiberingsforsøget.

Eksempel 4.

Isolering af fast clavulansyre-natriumsalt.

Koncentreret reekstrakt (6 liter) (fra ultrafiltrering) indeholdende 10 g clavulansyre ifølge β -lactamase-inhiberingsforsøg. Dette percoleres med en hastighed på 1 liter/time på en 5,08 cm x 60,96 cm søjle af "Permutit Zerolit FF 1 P SRA 62"-anionbytterharpiks i chlorid-form. Søjlen vaskes derefter med 2 liter deioniseret vand før eluering med en natriumchloridgradient. Gradienten dannes af et reservoir indeholdende 4 liter 1,4M NaCl, som ledes til et omrørt reservoir indeholdende 4 liter 0,7M NaCl, som igen føres til et omrørt reservoir indeholdende 4 liter deioniseret vand, som via en pumpe er forbundet med søjlen. Søjlen elueres med en hastighed på 2,5 ml/minut, og der opsamles fraktioner på 25 ml. Fraktionerne undersøges ved hjælp af β -lactamase-inhiberingsforsøget.

De aktive fraktioner (numrene 140 - 230) sammenhældes og inddampes i vakuum til næsten tørhed. 500 ml ethanol tilsættes, og det faste stof frafiltreres efter kraftig rystning. Ethanolekstrakten inddampes derefter i vakuum til tørhed på en rotationsfordamper og genopløses i 40 ml deioniseret vand. Dette hældes på en 10,16 cm x 60,96 cm søjle med "Biorad Biogel P2" og elueres med en 1% n-butanolopløsning. Der opsamles fraktioner på 25 ml, og de undersøges for β -lactamase-inhiberende virkning i en endelig fortynding på 1/2500. Undersøgelser for natriumindhold i 1/25-fortyndinger af fraktionerne udføres under anvendelse af sølvnitratopløsning. Fraktionerne indeholdende clavulansyre uden natriumchlorid sammenhældes, koncentrerer til 20 ml ved afdampning af opløsningsmidlet under reduceret tryk og frysetørres. Derved fås 4,8 g af natriumsaltet af clavulansyre (I_{50} -værdi ca. 0,06 μ g/ml).

Eksempel 5.

Fremstilling af magnesiumclavulanat.

En opløsning indeholdende natriumclavulanat (bedømt som ca. 4,4 g) i 15 ml vand hældes på en ionbyttersøjle, Zerolit FF(1P), SRA62, og søjlen vaskes med ét rumfang vand. Søjlen elueres med 0,2M mag-

nesiumchloridopløsning, og de opsamlede fraktioner undersøges ved papirchromatografi (påvisning med Ehrlich's reagens), og de mest intense fraktioner sammenhældes og inddampes under vakuum til et lille rumfang.

Dette rå præparat af magnesiumsaltet afsaltes ved percolering gennem en søjle af "Biogel" P2 (papirchromatografi-Ehrlich's spray).

Det afsaltede materiale inddampes derefter, blandes med ethanol og chromatograferes på en cellulosesøjle under anvendelse af butanol/ethanol/vand i forholdet 4:1:5 v/v topfase som eluant. Fraktioner indeholdende størstedelen af materialet sammenhældes og inddampes til tørhed i vakuum. Ved triturerering med acetone efterfulgt af filtrering fås det ønskede salt i form af 0,58 g hvidt fast stof. Højtryksvæskechromatografi-undersøgelse viser 91% rent magnesiumclavulanat. Atomabsorption viser 5,13% Mg^{++} . Karl Fischer-analyse viser 6,8% vand.

IR-Spektrum (KBr): $\nu_{\text{max}} = 1780, 1693 \text{ og } 1610 \text{ cm}^{-1}$.

Eksempel 6.

Kaliumsaltet af clavulansyre.

Et urent frysetørret fast præparat (10 g af ca. 30%'s renhed) af kaliumsaltet af clavulansyre opløses i 15 ml vand og hældes på en ionbytterkolonne (7 cm x 35 cm) af "Zerolit" FF (IP) SRA 62 på chlorid-form, og kolonnen vaskes med et rumfang vand. Kolonnen elueres derefter med 0,2M kaliumchloridopløsning. De opsamlede fraktioner (30 ml) bedømmes ved papirchromatografi (påvisning med Ehrlich's reagens) og tyndtlagschromatografi (påvisning med kaliumpermanganat-spray). Den β -lactamase-inhiberende aktivitet i de positive fraktioner måles under anvendelse af en 1/1000 fortynding af fraktionerne. De aktive fraktioner sammenhældes og inddampes til et ringe rumfang (ca. 10 - 15 ml) under vakuum.

Det resulterende præparat af kaliumsaltet afsaltes ved perkolering ned over en kolonne (7,5 cm x 48 cm) af "Biogel" [®] P2 og eluering

med 1% n-butanol i vand. De opsamlede fraktioner bedømmes som ovenfor beskrevet, og de kraftige fraktioner sammenhældes og inddampes under vakuum til ca. 10 ml. Der tilsættes ca. 10 ml ethanol, og opløsningen chromatograferes på en cellulosekolonne (7 cm x 30 cm) under anvendelse af butanol/ethanol/vand, 4:1:5, topfase, som eluant. Fraktioner indeholdende størstedelen af materialet (kraftige fraktioner identificeret som ovenfor anført) sammenhældes og inddampes under vakuum. På dette trin fremkommer noget gul olie og noget krystallinsk materiale. Den gule olie fraskilles ved dekantering, og ca. 20 ml n-butanol sættes til den resterende næsten farveløse overstående væske. Opløsningen inddampes til ca. 50 ml under vakuum. Det krystallinske faste stof i kolben skræbes ned i hele opløsningen, som derefter lades henstå natten over i køleskab. Det resulterende krystallinske kaliumsalt af clavulansyren frafiltreres, vaskes med ether og tørres, hvorved der fås 1,1 g af det ønskede materiale.

IR-Spektrum (nujol mull): 3320, 1790, 1700 og 1595 cm^{-1} .

IR-Spektrum (KBr): 3315, 3005, 2955, 2905, 2868, 1790, 1700, 1595, 1486(w), 1408(w), 1383, 1353(w), 1302, 1264, 1258, 1204(w), 1190, 1150, 1125, 1085, 1063, 1040, 1020(w), 1006, 988(w), 942, 906(w), 898, 840, 808, 788, 768, 710, 695(w), 660, 602, 576, 542, 505, 490, 420, 368 og 299 cm^{-1} .

NMR-Spektrum (D_2O , acetonitril δ 2,0 som intern standard): 3,03 (1H, d, $\underline{\text{J}}$, 17,5Hz, 6 β -CH), 3,5 (1H, dd, $\underline{\text{J}}$ 3 og 17,5Hz, 6 α -CH), 4,1 (2H, d, $\underline{\text{J}}$ 8Hz, CH_2OH), 4,88 (1H, s, 3-CH), 4,85 (1H, dt, $\underline{\text{J}}$ 1,5 og 8Hz, CHCH $_2$ OH, delvist forstyrret af signal ved 4,88), 5,66 (1H, d, $\underline{\text{J}}$ 3Hz, 5-CH).

Højtryksvæskechromatografiforsøg: Angivne værdier på 75,4 og 76,3 vægt/vægtprocents renhed udtrykt som ren fri clavulansyreækvivalent, hvilket svarer til et gennemsnit på 75,8 vægt/vægtprocents renhed udtrykt som ren fri clavulansyreækvivalent. Denne værdi svarer til 90,3 vægt/vægtprocent rent kaliumsalt af clavulansyre.

Imidazolanalyse: 89,1 og 90,9 vægt/vægtprocents renhed udtrykt som kaliumsalt af clavulansyre med et gennemsnit på 90 vægt/vægtprocents renhed udtrykt som kaliumsalt af clavulansyre.

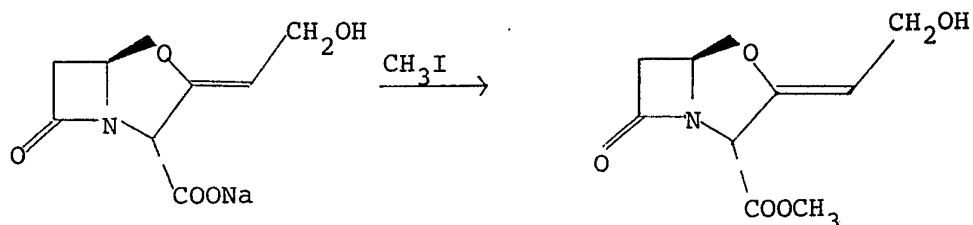
Vandanalyse (Karl Fischer): 1,54 og 1,41% med et gennemsnit på 1,47% vand.

Kaliumindhold (atomabsorption): 15,4 vægt/vægtprocent.

Røntgenanalyse (CuK α -stråling, reflektioner ved 2 θ): 11,7, 12,9, 17,1 22,75, 23,65, 25,05, 25,3, 26,2, 26,6 og 28,3.

Eksempel 7.

Fremstilling af en ester af clavulansyre (methylester).



19,8 mg af natriumsaltet af clavulansyre opløses i 0,5 ml tørt dimethylformamid og behandles med 0,25 ml methyliodid. Efter henstand ved stuetemperatur i 1 1/2 time under vandfrie betingelser fjernes opløsningsmidlerne i vakuum. Remanensen renses ved P.L.C. på silicagel (Kieselgel 60F254, markedsført af E. Merck, Darmstadt, Vesttyskland) og eluering med ethylacetat, hvorved der fås clavulansyre-methylester i form af en farveløs olie (R_f -værdi 0,38; rød farve med triphenyltetrazoliumchloridspray), og olien har nedenstående egenskaber:

Analyse:

Beregnet for $C_9H_{11}NO_5$:	C 50,70	H 5,20	N 6,57
Fundet:	C 50,49	H 5,43	N 6,29.

UV-spektrum (methanol: $\lambda_{\max}$: ingen absorption >215 nm;

IR-spektrum: $\nu_{\max}$ (film): 3300 - 3600 (bredt), 1800, 1750, 1695 cm^{-1} .

Tilnærmet første ordens NMR-spektrum (CDCl_3): 2,49 (bred s, 1, udskiftet med D_2O), 3,05

(d, 1, $J = 17,5$ Hz), 3,54 (dd, 1, $J = 17,5$ Hz, $J_2 = 2,5$ Hz), 3,84 (s, 3)

4,24 (d, 2, $J = 7$ Hz), 4,93 (dt, 1, $J = 7$ Hz, $J_2 = 1,5$ Hz),

5,07 (d, 1, $J = 1,5$ Hz), 5,72 (d, 1, $J = 2,5$ Hz).

Molekylvægt (massespektrum): 213,0635.

Beregnet for $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_5$: 213,0637.

Tyndtlagschromatografi på methylesteren viser en enkelt zone i hver af de nedenstående opløsningsmiddelsystemer: butanol/ethanol/vand i volumen/volumen-forholdet 4:1:5, topfase R_f -værdi 0,75; isopropanol/vand i volumen/volumen-forholdet 7:3, R_f -værdi 0,95; ethylacetat/ethylalkohol i volumen/volumen-forholdet 8:2, R_f -værdi 0,87. Disse zoner bestemmes ved bioautografi under anvendelse af Klebsiella aerogenes med tilsat benzylpenicillin (synergismesystem).

Eksempel 8.

Antibakterielt spektrum for clavulansyre-natriumsalt.

Den antibakterielle virkning af clavulansyre-natriumsalt mod en række bakterier bestemmes under anvendelse af mikrotitermetoden. Seriefortyndinger af clavulansyre-natriumsaltet i "Oxoid"-sensitivitetsforsøgsvæske i en mikrotiter plastbakke podes med en dyrkningskultur, der har stået natten over, af hver organisme, således at den endelige fortynding af inokulet er $0,5 \times 10^{-4}$. Kulturerne inkuberes natten over, og punkterne med bakterievækst bestemmes næste morgen ved at observere kulturens uklarhed. Resultaterne, udtrykt som tilnærmelsesvise MIC-værdier (minimum inhiberingskoncentration $\mu\text{g/ml}$) er anført i nedenstående tabel II, som viser, at forbindelsen har bredspektret antibakteriel virkning.

Tabel II.

Antibakterielt spektrum for clavulansyre-natriumsalt.

Bakteriestammer	Minimum inhiberings- koncentration $\mu\text{g/ml}$
Staphylococcus aureus (Oxford H)	7,5
Staphylococcus aureus (Russell)	7,5
Bacillus subtilis	62
Streptococcus faecalis	>500
Streptococcus pyogenes CN 10	125
Escherichia coli NCTC 10418	31
Klebsiella aerogenes	31 - 62
Klebsiella oxytocolum	62
Enterobacter aerogenes T 624	31
Enterobacter cloacae	62
Acinetobacter anitratus	125
Providentia stuartii	125
Serratia marcescens	125
Proteus mirabilis C977	62
Proteus vulgaris W090	31
Salmonella typhimurium	31
Shigella sonnei	62
Pseudomonas aeruginosa A	500

Eksempel 9.

Antibakteriel synergisme mellem ampicillin og clavulansyre-natrium-salt.

Den minimale inhiberingskoncentration (MIC-værdi) for ampicillin, clavulansyre-natriumsalt og ampicillin i tilstedeværelse af $1 \mu\text{g/ml}$ clavulansyre-natriumsalt bestemmes for en række β -lactamase-producerende bakterier. Organismerne podes i "Oxoid" sensitivitetstestsdyrkningsvæske anbragt i små skakter i en plastbakke og indeholdende forskellige koncentrationsgradienter af ampicillin, clavulansyre-natriumsalt eller ampicillin plus $1 \mu\text{g/ml}$ clavulansyre-natriumsalt (mikrotitermetode). Den endelige fortynding af inokulet i dyrkningsvæsken, dyrket natten over, er $0,5 \times 10^{-2}$. Bakken inkuberes ved

37°C natten over, og næste morgen bestemmes endepunkterne for bakterievæksten. MIC-værdierne i $\mu\text{g/ml}$ er anført i tabel III, hvorefter det fremgår, at synergisten ved den lave koncentration på 1 $\mu\text{g/ml}$ på afgørende måde forbedrer den antibakterielle virkning af ampicillin mod visse grampositive og gramnegative bakterier. Mekanismen i denne synergisme antages at bestå i inhibering af ampicillin-nedbrydende β -lactamase-enzymmer, men eksistensen af andre mekanismer kan ikke udelukkes.

Der fås lignende resultater som dem, som vises i tabel III, når ampicillin erstattes med amoxycillin eller med phthalidylesteren af ampicillin.

Tabel III

Antibakteriel synergisme mellem ampicillin og clavulansyre-natriumsalt

Bakteriestamme	Minimal inhiberingskoncentration $\mu\text{g/ml}$		
	Clavulansyre-natriumsalt	Ampicillin	Ampicillin i tilstedeværelse af 1 $\mu\text{g/ml}$ clavulansyre-natriumsalt
Escherichia coli NCTC 10481	31	1,8	< 0,4
Escherichia coli B 11	62	>500	125
Klebsiella aerogenes A	31	125	< 0,4
Klebsiella sp 62	31	125	< 0,4
Enterobacter cloacae	62	250	62
Serratia marcescens	125	>500	62
Staphylococcus aureus (Rüssell)	15	500	< 0,4
Staphylococcus aureus (en methicillinresistent stamme)	62	250	7,5

Påvisning af synergisme mellem natriumclavulanat og penicilliner mod *Staphylococcus aureus*.

Tabel IV

	MIC (ug/ml)			
	Russell	H	5275	Nobel
Ampicillin alene	1000	1000	500	500
Ampicillin + synergist 1 ug/ml	0,6	1,25	2,5-1,25	0,6
Ampicillin + synergist 5 ug/ml	0,019	0,3	0,15	0,03
Amoxycillin alene	1000	1000	500	500
Amoxycillin + synergist 1 ug/ml	1,25	1,25	2,5	0,6
Amoxycillin + synergist 5 ug/ml	0,15-0,07	0,3	0,15	0,15
Carbenicillin alene	62,5	62,5	62,5	31
Carbenicillin + synergist 1 ug/ml	5,0	5,0	5,0	2,5
Carbenicillin + synergist 5 ug/ml	0,6	2,5	0,6	1,25
Ticarcillin alene	31	62,5	62,5	31-15,6
Ticarcillin + synergist 1 ug/ml	5,0	2,5	5,0	2,5
Ticarcillin + synergist 5 ug/ml	0,6	1,25	1,25	2,5
Benzylpenicillin alene	1000	1000	1000	500
Benzylpenicillin + syner- gist 1 ug/ml	5,0	2,5	10	1,25
Benzylpenicillin + syner- gist 5 ug/ml	0,03	0,15	0,3	0,07
Natriumclavulanat alene	15,6	7,8	7,8	7,8

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til isolering af et clavulansyresalt, k e n d e t e g n e t ved, at en ved dyrkning vundet uren opløsning af et clavulansyresalt bringes i kontakt med et anionbyttermateriale derfor, hvorefter det ønskede salt af clavulansyre elueres derfra med en vandig opløsning af en tilsvarende elektrolyt, hvorefter overskydende elektrolyt fjernes ved afsaltning.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den urene opløsning er vundet ved dyrkning af en stamme af *Streptomyces clavuligerus*.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at anionbyttermaterialet er en stærk baseanionbytterharpiks.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at anionbyttermaterialet er en svag baseanionbytterharpiks.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at elektrolyten er natriumchlorid.

Fremdragne publikationer:
