

**NORGE**



**STYRET  
FOR DET INDUSTRIELLE  
RETTSVERN**

**Utlegningskrift nr. 120932**

Int. Cl. C 12 d 9/14 Kl. 6b-16/03

Patentsøknad nr. 154.981 Inngitt 2.X 1964

Løpedag -

Søknaden alment tilgjengelig fra 1.VII 1968

Søknaden utlagt og utlegningskrift utgitt 28.XII 1970

Prioritet begjært fra: 3.X-63 USA,  
nr. 313477

---

Merck & Co., Inc.,  
126 East Lincoln Avenue, Rahway, N.J., USA.

Oppfinnere: Louis Chalet, 33 Cypress Terrace, Springfield, N.J. USA  
og Justo Martinez Mata, calle Cea Bermudez, 80,  
Madrid, Spania.

Fullmektig: Siv.ing. Erling Quande.

Fremgangsmåte ved fremstilling av antibiotikum 235A

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte ved fremstilling av et nytt antibiotikum kalt "Antibiotikum 235A" (eller alternativt "Antibiotikum MSD 235"), og komponentene 235L og 235S derav.

Oppdagelsen av de bemerkelsesverdige terapeutiske egenskaper av penicillin frembrakte stor interesse på dette felt, hvilket har ført til fremstillingen av mange andre verdifulle antibiotika så som streptomycin, bacitracin, chloramphenicol, tetracyclin, erythromycin, novobiocin og lignende. Generelt sett er slike antibiotika særlig virksomme mot visse gram-positive bakterier. Andre er aktive mot gram-negative bakterier. Virksomheten av disse individuelle antibiotika er imidlertid vanligvis begrenset til noen få stammer av patogene mikroorganismer, og arbeidet har fortsatt på dette felt i et forsøk på å finne andre antibiotika som er effektive mot andre patogene mikroorganismer.

Skjønt noen av disse antibiotika har vist seg å være verdifulle ved behandling av forskjellige sykdommer, har det vist seg at visse stammer av patogene mikroorganismer utvikler resistens overfor et spesielt antibiotikum og, som følge derav, er antibiotikumet ikke lengre virksomt mot disse spesielle stammer.

Manglene ved de kjente antibiotika har følgelig stimulert forskningen til å finne andre antibiotika som vil være virksomme mot et større område av patogene mikroorganismer og spesielt å finne antibiotika som vil være virksomme mot resistente stammer av patogene mikroorganismer.

Ved foreliggende oppfinnelse skaffes et nytt og nyttig antibiotikum som er meget effektivt til å hindre veksten av patogene bakterier, særlig de gram-negative bakterier.

Det nye antibiotiske materiale fremstilles ifølge foreliggende oppfinnelse ved å dyrke under kontrollerte betingelser stammer av en ny *Streptomyces*-art. Denne art er blitt betegnet som *Streptomyces avidinii*. En kultur av denne er deponert ved the Northern Utilization Research Branch of the U. S. D. A. under nummer NRRL 3077, søkerens nr. MA 833.

De morfologiske og kulturelle egenskaper av den antibiotikum 235A-produserende stamme av *Streptomyces* er angitt i den etterfølgende tabell.

#### Morfologi for kultur MA-833:

Sporebærerne er lange, monopodiale forgrenede, som danner åpne til kompakte spiraler med mer enn 10 sporer. Sporene er ovale, 0,9 til 1,2 micron brede og 1,2 til 1,7 micron lange.

Vegetative hyfer - 0,9 micron brede.

(Czapek-Dox agar - 970x)

#### Beskrivelse av dyrkningsegenskaper av organismen som fremstiller antibiotikum.

235A

(inkubasjon 20 dager ved 28°C)

#### Tomatpasta - havregryn - agar-plater

Kultur MA-833 oppviser rikelige, flate, fløyelsaktige, hvite dotter, grått (5fe) luftmycel, bakside brun.

#### Czapek agar-plater

Kultur MA-833 oppviser tynn, spredende, farveløs til kremfarvet vekst, hvit (a) → rød (5cb) luftmycel, intet oppløselig pigment, bakside hvit (b).

Til sammenligning viser *Streptomyces lavendulae* tynn, spredende, farveløs til kremfarvet vekst, bomullshvit → vinfarvet-lavendel luftmycel, og intet oppløselig pigment.

Glycerol-asparagin-agar-plater

Kultur MA-833 oppviste intet oppløselig pigment.

Syntetisk agar (Glucose-asparagin-agar)-plater

Kultur MA-833 oppviser rikelige, flate, fløyelsaktige, hvite dotter, grått (5fe) luftmycel, intet oppløselig pigment, baksiden grå (2ih).

*Streptomyces lavendulae* oppviser gulaktig vekst, og hvit med laven-delaktig luftmycel.

Potetkile

Kultur MA-833 oppviser rikelig, brun vekst, grått (2dc) luftmycel og brunlig sort oppløselig pigment.

Til sammenligning oppviser *Streptomyces lavendulae* tynn, rynket, krem til gul vekst, intet luftmycel og sort oppløselig pigment.

Eggalbumin-agar

Kulturen MA-833: vegetativ vekst - tynn, spredende, farveløs

Luftmycel - grå-hvitt

Intet oppløselig pigment

Gjærekstrakt-dextrose-agar

Kulturen MA-833: vegetativ vekst - god, flat, kremfarvet

Luftmycel - grått (5fe)

Intet oppløselig pigment

Syntetisk stivelseagar

Kulturen MA-833: vegetativ vekst - god, flat, farveløs til kremfarvet

Luftmycel - rødt (5ec)

Intet oppløselig pigment

Ca-malat-agar

Kulturen MA-833: Luftmycel - sparsomt

Sporene få - gråfarvet

Intet oppløselig pigment

Farve uforandret

Calcium utnyttet ikke

Bennett's agar

Kulturen MA-833: Luftmycel - god vekst

Sporer mange - grå-lavendelfarvet

Intet oppløselig pigment

Bakside brun

Gelatinstikk (oppløsning)

Kultur MA-833 oppviser kremfarvet vekst, grått luftmycel, brunt opp-

løselig pigment og oppløser gelatinmediet sakte.

Til sammenligning oppviser *Streptomyces lavendulae* krem til brunlig overflatevekst, intet luftmycel eller hvitt luftmycel, brunt oppløselig pigment og oppløser gelatinmediet sakte.

Hydrogensulfid produseres av både MA-833 og *Streptomyces lavendulae*.

Ved vekst på stivelse-agar-plater hydrolyseres stivelse av MA-833.

På nitrit-agar bevirker hverken MA-833 eller *Streptomyces lavendulae* noen merkbar reduksjon av nitrater til nitriter.

#### Carbonutnyttelse

	Glu- cose	Xyl- ose	Ara- binose	Rham- nose	Raffi- nose	Mann- ose	Lact- ose
MA-833	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. laven- dulae</i>	+	vari- abel	vari- abel	-	-	+	-

Ovenstående beskrivelse av mikroorganismen som frembringer "Antibiotikum 235A", er tilstrekkelig til å klassifisere kulturen MA-833 som en ny art av *Streptomyces* som er gitt navnet *Streptomyces avidinii* i lys av kulturens uvanlige natur og av den iakttagelse at et biotinbindende middel, Streptavidin, kan fremstilles.

Kulturen MA-833 ble isolert fra jord funnet i Spania.

Ved å henføre denne stamme til en artsklassifisering, er de nøkler som anvendes, de som er beskrevet i Bergey's "Manual of Determinative Bacteriology", syvende utgave, og i en artikkel i "Applied Microbiology" 5, 52 - 79 (1958) "A Guide for the Classification of Streptomyces According to Selected Groups" av Pridham, Hesseltine og Benedict.

Detaljerte sammenligninger ble foretatt mellom den 235A antibiotikumproduserende kultur og de data som er publisert i Bergey's "Manual" eller "The Actinomycetes", vol 2, "Classification, Identification and Descriptions of Genera and Species", S. A. Waksman (1961) for beslektede kulturer, valgt fra nøklene.

MA-833 produserer rikelig mørkt oppløselig pigment ved dyrkning på organisk media så som tomatpasta-agar, eller potet og produserer likeledes hydrogensulfid.

MA-833 frembringer sporebærere som slutter i sporekjeder som tidlig i utviklingen av kulturen er bølget, og som utvikles ved videre inkubering til en oppkveilet tilstand, og ender i en fast kveil som ofte gir utseende av en ball. Kulturen faller derfor ifølge klassifikasjonen til Pridham, Hesseltine og Benedict i seksjonen "Spira". Ifølge Pridham, Hesseltine og Benedict er en

sekundær klassifikasjon "serie" basert på farven av det sporeproduserende mycel. MA-833 tilhører den grå serie.

Kulturen MA-833 kjennetegnes ved dannelsen av spiralsporede kjeder, ved produksjon av et oppløselig brunt pigment og ved produksjon av hydrogen-sulfid.

På et komplekst medium, f. eks. tomatpasta-agar, vokser kulturen sterkt, og produserer tydelig gråfarvede sporer uten overtone i rødt eller lavendel. Gråfarvede sporer produseres også på kjemisk definerte media.

Et forsøk ble gjort på å klassifisere kulturen gjennom nøkkelen til artene av slekten *Streptomyces* publisert i Bergey's "Manual of Determinative Bacteriology", syvende utgave, idet man tok i betraktning de gråfarvede sporer i komplekst medium. Ingen kjente arter ble funnet hvortil MA-833 kunne henføres.

De 9 oppløselig pigmentdannende arter i seksjonen *Spira*, grå serie, anført i publikasjonen av Pridham, Hesseltine og Benedict som er beskrevet i detalj i "The Actinomycetes", vol 2, ble overveiet nærmere. MA-833 kunne skilles fra de 9 kulturer på basis av følgende egenskaper: *Streptomyces aureus* kjennetegnes ved mangelen på luftmycel i organisk agar og ved lys oransjefarvet vekst på dextrose-asparagin-agar, *Streptomyces collinus* gir intet oppløselig pigment på potet og et karminrødt oppløselig pigment på dextrose-asparagin-agar, *Streptomyces cyaneus* gir blåfarvet vekst på en rekke medier og viser svak hydrolyse av stivelse, *Streptomyces filipiensis* gir et gulfarvet oppløselig pigment på både Czapek agar og glycerol-asparagin-agar, *Streptomyces fimbriatus* viser rik vekst på Czapek agar, et rødlig oppløselig pigment på gelatin og er et plantepatogen, *Streptomyces griseochromogenes* mangler spiralsporekjeder og produserer oransjefarvet vekst på Czapek agar, *Streptomyces griseoruber* gir rødligoransje vekst på Czapek agar, rødligoransje vekst og et gult oppløselig pigment på stivelse-agar, *Streptomyces hawaiiensis* viser bare svak oppløsning av gelatin og svak hydrolyse av stivelse, og *Streptomyces olivochromogenes* kjennetegnes ved et oppløselig pigment på dextrose-asparagin-agar og langsom oppløsning av gelatin.

Ingen art av mikroorganisme er kjent hvis vesentlige kjennetegn stemmer tilstrekkelig overens med MA-833. I lys av den karakteristiske sporefarvning på tomatpasta-agar, er det bestemt at denne distinkte type skal anerkjennes som en ny art og gies en ny artsbetegnelse. Navnet *Streptomyces avidinii* er blitt gitt i betraktning av den uvanlige natur av kulturen og den første erkjennelse av at det biotinbindende middel, Streptavidin, kan fremstilles av en mikroorganisme.

— Det nye antibiotikum 235A fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse inne-

holder minst to materialer, ett som er betegnet som materiale 235S og som har relativt lav molekylvekt. Det annet av de to materialer er betegnet som 235L og har en relativt høy molekylvekt. Materialet 235L som også er kalt "Streptavidin", er et proteinlignende materiale. Det nye antibiotikum 235A er uvanlig ved sin aktivitet, idet dets individuelle bestanddeler ikke har noen antibiotisk virkning overfor pantogene mikroorganismer i og for seg, unntatt når de bedømmes på spesielt fremstilte media, men er virksomme mot patogene mikroorganismer når blandinger av de to bestanddeler prøves mot patogene mikroorganismer. Det nye antibiotikum 235A inneholder således et synergistisk par av materialer betegnet som 235S og 235L, eller Streptavidin.

Antibiotikum 235S virker som et relativt lavmolekylært materiale som kan skilles i minst tre bestanddeler, betegnet som 235S<sub>1</sub>, 235S<sub>2</sub> og 235S<sub>3</sub> ved papirkromatografiske fremgangsmåter.

Ved således å anvende følgende oppløsningsmiddelsystemer for utvikling av kromatogrammene, bestemmes Rf' verdiene av de tre individuelle bestanddeler under anvendelse av et preparat av antibiotikum 235S isolert fra fermenteringsbuljong ved ionebyttefremgangsmåter. Oppløsningsmiddelsystem I er n-butylalkohol mettet med vandig 0,25M dinatriumhydrogenfosfat puffer oppløsning (pH 9,3). Oppløsningsmiddelsystem II er n-butylalkohol mettet med 0,1N ammoniumhydroxydoppløsning. I begge tilfelle blir papiret først mettet med den vandige puffer eller den vandige ammoniakoppløsning før påføring av prøven på papiret. Utviklingstiden er 6 til 17 timer. Resultatene er som følger.

	System I	System II 6 timer
235S <sub>1</sub>	Rf = 0,14	Rf = 0,15
235S <sub>2</sub>	Rf = 0,28	Rf = 0,33
235S <sub>3</sub>	Rf = 0,47	Rf = 0,51

Hver av de lavmolekylære bestanddeler av antibiotikum 235S kjenne- tegnes ved egenskapen av at de hindrer den intracellulære syntese av biotin av gram-negative mikroorganismer.

Antibiotikum 235S<sub>3</sub> er erholdt i krystallinsk form ved metoder beskrevet i det efterfølgende. Antibiotikum 235S<sub>3</sub> gir reaksjoner som er karakteristisk for primære aminer og er oppløselig i vann, lavere alkanoler, så som methanol, ethanol, isopropanol, n-butanol, og i vandige acetonoppløsninger. Antibiotikum 235S<sub>3</sub> kan krystalliseres fra alkaliske vandige oppløsninger ved tilsetning av aceton. Det krystallinske antibiotikum 235S<sub>3</sub> fremstilt på denne måte, har et smeltepunkt på ca. 217°C.

Antibiotikum 235S<sub>3</sub> er en optisk aktiv forbindelse med en dreining på

$$[\alpha]_D^{25} = +8,5^\circ \text{ (C, 2 i 0,1N saltsyre) og}$$

$$[\alpha]_D^{25} = +9,5^\circ \text{ (C, 2 i 3,5N saltsyre).}$$

En oppløsning av antibiotikum 235S<sub>3</sub> oppviser intet observerbart maksimum i det ultrafiolette absorpsjonsområdet.

Den infrarøde absorpsjon av en prøve krystallinsk antibiotikum 235S<sub>3</sub> suspendert i en mineralolje (NUJOL) ble tatt på et Baird Associates Model 12B infrarødt spectrofotometer under anvendelse av et natriumkloridprisme og viste en rekke karkateristiske topper, hvorav de mest betydningsfulle var ved følgende bølgelengder, uttrykt i mikron: 3,04, 3,7 - 4,8 og 6 - 6,6. Det infrarøde spektrum er illustrert i figur 1. Det bør merkes at det infrarøde absorpsjonsspektrum er et mål på absorpsjonen av antibiotikum 235S<sub>3</sub> i krystallinsk form fremstilt ved sakte tilsetning av aceton til en vandig ammoniakalsk oppløsning av antibiotikum 235S<sub>3</sub>. Skjønt bare en krystallinsk form er erholdt, eksisterer mange materialer som polymorfe modifikasjoner i hvilket tilfelle det infrarøde absorpsjonsspektrum kan oppvise mindre forskjeller mellom de forskjellige krystallinske former.

Antibiotikum 235S<sub>3</sub> inneholder elementene carbon, hydrogen, nitrogen og oxygen. Det følgende er en analyse av den elementære sammensetning erholdt på en prøve av krystallinsk 235S<sub>3</sub>:

Carbon	63,1
Hydrogen	8,9
Nitrogen	13,04
Oxygen (ved differens)	14,96

Antibiotikum 235S<sub>3</sub> er et primært amin som danner salter ved omsetning med syrer. Ved omsetning med sterke uorganiske syrer, såsom saltsyre, svovelsyre, hydrogenbromid og fosforsyre, dannes således de tilsvarende aminsalter. Ved omsetning med organiske syrer dannes likeledes saltet av antibiotikum 235S<sub>3</sub> og den organiske syre.

Den basiske natur av antibiotikum 235S<sub>3</sub> er også en kjennetegnende egenskap på den nye forbindelse. Når således en prøve av antibiotikum 235S<sub>3</sub> titreres potensiometrisk med 0,1N saltsyre, iakttas to basiske bindingsgrupper. Den første binding inntreer ved en pH på ca. 5,5. Den annen binding inntreer ved en pH på ca. 8,5. Denne titrering indikerer en pH<sub>1/2</sub> på ca. 7,5 og en molekylvekt på 373.

Antibiotikum 235S<sub>3</sub> gir en negativ reaksjon ved Biuret-prøven. Ved hydrolyse med 6N saltsyre under tilbakeløp er hydrolyseproduktet en α-aminosyre som har en R<sub>f</sub>-verdi på 0,52 ved papirkromatografi under anvendelse

av et oppløsningsmiddelsystem bestående av 100 deler butanol, 12 deler iseddik og 100 deler vann og ninhydrin-reagens for å bestemme aminosyre-flekken på kromatogrammet. Denne aminosyre har et smeltepunkt på 240 - 241°C.

Antibiotikum 235S<sub>2</sub> på den annen side, gir en positiv Biuret-prøve, hvilket indikerer nærvær av en amid-binding. Ved hydrolyse med 6N-saltsyre under tilbakeløp fåes en blanding av aminosyrer, hvorav en gir en Rf-verdi på 0,52 under anvendelse av papirkromatografisk bestemmelse som anvendt for hydrolyseproduktet av antibiotikum 235S<sub>3</sub>.

En osmometer-bestemmelse av molekylvekten av antibiotikum 235S<sub>3</sub> gir en verdi på 322 som, tatt sammen med mikroanalysedata, indikerer en molekylformel som følger: C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>. I lys av det forhold at molekylvekten, bestemt ved osmometeret, er et mål på en sammenbindende egenskap av molekylet, antas den å være en mere pålitelig metode for bestemmelse av molekylvekten enn titreringen som er utsatt for feil i det tilfelle at små mengder av sterkt sure eller basiske forurensninger er tilstede.

Antibiotisk materiale 235L, det annet av det synergistiske par av antibiotika innbefattet i antibiotikum 235A, har også vært fremstilt i krystallinsk form ved de nedenfor beskrevne metoder. En oppløsning av antibiotikum 235L oppviser et enkelt maksimum i det ultrafiolette absorpsjonsområdet ved 282 millimikron (E<sub>1</sub>% = 47). Smelteområdet for antibiotikumet er fra 220 - 230°C under spaltning.

Antibiotikum 235L inneholder elementene carbon, hydrogen, nitrogen, svovel og oxygen. Det følgende er en analyse av elementærsammensetningen erholdt på en prøve krystallinsk antibiotikum 235L:

Carbon	51,1
Hydrogen	7,4
Nitrogen	16,4
Svovel	0,2
Oxygen (ved differens)	24,9

Carbohydratinnholdet av 235L-molekylet målt ved orcinolmetoden ifølge Weimer, H. E. og Moshim, J. R. i Arch. Biochem. & Biophys. 92, 97 (1952) er null. Når den modifiserte Molisch-test [Dische Z., Mikrochemie 7, 33 (1929)] anvendes, finnes 235L-molekylet å inneholde mindre enn 1,0% hexose.

Den relativt store molekylvekt av antibiotikum 235L indikeres av det forhold at det ikke er dialyserbart gjennom en cellofanmembran. Bestemmelsen av molekylvekten ved ultrasentrifugering indikerer en molekylvekt på ca. 60.000.

Når det underkastes skive-elektroforese-fremgangsmåten på 7,5% polyacrylamid-gel i henhold til den metode som er beskrevet av Reisfeld et al. i Nature 195, 281 (1962), spaltes antibiotikum 235L i bånd i et karakteristisk mønster. 7,5% polyacrylamid-gelen suspenderes i en kolonne med pH 8,7 fosfatpuffer og 0,01 ml av en oppløsning av Streptavidin påføres på toppen av kolonnen. Elektroforesen får foregå i en time ved 5 milliamperes og 100 volt. Behandlingen utføres også med avidin, et tidligere kjent protein av omtrent samme molekylvekt. Båndene som utvikles ved elektroforesebehandlingen, farves med bromfenolblått. Båndene som fåes ved elektroforese av Antibiotikum 235L (Streptavidin) viser nærværet av større mengder av to proteiner og mindre mengder av to forskjellige proteiner som beveger seg intimt sammen mot anoden. Det mønster som fremkalles ved elektroforesen av avidin viser seks sterkt adskilte bånd av hvilke bare to mindre bestanddeler ligger i området for antibiotikum 235L.

Antibiotikum 235L synes å være protein-lignende eller en polypeptid-type-forbindelse da sur hydrolyse ved forhøyede temperaturen gir hydrolyseprodukter som gir en positiv prøve med ninhydrinreagenser, hvilket indikerer spaltning av amidbindinger. Antibiotikum 235L har bare en begrenset oppløselighet i vann på mindre enn ca. 1 mg/ml. Oppløseligheten i vann kan imidlertid økes opp til ca. 10 mg/ml ved tilsetning av forskjellige mengder natriumklorid til oppløsningen.

Antibiotikum 235A er virksom til å hindre veksten av gram-negative mikroorganismer. Skjønt de enkelte bestanddeler av antibiotikum 235A, d. v. s. antibiotikum 235S og 235L, når de prøves alene i konvensjonelle bedømmelses-systemer, er ineffektive til å hindre veksten av patogene mikroorganismer, virker kombinasjonen av de to som antibiotikum 235A synergistisk. Antibiotikum 235A, som en blanding av like deler av 235S og 235L, er således effektiv til å hindre veksten av *Salmonella typhosa* 2866, *Salmonella schottmuelleri* MI, *Escherichia coli* W og *Shigella sonnei* 1832.

Antibiotikum 235A er et relativt ugiftig stoff. Ved anvendelse av mus som forsøksdyr kan så mye som 500 mg/kg av 235S-bestanddelen og 400 mg/kg av 235L-bestanddelen tolereres når de injiseres intraperitonalt i musen uten noen som helst iakttagbare giftvirkninger.

Det nye antibiotikum 235A, er nyttig som et middel for å hindre veksten av gram-negative patogene organismer. Det er også nyttig til å erholde rene kulturer av mikroorganismer hvor en påvirkelig organisme kan skilles fra en resistent. Når antibiotikum 235A spaltes i sine enkelte bestanddeler, 235S og 235L, kan de individuelle bestanddeler anvendes som hjelpemidler i søkingen etter andre lignende materialer. 235S virker således som en inhibi-

tor på veksten av mikroorganismer i media som ikke inneholder eksogent biotin, men er fullstendig uvirksom for å hindre veksten av mikroorganismer i systemer inneholdende biotin-virksomme forbindelser. På denne måte kan antibiotikum 235S<sub>3</sub> anvendes ved mikrobiologiske bestemmelsessystemer for å prøve på nærvær av biotin eller biotin-virksomme materialer.

Antibiotikum 235L virker på den annen side som et biotin-kompleksdannende middel, og tillater således antibiotikum 235S å virke som en inhibitor på veksten av patogene mikroorganismer. Antibiotikum 235L er således et effektivt laboratiemiddel som kan anvendes for å undersøke ukjente prøver av mikroorganismer på deres evne til å produsere antibiotika som virker hovedsakelig ved å inhibere biotinsyntesen ved forskjellige patogene mikroorganismer.

Den antibiotiske virksomhet av antibiotikum 235A bestemmes ved agar-diffusjonsmetoden eller rørfortynningsbestemmelsesmetoden, under anvendelse av *Escherichia coli* voksende i et naturlig medium. Bestemmelsen av 235A kompliseres av det forhold at det består av et materiale med høy molekylvekt som diffunderer sakte og materialer av lav molekylvekt som diffunderer hurtig. Som følge av dette måler de vanlige agar-diffusjonsbestemmelser bare mengden av den langsomt-diffunderende bestanddel som er tilstede, da den hurtig-diffunderende bestanddel ikke selv er aktiv ved vanlige bestemmelser. Når først de to typer av bestanddeler er adskilt, er det mulig å fremstille bestemmelsesplater ved tilsetning av en tilstrekkelig mengde, 90 γ/ml, av forbindelsen av høy molekylvekt til prøven slik at dens diffusjon ikke vil begrense virksomheten av de små bestanddeler. Agar-diffusjonsmetoden utføres som følger:

En kolbe inneholdende 150 ml av et bestemmelsesmedium bestående av kjøttekstrakt 0,3%, pepton 0,5%, gjærekstrakt 0,2%, agar 1,5% og vann opptil volumet, steriliseres i autoklav i tyve minutter ved 120°C under 1,27 kg/cm<sup>2</sup>. Det flytende agar som holdes ved 45-50°C inokuleres med 5 ml av en over natten ved 37°C holdt næringsbuljongkultur av *Escherichia coli* W som er innstilt på en celle-tetthet av 60 på et Lumetron kolorimeter under anvendelse av et 600 millimikron filter. Fem ml av den podede agar pipetteres så over i en standard 90 mm steril plast-petrisål og får lov til å størkne. Etter størkning kjøles skålen inntil anvendelse i løpet av de følgende 24 timer.

Ved utførelse av prøven blir en standard 12,7 mm papirskive gjennombløtt med antibiotikumoppløsningen og derpå banket tørr på papirhåndkle og anbrakt på overflaten av en *Escherichia coli* W-podet agarplate. Platene inkuberes ved 25°C i 18 - 24 timer. Den antibiotiske aktivitet bestemmes så ved å måle sonen av inhibering rundt skiven i mm.

Rørfortynningsbestemmelsen utføres som følger:

En oppløsning fremstilles ved å tilsette 32 g "Difco" fenol-rødt buljongbase og 20 g dextrose til 1000 ml destillert vann. To ml av oppløsningen tilsettes til et reagensrør. Ni andre reagensrør inneholdende hver to ml av ovenstående oppløsning fortynnet med to ml vann fremstilles også. To ml av antibiotikumoppløsningen tilsettes til det første rør og blandes. To ml av den erholdte oppløsning overføres så til det annet rør og blandes. To ml fra dette annet rør overføres til det tredje rør og blandes. Denne fremgangsmåte gjentas til det tiende rør fra hvilket to ml av den dannede oppløsning fjernes og kastes. Til hvert av de ti rør tilsettes en dråpe "Lumetron 60" inokulat fremstilt som beskrevet ovenfor fra en 5 ml serologisk pipette. Rørene inkuberes så i et vannbad ved 37° i ca. to timer inntil kontrollrøret (et med næringsmedia av halv styrke, men uten antibiotikum) har slått over fra sin opprindelige røde farve til fullstendig gult. 10-rørs serien undersøkes så og det rør med den høyeste fortynning som fremdeles er rødfarvet, betraktes å inneholde den minimale inhiberende konsentrasjon (MIC) av antibiotikumet.

Nærværet av antibiotikum 235L kan bestemmes ved rutine agar-diffusjonsmetoder under anvendelse av *E. coli* forutsatt at tilstrekkelig antibiotikum 235S er inkorporert i agaren. På grunn av den store molekylvekt og tilsvarende lave forandring ved fortynning, mangler denne metode presisjon. Ved regulær næringsagar har nærvær av 0,6 mg/ml antibiotikum 235S vist seg å gi tilfredsstillende resultater.

Mengden av antibiotikum 235L kan bestemmes noe mere nøyaktig ved anvendelse av standard rørfortynningsbestemmelse med *E. coli* under tilsetning av et overskudd av antibiotikum 235S (100  $\gamma$ ) til bestemmelsesmediet. Resultatet uttrykkes som  $\gamma$ /ml som kreves for minimal inhiberingskonsentrasjon (MIC).

Antibiotikum 235S kan bestemmes kvantitativt på agar-diffusjonsplater under anvendelse av *E. coli*. Hvis næringsagar anvendes, er 90  $\gamma$  antibiotikum 235L per ml agar tilfredsstillende. Hvis et syntetisk næringsmedium anvendes, kreves intet antibiotikum 235L.

I sistnevnte tilfelle inhiberes virksomheten hvis biotin inkorporeres i agaren. Denne metode anvendes for å bekrefte produksjonen av antibiotika av 235-typen av kulturer erholdt ved undersøkelsesprogrammer.

Antibiotikum 235S kan også bestemmes ved rørfortynningsmetoder i nærvær av et overskudd av antibiotikum 235L.

Ved rørfortynningsbestemmelse er den minimale inhiberingskonsentrasjon for antibiotikumbestanddelene 0,5  $\gamma$ /ml for antibiotikum 235L, 25  $\gamma$ /ml for antibiotikum 235S<sub>2</sub> og 31  $\gamma$ /ml for antibiotikum 235S<sub>3</sub>.

Fremstillingen av det nye antibiotikum 235A utføres ved submers aerob fermentering av stammer av *Streptomyces avidinii* i passende vandige media. Vandige media så som de som er nyttige ved fremstilling av andre kjente antibiotika, er i almindelighet egnet for fremstilling av antibiotikum 235A. Slike media inneholder kilder for carbon og nitrogen som er assimilerbart av mikroorganismen og visse uorganiske salter som er viktige for den hurtige vekst av mikroorganismene. Dessuten inneholder fermenteringsmediet spor av metaller som er nødvendige for veksten av mikroorganismen som vanligvis er tilstede i komplekse kilder for carbon og nitrogen i mediet. I almindelighet er carbohydrater, såsom sukkerer, for eksempel dextrose, sucrose, dextrin og lignende, passende kilder for assimilerbart carbon. Den nøyaktige mengde av carbonkilde vil delvis avhenge av de andre bestanddeler i mediet, men det viser seg i almindelighet at en mengde carbohydrat mellom ca. 1 og 6 vektprocent beregnet på mediet, er tilfredsstillende. Disse carbonkilder kan anvendes enkeltvis eller flere slike kilder kan forenes i mediet.

Forskjellige nitrogenkilder så som kasein-hydrolysater, aminosyrer, for eksempel asparagin, glycin, arginin, oppsluttet soyabønne- mel, soyabønne- mel, drank og lignende, assimileres lett av de antibiotikum 235A-produserende mikroorganismer og kan anvendes i fermenteringsmedia for fremstilling av dette antibiotikum. I almindelighet er organiske kilder for nitrogen, særlig soyabønne- mel, meget tilfredsstillende ved fremstillingen av det nye antibiotikum. De forskjellige organiske og uorganiske kilder for nitrogen kan anvendes alene eller i kombinasjon, i mengder fra ca. 0,2 til ca. 6 vektprocent beregnet på det vandige medium.

Det etterfølgende er eksempler på media som er egnet for dyrkning av *Streptomyces avidinii* MA 833.

Medium Nr. 1

Gjærekstrakt	1%
Dextrose	1%
Agar	2%
oppløst i vann.	

Medium Nr. 2

"Bacto Pepton"	0,5%
Kjøtttekstrakt	0,3%
Dextrose	1%
Gjærekstrakt	0,1%

oppløst i vann. Oppløsningens pH innstilles på 7,0.

Medium Nr. 3

Dextrose	1 %
Asparagin	0,1 %
$K_2HPO_4$	0,01%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05%
Gjærekstrakt	0,05%
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	300 $\mu$ /L
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	250 $\mu$ /L
$MnSO_4 \cdot H_2O$	45 $\mu$ /L
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	47 $\mu$ /L
$(NH_4)_6M_0O_{24} \cdot 2H_2O$	19 $\mu$ /L
Borsyre	55 $\mu$ /L
$CaCl_2$	1mg/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	250 $\mu$ /L

oppløst i vann. Oppløsningens pH innstilles på 7,0.

Medium Nr. 4

Dextrose	10,0 g
Dl-Asparagin	1,0
$K_2HPO_4$	0,1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01
Gjærekstrakt	0,5
Destillert $H_2O$	1000 ml

Oppløsningens pH innstilles på 7,2.

Medium Nr. 5

Soyabønneemel	30,0 g
Drank	7,5
Cerelose	20,0
NaCl	2,5
$CaCO_3$	10,1
Destillert $H_2O$	1000 ml

Oppløsningens pH innstilles på 7,0.

Etter avslutningen av fermenteringen utvinnes antibiotikumet fra fermenteringsvæsken ved å bringe den filtrerte buljong i kontakt med en sterkt sur kationbytteharpiks. Et typisk eksempel på kationbytteharpiksen som anvendes ved utvinning av antibiotikum 235A, er "DOWEX 50 X 2" som inneholder en styren-divinyl-benzen copolymer med sulfonsyregrupper substituert i hele harpiksmassen. Ved å bringe fermenteringsbuljongen i kontakt

med kationbytteharpiksen, absorberes hovedmengden av antibiotikum 235S (bestanddelen med lav molekylvekt) på harpiksen sammen med en mindre mengde antibiotikum 235L. Hovedmengden av antibiotikum 235L passerer igjennom harpiksen og utvinnes fra avløpet ved fremgangsmåter som er beskrevet nedenfor.

Avløpet fra harpiksen inneholder antibiotikum 235L, som utvinnes i rå form ved felning med ammoniumsulfat. Det rå antibiotikum 235L renses videre ved fornyet felning fra vandig oppløsning under anvendelse av enten aceton eller ethanol som felningsmiddel. Det rå precipitat kan også alternativt renses ved dialyse av en vandig oppløsning av det rå materiale etterfulgt av felning av det delvis rensede antibiotikum 235L fra dialyseresten under anvendelse av aceton som felningsmidlet. Antibiotikum 235L isoleres også fra dialyseresiduet ved kromatografi over en "Sephadex G25"-kolonne for å fjerne gjenværende salt og omkromatograferes så under anvendelse av diethylaminoethylcellulose som adsorberingsmiddel. Antibiotikum 235L utvinnes fra avløpet fra diethylamino-ethylcellulose-kolonnen ved delvis fordampning og avkjøling for å krystallisere det antibiotiske materiale.

Antibiotikum 235S utvinnes fra ionebytteharpiks-adsorbatet ved eluering av harpiksen med fortynnet ammoniakk. Ammoniakkeluatet fra harpiksen inneholdende rått antibiotikum 235S blandet med en mindre mengde antibiotikum 235L, renses videre ifølge en fremgangsmåte ved fornyet adsorpsjon på "DOWEX W 50 X"-ionebytteharpiks. Ved eluering av det readsorberte antibiotikum 235S fra harpiksen med fortynnet ammoniakk, fåes krystallinsk antibiotikum 235S ved å konsentrere utvalgte fraksjoner og krystallisere fra vann/acetoneblandinger ved alkalisk pH.

Alternativt kan "DOWEX W 50 X"-eluatet inneholdende antibiotikum 235S renses videre ved ekstraksjon med butylalkohol og readsorpsjon av ekstraktet på "DOWEX W 50 X"-harpiks. Krystallinsk materiale fåes så fra de utvalgte fraksjoner av eluatet ved konsentrasjon.

#### EKSEMPEL 1

Et fermenteringsmedium med følgende sammensetning ble fremstilt og pH innstilt på 7,0:

Dextrose	1	%
Asparagin	0,1	%
$K_2HPO_4$	0,01	%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05	%
Gjærekstrakt	0,05	%
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	300	γ/L

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250 g/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	45 g/L
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	27 g/L
$(\text{NH}_4)_6\text{MgO}_{24} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	19 g/L
Borsyre	55 g/L
$\text{CaCl}_2$	1 mg L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250 g/L

oppløst i vann.

Ca. 3.785 l av et vandig medium av ovenstående sammensetning ble sterilisert og inokulert med et negativt inokulat av en kultur av *Streptomyces avidinii* MA 833. Det negative inokulat ble fremstilt på følgende måte. Et sterilt vandig medium ble inokulert med det lyofiliserte innhold av et rør med levedyktig *Streptomyces avidinii* MA 833, idet sammensetningen av mediet bestod av 1% gjærekstrakt og 1% dextrose i vann. Agar skråkulturer ble fremstilt fra denne suspensjon av mikroorganismer og etter utvikling i fire til fem dager ved 28°C ble de utviklede sporer skrapet over i en suspensjon av sterilt vandig medium bestående av 0,1% gjærekstrakt, 1% dextrose, 0,5% "Bacto Pepton" og 0,3% kjøtttekstrakt. Den således fremstilte sporesuspensjon ble så tilsatt til en 2-liter Erlenmeyer-kolbe med ribber, som inneholdt 500 ml sterilt vandig medium Nr. 2. Det inokulerte medium ble så inkubert ved 28°C på en roterende rystemaskin i ca. 24 timer, i løpet av hvilken tid en sterk vegetativ vekst av kulturen fant sted.

Den vegetative kultur fremstilt på ovenstående vis ble så tilsatt til et fermenteringskar inneholdende ca. 114 til 151 liter av et sterilt medium av sammensetning angitt som medium Nr. 2 ovenfor. Det inokulerte medium ble så inkubert ved 28°C i ca. 48 timer i løpet av hvilken tid mediet ble omrørt kraftig og luftet for å få en sterk vegetativ vekst av kulturen.

Ca. 8,4% av den vegetative kultur fremstilt på denne måte ble tilsatt til 354 l av et sterilt medium med sammensetning som angitt som medium Nr. 2 ovenfor, og det inokulerte medium ble inkubert ved 28°C i ca. 36 timer i løpet av hvilken tid mediet ble omrørt og luftet kraftig.

Antibiotikum-innholdet av fermenteringsbrygget ble fulgt ved agar-diffusjonsbestemmelser eller rørfortynningsbestemmelsermetoden under anvendelse av organismen *Escherichia coli* som beskrevet ovenfor. Når antibiotikumaktiviteten nådde en topp i løpet av ca. 24 til ca. 60 timer, ble fermenteringen avsluttet og fermenteringsbrygget tatt ut av fermenteringskaret.

Ca. 454 liter av fermenteringsbrygget fremstilt på den ovenfor beskrevne måte, ble filtrert og cellene kastet. Filtratet inneholdende det antibiotisk aktive materiale, ble innstilt på pH 5 og perkolert gjennom en kolonne

inneholdende 8 liter "DOWEX W 50 X" i natrium-cyklusen ved en hastighet på ca. 800 ml/min. Etter adsorpsjon av det antibiotiske materiale på harpiksen, ble harpiksen vasket med vann og eluert under anvendelse av 0,5N ammoniumhydroxyd ved en elueringshastighet på 250 ml/min. Hovedmengden av det antibiotisk aktive materiale ble samlet i ca. fire 2-liter fraksjoner eluat inneholdende en større mengde antibiotikum 235S og en mindre mengde antibiotikum 235L.

Den annen og tredje fraksjon ble forenet og pH innstilt på 7,5, og derpå inndampet til et volum på ca. 440 ml. Ca. 90 ml. av dette "DOWEX W 50 X"-konsentrerte eluat ble dialysert i en cellofanpose under anvendelse av tre 1-liter volum vann som dialysevæske. Dialysatene ble så forenet og inndampet til ca. 80 ml. Hverken dialysatkonsentratet eller dialyseresiduet hadde noen antibiotisk aktivitet målt mot *Escherichia coli* ved rørfortynningsbestemmelsen, men ved gjenforening av residuet og dialysatet hadde den erholdte kombinasjon antibiotisk virkning ved samme *Escherichia coli*-rørfortynningsbestemmelse.

#### EKSEMPEL 2

Seksti ml "DOWEX W 50X"-konsentrert eluat, fremstilt som beskrevet i eksempel 1, ble kromatografert på en 1-liter "Sephadex 25"-kolonne, idet utviklingsmidlet for kromatogrammet var destillert vann. De første 360 ml avløpsvæske ble kastet, hvoretter 27 fraksjoner hver på 25 ml ble oppsamlet. Ingen antibiotisk virkning fantes i noen av de oppsamlede fraksjoner bestemt ved *Escherichia coli*-agar-plate-bestemmelse.

To eluatkonsentrater ble fremstilt ved å forene fraksjoner 1-9, og fraksjoner 17-20. Fraksjoner 1-9 ble konsentrert til 20 ml og inneholdt konsentrert oppløsning av antibiotikum 235L som igjen ble utvunnet ved lyofilisering. Fraksjonene 17-20 ble inndampet til 10 ml og det delvis rensede antibiotikum 235S ble utvunnet i fast form ved lyofilisering av konsentratet.

Ovenstående kromatografiske forsøk ble gjentatt under anvendelse av 60 ml av samme "DOWEX W 50 X"-konsentrerte eluat som utgangsmateriale. Eluatfraksjoner 8 og 9 fra kromatograferingskolonnen ble forenet og konsentrert. Ved henstand krystalliserte antibiotikum 235L fra oppløsningen og ble utvunnet ved filtrering.

#### EKSEMPEL 3

3761 liter filtrert fermenteringsbrygg fremstilt som beskrevet i eksempel 1 ble ført gjennom "DOWEX W 50X"-harpiks og harpiks-adsorbatet eluert med 0,5N ammoniumhydroxydoppløsning. En 2,6 liter fraksjon av eluatet (1/16 av totalvolumet) ble innstilt på pH 9 under anvendelse av vandig

natriumhydroxydoppløsning og ekstrahert med tre 6-liter porsjoner n-butylalkohol. n-butylalkohol-ekstraktet ble fortynnet med vann og inndampet i vakuum til et volum på 2800 ml. En liter av n-butylalkohol-konsentratet ble inndampet videre til et volum på 40 ml og kromatografert over en 2-liter "Sephadex 25" (dextran) kromatograferingskolonne. Avløpene fra kolonnen med høyt innhold av faste stoffer ble innstilt på pH 3,8 og adsorbent på 50 ml "DOWEX W 50 X 2"-harpiks med en hastighet på 1 ml/min. Det erholdte harpiksadsorbat ble eluert med 0,2N ammoniumhydroxydoppløsning og ammoniumakkalske eluatfraksjoner på 25 ml i volum ble oppsamlet. Fraksjoner nr. 11 og 12 som utgjorde tilsammen 50 ml, ble inndampet til ca. halvt volum og fortynnet med 96 ml aceton for å bevirke krystallisasjon. Krystallene erholdt på denne måte, var antibiotikum 235S<sub>3</sub> i praktisk talt ren form.

Harpikseluatfraksjoner nr. 6 - 10 ble forenet og konsentrert til ca. 20 ml, og 120 ml aceton tilsatt for å bevirke krystallisasjon. De dannede 1,2 g krystaller viste seg å bestå av en blanding av antibiotikum 235S<sub>3</sub> og antibiotikum 235S<sub>2</sub> i et forhold på ca. 9:1.

#### EKSEMPEL 4

Ca. 3785 liter filtrert fermenteringsbrygg fremstilt ved fremgangsmåte beskrevet i eksempel 1, ble ført gjennom ca. 80 liter "DOWEX W 50 X 2"-harpiks. Avløpet fra harpikskolonnedadsorpsjonen ble behandlet med ammoniumsulfat i en mengde av 500 g ammoniumsulfat per liter avløp og det dannede bunnfall skilt fra ved filtrering. Bunnfallet ble oppløst i ca. 34 liter vann og dialysert i cellofanpose i ca. 24 timer. Residuet fra dialysen ble fortynnet med 1,5 volum aceton for å felle et rått materiale inneholdende antibiotikum 235L. Det rå bunnfall ble oppløst i vann, gjenutfelt med ethylalkohol og tørret. Ca. 50 g av det faste materiale fremstilt på denne måte, ble suspendert i vann, sentrifugert og den ovenstående oppløsning ble kromatografert over 5,5 liter "Sephadex 25" under anvendelse av destillert vann som fremkallingsmiddel. Ca. 1550 ml oppløsning inneholdende praktisk talt rent antibiotikum 235L ble oppsamlet og frysetørret. Et gram av de faste stoffer fremstilt på denne måte, ble oppløst i 25 ml vann og den vandige oppløsning ført igjennom 15 ml diethylaminoethylcellulose. Det forenede avløp ble konsentrert til ca. 15 ml og avkjølt hvorpå praktisk talt rene krystaller av antibiotikum 235L med et smeltepunkt på 225-229°C ble erholdt.

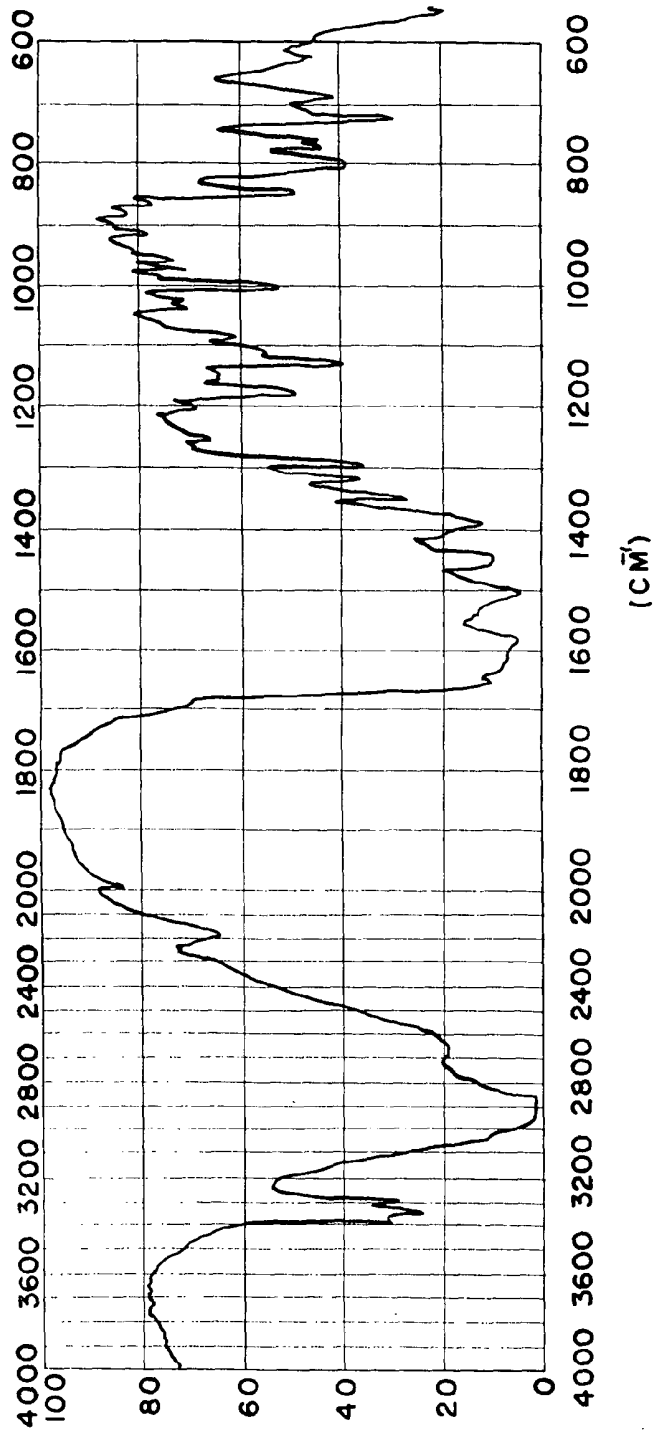
## Patentkrav

1. Fremgangsmåte ved fremstilling av Antibiotikum 235A og komponentene 235L og 235S derav, karakterisert ved at en mikroorganisme av arten *Streptomyces avidinii* dyrkes i et vandig næringsmedium og antibiotikumet utvinnes fra dette og eventuelt skilles i sine komponenter 235L og 235S.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at der som mikroorganisme anvendes *Streptomyces avidinii* NRRL 3077.

Anførte publikasjoner: -

Fig. 1.

235S3



120932