



⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **8005235**

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 **Antibioticum en werkwijze ter verkrijging daarvan.**
- ⑤1 Int.Cl³: C12P7/00, A61K35/74.
- ⑦1 Aanvrager: The Upjohn Company te Kalamazoo, Michigan, Ver. St. v. Am.
- ⑦4 Gem.: Ir. C.M.R. Davidson c.s.
Octrooibureau Vriesendorp & Gaade
Dr. Kuiperstraat 6
2514 BB 's-Gravenhage.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 8005235.
- ②2 Ingediend 19 september 1980.
- ③2 Voorrang vanaf 2 oktober 1979.
- ③3 Land van voorrang: Ver. St. v. Am. (US).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 81104 .
- ②3 - -
- ⑥1 - -
- ⑥2 - -

-
- ④3 Ter inzage gelegd 6 april 1981.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Antibioticum en werkwijze ter verkrijging daarvan.

De uitvinding heeft betrekking op een nieuw antibioticum met de code U-59761. Dit nieuwe antibioticum wordt gevormd door fermentatie onder beheerste omstandigheden waarbij gebruik wordt gemaakt van een biologisch zuivere cultuur van
5 het nieuwe micro-organisme Saccharopolyspora hirsuta stam 367, NRRL 12045, gedeponeerd op 24 september 1979.

Het antibioticum U-59761 is werkzaam tegen verschillende bacteriën en leent zich daarom voor het desinfecteren van afgewassen en opgestapeld eetgerij dat is besmet
10 met S. aureus. Omdat het antibioticum U-59761 ook werkzaam is tegen Mycobacterium avium, kan het worden toegepast voor het behandelen van tuberculose bij vogels en konijnen. Daarnaast kan het antibioticum U-59761 worden toegepast voor het bacteriostatisch reinigen van gewassen kledingsstukken en voor het
15 impregneren van papier en textielweefsels. Nog een andere toepassing is het remmen van de groei van gevoelige organismen bij plaat-bepalingsmethoden en in microbiologische media.

Chemische en fysische eigenschappen van antibioticum U-59761

20 Molekuulgewicht: 422,2269 (massaspectrometrie).
Brutoformule: $C_{23}H_{34}O_7$
Elementair analyse: C; 65,63 %; H; 7,97 %
Optische rotatie: $[\alpha]_D^{25} = 121^\circ$ (C; 0,7575 MeOH).
Ultraviolet absorptie: alleen eindabsorbtie.

25 Oplosbaarheid: Oplosbaar in methanol en ethanol;
minder oplosbaar in methylchloride en methyleenchloride;
betrekkelijk onoplosbaar in petroleumether en cyclohexaan.

Smeltpunt: 201-206°C.

Infraroodabsorptiespectrum:

Antibioticum U-59761 bezit een karakteristiek infrarood absorptiespectrum in indifferente mineraal olie zoals weergegeven in fig. 1. De golfgetallen voor de pieken, uitgedrukt in reciproke centimeters, zijn als volgt:

Bandfrequentie (golfgetallen)	intensiteit
3415	S
3290	M. schouder
3069	Z
3042	Z
2990	M
2960	S
2925	S
2872	S
2854	S
2824	M
2724	Z
2652	Z
1701	S
1651	Z
1465	M, schouder
1453	S
1421	Z
1376	M
1366	M
1349	M
1335	M
1328	M
1314	M
1295	S
1273	M
1250	M
1239	M
1231	M
1213	Z
1190	Z

8005235

<u>Bandfrequente (golfgetallen)</u>	<u>intensiteit</u>
1183	Z
1168	Z
1153	M
1139	Z
1124	M
1111	S
1104	S
1089	M
1079	M
1057	M
1029	S
1017	S
1002	M
990	S
970	M
961	M
950	M
937	M
928	Z
907	Z
887	M
879	M
875	Z
856	Z
820	Z
796	Z
781	Z
758	M
717	M
687	Z
660	M
648	M
631	M

8005235

S: sterk; M: middelmatig; Z: zwak.

¹³C-Kernmagnetisch resonantie (NMR) spectrum:

Antibioticum U-59761 bezit een karakteristiek

¹³C-NMR spectrum zoals weergegeven in fig. 2.

5 Antimicrobieel spectrum van antibioticum U-59761:

Antibioticum U-59761 is actief tegen de volgende microorganismen:

		<u>Agar diffusie</u>	
		<u>Organisme</u>	<u>inhibitie zone, mm*</u>
10		<u>B. subtilis</u> UC 564	0
		<u>B. subtilis</u> UC 6033	0
		<u>S. aureus</u> UC 70	spoortje
		<u>S. aureus</u> UC 3665	17
		<u>S. aureus</u> UC 6029	spoortje
15		<u>S. lutea</u> UC 130	35
		<u>S. lutea</u> UC 3383	34
		<u>S. lutea</u> sens	38
		<u>K. pneumoniae</u> UC 58	27
		<u>E. coli</u> UC 51	0
20		<u>S. schottmuelleri</u> UC 126	0
		<u>P. vulgaris</u> UC 93	0
		<u>P. aeruginosa</u> UC 95	0
		<u>M. avium</u> UC 159	26
		<u>P. oxalicum</u> UC 1268	0
25		<u>S. pastorianus</u> UC 1342	0
		<u>R. sphaeroides</u> UC 3238	20
		<u>S. pyogenes</u> UC 6055	0
		<u>B. fragilis</u> UC 6513	33
		<u>C. perfringens</u> UC 6509	33

30 *) Schleicher en Schuell Inc., 704 papierschijfjes (12,7 mm) gedompeld in 1 mg/ml methanolische oplossing van antibioticum, gedroogd en op geënte agarplaten gelegd; bepaling van de inhibitiezone na 16 uren incuberen.

35 Een oplossing van Antibioticum U-59761 in ethanol

8005235

werd verdund in BHI bouillon (Difco), en de minimale remmende concentraties werden bepaald met de standaard microplaatbouillon verdunningsmethode.

	Microorganisme	UC	minimale remmende concentratie (µg/ml)
5	<u>S. aureus</u>	76	125
		570	125
		746	250
	<u>S. fecalis</u>	694	1000
10	<u>S. pyogenes</u>	152	500
	<u>D. pneumoniae</u>	41	1000
	<u>E. coli</u>	45	1000
	<u>K. pneumoniae</u>	58	1000
	<u>P. vulgaris</u>	93	1000
15	<u>PS. aeruginosa</u>	95	1000
	<u>S. schottmuelleri</u>	126	1000

"UC" is een geregistreerd handelsmerk voor de Upjohn Company cultuurverzameling. Deze cultures zijn op verzoek verkrijgbaar bij de Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan.

20 Het microorganisme

Het voor de vorming van Antibioticum U-59 761 gebruikte microorganisme is een biologisch zuivere cultuur van Saccharopolyspora hirsuta stam 367, NRRL 12045.

25 Een subcultuur van dit microorganisme is verkrijgbaar bij de permanente verzameling van het Northern Regional Research Laboratory, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, Amerika. De cultuur kan worden opgevraagd onder verwijzing naar het deponeringsnummer NRRL 12045. Het is duidelijk, dat de cultuur alleen mag worden toegepast zonder inbreuk te

30 maken op verkregen octrooirechten.

Het microorganisme volgens de uitvinding werd onderzocht en gekarakteriseerd door Alma Dietz en Grace P. Li van The Upjohn Company Research Laboratories.

35 Een actinomyceet geïsoleerd in het Upjohn grondonderzoeklaboratorium bleek bij onderzoek de microscopische,

macroscopische en totale celhydrolysaateigenschappen van het genus Saccharopolyspora te bezitten (Iwasaki, A., N. Itoh en T. Mori, 1979: A new broad-spectrum aminoglycoside antibiotic complex, sporaricin. II. Taxonomische onderzoeken aan de sporaricine vormende stam Saccharopolyspora hirsuta subsp, kobensis nov. subsp. J. Antibiotics. 32: 180-186). (Lacey, J. en M. Goodfellow, 1975: A novel actinomycete from sugar-cane bagasse: Saccharopolyspora hirsuta gen. et sp. nov. J. Gen. Microbiol 88:75-85). Een vergelijking met de type cultuur Saccharopolyspora hirsuta ATCC 27875 is vermeld in onderstaande tabellen A en B. Een vergelijking met de type cultuur en met de subspecies Saccharopolyspora hirsuta ss. kobensis ATCC 20501 (Iwasaki, A. supra) gebaseerd op voor deze stammen gepubliceerde data, is vermeld in onderstaande tabel C.

Unieke eigenschappen van het genus Saccharopolyspora zijn z'n boter of gelatine-type vegetatieve groei, schaarse aeriële groei die zich het beste laat onderzoeken na 21 dagen incuberen, gele tot oranje tot oranje-taan vegetatieve groei en pigmentvorming, ontwikkeling van sporeketens tot een schede met unieke haarkwastjes met afgeknotte bases en gladde oppervlakken tussen de kwastjes, en de aanwezigheid van meso-diaminopimellinezuur, arabinose en galactose in totale celhydrolysaten en in celwandpreparaten. Behalve meso-diaminopimellinezuur werd ook L-diaminopimellinezuur in de celwandpreparaten aangetoond.

Van de vorming van antibioticum door de type cultuur is nimmer melding gemaakt. Het subspecies kobensis vormt het antibiotisch complex sporaricine (KA-6606) (Iwasaki, A. supra). Het nieuwe isolaat volgens de uitvinding onderscheidt zich daarvan door de vorming van Antibioticum U-59760. Het enige significante verschil tussen de stammen bestaat uit het vermogen antibioticum te vormen. In verband hiermee is de nieuwe stam volgens de uitvinding aangeduid als Saccharopolyspora hirsuta stam 367. De toegepaste taxonomische methoden zijn aangehaald in het werk van Dietz (Dietz, A. 1954:

- Ektachrome transparencies as aids in actinomycete classification, Ann N.Y. Acad. Sci. 60: 152-154) (Dietz, A. 1967. Streptomyces steffisburgensis sp. n. J. Bacteriol. 94: 2022-2026), Dietz en Mathews (Dietz, A. en J. Mathews; 1971, Classification of Streptomyces spore surfaces into five groups. Appl. Microbiol. 21: 527-533), Becker et al. (Becker, B., M.P. Lechevalier en H.A. Lechevalier, 1966: Chemical composition of cell wall preparations from strains of various form-genera of aerobic actinomycetes, Appl. Microbiol. 13 236-243), Lechevalier en Lechevalier (Lechevalier, H.A. en M.P. Lechevalier. 1970: A critical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes, p. 393-405. In H. Prauser (ed.), The Actinomycetales. Gustav Fisher, Jena). (Lechevalier, M.P. en H.A. Lechevalier. 1970: Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes, Int. J. Syst. Bacteriol. 20: 435-443) en Shirling en Gottlieb (Shirling, E.B. en D. Gottlieb. 1966: Methods for characterization of Streptomyces species. Int. J. Syst. Bacteriol. 16: 313-340).

Kleurkarakteristieken:

- Aerieel mycelium grijs tot grijs-rose (zeer schaars na 14 dagen). Melanine negatief. Uiterlijk op Ektachrome vermeld in onderstaande tabel A. De oppervlaktekleuren van de vegetatieve groei werden vastgesteld als rood (R) of geel (G) door vergelijking met de Tresner en Backus standaard kleurschijven (Tresner, H.D. en E.J. Backus, 1963: System of Color wheels for streptomycete taxonomy, Appl. Microbiol. 11: 335-338).

Microscopische eigenschappen

- Sporemassa's en sporeketens, intact en gefragmenteerd, en buigzame of losjes gespiraliseerde ketens, zoals waargenomen met Scanning Electron Microscopy, schijnen zich te ontwikkelen tot een schede die aanvankelijk bijna glad is maar waarop zich later unieke haarkwastjes (driehoekig aan de basis) vormen. Het oppervlak tussen de kwastjes is glad. Tenslotte wordt de schede bedekt met fijne lange haren. De lange scheden zijn verward en schijnen voort te komen uit of zich te verenigen

tot pseudosporangia. Wanneer de ketens met het substraat in aanraking komen, worden de sporen glad in omtrek met een verzonken of kamvormig uiterlijk. In de ontwikkelde ketens zijn "lege" hyfen waargenomen. De microscopische karakteristieken
 5 laten zich het beste waarnemen na 21 dagen incuberen bij 28-37°C. In 21 dagen oude cultures is nocardioform fragmentatie waarneembaar.

Groei op koolstofverbindingen.

Onder de proefomstandigheden van Shirling en
 10 Gottlieb (supra) was de groei goed op de positieve controle (basaal medium plus D-glucose), sucrose, D-mannitol, D-fructose en raffinose, twijfelachtig op L-arabinose en D-xylose en afwezig op de negatieve controle (alleen basaal medium), inositol, rhamnose en cellulose.

15 Totale celanalyse
 meso-diaminopimellinezuur, arabinose en galactose werden aangetoond.

Celwandanalyse
 Meso-diaminopimellinezuur, L-diaminopimellinezuur,
 20 arabinose en galactose werden aangetoond.

Cultuur en biochemische karakteristieken:
 zie tabel B.

Temperatuur
 25 Geen tot zeer arme groei bij 18°C op Bennett's en maltose-tryptonagars en arme groei op Czapek's sucrose agar. De groei was goed bij 24-45°C. Geen groei bij 55°C.

30

Tabel A

Kleurkarakteristieken* van Saccharopolyspora hirsuta ATCC 27875 en S. hirsuta stam 367 op Ektachrome

Agarmedium	Bepaling	S. hirsuta ATCC 27875		S. hirsuta stam 367	
		schijfnr.	kleur	schijfnr.	kleur
Bennett's	B	71	matig oranje geel	71	matig oranje geel
	O	71	matig oranje geel	71	matig oranje geel
Czapek's sucrose	B	74	sterk geelachtig bruin	67	brilliant oranje geel
	O	72	donker oranje geel	67	brilliant oranje geel
Maltose-trypton	B	71	matig oranje geel	71	matig oranje geel
	O	71	matig oranje geel	71	matig oranje geel
Pepton-ijzer	B	68	sterk oranje geel	68	sterk oranje geel
	O	68	sterk oranje geel	68	sterk oranje geel
O,1 % Tyrosine	B	73	bleek oranje geel	71	matig oranje geel
	O	73	bleek oranje geel	71	matig oranje geel
Caseïne	B	73	bleek oranje geel	70	licht oranje geel
	O	73	bleek oranje geel	73	bleek oranje geel

*kleurbepaling door vergelijking met NBS kleurschijven (SP 440. Kleur: Universal Language and Dictionary of Names. U.S. Government Printing Office, Washington, DC 20402. SRM 2106. ISCC-NBS Centroid Color Charts. Office of Standard Reference Material, Room B311, Chem. Building, National Bureau of Standards, Washington, DC 20234. B= bovenkant O= onderkant.

Tabel B

Cultuur en biochemische karakteristieken van *Saccharopolyspora hirsuta* stammen.

Agarmedium	Bepaling	S. hirsuta ATCC 27875	S. hirsuta stam 367
pepton-ijzer	B	kleurloos	kleurloos of lichttaan verward (V)
	O	bleekgeel	oranje-taan
	P	-	bleek taan tot oranje-taan
	A	melanine negatief	melanine negatief
calciummalaat	B	spoortje wit (A)	spoortje grijs (A)
	O	crème	bleekgrijs crème
	P	-	-
	A	malaat gesolubiliseerd	malaat iets gesolubiliseerd
glucose asparagine	B	kleurloos tot lichttaan (V)	lichttaan (V)
	O	oranje	oranje-taan
	P	oranje	oranje-taan
Taitemelk	B	taan (V)	oranje-bruin (V)
	O	oranje-taan	donker oranje-taan
	P	oranje-taan	diep oranje-taan
	A	caseïne gesolubiliseerd	caseïne gesolubiliseerd
Tyrosine	B	taan (V)	oranje-taan (V)
	O	oranje	oranje
	P	oranje	oranje
	A	tyrosine gesolubiliseerd	tyrosine gesolubiliseerd

Agarmedium	Bepaling	Tabel B (vervolg)	
		S. hirsuta ATCC 27875	S. hirsuta stam 367
Xanthine	B	kleurloos (V)	bleek taan (V)
	O	bleekgeel	bleek taan
	P	bleekgeel	bleek taan-perzik
	A	xanthine gesolubiliseerd rondom groei	xanthine gesolubiliseerd
Nutrient zetmeel	B	kleurloos (V)	bleek taan (V)
	O	bleekgeel	bleek taan
	P	zeer bleekgeel	zeer bleek taan
	A	zetmeel gehydrolyseerd	zetmeel gehydrolyseerd
Gist extract-mout extract	B	kleurloos (V)	bleek taan (V)
	O	oranje	bleek oranje-taan
	P	oranje	oranje
	B	kleurloos (V) met heel klein spoortje wit (A)	kleurloos (V)
Tyrosine (ISP-7)	O	geel-taan	licht oranje-taan tot taan
	A	melanine negatief	melanine negatief
	B	spoortje wit (A)	zeer bleek oranje (V)
	O	geel taan	zeer bleek oranje
	A	melanine negatief	melanine negatief

Tabel B (vervolg)

Agarmedium	Bepaling	S. hirsuta ATCC 27875	S. hirsuta stam 367
gelatine			
gewoon	B	spoortje wit (A) op kleur-loos oppervlak vliesje	kleurloos tot bleekgeel (V)
	P	geen	geen tot spoortje bleekgeel
	A	gelatine vervloeid	gelatine vervloeid
Nutrient	B	spoortje wit (A) op geel (V) vliesje	spoortje kleurloos (V) tot spoortje wit (A) op (V)
	P	geen	geen
	A	gelatine vervloeid	gelatine vervloeid
bouillon			
synthetisch nitraat	B	geen oppervlaktegroei	spoortje wit (A) op kleur-loos (V)
	P	geen	geen
	A	compacte bodemgroei geen reductie	compacte tot vlokke bodem-groei geen reductie
Nutrient nitraat	B	spoortje wit (A) op kleur-loos oppervlak vliesje	spoortje wit (A) op kleur-loos oppervlak ring
	P	geen	geen
	A	vlokkige bodemgroei; geen reductie	arme kleurloze compacte bodem-groei; geen reductie

Tabel B (vervolg)

Agarmedium	Bepaling	S. hirsuta ATCC 27875	S. hirsuta stam 367
lakmoes melk	B	bleekgrijs (A) op geel-taan oppervlak ring	blauw-grijs oppervlak ring
	P	geen	diep rood-taan
	O	lakmoes niet gereduceerd pH 6,7-7,3	peptonisatie pH 7,6-7,8
	B: Bovenkant O: Onderkant P: Pigment	A: Andere karakteristieken (V): vegetatieve groei (A): Aeriële groei	

Tabel C
Vergelijking van Saccharopolyspora hirsuta stammen

Proeven	S. hirsuta stam 367	S. hirsuta ATCC 27875	S. hirsuta kobensis ATCC 20501
<u>Fysiologische eigenschappen</u>			
temperatuur	groeï bij 18-45°C	groeï bij 25-45°C	groeï bij 18-45°C
optimale temperatuur	28-45°C	37-40°C	37-42°C
gelatine vervloeiing	compleet	positief bij 27°C	positief bij 27°C
zetmeel hydrolyse	positief	positief	positief
uitwerking op melk	geen coagulatie peptonisatie	geen coagulatie peptonisatie	geen coagulatie peptonisatie
melanoïde pigment vorming	negatief	negatief	negatief
nitraat reductie	negatief	negatief	positief

Tabel C (vervolg)

Proeven S. hirsuta stam 367 S. hirsuta ATCC 27875 S. hirsuta kobensis ATCC 20501

Koolstofbronbenutting

L-Arabinose	+-	-	-
D-xylose	+-	+	-
L-ramnose	-	+	-
D-glucose	+	+	+
D-fructose	++	+	+
sucrose	+	+	+
raffinose	++	+	+
inositol	-	+	-
D-mannitol	++	+	+

Het antibioticum volgens de uitvinding wordt gevormd door het microorganisme te kweken in een waterig voedingsmedium onder submerse, aerobe omstandigheden. Voor de vorming van kleine hoeveelheden kunnen oppervlakte-cultures en kolven worden gebruikt. Het voedingsmedium bevat een koolstofbron bijvoorbeeld een assimileerbaar koolhydraat, en een stikstofbron bijvoorbeeld een assimileerbare stikstofverbinding of een eiwitachtig materiaal. Als koolstofbron worden bij voorkeur gebruikt glucose, bruine suiker, sucrose, glycerol, zetmeel, maiszetmeel, lactose, dextrine en melasse. Voorkeurs stikstofbronnen omvatten maisweekvloeistof, gist, geautolyseerde brouwersgist, witte bestanddelen uit melk, sojaboonmeel, katoenzaadmeel, maismeel, vaste melkbestanddelen, pancreatisch verteerd caseïne, vismeel, vaste bestanddelen afkomstig uit destilleerderijen, dierlijke peptonvloeistoffen en vlees- en beenderschraapsel. Deze koolstof en stikstofbronnen kunnen met elkaar worden gecombineerd. Omdat kraanwater en ongezuiverde bestanddelen worden gebruikt als componenten voor het medium, behoeven geen spore-metalen zoals zink, magnesium, mangaan, kobalt en ijzer te worden toegevoegd alvorens het medium te steriliseren.

De fermentatie wordt in het algemeen uitgevoerd bij een temperatuur van ongeveer 18-40°C en bij voorkeur ongeveer 20-28°C. Het optimum in de vorming van het antibioticum wordt gewoonlijk in ongeveer 3-15 dagen bereikt. De eind pH van het fermentatiemedium is afhankelijk van de begin pH van het medium en van buffers voor zover aanwezig.

Wanneer het kweken wordt uitgevoerd in grote vaten en ketels, verdient het voorkeur om voor de enting in plaats van de sporevorm de vegetatieve vorm te gebruiken om een sterke lag in de vorming van het antibioticum alsook ondoelmatig gebruik van de apparatuur te vermijden. Daarom is het gewenst om in een voedingsmedium een vegetatieve ent te vormen door het medium te enten met een evenmatige hoeveelheid grond, vloeibare N₂ agar prop of scheve-buis-kweek. Wanneer men zich

aldus van een jonge, aktieve vegetatieve ent heeft verzekerd, wordt deze onder aseptische omstandigheden in grote vaten of tanks overgebracht. Voor het vormen van de vegetatieve ent kan het-zelfde of een ander medium worden gebruikt als voor
 5 de vorming van het antibioticum mits het microorganisme daarin goed groeit.

Het gevormde antibioticum kan uit de cultuurvloeistof worden geïsoleerd door extraheren met bijvoorbeeld methyleenchloride, aceton, butanol of ethylacetaat, en worden
 10 gezuiverd door silicagel-chromatografie.

Bij voorkeur wordt het antibioticum uit de cultuurvloeistof gewonnen door afscheiden van mycelium en onopgeloste vaste bestanddelen door filtreren, centrifugeren of extractie van de myceliumkoek en/of opgehelderde cultuurvloeistof met bijvoorbeeld ethylacetaat, butanol, MIBK of
 15 bij voorkeur methyleenchloride. Het extract wordt dan onder verminderde druk ingedampt en het antibioticum wordt uit het residu gewonnen door dit te chromatograferen over silicagel onder elueren met methanol en methyleenchloride.

20 Voorbeeld I

A. Fermentatie

Erlenmeyerentkolven met een inhoud van 500 ml die elk 100 ml steriel medium bevatten, worden geënt met een biologisch zuivere cultuur van Saccharopolyspora hirsuta
 25 stam 367, NRRL 12045. De samenstelling van het medium is als volgt:

Glucosemonohydraat	25 g/l
Pharmamedia*	25 g/l
Kraanwater q.s.	1 liter
pH 7,2 (voorsterilisatie)	

30 *Pharmamedia is een katoenzaadmeel van technische kwaliteit afkomstig van Traders Oil Mill Company, Fort Worth, Texas.

De ent wordt 3 dagen bij 28°C gekweekt in een
 35 Gump rotatie schudinrichting bij een snelheid van 250 omw./min. en

met een slag van ongeveer 6 cm.

Hierna worden Erlenmeyerkolven met een inhoud van 500 ml die elk 100 ml steriel fermentatiemedium bevatten, met het entmedium geënt (5 ml entmedium per 100 ml fermentatiemedium). De samenstelling van het fermentatiemedium is als volgt:

5	glucosemonohydraat	10 g/l
	dextrine	20 g/l
	maisweekvloeistof	2,5 g/l
	NH_4NO_3	3,0 g/l
10	NaCl	2,0 g/l
	CaCO_3	5,0 g/l
	pH 7,2 (voorsterilisatie)	

De fermentatiekolven worden 5 dagen geïncubeerd bij een temperatuur van 28°C in een Gump rotatie schudinrichting bij een snelheid van 250 omw./min. en met een slag van ongeveer 6 cm. De hoeveelheid in de fermentatievloeistof gevormd antibioticum na 2, 3, 4 en 5 dagen bedraagt:

	aantal dagen	hoeveelheid gevormd antibioticum, BE/ml ^{*)}
20	2	8,0
	3	10,4
	4	10,4
	5	11,2

^{*)} bepaald met *S. lutea* schijfplaten

Een bioeenheid (BE) wordt gedefinieerd als de concentratie antibioticum die onder standaardbepalingsomstandigheden een inhibitiezone van 20 mm geeft. Wanneer bijvoorbeeld een cultuurvloeistof tot 1/100 moet worden verdund om een inhibitiezone van 20 mm te geven, bedraagt de werkzaamheid van een dergelijke cultuurvloeistof 100 BE/ml.

B. Isolering en zuivering

De totale cultuurvloeistof (ongeveer 5000 liter) wordt met NaOH op een pH 7,3 gebracht en gefiltreerd op een 75 cm filterpers met als filtreerhulpmiddel diatomeeënaarde. Tijdens het filtreren wordt de filterkoek met water gewassen.

Aldus wordt 5500 liter heldere cultuurvloeistof verkregen die vervolgens 2x met steeds 1400 l methyleenchloride wordt geextraheerd. De verenigde extractoplossingen (in totaal 2800 liter) worden in vacuo geconcentreerd tot een volume van 10 liter. De aktiviteit van het concentraat zoals bepaald met S. lutea schijfplaten bedraagt 2424 BE/ml.

Het concentraat (9 liter) wordt vervolgens gechromatografeerd over een kolom die 9 kg silicagel (E. Merck-silicagel 7734) bevat onder elueren met achtereenvolgens 20 l methyleenchloride, 40 l 2 % methanol bevattende methyleenchloride, 150 l 5 % methanol bevattende methyleenchloride en tenslotte 100 l 10 % methanol bevattende methyleenchloride. Na een voorloop van 80 l worden 4-liter frakties verzameld die worden geanalyseerd op de aanwezigheid van antibioticum U-59761. Dit zijn de frakties 10-19.

De frakties 10-19 worden geconcentreerd waarbij kristallijn antibioticum U-59761 (41,4 g) wordt verkregen. Door de moederlogen te chromatograferen over silicagel onder elueren met ethylacetaat wordt nog 12,8 g kristallijn antibioticum U-59761 verkregen.

C o n c l u s i e s

1. Antibioticum, met het kenmerk dat, het antibioticum met de code U-59761 actief is tegen verschillende microorganismen, en in zuivere of nagenoeg zuivere vorm de volgende karakteristieken bezit:

- (a) molekuulgewicht: 422,2269 (massaspectrometrie),
- (b) elementair analyse: C: 65,63 % en H: 7,97 %,
 - (c) optische rotatie: $[\alpha]_D^{25} = +121^\circ$ (c: 0,7575 MeOH),
- (d) oplosbaar in methanol en ethanol, minder oplosbaar in methylchloride en methyleenchloride, en betrekkelijk onoplosbaar in petroleumether en cyclohexaan,
- (e) smeltpunt: 201-206°C,
- (f) karakteristiek infrarood absorptiespectrum gemeten aan een oplossing in een indifferente minerale olie: zoals weergegeven in fig. 1, en
- (g) karakteristiek ^{13}C -NMR spectrum: zoals weergegeven in fig. 2.

2. Werkwijze voor het vormen van een antibioticum langs microbiële weg, met het kenmerk dat, antibioticum met de code U-59761 wordt gevormd door kweken van Saccharopolyspora hirsuta stam 367, NRRL 12045, in een waterig voedingsmedium onder aerobe omstandigheden totdat een aanmerkelijke antibiotische U-59761 activiteit aan het medium is verleend.

3. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk dat, het waterig voedingsmedium een bron van assimileerbare koolhydraat en assimileerbare stikstof bevat.

4. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk dat Antibioticum U-59761 uit de cultuurvloeistof wordt gewonnen door

- (a) de cultuurvloeistof te filtreren,
- (b) de heldere cultuurvloeistof te extraheren met een oplosmiddel voor Antibioticum U-59761,
- (c) de extractoplossing van het antibioticum te

concentreren, en

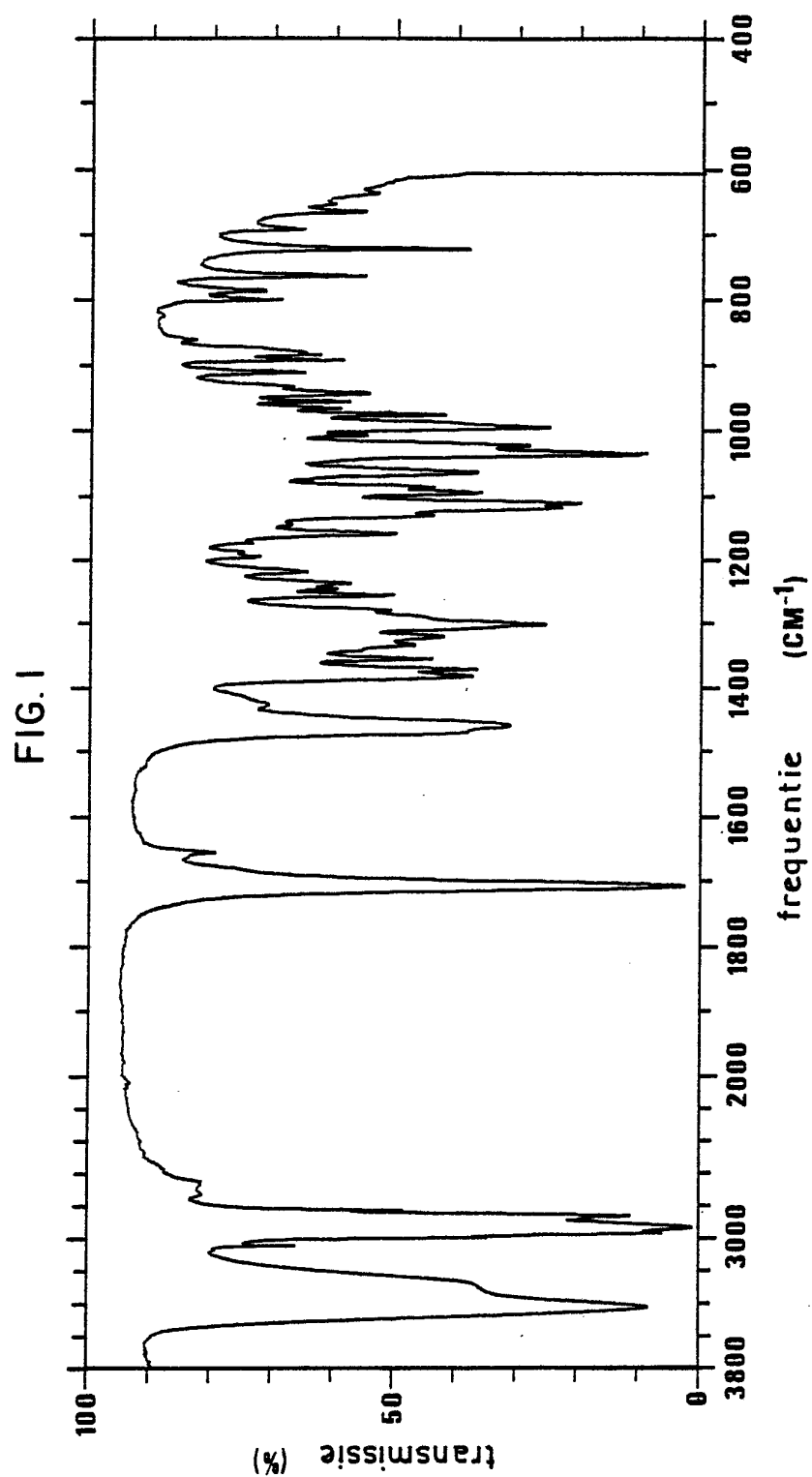
(d) het concentraat te chromatograferen over silicagel en uit het eluaat zuiver of nagenoeg zuiver Antibioticum U-59761 te winnen.

5 5. Werkwijze volgens conclusie 4, met het kenmerk dat, de cultuurvloeistof wordt geextraheerd met methyleen-chloride.

 6. Werkwijze volgens conclusie 4, met het kenmerk, dat, de chromatografiekolom wordt geelueerd met methanol en
10 methyleenchloride.

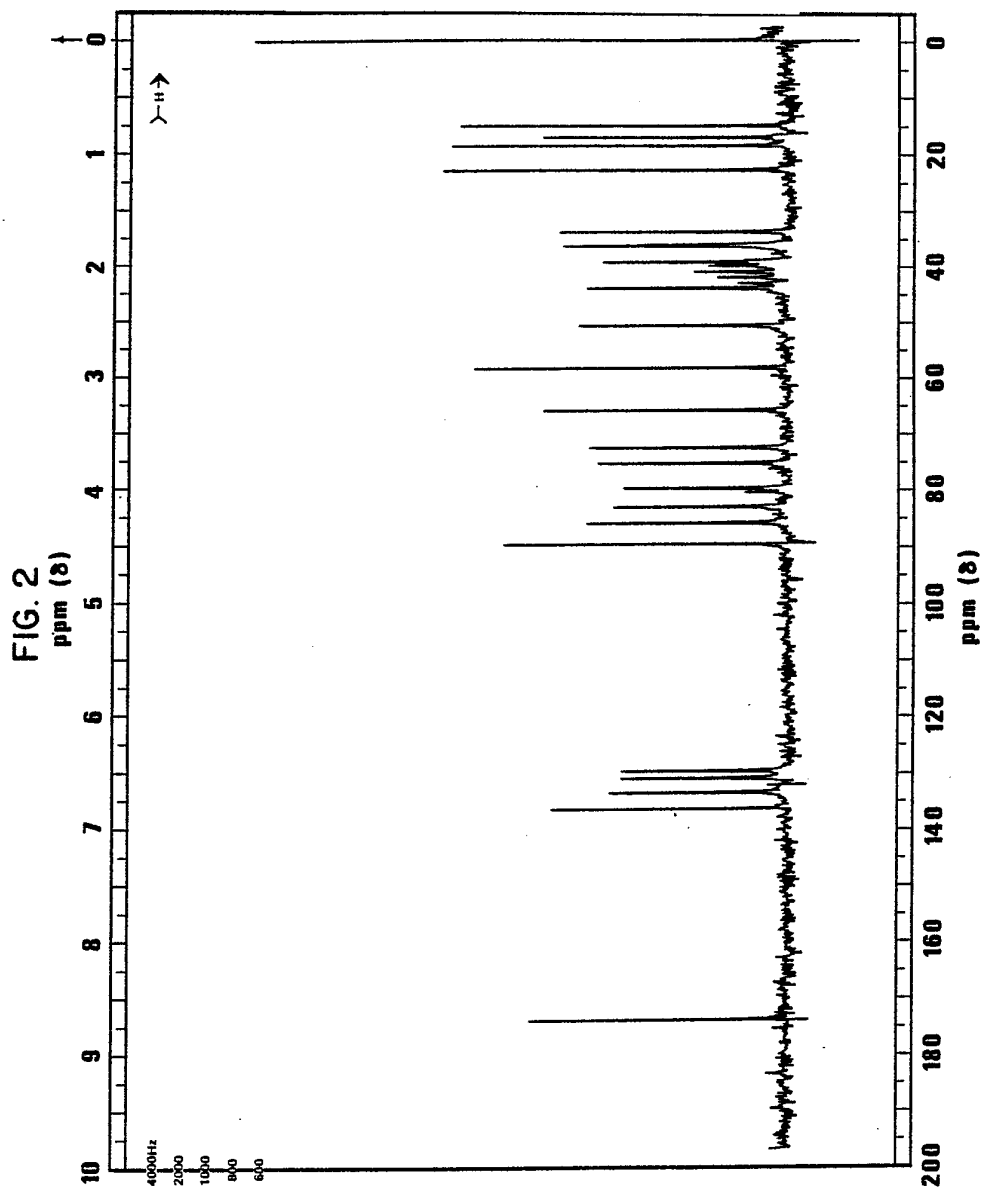
 7. Gekweekte biologisch zuivere cultuur van een microorganisme, met het kenmerk dat, het microorganisme Saccharopolyspora hirsuta stam 367, NRRL 12045 is, en dat de
15 cultuur daarvan in staat is Antibioticum U-59761 in winbare hoeveelheid te vormen door kweken in een waterig voedingsmedium dat assimileerbare bronnen van koolstof, stikstof en anorganische stoffen bevat.

 8. Produkten en werkwijzen alsmede daarbij verkrijgbare en verkregen produkten zoals beschreven in de
20 beschrijving en voorbeelden.



8005235

The Upjohn Company, te Kalamazoo, Michigan, Ver.St.v.Amerika



8005235