



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤ Int. Cl.³: C 12 P 17/10
// C 12 R 1/465

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



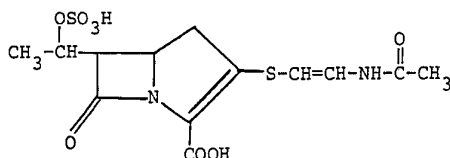
⑫ PATENTSCHRIFT A5

636 127

②① Gesuchsnummer:	14013/77	⑦③ Inhaber:	Merck & Co., Inc., Rahway/NJ (US)
②② Anmeldungsdatum:	16.11.1977		
③⑦ Priorität(en):	17.11.1976 US 742957	⑦② Erfinder:	Patrick Joseph Cassidy, Rahway/NJ (US) Sheldon Bernard Zimmerman, Springfield/NJ (US) Josefino Ballesteros Tunac, Troy/MI (US) Sebastian Hernandez, Madrid (ES)
②④ Patent erteilt:	13.05.1983		
④⑤ Patentschrift veröffentlicht:	13.05.1983	⑦④ Vertreter:	Bovard AG, Bern 25

⑤④ Verfahren zur Herstellung des neuen Antibiotikums MSD890A9.

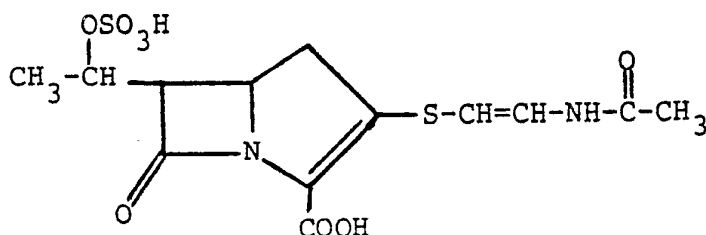
⑤⑦ Die neue Verbindung der Formel



und deren pharmazeutisch annehmbaren Salze werden durch Züchtung eines entsprechenden Stamms von *Streptomyces flavogriseus* in wässrigem Nährmedium, das assimilierbare Quellen für Kohlenstoff, Stickstoff und anorganische Salze enthält, unter submersen, aeroben Bedingungen und Gewinnung des gebildeten Antibiotikums hergestellt. Das neue Antibiotikum ist gegenüber verschiedenen gram-positiven und -negativen Bakterien wirksam und ein potenter Inhibitor von bakteriellen β -Lactamasen. Es kann in der Human- und Veterinärmedizin verwendet werden und eignet sich auch als Zusatzstoff zu Tierfutter durch Konservierung von Futter- und Nahrungsmitteln und als Desinfektionsmittel.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung des neuen Antibiotikums MSD 890A₉ in Form der Verbindung der Formel



oder von deren pharmazeutisch annehmbaren Salzen, dadurch gekennzeichnet, dass man einen 890A₉ liefernden Stamm von *Streptomyces flavogriseus* in wässrigem Nährmedium, das assimilierbare Quellen für Kohlenstoff, Stickstoff und anorganische Salze enthält, unter submersen, aeroben Bedingungen kultiviert und das Antibiotikum gewinnt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der kultivierte Mikroorganismus *Streptomyces flavogriseus* NRRL 11 020 ist.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung des neuen Antibiotikums MSD 890A₉, das sowohl gegenüber gram-positiven als auch gram-negativen Bakterien aktiv ist. Das Antibiotikum wird durch Züchten bzw. Wachsen von Species von *Streptomyces* auf geeigneten Fermentationsmedien hergestellt.

Die Entdeckung der bemerkenswerten antibiotischen Eigenschaften von Penicillin hat auf diesem Gebiet ein grosses Interesse stimuliert. Dadurch wurden viele andere, wertvolle antibiotische Substanzen gefunden. Im allgemeinen umfasst die antibakterielle Aktivität von jedem dieser Antibiotika nicht bestimmte, klinisch wichtige pathogene Bakterien. Beispielsweise sind einige hauptsächlich nur gegen gram-positive Arten von Bakterien aktiv. Die aufgetretene Resistenz bei der weitverbreiteten Verwendung vorhandener Antibiotika bei der Behandlung bakterieller Infektionen hat bewirkt, dass ein ernstes Resistenzproblem entstanden ist.

Die Nachteile der bekannten Antibiotika haben somit eine weitere Forschung nach anderen Antibiotika stimuliert, die gegenüber einem grossen Bereich von Pathogenen wie auch gegenüber resistenten Stämmen besonderer Mikroorganismen aktiv sind.

Die Erfindung umfasst ein Verfahren zur Herstellung des Antibiotikums MSD 890A₉ insbesondere in verdünnter Form, als rohes Konzentrat oder in reiner Form.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung eines neuen und nützlichen Antibiotikums zu schaffen, das bei der Inhibierung des Wachstums verschiedener gram-negativer und gram-positiver Mikroorganismen hochwirksam ist.

Es soll ein Verfahren zur Herstellung der neuen antibiotischen Verbindung durch Fermentation eines Nährmediums mit Species von *Streptomyces* geschaffen werden.

Die nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellte neue antibiotische Verbindung wird durch Wachstum bei kontrollierten Bedingungen eines neuen Stamms von *Streptomyces flavogriseus* erzeugt.

Auf Grundlage ausgedehnter taxonomischer Untersuchungen wurde der Stamm des bei der vorliegenden Erfindung verwendeten Mikroorganismus als zu den Species *Streptomyces flavogriseus* gehörig identifiziert und wurde in der Hinterle-

gungsstelle von Merck & Co., Inc. Rahway, N.J., als MA-4638 bezeichnet. Seine Kultur wurde am 15. September 1976 permanent ohne Beschränkungen hinsichtlich der Verfügbarkeit bei der Culture Collection of the Northern Regional Laboratories, Northern Utilization Research and Development Division, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Ill., hinterlegt. Sie ist unter der Hinterlegungsnummer 11 020 verfügbar.

Streptomyces flavogriseus MA-4638 bildet das Antibiotikum 890A₉, das in im wesentlichen reiner Form aus der Fermentationsbrühe isoliert wird.

Die morphologischen und kulturellen Eigenschaften von *Streptomyces flavogriseus* MA-4638 werden in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Morphologie – Sporenträger verzweigt, gerade bis gekrümmte Sporenketten, die Büschel bilden. Die Ketten sind nicht länger als 10 Sporen. Die Sporen sind sphärisch bis oval – 0,9 µ × 1,2 µ (970×).

Kultureigenschaften

Hafermehlagar (ISP Medium 3)

Vegetatives Wachstum – umgekehrt-gelb-dunkelgelb gesäumt mit Braun, gekräuselt;

Luftmycelium – hellgrau gesäumt mit Mittelgrau;

lösliches Pigment – keines;

Czapek Dox Agar (Saccharose-Nitratagar)

vegetatives Wachstum – umgekehrt-braun gesäumt mit Dunkelbraun;

Luftmycelium – mittelgrau, samtartig;

lösliches Pigment – leichtes Braunwerden des Mediums;

Eialbuminagar

vegetatives Wachstum – umgekehrt-gelb-dunkelgelb gesäumt mit Braun;

Luftmycelium – mittelgrau, vermischt mit gelblichem Grau (2dc) und grauem Gelb (2db);

lösliches Pigment – hellgelblich Dunkelgelb;

Glycerin-Asparaginagar

vegetatives Wachstum – umgekehrt-braun;

Luftmycelium – samtartig, hellgrau mit gelblichem Ton (2dc);

lösliches Pigment – helles Dunkelgelb;

Anorganisches Salze-Stärke-Agar (ISP Medium 4)

vegetatives Wachstum – umgekehrt-grünlich-gelblich-dunkelgelb;

Luftmycelium – samtartig, mittelgrau mit gelbem Ton (3fe);

lösliches Pigment – sehr helles Dunkelgelb;

Hefeextrakt-Dextrose + Salze-Agar

vegetatives Wachstum – umgekehrt-dunkelbraun;

Luftmycelium – dunkelgrau, vermischt mit hellerem Grau;

lösliches Pigment – keines;

Hefeextrakt-Malzextraktagar (ISP Medium 2)

vegetatives Wachstum – umgekehrt-braun;

Luftmycelium – samtartig, dunkelgrau gesäumt mit hellerem Grau;

lösliches Pigment – keines;

Magermilchagar
vegetatives Wachstum – dunkelgelb;
Luftmycelium – spärlich, weisslich;
lösliches Pigment – leichtes Braunwerden des Mediums;
Hydrolyse von Casein – gut;

Lackmusmilch
vegetatives Wachstum – mässiges Ringwachstum, dunkelgelb;
Luftmycelium – keines;
Farbe – purpur;
Koagulation und/oder Peptonisierung – vollständige Peptonisierung; Alkalischwerden;

Magermilch
vegetatives Wachstum – mässiges Ringwachstum, dunkelgelb;
Luftmycelium – keines;
lösliches Pigment – hellbraun;
Koagulation und/oder Peptonisierung – vollständige Peptonisierung; Alkalischwerden;

Nährtyrosinagar
vegetatives Wachstum – umgekehrt-dunkelbraun;
Luftmycelium – dunkelgrau gesäumt mit gräulichem Weiss;
lösliches Pigment – leichtes Braunwerden des Mediums;
Zersetzung von Tyrosin – positiv;

Pepton-Eisen-Hefeextraktagar
vegetatives Wachstum – dunkelgelb;
Luftmycelium – weisslich, mässig;
lösliches Pigment – keines;
Melanin – keines;
H₂S-Bildung – negativ;

Nähragar
vegetatives Wachstum – umgekehrt-helles gräuliches Braun;
Luftmycelium – hellgrau gesäumt mit Dunkelgrau;
lösliches Pigment – keines;

Nährstärkeagar
vegetatives Wachstum – dunkelgelb gesäumt mit Grau;
Luftmycelium – mittelgrau;
lösliches Pigment – keines;
Stärkehydrolyse – gut;

Nährgelatineagar
vegetatives Wachstum – dunkelgelb gesäumt mit Grau;
Luftmycelium – gräulich-weiss;
lösliches Pigment – keines;
Verflüssigung von Gelatine – gut;

Kartoffelstück
vegetatives Wachstum – dunkelgelb;
Luftmycelium – mittel- bis dunkelgrau;
lösliches Pigment – keines;

Loeffler's Blutserum
vegetatives Wachstum – creme-gefärbt;
Luftmycelium – keines;
lösliches Pigment – keines;
Verflüssigung – keine;

Gelatinestich
vegetatives Wachstum – dunkelgelb;
Luftmycelium – keines;
lösliches Pigment – keines;
Verflüssigung von Gelatine – vollständig.

Alle obigen Bestimmungen erfolgten nach dreiwöchiger Inkubation bei 28 °C, sofern nicht anders angegeben. Der pH-Wert der bei diesen Untersuchungen verwendeten Medien ist etwa neutral, nämlich pH 6,8 bis 7,2. Die in der Beschreibung verwendeten Farbbezeichnungen entsprechen den Definitionen von Color Harmony Manual, 4. Edition (1958), Container Corporation of America, Chicago, Illinois.

Streptomyces flavogriseus MA-4638 wird weiterhin auf seine Fähigkeit untersucht, verschiedene Kohlenhydrate auszu-

nutzen oder zu assimilieren. Zu diesem Zweck werden die Mikroorganismen auf synthetischem Grundmedium (Pridham und Gottlieb), das 1% Kohlenhydrat enthält, bei 28 °C drei Wochen gezüchtet. Der pH-Wert der bei diesen Untersuchungen verwendeten Medien ist etwa neutral (6,8 bis 7,2). In Tabelle I ist die Verwertbarkeit dieser Kohlenhydratquellen durch *Streptomyces flavogriseus* MA-4638 aufgeführt; + bedeutet Wachstum; ± bedeutet schlechtes oder fragliches Wachstum; und – bedeutet kein Wachstum im Vergleich mit einer negativen Kontrolle (keine Kohlenstoffquelle).

Tabelle I

15	Glucose	+	Maltose	+
	Arabinose	+	Mannit	+
	Cellulose	–	Mannose	+
	Fructose	+	Raffinose	–
	Inosit	–	Rhamnose	+
20	Lactose	+	Saccharose	±
	Xylose	+		

Die Stärke des Wachstums bei Änderungen der Temperatur und der Sauerstoffbedarf des Mikroorganismus sind wie folgt:
Temperaturbereich (Hefeextrakt-Dextrose + Salzeagar)
28 °C – gutes vegetatives Wachstum und Luftwachstum;
37 °C – gutes vegetatives Wachstum; keine Luftthyphen;
50 °C – kein Wachstum.

30 Sauerstoffbedarf (Stichkultur in Hefeextrakt-Dextrose + Salzeagar)
aerob.

Das erfindungsgemässe Verfahren ist nicht auf die Verwendung des Organismus *Streptomyces flavogriseus* oder auf Organismen beschränkt, die das obige Wachstum und die mikroskopischen Eigenschaften vollständig erfüllen. Diese sind nur zur Erläuterung aufgeführt. Die Verwendung von Mutanten, die aus den beschriebenen Organismen durch verschiedene Mittel bzw. Verfahren, wie Röntgenbestrahlung, Ultraviolettbestrahlung, Stickstofflost, Bakteriophageneinwirkung u.ä., erhalten werden, ist gewünscht und beabsichtigt.

890A₉ wird während der aeroben Fermentation bei kontrollierten Bedingungen von geeigneten, wässrigen Nährmedien gebildet, die mit einem Stamm des Organismus *Streptomyces flavogriseus* inokuliert sind. Wässrige Medien, wie solche, die für die Herstellung anderer Antibiotika verwendet werden, sind für die Herstellung von 890A₉ geeignet. Solche Medien enthalten Quellen für Kohlenstoff, Stickstoff und anorganische Salze, die von den Mikroorganismen assimilierbar sind.

Im allgemeinen können Kohlenhydrate, wie Zucker, z.B. Dextrose, Glucose, Fructose, Maltose, Saccharose, Xylose, Mannit u.ä., und Stärken, wie Dextrin oder Körner bzw. Granulat, z.B. von Hafer, Roggen, Maisstärke, Maismehl u.ä., verwendet werden, entweder allein oder zusammen mit einer Quelle von assimilierbarem Kohlenstoff in dem Nährmedium. Die Menge an Kohlenhydrat variiert normalerweise zwischen etwa 1 und 6 Gew.%, bezogen auf das Medium. Diese Kohlenstoffquellen können einzeln verwendet werden oder mehrere solcher Kohlenstoffquellen können in dem Medium vereinigt werden. Im allgemeinen können viele proteinhaltige Materialien als Stickstoffquellen bei dem Fermentationsverfahren verwendet werden. Geeignete Stickstoffquellen umfassen beispielsweise Hefehydrolysate, primäre Hefe, Sojabohnenmehl, Baumwollsaamenmehl, Hydrolysate von Casein, Maisleinweichflüssigkeit, lösliche Stoffe, die bei der Branntweinherstellung anfallen, bzw. Schlempe o.ä. Die bevorzugte Quelle sind lösliche Stoffe von der Branntweinbrennerei bzw. Schlempe. Die Stickstoffquellen werden entweder allein oder im Gemisch vor-

zugsweise in Mengen im Bereich von etwa 0,2 bis 6 Gew.%, bezogen auf das wässrige Medium, verwendet.

Zu den anorganischen Nährsalzen, die den Kulturmedien zugegeben werden, gehören die üblicherweise verwendeten Salze, die Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Calcium-, Magnesium-, Phosphat-, Sulfat-, Chlorid-, Carbonat- und ähnliche Ionen ergeben. Weiterhin umfasst werden insbesondere ebenfalls Spurenmetalle, wie Kobalt, Mangan und Eisen.

Die in den Beispielen beschriebenen Medien sind nur Beispiele für eine grosse Vielzahl von Medien, die verwendet werden können.

Die Fermentation wird zweckmässig bei einer Temperatur im Bereich von 20 bis 37 °C durchgeführt. Für optimale Ergebnisse ist es jedoch bevorzugt, die Fermentation bei einer Temperatur von 23 bis 28 °C durchzuführen. Der Anfangs-pH-Wert des für das Züchten der Stämme von *Streptomyces flavogriseus* Kulturen und die Erzeugung von Antibiotikum 890A₉ verwendeten Nährmediums kann von etwa 6,0 bis 8,0 variieren.

Eine Fermentation in kleinem Massstab des Antibiotikums wird zweckdienlich durchgeführt, indem man ein geeignetes Nährmedium mit einer Kultur, die das Antibiotikum bildet, inokuliert und nach dem Übertragen in das Produktionsmedium die Fermentation bei konstanter Temperatur von etwa 24 °C auf einer Schüttelvorrichtung während mehrerer Tage ablaufen lässt.

Die Fermentation kann in einem sterilisierten Kolben des Nährmediums über eine oder mehrere Stufen der Impfmaterialeentwicklung initiiert werden. Das für die Impfstufe verwendete Nährmedium kann irgendein geeignetes Gemisch aus Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sein. Der Impfkolben wird in einer Kammer mit konstanter Temperatur bei etwa 28 °C während eines Tages oder bis das Wachstum ausreicht geschüttelt, und ein Teil des entstehenden Wachstums wird zur Inokulierung entweder eines Impfmateriale der zweiten Stufe oder des Produktionsmediums verwendet. Impfkolben für das Zwischenstadium werden, wenn sie verwendet werden, in im wesentlichen der gleichen Art entwickelt, d.h. ein Teil des Kolbeninhalts von der letzten Impfstufe wird zur Inokulierung des Produktionsmediums verwendet. Die inokulierten Kolben werden bei konstanter Temperatur mehrere Tage geschüttelt und gegen Ende der Inkubationszeit wird der Inhalt des Kolbens zentrifugiert oder filtriert.

Für die Arbeit in grossem Massstab ist es bevorzugt, die Fermentation in geeigneten Tanks durchzuführen, die mit einer Rührvorrichtung und einer Einrichtung zum Belüften des Fermentationsmediums ausgerüstet sind. Nach diesem Verfahren wird das Nährmedium in dem Tank zubereitet und durch Erhitzen bei einer Temperatur bis zu etwa 120 °C sterilisiert. Nach dem Abkühlen wird das sterilisierte Medium mit einem zuvor gezüchteten Impfmateriale der produzierenden Kultur inokuliert, und die Fermentation kann während einer Zeit von beispielsweise 1 bis 6 Tagen ablaufen, während man das Nährmedium bewegt bzw. rührt und/oder belüftet und die Temperatur bei etwa 22 bis 26 °C hält. Dieses Verfahren zur Herstellung des Antibiotikums 890A₉ ist besonders zur Herstellung grosser Mengen an Antibiotikum geeignet.

Physikalische und chemische Eigenschaften des Antibiotikums 890A₉

Antibiotikum 890A₉ ist eine saure Verbindung, die in Rich-

tung auf den positiven Pol bei der Elektrophorese bei neutralem pH-Wert wandert. Bei einem Gradienten von 50 V/cm in 0,03 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,1, wandert das Antibiotikum in 30 min 8,0 cm, verglichen mit einer Wanderung von 4,0 cm für 890A₁. Das Dinatriumsalz ist ein weisses oder leicht gelbes Pulver, lyophilisiert aus einer wässrigen Lösung. Bei sauren Bedingungen in wässriger Lösung ist das Antibiotikum in freier Säureform instabil. Das Antibiotikum wird daher normalerweise in gebundener Form als Salz oder anderes Derivat, das stabiler ist, festgestellt.

Das Dinatriumsalz des Antibiotikums 890A₉ besitzt ein Absorptionsmaximum bei 308 und 228 nm und ein Minimum bei 262 nm bei neutralem pH-Wert in Wasser. Für die am stärksten gereinigte Zubereitung beträgt das A₃₀₈/A₂₆₀-Verhältnis 2,05; das A₃₀₈/A₂₂₀-Verhältnis 1,17; und das A₃₀₈/A₂₂₈-Verhältnis 1,05. Mehr als 93% der Absorption bei 308 nm werden durch Umsetzung mit Hydroxylamin bei neutralem pH-Wert ausgelöscht. Nach der Umsetzung mit Hydroxylamin nimmt die Absorption bei 260 nm zu, und das Verhältnis der Zunahme bei 260 nm zu der Abnahme bei 308 nm beträgt etwa 0,30. Die Umsetzung mit Hydroxylamin, die von der A₃₀₈-Abnahme bei den in der Sektion «Hydroxylamine Reaction» beschriebenen Bedingungen folgt, ist offensichtlich erster Ordnung mit einer Halbwertszeit bei Zimmertemperatur von 25 bis 50 s.

Bestimmt gegenüber einem Standard von Antibiotikum 890A₁, besitzt das Antibiotikum 890A₉ 82 Einheiten/HAEA₃₀₈-Einheit. HAEA₃₀₈ wird unter der Sektion «Hydroxylaminreaktion» beschrieben.

In Tabelle II sind die 100 MHz Signale des kernmagnetischen Resonanzspektrums von 890A₉ in D₂O bei 10 °C aufgeführt. Chemische Verschiebungen werden in ppm, bezogen auf HOD, bei 4,70 δ und 32 °C gegeben, und die Kupplungskonstanten werden in Hertz aufgeführt.

Tabelle II

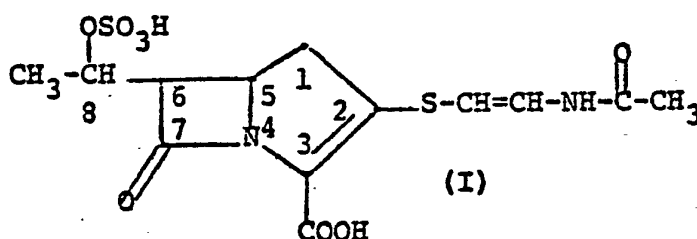
CH ₃ CH	1,55 (3H, D, 6 Hz)
CH ₃ CO	2,12 (3H, S)
C ₆ -H	3,91 (1H, D,D; J ₆₋₅ =5,5 Hz; J ₆₋₈ =9 Hz)
C ₅ -H	4,36 (1H, M)
C ₈ -H	~5 (teilweise überlagert von der HOD-Linie)
C ₍₁₎ -H ₂	3,14 (1H, D,D; 18,2 + 9,8 Hz)
-S-CH=CH-N	6,10 (1H, D, 13,9 Hz) und 7,19 (1H, D, 13,9 Hz)

Das Massenspektrum von TMSi-890A₉ zeichnet sich durch die in Tabelle III aufgeführten Fragmente aus.

Tabelle III

m/e	84
	227
	298/9
	339
	340
	366
	456

Antibiotikum 890A₉ besitzt die folgende Molekülstruktur



Antibiotikum 890A₉ zeichnet sich weiter durch die folgenden antibiotischen Spektrumprofile aus.

Der Versuch zur Bestimmung der antibiotischen Spektrumprofile des Antibiotikums 890A₉ wird durch Anwendung eines 0,015 ml Tröpfchens aus einer 20 µg/ml wässrigen Lösung des Antibiotikums auf die Oberfläche einer 100×15 mm Petrischale, die 5 ml geimpftes Nähragar plus 0,2% Hefeextrakt enthält und die bei 25 °C inkubiert wird, durchgeführt. Die Ergebnisse, ausgedrückt als Durchmesser in mm der Inhibitionszone bzw. Hemmzone, werden in Tabelle IV aufgeführt.

Organismus	Hemmzone Durchmesser, mm
<i>Bacillus</i> sp. MB Nr. 633	38
<i>Proteus vulgaris</i> MB Nr. 1012	26
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MB Nr. 979	0
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 890	21
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P	30
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	38
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	30
<i>Staphylococcus aureus</i> MB Nr. 698	20
<i>Streptococcus faecalis</i> MB Nr. 753	0
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 213	29
<i>Brucella bronchiseptica</i> ATCC 4617	16
<i>Salmonella gallinarum</i> MB Nr. 1287	34
<i>Vibrio percolans</i> ACC 8461	32
<i>Xanthomonas vesicatoria</i> MB Nr. 815	28
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 21100	35
<i>Escherichia coli</i> MB Nr. 1418	30
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 11607	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> MB Nr. 1264	24
<i>Aerobacter aerogenes</i> MB Nr. 835	25
<i>Erwinia atroseptica</i> ATCC 4446	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MB Nr. 2824	0
<i>Corynebacterium pseudodiph.</i> ATCC 9742	19
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	26
<i>Streptococcus faecium</i> MB Nr. 2820	10
<i>Streptococcus agalactiae</i> MB Nr. 2875	29
<i>Vibrio percolans</i> MB Nr. 2566 (res. ceph C)	21
<i>Proteus vulgaris</i> MB Nr. 2112 (Episom)	34
<i>Proteus mirabilis</i> MB Nr. 3126	27
<i>Vibrio percolans</i> ATCC 8461 + 2×10 ⁵ µ/ml Penicillinase	19
<i>Vibrio percolans</i> ATCC 6461 + β-Lactamase von <i>Enterobacter cloacae</i> MB 2646	32

Antibiotikum 890A₉ ist gegenüber verschiedenen grampositiven und gram-negativen Bakterien wirksam und ist ein potenter Inhibitor von bakteriellen β-Lactamasen und kann in der Human- und Veterinärmedizin Verwendung finden. 890A₉ kann allein oder zusammen mit anderen antibakteriellen Arzneimitteln für die Behandlung von Infektionen verwendet werden, die durch gram-positive oder gram-negative Bakterien, z.B. *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Salmonella schottmuelleri*, verursacht werden.

Die beschriebene Verbindung kann ebenfalls zusammen mit β-Lactam-Antibiotika, die gegenüber β-Lactamasen empfindlich sind, zur Potenzierung der Wirkung solcher β-Lactam-Antibiotika durch Inhibierung der Lactamase-Aktivität verwendet werden und ermöglicht somit eine verlängerte Lebensdauer der Antibiotika.

Ein Gemisch aus Antibiotikum 890A₉ mit einem lactamaseempfindlichen β-Lactam-Antibiotikum wird wirksamer bei der Behandlung von Infektionen mit β-Lactamase erzeugenden

Bakterien sein als die gleiche Menge an β-lactamase-empfindlichen Antibiotika allein.

Antibiotikum 890A₉ kann als Zusatzstoff zu Tierfutter, zur Konservierung von Futter- und Nahrungsmitteln und als Desinfektionsmittel verwendet werden. Es kann in wässrigen Zubereitungen in Mengen im Bereich von etwa 0,1 bis etwa 100 Teilen Antibiotikum/Million Teile Lösung oder bevorzugt in Konzentrationen im Bereich von etwa 1 bis etwa 10 Teilen Antibiotikum/Million Teile Lösung zur Zerstörung und Inhibition des Wachstums schädlicher Bakterien auf medizinischen und zahnmedizinischen Gegenständen bzw. Einrichtungen und als Bakterizid bei industriellen Anwendungen verwendet werden.

Antibiotikum 890A₉ kann in pharmazeutischen Zubereitungen als einziger aktiver Bestandteil oder zusammen mit einem oder mehreren Antibiotika oder mit einer oder mehreren pharmakologisch aktiven Substanzen verwendet werden.

Das Antibiotikum kann oral, topisch, intravenös oder intramuskulär verabreicht werden. Die für die Verabreichung verwendeten Verfahren können irgendwelche Verfahren sein, die dem Fachmann geläufig sind oder die dem beschriebenen Antibiotikum angepasst werden können.

Die beschriebenen Zusammensetzungen können zusätzlich zu einem Träger andere Bestandteile, wie Stabilisatoren, Bindemittel, Antioxydantien, Konservierungsmittel, Schmiermittel, Suspensionsmittel, Mittel zur Regulierung der Viskosität oder Geschmacksmittel, enthalten, Mittel, die gut bekannt sind und üblicherweise verwendet werden.

In der Veterinärmedizin, wie bei der Behandlung von Geflügel, Kühen bzw. Rindern, Schafen, Schweinen u.ä., können die Zubereitungen z.B. als intramammare Zubereitung entweder in langwirkenden oder schnell abgebenden Grundstoffen verwendet werden.

Die zu verabreichende Dosis hängt in grossem Ausmass von dem Zustand des zu behandelnden Subjekts, dem Gewicht des Wirts und der Art der Infektion, dem Weg und der Frequenz der Verabreichung ab. Der parenterale Weg ist für generalisierte Infektionen bevorzugt. Der orale Weg ist für intestinale Infektionen bevorzugt.

Bei der Behandlung bakterieller Infektionen bei Menschen bzw. Lebewesen können die beschriebenen Verbindungen zusammen mit einem β-lactamase-empfindlichen Antibiotikum oral oder parenteral nach an sich bekannten Verfahren für die Antibiotikumverabreichung verabreicht werden. Das Antibiotikum 890A₉ kann in einer Menge von etwa 2 bis 600 mg/kg/Tag verabreicht werden. Bevorzugt wird es in Mengen von etwa 5 bis 100 mg/kg/Tag, bevorzugt in unterteilten Dosiseinheiten, z.B. drei bis vier Mal täglich, verabreicht. Es kann in Dosiseinheiten verabreicht werden, die z.B. 100, 330, 400 oder 1000 mg aktiven Bestandteil mit geeigneten physiologisch annehmbaren Trägern oder Verdünnungsmitteln enthalten. Die Dosiseinheiten werden in Form flüssiger Präparationen, wie Lösungen oder Suspensionen, oder als Feststoffe in Tabletten oder Kapseln vorliegen. Die optimale Dosis wird bei einem gegebenen Fall von der Art und der Stärke der zu behandelnden Infektion abhängen. Kleinere Dosen werden bei der Kinderheilkunde verwendet werden; alle diese Einstellungen sind dem Fachmann geläufig.

Das erfindungsgemässe Verfahren umfasst auch die Herstellung der nichttoxischen, pharmazeutisch annehmbaren Salze von 890A₉, z.B. die pharmakologisch annehmbaren Salze, die mit anorganischen und organischen Basen gebildet werden, beispielsweise die Metallsalze, die sich von Alkalimetall- oder Erdalkalimetallhydroxiden ableiten, Carbonate oder Bicarbonate, wie solche, die sich von Natrium, Kalium, Ammonium und Calcium ableiten, und Salze, die sich von primären, sekundären oder tertiären Aminen, wie Monoalkylamine, Dialkylamine, Trialkylamine, niedrig-Alkanolamine, Di-niedrig-alka-

nolamine, niedrig-Alkylendiamine, N,N-Diaralkyl-niedrig-alkylendiamine, Aralkylamine, Amino-subst.-niedrig-Alkanole, N,N-Di-niedrig-alkylamino-subst.-niedrig-alkanole, Amino-polyamino- und Guanidino-subst.-niedrig-alkansäuren und Stickstoff enthaltende heterocyclische Amine, ableiten. Beispiele sind Salze, die sich von Natriumhydroxid, Ammoniumhydroxid, Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Kaliumcarbonat, Kaliumhydroxid, Calciumcarbonat, Trimethylamin, Triäthylamin, Piperidin, N-Äthylpiperidin, Morphin, Chinin, Lysin, Protamin, Arginin, Procain, Äthanolamin, Morpholin, Benzylamin, Äthylendiamin, N,N'-Dibenzyläthylendiamin, Diäthanolamin, Piperazin, Dimethylaminoäthanol, 2-Amino-2-methyl-1-propanol, Theophyllin, N-Methylglucamin u.ä. ableiten.

Die Salze der beschriebenen Verbindung können direkt aus dem Fermentationsmedium unter Verwendung geeigneter Eluierungsmittel während der Ionenaustauschchromatographie isoliert werden oder sie können nach an sich bekannten Verfahren hergestellt werden. Beispielsweise können die Disalze, wie das Dinatriumsalz, durch Behandlung von 2 Äquiv. Natriumhydroxid mit 1 Mol des Produktes (I) in einem geeigneten Lösungsmittel hergestellt werden. Gemischte Salze mit einwertigen Kationen können durch Vermischen von 1 Mol einer einwertigen Base mit 1 Mol des Produktes (I) plus 1 Äquiv. einer anderen Base hergestellt werden. Alternativ können monobasische Salze durch Behandlung von 1 Äquiv. einer Base mit einem einwertigen Kation mit 1 Mol des Produktes (I) hergestellt werden. Salze können ebenfalls durch Behandlung von 1 Mol des Produktes mit 1 Mol einer Base mit einem zweiwertigen Kation hergestellt werden. Die nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten Salze sind pharmakologisch annehmbare, nichttoxische Derivate, die als aktiver Bestandteil in einer geeigneten pharmazeutischen Dosiseinheitsform verwendet werden können. Sie können ebenfalls mit anderen Arzneimitteln unter Erzeugung von Zubereitungen mit einem breiten Aktivitätsspektrum kombiniert werden.

Die Fermentationsbrühen, die das erfindungsgemäss hergestellte Antibiotikum 890A₉ enthalten, besitzen im allgemeinen Aktivitäten im Bereich von etwa 2 bis 170 Einheiten/ml bei der Analyse entsprechend dem Scheiben-Diffusions-Assay unter Verwendung von *Vibrio percolans* (ATCC 8461). Das in diesen Fermentationsbrühen enthaltene Antibiotikum 890A₉ kann nach einer Reihe von Verfahren gewonnen und gereinigt werden. Bei einem dieser Verfahren kann das Antibiotikum 890A₉ an einem stark basischen Anionenaustauschharz adsorbiert werden. Beispiele solcher stark basischen Anionenaustauschharze sind solche, die eine Styrol-Divinylbenzol-Matrix enthalten, z.B. das Polystyrolharz «Dowex» 1×2 mit quaternären Ammoniumgruppen am Kern (hergestellt von Dow Chemical Co., Midland, Michigan), im Chloridzyklus. Andere Beispiele dieser Klassen sind stark basische Austauschharze einschliesslich der folgenden: «Duolite» A-40, A-42, A-101, A-102 und A-114 (hergestellt von Chemical Process Co., Redwood City, California); «Amberlite» IRA-400, IRA-401 und IRA-410. Alternativ kann ein schwach basisches Anionenaustauschharz, wie «Amberlite» IRA-68, verwendet werden. («Amberlite»-Harze werden von Rohm and Haas, Washington Square, Philadelphia 5, Pennsylvania, hergestellt).

Das adsorbierte Antibiotikum kann leicht von dem Anionenaustauschharz mit Salzlösungen in 80%igem (Vol/Vol) wässrigem Methanol eluiert werden. Das so erhaltene Eluat kann weiter nach anderen Reinigungsverfahren gereinigt werden. Das Eluat kann gereinigt werden, indem man es konzentriert und durch eine Säule leitet, die mit einem Polystyrol, nichtpolares, hydrophobes, vernetztes Divinylbenzopolymer, wie XAD-1, 2 und 4, oder Polyacrylamidharzen, wie XAD-7 und 8, gefüllt ist. XAD-2 ist bevorzugt. (XAD-1, 2, 4, 7 und 8

werden von Rohm and Haas, Washington Square, Philadelphia, Pennsylvania, hergestellt).

Ein Verfahren zur Herstellung von weiter gereinigtem Antibiotikum 890A₉ kann beispielsweise durch Gelfiltration mit Polyacrylamidgel mit einer Porengrösse, die Moleküle mit einem Molekulargewicht über 1800 ausschliesst, wie «Bio-Gel» P-2 (hergestellt von Bio-Rd, Richmond, California) durchgeführt werden. Andere Gele, wie «Sephadex» G-10, können ebenfalls für die Entsalzung verwendet werden.

Das bevorzugte Verfahren, gemäss dem das Antibiotikum 890A₉ in hoher Reinheit aus einer Brühe erhalten werden kann, besteht darin, dass man die Brühe zur Entfernung der Feststoffe zentrifugiert oder filtriert, das Filtrat an einem Anionenaustauschharz, wie «Dowex»-1×2 im Chloridzyklus mit 3%igem NaCl in 80%igem (Vol/Vol) wässrigem Methanol adsorbiert und eluiert. Dadurch werden die Antibiotika sowohl konzentriert als auch teilweise gereinigt. Anschliessend wird über eine Säule mit geeignet präpariertem XAD-2 geleitet, das die Antibiotika verzögert und dadurch das «Dowex»-1×2-Eluat reinigt und entsalzt. Die mit 890A₉ angereicherten Fraktionen werden gesammelt und weiter gereinigt. Die Chromatographie an einem «Dowex»-1×2, Teilchengrösse max. 0,037 mm, mit der Elution durch NaCl und/oder NH₄Cl in 80%igem wässrigem Methanol ergibt ein Produkt, das von den meisten UV absorbierenden Verunreinigungen frei ist (das NH₄Cl wird verwendet, um in dem Eluierungsmittel eine gewisse Pufferkapazität zu erhalten). Das 890A₉ wird von anderen Antibiotika bei diesem Verfahren abgetrennt. Durch eine Entsalzung an «Bio-Gel» P-2 oder «Sephadex» G-10 in 50%igem Methanol wird die Hauptmenge des Salzes, das bei der «Dowex»-1×2-Chromatographie eingeführt wurde, entfernt.

Die restlichen Verunreinigungen können durch einen weiteren Chromatographiezyklus an «Dowex»-1×2 der angegebenen Teilchengrösse und Eluierung mit einer Lösung, die Natriumchlorid und 50%iges Methanol enthält, und anschliessende Entsalzung verringert werden.

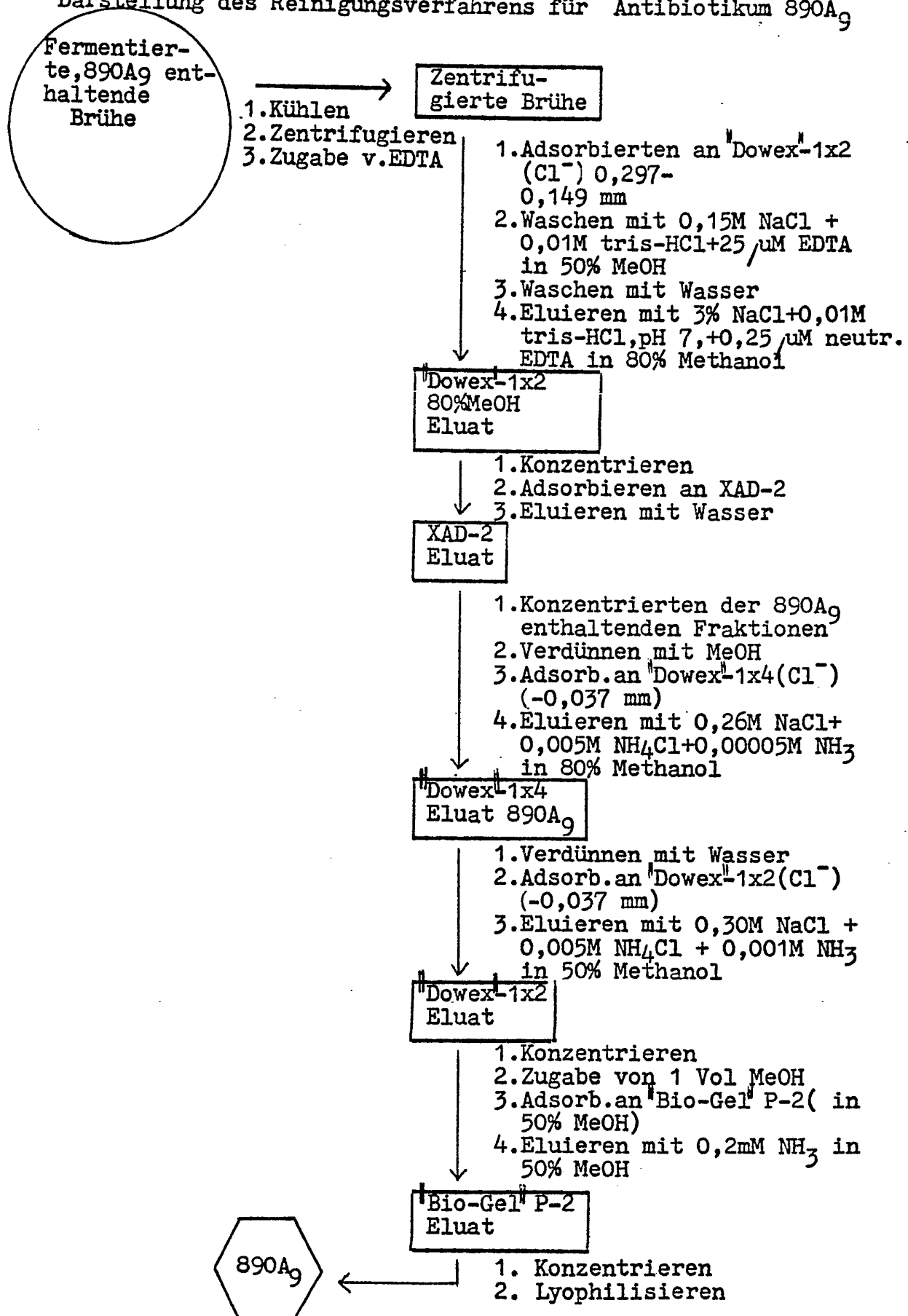
Bei der Reinigung durch Säulenchromatographie werden im allgemeinen nur solche Fraktionen eluierten Volumens, die das Antibiotikum in einer Menge enthalten, das mindestens 30% rein ist, als reinste Fraktionen für die weitere Reinigung vereinigt. Die Kriterien für die Reinigung sind die Verhältnisse Bioaktivität/A₂₂₀ oder A₃₀₈/A₂₆₀ und HAEA₃₀₈/A₂₂₀ und bei Entsalzungsverfahren die Leitfähigkeit. Bei jeder Chromatographiestufe werden A₂₂₀, A₂₆₀, A₃₀₈ und die Bioaktivität geeigneter Fraktionen gemessen. Sofern möglich, wird HAEA₃₀₈ ebenfalls gemessen und beim Entsalzen werden die Leitfähigkeiten gemessen. Die Kriterien für die Entscheidung, welche Fraktionen für die nachfolgenden Verfahren vereinigt werden, können etwas eingestellt werden, so dass man eine höhere Ausbeute auf Kosten der Reinheit erhält oder umgekehrt, so dass man eine höhere Reinheit auf Kosten der Ausbeute erhält.

Beim Arbeiten im Labormassstab (weniger als 20 l Probenvolumen) können alle Chromatographiestufen, mit Ausnahme der XAD-2-Chromatographie, in einem Kühlraum bei 2 bis 5 °C durchgeführt werden. Die XAD-2-Chromatographie wird bei Zimmertemperatur durchgeführt. Der pH-Wert der zu lagernden Antibiotika-Lösungen wird auf 7 bis 8 durch sorgfältige Zugabe verdünnter NaOH- oder NCl-Lösungen eingestellt. Wässrige Lösungen werden in einem Kühlschrank oder, bevorzugt, in Eis-Wasser aufbewahrt, und 50- bis 80%ige Methanollösungen werden bei -20 bis -60 °C aufbewahrt.

Bei Reinigungsstufen vor der XAD-2-Chromatographie werden die Lösungen im allgemeinen auf 25 µM in EDTA durch Zugabe von 1/4000stel Volumen einer Lösung aus 0,1 M Na₂ EDTA eingestellt, die durch Zugabe von Natriumhydroxid (0,1 M «neutrales EDTA») auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt wurde.

Ein Fließschema für das Reinigungsverfahren zur Herstellung des Antibiotikums 890A₉ ist nachstehend dargestellt.

Darstellung des Reinigungsverfahrens für Antibiotikum 890A₉



Assay-Verfahren für Antibiotikum 890A₉

I. Bioassay

Ein Agarplattenscheiben-Diffusionsverfahren wird unter Verwendung von *Vibrio percolans* ATCC 8461 als Testorganismus verwendet. Eine gereinigte Probe des Antibiotikums 890A₁ wird als Standard verwendet. Antibiotikum 890A₁ wird entsprechend dem nachstehend beschriebenen Verfahren hergestellt.

Vibrio percolans ATCC 8461 enthaltende Platten werden folgendermassen hergestellt.

Eine lyophilisierte Kultur von *Vibrio percolans* ATCC 8461 wird in 15 ml sterilisiertem Medium, das 8 g/l «Difco» Nährbrühe und 2 g/l Hefeextrakt in destilliertem Wasser enthält, «Nährbrühe-Hefeextrakt» (im folgenden als NBYE bezeichnet), suspendiert. Die Kultur wird über Nacht auf einer Rotationsschüttelvorrichtung bei 28 °C inkubiert. Diese Kultur wird zur Inokulation der Oberfläche von Schrägkulturen, die 1,5% Agar in NBYE enthalten, verwendet. Die inokulierten Schrägkulturen werden über Nacht bei 28 °C inkubiert und dann in einem Eisschrank gelagert.

Die gekühlten Schrägkulturen, die aus einer einzigen, lyophilisierten Kultur hergestellt werden, werden bis zu 4 Wochen von ihrer Herstellung an folgendermassen verwendet: Eine Öse von Inokulum aus der Schrägkultur wird in 50 ml NBYE, das in einem 250 ml Erlenmeyerkolben enthalten ist, dispergiert. Die Kultur wird über Nacht auf einer Rotationsschüttelvorrichtung bei 28 °C inkubiert und dann auf eine Dichte verdünnt, die 50% Durchlässigkeit bei 660 nm ergibt. Ein 33,2 ml Teil dieser verdünnten Kultur wird zu 1 l NBYE, das 15 g Agar enthält und bei 46 °C gehalten wird, zugegeben. Das inokulierte, Agar enthaltende Medium wird in 100×15 mm Kunststoff-Petrischalen, 5 ml pro Schale, gegossen, gekühlt und bei 2 bis 4 °C bis zu 5 Tagen vor der Verwendung gehalten.

Filterpapierscheiben mit einem Durchmesser von 1,27 cm werden in die zu untersuchende Lösung eingetaucht und auf den Agar gelegt. Alternativ können die Scheiben durch Aufpipettieren von 1/10 ml Lösung auf die trockene Scheibe beladen werden, und dann kann die Scheibe auf den Agar gelegt werden. Der Durchmesser der Hemmzone wird nach einer geeigneten Inkubation (12 bis 24 h bei 25 °C) gemessen. Gegebenenfalls erfolgen Verdünnungen der Lösungen, die untersucht werden sollen, mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4 «Kaliumphosphatpuffer» (im folgenden als KPB bezeichnet) oder mit entionisiertem Wasser.

Die Wirksamkeiten bzw. Potenzen werden folgendermassen berechnet. Eine Neigung wird bestimmt, indem man die Zonendurchmesser einer Lösung des Antibiotikums 890A₉ und einer vierfachen Verdünnung (in KPB) dieser Lösung misst. Zwei Scheiben mit jeder Konzentration werden auf einer einzigen Platte analysiert, und die durchschnittliche Zonengrösse bei jeder Konzentration wird bestimmt. Die Neigung ist gleich der Hälfte des Unterschieds der durchschnittlichen Zonengrössen. Die Wirksamkeiten bzw. Potenzen werden nach der Formel berechnet:

$$\text{Potenz (Einheiten/ml)} = \left(\frac{[D - D_s] \log 2}{\text{Neigung}} \right)$$

(Potenz des Standards) × Verdünnung × 10

worin D der durchschnittliche Durchmesser der von der Unbekannten gebildeten Zonen, D_s der durchschnittliche Durchmesser der Standardzonen und «Verdünnung» der Grad, mit der die Unbekannte vor der Analyse verdünnt wurde, bedeuten. Wird kein Standard verwendet, nimmt man an, dass D_s 0,25 mm beträgt und die (Potenz des Standards) wird als 1 Einheit/ml angenommen, bestimmt an *Vibrio percolans* ATCC 8461. Reines 890 A₁ wird so definiert, dass es eine Wirksamkeit von 250 Einheiten pro Hydroxylamin-verschwindbare Absorptionseinheit bei 300 nm ergibt, wenn es als Standard verwendet wird.

II. Analysen- bzw. Assayverfahren für die Bestimmung der «890 Assay-Einheiten»

Ein an sich bekanntes Agarplattenscheiben-Diffusionsverfahren wird unter Verwendung von *Vibrio percolans* ATCC 8461 als Testorganismus verwendet. Cephaloridin wird als Standard verwendet. *Vibrio percolans* ATCC 8461 enthaltende Platten werden folgendermassen hergestellt. Eine Kultur von *Vibrio percolans* ATCC 8461 wird in einem Nährbrühe-Hefeextrakt über Nacht auf einer Rotationsschüttelvorrichtung bei 28 °C inkubiert und dann wird auf eine Dichte von 60% Durchlässigkeit bei 660 nm verdünnt. Ein 33,2 ml Teil dieser verdünnten Kultur wird zu 1 l Medium zugegeben, das ein Nähragar plus 0,2% Hefeextrakt enthält und bei 46 °C gehalten wird. Das inokulierte, Agar enthaltende Medium wird auf 100×15 mm Kunststoff-Petrischalen, 10 ml pro Schale, gegossen, gekühlt und bei 2 bis 4 °C bis zu 5 Tagen vor der Verwendung gehalten.

Die Konzentration an Cephaloridin, die äquivalent zu 1 Einheit/ml 890A₁ ist, wird durch Analyse an Platten, die wie oben beschrieben hergestellt wurden, die jedoch 5 ml inokuliertes Medium/Platte enthalten, folgendermassen bestimmt. Vier Konzentrationen an Cephaloridin werden als Standard verwendet – 3,12, 6,25, 12,5 und 25 µg/ml mit 12,5 µg/ml als Vergleichslösung. Die Zonendurchmesser auf einer 5 ml Platte für den Standard sind wie folgt:

Konzentration (µg/ml)	Zonendurchmesser (mm)
3,12	16,8
6,25	22,3
12,5	25,0
25	29,6

Eine Einheit wird als die Menge an Antibiotikum/ml definiert, die eine 25 mm Hemmzone auf einer 5 ml Platte, wie in Teil I oben beschrieben, ergibt. Daher wird bei diesem Versuch eine Konzentration von 12,5 µg/ml Cephaloridin äquivalent zu 1 Einheit 890A₁/ml angenommen. Da die Neigung der Linie für Cephaloridin 4,0 beträgt, werden die Berechnungen der Potenz der Probe unter Verwendung einer Neigung von 4,0 durchgeführt.

III. Hydroxylamin-Reaktion

Antibiotikum 890A₉ reagiert mit Hydroxylamin und ergibt eine Substanz, bei der die Absorption bei 308 nm im wesentlichen verschwunden ist. Man erhält somit eine Grundlage für eine quantitative Analyse des Antibiotikums 890A₉.

Die zu analysierende Lösung wird auf 0,05 M in Kaliumphosphat, pH 7,4 durch Zugabe von 1/20 Vol. einer Lösung, die 0,8 M K₂HPO₄ und 0,2 M KH₂PO₄ enthält, gebracht. 1/100 Vol. von 1 M Hydroxylamin-hydrochlorid wird zugegeben und die Absorption bei 308 nm wird in Intervallen von 1/2 bis 2 min gemessen. Die Umsetzung wird bei Zimmertemperatur durchgeführt. Kinetische Werte erster Ordnung werden angenommen und die Halbwertszeit wird aus der Absorptionsabnahme während der ersten 10 min bestimmt. Aus dieser Halbwertszeit wird die Zeit geschätzt, bei der keine weitere Absorptionsabnahme beobachtet werden sollte, und die Beobachtungen werden über diesen Zeitpunkt hinweg durchgeführt. Wenn man keine weitere Abnahme über diese Zeit beobachtet, wird die gesamte Absorptionsabnahme als «Hydroxylamin-verschwindbare Absorption bei 308 nm (HAEA₃₀₈)» genommen (wobei für die Verdünnungswirkung und die Absorption des Hydroxylamins korrigiert wird). Wenn man eine Absorptionsabnahme über diese Zeit beobachtet, wird die Rate der Hintergrundsabsorptionsabnahme berechnet, und die beobachtete Abnahme zu diesem Zeitpunkt wird für die Hintergrundsabnahme korrigiert, wobei man annimmt, dass die Hintergrundsabnahme mit

der Zeit linear verläuft. Der korrigierte Wert wird dann als HAEA₃₀₈ aufgezeichnet.

Die Anzahl der HAEA₃₀₈-Einheiten ist gleich dem HAEA₃₀₈, multipliziert mit dem Volumen in ml.

In den folgenden Beispielen werden die Verfahren, gemäss denen die beschriebenen Produkte hergestellt werden, erläutert. Die Herstellung des Antibiotikums 890A₁ wird in der US-Anmeldung mit der Ser.-Nr. 634 300 beschrieben. Auf diese Veröffentlichung wird expressis verbis Bezug genommen.

Beispiel 1

Eine MA-4638 enthaltende Schrägkultur wird zur Inokulierung eines 250 ml Erlenmeyerkolbens, der mit Ablenkeorganen versehen ist und 50 ml Medium A enthält, verwendet.

Medium A

Dextrose	10,0 g
Hefeautolysat («Ardamine»*)	10,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
Phosphatpuffer**	2,0 ml
destilliertes Wasser	1000 ml

pH 6,5

* «Ardamine»: Yeast Products, Inc.

** Phosphatpufferlösung:

KH ₂ PO ₄	91,0 g
Na ₂ HPO ₄	95,0 g
destilliertes Wasser	1000 ml

Dieser Kolben wird bei 28 °C auf einer 220 U/min Schüttelvorrichtung mit einer Schwingungsamplitude von 5,08 cm 2 Tage lang geschüttelt, bis das Wachstum zufriedenstellend ist. Nach 2 Tagen wird dieses Impfgut zur Inokulierung von drei 250 ml Erlenmeyerkolben, die 40 ml Medium B enthalten, unter Verwendung von 2 ml/Kolben (5%) verwendet.

Medium B

Tomatenpaste bzw. -mark	20,0 g
Gesamtweizen (gemahlen)	20,0 g
destilliertes Wasser	1000 ml

pH: unter Verwendung von NaOH auf 7,0 eingestellt.

Diese Produktionskolben werden ebenfalls bei 28 °C auf einer 220 U/min Schüttelvorrichtung bis zu 4 Tage lang geschüttelt, wobei während der Fermentation Analysenversuche durchgeführt wurden. Nach einem Alter von 3 Tagen wird ein aliquoter Teil der überstehenden Lösung aus der zentrifugierten Brühe für die Klassifizierung und Identifizierungsuntersuchung verwendet. Unter Verwendung von 0,63 cm Analysenscheiben auf Standardanalysenplatten ergibt diese Brühe eine 22 mm Hemmzone gegenüber *Proteus vulgaris* und eine 15 mm Hemmzone gegenüber *Salmonella gallinarum*. Die Bioautographie eines Elektrophoretogramms der zentrifugierten Brühe zeigt zwei Komponenten. Der sich schneller bewegende kleinere Flecken enthält 890A₉.

Beispiel 2

Fünfzehn gefrorene Ampullen, die 1 ml MA-4638-Kulturbede enthalten, werden langsam aufgetaut und der Inhalt wird aseptisch in fünfzehn 250 ml Erlenmeyerkolben mit dreifachen Umlenkelementen, die 50 ml C-Impfmedium enthalten, überführt. Die Kolben werden mit Baumwolle verschlossen.

C-Medium

autolysierte Hefe («Ardamine»*)	10,0 g
Glucose	10,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
Phosphatpuffer**	2,0 ml
destilliertes Wasser	1000 ml

der pH-Wert wird mit NaOH vor der Behandlung im Autoklaven auf 6,5 eingestellt

* «Ardamine»: Yeast Products, Inc.

** Phosphatpufferlösung:

KH ₂ PO ₄	91,0 g
Na ₂ HPO ₄	95,0 g
destill. Wasser	1000 ml

Die Impfkolben werden 20 bis 24 h lang bei 28 °C ± 1 °C an einem 210 U/min Gyrotationsschüttler, 5,08 cm (2 inch) Schwingungsamplitude, geschüttelt. Die Brühe von den Impfkolben wird zur Inokulierung von Produktionskolben verwendet.

Die folgenden unterschiedlichen Produktionskolben, die D-Produktionsmedium enthalten, werden verwendet: sechs 2 l Schüttelkolben ohne Ablenkelemente, die 150 ml Medium/Kolben enthalten, mit Baumwolle verschlossen; acht 2 l Schüttelkolben mit drei Umlenkelementen, die 350 ml Medium/Kolben enthalten, mit Mullverschluss; und zweihundertfünfzig 250 ml Schüttelkolben ohne Ablenkelemente, die 40 ml Medium/Kolben enthalten, mit Baumwolle verschlossen. Die Gehalte an verwendetem Inokulum sind: 5 ml/150 ml Medium; 10 ml/350 ml Medium; und 1,5 ml/40 ml Medium.

D-Medium

Dextrin CPC-modifizierte Stärke)	40,0 g
Schlempe	7,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	50,0 mg
destilliertes Wasser	1000 ml

der pH-Wert wird mit NaOH vor der Behandlung im Autoklaven auf 7,3 eingestellt

Nach der Inokulation werden die Produktionskolben bei 25 °C ± 1 °C unter Schütteln auf einer 220 U/min Gyrotationsschüttelvorrichtung, 5,08 cm Schwingungsamplitude, während 3 Tagen geschüttelt. Die Kolben werden geerntet und der Inhalt wird vereinigt.

Die Brühe wird in 200 ml Teilen bei 11 000 U/min während 15 min zentrifugiert. Zu den vereinigten überstehenden Lösungen, insgesamt 9 l, gibt man 2 ml 0,1 M EDTA, und die überstehende Lösung wird auf eine Säule (8,2 × 20 cm) von Dowex-1 × 2 (Cl⁻), 0,297 bis 0,149 mm aufgebracht, die zuvor mit 5 l 0,1 M HCl + 30 g/l NaCl in 80%igem (Vol/Vol) wässrigem Methanol und anschliessend mit 5 l entionisiertem Wasser gewaschen wurde. Die Geschwindigkeit der Anwendung beträgt 10 bis 50 ml/min. Nach der Anwendung der Probe wird die Säule mit 1 l entionisiertem Wasser und anschliessend mit 9 l 0,15 M NaCl + 0,01 M tris-HCl-Puffer, pH 7,0, + 25 µM neutral. EDTA in 50%igem wässrigem Methanol gewaschen. Das Antibiotikum 890A₉ wird dann mit 9 l eines 30 g/l NaCl ± 0,01 M tris-HCl-Puffer, pH 7,0, + 25 µM neutr. EDTA in 80%igem wässrigem Methanol in einer Strömungsrate von 40 ml/min eluiert. Die Fraktionen von 200 bis 900 ml werden gesammelt.

Die antibiotische Aktivität nach der ATCC 8461 Analyse scheint in allen Fraktionen, 1 bis 19, aufzutreten, mit einem breiten Maximum bei den Fraktionen 6 bis 11, die sich von 1290 bis 3550 ml eluiertem Volumen erstrecken. Die Fraktionen 6 bis 14 werden vereinigt und bei vermindertem Druck auf 190 ml konzentriert, und der pH-Wert wird durch Zugabe von 0,4 ml 12M HCl von 7,6 auf 6,5 gebracht.

Das Konzentrat wird auf eine Säule (4,95 × 36 cm) aus XAD-2, die zuvor mit 4 l von je 60%igem wässrigem Aceton, entionisiertem Wasser und 50 g/l NaCl in entionisiertem Wasser gewaschen wurde, angewendet. Nach der Anwendung der Probe wird die Säule dreimal mit 1 l entionisiertem Wasser gewaschen und dann mit entionisiertem Wasser bei 15 ml/min eluiert. Die Fraktionen von 100 bis 500 ml werden gesammelt. Diese Säule wird gewaschen und die Chromatographie wird bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die verdünnten Fraktionen werden unmittelbar mit Eis-Wasser gekühlt.

Die antibiotische Aktivität nach der ATCC 8461-Analyse

tritt in den Fraktionen 4 bis 12 auf, die sich von 450 bis 2345 ml eluiertem Volumen erstrecken. Die Fraktionen 5 bis 8, die sich von 600 bis 1245 ml eluiertem Volumen erstrecken, besitzen die höchsten Verhältnisse an HAEA₃₀₄/A₂₂₀ und werden dementsprechend für die weitere Reinigung vereinigt. Die gesammelten Fraktionen besitzen insgesamt 607 HAEA₃₀₄-Einheiten.

Die vereinigten Fraktionen 5 bis 8 werden bei vermindertem Druck auf 40 ml konzentriert, und das Konzentrat wird mit 160 ml Methanol verdünnt. Der pH-Wert dieser Lösung wird mit 1 M NaOH auf 7,5 eingestellt, und die Lösung wird dann auf eine Säule, 2,2 × 40 cm, aus «Dowex»-1 × 4 (Cl⁻), (-0,037 mm), die zuvor mit 2 l 0,1 M HCl + 30 g/l NaCl in 80%igem (Vol/Vol) wässrigem Methanol und dann mit 1 l 80%igem Methanol gewaschen wurde, aufgebracht. Die Rate der Anwendung der Probe beträgt 2 ml/min. Nach der Anwendung wird die Säule mit 50 ml 80%igem Methanol gewaschen und mit 0,26 M NaCl + 0,01 M NH₄Cl + 0,0002 M NH₃ in 80%igem Methanol bei 1 ml/min eluiert. Die Fraktionen von 10 ml werden gesammelt.

Die Bioaktivität nach der ATCC 8461-Analyse tritt in den Fraktionen 87 bis 280 auf. Der Hauptpeak des Antibiotikums 890A₉ tritt in den Fraktionen 231 bis 275 auf, die maximale Aktivität tritt in der Fraktion 250 auf. Die Fraktionen 231 bis 275 werden vereinigt und ergeben die 890A₉-«Dowex»-Charge.

Die 890A₉-«Dowex»-Charge (vereinigte Fraktionen 231 bis 275) wird mit 1600 ml entionisiertem Wasser verdünnt und auf eine Säule (2,2 × 42 cm) aus «Dowex»-1 × 2 (Cl⁻) (-0,037 mm), bei 2 ml/min aufgebracht. Nach der Anwendung wird die Säule mit 50 ml 50%igem (Vol/Vol) Methanol gewaschen und mit 3,4 l 0,30 M NaCl + 0,010 M NH₄Cl + 0,0002 M NH₃ in 50%igem Methanol und anschliessend mit 2 l 0,30 M NaCl + 0,01 M NH₄Cl ± 0,0002 M NH₃ in 60%igem Methanol bei 2 ml/min eluiert. Fraktionen von 9,5 ml werden gesammelt.

Der Hauptabsorptionspeak bei 305 nm tritt in den Fraktionen 385 bis 440 mit einem Maximum bei der Fraktion 410 auf. Die Fraktionen 400 bis 425 besitzen die höchsten A₃₀₅/A₂₆₀-Verhältnisse und werden für die weitere Verarbeitung vereinigt. Die vereinigten Fraktionen enthalten 160 A₃₀₅ Einheiten, von denen 147 durch Hydroxylamin auslöschar sind.

Die vereinigten Fraktionen werden bei vermindertem Druck auf 5,5 ml konzentriert. Der pH-Wert wird durch Zugabe von 30 µl 1 M NaOH auf 7,1 eingestellt, und 5,5 ml Methanol werden zugegeben. Die Probe wird dann auf eine Säule (2,2 × 69 cm) aus «Sephadex» G-10 angewendet, die zuvor mit 2 l 0,05 mM NH₃ in 50%igem (Vol/Vol) Methanol gewaschen wurde. Nach der Anwendung der Probe wird die Säule mit 0,05 mM NH₃ in 50%igem Methanol, bei 1 ml/min, eluiert. Fraktionen von 2,95 ml werden gesammelt.

Der Hauptabsorptionspeak bei 307 nm tritt bei den Fraktionen 69 bis 85 mit einem Maximum bei den Fraktionen 77 bis 78 auf. Leitfähigkeitsmessungen einzelner Fraktionen zeigen, dass der Hauptabsorptionspeak bei 307 nm etwas nach dem Salzpeak eluiert. Die Fraktionen 74 bis 82, die 68 A₃₀₇-Einheiten mit einem Verhältnis von A₃₀₇/A₂₆₀ von 1,80 enthalten, werden vereinigt.

Die vereinigten Fraktionen werden bei vermindertem Druck auf 3 ml konzentriert, und das Konzentrat wird auf eine Säule (3,4 × 45 cm) aus «Dowex»-50 × 2 (Na⁺) (0,074 bis 0,037 mm), angewandt, die zuvor mit 2 l 10⁻⁵ M NaOH in entionisiertem Wasser und anschliessend mit 100 ml entionisiertem Wasser gewaschen wurde. Nach Anwendung der Probe wird die Säule zweimal mit 2 ml entionisiertem Wasser gespült und dann mit entionisiertem Wasser bei 4 ml/min eluiert. Fraktionen von 3,95 ml werden gesammelt.

Der Hauptabsorptionspeak bei 307 nm tritt bei den Fraktionen 38 bis 48 mit einem Maximum bei den Fraktionen 42 und 43 auf. Die Fraktionen 42, 43 und 44 haben die höchsten A₃₀₇/A₂₂₀-Verhältnisse und werden für die Lyophilisierung gesammelt. Der pH-Wert der vereinigten Fraktionen wird durch

Zugabe von 2,2 µl 0,1 M NaOH von 5,8 auf 7,0 eingestellt und 2,5 ml werden entfernt. Die restlichen 9,4 ml werden bei vermindertem Druck auf 1 ml konzentriert und 10 ml D₂O werden zugegeben. Die Konzentration auf 1 ml und die Zugabe von 10 ml D₂O werden wiederholt und die Endkonzentration wird erreicht. 1 ml des Konzentrats wird gefroren und lyophilisiert. Man erhält 20 mg Feststoffe, wovon etwa 18 mg NaCl sind, geschätzt durch die Leitfähigkeit.

Beispiel 3

Zwei gefrorene Ampullen, die je 1 ml MA-4638-Kulturbede enthalten, werden langsam aufgetaut, und der Inhalt wird aseptisch in zwei 250 ml Erlenmeyerkolben mit drei Ablenkelementen, die je 50 ml C-Impfmedium enthalten, gegeben. Die Kolben werden mit Baumwolle verschlossen.

C-Medium
autolysierte Hefe («Ardamine»*) 10,0 g
Glucose 10,0 g
MgSO₄·7H₂O 0,05 g
Phosphatpuffer** 2,0 ml
destilliertes Wasser 1000 ml
der pH-Wert wird durch Zugabe von NaOH vor der Behandlung im Autoklaven auf 6,5 eingestellt.

*«Ardamine»: Yeast Products, Inc.

**Phosphatpufferlösung:

KH₂PO₄ 91,0 g
Na₂HPO₄ 95,0 g
destill. Wasser 1000 ml

Die Impfkolben werden 20 bis 24 h lang bei 28° ± 1 °C auf einer 210 U/min Gyrotationsschüttelvorrichtung, 5,08 cm Schwingungsamplitude geschüttelt. Der Inhalt wird gesammelt und zur Inokulierung der Produktionskolben verwendet.

Zehn 2 l Schüttelkolben mit Ablenkelementen, die je 300 ml D-Produktionsmedium enthalten, werden mit 10 ml/Kolben der Brühe von dem Impfkolben inokuliert. Die Produktionskolben werden mit einem Mullverschluss bedeckt.

D-Medium
Dextrin (CPC modifizierte Stärke) 40,0 g
Schlempe 7,0 g
Hefeextrakt 5,0 g
CoCl₂·6H₂O 50,0 mg
destilliertes Wasser 1000 ml

der pH-Wert wird mit NaOH vor der Behandlung im Autoklaven auf 7,3 eingestellt

Nach der Inokulierung werden die Produktionskolben bei 24° ± 1 °C unter Schütteln auf einer 210 U/min Gyrotationsschüttelvorrichtung, 5,08 cm Schwingungsamplitude, 3 Tage lang inkubiert. Die Kolben werden geerntet, der Inhalt wird vereinigt und die Brühe wird auf ihre Aktivität geprüft.

Erntealter (h) 72
pH-Wert 6,5
890 Assay (Einheiten/ml) 30,45

2 l der gesamten Brühe aus den obigen KR-Produktionskolben werden in 200 ml Teilen bei 9000 U/min zentrifugiert; man erhält 1,7 l überstehende Lösung mit einem pH-Wert von 6,8.

Die überstehende Lösung wird auf eine «Dowex» 1 × 2- (Cl⁻)-Säule, 50 bis 100 mesh (0,297 bis 0,149 mm), Schichtdimension 3,9 cm × 25 cm, bei einer Strömungsrate von 5 bis 10 ml/min angewendet. Die Säule wird mit 50 ml entionisiertem Wasser und anschliessend mit 2 l 0,15 M NaCl + 0,02 M tris-HCl-Puffer, pH 7,0, + 0,25 µM neutr. EDTA in 50%igem (Vol/Vol) wässrigem Methanol gewaschen.

Das Produkt wird dann mit 30 g/l NaCl + 0,02 M tris-HCl-Puffer, pH 7,0, + 25 µM EDTA in 80%igem (Vol/Vol) wässri-

gem Methanol bei einer Strömungsrate von 5 ml/min eluiert. Fraktionen von 10 ml werden gesammelt.

Die Bioaktivität tritt in den Fraktionen 5 bis 180 mit einem Maximum bei den Fraktionen 25 bis 70 auf. Die Fraktionen 12 bis 105 werden vereinigt und bei vermindertem Druck auf 15 ml konzentriert. Der pH-Wert wird mit 1 M HCl auf 6,5 eingestellt und das Konzentrat wird auf eine Säule (3,4 × 55 cm) aus XAD-2 angewendet, die mit 2,5 l von je 60%igem (Vol/Vol) wässrigem Aceton, entionisiertem Wasser und 5% NaCl in entionisiertem Wasser gewaschen wurde. Die Säule wird mit 3 × 5 ml Teilen entionisiertem Wasser gespült und mit entionisiertem Wasser bei 10 ml/min eluiert. Fraktionen von 10 ml werden gesammelt.

Die Bioaktivität tritt in den Fraktionen 32 bis 270 mit einem Maximum bei den Fraktionen 42 bis 62 auf. Die gesamte Bioaktivität, die eluiert wird, beträgt 25% der Aktivität der ursprünglichen Brühe. Die Fraktionen 40 bis 240 werden vereinigt und die gelagerten vereinigten Fraktionen 12 bis 34 aus der XAD-2-Säule von Beispiel 1 zugegeben. Die gesamten vereinigten Fraktionen werden bei vermindertem Druck auf 50 ml konzentriert; 20 sie enthalten 120 HAEA₃₀₄-Einheiten.

Das Konzentrat wird mit 200 ml Methanol verdünnt und bei 2 ml/min auf eine Säule (2,15 × 40 cm) aus «Dowex»-1×4, (−0,037 mm), aufgebracht, die zuvor mit 2 l von 30 g/l NaCl in 80%igem wässrigem Methanol und 1 l 80%igem wässrigem Methanol gewaschen wurde. Nach Anwendung der Probe wird die Säule mit 100 ml 80%igem (Vol/Vol) wässrigem Methanol gewaschen und mit 2,5 l 0,22 M NaCl + 0,01 M NH₄Cl + 0,0002 M NH₃ in 80%igem (Vol/Vol) wässrigem Methanol und anschliessend mit 3 l 0,31 M NaCl + 0,01 M NH₄Cl + 0,0002 M NH₃ in 80%igem (Vol/Vol) wässrigem Methanol eluiert. Die Strömungsrate beträgt 2 ml/min. Fraktionen von je 10 ml werden gesammelt.

Das Antibiotikum 890A₉ wird an der «Dowex»-1×4-Säule abgetrennt und in den Fraktionen 280 bis 350 eluiert, bestimmt durch Analyse an ATCC 8461.

Die «Dowex»-1×4-Fraktionen 307 bis 338 werden vereinigt und bei vermindertem Druck auf 7,6 ml konzentriert. 30 µl 1 M NaOH werden zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,0 bis 7,5 zugegeben. Das Konzentrat wird mit 7,6 ml Methanol verdünnt, und die Lösung wird zur Entfernung des Salzniederschlags zentrifugiert. Die überstehende Lösung wird bei vermindertem Druck auf 4 ml konzentriert, und zu diesem Konzentrat gibt man 6 ml Methanol. Der Salzniederschlag kann sich absetzen und die überstehende Lösung wird auf eine Säule (2,2 × 70 cm) aus «Sephadex» G-10 pipettiert, die zuvor mit 10 ml 1 M NH₃ in wässrigem Methanol und anschliessend mit 1 l 0,0001 M NH₃ in 80%igem Methanol gewaschen wurde. Nach Anwendung der Probe wird die Säule dreimal mit 1 ml 0,0001 M NH₃ in 80%igem Methanol gespült und mit 400 ml des gleichen Lösungsmittels mit einer Strömungsrate von 1 ml/min gewaschen. Die Säule wird dann mit 0,00005 M NH₃ in 50%igem wässrigem Methanol bei einer Strömungsrate von 1 ml/min eluiert. Fraktionen von 10 ml werden gesammelt, wobei man vom Beginn der ersten Anwendung des 50%igen Methanoleluats zählt.

Ein Absorptionspeak bei 305 nm tritt bei den Fraktionen 9 bis 22 mit einem Maximum bei der Fraktion 12 auf. Die Fraktionen 11 bis 17 werden vereinigt; sie enthalten 17 A₃₀₅-Einheiten, von denen 9,1 durch Hydroxylamin auslösbar sind.

Die vereinigten Fraktionen werden bei vermindertem Druck auf 2 ml konzentriert, mit 99,7% D₂O auf 10 ml verdünnt und dann bei vermindertem Druck auf 1,5 ml konzentriert, gefroren und lyophilisiert. Das entstehende, weisse Pulver, das das Produkt 890A₉ und mehr als 5 mg Natriumchlorid enthält, wird NMR-spektroskopisch analysiert.

Antibiotikum 890A₁

Ein Rohr bzw. eine Ampulle aus lyophilisierter Kultur von *Streptomyces glavogriseus* MA-4600 NRRL 8140 wird aseptisch geöffnet und der Inhalt wird in einem Rohr suspendiert, das 1,5 ml steriles Medium E der folgenden Zusammensetzung enthält.

Medium E	
Hefeextrakt	10,0 g
Glucose	10,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
Phosphatpuffer**	2 ml
destilliertes Wasser	1000 ml
**Phosphatpuffer:	
KH ₂ PO ₄	91,0 g
Na ₂ HPO ₄	95,0 g
destilliertes Wasser	1000 ml

Diese Suspension wird zur Inokulierung eines 250 ml Erlenmeyerkolbens mit drei Ablenkelementen, der 54 ml Impfmedium C der folgenden Zusammensetzung enthält, verwendet.

Medium C	
autolyseerte Hefe («Ardamine»*)	10,0 g
Glucose	10,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
Phosphatpuffer**	2 ml
destilliertes Wasser	1000 ml
der pH-Wert wird mit NaOH auf 6,5 eingestellt	
*«Ardamine»:	
Yeast Products, Corp.	
**Phosphatpufferlösung:	
KH ₂ PO ₄	91,0 g
Na ₂ HPO ₄	95,0 g
destill. Wasser	1000 ml

Der Impfkolben wird mit Baumwolle bzw. Watte verschlossen und 30 h bei 28° ± 1 °C auf einer 220 U/min Gyrotations-schüttelvorrichtung, 5,08 cm Schwingungsamplitude, geschüttelt.

Fünfzig 250 ml Erlenmeyer-Produktionskolben ohne Ablenkelemente, die je 40 ml Produktionsmedium F enthalten, werden mit 1 ml/Kolben der Brühe von dem Impfkolben inokuliert. Die Produktionskolben werden mit Watte bzw. Baumwolle verschlossen.

Medium F	
Tomatenpaste bzw. -mark	20,0 g
primäre Hefe	10,0 g
Dextrin («Amidex»)	20,0 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5,0 mg
destilliertes Wasser	1000 ml

der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,2 bis 7,4 eingestellt

Nach der Inokulierung werden die Produktionskolben bei 28° ± 1 °C unter Schütteln auf einer 220 U/min Gyrotations-schüttelvorrichtung, 5,08 cm Schwingungsamplitude, 3 Tage lang geschüttelt. Die Kolben werden auf ihre Aktivität gegenüber *Vibrio percolans* ATCC 8461-Standardassayplatten unter Verwendung von 1,27 cm Analysenscheiben, die in zentrifugierte Fermentationsbrühenproben eingetaucht wurden, untersucht. Die Proben werden mit 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,4, verdünnt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Stunden nach der Entnahme	72
pH-Wert	6,4
<i>Vibrio percolans</i>	
(1/100 Verdünnung) Assay	23 mm
890 Assay, Einheiten/ml	103

Die gesamte Brühe wird in 200 ml Teilen in Polycarbonatflaschen 15 min bei 9000 U/min zentrifugiert; man erhält 1600

ml vereinigte überstehende Lösung mit einer Potenz von 104 Einheiten/ml. Dazu gibt man 0,5 ml 0,1 M neutr. EDTA.

Die zentrifugierte Brühe wird an einer «Dowex»-1×2 (Cl⁻), (0,297 bis 0,149 mm)-Säule, Schichtdimensionen 3,8 × 22 cm, in einer Strömungsrate von 6 bis 20 ml/min adsorbiert. Die Säule wird mit 100 ml entionisiertem Wasser gespült und mit 1 l entionisiertem Wasser, enthaltend 50 g Natriumchlorid, 0,02 M tris-HCl-Puffer, pH 7,0, und 25 µM neutr. EDTA bei einer Strömungsrate von 6 ml/min eluiert. Fraktionen von 10 ml werden gesammelt. Antibiotikum 890A₁ tritt in den Fraktionen 13 bis 81 mit einem Maximum bei den Fraktionen 25 bis 33 auf, wenn man vom Beginn der ersten Anwendung des Salzeluats an zählt. Die Fraktionen 24 bis 41, die die höchsten Biopotenz/A₂₂₀-Verhältnisse besitzen, werden für die weitere Behandlung vereinigt. Die vereinigten Fraktionen besitzen insgesamt 29 000 Einheiten oder 17% der angewendeten Bioaktivität.

Das «Dowex»-Eluat wird auf 10 ml konzentriert, und der pH-Wert wird mit verdünnter Chlorwasserstoffsäure auf 6,5 eingestellt. Das Konzentrat wird auf eine Säule aus XAD-2, Schichtdimensionen 3,3 × 36 cm, aufgebracht, die zuvor mit je 2 l 60%igem Aceton, entionisiertem Wasser und 5%igem (Gew./Vol.) Natriumchlorid in entionisiertem Wasser gewaschen wurde. Die Probe wird damit entionisiertem Wasser in einer Strömungsrate von 6 ml/min eluiert. Die Fraktionen von 40 bis 260 ml werden gesammelt.

Die antibiotische Aktivität tritt in den Fraktionen 6 bis 14 auf, die sich von 220 bis 2560 ml des eluierten Volumens erstrecken. Der Peak tritt bei den Fraktionen 9 und 10 auf, die sich von 370 bis 590 ml eluiertem Volumen erstrecken. Die Fraktionen 9 bis 12, die 370 bis 1060 ml des eluierten Volumens entsprechen, besitzen die höchsten HAEA₃₀₀/A₂₂₀-Verhältnisse und werden für die weitere Behandlung vereinigt. Diese Fraktionen enthalten 36 600 Einheiten; dies entspricht 126% der offensichtlich angewandten Aktivität.

Die vereinigten Fraktionen 9 bis 12 werden auf 100 ml konzentriert und das Konzentrat wird auf eine Säule aus «Dowex»-1×4 (Cl⁻) (-0,037 mm), Schichtdimension 2,2×41 cm, in einer Strömungsrate von 2 ml/min aufgebracht. Die Säule wird mit 50 ml entionisiertem Wasser gespült und mit 3 l 0,07 M NaCl + 0,005 M NH₄Cl + 0,0001 M NH₃ in entionisiertem Wasser in einer Strömungsrate von 2 ml/min eluiert. Fraktionen von 10,8 ml werden gesammelt, beginnend bei der ersten Anwendung des Eluierungsmittels.

Der Hauptpeak des Antibiotikums 890A₁ tritt in den Fraktionen 181 bis 217 mit einem Maximum bei der Fraktion 198 auf. Die Fraktionen 186 bis 210, die insgesamt 114 Absorptionseinheiten bei 300 nm enthalten, werden vereinigt.

Die vereinigten Fraktionen werden auf 4,0 ml konzentriert, und der pH-Wert wird durch Zugabe von 16 µl 1 M NaOH auf 7,3 eingestellt. Das Konzentrat wird auf eine Säule aus «Bio-Gel» P-2 (0,074 bis 0,037 mm), Schichtdimension 2,15 × 70 cm, aufgebracht, mit 3×1 ml entionisiertem Wasser gewaschen und mit entionisiertem Wasser bei 0,96 ml/min eluiert. Fraktionen von 3,85 ml werden gesammelt.

Der Hauptpeak des Antibiotikums 890A₁ tritt bei den Fraktionen 24 bis 44 mit einem Maximum bei den Fraktionen 33 und 34 auf. Die Fraktionen 27 bis 38, die die höchsten A₃₀₀/A₂₄₅-Verhältnisse besitzen, werden für die Lyophilisierung vereinigt. Diese vereinigten Fraktionen haben insgesamt 72 A₃₀₀-Einheiten.

Zur Durchführung der Lyophilisierung werden die vereinigten Fraktionen auf 3,0 ml konzentriert, und der pH-Wert des Konzentrats wird durch Zugabe von 10 µl 0,1 M NaOH auf 7,5 eingestellt. Die Probe wird in zwei Teile von je 1,50 ml geteilt, und die Teile werden getrennt schnell gefroren und aus 14 ml Ampullen mit Glasschraubverschluss lyophilisiert. Jede Probe enthält 1,73 mg 890A₁; dies entspricht 35,8 A₃₀₀-Einheiten.