



**NORGE**

**[NO]**

**STYRET  
FOR DET INDUSTRIELLE  
RETTSVERN**

**[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 145342**

(51) Int. Cl.<sup>3</sup> C 12 P 1/06, //(C 12 R 1/045)

(21) Patentsøknad nr. 760725

(22) Inngitt 03.03.76

(23) Løpedag 03.03.76

(41) Alment tilgjengelig fra 07.09.76

(44) Søknaden utlagt, utlegningsskrift utgitt 23.11.81

(30) Prioritet begjært 05.03.75, Storbritannia, nr. 9057/75

(54) Oppfinnelsens benevnelse Fremgangsmåte til fremstilling av nye fosfoglykolipid- og glykopeptidantibiotika.

(71)(73) Søker/Patenthaver GRUPPO LEPETIT S.P.A.,  
Via Durando 38,  
I-20158 Milano,  
Italia.

(72) Oppfinner CAROLINA CORONELLI,  
GRAZIA BERETTA,  
MARIA ROSA BARDONE,  
FRANCESCO PARENTI,  
alle: Milano,  
Italia.

(74) Fullmektig Bryns Patentkontor A/S, Oslo.

(56) Anførte publikasjoner Ingen.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte til fremstilling av nye fosfoglykolipid- og glykopeptidantibiotika. Det oppnås herved en blanding som omfatter en familie av nye antibiotiske stoffer som kan separeres og isoleres i form av enkeltkomponenter.

Disse stoffer vil i det følgende bli betegnet som antibiotikum 8327 faktor A, 8327 faktor B og 8327 faktor C.

Antibiotikum 8327 faktor A, som videre er en blanding av tre lignende stoffer, betegnes også teichomycin og de tre fraksjonene vil bli kalt teichomycin A<sub>1</sub>, teichomycin A<sub>2</sub> og teichomycin A<sub>3</sub>.

Blandingen av antibiotiske stoffer og enkeltfaktorene oppnås ved fermentering av en stamme tilhørende slekten *Actinoplanes* betegnet *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. og med kolleksjonsnummer A/8327. Stammen er deponert ved A.T.C.C. og har fått deponeringsnummer 31121.

Ifølge foreliggende oppfinnelse er det tilveiebrakt en fremgangsmåte til fremstilling av nye fosfoglykolipid- og glykopeptidantibiotika betegnet teichomycin A<sub>1</sub> og teichomycin A<sub>2</sub>, og denne fremgangsmåte er kjennetegnet ved at mikroorganismestammen *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. ATCC 31121 dyrkes under aerobe betingelser i vandig næringsmedium inneholdende en assimilerbar karbonkilde, en assimilerbar nitrogenkilde og uorganiske salter, hvoretter den antibiotisk aktive blanding utvinnes og teichomycin A<sub>1</sub> og A<sub>2</sub> separeres og eventuelt renses. Vanligvis blir den antibiotika-produserende stamme pre-dyrket i en rysteflaske inntil man får en vesentlig mycelievekst- hvoretter kulturen anvendes for inokulering av fermenteringsbeholdere inneholdende nærende gjæringsmedium.

Dyrkingen fortsettes ved 25-35°C under aerobe betingelser i et tidsrom som er tilstrekkelig til å gi et vesentlig antibiotisk nivå. I løpet av denne tiden foretas mikrobiologiske prøver ved hjelp av agar-diffusjonsmetoden for

å regulere konsentrasjonen av dannet antibiotisk stoff. Fermenteringsvæsken filtreres for å separere mycelie-kaken. Antibiotika-blandingen isoleres fra den filtrerte fermenteringsvæske ved hjelp av konvensjonelle metoder slik som f.eks. ved ekstraksjon med et organisk oppløsningsmiddel hvori den antibiotiske blanding er oppløselig og som er ikke-blandbar med det vandige medium. Ekstraksjonen utføres etter innstilling av pH-verdien på fermenteringsvæsken til ca. 3,5. Egnede organiske oppløsningsmidler for ekstraksjonen velges med fordel fra halogenerte  $C_1$ - $C_4$ -hydrokarboner og  $C_4$ - $C_6$ -alkanoler. Oppløsningsmidlet blir deretter separert fra fermenteringsvæsken ved high speed-sentrifugering, konsentreres til ca. 1/10 - 1/20 av dens opprinnelige volum, avkjøles og henses inntil det dannes et bunnfall som innvinnes på et filter.

Dette bunnfall består i alt vesentlig av antibiotikum 8327 faktor A (teichomycin), d.v.s. en blanding av teichomycin  $A_1$ ,  $A_2$  og  $A_3$ . Antibiotikum 8327 faktorer B og C blir i det vesentlige tilbake i den organiske oppløsning og utfelles ved tilsetning av en stor mengde inert ikke-polart organisk oppløsningsmiddel slik som lett petroleum.

Teichomycin  $A_1$ ,  $A_2$  og  $A_3$  skilles fra hverandre ved kolonnekromatografi mens faktorene B og C skilles fra hverandre ved hjelp av motstrøms-fordelingsteknikker.

Ved ekstrahering av myceliekaken med vandig aceton er det mulig å innvinne et ytterligere produkt. Etter destillasjon av acetonet underkastes den vandige fase den samme behandling som beskrevet ovenfor for den filtrerte fermenteringsvæske.

Beskrivelse av Actinoplanes teichomyceticus nov. sp. ATCC 31121

#### Makroskopisk undersøkelse av kolonier

Stammen med kodennummer A/8327 ble isolert fra en jordprøve fra Nimodi Village - Indore (India). Stammen vokser godt på forskjellige næringsagar-materialer. I havremelagar har koloniene en diameter på 5-6 mm, og de har regelmessige konturer og et midtre dom-lignende fremspring. Et rikt sterilt luft-mycelium finnes på noen media.

#### Mikroskopisk undersøkelse

Sporangier, dannes rikelig på de fleste media og finnes hovedsakelig på koloniens dom. De er sfæriske til ovale med regelmessige konturer med en diameter varierende fra 15-25

µm. Sporangioforer er rette, ca. 15 µm lange med en diameter på 2 µm. Sporene, meget bevegelige, er sfæriske til ovale med en diameter på 1,5 - 2 µm.

På grunnlag av disse karakteristika henføres A/8327 stammen til slekten *Actinoplanes* og betegnes *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. ATCC 31121.

Tabell I i det nedenstående angir kultur-karakteristika for *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. ATCC 31121 dyrket på forskjellige standard media foreslått av Shirling og Gottlieb (Int. J. Syst. Bacteriol, 16, 313-340, 1966) og andre media ifølge Waksman (The Actinomycetes, Vol. II, The Williams and Wilkins Co., 1961). Kultur-karakteristikaene ble bestemt etter 6-14 dagers inkubering ved 30°C.

Tabell II angir utnyttelse av karbonkilder undersøkt ifølge metoden til Pridham og Gottlieb (Journal Bacteriol, 56, 107, 1948).

Tabell III angir de fysiologiske egenskaper til stammen.

Stammen *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. ATCC 31121 er blitt dyrket ved siden av *A. brasiliensis*, *A. missouriensis*, *A. uthaensis*, *A. filippinensis*, *A. italicus*, *A. armeniacus*, *A. deccanensis* ATCC 21983, *A. garbadinensis* ATCC 31049 og *A. liguriae* ATCC 31048. Den førstnevnte stamme kunne klart skilles fra nevnte arter på grunnlag av morfologiske og pigmenteringskarakteristika. I tillegg til dette peptoniserer den lakmusmelk, et sjeldent trekk som deles med den kirsebær-rosa pigmenterte *A. italicus*. Av disse grunner anses stammen A/8327 som en ny art og er gitt navnet *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. ATCC 31121.

#### Tabell 1

##### Kultur-karakteristika

##### Kulturmedium

##### Kulturkarakteristika

Hickey og Tresners agar

Kraftig vekst med glatt overflate lys brun 14/B/9 - spor av hvitaktig luftmycelium - moderat produksjon av sporangier - brunt oppløselig pigment

Bennetts agar

Kraftig vekst med glatt overflate, lys orange 9/B/7, - moderat produksjon av blekrosa luftmycelium

145342

4

Czapek glukoseagar	Kraftig vekst med glatt overflate, lys orange 9/H/7. Produksjon av hvitt-rosa luftmycelium - noen spredte sporangier
Czapek sukroseagar	Kraftig vekst med glatt overflate, blek orange 9/B/7 - moderat produksjon av sporangier
Glukose-asparaginagar	Moderat vekst med glatt overflate, orange 10/D/12
Potetagar	Kraftig vekst med glatt og tynn overflate, lys hassel-brun - rikelig produksjon av blekrøde sporangier - lys hasselbrunt oppløselig pigment
Næringsagar	Dårlig vekst med glatt og tynn overflate, orange 10/5/11
Egg-albumin-agar	Kraftig vekst med glatt overflate, lys blekrød-orange 9/B/5 - rikelig produksjon av sporangier
Pepton-glukoseagar	Kraftig vekst med skrukket overflate, dyp orange 10/C/12 - lys ravfarget oppløselig pigment
Potetplugg	Dårlig vekst, med rynket overflate, lys orange
Loeffler blodserum	Noen spredte kolonier, lys orange med gråaktig brunt oppløselig pigment
Medium nr. 2 (gjærekstrakt-maltagar)	Kraftig vekst med noe skrukket overflate, lett blekrød orange 9/B/6 - rikelige sporangier, lys blekrød 9/A/5 - ravfarget oppløselig pigment
Medium nr. 3 (havremelagar 20 %)	Kraftig vekst med glatt overflate, blek orange 9/B/5 - rikelige sporangier, lys blekrød 9/A/5
Medium nr. 4 (stivelsesagar)	Kraftig vekst med glatt overflate, dyp orange 9/H/10, knapp produksjon av sporangier
Medium nr. 5 (glycerol-asparaginagar)	Kraftig vekst med tynn og glatt overflate, blek orange 9/B/7. Moderat produksjon av luftmycelium, lys blekrød
Medium nr. 6 (pepton-gjærekstrakt jernagar)	Knapp vekst

Medium nr. 7 (tyrosinagar)	Moderat vekst med glatt og tynn overflate, blekrød-brun 12/A/9 - produksjon av lite og hvitaktig luftmycelium - blekrød-brunt oppløselig pigment 12/A/9
Havremelagar (60 %)	Kraftig vekst med glatt overflate blek orange 9/B/5 til lys orange-brun 12/B/8 med tiden - rikelige sporangier, lys blekrød 9/B/5, lys hassel-brunt oppløselig pigment
Skummet melkagar	Kraftig vekst med glatt overflate, brent ravfarget 15/A/12, dyp ravfarget-brunt oppløselig pigment 7/E/12
Kalsium-malatagar	Dårlig vekst, med glatt og tynn overflate, blekorange 9/B/5 - moderat produksjon av sporangier
Agar	Moderat vekst, fargeløs, kraftig dannelse av sporangier
Gelatin	Ravfarget oppløselig pigment
Nitrat-gjæringsvæske	Ravfarget oppløselig pigment

Fargebestemmelse ble foretatt ifølge Maerz og Paul (Maerz, A. og M. Reg Paul 1950, a dictionary of color, 2. utgave M.Grow - Hill Book Company, Inc., New York).

Tallangivelsene for samme kulturmedia refererer seg til de som er gitt ifølge Shirling og Gottlieb.

Tabell II  
Karbonutnyttelse

<u>Karbonkilde</u>	<u>Vekst</u>
Inositol	-
Fruktose	++
Rhamnose	-
Mannitol	++
Xylose	++
Raffinose	-
Arabinose	++
Cellulose	-
Salicin	+
Sukrose	++
Mannose	++

145342

6

Laktose +  
 Glukose (positiv kontroll) ++

- = ingen utnyttelse

+ = tvilsom utnyttelse

++ = sterk positiv utnyttelse

### Tabell III

#### Fysiologiske karakteristika

Stivelseshydrolyse	++
H <sub>2</sub> S-dannelse	++
Kromogen virkning	++
Tyrosin-hydrolyse	-
Kaseinhydrolyse	+++
Ca-malat-hydrolyse	-
Lakmus-melk-koagulering	-
Lakmus-melk-peptonisering	+
Nitrat-reduksjon	++
Gelatin-flytendegjøring	++
Cellulose-dekomponering	-

- = negativ respons

+ = svak positiv respons

++ = positiv respons

+++ = sterk positiv respons

#### Produksjon av antibiotika og isolering

For dannelse av de antibiotiske stoffer blir stammen *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. ATCC 31121 pre-dyrket aerobt i et næringsmedium inntil man får en vesentlig mycelievekst, og ved en pH-verdi varierende fra ca. 6 til ca. 8.

En rysteflaske-kultur kan f.eks. ha følgende sammensetning i g/l:

Kjøtttekstrakt	3,0
Trypton	5,0
Gjærekstrakt	5,0
Glukose	1,0
Oppløselig stivelse	24,0
Kalsiummalat	4,0
Destillert vann q.s. til 1000 ml.	

Flaskene eller kolbene rystes i omkring 24 timer ved

ca. 28-30°C og deretter anvendes pre-kulturene (1 liter) for inokulering av fermentere hver inneholdende 10 liter av følgende næringsmedium:

Kjøtttekstrakt	40 g
Pepton	40 g
Gjærekstrakt	10 g
Natriumklorid	25 g
Soyabønnemel	100 g
Glukose	500 g
Kalsiumkarbonat	50 g
Vannledningsvann q.s.	til 10 liter.

Fermenteringsporsjonene inkuberes aerobt under omrøring ved 28-30°C. Ved intervaller undersøkes den antibiotiske aktivitet mikrobiologisk ved agar-diffusjonsmetoden under anvendelse av *Staphylococcus aureus* som testorganisme. Maksimal aktivitet nås etter 72-96 timers fermentering.

#### Isolering av teichomyciner og antibiotiske 8327 faktorer B og C

Antibiotika som befinner seg i det filtrerte medium og i myceliekaken, kan ekstraheres med organiske oppløsningsmidler på konvensjonell måte.

Den filtrerte væske innstilles til en pH-verdi på 3,5 ved tilsetning av 8 % HCl og ekstraheres deretter to ganger med 30 % butanol. De organiske ekstrakter konsentreres i vakuum ved 45°C til 1/10 av det opprinnelige volum, vaskes med en liten mengde vann ved pH 3,5 og konsentreres igjen til et lite volum. Den konsentrerte oppløsning hensettes ved lav temperatur i 10-15 timer inntil det dannes et bunnfall som innvinnes ved filtrering. Den filtrerte oppløsning helles i en stor mengde lett petroleum og det oppnådde urene bunnfall innvinnes ved filtrering.

Myceliekaken vaskes med vann ved pH 3,5, tørkes under vakuum og ekstraheres med en blanding av vann-aceton, 2:8. Acetonekstraktet konsentreres under vakuum ved 40-45°C. Den vandige rest innstilles til pH 3,5 og ekstraheres tre ganger med butanol. De oppsamlede butanolekstrakter vaskes med en liten mengde vann ved pH 3,5 og konsentreres under vakuum til 1/20 av det opprinnelige volum. Den konsentrerte oppløsning hensettes ved 4°C i 10-12 timer. Dette gir et urent bunnfall som oppsamles ved filtrering. Den filtrerte oppløsning helles i en stor

mengde lett petroleum og gir et ytterligere bunnfall.

Kromatografisk undersøkelse utført som vist i nedenstående tabell IV viser at de produkter som oppnås ved avkjøling av de konsentrerte butanolekstrakter inneholder i det vesentlige  $A_1$ ,  $A_2$  og  $A_3$ , idet  $A_2$  er tilstede i størst mengde, og produktene oppnådd ved utfelling i et inert ikke-polart oppløsningsmiddel (lett petroleum) inneholder antibiotiske 8327 faktorer B og C.

Antibiotiske 8327 faktorer B og C skilles fra hverandre under anvendelse av motstrøms-fordelingsteknikker og isoleres som individuelle antibiotiske forbindelser. Et oppløsningsmiddelsystem som er egnet for separeringen er en blanding av fosfatbuffer M/15 pH 7,0 - n-butanol-heksan 1:1:0,05.

Teichomycin  $A_1$ ,  $A_2$  og  $A_3$  separeres ved kolonnekromatografi på "Sephadex LH-20" under anvendelse av en blanding av n-propanol-etylacetat- $\text{NH}_4\text{OH}$  0,2 N i forholdet 10:7:7 som elueringsmiddel.

De eluerte fraksjoner analyseres med "Silikagel TLC" under anvendelse av n-propanol-etylacetat-konsentrert  $\text{NH}_4\text{OH}$  i forholdet 2:1:2, som oppløsningsmiddelsystem og mikrobiologisk utvikling på *S.aureus* som påvisningssystem. Teichomycin  $A_1$  har  $R_f = 0,48$ , teichomycin  $A_2$   $R_f = 0,10$  og teichomycin  $A_3$   $T_f = 0,0$ .

Fraksjonene inneholdende de enkelte antibiotika konsentreres til et meget lite volum, fortynnes med metanol og helles i et stort volum aceton hvori de tre antibiotika utfelles som hvitaktige, amorf pulverer.

De forskjellige kromatografiske mønstre for de fem antibiotika i de forskjellige elueringssystemer er angitt i tabell IV.

Tabell IV

Kromatografiske mønstre for antibiotisk 8327 faktor B, faktor C, teichomycin A<sub>1</sub>, teichomycin A<sub>2</sub> og teichomycin A<sub>3</sub>

Kromatografi på Whatman papir nr. 1 billedannelse av flekkene ved mikro- biologisk fremkalling på Staphylococcus aureus	Faktor B	Faktor C	teicho- mycin A <sub>1</sub>	teicho- mycin A <sub>2</sub>	teichomycin A <sub>3</sub>
Elueringssystem					
1) butanol mettet med fosfatbuffer M/15 pH 6,0	0,85	0,86	0,0	0,0	0,0
2) butanol mettet med vann inneholdende 2% p-toluensulfonsyre	0,83	0,88	0,05	0,13	0,0
3) butanol mettet med vann inneholdende 2% ammoniumhydroksyd	0,73	0,79	0,0	0,0	0,33
4) Fosfatbuffer M/15 pH 6,0 mettet med butanol	0,0	0,76	0,20	0,25	0,65
5) 20% vandig oppløsning av NH <sub>4</sub> Cl	0,0	-	0,0	0,0	0,61
6) butanol:metanol:vann (40:10:20) med 0,75 % metylorange	0,88	0,88	0,42	0,37	0,13
7) butanol:metanol:vann (40:10:20)	0,89	0,90	0,46	0,41	0,20
8) etylacetat mettet med vann	0,20	0,70	0,0	0,0	0,0
9) n. propanol:n. butanol:NH <sub>4</sub> OH 10 N (2:3:4)	-	0,88	0,55	0,43	0,10

Tynnsluktkromatografi på silisium-  
dioksydgel

Elueringssystem

n. propanol:etylacetat:kons. NH<sub>4</sub>OH (2:1:2)

0,48 0,10 0,0

145342

Biologiske egenskaper for teichomycin A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> og 8327 faktorer B og C1) In vitro aktivitet

Stamme	Minimal inhiberende konsentrasjon (µg/ml)					
	teicho- mycin A <sub>1</sub>	teicho- mycin A <sub>2</sub>	teicho- mycin A <sub>3</sub>	8327 faktor B	8327 faktor C	8327 faktor C
Staphylococcus aureus ATCC 6538	0,02	0,5	2,0	2,0	2,0	2,0
Staphylococcus aureus Tour	0,05	1,0	2,0	5,0	5,0	2,0
Staphylococcus aureus Tour + 30% bovin serum	50	1,0	2,0	20	20	2,0
Streptococcus haemolyticus C-203	0,5	0,05	1,0	2,0	2,0	0,5
Diplococcus pneumoniae UC 41	0,5	0,1	2,0	2,0	2,0	2,0
Clostridium perfringens ISS 30543	2,0	0,05	5,0	10	10	50
Escherichia coli SKF 12140	10	>100	>100	>100	>100	>100
Proteus vulgaris X 19 H	20	>100	>100	>100	>100	>100
Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145	100	>100	>100	>100	>100	>100
Candida albicans SKF 2270	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Trichophyton mentagrophytes SKF 17410	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Mycobacterium tuberculosis H <sub>37</sub> R <sub>v</sub> ATCC 9360	>100	>100	N.D.	>100	>100	100
Mycoplasma gallisepticum H 21 C.Z.B.	N.D.	>100	>100	>100	>100	>100
Neisseria gonorrhoeae	10	1,0	10	N.D.	N.D.	10

N.D. = Ikke bestemt

Teichomyciner er også aktive mot bakterier som er motstandsdyktige mot utstrakt benyttede antibiotika slik som penicillin, tetracyclin, streptomycin, bacitracin, cefalosporin, rifampicin, streptomycin, neomycin og kloramfenikol.

Fra de ovenfor angitte egenskaper er det tydelig at de nye antibiotiske stoffer er nyttige for forskjellige formål slik som bekjempelse av infeksjonssykdommer hos dyr, desinfeksjon av gjenstander og instrumenter, vekstfremmende midler hos dyr og mange andre anvendelser som innebærer undertrykkelse av patogene bakterier.

## 2) Akutt toksisitet hos mus

Teichomycin A<sub>1</sub>  
500 mg/kg (i.v.)  
Teichomycin A<sub>2</sub>  
1000 mg/kg (i.p.)

## 3) In vivo-aktivitet i eksperimentelle infeksjoner

Infiserende stamme	ED <sub>50</sub> mg/kg s.c.	
	Teichomycin A <sub>1</sub>	Teichomycin A <sub>2</sub>
Streptococcus haemolyticus	2,14	0,1
Staphylococcus aureus		3,97
Diplococcus pneumoniae	11,5	0,57

8327 faktor B og 8327 faktor C viste ikke noen aktivitet opp til 80 mg/kg s.c.

## Kjemisk-fysikalske egenskaper for teichomycin A<sub>2</sub>

Teichomycin A<sub>2</sub> oppnådd som beskrevet ovenfor er et amorft pulver som etter videre rensing ved behandling med en polystyrensulfonylert harpiks ("Dowex 50") i vandig oppløsning til pH 4, viser følgende kjemisk-fysikalske egenskaper:

1) Smeltepunkt: 260°C (dekomponering)

2) Elementæranalyse:

Den følgende prosentvise sammensetning er midlet for tre forskjellige analyser:

C = 54,20, H = 5,70, N = 6,80, Cl = 3,30, O (ved forskjell)  
= 30,00

3) Ultrafiolett absorpsjonsspektrum: (se fig. 1)

<u>Oppløsningsmiddel</u>	$\lambda$ max (nm)	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$
fosfatbuffer pH 7,38	278	55
saltsyre 0,1 N	278	53
natriumhydroksyd 0,1 N	297	74

U.V.-spekteret ble oppnådd med et Beckman DK-2-apparat.

4) I.R. absorpsjonsspektrum:

Det komplette bilde av spekteret i nujol er angitt på fig. 2. De viktigste absorpsjonsbånd forekommer ved følgende frekvenser ( $\text{cm}^{-1}$ ):

3300 (bredt), ~2900(nujol), 1720 (skulder), 1660, 1600 (skulder), ~1500, 1455(nujol), 1375(nujol), 1235, 1190-930, 850, 720 (bredt).

I.R.-spekteret ble oppnådd med et Perkin Elmer 157-apparat.

5) Oppløselighet

Forbindelsene er: oppløselige i vandig oppløsning ved pH 7,0, vandig natriumbikarbonat, fortynnede vandige oppløsninger av alkalihydroksyder, metanol-vann-blandinger; delvis oppløselige i metanol og etanol; uoppløselige i fortynnede mineralsyrer og i ikke-polare organiske oppløsningsmidler.

6) Karakteristiske reaksjoner:

Fehling	positiv
Tollens	positiv
$\text{KMnO}_4$	positiv
$\text{FeCl}_3$	positiv
$\text{H}_2\text{SO}_4$ konsentrert	mørk fiolett farge
Folin Ciocolteu	positiv
Griess	negativ
Antrone	negativ
Schiff	negativ

7) Potensiometriske titreringer:

En ioniserbar funksjon vises potensiometrisk i vannoppløsninger med en  $\text{pK}_a$ -verdi = 4,9.

En basisk funksjon vises ved titrering med  $\text{HClO}_4$  i dimetylsulfoksyd (DMSO)-oppløsninger; den følgelig bestemte ekvivalentvekt er 1170.

Kjemisk-fysikalske egenskaper til teichomycin  $A_1$

Teichomycin  $A_1$  oppnådd som beskrevet ovenfor renses

ytterligere ved kolonnekromatografi på silisiumdioksydgelcelitt (1:1 v/v) under anvendelse av en blanding av n-butanol-eddiksyre-vann (8:2:2) som elueringsmiddel. Det er et amorft pulver med følgende kjemisk-fysikalske egenskaper:

1) Smeltepunkt: 220°C (dekomponering)

2) Elementæranalyse:

Følgende prosentvise sammensetning er midlet for tre forskjellige analyser:

C = 52,9 %, H = 7,6 %, N = 5,26 %, O = 32,5 %, aske = 3,26 %

Analyse av asken viste fosfor, og prosentandelen av dette materialet i teichomycin A<sub>1</sub>, bestemt på kjemisk måte, er 0,96.

3) Ultrafiolett absorpsjonsspektrum:

Ingen absorpsjon mellom 220 og 360 nm.

U.V.-spektret ble oppnådd med et Beckman DK-2-apparat.

4) I.R. absorpsjonsspektrum:

Det komplette bilde for spekteret i nujol er gitt i fig. 3. De viktigste absorpsjonsbånd forekommer ved følgende frekvenser (cm<sup>-1</sup>):

3350 (bredt), 2930-2850(nujol), 2750-2000, 1720 (skulder), 1670 (bredt), 1620 (skulder), 1560 (bredt), 1460 og 1370 (nujol), 1340 (skulder), 1260, 1240, 1155 (skulder), 1120 (skulder), 1040 (meget bredt), 970 (bredt), 950 (skulder), 900 (bredt), 865, 805, 720.

I.R.-spekteret ble oppnådd med et Perkin Elmer 517-apparat.

5) Oppløselighet

Forbindelsen er:

oppløselig i vandig oppløsning ved pH 7,0, vandig natriumbikarbonat, fortynnede vandige oppløsninger av alkali-hydroksyder, dimetylformamid, dimetylsulfoksyd;

delvis oppløselig i metanol og etanol,

uoppløselig i fortynnede mineralsyrer og i ikke-polare organiske oppløsningsmidler.

6) Karakteristiske reaksjoner:

Fehling	positiv
Tellens	positiv
KMnO <sub>4</sub>	positiv

(forts.)

145342

14

Griess	negativ
Antrone	positiv
Schiff	negativ
Molish	positiv

7) Molekylvekt:

Bestemmelser for molekylvekt ved kromatografi gjennom "Sephadex G 75" viser følgende verdier:

20.000 i fosfatbuffer pH 7,38

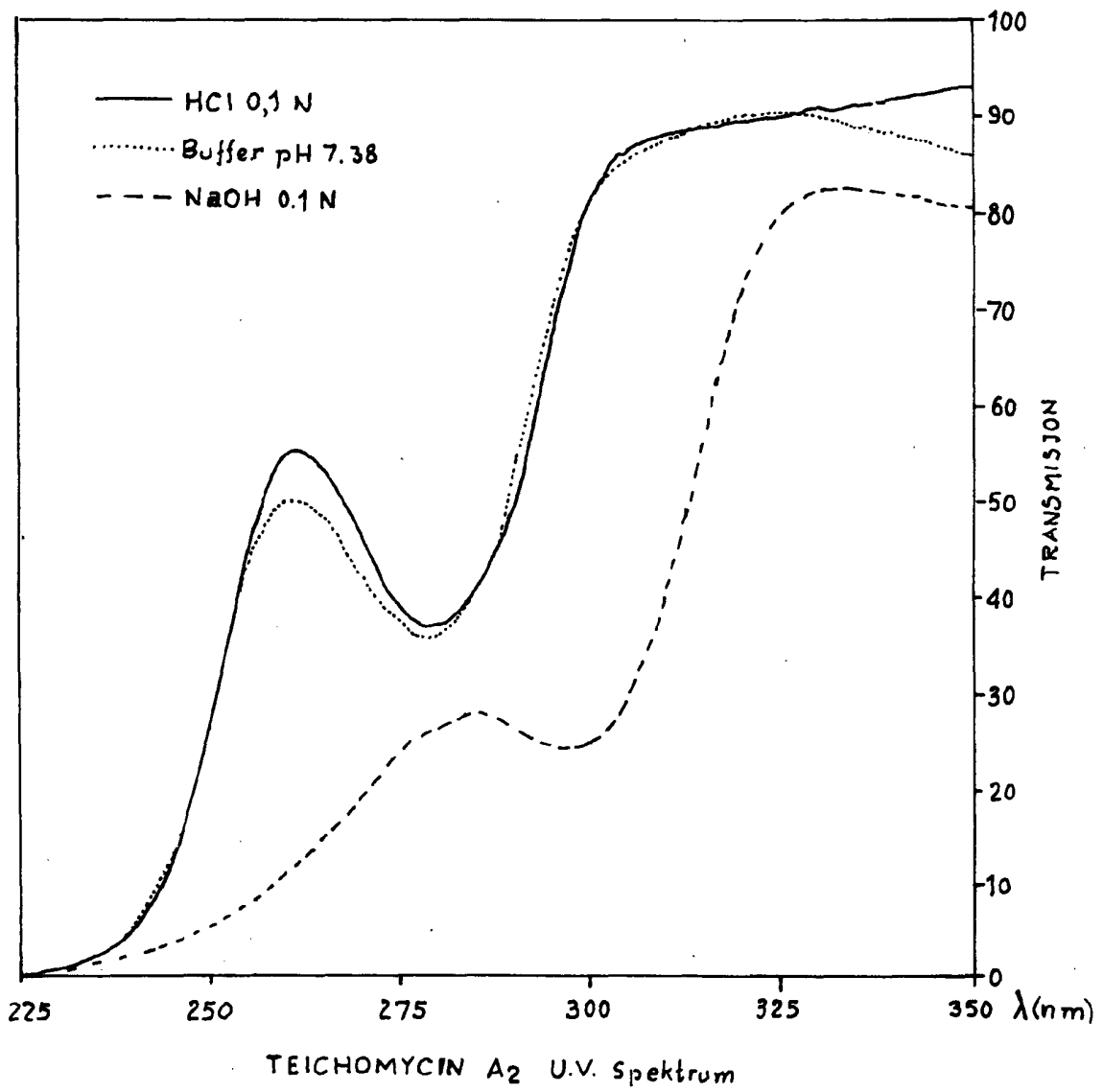
30.000 i citratbuffer pH 4,4

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte til fremstilling av nye fosfoglyko-  
lipid- og glykoptidantibiotika betegnet teichomycin A<sub>1</sub> og  
teichomycin A<sub>2</sub>, k a r a k t e r i s e r t v e d at mikro-  
organismestammen Actinoplanes teichomyceticus nov. sp. ATCC  
31121 dyrkes under aerobe betingelser i et vandig næringsmedium  
inneholdende en assimilerbar karbonkilde, en assimilerbar  
nitrogenkilde og uorganiske salter, hvoretter den antibiotisk  
aktive blanding utvinnes og teichomycin A<sub>1</sub> og A<sub>2</sub> separeres og  
eventuelt renses.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i -  
s e r t v e d at den antibiotisk aktive blanding utvinnes  
ved ekstraksjon med halogenerte C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-hydrokarboner eller  
C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>-alkanoler.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1-2, k a r a k t e r i -  
s e r t v e d at ekstraksjonen foretas med butanol.
4. Fremgangsmåte ifølge krav 1-3, k a r a k t e r i -  
s e r t v e d at butanolekstraktet konsentreres til ca.  
1/10-1/20 av dets opprinnelige volum og deretter avkjøles for  
oppnåelse av et bunnfall som i det vesentlige består av en  
blanding av teichomyciner.
5. Fremgangsmåte ifølge krav 1-4, k a r a k t e r i -  
s e r t v e d at teichomycin A<sub>1</sub> og A<sub>2</sub> skilles fra hver-  
andre ved hjelp av kolonnekromatografi.
6. Fremgangsmåte ifølge krav 1-5, k a r a k t e r i -  
s e r t v e d at teichomycin A<sub>2</sub> renses ved behandling  
med en polystyren-sulfonert harpiks i vandig oppløsning ved  
pH 4.
7. Fremgangsmåte ifølge krav 1-6, k a r a k t e r i -  
s e r t v e d at teichomycin A<sub>1</sub> renses ved kromatografi  
gjennom en silisiumdioksyd-celitt-kolonne og eluering med en  
blanding av n-butanol, eddiksyre og vann.

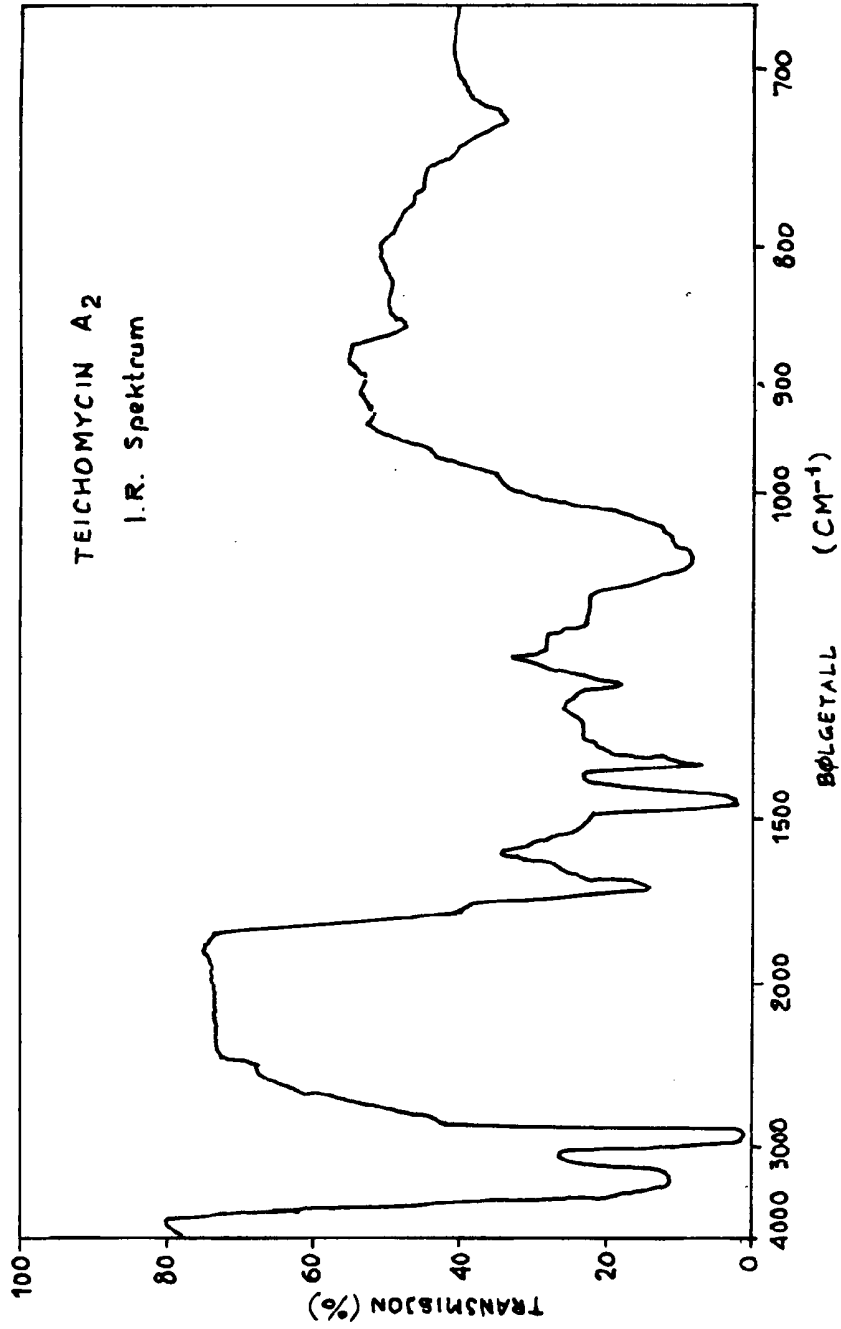
145342

FIG. 1



145342

FIG. 2



145342

FIG. 3

