

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR  
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

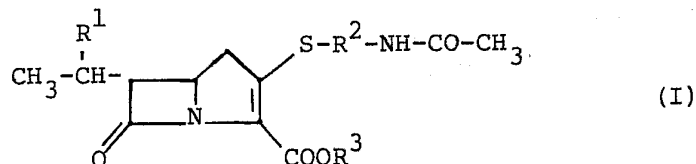


(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 145382 B

- (21) Ansøgning nr. 4543/78 (51) Int.Cl.<sup>3</sup> C 12 P 17/18  
(22) Indleveringsdag 12. okt. 1978 C 07 D 487/04  
(24) Løbedag 12. okt. 1978  
(41) Alm. tilgængelig 14. apr. 1979  
(44) Fremlagt 8. nov. 1982  
(86) International ansøgning nr. -  
(86) International indleveringsdag -  
(85) Videreførelsesdag -  
(62) Stamansøgning nr. -  
(30) Prioritet 13. okt. 1977, 121857/77, JP 29. dec. 1977, 160424/77, JP  
  
(71) Ansøger SANRAKU-OCEAN CO. LTD., Tokyo, JP.  
  
(72) Opfinder Kazuhiko Okamura, JP: Shoji Hirata, JP: Yasushi Okamura, JP: Yasuo Fukagawa, JP: Yasutaka Shimauchi, JP: m. fl.  
(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

- (54) Fremgangsmåde til fremstilling af  
beta-lactamantibiotika kaldet  
PS-6 og PS-7 eller salte eller  
estere deraf.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte antibiotiske stoffer kaldet PS-6 og PS-7 eller salte eller estere deraf med formlen

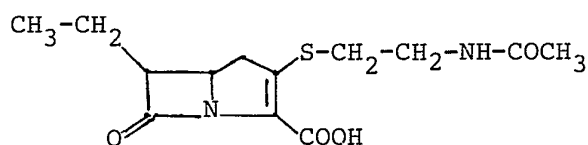


hvor R<sup>1</sup> betyder CH<sub>3</sub>, og R<sup>2</sup> betyder -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, eller R<sup>1</sup> betyder H, og R<sup>2</sup> betyder -CH=CH-, og R<sup>3</sup> betyder hydrogen, en saltdannende kation, alkyl med 1-6 carbonatomer eller triphenylmethyl.

DK 145382 B

Det er kendt, at der findes antibiotika med  $\beta$ -lactamase-hæmmende virkning samt  $\beta$ -lactamasehæmmende midler. Fra beskrivelsen til US patent nr. 3.981.788 (Derwent CPI 19171X) kendes således stofferne MC696-SY2-A og -B, som er blevet isoleret fra dyrkningsvæsker fremkommet ved dyrkning af en MC696-SY2-producerende stamme af slægten *Streptomyces*. Fra DE offentliggørelsesskrift nr. 2.513.855 (Derwent CPI 67721W) og DE offentliggørelsesskrift nr. 2.513.854 (Derwent CPI 67720W) kendes tillige stofferne MM4550 eller MM13902 isoleret fra en dyrkningsvæske fremkommet ved dyrkning af en MM4550- eller MM13902-producerende stamme hørende til slægten *Streptomyces*. Fra DE offentliggørelsesskrift nr. 2.517.316 (Derwent CPI 72840W) kendes endvidere clavulansyre isoleret fra dyrkningsvæsken fremkommet ved dyrkning af *Streptomyces clavuligerus*. Antibiotiket thienamycin med penicillinlignende kemisk struktur samt derivater deraf er endvidere kendt fra beskrivelsen til US patent nr. 3.950.357 (Derwent CPI 31696X), DE offentliggørelsesskrift nr. 2.652.677 (Derwent CPI 40282Y), beskrivelsen til BE patent nr. 848.346 (Derwent CPI 34505Y), beskrivelsen til BE patent nr. 848.349 (Derwent CPI 34507), DE offentliggørelsesskrift nr. 2.652.680 (Derwent CPI 40283Y), DE offentliggørelsesskrift nr. 2.652.675 (Derwent CPI 40280Y), DE offentliggørelsesskrift nr. 2.652.674 (Derwent CPI 40279Y) og DE offentliggørelsesskrift nr. 2.652.676 (Derwent CPI 40281Y).

I beskrivelsen til dansk patentansøgning nr. 1436/78 er endvidere beskrevet et  $\beta$ -lactamantibiotikum med betegnelsen "PS-5" og med følgende formel

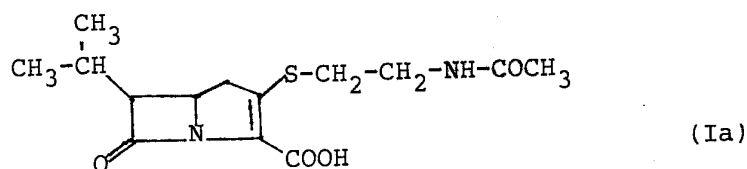


Dette antibiotikum fremstilles ifølge nævnte beskrivelse ved dyrkning af en stamme af arten *Streptomyces* sp. A271.

Den foreliggende opfindelse angår som nævnt en fremgangsmåde til fremstilling af de hidtil ukendte antibiotika med betegnelserne PS-6 og PS-7 eller ovennævnte derivater deraf, hvilke forbindelser har kraftig antibiotisk virkning,  $\beta$ -lactamaseinhiberende virkning og evne til at frembringe en synergistisk forøgelse af den antibiotiske virkning af penicilliner, cephalosporiner og lignende forbindelser mod  $\beta$ -lactamasedannere, hvilken

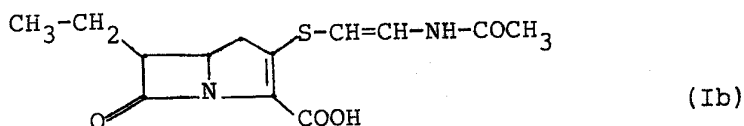
fremgangsmåde er ejendommelig ved, at en stamme af arten *Streptomyces* sp. A 271 dyrkes i et næringssubstrat, hvorpå de dannede antibiotika isoleres fra det dyrkede materiale, og, om ønsket, en således vundet forbindelse med formlen (I), hvori  $R^3$  betyder hydrogen, omdannes til et salt deraf, eller en vundet forbindelse med formlen (I), hvori  $R^3$  betyder hydrogen, eller en saltdannende kation, esterificeres til dannelse af en forbindelse med formlen (I), hvor  $R^3$  betyder alkyl med 1-6 carbonatomer eller triphenylmethyl.

Den forbindelse med formlen (I), hvori  $R^1$  betyder  $\text{CH}_3$  og  $R^2$  betyder  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ , dvs.



betegnes i det følgende som "antibiotikum PS-6".

Forbindelsen med formlen (I), hvori  $R^1$  betyder H og  $R^2$  betyder  $-\text{CH}=\text{CH}-$ , dvs.



betegnes i det følgende "antibiotikum PS-7".

Antibiotiket PS-6 og PS-7 samt deres nævnte derivater beskrives mere detaljeret i det følgende.

#### Antibiotiket PS-6

Antibiotiket PS-6 er karakteriseret ved hjælp af nedenstående fysisk-kemiske egenskaber og biologiske egenskaber:

#### Fysisk-kemiske egenskaber for antibiotiket PS-6

##### (1) Papirchromatografi

Antibiotiket PS-6 (natriumsaltet) giver følgende  $R_f$ -værdier ved papirchromatografering med nedhængende papir (Toyo Filter Paper NO.50) ved anvendelse af følgende opløsningsmidler:

Acetonitril/tris/EDTA (Note 1):	$R_f=0,41$
Ethanol/vand (7/3)	: $R_f=0,65$

Note 1: Blandet opløsningsmiddel sammensat af 120 ml acetonitril, 30 ml 1/10 M tris(hydroxymethyl)-aminomethan-saltsyrepuffer (pH-værdi 7,5) og 1 ml 1/10 M vandig natriumethylendiamintetraacetatopløsning (pH-værdi 4,5).

I nærværende beskrivelse er opløsningsmiddelforholdene udtrykt i rumfang til rumfang, medmindre andet er anført.

(2) Tyndtlagschromatografi (TLC)

Ved tyndtlagschromatografi opnås følgende  $R_f$ -værdier for antibiotiket PS-6 (natriumsaltet), idet der ved chromatograferingen anvendes Chromatogram Sheet 13254 Cellulose (No. 6065) fra firmaet Eastman Kodak Co., Ltd. og følgende fremkalderopløsningsmidler:

n-Butanol/ethanol/vand (4/1/5)	
(øvre lag)	: $R_f=0,67$
n-Propanol/vand (8/2)	: $R_f=0,69$
n-butanol/i-propanol/vand (7/7/6)	: $R_f=0,70$
Acetonitril/vand (8/2)	: $R_f=0,63$

(3) Højspændingspapirelektroforese

Når antibiotiket PS-6 (natriumsaltet) underkastes elektroforese på Toyo Filter Papir No. 50 under anvendelse af et højspændingspapirelektroforeseapparat fra firmaet Savant Instrument Inc. (High Voltage Power Supply HV 3000 A, Flat Plate Electrophoresis Chamber FP 18A) konstateres følgende opførsel i en pufferopløsning af nedenstående sammensætning og pH-værdi.

Antibiotiket migrerer over en afstand på mindst 5 mm, sædvanligvis 10-40 mm mod anoden ved gennemledning af en strøm i 30 minutter med en potentialgradient på 42 volt/cm i en puffer (pH-værdi 8,6) sammensat af 3000 ml vand, 3,3 g barbital og 25,5 g natriumbarbital.

(4) Opførsel over for  $\beta$ -lactamase

Virkningen inaktiveres af  $\beta$ -lactamase fra *Bacillus cereus*.

(5) Syre-baseegenskaber

Antibiotiket PS-6 er en ensyret syre med én carboxylgruppe i molekylet.

(6) UV-absorptionsspektrum

Antibiotiket PS-6 (natriumsaltet) udviser et karakteristisk UV-absorptionsmaksimum ved

$$\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}} = \text{ca. } 300 \text{ nm}$$

(7) IR-absorptionsspektrum

Antibiotiket PS-6 (natriumsaltet) udviser nedenstående karakteristiske IR-absorptionsmaksima målt i KBr-tablet:

ca.  $1760\text{ cm}^{-1}$  (-CO- i  $\beta$ -lactamring)

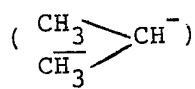
ca.  $1660\text{ cm}^{-1}$  (-CO- i amid)

ca.  $1600\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{COO}^{\ominus}$ )

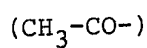
(8) Proton NMR-spektrum

Antibiotiket PS-6 (natriumsalt) giver følgende karakteristiske signaler i 100 MHz proton NMR spektret målt i tungt vand ( $\text{D}_2\text{O}$ ):

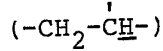
- (i) et par dubletter centreret ved ca. 0,94 og 0,98 ppm med koblingskonstanter på ca. 7,0 Hz



- (ii) en skarp singlet ved ca. 1,92 ppm



- (iii) en multiplet ved ca. 2,40-3,50 ppm



- (iv) en multiplet ved ca. 3,90-4,20 ppm

(9) Molekylvægt


Ud fra resultater fra højopløsningsmassespektrometri for methylesteren af antibiotiket PS-6 bestemmes molekylvægten til ca. 312.

(10) Farvereaktion

Reaktion med Ehrlich-reagens:	positiv
Reaktion med iod-chlorplatinsyre:	positiv
Reaktion med ninhydrin:	negativ

(11) Opløselighed

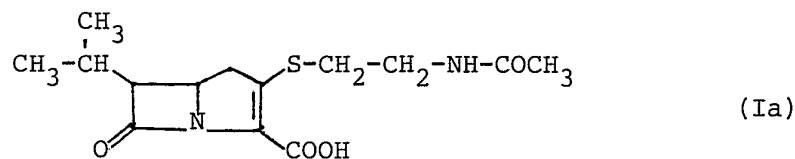
Antibiotiket PS-6 er opløseligt i vand ved pH 6-9, men er praktisk taget uopløseligt i benzen, acetone og ethylacetat.

Ovennævnte fysisk-kemiske egenskaber viser klart tilstedeværelsen af grupperne  $\text{CH}_3\text{-}\overset{|}{\text{CH}}\text{-}$ ,  $\text{CH}_3\text{CO-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-}\overset{|}{\text{CH}}\text{-}$ ,  $\text{-}\overset{|}{\text{CH}}\text{-}$ , ,  $\text{-NHCO-}$  og  $\text{-COO}^{\ominus}$  i antibiotiket PS-6 (natriumsalt).

Ud fra UV-absorptionsmaksimet og ændringen af UV-absorptionsmaksimet fra 300 nm til 316 nm som følge af esterificeringen

af antibiotiket, som omtales nærmere i det følgende, antages det, at antibiotiket PS-6 har et thienamycinskelet (jfr. beskrivelsen til US patent nr. 3.950.357) omfattende en svovlsidekæde svarende til det ovenfor omtalte antibiokum PS-5. Endvidere er molekylformen for antibiotiket PS-6 beregnet til  $C_{14}H_{20}N_2O_4S$  på baggrund af resultaterne af højopløsningsmassespektrometri for methylesteren.

På baggrund af ovenstående data antages det, at antibiotiket PS-6 har følgende struktur:



### Biologiske egenskaber for antibiotiket PS-6

#### (1) Antibiotisk spektrum

Antibiotiket PS-6 har bredspektret antibiotisk virkning og udviser særdeles kraftig virkning mod forskellige bakterier, f.eks. grampositive bakterier hørende til slægterne *Staphylococcus*, *Diplococcus*, *Streptococcus* og *Bacillus*, samt gramnegative bakterier hørende til slægterne *Alcaligenes* og *Comamonas*. Antibiotiket PS-6 udviser tillige god virkning mod f.eks. gramnegative bakterier hørende til slægterne *Klebsiella* og *Proteus*.

Det er karakteristisk, at antibiotiket PS-6 udviser kraftig virkning mod gramnegative bakterier, som er resistente over for antibiotika med  $\beta$ -lactamringstruktur, f.eks. bakterier, som hører til slægterne *Citrobacter*, *Proteus* og *Klebsiella*.

#### (2) Forøgelse af andre antibiotikas antibiotiske virkning mod $\beta$ -lactamaseproducerende bakterier

Antibiotiket PS-6 er i stand til at forøge andre antibiotikas antibiotiske virkning, især  $\beta$ -lactamantibiotika såsom penicilliner og cephalosporiner, mod  $\beta$ -lactamaseproducerende bakterier såsom *Proteus vulgaris* og *Serratia marcescens*.

#### (3) In vivo virkning

Antibiotiket har en udtalt terapeutisk virkning ved indgift til mus, som er inficeret med patogene grampositive bakterier.

#### (4) Toksicitet

Antibiotiket udviser ingen toksicitet ved intraperitoneal indgift til mus i en dosis på 500 mg/kg.

(II) Antibiokum PS-7Fysisk-kemiske egenskaber for antibiotiket PS-7(1) Papirchromatografi

Antibiotiket PS-7 (natriumsalt) giver ved papirchromatografi med nedhængende papir på Toyo filterpapir nr. 50 nedenstående  $R_f$ -værdier med følgende opløsningsmiddelsystem:

Acetonitril/tris/EDTA	: $R_f=0,41$
Ethanol/vand (7/3)	: $R_f=0,68$

(2) Tyndtlagschromatografi (TLC)

Antibiotiket PS-7 (natriumsalt) udviser følgende  $R_f$ -værdier ved tyndtlagschromatografi under anvendelse af chromatogramplader 13254 cellulose (nr. 6065) fra firmaet Eastman Kodak Co. med følgende opløsningsmiddelsystem:

n-butanol/ethanol/vand (4/1/5) (øvre lag)	: $R_f=0,60$
n-propanol/vand (7/3)	: $R_f=0,81$
n-butanol/isopropanol/vand (7/7/6)	: $R_f=0,71$
Acetonitril/vand (8/2)	: $R_f=0,65$

(3) Højspændingspapirelektroforese

Der konstateres følgende migrering med antibiotiket PS-7 (natriumsalt) ved elektroforese på Toyo filterpapir nr. 50 med en pufferopløsning med den nedenfor anførte pH-værdi under anvendelse af et højspændingspapirelektroforeseapparat fra firmaet Savant Instruments Co., højspændingskilde HV 3000A, elektroforesebeholder FP 18A: Antibiotiket PS-7 migrerer mod anoden i en længde på mindst 5 mm, sædvanligvis mellem 10 og 40 mm i en pufferopløsning bestående af 3,3 g bartital, 25,5 g natriumbarbital og 3000 ml vand (pH-værdi 8,6) ved gennemledning af en strøm ved 42 volt/cm i 30 minutter.

(4) Opførsel mod  $\beta$ -lactamase

Antibiotiket PS-7 inaktiveres af  $\beta$ -lactamase fra *Bacillus cereus*.

(5) Syre-baseegenskaber

Antibiotiket PS-7 er en ensyret syre, som indeholder en carboxylgruppe i molekylet.

(6) UV-absorptionspektrum

Antibiotiket PS-7 (natriumsalt) udviser nedenstående karakteristiske UV-absorptionsmaksima:

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}} = \text{ca. } 220 \text{ nm} \quad \text{og}$$

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}} = \text{ca. } 308 \text{ nm}$$

(7) IR-absorptionsspektrum

Det infrarøde absorptionsspektrum for antibiotiket PS-7 (natriumsalt) målt i en KBr-tablet har karakteristiske absorptionsmaksima ved følgende bølgetal:

$$\text{ca. } 1760 \text{ cm}^{-1} \quad (-\text{CO}- \text{ i } \beta\text{-lactamring})$$

$$\text{ca. } 1670 \text{ cm}^{-1} \quad (-\text{CO}- \text{ i amid})$$

$$\text{ca. } 1620 \text{ cm}^{-1} \quad (-\text{COO}^\ominus \text{ og } -\text{CH}=\text{CH}-)$$

(8) Proton NMR spektrum

I 100 MHz proton NMR spektret i tungt vand ( $\text{D}_2\text{O}$ ) udviser antibiotiket PS-7 (natriumsalt) følgende tydelige karakteristiske signaler:

(i) en triplet med centrum ved ca. 0,96 ppm ( $\text{CH}_3\text{---CH}_2\text{-}$ )

(ii) en multiplet med centrum ved ca. 1,72 ppm ( $-\text{CH}_2\text{-CH}_3$ )

(iii) en skarp singlet ved ca. 2,05 ppm ( $\text{CH}_3\text{-CO-}$ )

(iv) en multiplet ved ca. 2,96-3,38 ppm ( $-\text{CH}_2\text{-CH-}$ )

(v) et signal med centrum ved ca. 3,96 ppm ( $-\overset{\text{N}}{\underset{|}{\text{C}}}\text{H-}$ )

(vi) et par dubletter med centrum ved ca. 6,02 ppm og ca. 7,10 ppm  
( $J = \text{ca. } 14 \text{ Hz}$ ) ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ )

(9) Molekylvægt

Molekylvægten er ca. 296 beregnet ud fra resultaterne af højopløsningsmassespektrometri for methylesteren af antibiotiket PS-7.

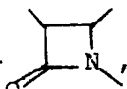
(10) Farverreaktion

Ehrlichreagensreaktion:	positiv
Iod-chlorplatinsyrereaktion:	positiv
Ninhydrinreaktion:	negativ

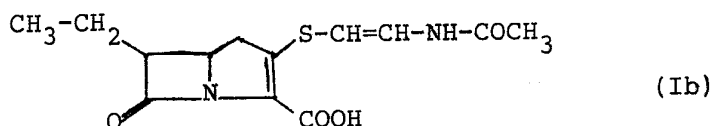
(11) Opløselighed

Stoffet er opløseligt i vand ved pH 6-9, men er praktisk taget uopløselig i benzen, acetone og ethylacetat.

Disse fysisk-kemiske egenskaber bekræfter antagelsen, at antibiotiket PS-7 (natriumsalt) indeholder grupperne

$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $\text{CH}_3\text{CO-}$ ,  $\text{-CH=CH-}$ ,  $\text{-CH-}$  ,  $\text{-NHCO-}$  og  $\text{-COO}^\ominus$ . Ud fra disse

data antages det, at antibiotiket PS-7 har følgende strukturformel

Biologiske egenskaber for antibiotiket PS-7(1) Antibiotisk spektrum

Antibiotiket PS-7 har bredspektret antimikrobiel virkning. Det har særdeles kraftig antimikrobiel virkning mod forskellige mikroorganismer, f.eks. grampositive bakterier hørende til slægten Staphylococcus eller slægten Diplococcus, og det har tillige kraftig antimikrobiel virkning mod gramnegative bakterier hørende til f.eks. slægten Alcaligenes.

Antibiotiket PS-7 er især karakteriseret ved dets kraftige antimikrobielle virkning mod gramnegative bakterier hørende til f.eks. slægten Citrobacter eller slægten Enterobacter, hvilke slægter er resistente over for de kendte  $\beta$ -lactamantibiotika.

(2) Forøgelse af andre antibiotikas antibiotiske virkning mod  $\beta$ -lactamaseproducerende bakterier

Antibiotiket PS-7 kan forøge andre antibiotikas antimikrobielle virkning, f.eks.  $\beta$ -lactamantibiotika såsom cephalosporiner på de  $\beta$ -lactamaseproducerende bakterier såsom Proteus vulgaris eller Serratia marcescens.

(3) In vivo virkning

Antibiotiket har en udtalt terapeutisk virkning ved indgift til mus, som er inficeret med patogene, grampositive bakterier.

#### (4) Toksicitet

Antibiotiket udviser ingen akut toksicitet ved intraperitoneal indgift til mus i en dosis på 500 mg/kg.

Mikroorganismestammen, som kaldes stamme nr. A 271, er en stamme, som er blevet isoleret fra en jordprøve udtaget nær Eiheijitemplet i Yoshidadistriktet, Fukui, Japan. Denne stamme er i stand til at danne begge de to antibiotika PS-6 og PS-7. Den er i beskrivelsen til dansk patentansøgning nr. 1436/78, offentliggjort den 1. oktober 1978, beskrevet på følgende måde:

#### Taxonomiske karakteristika for stamme A271

De taxonomiske karakteristika for stamme *Streptomyces* A271 er som følger:

##### 1) Morphologiske egenskaber

Forgrening hos sporedannende luftmycelium: Simpel forgrening.  
Form af sporedannende luftmycelium: den øverste del af luftmyceliet har kroge, løkker eller ufuldstændige spiraler.

Organismen henføres derfor til gruppen *Retinaculum-Apertum*. Disse former konstateres især når stammen dyrkes på et havre-agar-substrat og et glycerol-asparagin-agarsubstrat, medens en lige eller buftet form lejlighedsvis konstateres på gærekstrakt-maltekstrakt-agarsubstrat. Form og antal af sporer i sporekæder: Ovale eller cylindriske sporer, som danner en kæde på mere end 10, sædvanligvis 10-50 sporer. Sporernes størrelse og overfladestruktur: 0,8-1,0 x 1,0-1,8  $\mu$ , glat overflade. Der er hverken konstateret svingtråde eller sporangier. Hyfer dannes på luftmyceliet.

##### 2) Vækstegenskaber

Vækstegenskaberne for stamme A271 er anført i nedenstående tabel I, som angiver resultaterne af observationer efter 2 ugers dyrkning ved 28°C, medmindre andet er anført. Farvebeskrivelsen er hovedsagelig baseret på fremgangsmåden ifølge H.D. Tresner og E.J. Backus, "System of Color Wheels for Streptomycete Taxonomy", jvf. Appl. Microbiol. 11, 335, 1963, og farvebeskrivelsen i "Guide to Color Standard" fra Japan Color Institute Foundation.

Tabel I

Substrat	Vækst	Luftmyceliets farve	Substratmyceliets farve	Opløseligt pigment
Saccharose-nitrat-agar	Kraftig	lys orangegul (3ea)	lysegul (2fb) til lys orangegul (3ea)	intet
Glucose-asparagin-agar	Kraftig	svag orangegul (3ca) til lys orangegul (3ea)	lysegul (1 2/1 fb)-2fb)	intet
Glycerol-asparagin-agar	Kraftig	svag orangegul (3ca) til lys orangegul (3ea)	lysegul (2fb) til noget gul-liglyserød (4gc)	intet
Stivelse-uorganisk salt-agar	Kraftig	svag orangegul (3ca) til lys orangegul (3ea)	lys orangegul (3ea) til lysegul (2fb)	intet
Tyrosin-agar	Kraftig	svag orangegul (3ca) til lys orangegul (3ea)	lys orangegul (3ea) til brunlig gul	intet
Nærings-agar	Kraftig	næsten ikke dannet; hvis dannelse findes, da noget mørk	lysegul (2db)	intet
Gærekstrakt-maltekstrakt-agar	Kraftig	svag orangegul (3ca) til lys orangegul (3ea)	lys orangegul (3ea) til svag brun (4ie)	intet
Havremel-agar	Kraftig	svag orange (3ca) til lys orangegul (3ea)	lysegul (2fb)	intet

(3) Fysiologiske egenskaber

- 1) Væksttemperaturområde: 10-40°C, optimum 20-30°C.
- 2) Omdannelse af gelatine fra fast form til flydende form (på glucose-pepton-gelatinesubstrat): Gelatine bliver smeltet ved dyrkning ved 20°C.
- 3) Hydrolyse af stivelse (på stivelse-uorganisk salt-agar-substrat): Stivelsen hydrolyseres.
- 4) Koagulering og peptonisering af skummetmælk: Der konstateres peptonisering men ingen koagulering.

- 5) Dannelse af melanoidt pigment: der dannes intet melanoidt pigment på tyrosinagarsubstrat og peptongærionagarsubstrat og i trypton-gærekstraktvæske.
- 6) Udnyttelse af forskellige kulstofkilder (Pridham og Gottlieb agarsubstrat):
- |             |   |
|-------------|---|
| L-Arabinose | + |
| D-Xylose    | + |
| D-Glucose   | + |
| D-Fructose  | - |
| Saccharose  | ± |
| Inositol    | - |
| L-Rhamnose  | + |
| Raffinose   | - |
| D-Mannitol  | - |
- (+: god udnyttelse, ±: ringe udnyttelse, -: meget ringe udnyttelse eller slet ingen udnyttelse).

Det fremgår klart af ovenstående egenskaber, at stammen A271 hører til slægten *Streptomyces* og har egenskaber til fælles med mikroorganismene hørende til gruppen RA, da farven af myceliets overflade er gul eller rød, sporeoverfladen er glat, og der dannes intet vandopløseligt pigmentlignende melanoidt pigment. En undersøgelse i Waksman's "The Actinomycetes", bind 2, 1961, E.B. Shirling og D. Gottlieb's artikler i *International Journal of Systematic Bacteriology*, bind 18, side 69-189, 1968, *ibid*, side 279-892, 1968, *ibid*, bind 19, side 391-512, 1969, *ibid*, bind 22, side 265-394, 1972 og Bergey's "Manual of Determinative Bacteriology, 8th udgave, 1974, efter organismer med ovennævnte taxonomiske egenskaber viser, at lignende organismer, som hører til gruppe RA, er *Actinomyces cremeus*, *Actinomyces flavidovirens*, *Actinomyces albohelvatus*, *Actinomyces flavescens*, *Streptomyces rutgersensis*, *Streptomyces chryseus* og *Streptomyces helvaticus*. Endvidere har organismen *Streptomyces pluricolorscens* lignende morfologiske egenskaber, selv om den hører til gruppe RF. Ovennævnte 8 organismer, med undtagelse af *Streptomyces pluricolorscens*, angives at danne luftmycelium med lige eller buget form, idet variationen afhænger af dyrkningsbetingelserne. Typekulturer af de ovennævnte 8 arter sammenlignes med stamme A271 efter dyrkning under samme betingelser. Det viser sig, at stamme A271 er tydelig forskellig fra disse kulturer med hensyn til vækst, luftmyceliets farve, substratmyceliets farve og udnyttelse af kulstofkilder.

I nedenstående tabel II, III og IV anføres resultaterne af sammenligningen af stamme A271 med de kulturer, som ligner den mest.

Tabel II

Sammenligning med lignende kulturer.  
Luftmyceliets farve

<u>Substrat</u>	<u>Stamme A271</u>	<u>Actinomyces cremeus ISP 5147</u>	<u>Actinomyces flavidovirens ISP 5150</u>
Saccharose- nitrat- agar	lys orangegul (3ea)	næsten intet	intet
Glucose- asparagin- agar	svag orangegul (3ca) til lys orangegul (3ea)	svag orangegul (3ca)	hvid (b)
Glycerol- asparagin- agar	svag orangegul (3ca) til lys orangegul (3ea)	svag orangegul (3ca)	næsten ikke dannet; når dannelse findes da svag hvid (a)
Stivelse uorganisk saltagar	svag orangegul (3ca) til lys orange (3ea)	svag orangegul (3ca)	tyndt dannet hvid (a) til svag gul (3db)
Nærings- agar	næsten ikke dan- net, når dannel- se findes, da noget mørk	hvid (a) til svag orangegul (3ca)	hvid
Gærekstrakt maltekstrakt- agar	svag orange- gul (3ca) til lys oran- gegul (3ea)	svag gul (2db)	hvid (b) til svag gullig- grøn (1cb)
Havremels- agar	svag orange- gul (3ca) til lys oran- gegul (3ea)	hvid (b) til svag orange- gul (3ca)	hvid (b) til svag gullig- grøn (1bd)

Tabel III

Sammenligning med lignende kulturer.  
Substratmyceliets farve

<u>Substrat</u>	<u>Stamme A271</u>	<u>Actinomyces cremeus ISP 5147</u>	<u>Actinomyces flavidovirens ISP 5150</u>
Saccharose nitrat agar	lysegul (2fb) til lys orange- gul (3ea)	ringe vækst farveløs til hvid (b)	ringe vækst farveløs til hvid (a)
Glucose- asparagin agar	lysegul (1 2/1 fb - 2fb)	lys orangegul (3ea)	svag gul (2db)
Glycerol- asparagin agar	lysegul (2fb) til noget gul- liglyserød (4gc)	lys orangegul (3ea)	svag gul (2db)
Stivelse uorganisk saltagar	lys orangegul (3ea) til lysegul (2fb)	moderat gul- lig-lyserød (ea)	lysegul (2fb)
Tyrosin agar	lys orangegul (3ea) til brun- liggul	svag brun (4ie)	gråliggul (3ec)
Nærings- agar	svag gul (2db)	lys orangegul (3ea)	svag gul (2db)
Gærekstrakt maltekstrakt agar	lys orangegul (3ea) til svag brun (4ie)	lys orangegul (3ea) til mør- kegul	mørkegul
Hvedemels- agar	lysegul (2fb)	noget gullig- lyserød (4gc)	svag gul (2db) til svag orange- gul (3ca)

Tabel IV

Sammenligning med lignende kulturer  
Udnyttelse af kulstofkilder

<u>Kulstofkilde</u>	<u>Stamme A271</u>	<u>Actinomyces cremeus ISP 5157</u>	<u>Actinomyces flavidovirens ISP 5150</u>
L-Arabinose	+	+	+
D-Xylose	+	+	+
D-Glucose	+	+	+
D-Fructose	-	+	+
Saccharose	±	-	-
Inositol	-	-	+
L-Rhamnose	+	-	+
Raffinose	-	-	-
D-Mannitol	-	-	-

Ud fra de i ovenstående tabeller anførte resultater kan der drages følgende konklusion. Hvad angår farven af luftmyceliet er denne hos *Actinomyces flavidovirens* sædvanligvis hvid men kan dog være gul, og er i dette tilfælde grønliggul, hvorved den klart adskiller sig fra stamme A271.

Med hensyn til substratmyceliets farve udviser *Actinomyces flavidovirens* svag gul farve og *Actinomyces cremeus* udviser lys orangegul farve i mange tilfælde, medens stamme A271 sædvanligvis udviser lysegul farve. Endvidere viser en detaljeret sammenligning af forsøgsresultater opnået på forskellige substrater, at stamme A271 er forskellig fra de to andre kulturer. Stamme A271 afviger fra *Actinomyces cremeus* med hensyn til udnyttelse af D-fructose og L-rhamnose og fra *Actinomyces flavidovirens* med hensyn til udnyttelse af D-fructose og inositol.

Stamme A271 er således klart forskellig fra de to kendte kulturer, som ligner den mest. Stamme A271 er derfor forskellig fra alle kendte *Streptomyces*-arter og må betragtes som en hidtil ukendt art, som betegnes *Streptomyces* sp. A271. Denne kultur er deponeret i Fermentation Research Institute, Agency og Industrial Science and Technology, Japan, med deponeringsnummeret FERM-P No. 3984. En kultur af *Streptomyces* sp. A271 er endvidere deponeret hos ATCC under deponeringsnummeret No. 31358.

Ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse kan ikke blot anvendes stamme A 271, men tillige de naturlige og kunstige mutanter deraf, som kan fremkaldes ved kemisk eller fysisk behandling, og som har væsentligt samme egenskaber som denne og derfor kan henføres til arten A271.

Næringssubstratet, der anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, skal indeholde carbonkilder, nitrogenkilder og uorganiske salte. Som eksempler på kulstofkilder kan nævnes carbonhydrater såsom glucose, glycerol, maltose, saccharose, melasse, dextrin og stivelse, samt olier og fedtstoffer såsom sojabønneolie, jordnøddolie eller svinefedt. Som eksempler på nitrogenkilder kan nævnes pepton, kødekstrakt, sojabønneemel, bomuldsfrøolie, tørgær, majsstøbevand, gærekstrakt, skummetmælk, casein, natriumnitrat, ammoniumnitrat og ammoniumsulfat. Eksempler på uorganiske salte er dikaliumphosphat, natriumchlorid, calciumcarbonat og magnesiumsulfat. Om ønsket kan der tilsættes spormængder af metaller som cobalt eller mangan. Endvidere kan der anvendes alle næringsstoffer,

som kan udnyttes af organismerne til dannelse af antibiotiket PS-6 og/eller PS-7. For at forhindre skumdannelse under varmesterilisationen og fermenteringen kan der tilsættes skumdæmpende midler såsom siliconeolier og vegetabiliske olier.

Der er ingen særlige begrænsninger med hensyn til mængderne af ovennævnte næringskilder, og mængderne kan varieres inden for vide grænser. Med enkelte forsøg i lille målestok kan en fagmand let bestemme den optimale sammensætning og de optimale mængder af næringskilder for en bestemt stamme, som kan danne de antibiotiske stoffer PS-6 og PS-7.

Det har ifølge opfindelsen vist sig, at mængden af akkumuleret antibiotikum PS-6 kan forøges ved tilsætning af en aminosyre eller en organisk syre til vækstsubstratet under dyrkningen af *Streptomyces* sp. A271. Som aminosyre kan anvendes neutrale aminosyrer med 2-10 carbonatomer, især valin og leucin, og som organisk syre kan anvendes aliphatiske organiske syrer med 2-10 carbonatomer, især *n*-valerianesyre. Aminosyrer af L-, D- og DL-former kan alle anvendes, men L-aminosyrerne er de mest foretrukne. Mængden af disse aminosyrer eller organiske syrer, som skal tilsættes, er ikke kritisk, men sædvanligvis udgør de fortrinsvis 0,01-1% (vægt/rumfang), helst 0,1-0,5% (vægt/rumfang), henført til vækstsubstratet. Tilsætningstidspunktet er ikke begrænset. Disse forbindelser kan sættes til substratet på et vilkårligt tidspunkt under dyrkningen. Det foretrækkes imidlertid, at de tilsættes ved dyrkningens begyndelse eller i løbet af 100 timer efter påbegyndelsen af dyrkningen. Aminosyrerne og de organiske syrer kan hver især tilsættes på en gang eller opdelt i flere mængder og tilsat på forskellige tidspunkter.

Substratet kan være steriliseret inden dyrkningen. Det er fordelagtigt at indstille substratets pH-værdi i området 4-9, specielt 6-8, før eller efter steriliseringen.

Dyrkningen af de PS-6 og PS-7-producerende stammer kan principielt gennemføres under anvendelse af en fremgangsmåde, der ligner de fremgangsmåder, som sædvanligvis anvendes ved fremstillingen af antibiotika ved hjælp af *Streptomyces*. Dyrkning under aerobe betingelser er sædvanligvis foretrukket. Almindeligvis kan dyrkningen gennemføres uden omrøring og/eller luftning. Selv om en vilkårlig dyrkningsmetode valgt blandt stationær dyrkning,

rystedyrkning og submers dyrkning indbefattende luftning og omrøring kan anvendes, er den submers dyrkning fordelagtig. Der er ingen særlige grænser med hensyn til de anvendelige dyrkningstemperaturer, og der kan anvendes temperaturer i det område, i hvilket væksten af stammerne, som danner antibiotiket PS-6 og PS-7, ikke inhiberes i væsentlig grad, og hvor antibiotiket PS-6 og/eller PS-7 kan dannes. Selv om dyrkningstemperaturen kan variere afhængigt af den anvendte type stamme, ligger den egnede temperatur sædvanligvis i området 20-40, fortrinsvis 25-35°C.

Vækstsubstratets pH-værdi kan om ønsket reguleres under fermenteringen til en værdi i området 4-9, især 6-8, til gennemførelse af fermenteringen på fordelagtig måde. Ved fermentering i stor målestok foretrækkes det at dyrke en podestamme, hvorefter næringssubstratet inokuleres med podekulturen, hvorpå der foretages submers dyrkning.

Fermenteringen kan sædvanligvis fortsættes, indtil der er akkumuleret tilstrækkelige mængder af antibiotiket PS-6 og/eller PS-7. Fermenteringen varer sædvanligvis 30-90 timer, men fermenteringstiden afhænger af substratets sammensætning, fermenteringstemperaturen, den anvendte type stamme, etc.

En fagmand vil let kunne fastlægge de optimale dyrkningsbetingelser ved at foretage simple forsøg i overensstemmelse med egenskaberne hos en specifik stamme, som kan danne de ønskede antibiotika. Mængden af antibiotiket PS-6 og/eller PS-7 akkumuleret i vækstsubstratet kan bestemmes ved hjælp af en bioanalysemetode og bioautografi, hvilket beskrives nærmere i det følgende.

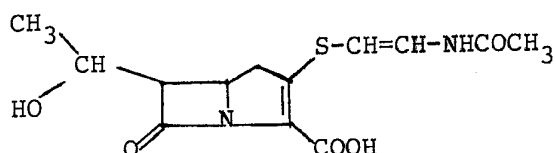
Da de akkumulerede antibiotika PS-6 og PS-7 i fermenteringsproduktet er vandopløselige og hovedsagelig findes uden for mikroorganismecellerne, foretrækkes det at fjerne cellerne efter fermenteringen under anvendelse af en kendt separationsproces, f.eks. filtrering, centrifugering eller ekstraktion, hvorefter antibiotiket udvindes fra filtratet, den ovenstående væske eller ekstrakten.

Udvinding af antibiotiket kan gennemføres under anvendelse af forskellige kendte fremgangsmåder. Især kan der med fordel anvendes de fremgangsmåder, som ofte anvendes til udvinding af antibiotika af carboxylsyretypen. Følgende fremgangsmåder kan f.eks. anvendes enten alene i kombination eller flere på hinanden følgende gange. Ekstraktion ved en lav pH-værdi med et opløsningsmiddel såsom

ethylacetat eller n-butanol og tilbageekstraktion fra opløsningsmidlet til en vandig fase ved en højere pH-værdi, ekstraktion ved neutral pH-værdi med et opløsningsmiddel såsom methylenchlorid eller chloroform i nærværelse af et lipofilt kvaternært ammoniumsalt såsom benzalkoniumchlorid eller tetra n-butylammoniumhydrogensulfat eller en macro-cyklisk polyether, såsom 1,4,7,10,13,16-hexaoxa-cyclo-octadecan (NISSO kroneether fremstillet af Nippon Soda Co., Ltd.), 1,4,7,10,13-pentaoxa-cyclo-pentadecan (NISSO kroneether 15-krone-5 fremstillet af Nippon Soda Co., Ltd.) og tilbageekstraktion fra opløsningsmiddelfasen til et neutralt vandigt lag indeholdende natriumiodid, kaliumiodid eller lignende, adsorption på aktivt kul, "Amberlite" XAD, "Diaion" HP-20 eller lignende og eluering med en vandig methanolopløsning, vandig acetoneopløsning eller lignende, adsorption og eluering med ionbytterharpiks såsom "Dowex" 1 x 2 eller QAE-"Sephadex" A-25, gelfiltrering med "Sephadex" G-10, "Bio-Gel" P-2, "Bio-Beads" S-X3 eller lignende, søjle- eller tyndtlagschromatografering med cellulose, "Avicel" SF, DEAE-cellulose, Whatman DE-32, DEAE-"Sephadex" A-25, silicagel, aluminiumoxid eller lignende og tvunget fældning ved tilsætning af et opløsningsmiddel såsom acetone.

Til adskillelse af antibiotiket PS-7 fra analoge forbindelser med en mættet carbonkæde i svovlsidekæde, f.eks. antibiotiket PS-5 og PS-6, som kan være dannet og akkumuleret samtidig, er det især fordelagtigt at anvende følgende fremgangsmåde. De analoge forbindelser med en mættet carbonkæde isoleres ved anvendelse af gængs chromatografering med en anionbytterharpiks, hvor de aktive bestanddele adsorberes på en anionbytterharpiks af polystyrentypen såsom "Dowex" 1 x 2, "Duolite" A-101, "Amberlite" 400 eller "Diaion" PA 306, og de analoge forbindelser elueres med et vandigt uorganisk salt, hvorefter antibiotiket PS-7 elueres med en vandig opløsning af et polært opløsningsmiddel såsom methanol eller acetone (koncentration: 1-80%, fortrinsvis 10-75%) indeholdende 0,1-10, fortrinsvis 1-5% af et uorganisk salt såsom natriumchlorid, kaliumchlorid, calciumchlorid eller natriumbromid.

Det har endvidere vist sig, at afhængigt af dyrkningsbetingelserne dannes der i vækstsubstratet samtidig en forbindelse med formlen



som betegnes antibiotikum PS-4, eller et salt deraf. Når derfor antibiotiket PS-4 og PS-7 dannes samtidig, kan de adskilles fra hinanden under anvendelse af de ovenfor beskrevne fremgangsmåder enten i kombination eller ved at gentage disse. Det er særlige fordelagtigt at anvende følgende fremgangsmåde. En opløsning indeholdende antibiotiket PS-4 og antibiotiket PS-7 adsorberes på en adsorptions-harpiks såsom "Dianion" HP-20AG, og de antibiotiske stoffer elueres med en gradient fra 0 til 50%, fortrinsvis 0-10% polært opløsningsmiddel opløst i vand, f.eks. en vandig acetoneopløsning. Opførselen af antibiotiket PS-6 og/eller PS-7 under udvindings- og isoleringsprocessen kan erkendes ved at bestemme antibiotiket PS-6 og/eller PS-7 ved hjælp af en bioanalysemetode og bioautografi, som beskrives nærmere i det følgende.

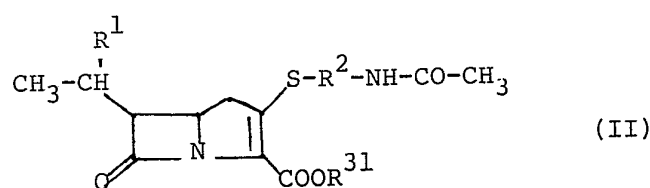
Antibiotiket PS-6 og/eller PS-7 med de ovenfor beskrevne egenskaber kan fås på den ovenfor anførte måde. Da antibiotikaene PS-6 og PS-7 er noget labile som beskrevet ovenfor, må udvindingen og isoleringen gennemføres med stor omhu.

Da antibiotiket PS-6 og PS-7 sædvanligvis har tendens til at være mere stabile i saltformen end i den fri syreform, foretrækkes saltformen ved farmaceutisk anvendelse, hvilket beskrives i det følgende, ved anvendelse som mellemprodukt ved syntetisering af derivater eller under ovennævnte rensningsprocesser.

Den ovenfor beskrevne saltform indbefatter f.eks. alkalimetalsaltene såsom natriumsaltet, kaliumsaltet eller lithiumsaltet, jordalkalimetalsaltene såsom calciumsaltet eller magnesiumsaltet samt andre salte såsom aluminiumsalte, ammoniumsalte, salte med primære, sekundære eller tertiære aminer såsom monoethylamin, diethylamin, triethylamin, monoethanolamin eller diethanolamin og endvidere salte

med organiske baser såsom benzathin eller procain. Egnede salte er farmaceutisk acceptable salte. Særligt velegnede salte er alkali-metalsaltene såsom natrium- eller kaliumsaltene.

Som tidligere anført er antibiotikaene PS-6 og PS-7 hver især énsyrede syrer med en carboxylgruppe i molekylet. Der kan afledes forskellige estere af antibiotikaene med nedenstående almene formel



hvor  $R^{31}$  betyder en alkylgruppe med 1-6 carbonatomer eller en triphenylmethylgruppe, og  $R^1$  og  $R^2$  har de ovenfor anførte betydninger.

I ovenstående almene formel (II) kan den lavere alkylgruppe være en ligekædet eller forgrenet gruppe med højst 6 carbonatomer, og specielt en gruppe med 1-4 carbonatomer. Som eksempler på den lavere alkylgruppe kan nævnes methyl, ethyl, n-propyl, iso-propyl, n-butyl, iso-butyl, n-pentyl, iso-pentyl og n-hexyl.

Estrene med den almene formel (II) kan fremstilles ved at omsætte en forbindelse med formlen (I), dvs. de vundne antibiotika PS-6 eller PS-7, eller salte deraf med en forbindelse med den almene formel



hvor  $R^{31}$  har den ovenfor anførte betydning, og Y betyder et atom eller en gruppe, som kan fraspaltes, eller med en lavere diazoalkan.

Hvad angår det fraspaltelige atom eller gruppen Y i den almene formel (III) kan anvendes et vilkårligt atom eller en vilkårlig gruppe, som kan fraspaltes, når det bringes i kontakt med carboxylgruppen i antibiotiket PS-6 eller PS-7, f.eks. et halogenatom såsom chlor, brom eller iod, en hydroxylgruppe, en thiolgruppe, en sulfonyl-oxygruppe, -COH, en reaktiv carbonyloxygruppe såsom -O-CO-CF<sub>3</sub> eller lignende. Halogenatomer er særligt foretrukne.

Som eksempler på forbindelsen med den almene formel (III) kan nævnes følgende:

Methylalkohol, methyliodid, dimethylsulfonat, methylmercaptan, ethanol, ethylbromid, ethyliodid, ethylmercaptan, n-propylchlorid, n-propyliodid, propylaikohol, iso-propylaikohol, iso-propylbromid,

iso-propyliodid, n-butylalkohol, n-butylbromid, n-butyliodid, n-pentylalkohol, n-pentylchlorid, n-pentylbromid, n-pentyliodid, n-hexylalkohol, n-hexylbromid, n-hexyliodid, tritylalkohol, tritylmercaptan, tritylchlorid og tritylbromid.

Som et repræsentativt eksempel på de lavere diazoalkaner kan nævnes diazomethan.

Reaktionen mellem antibiotiket PS-6 eller PS-7 med forbindelsen med den almene formel (III) eller med en lavere diazoalkan kan gennemføres under anvendelse af de gængse esterificeringsmetoder. Reaktionen mellem antibiotiket PS-6 eller PS-7 og forbindelsen med den almene formel (III) eller den lavere diazoalkan kan eksempelvis sædvanligvis gennemføres i fraværelse af et reaktionsmedium. Imidlertid gennemføres omsætningen almindeligvis i et indifferert flydende medium. Som eksempler på anvendelige flydende indifferente medier kan nævnes carbonhydrider såsom benzen, toluen, n-hexan eller cyclohexan, halogene-rede carbonhydrider såsom chloroform eller methylenchlorid, amider såsom dimethylformamid eller hexamethylphosphorsyretriamid, dimethylsulfoxid, ethere såsom diethylether, diisopropylether, di-n-butylether, tetrahydrofuran eller dioxan, estere såsom ethylacetat eller n-butylacetat, samt ketoner såsom acetone eller methylethylketon. Disse opløsninger kan anvendes enkeltvis eller i blandinger af to eller flere.

Reaktionstemperaturen er ikke kritisk og kan varieres inden for vide grænser afhængigt af typen af forbindelsen med den almene formel (III), typen af den lavere diazoalkan, arten af det flydende medium osv. Reaktionstemperaturen skal vælges således, at der ikke sker en væsentlig sønderdeling af antibiotiket PS-6 eller PS-7. Sædvanligvis er den egnede temperatur ikke højere end  $60^{\circ}\text{C}$ , fortrinsvis i området  $0-40^{\circ}\text{C}$ , og helst i området mellem  $5^{\circ}\text{C}$  og stuetemperatur. Om nødvendigt kan der anvendes en reaktionspromotor såsom trimethylamin, triethylamin, pyridin eller dicyclohexylcarbodiimid.

Under disse betingelser kan reaktionen afsluttes i løbet af ca. 1-24 timer, sædvanligvis 3-12 timer.

Det antibiotiske stof PS-6 eller PS-7, som skal omsættes med forbindelsen med formlen (III) eller den lavere diazoalkan, behøver ikke at være et isoleret produkt. Således kan der anvendes det udgærede væksts substrat fra dyrkningen af den stamme, som danner antibiotiket PS-6 eller PS-7, eller der anvendes et filtreret væksts substrat, hvor mikroorganismecellerne er fjernet fra væksts substratet. Endvidere kan antibiotiket PS-6 eller PS-7 anvendes i rå form fremkommet ved delvis rensning af det ved dyrkningen fremkomne produkt. Som eksempel på et delvis rensset produkt kan nævnes et koncentreret eluat fra aktivt kul,

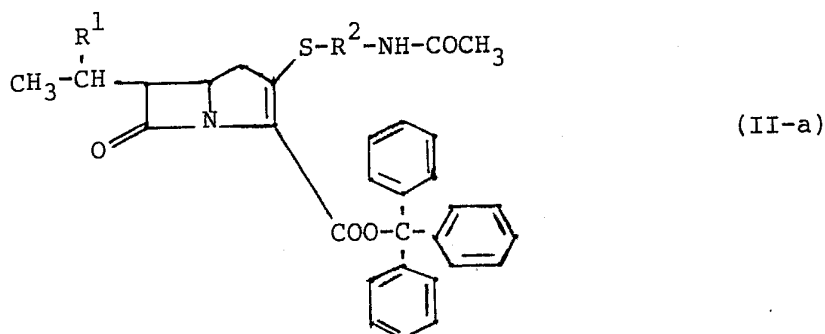
hvormed det filtrerede vækstsustrat er blevet behandlet, et koncentreret eluat fra en "Diaion" HP-20 harpiks, hvormed det filtrerede udgørede vækstsustrat er blevet behandlet, et afsaltet koncentrat med aktivt kul af et eluat fremkommet med gradientkoncentration af natriumchlorid i fosfatpuffere fra "QAE-Sephadex", hvorpå det koncentrerede eluat fra behandlingen med "Diaion" HP-20 er blevet adsorberet. En koncentreret ekstrakt med methylenchlorid i nærværelse af benzalkoniumchlorid, en koncentreret ekstrakt med chloroform i nærværelse af makro-cycliske polyethere og en koncentreret ekstrakt med butanol ved pH-værdien 3,5 ved lav temperatur.

Den således fremstillede ester af antibiotiket PS-6 eller PS-7 kan isoleres fra reaktionsblandingen eller renses på i og for sig kendt måde. Når reaktionen er afsluttet kan reaktionsblandingen f.eks. først hældes i et vandigt medium til fjernelse af vandopløselige urenheder såsom biprodukter. Det foretrækkes at anvende en neutral puffer som det vandige medium for at holde pH-værdien tæt ved neutralværdien. Esteren af antibiotiket PS-6 eller PS-7 i denne blanding ekstraheres derpå med et mindre polært organisk opløsningsmiddel, som praktisk taget ikke er blandbart med vand, f.eks. ethylacetat, benzen eller chloroform. Der kan tilsættes et salt såsom natriumchlorid eller ammoniumsulfat for at forøge effektiviteten af ekstraktionen ved hjælp af udsaltningseffekten.

Efter tørring med vandfrit natriumsulfat kan esteren isoleres fra opløsningsmiddelfasen på i og for sig kendt måde, f.eks. ved gel-filtrering under anvendelse af "Bio-Beads S-X<sub>3</sub>" eller "Sephadex" LH-20 eller ved adsorptionschromatografi under anvendelse af et bærestof såsom silicagel, aluminiumoxid eller "Florisil", som kan anvendes i passende kombination og om nødvendigt anvendes gentagne gange.

Den således rensede ester kan yderligere renses ved omkrySTALLISATION fra et opløsningsmiddel såsom benzen, toluen, xylen, ethylacetat, diethylether, methylenchlorid, chloroform, hexan og petroleumsether (kogeområde 30-60°C) enten enkeltvis eller i form af blandinger.

Blandt estrene med den almene formel (II), som kan fremstilles ved ovenstående fremgangsmåde, er antibiotikum PS-6- eller PS-7-trityl-esteren med formlen



hvor  $R^1$  og  $R^2$  har de ovenfor angivne betydninger, karakteristiske og nyttige, idet de er mere stabile end antibiotiket PS-6 eller PS-7 med formlen (I) og følgelig lettere at isolere, og endvidere har de kraftig antibakteriel og  $\beta$ -lactamaseinhiberende virkning, hvorimod tritylesteren af f.eks. de kendte penicilliner ikke udviser nogen væsentlig antibakteriel virkning. Dette skyldes formentlig at tritylgruppen i PS-6 eller PS-7-tritylesteren er så aktiv, at den let fraspaltes i analysemediet eller in vivo. Tritylesteren med formlen (II-a) er et meget vigtigt mellemprodukt ved syntetiseringen af andre farmaceutisk anvendelige derivater, da tritylgruppen i tritylesteren med formlen (II-a) er meget aktiv og let kan fraspaltes.

En detaljeret beskrivelse af de fysisk-kemiske og biologiske egenskaber for tritylesteren af antibiotiket PS-6 og PS-7 med formlen (II-a) anføres i det følgende.

[I] Tritylesteren af antibiotiket PS-6

Fysisk-kemiske egenskaber for tritylesteren af antibiotiket PS-6

(1) UV-absorptionsspektrum

$$\lambda_{\max}^{\text{CH}_3\text{OH}} = 3,15,0 \text{ nm}$$

(2) Farveregninger

Ehrlich-reagensreaktion:	positiv
Iod-chlorplatinsyrereaktion:	positiv
Ninhydrinreaktion:	negativ

(3) Tyndtlagschromatografi (TLC)

Der opnås følgende  $R_f$ -værdier på de anførte plader med de anførte opløsningsmidler.

Kisegel 60 F <sub>254</sub> (E. Merck Co., Inc)	
Benzen/acetone (2/1):	$R_f=0,37$
Benzen/ethylacetat(1/8):	$R_f=0,34$

### Biologiske egenskaber for tritylesteren af antibiotiket PS-6

#### (1) Antimikrobielt spektrum

Tritylesteren af antibiotiket PS-6 har bredspekretet antimikrobiel virkning og udviser meget kraftig virkning mod forskellige bakterier, f.eks. grampositive bakterier, som hører til slægterne *Staphylococcus*, *Diplococcus* og *Streptococcus*, samt gramnegative bakterier, som hørende til slægten *Alcaligenes*.

Tritylesteren af antibiotiket PS-6 udviser endvidere god virkning mod gramnegative bakterier hørende til slægten *Klebsiella* og *Proteus*.

Det er karakteristisk, at tritylesteren af antibiotiket PS-6 udviser kraftig virkning mod gramnegative bakterier, som er resistente over for  $\beta$ -lactamantibiotika, f.eks. bakterier hørende til slægten *Citrobacter*, *Proteus*, *Klebsiella* og *Serratia*.

#### (2) In vivo-virkning

Tritylesteren af antibiotiket PS-6 udviser en markant terapeutisk virkning ved indgift til mus, som er inficeret med pathogene grampositive bakterier.

#### (3) Toksicitet

Tritylesteren udviser ingen akut toksicitet ved intraperitoneal indgift til mus i en dosis på 500 mg/kg.

### [II] Tritylesteren af antibiotiket PS-7

### Fysisk-kemiske egenskaber af tritylesteren af antibiotiket PS-7

#### (1) UV-absorptionsspektrum

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}} = 321,0 \text{ nm}$$

og

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}} = 230,5 \text{ nm}$$

#### (2) Farvereaktioner

Ehrlich-reagensreaktion:	positiv
Iod-chlorplatinsyrereaktion:	positiv
Ninhydrinreaktion:	negativ

#### (3) Tyndtlagschromatografering (TLC)

Der opnås følgende  $R_f$ -værdier på de anførte chromatograferingsplader med de anførte opløsningsmidler.

Kisegel 60 F <sub>254</sub> (E. Merck Co., Inc)	
Benzen/acetone (2/1):	R <sub>F</sub> =0,51
Benzen/ethylacetat (1/8):	R <sub>F</sub> =0,67

### Biologiske egenskaber for tritylesteren af antibiotiket PS-7

#### (1) Antimikrobielt spektrum

Tritylesteren af antibiotiket PS-7 har bredspektret antimikrobiel virkning og udviser meget kraftig virkning mod forskellige bakterier, f.eks. grampositive bakterier, som hører til slægten Staphylococcus, Diplococcus og Streptococcus, samt mod gramnegative bakterier hørende til slægten Alcaligenes.

Tritylesteren af antibiotiket PS-7 udviser tillige god virkning mod f.eks. gramnegative bakterier hørende til slægten Klebsiella og Proteus.

Det er karakteristisk, at tritylesteren af antibiotiket PS-7 udviser kraftig virkning mod gramnegative bakterier, som er resistente over for  $\beta$ -lactamantibiotika, f.eks. bakterier fra slægten Citrobacter, Proteus, Klebsiella og Serratia.

#### (2) In vivo-virkning

Tritylesteren af antibiotiket PS-7 udviser markant terapeutisk virkning ved indgift til mus inficeret med pathogene grampositive bakterier.

#### (3) Toksicitet

Tritylesteren udviser ingen akut toksicitet ved intraperitoneal indgift til mus i en dosis på 500 mg/kg.

De omhandlede antibiotika PS-6 og PS-7 samt tritylesteren deraf udviser tilstrækkelig kraftig antimikrobiel virkning til at de kan anvendes effektivt til forebyggelse og bekæmpelse af bakterieinfektioner, som optræder ikke blot hos mennesker, men tillige hos dyr, f.eks. pattedyr, fjerkræ og fisk.

Endvidere er tritylesteren et meget vigtigt mellemprodukt ved fremstillingen af andre nyttige farmaceutika, da tritylgruppen i tritylesteren med formlen (II-a) er meget aktiv og let fraspaltes.

Antibiotiket PS-6 og PS-7 og tritylesteren deraf kan indgives oralt, topisk eller parenteralt (intravenøst, intramuskulært, intraperitonealt, osv.) og kan anvendes i vilkårlig gangs farmaceutisk indgiftsform afhængigt af indgiftsvejen. Antibiotiket PS-6 eller tritylesteren deraf kan f.eks. formuleres med et farmaceutisk acceptabelt bærestof eller fortyndingsmiddel til faste præparatformer, f.eks. tabletter, kapsler, pulvere, granulater, sukkerovertrukne tabletter,

drageer, pudder og suppositorier, halvfaste former som f.eks. salver, cremer og halvfaste kapsler, eller flydende former som f.eks. flydende opløsninger, emulsioner, suspensioner, lotioner, sirupper, injektionsopløsninger og væskesprøjttemidler.

Enhedsdosispræparatet indeholdende antibiotiket PS-6 eller tritylesteren deraf kan sædvanligvis indeholde 0,1-99 vægtprocent, fortrinsvis 10-60 vægtprocent af den aktive bestanddel i en vilkårlig flydende, halvfast eller fast form.

De ovenfor beskrevne farmaceutiske præparater kan indeholde antibiotiket PS-6 eller PS-7 og/eller tritylesteren alene eller i kombination med andre terapeutisk virksomme bestanddele.

Da antibiotiket PS-6 eller PS-7 og tritylesteren deraf i kombination med  $\beta$ -lactamforbindelser har synergistisk virkning på forskellige  $\beta$ -lactamaseproducerende bakterier, vil det være fordelagtigt at kombinere de omhandlede forbindelser med  $\beta$ -lactamforbindelser i farmaceutiske præparater, hvilket beskrives nærmere i det følgende. Som eksempler på egnede  $\beta$ -lactamforbindelser kan nævnes penicillinderivater såsom benzylpenicillin, phenoxymethylpenicillin, carbenicillin, ampicillin og amoxicillin samt cephalosporinderivater såsom cephaloridin, cephalotin, cefazolin, cephalexin, cefoxitin, cephacetril, cephamandol, cephapirin, cephradine og cephaloglycin.

Når antibiotiket PS-6 eller PS-7 og/eller tritylesteren kombineres med en eller flere af de ovennævnte  $\beta$ -lactamforbindelser er kombinationsforholdet ikke kritisk men kan varieres inden for vide grænser. Fra et praktisk synspunkt vil det imidlertid være tilrådeligt at anvende de omhandlede antibiotika og den kendte  $\beta$ -lactamforbindelse(r) i mængdeforhold i området 20:1 til 1:150, fortrinsvis 10:1 til 1:100.

Ved behandling af bakterieinfektioner hos mennesker kan dosis af antibiotiket PS-6 eller PS-7 og/eller tritylesteren varieres afhængigt af den pågældende person, legemsvægten, infektionernes type, sværhedsgrad og symptomer, indgiftsvejen og antallet af indgivelser osv. Til sædvanlig oral eller parenteral indgift vil det være fordelagtigt at anvende en daglig dosis i området 0,05-500, fortrinsvis 0,5-200 mg/kg, fortrinsvis i opdelte doser. Det er klart, at en ansvarlig læge kan vælge doser, som ligger uden for det ovenfor anbefalede interval, under hensyntagen til patientens individuelle forhold.

Antibiotiket PS-6 eller PS-7 og/eller tritylesteren kan anvendes i form af farmaceutiske præparater som beskrevet ovenfor eller kan tilsættes direkte eller som foderadditivkoncentrat i dyrefoder. Endvidere kan de anvendes som aktive bestanddele til foderkonserveringsmidler eller desinfektionsmidler.

Opfindelsen illustreres nærmere i de nedenstående eksempler. I eksempler er de kvantitative og kvalitative analyser af den antimikrobielle virkning baseret på følgende fremgangsmåder:

(1) Bioanalyse af antimikrobiel virkning

En skrårørsnæringsagarkultur af *Comamonas terrigena* B-996, som har været dyrket natten over, suspenderes i et næringssubstrat, hvorved der fås en podesuspension med en optisk celletæthed på 0,040 ved 610 nm. Podesuspensionen sættes i en mængde på 1% til et smeltet agarsubstrat indeholdende 0,8% Kyokuto næringssubstratpulver (Kyokuto Pharmaceutical Industries Co.) og 1,0% Bacto-Agar (Difco Laboratories). Portioner på 7 ml af det flydende podesubstrat hældes i Petriskåle med en diameter på 9 cm og størknes. En sådan skål kaldes en *Comamonas*analyseplade.

*Staphylococcus aureus* FDA 209P dyrkes natten over i et næringssubstrat under omrystning og fortyndes 50 gange i næringssubstrat til dannelse af en podesuspension. Et smeltet agarsubstrat indeholdende 1% Kyokuto næringssubstratpulver (Kyokuto Pharmaceutical Industries Co.) og 1% Bacto-agar (Difco Laboratories) inokuleres grundigt med podesuspensionen i en mængde på 1% (rumfang/rumfang) portioner på 7 ml af det smeltede agarpodesubstrat ophældes i Petriskåle med en diameter på 9 cm, hvorpå skålene henstilles til størkning. En sådan skål kaldes en *Staphylococcus*analyseplade.

På lignende måde fremstilles en *Alcaligenes*-analyseplade, idet en skrårørsnæringsagarkultur af *Alcaligenes faecalis* B-326, som har været dyrket natten over, suspenderes i et næringsmedium til dannelse af en podesuspension, hvori cellekoncentrationen reguleres svarende til en optisk tæthed på 0,020 ved 610 nm. Et agarsubstrat indeholdende 0,5% Kyokuto næringssubstratpulver (Kyokuto Pharmaceutical Industries Co.) og 1,0% Bacto-agar (Difco Laboratories) smeltes ved en passende temperatur og inokuleres med podesuspensionen i en mængde på 1%. Det smeltede podesubstrat hældes i portioner på 7,0 ml i Petriskåle med en diameter på 9 cm, hvorefter skålene henstilles til størkning. En sådan skål kaldes en *Alcaligenes*analyseplade.

En pulplade med en diameter på 8 mm gennemblødes på sædvanlig måde med prøveopløsningen, som skal analyseres, hvorefter den anbringes på et rent stykke filterpapir i tilstrækkelig lang tid til at overskud af opløsningen fjernes, skiven overføres til en analyseplade, og der inkuberes ved 35°C i 20 timer. Diameteren af den konstaterede hæmningszone måles og sammenlignes med diameteren fremkommet med standardopløsninger af cephaloridin. Den antimikrobielle virkning af antibiotiket PS-6 og beslægtede forbindelser udtrykkes som cephaloridinækvivalentenheder/ml. Dette forklares nærmere i det følgende. En opløsning af antibiotiket PS-6 og beslægtede forbindelser, som fremkalder en hæmningszone med samme diameter som 100 µg/ml cephaloridin, tillægges værdien 100 cephaloridinenheder/ml. På tilsvarende måde når en fast prøve af antibiotiket PS-6 og beslægtede forbindelser i en koncentration på 1 mg/ml fremkalder samme diameter som 1 µg/ml cephaloridin er den specifikke virkning af den faste prøve 1 cephaloridinenhed/mg. Det er klart, at analysestandardkurven varierer i nogen grad afhængigt af arten af testmikroorganismen. Til nærmere angivelse af arten af testorganismerne anvendes følgende udtryk for enhederne: Comamonas-cephaloridinenhed (forkortet CCU), Staphylococcus-cephaloridinenhed (forkortet SCU) og Alcaligenes-cephaloridinenhed (forkortet ACU).

## (2) Bioautografi

En stor analyseplade fremstilles som beskrevet ovenfor under (1). Bioanalyse af antimikrobiel virkning foretages, med den undtagelse, at 100 ml af det smeltede podeagarsubstrat hældes i en rektangulær skål (32 x 24 cm) i stedet for en 9 cm Petriskål:

Et papirchromatogram, som skal analyseres, anbringes i 15 minutter på ovennævnte store analyseplade. Efter fjernelse af papiret inkuberes analysepladen med 35°C i 20 timer til frembringelse af inhiberingszoner. Dette tillader ikke blot beregning af  $R_f$ -værdier (kvalitativ analyse) men tillige bestemmelse af den antimikrobielle virkning (semi-kvantitativ analyse) baseret på størrelsen af hæmningszonen.

I tilfælde med TLC-plader anbringes et ark tyndt papir mellem TLC-pladen og analysepladens overflade. Tilsvarende fremgangsmåde anvendes ved kvalitative og semi-kvantitative analyser.

Eksempel 1

En 500 ml erlenmeyerkolbe indeholdende podekultursubstratet SE-4, som beskrevet nærmere i det følgende, steriliseres ved 120°C i 15 minutter. Til en skrårørskultur af *Streptomyces* sp. A271 med god sporedannelse sættes 10 ml opløsning indeholdende 0,02% overfladeaktivt stof "Tween 80"® (Atlas Powder Corp.), og der omrystes forsigtig til dannelse af en sporesuspension. En milliliter af sporesuspensionen inokuleres i 500 ml erlenmeyerkolben, og der dyrkes ved 28°C i 48 timer på et roterende rystebord (200 omdrejninger pr. minut, radius i cirkel 3,5 cm). Derpå udtages 2 ml af podekulturen og inokuleres i en 500 ml erlenmeyerkolbe indeholdende 100 ml af det nedenfor beskrevne produktionssubstrat, og der foretages dyrkning ved 28°C i 48 til 96 timer på et roterende rystebord.

Podokultursubstrat (SE-4)

Kødekstrakt (Difco Laboratories)	0,3% (vægt/rumfang)
Bacto-trypton (Difco Laboratories)	0,5% (vægt/rumfang)
Glucose	0,1
Opløselig stivelse	2,4
Gærekstrakt	0,5
Calciumcarbonat	0,4
Affedtet sojabønneemel	0,5
pH-værdien indstilles på 7,5 inden sterilisering.	

Produktionssubstrat

## (1) AG-1 substrat

Glucose	1,5% (vægt/rumfang)
Majsstivelse	2,5
Majsstøbevand	2,0
Tørgær	1,0
D,L-methionin	0,1
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,00013
pH-værdien er 7,2 inden sterilisering.	

## (2) AGA-2-substrat

Glucose	1,5% (vægt/rumfang)
Kartoffelstivelse	2,5
Majsstøbevand	2,0
Tørgær	1,0
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,00013
pH-Værdi 6,5 inden sterilisering.	

- (3) AGB-substrat
- |                                      |                     |
|--------------------------------------|---------------------|
| Maltose                              | 3,0% (vægt/rumfang) |
| Majsstøbevand                        | 1,0                 |
| Tørgær                               | 1,0                 |
| CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 0,0001              |
| pH-Værdi 6,5 inden sterilisering.    |                     |
- (4) AGB-41-substrat
- |                                      |                     |
|--------------------------------------|---------------------|
| Maltose                              | 5,0% (vægt/rumfang) |
| Opløselig stivelse                   | 1,0                 |
| Glycerol                             | 0,3                 |
| Tørgær                               | 2,5                 |
| NaCl                                 | 0,5                 |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 0,05                |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,05                |
| CaCO <sub>3</sub>                    | 0,3                 |
| CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 0,00013             |
| pH-Værdi 7,0 inden sterilisering     |                     |
- (5) ML-19-substrat
- |                                   |                     |
|-----------------------------------|---------------------|
| Glycerol                          | 4,0% (vægt/rumfang) |
| Pepton                            | 0,5                 |
| Glucose                           | 0,2                 |
| Kartoffelstivelse                 | 0,2                 |
| Affedtet sojabønneemel            | 0,5                 |
| Tørgær                            | 0,5                 |
| NaCl                              | 0,5                 |
| CaCO <sub>3</sub>                 | 0,2                 |
| pH-Værdi 6,4 inden sterilisering. |                     |
- (6) AGO-1-substrat
- |                                      |                     |
|--------------------------------------|---------------------|
| Sojabønneolie                        | 3,0% (vægt/rumfang) |
| Tørgær                               | 2,0                 |
| NaCl                                 | 0,5                 |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 0,05                |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,05%               |
| CaCO <sub>3</sub>                    | 0,3                 |
| CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 0,00013             |
| pH-Værdi 7,0 inden sterilisering.    |                     |

En lille portion af dyrkningssubstratet udtages fra hver kolbe med regelmæssige mellemrum. De aktive bestanddele i prøverne ekstraheres og koncentrerer, og tilstedeværelsen af antibiotiket PS-6 og PS-7 påvises ved hjælp af papirchromatografi og bioautografi som beskrevet i det følgende.

#### Påvisning af antibiotiket PS-6

Det udtagne dyrkningssubstrat centrifugeres, og 10 ml af den ovenstående væske elueres i en minisøjle indeholdende 1,5 ml af ionbytteren "Diaion" HP-20 (Mitsubishi Chemical Industries Ltd.). Efter absorption af den aktive komponent elueres den med vandig acetoneopløsning (50% rumfang/rumfang). 0,5 ml af begyndelseseluatet kasseres, og der opsamles 2 ml af det efterfølgende eluat. Dette eluat koncentrerer, og 20  $\mu$ l af det koncentrerede eluat underkastes papirchromatografi med nedhængende filterpapir (Toyo Roshi nr. 50, Toyo Roshi Kaisha), og der fremkaldes ved 5°C i 7-20 timer med forskellige typer opløsningsmidler. Efter fremkaldelsen anbringes filterpapiret i våd tilstand på en analyseplade for bioautografi under anvendelse af forskellige typer mikroorganismer i 15-30 minutter. Derpå fjernes filterpapiret, og analysepladen dyrkes derpå ved 30°C i ca. 18 timer. En prøve, som indeholder antibiotiket PS-6, danner en hæmningszone ved  $R_f$ -beliggenheden for antibiotiket PS-6. Ved anvendelse af denne fremgangsmåde påvises antibiotiket PS-6 i dyrkningssubstratet fra 6 medier.

#### Påvisning af antibiotiket PS-7

En prøve af dyrkningssubstratet centrifugeres, og 10 ml af den ovenstående væske sættes til en minisøjle pakket med 1,5 ml "Diaion" PA-306 (Mitsubishi Chemical Industries Ltd.). Søjlen vaskes med 0,5 ml 5%'s (vægt/rumfang) natriumchloridopløsning og elueres med 50%'s (vægt/rumfang) methanoloopløsning indeholdende 3% (vægt/rumfang) natriumchlorid. De første 1,0 ml af eluatet kastes bort, og de efterfølgende 5,0 ml eluat opsamles. Methanolen fordampes under formindsket tryk, hvorefter eluatkoncentratet sættes en minisøjle pakket med 1,5 ml "Diaion" HP-20 (Mitsubishi Chemical Industries Ltd.). En aktiv komponent adsorberet på harpiksen elueres med 50%'s rumfang/rumfang) acetoneopløsning. De første 0,5 ml af eluatet kastes bort, og de efterfølgende 2,0 ml eluat opsamles. Eluatet koncentrerer,

og 20  $\mu$ l af det fremkomne koncentrat anbringes på Toyo filterpapir nr. 50 (Toyo Roshi Co.). Der gennemføres papirchromatografi med nedhængende papir under anvendelse af forskellige opløsningsmiddel-systemer ved 5°C i 7-20 timer. Efter fremkaldelse anbringes de halvtørre chromatogrammer i kontakt i 15-30 minutter med agaroverfladen på bioautografianalysepladerne indeholdende forskellige testorganismer. Analysepladerne inkuberes ved 35°C i 18 timer. En prøve indeholdende antibiotiket PS-7 giver en væksthæmningszone på stedet svarende til  $R_f$ -værdien for antibiotiket PS-7.

Resultater fremkommet under anvendelse af den ovenfor beskrevne fremgangsmåde viser, at antibiotiket PS-7 findes i alle dyrkningssubstratfiltraterne fra ovennævnte fire typer substrater selv om de akkumulerede mængder varierer fra substrat til substrat.

#### Eksempel 2

Streptomyces sp. A271 dyrkes analogt med den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde, idet der dog anvendes det i det følgende anførte substrat AGB-42. Inden eller 24 timer efter dyrkningens start sættes 0,2% DL-valin eller L-valin til substratet. Mængden af antibiotiket PS-6 akkumuleret i dyrkningssubstratet efter rystedyrkning i 72 timer er mere end den firdobbelte af mængden i kontroldyrkningssubstratet, som ikke er tilsat valin.

#### Sammensætning af substrat AGB-42

Maltose	5,0% (vægt/rumfang)
Opløselig stivelse	1,0% (vægt/rumfang)
Glycerol	0,3% (vægt/rumfang)
Tørgær	3,0% (vægt/rumfang)
NaCl	0,5% (vægt/rumfang)
$K_2HPO_4$	0,05% (vægt/rumfang)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05% (vægt/rumfang)
$CaCO_3$	0,3% (vægt/rumfang)
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,00013%
pH-Værdi 7,0 inden sterilisering.	

Eksempel 3

Streptomyces sp. A271 dyrkes analogt med den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde, idet der dog som substrat anvendes det ovenfor beskrevne ML-19 substrat. Inden eller 24 timer efter dyrkningens påbegyndelse sættes 0,2% DL-valin eller L-valin til substratet. Efter rystedyrkingen af kulturen i 72 timer er mængden af antibiotiket PS-6 akkumuleret i dyrkningssubstratet mere end fire gange så stor som mængden i kontroldyrkningssubstratet, som ikke er tilsat valin.

Eksempel 4

Streptomyces sp. A271 dyrkes analogt med den i eksempel 3 beskrevne fremgangsmåde, bortset fra at der tilsættes DL- eller L-leucin i stedet for DL- eller L-valin. Efter rystedyrking af kulturen i 72 timer er mængden af antibiotiket PS-6 akkumuleret i dyrkningssubstratet mere end dobbelt så stor som i kontroldyrkningssubstratet, hvortil der ikke er sat leucin.

Eksempel 5

Streptomyces sp. A271 dyrkes analogt med den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde, idet der dog anvendes det nedenfor beskrevne substrat AGB-3. Inden dyrkingen sættes 0,1% L-valin og 0,3% L-leucin til substratet. Efter rystedyrking af kulturen i 72 timer er der akkumuleret en væsentlig mængde af antibiotiket PS-6 i dyrkningssubstratet.

Sammensætning af substrat AGB-3

Maltose	3,0% (vægt/rumfang)
Tørgær	2,0%
NaCl	0,5%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05%
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05%
CaCO <sub>3</sub>	0,3%
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,00013%
pH-værdi 7,0 inden sterilisering.	

Eksempel 6

Der foretages dyrkning analogt med den i eksempel 2 beskrevne fremgangsmåde, idet dog n-valerianesyre sættes til substratet i stedet for DL- eller L-valin. Mængden af antibiotiket PS-6 akkumuleret i dyrkningssubstratet efter rystedyrkning af kulturen i 72 timer er mere end fire gange så stor som mængden i kontroldyrkningssubstratet, som ikke er tilsat n-valerianesyre.

Eksempel 7

Der foretages en dyrkning analogt med den i eksempel 3 beskrevne fremgangsmåde, idet dog substratet tilsættes n-valerianesyre i stedet for DL- eller L-valin. Mængden af antibiotiket PS-6 akkumuleret i dyrkningssubstratet er mere end to gange så stor som mængden i kontrolsubstratet, som ikke er tilsat n-valerianesyre.

Eksempel 8

Der gås frem analogt med den i eksempel 5 beskrevne fremgangsmåde, idet der dog tilsættes n-valerianesyre i stedet for L-valin. Mængden af antibiotiket PS-6 akkumuleret i dyrkningssubstratet er mere end fire så stor som mængden i kontrolsubstratet, som ikke er tilsat n-valerianesyre.

Eksempel 9

100 ml af en podekultur fremstillet som beskrevet i eksempel 1 overføres til en 30 liter fermenteringsbeholder indeholdende 15 liter SE-4-substrat, og dyrkningen gennemføres under tvungen beluftning ved 28°C i 24 timer ved 200 omdrejninger pr. minut og under tilsætning af den sterile luft i en mængde på 7,5 liter pr. minut. 1 liter af substratet inokuleres i 100 liter AGB-42 substrat, som er tilsat 0,5% L-valin inden inokuleringen, i en 200 liter rustfri fermenteringsbeholder, og der foretages dyrkning under tvungen beluftning i en mængde på 50 liter pr. minut ved 28°C i 72 timer med 100 omdrejninger pr. minut. En prøve af dyrkningssubstratet centrifugeres, og i den ovenstående væske konstateres en antibiotisk styrke på 450 CCU/ml. Til dyrkningssubstratet sættes 3% (vægt/rumfang) perlitfilterhjælpemiddel (Topco Perlite, Topco No. 34, Toko Perlite Kogyo K.K.), og der filtreres gennem en filterpresse, hvorved fås 60 liter filtrat (samlet antibiotisk aktivitet:  $25,5 \times 10^6$  CCU).

Alle de i det følgende anførte processer gennemføres under afkøling til under 6°C. Filtratet adsorberes på en søjle pakket med 6 liter ion-bytterharpiks "Diaion" PA-306 (Mitsubishi Chemical Industries Ltd.). Søjlen elueres med 20 liter 5%'s (vægt/rumfang) natriumchloridopløsning, og der fås en aktiv fraktion (A) indeholdende antibiotiket PS-5 og PS-6 (samlet antibiotisk aktivitet:  $4,2 \times 10^6$  CCU). Den på denne måde eluerede søjle anvendes senere til isolering af antibiotiket PS-7. Den aktive fraktion (A) sættes til en søjle med "Diaion" HP-20 harpiks (Mitsubishi Chemical Industries Ltd.) (3 x 70 cm), hvorefter der elueres med 10%'s vandig acetoneopløsning. Eluatet koncentrerer under formindsket tryk til fjernelse af acetonen og sættes derpå til en søjle (2,4 x 22 cm) af "QAE-Sephadex" (Pharmacia Fine Chemicals Co.), som forinden er indstillet på pH-værdien 8,0 med 1/100 fosfatpufferopløsning, og elueringen gennemføres med en M/100 fosfatpufferopløsning med en lineær natriumchloridgradientkoncentration på fra 1 til 0,4 M NaCl, og eluatet opsamles i 10 g fraktioner. De opsamlede fraktioner fortyndes 100 gange, og de aktive fraktioner udtages efter påvisning ved hjælp af UV-absorption og bioanalyse. Til fuldstændig fjernelse af det indeholdte antibiotikum PS-5 sættes den aktive fraktion til en søjle (1,2 x 40 cm) af "Diaion" HP-20 AG (Mitsubishi Chemical Industries Ltd.) og elueres med 300 ml vandig methanolopløsning med en lineær methanolgradientkoncentration på fra 10 til 75%. Der udtages fraktioner på 4 g. Hver fraktion underkastes papirchromatografi med nedhængende papir, og der fremkaldes med et blandet opløsningsmiddel sammensat af 120 ml acetonitril, 30 ml 1/10 M tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl pufferopløsning (pH-værdi 7,5) og 1 ml vandig 1/10 M natriummethyldiamintetraacetatopløsning (pH-værdi 7,5) hvorpå der analyseres ved hjælp af bioautografi. Der udtages aktive fraktioner fra nr. 25 til nr. 30 indeholdende antibiotiket PS-5 og aktive fraktioner fra nr. 33 til nr. 40 indeholdende antibiotiket PS-6. De aktive fraktioner indeholdende antibiotiket PS-6 koncentrerer og frysetørres efter destillation af methanolen. Det således fremkomne lyofiserede produkt opløses i 1 ml M/100 fosfatpufferopløsning (pH-værdi 8,0), hvor det renses på en søjle (1,2 x 80 cm) med "Sephadex" G-10 (Pharmacia Fine Chemicals Co.) og fremkaldes med samme pufferopløsning. De aktive fraktioner opsamles og indstilles på pH-værdien 8,3 med fortyndet vandig natriumhydroxidopløsning, hvorpå de sættes til en søjle (1,2 x 20 cm) med "Diaion" HP-20 harpiks (Mitsubishi Chemical Industries Ltd.). Elueringen foretages med 10%'s vandig acetoneopløsning til afsaltning. De aktive fraktion opsamles og frysetørres, og der fås 2,4 mg lyofiliseret hvidt produkt

af antibiotiket PS-6-natriumsalt. Søjlen med "Diaion" PA-306 (Mitsubishi Chemical Industries Ltd.), som er blevet elueret med natriumchloridopløsning og lagt til side med henblik på isolering af antibiotiket PS-7, elueres med 50%'s (rumfang/rumfang) vandig methanol indeholdende 3% (vægt/rumfang) natriumchlorid, og der fås en aktiv fraktion (B) (samlet antimikrobiel aktivitet:  $1,1 \times 10^6$  CCU, 4,3%'s udbytte).

Eluatet af den aktive fraktion (B) koncentreres under formindsket tryk til fjernelse af methanolen, hvorpå det absorberes på en søjle (3 x 70 cm) pakket med "Diaion" HP-20 (Mitsubishi Chemical Industries Ltd.) og elueres med 10%'s (rumfang/rumfang) vandig acetone. Eluatet opsamles i 25 g's portioner.

De aktive fraktioner blandes sammen og koncentreres under formindsket tryk til fjernelse af acetonen. Koncentratet adsorberes på en "QAE-Sephadex" (Pharmacia Fine Chemicals AB) søjle (2,5 x 30 cm) som forinden er pufret med M/1000 fosfatpufferopløsning med pH-værdi 8,0, og der elueres med M-100 fosfatpufferopløsning med en lineær gradient af natriumchloridkoncentration på fra 0,1 til 0,7 M. Eluatet opsamles i 17 g's portioner. Hver portion analyseres under anvendelse af bioanalyse og papirchromatografi efterfulgt af bioautografi, og fraktionerne fra nr. 25 til nr. 33, som indeholder antibiotiket PS-7 udtages og hældes sammen.

De blandede aktive fraktioner adsorberes på en søjle (1,1 x 20 cm) pakket med "Diaion" HP-20AG (Mitsubishi Chemical Industries Ltd.) og elueres med i alt 400 ml med en lineær acetonekoncentrationsgradient på fra 0 til 10%. Eluatet opsamles i 5 g's portioner. Hver portion fortyndes 50 gange med henblik på ultraviolet spektroskopi. Fraktionerne fra nr. 15 til nr. 20, som indeholder antibiotiket PS-7, hældes sammen og lyofiliseres, hvorved fås antibiotiket PS-7 i rå form.

Til yderligere rensning af antibiotiket PS-7 opløses det lyofiliserede rå produkt i M/100 fosfatpufferopløsning med pH-værdi 8,0 og sættes en "Sephadex" G-10 (Pharmacia Fine Chemicals AB) søjle (1,2 x 80 cm), hvorpå der fremkaldes med samme fosfatpufferopløsning. De aktive fraktioner blandes og adsorberes på en "QAE-Sephadex" (Pharmacia Fine Chemicals AB) søjle (1,1 x 20 cm), som forinden er blevet pufret med M/100 fosfatpufferopløsning med pH-værdi 8,0, og der elueres med i alt 200 ml med en lineær natriumchloridkoncentrationsgradient fra 0 til 0,4 M. De aktive fraktioner hældes sammen. Til de sammenblandede fraktioner sættes natriumchlorid i en koncentration på 3% (vægt/rumfang). Opløsningen adsorberes på en "Diaion" HP-20AG (Mitsubishi Chemical Industries Ltd.)

søjle (1,1 x 20 cm), og den aktive komponent elueres med 10%'s (rumfang/rumfang) vandig acetone og afsaltes. Den aktive fraktion lyofiliseres, og der fås 1,5 mg natriumsalt af antibiotiket PS-7 i form af et hvidt lyofiliseret produkt.

De således fremstillede natriumsalte af antibiotiket PS-6 og PS-7 har følgende fysisk-kemiske egenskaber.

#### I. Antibiotiket PS-6

##### 1) Farve

Stoffet er farveløst

##### 2) Opløselighed

Stoffet er opløseligt i vand og praktisk taget uopløseligt i acetone.

##### 3) Sønderdelingstemperatur

Til bestemmelsen anvendes et Koflermikrosmeltepunktsapparat BY-1 (YAZAWA Scientific Mfg. Co., Ltd.) med en temperaturstigning på 1°C/minut, og stoffet udviser ikke noget klart smeltepunkt. Det begynder at blive blødt omkring 143°C og bliver gradvis brunt og begynder at svinde ind ved 165°C. Omkring 220°C ændres stoffets farve langsomt til brun (harpiks).

##### 4) Ultraviolet absorptionsspektrum

60 mikrogram antibiotikum PS-6-natriumsalt opløses i 3,0 ml vand, og bestemmelsen foretages på et Hitachi dobbeltstrålespektrofotometer model 200-20 (Hitachi, Ltd.). Det fremkomne spektrum er vist i fig. 1 på tegningen. Nedenfor anføres de karakteristiske værdier.

$$\lambda_{\text{min.}}^{\text{H}_2\text{O}} = \text{ca. } 243,0 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{max.}}^{\text{H}_2\text{O}} = \text{ca. } 300,0 \text{ nm}$$

Til en vandig opløsning af dette stof i destilleret vand sættes en hydroxylaminopløsning (pH-værdi 7,5) i en sådan mængde, at koncentrationen af PS-6 er 20 µg/ml og koncentrationen af hydroxylamin 10 mM. Efter 30 minutter ved 22°C har reaktionsblandingen mistet ca. 95% af den oprindelige optiske tæthed ved 300,0 nm.

5) Infrarødt absorptionspektrum

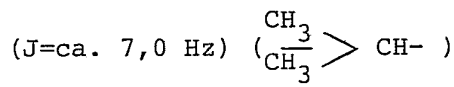
Det infrarøde absorptionspektrum for antibiotiket PS-6-natriumsalt i KBr optaget på et Hitachi infrarødt spektrofotometer model 215 (Hitachi, Ltd.) er vist i fig. 2 på tegningen. I det følgende anføres karakteristiske absorptionsmaksima ved de angivne bølgetal.

- (i) ca.  $1760 \text{ cm}^{-1}$  (-CO- i  $\beta$ -lactamringen)
- (ii) ca.  $1660 \text{ cm}^{-1}$  (-CO- i amidbindingen)
- (iii) ca.  $1600 \text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{COO}^{\ominus}$ )
- (iv) ca.  $1555 \text{ cm}^{-1}$  (-CO-NH- i amidbindingen)

6) Protonkernemagnetisk resonansspektrum

100 MHz protonkernemagnetisk resonansspektrum for antibiotiket PS-6-natriumsalt i tungt vand optaget på et JEOL NMR-spektrometer JNM PS-100 (Japan Electron Optics Laboratory Co., Ltd.) er vist i fig. 3 på tegningen. Der findes nedenstående karakteristiske signaler:

- (i) et par dubletter, som er centreret omkring 0,94 ppm og omkring 0,98 ppm



- (ii) en skarp singlet omkring 1,92 ppm ( $\text{CH}_3\text{-CO-}$ )
- (iii) en multiplet i området omkring 2,42-3,50 ppm ( $-\text{CH}_2\text{-}$ ,  $-\text{CH-}$ )
- (iv) en multiplet i området omkring 3,90-4,20 ppm
 
$$\begin{array}{c} \text{N} \\ | \\ \text{CH-} \end{array}$$

7) Farvereaktion

Ehrlichreagensreaktion:	positiv
Iod-chlorplatinhydrereaktion:	positiv
Ninhydrinreaktion:	negativ

8) Papirchromatografi

Antibiotiket PS-6 udviser følgende  $R_f$ -værdier med Toyo filterpapir No. 50 (Toyo Roshi Kaisha Ltd.) og med de nedenfor anførte opløsningsmidler ved nedhængende papirchromatografi:

Acetonitril/tris puffer/EDTA (Note 1):	$R_f = 0,41$
Ethanol/vand (7/3):	$R_f = 0,65$

(Note 1: En opløsningsmiddelblanding sammensat af

120 ml acetonitril, 30 ml 1/10 M tris-(hydroxylmethyl)aminomethan-HCl pufferopløsning (pH-værdi 7,5) og 1 ml vandig 1/10 M natriumethylendiamintetraacetatopløsning (pH-værdi 7,5).

9) Tyndtlagschromatografi (TLC)

Antibiotiket PS-6 underkastes tyndtlagschromatografering under anvendelse af chromatogramplade 13254 cellulose (Eastman Kodak Co.) og under anvendelse af nedenstående opløsningsmidler, hvorved der opnås de i det følgende anførte  $R_f$ -værdier.

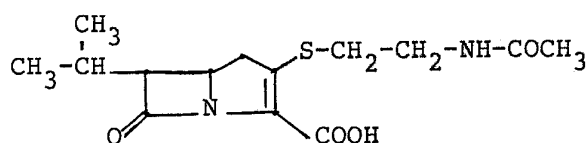
n-butanol/ethanol/vand (4/1/5)	
det øvre lag:	$R_f = 0,67$
n-propanol/vand (8/2):	$R_f = 0,69$
n-butanol/i-propanol/vand (7/7/6):	$R_f = 0,70$
Acetonitril/vand (8/2):	$R_f = 0,68$

10) Højspændingspapirelektroforese

Antibiotiket PS-6 analyseres ved hjælp af højspændingspapirelektroforese under de nedenfor anførte betingelser. Der anvendes et højspændingspapirelektroforeseapparat fra firmaet Savant Instruments Co., højspændingskilde HV 3000A og fladpladeelektroforese, model nr. FP 18A. Det anvendte filterpapir til denne analyse er Toyo filterpapir nr. 50. Der opnås følgende resultater:

Når elektroforesen gennemføres i 30 minutter under afkøling (under  $4^{\circ}\text{C}$ ) ved et potentiale på 42 V/cm i en pufferopløsning (pH-værdi 8,6) indeholdende 3,3 g barbital og 25,5 g natriumbarbital i 3000 ml vand migrerer antibiotiket PS-6 28 mm mod anoden.

De ovenfor anførte fysisk-kemiske egenskaber viser, at molekylstrukturen for antibiotiket PS-6 fremstillet i dette eksempel kan gengives ved følgende formel



De nedenfor anførte biologiske egenskaber opnås med det ifølge dette eksempel fremstillede natriumsalt af antibiotiket PS-6:

1) Antimikrobielt spektrum

Den minimale hæmningskoncentration for natriumsaltet af antibiotiket PS-6 bestemmes på forskellige patogene mikroorganismer, herunder resistente stammer, ved hjælp af substratfortyndingsmetoden under anvendelse af hjerne-hjerte-infusionssubstrat "Eiken" (Eiken Chemical CO., Ltd.).

Natriumsaltet af antibiotiket PS-6 opløses i hjerne-hjerte-infusionssubstrat "Eiken" (Eiken Chemical CO., Ltd.) (pH-værdi 7,0) i koncentrationer i området 5-100  $\mu\text{g/ml}$ . Der foretages passende fortyndingsserier under anvendelse af det samme flydende substrat. De i den efterfølgende tabel V anførte mikroorganismer dyrkes i 18 timer i hjerne-hjerte-infusionssubstrat "Eiken" ved  $28^{\circ}\text{C}$  og inokuleres til fortyndingsrækkerne af antibiotiket PS-6 i en slutpodemængde på  $1 \times 10^5$  celler/ml. Efter henstand af kulturerne ved  $35^{\circ}\text{C}$  i 20 timer aflæses mikroorganismevæksten i hver fortynding af antibiotiket PS-6. Den minimale hæmningskoncentration er den laveste koncentration af antibiotiket PS-6-natriumsalt, hvor der ved visuel bedømmelse ikke konstateres nogen vækst af den pågældende mikroorganisme. Som kontrol opløses to kendte  $\beta$ -lactamantibiotika, cefazolin og cefoxitin i hjerne-hjerte-infusionssubstrat med pH-værdien 7,0 i koncentrationer fra 1  $\mu\text{g/ml}$  til 100  $\mu\text{g/ml}$ , hvorefter der fremstilles flere fortyndingsrækker i det flydende substrat, og de behandles som beskrevet ovenfor i forbindelse med bestemmelserne af den minimale hæmningskoncentration. De opnåede resultater er anført i tabel V. Foruden de minimale hæmningskoncentrationer for antibiotiket PS-6 er anført referenceværdierne for cefazolin og cefoxitin.

Tabel V

Mikroorganisme	Minimal hæmningskoncentration (µg/ml)		
	Antibiotikum PS-6	Cefazorin	Cefoxitin
<u>Staphylococcus aureus</u> FDA-209P	0,33	0,25	2,50
<u>Staphylococcus aureus</u> Bx-1633	0,33	0,50	2,50
<u>Staphylococcus aureus</u> Russell	1,34	1,0	5,0
<u>Diplococcus pneumoniae</u> Type III <sup>4*</sup>	0,17	0,125	2,50
<u>Streptococcus pyogenes</u> NY-5 <sup>4*</sup>	0,33	0,25	1,25
<u>Bacillus subtilis</u> ATCC 6633	1,34	0,50	1,25
<u>Alcaligenes faecalis</u> B-326	1,56	6,25	1,56
<u>Citrobacter freundii</u> E-9 *	12,5	>100	>100
<u>Serratia marcescens</u> S-18 *	50,0	>100	50,0
<u>Klebsiella pneumoniae</u> K-2 *	12,5	6,25	6,25
<u>Enterobacter</u> sp. E-8 *	12,5	3,13	12,5
<u>Enterobacter cloacae</u> E-16 *	25,0	>100	>100
<u>Enterobacter aerogenes</u> E-19 *	25,0	>100	>100
<u>Proteus vulgaris</u> P-5	25,0	>100	
<u>Proteus rettgeri</u> P-7 <sup>3*</sup>	6,25	25,0	
<u>Proteus Mirabilis</u> P-6 <sup>2*</sup>	12,5	6,25	
<u>Proteus</u> sp. P-22	12,5	>100	
<u>Providencia</u> sp. P-8 <sup>2*</sup>	12,5	50,0	

Note: \* β-lactamasedanner

2\* resistent over for kanamycin, gentamycin og tobramycin

3\* resistent over for gentamycin og tobramycin

4\* substratet er tilsat 10% hesteblod

2) Potenserende og synergistisk virkning på den antimikrobielle aktivitet af kendte  $\beta$ -lactamforbindelser mod  $\beta$ -lactamresistente mikroorganismer

---

10 ml fortyndet næringsagar (pH-7,0) fortyndet 2,5 gange og indeholdende 50  $\mu$ g/ml penicillin G eller cephaloridin podes med  $\beta$ -lactamaseproducerende og  $\beta$ -lactamresistente mikroorganismer og holdes i en Petriskål med en diameter på 9 cm, hvorved der fås en bioanalyse-agarplade. På denne analyseplade anbringes 8 mm pulpskiver hver indeholdende 20  $\mu$ l af en opløsning af antibiotiket PS-6 i en koncentration på 240  $\mu$ g/ml, og der inkuberes ved 35°C i 18 timer inden hæmningszonerne måles. En kontrolanalyseplade fremstilles på tilsvarende måde men uden indhold af penicillin G eller cephaloridin. Som referenceantibiotika analyseres 10.000  $\mu$ g/ml penicillin G eller 20  $\mu$ l cephaloridin under samme betingelser. Resultaterne er anført i den efterfølgende tabel VI.

Det fremgår af de i tabel VI anførte resultater, at tilsætningen af antibiotiket PS-6 til penicillin G eller cephaloridin i en koncentration under den påviselige grænse bevirker en klar synergistisk virkning mod  $\beta$ -lactamresistente mikroorganismer. Tilsætningen af penicillin G eller cephaloridin i stedet for antibiotiket bevirker ingen synergistisk virkning.

Tabel VI

β-lactamresistent mikroorganisme	Plade	Hæmningszone (mm)		
		Kontrol	med penicillin G	med cephaloridin
<u>Proteus vulgaris</u> P-5	PS-6	14,0	30,0	28,5
	penicillin G	15,0	15,0	15,0
	cephaloridin	12,0	12,0	12,0
<u>Citrobacter freundii</u> E-9	PS-6	22,0	23,0	25,0
	penicillin G	0,0	0,0	0,0
	cephaloridin	12,0	12,0	12,0
<u>Serratia marcescens</u> S-18	PS-6	20,0	22,0	26,0
	penicillin G	0,0	0,0	0,0
	cephaloridin	11,0	11,0	11,0

### 3) In vivo-virkning

Den terapeutiske virkning af natriumsaltet af antibiotiket PS-6 undersøges ved behandling af mus, som er blevet inficeret intraperitonealt med  $5 \times 10^5$  celler/mus af *Staphylococcus aureus* Smith. Kort tid efter inficeringen injiceres en vandig opløsning af natriumsaltet af antibiotiket PS-6 subcutant. Med DDY hammus (Shizuoka) som forsøgsdyr fås en 50%'s kurativ dosis på 5,2 mg/kg.

### 4) Toksicitet

En vandig injektionsopløsning af natriumsaltet af antibiotiket PS-6 injiceres intraperitonealt til DDY hammus (Shizuoka) i en dosis på 500 mg/kg. Der registreres ingen akut toksicitet.

### 5) Følsomhed over for kendte $\beta$ -lactamaser (egenskaber ved antibiotiket PS-6 som enzymsubstrat)

Følsomheden over for  $\beta$ -lactamase af natriumsaltet af antibiotiket PS-6 som enzymsubstrat undersøges mod exo-penicillinase fra *Bacillus licheniformis* 749/C (ATCC 25972) og inducerbar penicillinase fra *Bacillus cereus* 569 (ATCC 27348) under nedenstående reaktionsbetingelser:

#### (A) Reagens

##### (1) Substrat

Natriumsaltet af antibiotiket PS-6 opløses i 25 nM fosfatpuffer (pH=6,8) i de angivne koncentrationer.

##### (2) $\beta$ -Lactamase

(a) Exo-penicillinase fra *Bacillus licheniformis* 749/C (ATCC 25972). Renset under anvendelse af cephalixin-Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals AB) affinitetssøjlechromatografi. Dette enzymapparat har en styrke på 16.600 enheder/ml når hydrolysen af penicillin G kalium måles ved hjælp af iodometri ved 30°C i en M/10 fosfatpuffer med pH-værdi 6,8. En enhed penicillinase er den mængde af enzymet, som kan hydrolyseres 1 mikromol penicillin G i 60 minutter ved 30°C ved en pH-værdi på 6,8.

(b) Inducerbar penicillinase fra *Bacillus cereus* 569 (ATCC 27348). Denne  $\beta$ -lactamase induceres ved hjælp af ampicillin og renses ved søjlechromatografi på CM-cellulose. Dette præparat har en titer på 26.900 penicillin G kaliumenheder/ml.

## (B) Reaktions- og analysebetingelser

Til en 1 cm kvartskuvette indeholdende 3 ml af den pufrede opløsning af natriumsaltet af antibiotiket PS-6 ved 30°C sættes  $\beta$ -lactamase i de angivne mængder, og der foretages straks grundig blanding for at starte reaktionen. Tidsforløbet for hydrolysen følges ved 30°C ved at bestemme formindskelsen i optisk tæthed ved 301 nm, som svarer specifikt til koncentrationen af antibiotiket PS-6. Som anført i beskrivelsen til dansk patentansøgning nr. 1936/78 giver natriumsaltet af antibiotiket PS-5 en  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  værdi på 267,5 ved  $\lambda_{\text{max}}$  på 301 nm. Hvis dette stof ikke indeholdt krystallisationsvand ville epsilonværdien være 8560.

Da 5% af den optiske tæthed fra starten for antibiotiket PS-5 ved 301 nm stadig er tilbage selv efter fuldstændig sønderdeling med hydroxylamin eller  $\beta$ -lactamase, antages forskellen i optisk tæthed for dette substrat ved 301 nm at være  $\Delta = 8132$ . Dette antages at kunne anvendes på antibiotiket PS-6, og der gennemføres følgende beregning.

## (C) Resultater

(a) Exo-penicillinase fra *Bacillus licheniformis* 749/C. 0,5 ml af ovennævnte enzympræparat og 2,5 ml af substratopløsningen indeholdende 30  $\mu\text{M}$  mol af antibiotiket PS-6 blandes (slutkoncentration for antibiotikum PS-6 = 10 pmol/ml = 3,3  $\mu\text{g/ml}$ , optisk tæthed ved start ved 301 nm = 0,086), og der inkuberes i 15 minutter under de ovenfor anførte betingelser uden væsentlig hydrolyse af antibiotiket PS-6.

(b) Inducerbart penicillinase fra *Bacillus cereus* 569. Tidsforløbet for hydrolysen af antibiotiket PS-6 ved hjælp af denne  $\beta$ -lactamase følges under de ovenfor beskrevne betingelser ved at bestemme den optiske tæthed ved 301 nm for reaktionsblandingerne indeholdende 7,5  $\mu\text{l}$  af ovennævnte enzympræparat og 77,5 pmol af antibiotiket PS-6 som substratet i alt 3,0 ml (slutkoncentration af antibiotiket PS-6 = 25,8 pmol/ml = 8,63  $\mu\text{g/ml}$ , optisk tæthed ved 301 nm = 0,366).

Ud fra disse data beregnes  $K_m$ -værdien til 17,7  $\mu\text{M}$  under anvendelse af metoden ifølge Shyun-Long Yun og H. Clarence Suelter (*Biochemica et Biophysica Acta*, bind 480, side 1-13, 1977).

II Antibiotiket PS-7

- 1) Farve  
stoffet er farveløst
- 2) Opløselighed  
Stoffet er opløseligt i vand, men praktisk taget uopløseligt i acetone.

3) Sønderdelingstemperatur

Stoffet har ikke noget veldefineret smeltepunkt, og det bliver gradvist blødt ved 145-150°C, krymper sammen og virker størknet med farve ved 220°C ved måling under anvendelse af Kofler's metode under anvendelse af en temperaturstigningshastighed på 1°C pr. minut og under anvendelse af et mikrosmeltepunktsskærm af typen BY-1 (Yazawa Kagaku Kikaikogyo Co.).

4) Ultraviolet absorptionsspektrum

Det ultraviolette absorptionsspektrum optaget ved måling på en opløsning indeholdende 45 mikrogram af natriumsaltet af antibiotiket PS-7 i 3 ml M/100 fosfatpuffer (pH-værdi 7,0) med et Shimadzu Digital dobbeltstrålespektrofotometer UV 210A er vist i fig. 4 på tegningen. De karakteristiske værdier er som følger:

$$\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}} = \text{ca. } 220,0 \text{ nm og}$$

$$\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}} = \text{ca. } 308,0 \text{ nm}$$

Ca. 95% af absorbansen ved 308,0 nm går tabt, når en vandig hydroxylaminopløsning med pH-værdi 7,5 sættes til en deioniseret vandig opløsning af stoffet, hvor koncentrationen af stoffet og hydroxylamin er indstillet på henholdsvis ca. 20 µg/ml og 10 mM, og blandingen inkuberes ved 22°C i 30 minutter.

5) Infrarødt absorptionsspektrum

Det infrarøde absorptionsspektrum målt i en KBr tablet under anvendelse af et Hitachi infrarødt spektrofotometer type 215 er vist i fig. 5 på tegningen. De karakteristiske maksimumabsorptionsbølgelængder er som følger:

(i) ca. 1760 cm<sup>-1</sup> (-CO- fra β-lactamring)

(ii) ca. 1670 cm<sup>-1</sup> (-CO- fra amid)

(iii) ca. 1620 cm<sup>-1</sup> (-COO<sup>⊖</sup> og -CH=CH-).

6) Protonkernemagnetisk resonansspektrum

100 MHz protonkernemagnetisk resonansspektrret målt i tungt vand ved hjælp af et Nihon Denshi JNM type PS-100 apparatur er vist i fig. 6 på tegningen. De karakteristiske signaler er som følger:

- (i) en triplet centreret ved ca. 0,96 ppm ( $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CH}_2^- \end{array}$ )
- (ii) en mulitplet centreret ved ca. 1,72 ppm ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ )
- (iii) en skarp singlet ved ca. 2,05 ppm ( $\text{CH}_3-\text{CO}-$ )
- (iv) en multiplet ved ca. 2,96-3,38 ppm ( $-\text{CH}_2-$ ,  $\text{N}-\overset{|}{\text{CH}}-$ )
- (v) et signal centreret ved ca. 3,96 ppm ( $-\overset{|}{\text{CH}}-$ )
- (vi) et par dubletter centreret ved ca. 6,06 ppm og ca. 1,76 ppm  
(J = ca. 14 Hz) ( $-\text{CH}=\overset{|}{\text{CH}}-$ )

7) Farvereaktion

Ehrlich-reagensreaktion:	positiv
Iod-chlorplatinsyrereaktion:	positiv
Ninhydrinreaktion:	negativ

8) Papirchromatografi

Antibiotiket PS-7 giver følgende  $R_f$ -værdier ved papirchromatografi med nedhængende papir på Toyo filterpapir nr. 50 (Toyo Roshi CO.) med følgende opløsningsmiddelsystem:

Acetonitril/Tris/EDTA <sup>1)</sup> :	$R_f = 0,41$
Ethanol/vand (7/3):	$R_f = 0,68$

9) Tyndtlagschromatografi (TLC)

Antibiotiket PS-7 giver nedenstående  $R_f$ -værdier ved tyndtlagschromatografi under anvendelse af cellulosechromatogramplade 13254 (No. 6065) (Eastman KODAK Co.) med følgende opløsningsmiddelsystem:

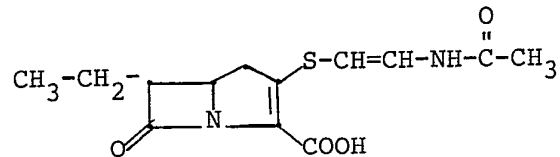
n-Butanol/ethanol/vand (4/1/5) (øvre lag):	$R_f = 0,65$
n-Propanol/vand (7/3):	$R_f = 0,81$
n-Butanol/isopropanol/vand (7/7/6):	$R_f = 0,71$
Acetonitril/vand (8/2):	$R_f = 0,65$

10) Højspændingspapirelektroforese

Der konstateres følgende migrering med antibiotiket PS-7 ved elektroforese på Toyo filterpapir nr. 50 med en pufferopløsning med den nedenfor anførte pH-værdi under anvendelse af et højspændingspapirelektroforeseapparat fra firmaet Savant Instruments Co., højspændingskilde HV 3000A, elektroforesebeholder Fp 18A.

Antibiotiket PS-7 migrerer mod anoden over en længde på 28 mm i en pufferopløsning bestående af 3,3 g barbital, 25,5 g natriumbarbital og 3000 ml vand (pH-værdi 8,6) ved gennemledning af en strøm ved 42 volt/cm i 30 minutter.

De ovenfor anførte fysisk-kemiske egenskaber viser, at antibiotiket PS-7 fremstillet i dette eksempel har følgende molekylstruktur:



Natriumsaltet af antibiotiket PS-7 fremstillet i dette eksempel har de i det følgende anførte biologiske egenskaber.

1) Antimikrobielt spektrum

De minimale hæmningskoncentrationer bestemmes under anvendelse af forskellige pathogene stammer, herunder resistente stammer for antibiotiket PS-7 under anvendelse af substratfortyndingsmetoden med et hjerne-hjerteinfusionssubstrat "Eiken" (Eiken chemical Co., Ltd.).

Natriumsaltet af antibiotiket PS-7 opløses og fortyndes med hjerne-hjerteinfusionssubstratet "Eiken" til koncentrationer mellem 5 µg/ml og 100 µg/ml. Opløsningen fortyndes yderligere med det samme substrat til dannelse af en række geometriske koncentrationer. Til rækkefortyndingerne sættes podekulturer fremstillet ved rystedyrkning af forskellige testorganismer anført i tabel V i hjerne-hjerteinfusionssubstratet ved 28°C i 18 timer, idet det endelige celledetal er ca.  $1 \times 10^5$ /ml. Cellevæksten undersøges efter inkubation ved 35°C i 20 timer. Den laveste koncentration, ved hvilken der ikke konstateres cellevækst, er den minimale hæmningskoncentration for antibiotiket PS-7 over for testorganismen. Som kontrol opløses de kendte antibiotika cephalosporin og cephaloxitin i hjerne-hjerteinfusionssubstratet ved pH-værdien 7,0 i en koncentration mellem 1 og 100 µg/ml, og der fortyndes geometrisk med samme substrat til dannelse af rækkefortyndinger. Den minimale hæmningskoncentration

på testorganismerne bestemmes på samme måde som beskrevet ovenfor. Resultaterne er anført i tabel VII. Til sammenligningsformål er resultaterne med de kendte antibiotika cephalozolin og cefoxitin også anført i tabel VII.

Tabel VII

Mikroorganisme	Minimal hæmningskoncentration		
	Antibiotikum PS-7	Cephalozolin	Cefoxitin
Staphylococcus aureus FDA 209P	< 0,19	0,25	2,50
Diplococcus pneumoniae type III**	< 0,19	0,125	2,50
Alcaligenes faecalis B-326	0,78	6,25	1,56
Citrobacter freundii E-9*	3,13	>100	>100
Enterobacter cloacae E-16*	6,25	>100	>100

\*  $\beta$ -lactamaseproducerende stamme

\*\* Substratet tilsættes hesteserum i en mængde på 10%.

2) Potenserende og synergistisk virkning på den antimikrobielle aktivitet af  $\beta$ -lactamantibiotika mod  $\beta$ -lactamresistente mikroorganismer

Cephaloridin sættes til et næringsagarsubstrat, der er fortyndet 2,5 gange, og som har pH-værdien 7,0, og substratet inokuleres med en  $\beta$ -lactamproducerende stamme, som danner  $\beta$ -lactamase. 10 ml af substratet udhældes og fordeles i en petriskål med en diameter på 9 cm, hvorefter substratet størkner til dannelsen af en analyseplade. Antibiotikumet PS-7 opløses i en koncentration på 50  $\mu$ g/ml eller 29  $\mu$ g/ml. I 20  $\mu$ l af opløsningerne samt de 2-dobbelte og 4-dobbelte fortyndinger deraf udblødes en pulpskive med en diameter på 8 mm. Pulpskiven anbringes på overfladen af ovennævnte analyseplader, og størrelsen af væksthæmningszonen omkring skiven bedømmes efter 18 timers inkubering ved 35°C. Som kontrol gennemføres samme forsøgsrække med samme substrat, der dog ikke er tilsat cephaloridin. Til yderligere sammenligning gennemføres en lignende forsøgsrække med pulpskiver udblødt i 20  $\mu$ l 10.000  $\mu$ g/ml penicillin G opløsning eller 10.000  $\mu$ g/ml cephaloridinopløsning i stedet for antibiotikumet PS-7. Resultaterne er anført i nedenstående tabel VIII.

Tabel VIII

$\beta$ -lactam-resistent stamme	Skive	Diameter af hæmningszone (mm)	
		Ingen tilsætning	Cephaloridin- tilsætning
	Antibiotikum PS-7		
Proteus vulgaris P-5	{ x1	0,0	19,0
	{ x2	0,0	15,0
	{ x4	0,0	11,0
	Penicillin G	15,0	15,0
	Cephaloridin	12,0	12,0
	Antibiotikum PS-7		
Citrobacter freundii E-9	{ x1	12,5	13,5
	{ x2	0,0	0,0
	{ x4	0,0	0,0
	Penicillin G	0,0	0,0
	Cephaloridin	12,0	12,0
	Antibiotikum PS-7		
Serratia marcescens S-18	{ x1	11,0	18,0
	{ x2	0,0	14,0
	{ x4	0,0	0,0
	Penicillin G	0,0	0,0
	Cephaloridin	11,0	11,0

De ovenfor anførte resultater viser, at der ved tilsætning af antibiotikum PS-7 opnås tydelig forøgelse af den antimikrobielle virkning på  $\beta$ -lactamresistente stammer af penicillin G eller cephaloridin i sådanne koncentrationer, hvor der uden tilsætning ikke konstateres nogen antimikrobiel virkning. Der konstateres ingen forøgelse af den antimikrobielle virkning ved tilsætning af penicillin G eller cephaloridin i stedet for antibiotikum PS-7.

### 3) In vivo-virkning

Virkningen af det ovenfor fremstillede antibiotikum PS-7 påvises under anvendelse af mus, som intraperitonealt er inficeret med *Staphylococcus aureus* Smith i en mængde på  $5 \times 10^5$  celler pr. mus. Natriumsaltet af antibiotikum PS-7 indgives subcutant til musene umiddelbart efter inficeringen. Med DDY hammus (Shizuoka) opnås en

CD<sub>50</sub>-værdi på 7,5 mg/kg.

#### 4) Toksicitet

Ved intraperitoneal indgift af natriumsaltet af antibiotiket PS-7 til DDY hammus (Shizuoka) konstateres ingen akut toksicitet.

#### 5) Følsomhed over for kendte $\beta$ -lactamaser (egenskaber ved antibiotiket PS-7 som enzymsubstrat)

Virkningen af antibiotiket PS-7 i form af natriumsaltet som substrat over for penicillinase af den inducerede type produceret af *Bacillus cereus* 569 (ATCC 27348) undersøges på følgende måde:

##### (A) Reagenser

###### (1) substrat:

Natriumsaltet af antibiotiket PS-7 opløses i 100 mM phosphatpufferopløsning (pH-værdi 6,8) i den angivne koncentration.

###### (2) $\beta$ -lactamase:

Penicillinase af den inducerede type fra *Bacillus cereus* 569 (ATCC 27348) induceres ved hjælp af ampicillin og der foretages delvis rensning ved søjlechromatografering under anvendelse af CM-cellulose (Brown Co.). Enzympræparatet har en enzymstyrke på 14.800 enheder/ml med kaliumsaltet af penicillin G som substrat.

##### (B) Reaktions- og analysebetingelser.

Opløsningen af antibiotiket PS-7, der tjener som substrat, opvarmes til 30°C. 3,0 ml af opløsningen hældes i en kvartskuvette med en optisk vejlængde på 1 cm, og reaktionen startes ved tilsætning og blanding af den angivne enzymmængde. Reaktionen gennemføres ved 30°C, og en formindskelse af substratet, antibiotiket PS-7, registreres ved hjælp af absorbansen ved 308 nm.

Restabsorbansen ved 308 nm bestemmes til  $\epsilon = 9720$  ud fra den forudsætning, at  $\epsilon$ -værdien for antibiotiket PS-7 er 10.800 baseret på formindskelsen af absorbansen, når antibiotiket PS-7 i ren form spaltes fuldstændigt under anvendelse af ovennævnte enzym.

##### (C) Resultater.

En reaktionsblanding indeholdende 10  $\mu$ l af penicillinasepræparatet og 102  $\mu$ mol af antibiotiket PS-7 (slutkoncentration 34  $\mu$ mol/ml) i et samlet rumfang på 3,0 ml inkuberes under de ovennævnte betingelser, og formindskelsen af koncentrationen af antibiotiket PS-7 bestemmes i relation til inkubationstiden.

Under anvendelse af fremgangsmåden ifølge Shyun-Long Yun og H. Clarence Sudlter's fremgangsmåde, Biochemica et Biophysica Acta 480, 1-13 (1977) beregnes Km-værdien ud fra ovenstående resultater til 13,0  $\mu\text{m}$  i PS-7.

#### Eksempel 10

##### Tritylesteren af antibiotiket PS-6

25,9 mg af det frysetørrede antibiotikum PS-6-natriumsalt fremstillet analogt med den i eksempel 9 beskrevne fremgangsmåde opløses i 5 ml dimethylformamid, og der tilsættes 20  $\mu\text{l}$  triethylamin og derpå 50 mg tritylchlorid.

Efter omrøring ved stuetemperatur i 3 timer fortyndes reaktionsblandingen med 200 ml benzen og vaskes 3 gange med 70 ml 0,1 M phosphatpufferopløsning (pH-værdi 6,8). Efter dehydratisering ved tilsætning af 3 ml mættet vandig natriumchloridopløsning tørres benzenopløsningen ved tilsætning af vandfri natriumsulfat. Benzenet destilleres under formindsket tryk, og der fås ca. 0,5 ml benzenopløsning, som ledes gennem en søjle (1,2 x 96,0 cm) med "Bio-Beads" S-X3 (Bio-Rad Laboratories). Søjlen fremkaldes med benzen. De således fremkomne aktive fraktioner kombineres og koncentrerer til tørhed under formindsket tryk. Remanensen opløses i 0,5 ml acetone og sættes til en søjle (1,2 x 96,0 cm) med "Sephadex" LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals AB), som forinden er kvældet med acetone, og søjlen fremkaldes med acetone. De aktive fraktioner kombineres og koncentrerer til tørhed under formindsket tryk, hvorved der fås 23,7 mg af et hvidt pulver. Ved omkrystallisation af dette pulver i en blanding af benzen og n-hexan fås 17,5 mg af tritylesteren af antibiotiket PS-6 i form af et farveløst krystallinsk pulver.

Dette farveløse krystallinske pulver har følgende fysisk-kemiske egenskaber:

- 1) Farve  
Farveløst
- 2) Ultraviolet absorptionsspektrum

Det ultraviolette absorptionsspektrum for tritylesteren af antibiotiket PS-6 optages på et Hitachi dobbeltstrålespektrofotometer model 200-20 (Hitachi, Ltd.) ved en koncentration på 100  $\mu\text{g}/3$  ml methanol.

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}} = 315,0 \text{ nm}$$

3) IR-absorptionsspektrum

200  $\mu\text{g}$  af tritylesteren af antibiotiket PS-6 opløses i 0,3 ml  $\text{CHCl}_3$ , og det infrarøde absorptionsspektrum optages under anvendelse af et Hitachi infrarødt spektrofotometer model 260-30 (Hitachi Limited) under anvendelse af en KBr-fikseret celle. Det infrarøde absorptionsspektrum er vist i fig. 7 på tegningen.

Der findes følgende karakteristiske absorptionsmaksima ved de angivne bølgetal:

- (i) ca.  $1780 \text{ cm}^{-1}$  (-CO i  $\beta$ -lactamringen)
- (ii) ca.  $1700 \text{ cm}^{-1}$  (-CO- i amidbindingen)
- (iii) ca.  $1675 \text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{COO}^\ominus$  i esterbindingen).

4) Opløselighed

Opløseligheden af trityleringsproduktet af antibiotiket PS-6 bestemmes ved under rystning at opløse 5 mg af trityleringsproduktet af antibiotiket PS-6 i 0,1 ml af de nedenfor anførte opløsningsmidler ved  $20^\circ\text{C}$ . Der opnås følgende resultater:

Praktisk taget uopløseligt i vand og n-hexan,

Let opløselig i benzen, ethylacetat, chloroform, methanol, ethanol, acetone, dimethylformamid (DMF) og dimethylsulfoxid (DMSO).

5) Farvereaktion

Ehrlich-reagensreaktion:	positiv
Iod-chlorplatinsyrereaktion:	positiv
Ninhydrinreaktion:	negativ

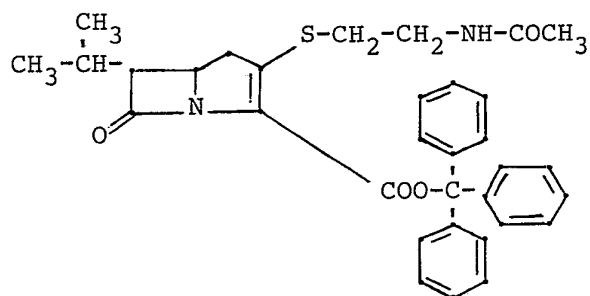
6) Tyndtlagschromatografi (TLC)

Tritylesteren af antibiotiket PS-6 giver nedenstående  $R_f$ -værdier under de anførte betingelser. Migreringen påvises ved bioautografi på *Comamonas terrigena* B-996.

Silicageltyndtlagschromatograferingsplader (Merck, kiselgel 60 F<sub>254</sub>) anvendes, og inden anbringelse af pletterne anbringes 2,5  $\mu\text{l}$  acetoneopløsning indeholdende 10% dimethylformamid. Der fås følgende  $R_f$ -værdier:

Opløsningsmiddelsystem: benzen/acetone (2/1):	$R_f = 0,37$
benzen/ethylacetat (1/8):	
	$R_f = 0,34$

Ud fra molekylstrukturen af antibiotiket PS-6 og de ovenfor anførte fysisk-kemiske egenskaber for tritylesteren af antibiotiket PS-6 antages tritylesteren af antibiotiket PS-6 at have følgende struktur:



De biologiske egenskaber for tritylesteren af antibiotiket PS-6 omtales nærmere i det følgende:

### 1) Antimikrobielt spektrum

Den minimale hæmningskoncentration for forbindelsen på forskellige patogene mikroorganismer, herunder flere resistente stammer, bestemmes under anvendelse af substratfortyndingsmetoden med hjerne-hjerteinfusionssubstrat "Eiken" (Eiken Chemical Co., Ltd.).

Ved denne bestemmelse opløses tritylesteren af antibiotiket PS-6 i en lille mængde methanol og fortyndes hurtigst muligt i hjerne-hjerteinfusionssubstrat "Eiken" (pH-værdi 7,0) (Eiken Chemical Co., Ltd.), indtil koncentrationen af tritylesteren af antibiotiket PS-6 ligger i området fra 40  $\mu\text{g/ml}$  til 20  $\mu\text{g/ml}$ , og koncentrationen af methanol i den færdige opløsning ikke overstiger 10%. Denne opløsning fortyndes i en dobbelt geometrisk række. Mikroorganismene anført i tabel IX dyrkes i 18 timer ved 28°C i hjerne-hjerteinfusionssubstrat "Eiken" og inokuleres til ovennævnte fortyndingsrække i en slutpodemængde på  $1 \times 10^5$  celler/ml. Resultaterne aflæses efter inkubering ved 35°C i 20 timer. Den minimale hæmningskoncentration er den laveste koncentrationsenhed af trityleringsproduktet af antibiotiket PS-6, hvor der ikke konstateres nogen vækst af mikroorganismen under de ovenfor beskrevne betingelser. Som kontrolantibiotika fremstilles opløsninger af ampicillin og cephaloridin i hjerne-hjerteinfusionssubstrat "Eiken" (pH-værdi 7,0) i en koncentration på 100  $\mu\text{g/ml}$ , og de behandles på samme måde som tritylesteren. I nedenstående tabel IX anføres de minimale hæmningskoncentrationer for tritylesteren af antibiotiket PS-6 sammen med de med cephaloridin som kontrolantibiotikum opnåede kontrolværdier.

Tabel IX

Mikroorganisme	Minimal hæmningskoncentration (µg/ml)	
	Trityl PS-6	Cephaloridin
<u>Staphylococcus aureus</u> FDA-209P	0,33	0,04
<u>Diplococcus pneumoniae</u> Type III**	0,33	0,01
<u>Streptococcus pyogenes</u> NY-5**	0,33	0,01
<u>Alcaligenes faecalis</u> B-326	1,34	3,13
<u>Klebsiella pneumoniae</u> K-2*	20,0	20,0
<u>Citrobacter freundii</u> E-9*	12,5	>100
<u>Proteus vulgaris</u> P-5*	25,0	>100
<u>Enterobacter cloacae</u> E-16*	25,0	>100

Note: \* β-lactamaseproducerende organisme  
 \*\*substratet er tilsat 10% hesteblod.

Det fremgår af de ovenfor anførte data, at tritylesteren af antibiotiket PS-6 har bredspektret antimikrobiel virkning og særlig kraftig antibiotisk virkning på forskellige  $\beta$ -lactamresistente ( $\beta$ -lactamaseproducerende) mikroorganismestammer.

## 2) In vivo-virkning

In vivo-virkningen af trityleringsproduktet af antibiotiket PS-6 bestemmes på mus, som intraperitonelt inficeres med  $5 \times 10^5$  celler pr. mus af *Staphylococcus aureus* Smith. Trityleringsproduktet af antibiotiket PS-6 injiceres subcutant efter inficeringen. 50%'s kurativ dosis på han DDY mus (SHIZUOKA) er 5,5 mg/kg.

## 3) Toksicitet

Med DDY hanmus (Shizuoka) konstateres ingen akut toksicitet med tritylesteren af antibiotiket PS-6 ved en intraperitoneal dosis på 500 mg/kg.

### Eksempel 11

24,5 mg af natriumsaltet af antibiotiket PS-7 i form af et hvidt frysetørret produkt fremstillet på samme måde som beskrevet i eksempel 9 opløses i 5 ml dimethylformamid, og der tilsættes 20  $\mu$ l triethylamin og derpå 50 mg tritylchlorid. Efter omrøring ved stuetemperatur i 3 timer fortyndes reaktionsblandingen med 200 ml benzen og vaskes 3 gange med 70 ml 0,1 M phosphatpufferopløsning (pH-værdi 6,8). Efter dehydratisering ved tilsætning af 3 ml mættet vandig natriumchloridopløsning tørres benzenopløsningen ved tilsætning af vandfri natriumsulfat. Benzenet destilleres delvis under formindsket tryk, og der fås ca. 0,5 ml af benzenopløsningen, som derpå ledes gennem en søjle (1,2 x 96,0 cm) med "Bio-Beads" S-X3 (Bio-Rad Laboratories). Søjlen fremkaldes med benzen. De således fremkomne aktive fraktioner hældes sammen og koncentrerer til tørhed under formindsket tryk. Den fremkomne remanens opløses i 0,5 ml acetone og sættes til en søjle (1,2 x 96,0 cm) med "Sephadex" LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals AB), som forinden er blevet kvældet med acetone, og søjlen fremkaldes med acetone. De aktive fraktioner hældes sammen og koncentrerer til tørhed under formindsket tryk, hvorved der fås 20,5 mg hvidt pulver. Ved omkrystallisation af dette pulver i en blanding af benzen og n-hexan fås 15,5 mg af tritylesteren af antibiotiket PS-7 i form af et farveløst krystallinsk pulver. Dette farveløse krystallinske pulver har følgende fysisk-kemiske egenskaber.

## 1) Farve

farveløst

2) UV absorptionsspektrum

Det ultraviolette absorptionsspektrum for trityleringsproduktet af antibiotiket PS-7 optages på et Hitachi dobbeltstrålespektrofotometer model 200-20 (Hitachi, Ltd.) ved en koncentration på 100 µg/3 ml methanol.

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}} = 230,5 \text{ nm}, 321,5 \text{ nm}.$$

3) Opløselighed

Opløseligheden af trityleringsproduktet af antibiotiket PS-7 bestemmes ved under omrystning af opløse 5 mg af trityleringsproduktet af antibiotiket PS-7 i 0,1 ml af de nedenstående opløsningsmidler ved 20°C. Der opnås følgende resultater:

Praktisk taget uopløseligt i vand og n-hexan,  
 Let opløseligt i benzen, ethylacetat, chloroform, methanol, ethanol, acetone, dimthylformamid (DMF) og dimethylsulfoxid (DMSO).

4) Farverreaktion

Ehrlich-reagensreaktion:	positiv
Iod-chlorplatinsyrereaktion:	positiv
Ninhydrinreaktion:	negativ

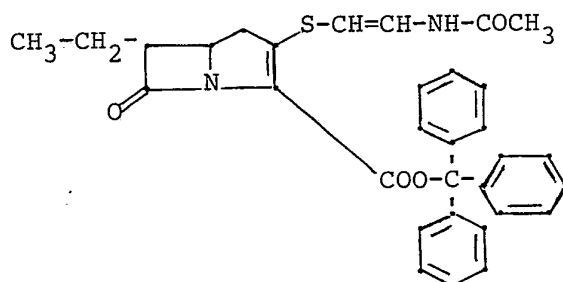
5) Tyndtlagschromatografi (TLC)

Tritylesteren af antibiotiket PS-7 giver nedenstående  $R_f$ -værdier under de anførte betingelser. Positionen af migreringspletten konstateres ved hjælp af bioautografi på *Comamonas terrigena* B-996.

Der anvendes silicageltyndtlagschromatograferingsplader (Merck, kiselgel 60 F<sub>254</sub>), og inden anbringelse af pletten anbringes 2,5 µl acetoneopløsning indeholdende 10% dimethylformamid. Der fås følgende  $R_f$ -værdier:

Opløsningsmiddelsystem: benzen/acetone (2/1):  $R_f = 0,51$   
 benzen/acetone (1/1):  $R_f = 0,67$

Ud fra molekylstrukturen af antibiotiket PS-7 og de ovenfor anførte fysiske-kemiske egenskaber for tritylesteren af antibiotiket PS-7 tillægges tritylesteren af antibiotiket PS-7 følgende struktur:



De biologiske egenskaber for tritylesteren af antibiotiket PS-7 beskrives i det følgende:

### 1) Antimikrobielt spektrum

Den minimale hæmningskoncentration for forbindelsen bestemmes på forskellige patogene mikroorganismer, herunder flere resistente stammer, under anvendelse af substratfortyndingsmetoden med hjerne-hjerteinfusionssubstrat "Eiken" (Eiken Chemical Co., Ltd.).

Tritylesteren af antibiotiket PS-7 opløses i en lille mængde methanol og fortyndes hurtigst muligt i hjerne-hjerteinfusionssubstrat "Eiken" (pH-værdi 7,0) (Eiken Chemical Co., Ltd.), indtil koncentrationen af tritylesteren af antibiotiket PS-7 ligger i området fra 40  $\mu\text{g/ml}$  til 20  $\mu\text{g/ml}$  og koncentrationen af methanol i den færdige opløsning ikke er større end 10%. Denne opløsning fortyndes i en todobbelt geometrisk række. De i tabel X anførte mikroorganismer dyrkes i 18 timer ved 28°C i hjerne-hjerteinfusionssubstrat "Eiken" og inokuleres til ovennævnte rækkefortyndinger i en slutpodekoncentration på  $1 \times 10^5$  celler/ml. Resultaterne aflæses efter inkubering ved 35°C i 20 timer. Den minimale hæmningskoncentration er den laveste koncentration af trityleringsproduktet af antibiotiket PS-7, hvor der ikke konstateres nogen vækst af den pågældende mikroorganisme under de ovenfor beskrevne betingelser. Som kontrolantibiotika fremstilles opløsninger af ampicillin og cephaloridin i hjerne-hjerteinfusionssubstrat "Eiken" (pH-værdi 7,0) i en koncentration på 100  $\mu\text{g/ml}$ , og opløsningerne behandles på samme måde som opløsningerne af forsøgsforbindelsen. I den efterfølgende tabel X er anført de minimale hæmningskoncentrationer for tritylesteren af antibiotiket PS-7 sammen med de minimale hæmningskoncentrationer for cephaloridin som kontrolantibiotikum.

Tabel X

Mikroorganisme	Minimal hæmningskoncentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Trityl-PS-7	Cephaloridin
<u>Staphylococcus aureus</u> FDA-209P	0,16	0,04
<u>Diplococcus pneumoniae</u> Type III**	0,16	0,01
<u>Streptococcus pyogenes</u> NY-5**	0,16	0,01
<u>Alcaligenes faecalis</u> B-326	1,34	3,13
<u>Klebsiella pneumoniae</u> K-2*	10,0	20,0
<u>Citrobacter freundii</u> E-9*	6,25	>100
<u>Proteus vulgaris</u> P-5*	25,0	>100
<u>Enterobacter cloacae</u> E-16*	25,0	>100

Note: \*  $\beta$ -lactamaseproducerende organisme

\*\*substratet er tilsat 10% hesteblod

Det fremgår klart af de i den ovenstående tabel anførte data, at tritylesteren af antibiotiket PS-7 har bredspektret antimikrobiel virkning og især kraftig antibiotisk virkning på forskellige  $\beta$ -lactamresistente ( $\beta$ -lactamaseproducerende) mikroorganismestammer.

### 2) In vivo-virkning

In vivo-virkningen af trityleringsproduktet af antibiotiket PS-7 bestemmes på mus, som intraperitonealt inficeres med  $5 \times 10^5$  celler pr. mus af *Staphylococcus aureus* Smith. Trityleringsproduktet af antibiotiket PS-7 injiceres subcutant straks efter inficeringen. Med hammus DDY (SHIZUOKA) fås en 50% kurativ dosis på 4,5 mg/kg.

### 3) Toksicitet

Ved intraperitoneal indgift af 500 mg/kg af tritylesteren af antibiotiket PS-7 konstateres ingen akut toksicitet på hammus DDY (SHIZUOKA).

### Eksempel 12

#### Methylesteren af antibiotiket PS-6

2,0 mg lyofiliseret antibiotikum PS-6-natriumsalt fremstillet ifølge eksempel 9 suspenderes i 1 ml tør dimethylformamid (DMF), og der tilsættes 20  $\mu$ l triethylamin og 50  $\mu$ l methyliodid. Efter omrøring af blandingen i 2 timer ved stuetemperatur udtages 20  $\mu$ l blanding, som opløses i methanol, og methanolopløsningen undersøges på et Hitachi spektrofotometer model EPS-3T (Hitachi Ltd.) til bestemmelse af forøgelsen af absorbansen ved 315 nm med henblik på at følge reaktionens forløb. Når dette er sket, sættes hele reaktionsblandingen til 20 ml benzen, og der vaskes straks med to gange 10 ml 0,1 M phosphatpufferopløsning (pH-værdi 7,0). Benzenopløsningen tørres over vandfri natriumsulfat og koncentrerer til 1 ml ved 35°C under formindsket tryk. Den koncentrerede opløsning sættes til en søjle (1,2 x 85 cm) med "Bio-Beads" S-X3 (Bio-Rad Laboratories), og søjlen fremkaldes med benzen. Eluatet underkastes tyndtlagschromatografi (kiselgel 60 F<sub>254</sub>, benzen/acetone (1/1)), og eluatfraktionerne, som ved UV-absorption viser sig at indeholde methylesteren af antibiotiket PS-6, hældes sammen. Fraktionerne koncentrerer til tørhed under formindsket tryk, hvorved fås en olieagtig remanens, der opløses i 1 ml acetone. Acetoneopløsningen sættes til en søjle (1,2 x 85 cm) med "Sephadex" LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals AB), der forinden er blevet fyldt med acetone, og der fremkal-

des med acetone. Efter identificering af fraktionerne indeholdende methylesteren af antibiotiket PS-6 som beskrevet ovenfor sammenhældes disse fraktioner. De sammenblandede fraktioner koncentrerer til tørhed hvorved der fås 1,0 mg af methylesteren af antibiotiket PS-6 i form af et hvidt olieagtigt produkt.

(1) Tyndtlagschromatografi

$$R_f = 0,45 \text{ (Kiselgel 60 F}_{254}\text{, benzen:acetone = 1:1)}$$

(2) Ultraviolet absorptionsmaksimum i methanol

$$316,6 \text{ nm}$$

(3) Molekylvægt (højopløsningsmassespektrometri)

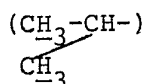
$$\text{fundet: } 326.128683$$

$$\text{beregnet for } C_{15}H_{22}N_2O_4S: 326.130000$$

(4) Protonkernemagnetisk resonansspektrum

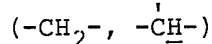
Fig. 8 på tegningen viser 100 MHz proton NMR spektret for methylesteren af antibiotiket PS-6 (opløsning af 2 mg af methylesteren i 0,5 ml deuteriochloroform) målt på et JEOL NMR spektrometer JNM PS-100 (Japan Electron Optics Laboratory CO., Ltd.). Der opnås følgende karakteristiske signaler:

(i) triplet\* som er centreret omkring 1,06 ppm



(ii) skarp singlet omkring 2,0 ppm ( $\text{CH}_3\text{-CO-}$ )

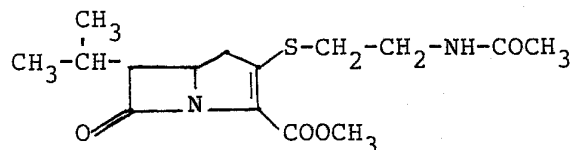
(iii) multiplet i området 2,6-3,6 ppm



(iv) skarp singlet omkring 3,83 ppm ( $\text{-COCH}_3$ )

\* et par dubletter, som overlapper hinanden under dannelse af en tilsyneladende triplet med 6 protoner.

På baggrund af den tidligere anførte struktur for antibiotiket PS-6 og de ovenfor anførte fysisk-kemiske data, tillægges methylesteren af antibiotiket PS-6 følgende molekylstruktur:



Eksempel 13Methylesteren af antibiotiket PS-7

2,0 mg af det lyofiliserede antibiotikum PS-7-natrium-salt fremstillet ifølge eksempel 9 suspenderes i 1 ml tør dimethylformamid (DMF), og der tilsættes 20 µl triethylamin og 50 µl methyliodid. Efter omrøring af blandingen i 2 timer ved stuetemperatur udtages ca. 20 µl blanding, som opløses i methanol og analyseres under anvendelse af et Hitachi spektrofotometer model EPS-3T (Hitachi Ltd.) til bestemmelse af forøgelsen af absorbansen ved 32,15 nm for at følge reaktionens forløb. Når reaktionen er løbet til ende, hældes hele reaktionsblandingen i 20 ml benzen, og der vaskes straks med to gange 10 ml 0,1 M phosphatpufferopløsning (pH-værdi 7,0). Benzenopløsningen tørres over vandfri natriumsulfat og koncentrerer til 1 ml ved 35°C under formindsket tryk. Den koncentrerede opløsning sættes til en søjle (1,2 x 85 cm) med "Bio-Beads" S-X3 (Bio-RAD Laboratories) og fremkaldes med benzen. Eluatet underkastes tyndtlagschromatografering (kiselgel 60 F<sub>254</sub>, benzen/acetone (2/1)), og efter identificering af fraktionerne indeholdende methylesteren af antibiotiket PS-7 med UV-absorption opsamles disse fraktioner. Fraktionerne koncentrerer til tørhed under formindsket tryk, hvorved fås en farveløs olieagtig forbindelse, der opløses i 1 ml acetone. Acetoneopløsningen sættes til en søjle (1,2 x 85 cm) med "Sephadex" LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals AB) der forinden er blevet fyldt med acetone, og der fremkaldes med acetone. Efter identificering af fraktionerne indeholdende methylesteren af antibiotiket PS-7 som beskrevet ovenfor opsamles disse fraktioner. De opsamlede fraktioner koncentrerer til tørhed, og fås ca. 1,0 mg af methylesteren af antibiotiket PS-7 i form af et hvidt olieagtigt stof.

## (1) Tyndtlagschromatografi

$$R_f = 0,44 \text{ (kiselgel 60 F}_{254} \text{ plade, benzen:acetone = 2/1)}$$

$$R_f = 0,07 \text{ (kiselgel 60 F}_{254} \text{ plade, chloroform:methanol = 99:1)}$$

## (2) UV-absorptionsmaksimum i methanol

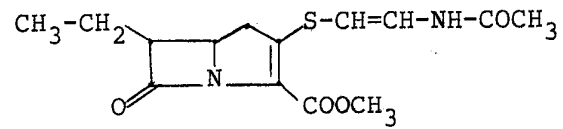
$$230,5 \text{ nm og } 321,5 \text{ nm}$$

## (3) Molekylvægt (højopløsningsmassespektrometri)

$$\text{fundet } 310.37443$$

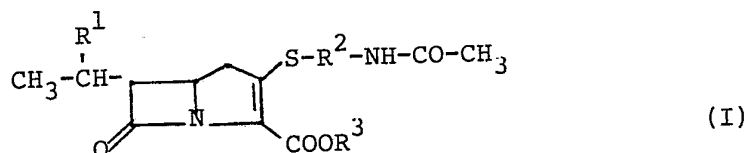
$$\text{beregnet for } C_{14}H_{18}N_2O_4S: 310.375760$$

Ud fra den tidligere anførte struktur af antibiotiket PS-7 og de ovenfor anførte fysisk-kemiske data tillægges methylesteren af antibiotiket PS-7 følgende molekylstruktur:



P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde til fremstilling af antibiotiske stoffer kaldet PS-6 og PS-7 eller salte eller estere deraf med formlen



hvor  $R^1$  betyder  $CH_3$ , og  $R^2$  betyder  $-CH_2-CH_2-$ , eller  $R^1$  betyder H, og  $R^2$  betyder  $-CH=CH-$ , og  $R^3$  betyder hydrogen, en saltdannende kation, alkyl med 1-6 carbonatomer eller triphenylmethyl, k e n d e t e g n e t ved, at en stamme af arten Streptomyces sp. A271 dyrkes i et næringssubstrat, hvorpå de dannede antibiotika isoleres fra det dyrkede materiale, og, om ønsket, en således vundet forbindelse med formlen (I), hvori  $R^3$  betyder hydrogen, omdannes til et salt deraf, eller en vundet forbindelse med formlen (I), hvori  $R^3$  betyder hydrogen eller en saltdannende kation, esterificeres til dannelse af en forbindelse med formlen (I), hvor  $R^3$  betyder alkyl med 1-6 carbonatomer eller triphenylmethyl.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at mikroorganismestammen er Streptomyces A271 (ATCC 31.358, FERM-P nr. 3984).

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at dyrkningen gennemføres ved en temperatur mellem 20 og 40°C ved en pH-værdi mellem 4 og 9.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1 til fremstilling af en forbindelse med formlen (I), hvori  $R^1$  betyder  $CH_3$  og  $R^2$  betyder  $-CH_2-CH_2-$ , k e n d e t e g n e t ved, at dyrkningssubstratet tilsættes et additiv valgt blandt aminosyrer og organiske syrer.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at aminosyrerne er naturlige aminosyrer med 2-10 carbonatomer.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at aminosyren er valgt blandt valin og leucin.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at de organiske syrer er aliphatiske carboxylsyrer med 2-10 carbonatomer.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at den organiske syre er n-valerianesyre.

Fremdragne publikationer:

DK ans. nr. 1436/78 (PL § 2,2,3), (patent 144098).

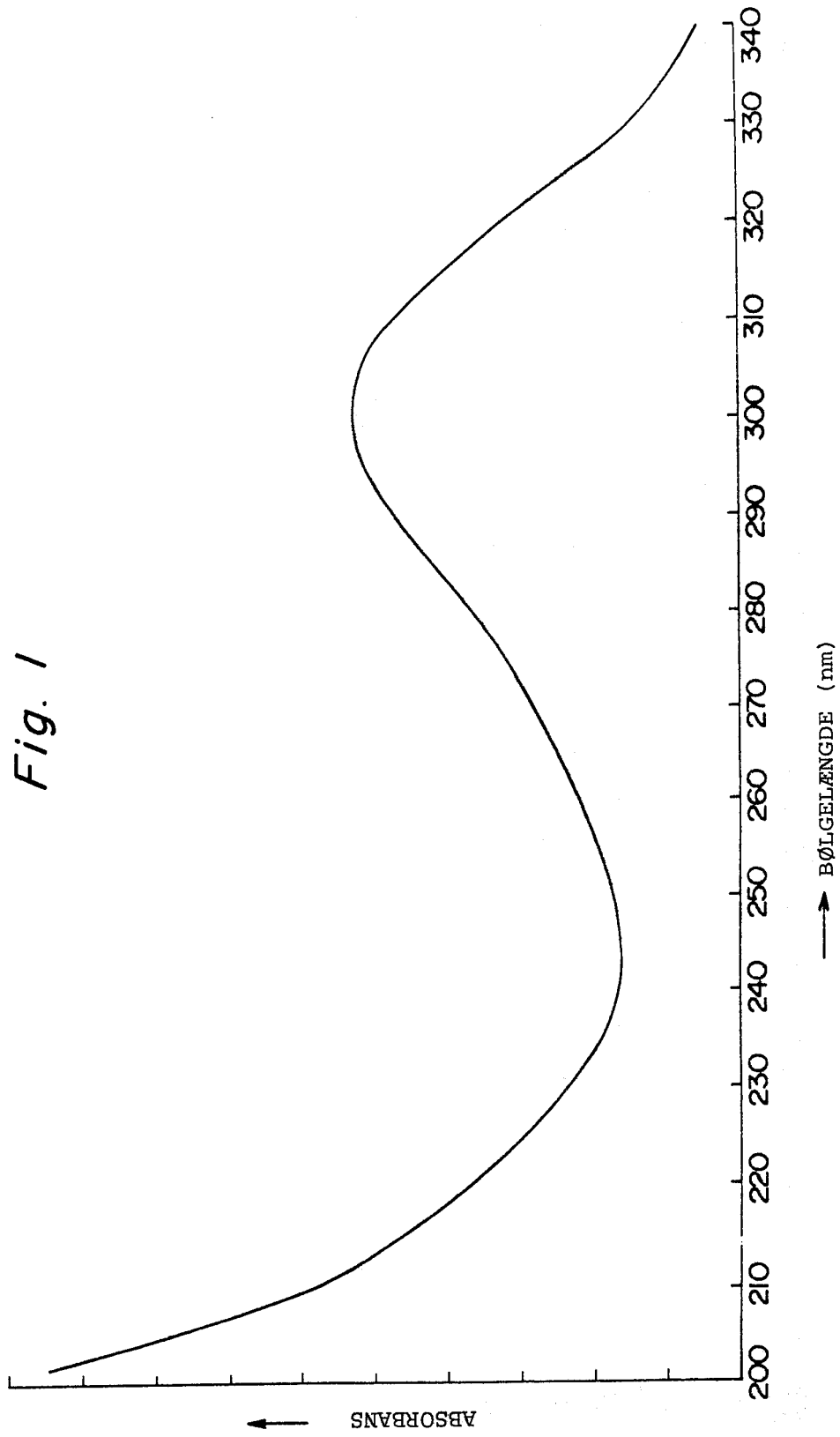
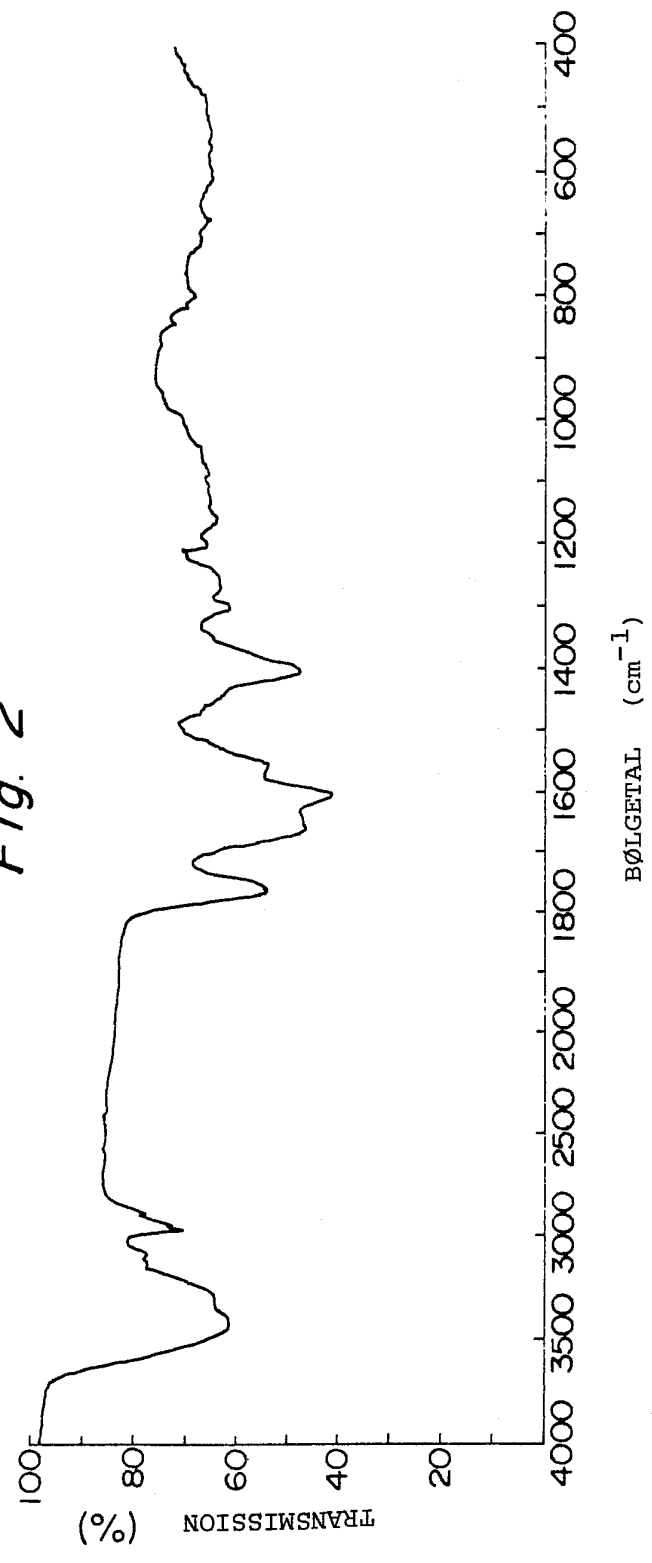
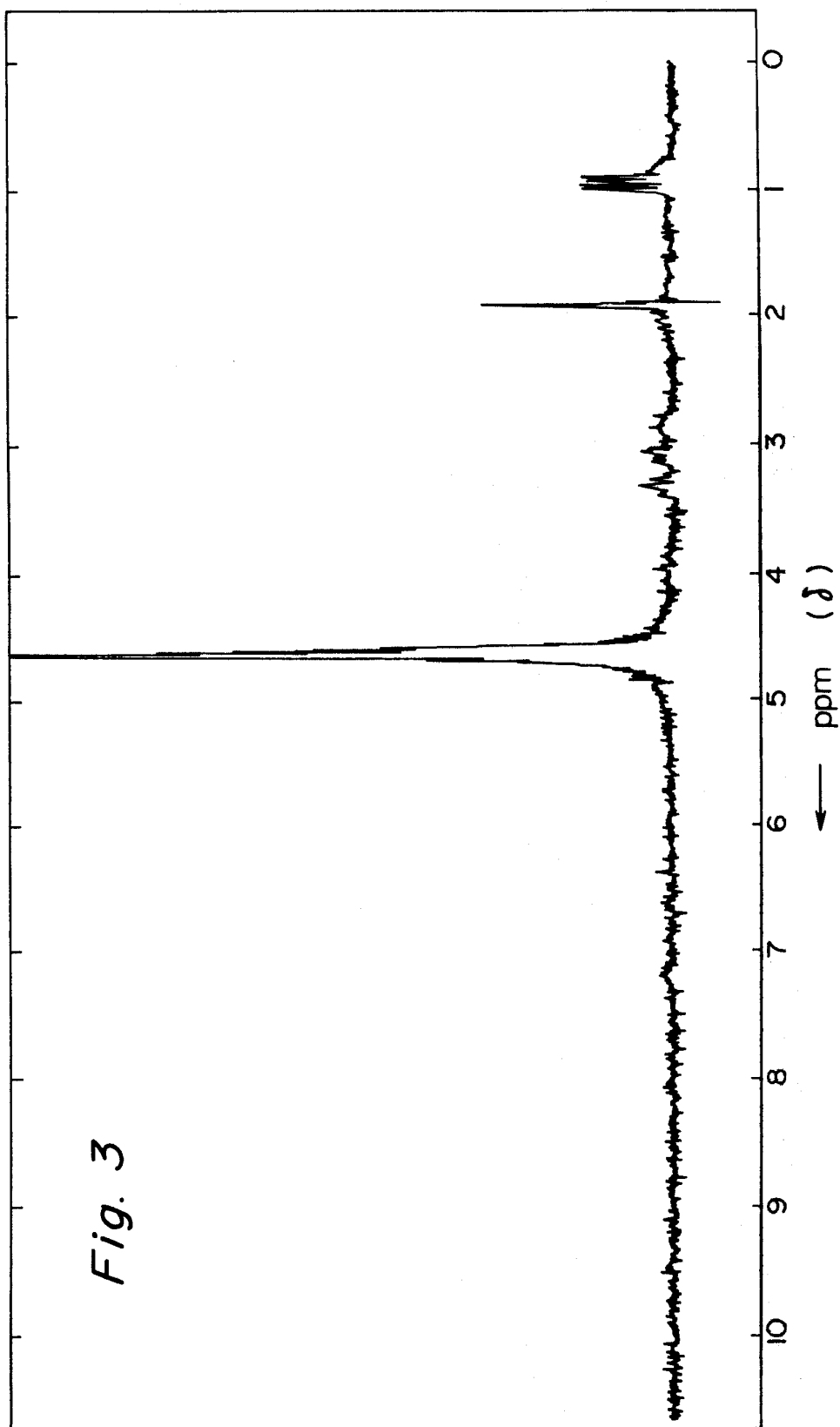


Fig. 2





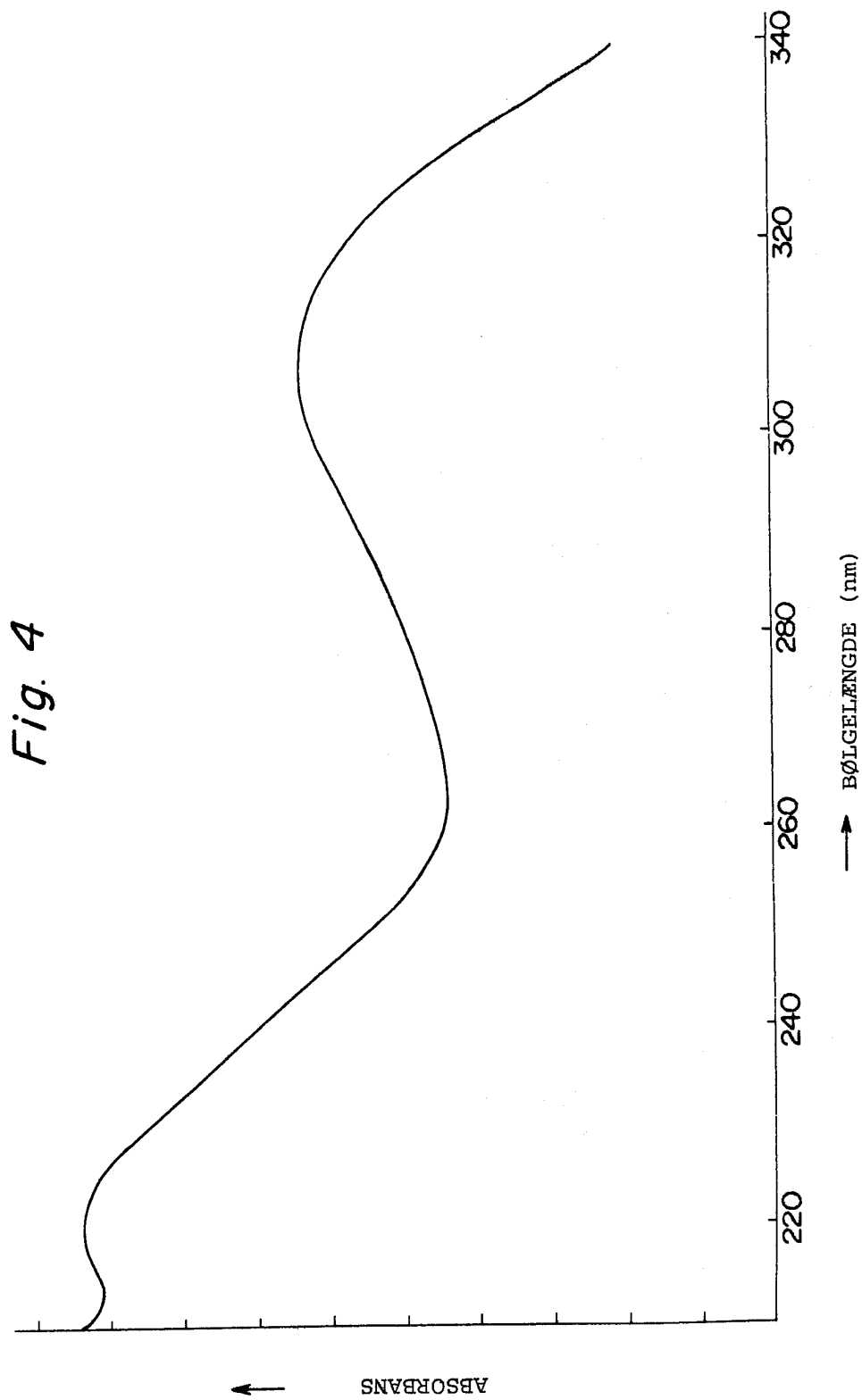


Fig. 5

