

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 148748 B



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: 2509/81

(22) Indleveringsdag: 09 jun 1981

(24) Løbedag: 13 okt 1980

(41) Alm. tilgængelig: 09 jun 1981

(44) Fremlagt: 16 sep 1985

(86) International ansøgning nr.: PCT/GB80/00164

(86) International indleveringsdag: 13 okt 1980

(85) Videreførelsesdag: 09 jun 1981

(30) Prioritet: 12 okt 1979 GB 7935534

(51) Int.Cl.⁴: C 12 P 1/04
C 12 N 1/20
C 07 K 15/04

(71) Ansøger: *BOEHRINGER INGELHEIM GMBH; Ingelheim am Rhein, DE, WILLIAM JAMES *CUNLIFFE;

Bramhope, GB, ELIZABETH ANNE *EADY; Leeds, GB, KEITH THOMAS *HOLLAND; Leeds, GB.

(72) Opfinder: William James *Cunliffe; GB, Elizabeth Anne *Eady; GB, Keith Thomas *Holland; GB.

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af antibiotiske polypeptidforbindelser, eller syreadditionssalte deraf, og mikroorganisme til anvendelse ved udførelse af fremgangsmåden

(57) Sammendrag:

Kompositioner omfattende antibiotiske stoffer og fremgangsmåder til behandling med disse.

Hidtil ukendt stamme af *Staphylococcus epidermidis*, der producerer de antibiotiske polypeptider, kompositioner indeholdende nævnte stamme og en fremgangsmåde til kosmetisk eller profylaktisk behandling af menneskehuden med sådanne kompositioner.

2509-81

Antibiotisk polypeptidforbindelse, eller additions-salt deraf, med en molekylvægt på højst 10000 og med baktericide og bakteriolytiske aktiviteter over for grampositive bakterier, hvilken forbindelse i dens molekylstruktur omfatter aminosyrederivater med formlerne

$\text{-NH-R}_1\text{-CO-}$, $\text{-NH-R}_2\text{-CO-}$, $\text{-NH-R}_3\text{-CO-}$, $\text{-NH-R}_4\text{-CO-}$, $\text{-NH-R}_5\text{-CO-}$, $\text{-NH-R}_6\text{-CO-}$, $\text{-NH-R}_7\text{-CO-}$ og $\text{-N(R}_8\text{)-CO-}$, hvor henholdsvis

$\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-R}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-R}_3\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-R}_4\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-R}_5\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-R}_6\text{-COOH}$ og $\text{NH}_2\text{-R}_7\text{-COOH}$ repræsenterer isoleucin, phenylalanin, alanin, asparaginsyre, glutaminsyre, lysin og glycin, og $\text{-HN(R}_8\text{)-COOH}$ repræsenterer

prolin.

Fremgangsmåde til fremstilling af antibiotiske polypeptider ved aerob dyrkning af en stamme af *S.-epidermidis*.

DN 140/40 D

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af antibiotiske polypeptidforbindelser eller syreadditionssalte deraf, med baktericide og bakteriolytiske aktiviteter over for grampositive bakterier.

- 5 Endvidere angår opfindelsen en hidtil ukendt mikroorganisme til anvendelse ved udøvelse af nævnte fremgangsmåde.

Staphylococci vides at producere mindst tre klasser af forbindelser med en hæmmende virkning på væksten af
10 bakterier, nemlig bakteriociner, bakteriolytiske enzymer og lavmolekylære antibiotica. Publikationer, der beskriver produktionen af lavmolekylære antibiotica ud fra staphylococci, er følgende:

- HSU, C-Y. og WISEMAN, G.M., Can. J. Microbiol, 17 (1971),
15 side 1223-1226.

LOEB, L.J., MOYER A. og MURRAY, R.G.E., Can. J. Res.,
28E (1950), side 212-216.

- PULVERER, G. og JELJASZEWICZ, J., Proceedings of III
International Symposium on staphylococci and staphylo-
20 cocal infections, side 599-621. Udgivet af J. Jeljaszewicz. Stuttgart: Fischer-Verlag.

- SELWIN, S., MARSH, P.D. og SETHNA, T.N., Chemotherapy.
"Proceedings of the 9th International Congress of Chemo-
therapy", 5 (1975), side 391-396. Udgivet af J.D. Willi-
25 ams og A.M. Geddes. New York.

SU, T.L., Br. J. Exp. Pathol., 29 (1948), side 473-481.

HALBERT, S.P., SWICK, L. og SONN, C., J. Immunol., 70
(1953) side 400-410.

- Ingen af de i ovennævnte publikationer beskrevne
30 lavmolekylære antibiotica har imidlertid vist sig at udvise en bactericid virkning resulterende i lysis af bakteriecellerne.

- I J.Med.Microbiol., 12 (1979), side 71-82, er der beskrevet forsøg, hvori adskillige stammer af for menneskehuden naturlige bakterier omfattende 93 isolater af
35 Propionobacterium acnes og 148 isolater af Micrococcaceae blev undersøgt for deres evne til at hæmme væksten af

forskellige indikatorstammer af *P.acnes* og *Staphylococcus epidermidis*. 53 Stammer blandt de undersøgte viste nogen aktivitet over for mindst én indikatorstamme, og der fandtes både bred- og smal-spektrret hæmning. De stammer, 5 der undersøgtes, kom fra 36 acne-patienter og 8 kontrolpersoner, og hovedformålet med undersøgelserne var at finde ud af, om forekomsten af hæmmende stammer og omvendt forekomsten af sensible stammer hos patienter resulterer i en prædisposition for acne. De særlige stammer 10 af *P.acnes* og *Micrococcaceae*, der blev undersøgt, er ikke identificeret undtagen gennem en intern reference. Endvidere findes ingen beskrivelse af noget forsøg på at udvinde de aktive forbindelser, der var ansvarlige for den observerede hæmning.

15 Den foreliggende opfindelse er baseret på den erkendelse, at en særlig stamme af *Staphylococcus epidermidis*, dvs. *Staphylococcus epidermidis* NCIB 11536 (der i henhold til Budapesttraktaten er deponeret i the National Collection of Industrial Bacteria, Torrey Research Station, 20 P.O. Box 31, 135 Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, 3.oktober 1979) kan dyrkes til produktion af hidtil ukendte lavmolekylære antibiotiske polypeptider, der udviser bredspektrret aktivitet over for grampositive bakterier, og som afviger fra de af *staphylococci* hidtil producerede lavmolekylære antibiotica ved, at de har en baktericid virkning resulterende i lysis af bakteriecellerne.

Opfindelsen angår således som nævnt en fremgangsmåde til fremstilling af antibiotiske polypeptidforbindelser, eller syreadditionssalte deraf, med baktericide 30 og bakteriolytiske aktiviteter over for grampositive bakterier, med en molekylvægt på fra 950 til 10.000 og indeholdende i peptidkæden én prolinrest, to glycinrester og mindst én rest af hver af aminosyrerne isoleucin, phenylalanin, alanin, asparaginsyre, glutaminsyre og lysin, 35 hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at *Staphylococcus epidermidis* NCIB 11536 eller en mutant deraf med væsentligt samme egenskaber dyrkes aerobt i eller på et dyrkningsmedium for nævnte organisme, hvorefter nævnte antibiotiske polypeptidforbindelser udvindes.

Særligt egnet blandt de omhandlede antibiotiske polypeptidforbindelser er et antibioticum med en molekylvægt på ca. 950 og indeholdende i molekylstrukturen deraf én prolinrest, to glycinrester og én rest af hver af
5 de ovennævnte yderligere aminosyrer.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan gennemføres ved anvendelse af et flydende eller fast dyrkningsmedium, der indeholder carbon- og nitrogen-kilder sammen med passende uorganiske salte og andre næringsmidler. Egnede
10 dyrkningsmedier udgøres for eksempel af følgende:

(i) Hjerne-Hjerte-Infusionsagar (BHIA):

Dette er et kommercielt medium markedsført af Difco Laboratories, Central Avenue, West Molesey, Surrey, England, og indeholder infusioner fra kalvehjerner og oksehjerner, proteosepepton (Difco), bacto-dextrose, natriumchlorid og dinatriumphosphat.
15

(ii) Trypticase-Soja-Suppe:

Dette er et kommercielt medium markedsført af Becton Dickinson & Co. Limited, Empire Way, Wembley, Middlesex, England, og indeholdende pancreatinfordøjjet kasein, papainfordøjjet sojabønneemel, natriumchlorid og dinatriumphosphat.
20

(iii) Tryptone L42/Gærekstrakt L21-Medium:

Dette er et medium fremstillet, så det indeholder
25 2 vægt% Tryptone L 42 og 1 vægt% Gærekstrakt L 21, begge bestanddele markedsført af Oxoid Limited, Southwark Bridge Road, London SE1 9HF, England.

(iv) Syntetisk Medium:

Dette er et medium som beskrevet af Griffith, C.J. og Melville, T.H., Arch.Oral.Biol., 19 (1974), side 87-90, med følgende sammensætning:
30

5	Komponent	Koncen- tration mg pr.liter	Komponent	Koncen- tration mg pr.liter
	K_2HPO_4	1.750	Biotin	0,006
	KH_2PO_4	1.750	Nicotinsyre	2,3
	Trinatriumcitrat	500	Thiamin	1,0
10	PIPES	5.000	Pyridoxin HCl	12,0
	(Piperazin-N-N ¹ -bis- (2-ethansulfonsyre))		Calciumpanto- thenat	1,2
			Glucose	0,2% (vægt/ volumen)
15	L-alanin	100	<u>Opløsning af salte:</u>	
	L-arginin	200	$MgSO_4, 7H_2O$	200)
	L-asparagin	100	Fe-citrat	10)
	L-asparaginsyre	200	$MnSO_4, 4H_2O$	10) 5 ml
	L-cystein	100	NaCl	10) pr.
20	L-glutaminsyre	500	$CaCl_2$	10) liter
	Glycin	100	$ZnCl_2$	5)
	L-histidin	100	$CuSO_4$	0,5)
	L-hydroxyprolin	100	$CoNO_3$	5)
	L-isoleucin	100		
25	L-leucin	100	Agar	1,0% (vægt/ volumen)
	L-lysin	100		
	L-methionin	100		
	L-phenylalanin	100		
	L-prolin	100		
30	L-serin	200		
	L-threonin	200		
	L-tryptophan	100		
	L-tyrosin	100		
	L-valin	100		
35	Adenin	10		
	Guanin	10		
	Uracil	10		

Dyrkningstrinnet gennemføres aerobt, hensigtsmæssigt ved en temperatur på 35° til 40°C, fortrinsvis ved ca. 37°C, i ca. 12 til 48 timer, fortrinsvis 24 til 36 timer. Dyrkningsmediets indledende pH-værdi ligger hensigtsmæssigt inden for området fra 4,5 til 7, idet pH-værdier fra 5 til 6,5 foretrækkes.

Efter endt dyrkningstrin udvindes de hidtil ukendte antibiotiske stoffer fra dyrkningsmediet. Fremgangsmåder, der har vist sig anvendelige til gennemførelse af udvin-
dingstrinnet, er følgende:

1. Fryse-tø-ekstraktion:

Dette er en velkendt teknik, beskrevet for eksempel af McGeachie J., Zentralbl. Bakteriol. (Orig A), 196 (1965), side 377-384. Den ekstraherede væske kan derefter
centrifugeres for at fjerne bakterierne. Den således vund-
ne rå fryse-tø-ekstrakt kan, om ønsket til anvendelse ved
prøvning af de antibiotiske stoffer, steriliseres ved fil-
trering gennem et celluloseacetat-membranfilter (poredia-
meter 0,45 µm, Oxoid Ltd.) og lagres ved 4°C indtil brug.
Ikke-steril ekstrakt kan lagres ved -20°C.

2. Inddampning:

pH-Værdien af rå fryse-tø-ekstrakter gøres sur, fortrinsvis til ca. pH 5 og hensigtsmæssigt ved tilsætning af 10N HCl, forud for inddampning, fordi den hæmmende aktivitet af de hidtil ukendte antibiotiske stoffer kun er varmestabil under sure betingelser. Inddampning kan
hensigtsmæssigt ske ved 90°C på en rotationsfordamper (Rotavapor-EL, Buchi, Schweiz) ved reduceret tryk.

3. Ultrafiltrering: Koncentrering eller dialyse kan opnås ved positiv trykfiltrering under anvendelse af en passende filtreringsmembran, f.eks. i en Amicon-model 52 (kapacitet 65 ml), markedsført af Amicon Limited, High Wycombe, Buckinghamshire, England. Fem dobbeltvolumen-udskiftninger af destilleret vand anvendes hensigtsmæssigt til dialyse.

4. Ammoniumsulfatfældning:

Ammoniumsulfat sættes til fryse-tø-ekstrakten til opnåelse af 25-30% mætning. Efter omrøring kan det derved

udfældede protein fjernes, f.eks. ved centrifugering. Det overliggende materiale bringes derefter til 50-60% mætning ved tilsætning af yderligere $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ igen efterfulgt af omrøring og centrifugering. Bundfaldet, der indeholder de antibiotiske stoffer, kan derefter gensuspenderes i et minimalt volumen puffer, f.eks. 0,05M phosphatpuffer, pH 6,0. Ved gennemførelse af dette rensningstrin bliver $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fortrinsvis først tilsat til opnåelse af ca. 30% mætning og derefter tilsat til opnåelse af ca. 50% mætning.

5. Ionbytter-chromatografi:

En prøve, der er delvis rensat ved inddampning eller ammoniumsulfat-fældning, overføres til en Sephadex C25-kationbyttersøjle. Ikke-bundne stoffer elueres med startpuffer, f.eks. 0,05M phosphatpuffer, pH 6,0. Bundne stoffer kan derefter elueres ved en strømningshastighed på 15 ml pr.time under anvendelse af lineært stigende ionstyrkegradient af 0-0,5M (400 ml) NaCl i 0,5M phosphatpuffer, pH 6,0, og der opsamles fraktioner på 5,5 ml.

6. Gelfiltrerings-chromatografi:

En prøve, der er delvis rensat ved inddampning, ammoniumsulfatfældning og/eller ionbytter-chromatografi, overføres til en Sephadex G50-søjle og elueres, f.eks. med 0,05M phosphatpuffer, pH 6,0. Om ønsket kan Sephadex G25 -, Sephadex G15- eller Biogel P2-søjler anvendes i stedet for Sephadex G50-søjlen.

Ved ionbytter- og gelfiltrerings-trinnene ovenfor har det vist sig, at de eluerede omhandlede antibiotiske polypeptider ofte har et betydeligt NaCl-indhold. Dette skyldes den stærkt kationiske natur af og den aromatiske rest i polypeptiderne, der bringer dem til at binde stærkt til gelfiltreringsmedier (hvadenten der er tale om polyacrylamid- eller dextran-geler), således at der til deres frigørelse kræves anvendelse af puffere med høj ionstyrke.

I praksis er der derfor udviklet tre alternative kombinationer af ionbytter- og gelfiltrerings-chromatografier til anvendelse på prøver, der er partielt ren-

set ved inddampning eller ammoniumsulfatfældning:

- (a) opnåelse af en høj titer indeholdende NaCl ved eluering gennem en Biogel P2- eller Sephadex G15-søjle efterfulgt af eluering gennem en Sephadex C25-søjle.
- 5 (b) opnåelse af en lavere titer med lavt NaCl-indhold ved eluering gennem en Sephadex C25-søjle efterfulgt af eluering gennem en Sephadex G10-søjle, og
- (c) kombineret fjernelse af højmolekylært materiale og fjernelse af NaCl ved eluering gennem en Sephadex G-
10 15-søjle efterfulgt af eluering gennem en Sephadex C-25-søjle efterfulgt af eluering gennem en Sephadex G-10-søjle.

Det vil forstås, at de ovenfor beskrevne rensnings-
trin er eksempelvis, og at disse trin kan modificeres
15 eller erstattes med andre rensningstrin som ønsket. For eksempel er det muligt at erstatte ammoniumsulfatfældningstrinnet med et lignende trin, der gør brug af andre fældningsmidler, såsom ethanol eller acetone.

Udvindingstrinnet indebærer fortrinsvis fryse-tø-
20 ekstraktion, ammoniumsulfatfældning, ionbytter-chromatografi og gelfiltrerings-chromatografi.

Som et alternativ til fryse-tø-ekstraktion indebærer endnu et foretrukket udvindingstrin centrifugering af det inkuberede medium ved ca. 3000 g i ca. 30 minutter
25 for at fjerne cellemateriale, hvorefter den overliggende væske underkastes ammoniumsulfatfældningen og påfølgende trin som beskrevet for fryse-tø-ekstrakten. Dette er særligt velegnet, når inkubation er foretaget i hjerne-hjer-te-infusionssuppe.

30 Det er påvist, at der ved ionbytter-chromatografi eller gelfiltrerings-chromatografi sker en separation fra et mere høj-molekylært antibiotisk stof. Således er der for eksempel efter ammoniumsulfatfældning efterfulgt af gelfiltrerings-chromatografi som ovenfor beskrevet fundet to spidser for
35 hæmningsaktivitet over for udvalgte indikatorstammer af *S.epidermidis* (kodenummer MF87) og *S.cohnii* (kodenummer MF121). En kvantitativ bestemmelse af hæmningsaktivitet er foretaget ved en modifikation af metoden ifølge Dajani

- og Wannamaker, J. Bacteriol., 97 (1969), side 985-991. To-fold-rækkefortyndinger af præparatet af antibiotiske stoffer blev lavet i enten hjerne-hjerte-infusion (rå præparater vundet ved fryse-tø-ekstraktion) eller 0,05M phosphatpuffer, pH 6,0 (søjlefraktioner) under anvendelse af volumener på 0,5 ml. Et volumen på 0,02 ml af hver fortynding blev anbragt pletvis på overfladen af en tilsæt plade af hver indikatororganisme og henstillet til tørring. Plader blev inkuberet aerobt i 6-7 timer ved 37°C.
- 10 Den fortynding, der frembragte en tydelig reduktion af indikatorstammens væksthæthed, blev betragtet som slutpunktet og blev betragtet som indeholdende 1 enhed hæmningsaktivitet pr. ml. Fig. 1 på tegningerne illustrerer de resultater, der er opnået på søjlefraktioner vundet
- 15 ved gelfiltrerings-chromatografi, og det fremgår, at der er en mindre spids, der eluerede i udtømningsvolumenet, og en større spids, der blev tilbageholdt af gelen. De i Fig. 1 illustrerede resultater er for ammoniumsulfatfældet inhibitor elueret gennem Sephadex G50 under anvendelse af en 0,05M phosphatpuffer ved pH 6,0. Den totale
- 20 udvinding af aktivitet fra søjlen var 84,3%. Det er påvist, at den mindre spids tilvejebringes af stof med relativt høj molekylvægt (muligvis større end 30.000), og at den større spids tilvejebringes af stof med relativ
- 25 lav molekylvægt (mindre end 10.000). Der var en 20-fold forøgelse i den specifikke aktivitet af de lavmolekylære antibiotiske stoffer, de antibiotiske polypeptider, (fra 2,06 til 40 enheder pr. mg protein over for MF121), men ikke for antibiotisk stof med højere molekylvægt, som
- 30 vist i nedenstående Tabel I.

Tabel I

	Fraktion	Totale aktivi- tetsen- heder over for MF121	Totalt protein mg	Speci- fik ak- tivitet enheder pr. mg protein	Totalt udbytte, %
5	Rå fryse-tø-ekstrakt	5120	2480	2,06	
	Ammoniumsulfatfældning	1280	96	13,3	25,0
10	Relativt højmolekylært antibiotisk stof (samlet)	45	46	0,98	0,88
	Relativt lavmolekylært antibiotisk stof (samlet)	1040	26	40	20,3

- 15 Virkningsmåden for de omhandlede lavmolekylære antibiotiske stoffer over for *S.epidermidis* (MF87) er undersøgt i vækstmedium (BHI) og ikke-vækst-medium (phosphatpuffer) for at bestemme, om denne virkningsmåde er
- 20 bakteriostatisk, baktericid eller bakteriolytisk. Til bestemmelse af virkningsmåden blev *Staphylococcus epidermidis* (MF87) dyrket natten over ved 37°C og anvendt som substrat ved en indledende koncentration på 10^8 celler pr.ml BHI eller 0,5M phosphatpuffer, pH 6,0. Inaktiv in-
- 25 hibitor anvendtes som kontrol og vandtes ved autoklaving ved 121°C i 0,25 time ved pH 9,0. pH-Værdien blev forud for anvendelse genindstillet på 6,0. Aktivt stof vandtes enten ved Sephadex G50-chromatografi af et inddampet kon-
- 30 centrat (til undersøgelser i vækstmedium) eller ved ionbytter-chromatografi af lavmolekylært stof på Sephadex C-25 (til undersøgelser i ikke-vækst-medium). Ens volumener af celler og antibiotisk stof (eller autoklaveret antibi-
- 35 otisk stof) blev blandet ved T_0 , og portioner af hver blanding blev inkuberet ved 37°C i kuvetter holdt i et automateret dobbeltstråle-spektrofotometer (SP1800, Pye Unicam) indstillet på 600 nm-aflæsning ved intervaller på 0,08 time. Resten af hver blanding (også inkuberet ved

37°C) anvendtes til registrering af levedygtighedstal. Bakteriernes udseende under mikroskop bestemtes hver time ved Gram-farvning.

Fig. 2 på tegningerne viser ændringerne i levedygtighedstal og optisk tæthed for en suspension af celler af *S.epidermidis* (MF87) i vækstmedium i nærværelse og fraværelse af de antibiotiske stoffer. Ved fravær af de antibiotiske stoffer voksede organismerne og nåede den stationære fase efter 5,25 timers inkubation. I nærværelse af de antibiotiske stoffer begyndte levedygtighedstallet imidlertid at falde straks og var reduceret til 10% af dets oprindelige niveau efter 0,17 time, uden nogen reduktion af optisk tæthed. Kort tid senere begyndte den optiske tæthed at falde, og efter 6 timers inkubation havde den nået næsten nul. På dette tidspunkt var levedygtighedstallet 10 organismer pr.ml. Gram-farvede film af kontrolkulturen viste til alle tider intakte grampositive cocci. Kulturen indeholdende de antibiotiske stoffer begyndte at undergå lysis efter 0,17 time (gramnegative celler, morfologi utydelig, gramnegativt materiale uden for celler), og graden af lysis steg med forlænget inkubation. Efter 4 timers inkubation var der kun få intakte celler tilbage.

I ikke-vækst-medium blev der opnået lignende resultater, selvom effekten af inhibitoren var reduceret, således at levedygtighedstallet faldt til 10% af dets indledende niveau efter 0,5 time (sammenlignet med 0,17 time i vækstmedium).

Der er observeret de følgende egenskaber for de antibiotiske stoffer fremstillet ved dyrkningsprocessen ifølge opfindelsen og for de rå præparater, ud fra hvilke de udvindes:

1. Protease-sensibilitet.

De ionbyttede lavmolekylære antibiotiske stoffer (indeholdende 1,75 mg pr.ml protein) var sensib~~le~~^{ile} over for trypsin (2,5 mg pr.ml), men resistente over for thermolysin (160 µg pr.ml), subtilisin (650 µg pr.ml) og pronase (1,5 mg pr.ml). Aktivitet målt ved pH 6,0 i 0,05M phosphatpuffer. Inkubation foregik ved 37°C i 3 timer.

2. Hæmnings-spektre for det rå præparat (dvs. fryse-tø-ekstrakt) og for de separerede lavmolekylære antibiotiske stoffer.

Tabel II nedenfor viser hæmnings-spektrene for den rå fryse-tø-ekstrakt og for de lavmolekylære antibiotiske stoffer. Disse blev frasepareret ved gelfiltrering af et ammoniumsulfatbundfald på Sephadex G50.

Tabel II

Aktivitetsspektre for forskellige inhibitorpræparater.

Organisme	For-søgs-medium	Følsomhed over for	
		Lavmolekylære antibiotiske stoffer	Råt præparat (fryse-tø-ekstrakt)
<u>S.aureus</u> (3 stammer)	6BHIA	+	+
25 <u>S.epidermidis</u>	"	+	+
<u>S.cohnii</u> (MF121)	"	+	+
<u>M.luteus</u>	6BHIA	+	+
<u>M.roseus</u>	"	+	+
30 <u>P.acnes</u>	6BHIA	±	±
<u>P.avidum</u>	"	+	+
<u>P.granulosum</u>	"	±	±
<u>S.pyogenes</u>	6BHIA	+	+
<u>S.faecalis</u>	"	-	-
35 <u>S.zymogenes</u>	"	+	+
<u>S.viridans</u>	"	+	+

(fortsættes)

	Organisme	For- søgs- medium	12 Følsomhed over for	
			Lavmole- kylære antibi- otiske stoffer	Råt præ- parat (fryse-tø- ekstrakt)
5	<u>A.viridans</u>	6BHIA	+	+
	<u>B.cereus</u>	6BHIA	-	-
	<u>B.megaterium</u>	"	+	+
10	<u>B.laterosporus</u>	"	-	±
	<u>B.sphaericus</u>	"	+	+
	<u>C.diphtheriae gravis</u>	6BHIA	+	+
	<u>C.xerosis</u>	"	+	+
	<u>C.hofmannii</u>	"	+	+
15	<u>L.monocytogenes</u>	6BHIA	+	+
	<u>C.sporogenes</u>	FBA	-	-
	<u>C.bifermentans</u>	"	+	+
	<u>C.perfringens</u>	"	+	+
	<u>Arthrobacter oxydans</u>	6BHIA	+	+
20	<u>Cellulomonas subalbus</u>	"	+	+
	<u>P.ovale</u>	Pepton Oksegalde	-	-
	<u>N.meningitidis</u>	HBA	-	-
	<u>N.gonorrhoeae</u>	"	-	-
	<u>N.pharyngis</u>	"	-	-
25	<u>H.Influenzae</u>	"	-	-
	<u>Chromobacterium violaceum</u>	6BHIA	-	-
	<u>E.coli (2)</u>	6BHIA	-	-
	<u>P.vulgaris</u>	"	-	-
	<u>P.morganii</u>	"	-	-
30	<u>S.typhimurium</u>	"	-	-
	<u>K.aerogenes</u>	"	-	-
	<u>K.pneumoniae</u>	"	-	-
	<u>A.faecalis</u>	"	-	-
	<u>S.marcescens</u>	"	-	-
35	HBA = opvarmet blodagar FBA = frisk blodagar 6BHIA = Hjerne-Hjerte-Infusionsagar, pH 6,0			

- + = zone med total hæmning i dråbeområde.
 ± = zone med partiel hæmning (reduceret vækst).
 - = ingen hæmning.

- 5 Aktivitet var begrænset til hæmning af grampositive organismer. Spektret for de lavmolekylære antibiotiske stoffer var identisk med spektret for det rå præparat.

10

3. Andre egenskaber af det rå præparat.
 (dvs. fryse-tø-ekstrakt).

Virkningerne af forskellige behandlinger på aktiviteten af rå fryse-tø-ekstrakter af det eller de antibiotiske stoffer er vist i nedenstående Tabel III.

Tabel III

Virkningerne af forskellige behandlinger på aktiviteten af rå fryse-tø-ekstrakt

<u>Behandling</u>	<u>Indledende^{x)}</u> <u>titer</u>	<u>Endelig^{x)}</u> <u>titer</u>	<u>%</u> <u>Resterende</u>
1. Opvarmning:			
37°C/16 timer	8	8	100
100°C/4 timer	8	8	100
121°C/15 min./pH 5	6	6	100
121°C/15 min./pH 9	6	0	0
2. pH (2 uger/4°C)			
pH 2	8	8	100
pH 7	8	6	75
pH 11	8	0	0
3. Inddampning			
90°C, reduceret tryk	800	640	80
4. Amicon-dialyse (PM30) ^{y)}	8	2	25
5. Adsorption:			
10 ¹¹ celler af <u>S.epidermidis</u> pr. ml inhibitor, 5 min./37°C	12	3	25

x) Titer er udtrykt som enheder pr.ml over for MF87 (undtagen i tilfælde af inddampning, hvor titeren er totale enheder over for MF87).

y) Tilbageholder molekyler > 30.000 mol.vægt.

5 Det har vist sig, at aktiviteten er yderst termostabil ved sure pH-værdier, således at koncentrerede præparater kunne vindes ved inddampning af fryse-tø-ekstrakterne ved pH 5,0. Hæmnings-aktiviteten var stabil ved 4°C, hvis pH var sur, og blev adsorberet på de sensibile
10 celler af S.epidermidis ved 37°C. Aktiviteten blev fældet med ammoniumsulfat (0-50% mætning). Under fremstilling på BHI-agar passerende hæmningsaktiviteten gennem en dialysemembran (tilbageholdelsesgrænse ved molekylvægt på 14.000) anbragt på overfladen af agaren mellem frembringerkulturen og vækstmediet for indikatorstammen. Aktiviteten af
15 rå præparater kunne imidlertid ikke fjernes totalt ved dialyse mod destilleret vand. Ultrafiltrerings-membraner med molekylvægtgrænser ved 10.000 og 30.000 tilbageholdt fra 18,25 til 25% af hæmningsaktiviteten. Mindst 99% af
20 molekyler, der kan passere gennem membranen, skulle fjernes ved denne metode. Disse resultater viser tilstedeværelsen af lavmolekylære og højmolekylære stoffer.

25 4. Aktivitet af antibiotiske stoffer over for S.epidermidis NCIB 11536.

Der er ikke observeret nogen aktivitet for de lavmolekylære antibiotiske stoffer.

30 5. Aminosyre-analyse af lavmolekylære antibiotiske stoffer.

Aminosyre-analyse viser, at de lavmolekylære antibiotiske stoffer er polypeptider afledt af isoleucin, phenylalanin, alanin, asparaginsyre, glutaminsyre, lysin, glycin og prolin. Der er navnlig påvist en aminosyresammensætning af én enhed afledt af hver af isoleucin, phenylalanin, alanin, asparaginsyre, glutaminsyre, lysin og
35 prolin og to enheder afledt af glycin. I de allerede kendte polypeptid-antibiotica er der ikke påvist tilstedeværelse af isoleucin og phenylalanin. Hsu, C-Y og Wise-

man, G.M. i Can. J. Microbiol. 18 (1972) 121-125, har i-
midlertid rapporteret epidermidiner, hvori der foreligger
alanin, asparaginsyre, glutaminsyre, glycin, lysin og
prolin, men det skal bemærkes, at virkningsmåden for dis-
5 se epidermidiner er bakteriostatisk snarere end bakteri-
cid og bakteriolytisk.

6. Virkningsmåde for de antibiotiske stoffer.

Det rå præparat (dvs. fryse-tø-ekstrakten) udviser
en baktericid virkning resulterende i lysis af cellerne.
10 Det er observeret, at den lysis, der skyldes, at S.epi-
dermidis-celler udsættes for de lavmolekylære antibioti-
ske stoffer, ikke var en primær effekt af adsorption af de
antibiotiske stoffer, da over 90% af cellerne var blevet
dræbt, førend lysis begyndte. Aktiviteten foreligger også
15 på ikke-vækst-medier.

På grund af deres baktericide virkning og deres bre-
de aktivitetsspektrum over for grampositive bakterier er
de omhandlede lavmolekylære antibiotiske stoffer potenti-
elt anvendelige ved forebyggelse og behandling af grampositive
20 bakterieinfektioner, navnlig sådanne infektioner af hu-
den. De lavmolekylære antibiotiske stoffer er af særlig in-
teresse derved, at de er potentielt anvendelige ved fore-
byggelse og behandling af sådanne hudinfektioner som inficeret eksem,
impetigo, bylder, cellulitis og navnlig acne, idet stoffer-
25 nes aktivitet over for et stort antal indikatorstammer
af P.acnes er påvist. Det menes, at de lavmolekylære an-
tibiotiske stoffer, da de produceres af en på huden normalt
foreliggende organisme, sandsynligvis vil have større
stabilitet og aktivitet på huden end hidtil anvendte an-
30 tibiotica.

De omhandlede antibiotiske polypeptidforbindelser
kan indgå i farmaceutiske kompositioner sammen med et
farmaceutisk bærestof eller excipiens,

De farmaceutiske kompositioner kan for eksempel
35 foreligge i en form egnet til oral, parenteral, enteral
eller lokal anvendelse. Præparater til lokal anvendelse
foretrækkes, og sådanne præparater kan for eksempel fore-
ligge i form af opløsninger, emulsioner, geler, lotioner,

salver, cremer eller pulvere. Sædvanlige farmaceutiske bærere og excipienser såvel som de sædvanlige fremstillingsmetoder kan anvendes ved fremstillingen af farmaceutiske præparater.

- 5 Opfindelsen angår som nævnt også en mikroorganisme til anvendelse ved udøvelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen og ejendommelig ved, at mikroorganismen er *Staphylococcus epidermidis* NCIB 11536 i biologisk ren form.
- 10 Stammen *S.epidermidis* NCIB 11536 er isoleret fra et voksent menneskes ansigtshud og blev identificeret efter skemaet ifølge Kloos, W.E. og Schleifer, K.H., J.Clin. Microbiol., 1 (1975), side 82-88. Karakteristika for denne stamme er følgende:.
- 15 Historie:
Oprindelig beskrivelse af farver: grå-hvid, proteolytisk (på chokoladeagar).
Dato for isolering: Maj 1976.
Kilde: Overflade af ansigtshud, han-kaukasier, sund hud
- 20 (ingen acne vulgaris eller tegn på anden hudsygdom), alder 25 år.
Lagring: I 40 volumen% glycerol/phosphat-pufret saltopløsning (PBS).
Vækstbetingelser: Flydende kultur - Hjerne-Hjerte-Infusion, inkubation natten over, 37°C aerobt.
- 25 Inokulum: 0,1 ml fra glycerol/PBS-lagerkultur.
(Bem.: langtidslagring - frysetørrede kulturer og kulturer holdt i flydende nitrogen.)

Karakteristika:

	<u>Prøve</u>	<u>Reaktion</u>
	Coagulase	-
	Phosphatase	+
5	Nitratreduktion	+
	Novobiocin-sensibilitet	sensibil over for 5µg-plade
	Syre, aerobt fra:	
	glucose	+
10	mannitol	-
	trehalose	-
	sucrose	+
	lactose	+
	xylose	-
15	arabinose	-
	maltose	+
	fructose	+
	ribose	-
	Protease	+
20	Lipase - triolein	+ (kun pladeprøve)
	tributyrin	+ (" ")
	Hyaluronidase	-
	Hæmolyse (heste- eller menneskeblod) +	(kun pladeprøve)
	Produktion af acetoin	+
25	DNase	+

Ernæring (aerob vækst):

1. Vitaminbehov: nicotinsyre
thiamin
- 30 biotin (kan erstattes med oliesyre).
2. Aminosyrebehov: ikke fuldt ud bestemt, men vil vokse på syntetisk medium indeholdende 7 aminosyrer.
3. Kræver ikke guanin, uracil eller adenin for vækst.

Antibiotiske sensibiliteter:

		Mængde af anti- bioticum/plade
5	Sensibil over for: ampicillin	10 µg
	penicillin G	1 enhed
	carbenicillin	100 µg
	tetracyclin	10 µg
	clindamycin	2 µg
10	gentamycin	10 µg
	erythromycin	5 µg
	chloramphenicol	25 µg
	furoxon	50 µg
	novobiocin	5 µg

15

Opfindelsen beskrives nærmere gennem følgende eksempel.

Mikroorganismer:

- Indikatorstammerne *S.epidermidis* MF87 og *S.cohnii* MF121, ligesom den antibioticum-producerende stamme *S. epidermidis* NCIB 11536, blev isoleret fra ansigtshuden af et voksent menneske. Stammerne holdtes i 40 volumen% glycerol/PBS under anvendelse af en modifikation af metoden ifølge Gore L.F. og Walsh P., *J.Med.Lab.Technol.*, 21 (1964), side 244-246.

25

Kultur:

- Et isolat af stammen *S.epidermidis* NCIB 11536 (taget fra en lagerkultur holdt i 40 volumen% glycerol/PBS som ovenfor beskrevet) blev inkuberet i Hjerne-Hjerte-Infusions(BHI)-suppe i en mængde på 0,1 ml isolat pr. 10 ml suppe, idet inkubationen foregik aerobt natten over ved 37°C under anvendelse af en baneryster.

30

- Portioner på 0,1 ml af den således vundne suppekultur blev inokuleret over på plader af Hjerne-Hjerte-Infusionsagar (BHIA), idet dyrkningsmediet var som markedsført af Difco Laboratories og med følgende sammensætning pr.liter medium:

35

	Kalvehjerner, infusion derfra	200 g
	Oksehjerte, infusion derfra	250 g
	Proteose-pepton, Difco	10 g
	Bacto-dextrose	2 g
5	Natriumchlorid	5 g
	Dinatriumphosphat	2,5 g
	Agar - sat til endeligt koncentrat i mængde på 1% (vægt/volumen)	
	Dyrkningsmediets pH var 6.	

10

Pladerne blev derefter inkuberet i 24 timer under aerobe betingelser ved en temperatur på 37°C.

Udvinding af antibiotiske stoffer:

1. Fryse-tø-ekstraktion:

- 15 Dette trin udførtes ved en modifikation af metoden ifølge McGeachie J., Zentrabl.Bakteriol (Orig A), 196 (1965), side 377-384. Kulturen blev lagret natten over ved en temperatur på -20°C og blev derefter optøet ved stuetemperatur, og den derved udtrængte væske blev
- 20 indsamlet. Denne udtrængte væske blev derefter underkastet centrifugering ved 3.000 g i 1 time ved 4°C. Det herved vundne overliggende materiale omtales her som rå fryse-tø-ekstrakt.

1a. Centrifugering.

- 25 I et alternativt tilfælde, hvor inkubation udførtes aerobt i 48 timer ved 37°C i Hjerne-Hjerte-Infusions-suppe under anvendelse af en baneryster, blev den inkuberede suppe centrifugeret ved 3000 g i 30 minutter for at fjerne cellemateriale. Det således vundne overliggende materiale blev derefter behandlet på samme
- 30 måde som beskrevet for rå fryse-tø-ekstrakt.

2. Ammoniumsulfat-fældning.

- Fast ammoniumsulfat (analar, B.D.H.) blev sat til den rå fryse-tø-ekstrakt til opnåelse af 30% mætning. Efter omrøring ved 4°C i 3 timer blev det herved vundne bundfald (der indeholdt noget af det i ekstrakten tilstedeværende protein) fjernet ved centrifugering ved
- 35 3000 g i 1 time ved 4°C. Yderligere fast ammoniumsulfat blev derefter tilsat til opnåelse af 50% mætning.

Efter omrøring natten over ved 4°C blev det vundne bundfald (der indeholdt de antibiotiske stoffer, der skulle udvindes) igen fraskilt ved centrifugering som ovenfor beskrevet. Dette andet bundfald blev opløst i en minimal mængde 0,05M phosphatpuffer, pH 6,0, ved 4°C, og uopløst bundfald blev igen fjernet ved centrifugering til opnåelse af et overliggende materiale til yderligere rensning.

3. Ionbytter-chromatografi.

- En prøve på 10 ml af det ved ammoniumsulfatfældning vundne overliggende materiale blev overført til en Sephadex C25-kationbyttersøjle (søjledimensioner 1,5 x 30 cm), der var for-ækvilibreret med 0,05M phosphatpuffer, pH 6,0. Ikke-bundne stoffer blev elueret med startpuffer ved stuetemperatur. Bundne stoffer blev derefter elueret ved en strømningshastighed på 15 ml pr.time under anvendelse af en lineært stigende ionstyrkegradient af 0-0,5M (400 ml) NaCl i 0,05M phosphatpuffer, pH 6,0, ved stuetemperatur. Det højmolekylære antibiotiske stof var ubundet og vandtes i eluatet med startpuffer. Under eluering blev der indsamlet fraktioner på 5,5 ml, og dem, der indeholdt det lavmolekylære antibiotiske stof (identificeret ved deres hæmningsaktivitet over for MF121) blev tilbageholdt.

4. Gelfiltrerings-chromatografi.

- Af spidsfraktioner fra ionbytter-chromatografi indeholdende de lavmolekylære antibiotiske stoffer blev 10 ml overført til en Sephadex G25-søjle (2,2 x 45 cm, $V_0 = 61,5$ ml, $V_t = 141$ ml), der var for-ækvilibreret med 0,05M phosphatpuffer, pH 6,0. Søjlen blev elueret med 0,05M phosphatpuffer, pH 6,0, ved en strømningshastighed på 12 ml pr.time ved stuetemperatur, og fraktioner på 4 ml, hvoraf nogle indeholdt de lavmolekylære antibiotica (igen identificeret ved deres hæmningsaktivitet over for MF121), blev indsamlet. I nedenstående Tabel IV er samlet de opnåede resultater:

Tabel IV

	Fraktion	Totale enheder af hæmningsaktivitet over for <u>S.cohnii</u> z)	Totalt protein mg	Specifik aktivitet enheder pr. mg protein	Udbytte %
5	Rå fryse-tø-ekstrakt	12.800	2.560	5	
	30-50% ammonium-sulfat-bundfald	10.400	50,50	202,80	80
10	x) C25-ubundet højmolekylært antibiotisk stof	185,80			1,45
15	x) C25-bundet lavmolekylært antibiotisk stof (alle fraktioner)	5.110,60	3,27	1.561,40	39,90
	C25-bundet lavmolekylært antibiotisk stof (spids-fraktioner)	4.659,20	1,17	3.983,10	36,40
	y) G25 (alle fraktioner)	1.194,80	0,076	15.720,40	9,33
20	y) G25 (spidsfraktioner)	1.056	0,027	39.111,10	8,25

x) Sephadex C25-kationbytter

y) Sephadex G25-søjle

z) S.cohnii - MF121.

Proteinprøve.

- 25 I ovenstående Tabel og i hele beskrivelsen er protein bestemt ved metoden ifølge Lowry, O.H., Rosgbrough, N.J., Farr, A.L. og Randall, R.J., J.Biol. Chem., 193 (1951), side 265-275, under anvendelse af okseserumalbumin som reference.

30 Undersøgelser af minimalernæring.

- Til yderligere undersøgelse af fremstillingen af de omhandlede antibiotiske stoffer blev der foretaget undersøgelser vedrørende minimalernæring. Ved disse undersøgelser blev isolater af stammen *S.epidermidis* NCIB 11536 (taget fra en lagerkultur holdt i 40 volumen% glycerol/PBS som ovenfor beskrevet) inkuberet aerobt i 24 timer ved 37°C under anvendelse af en baneryster. Inkubation fandt sted i et syntetisk medium som ovenfor beskrevet, men idet flere komponenter var udskiftet, udeladt eller forelå i andre koncentrationer. Idet der henvises til

det ovenfor beskrevne syntetiske medium var, til undersøgelserne vedrørende minimalernæring, phosphatindholdet reduceret til 200 mg pr.liter NaH_2PO_4 , PIPES var erstattet med 10000 mg pr.liter MES (2-(morpholino)ethansulfonsyre), K_2HPO_4 var erstattet med 500 mg pr.liter KCl, og glucoseindholdet var sat til 2000 mg pr.liter. Ved anvendelse af dette syntetiske medium som basis for minimalernærings-undersøgelserne blev aminosyreindholdene i de syntetiske medier varieret ved udeladelse fra medierne af forskellige aminosyrer. Det viste sig, at aminosyreindholdet i det syntetiske medium kunne reduceres til

800 mg pr.liter L-arginin,
400 mg pr.liter L-cystein,
2000 mg pr.liter L-glutaminsyre,
400 mg pr.liter glycin,
400 mg pr.liter L-prolin
400 mg pr.liter L-tryptophan og
400 mg pr.liter L-histidin

uden at hindre vækst af *S.epidermidis* NCIB 11536 eller fremstilling af de omhandlede antibiotiske stoffer.

Ved disse undersøgelser fandtes også, at hævning af den totale aminosyrekoncentration fra 2800 mg pr.liter til 11200 mg pr.liter resulterede i en 8 til 16 ganges forøgelse i titer, mens bakterielt udbytte kun steg med 1%.

Disse resultater viser, at aminosyresammensætning har en tydelig indvirkning på antibioticumfremstilling. Ultraviolette absorptionsspektre.

Fig. 3, 4 og 5 på tegningerne illustrerer U.V.-spektre registreret inden for absorptionsområdet 200-300 nm med tre prøver af de lavmolekylære antibiotiske stoffer vundet ved aerob dyrkning af *S.epidermidis* NCIB 11536. Prøverne viste hver en absorptionsspids centreret ved ca. 210 nm og en svagere absorptionsspids centreret ved ca. 270-280 nm. Fig. 3 og 4 illustrerer U.V.-spektre for prøver af de antibiotiske stoffer efter ionbytter-chromatografi ved eluering gennem en Sephadex C25-kationbyttersøjle

og repræsenterer titere på henholdsvis 256 og 512 enheder pr.ml. Fig. 5 illustrerer de ultraviolette spektre for en prøve af det antibiotiske stoffer efter genfiltrerings-chromatografi ved eluering gennem en Sephadex G25-søjle.

5

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til fremstilling af antibiotiske polypeptidforbindelser, eller syreadditionssalte deraf, med baktericide og bakteriolytiske aktiviteter over for
10 grampositive bakterier, med en molekylvægt på fra 950 til 10.000 og indeholdende i peptidkæden én prolinrest, to glycinrester og mindst én rest af hver af aminosyrerne isoleucin, phenylalanin, alanin, asparaginsyre, glutaminsyre og lysin, k e n d e t e g n e t ved, at Staphylococcus epidermidis NCIB 11536 eller en mutant deraf med væsentligt samme egenskaber dyrkes aerobt i eller på et dyrkningsmedium for nævnte organisme, hvorefter nævnte antibiotiske polypeptidforbindelser udvindes.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at nævnte dyrkningsmedium indeholder L-arginin, L-cystein, L-glutaminsyre, glycin, L-prolin, L-tryptophan og L-histidin.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at der, ved udvinding af nævnte antibiotiske polypeptidforbindelser, efter fraskillelse af bakteriecellemateriale, foretages udfældning af de antibiotiske polypeptidforbindelser ved indvirkning af ammoniumsulfat.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at nævnte fraskillelse fra bakteriecellemateriale gennemføres ved en fryse-tø-ekstraktion.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 2 eller 3, k e n d e t e g n e t ved, at der efter udfældning ved indvirkning af ammoniumsulfat foretages fraskillelse af de antibiotiske polypeptidforbindelser ved ionbytter-chromatografi.

6. Mikroorganisme til anvendelse ved udøvelse af fremgangsmåden ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at mikroorganismen er Staphylococcus epidermidis NCIB 11536 i biologisk ren form.

Fremdragne publikationer:

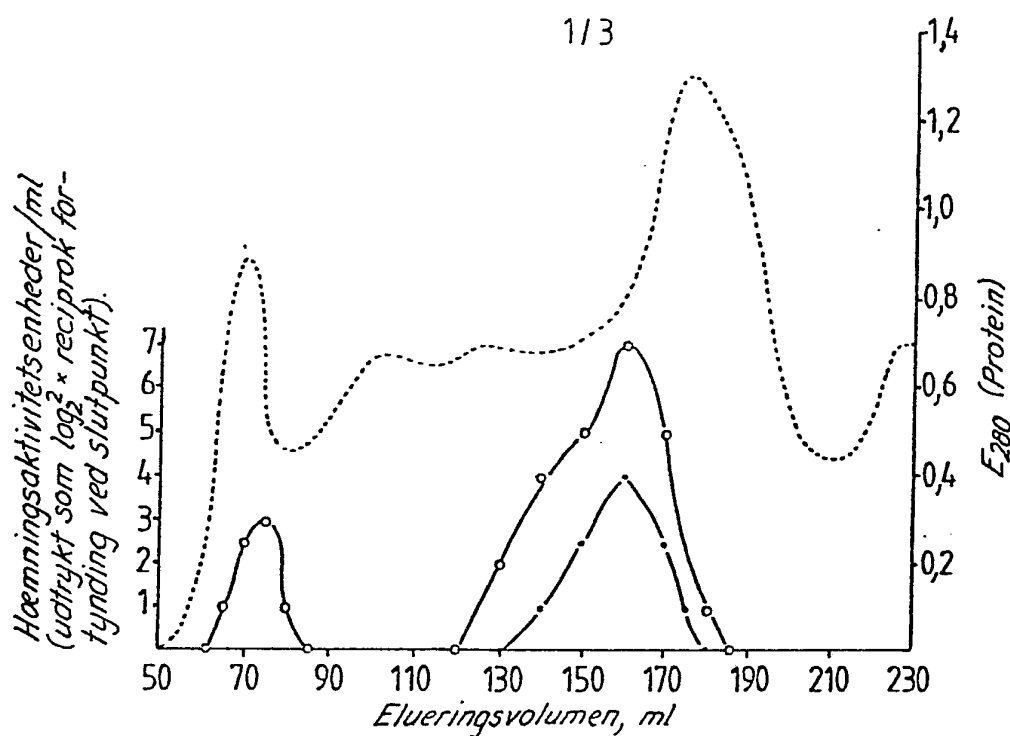


FIG. 1

-----, Absorptionsevne ved 280 nm
 —●—, Aktivitet over for MF87
 —○—, Aktivitet over for MF121

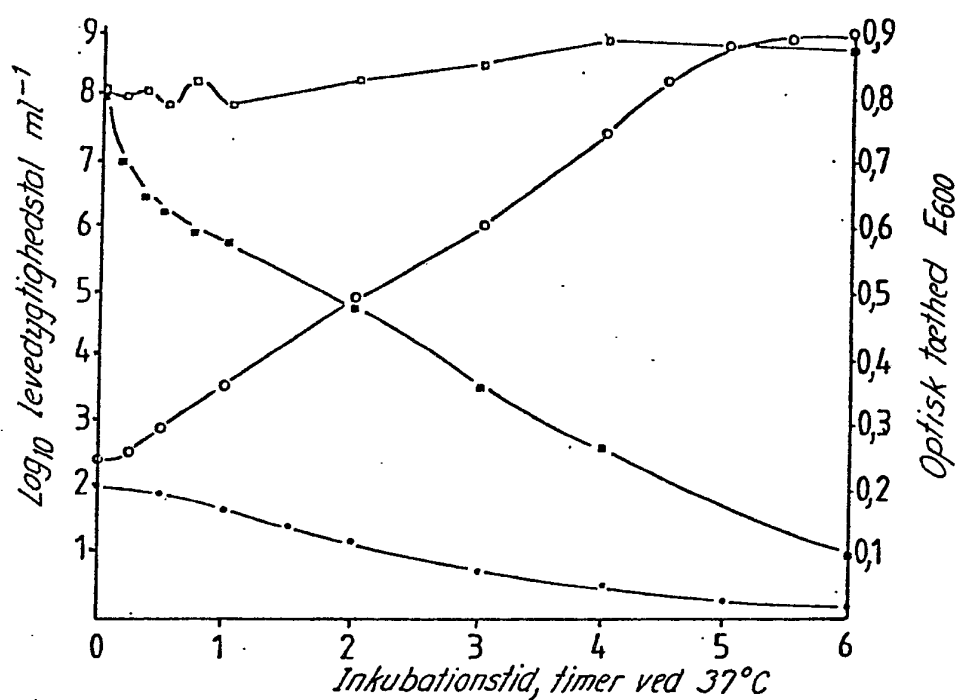


FIG. 2

—●— $O.D. 600$, aktiv inhibitor (prøve)
 —○— $O.D. 600$, inaktiv inhibitor (kontrol)
 —■— $\log_{10}$ levedygtighedstal ml^{-1} , aktiv inhibitor
 —□— $\log_{10}$ levedygtighedstal ml^{-1} , inaktiv inhibitor

2/3

FIG. 3

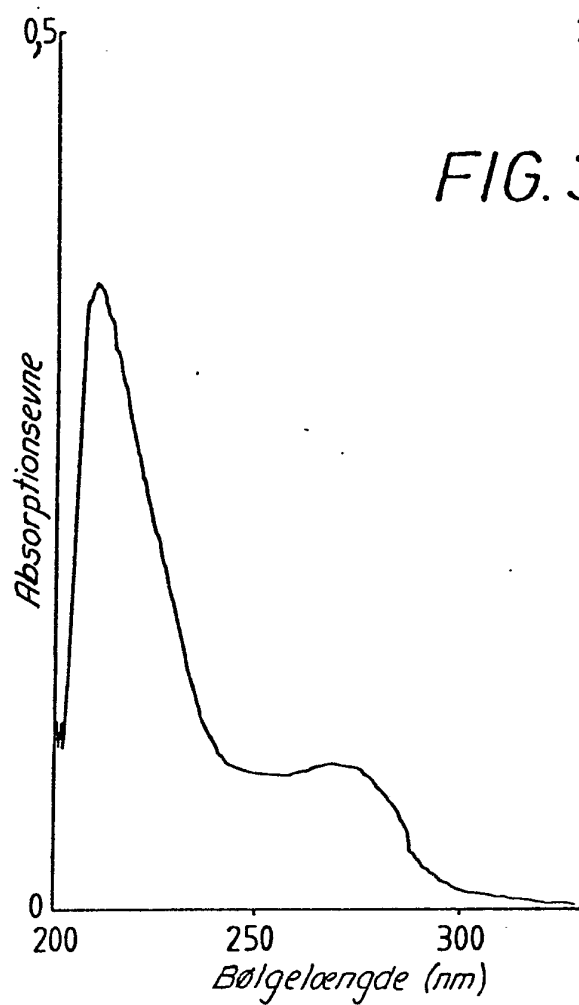


FIG. 4

