



**NORGE**

(19) [NO]

STYRET FOR DET  
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) **NR. 155496**

(51) Int. Cl.<sup>4</sup> C 12 P 21/00

(83)

(21) Patentsøknad nr. **800869**  
(22) Inngivelsesdag 25.03.80  
(24) Løpedag 25.03.80  
(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(86) Internasjonal søknad nr. -  
(86) Internasjonal inngivelsesdag -  
(85) Videreføringsdag -

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

(41) Alment tilgjengelig fra 08.10.80  
(44) Utlegningsdag 29.12.86  
(72) Oppfinner **BRUNO CAVALLERI**, Milano,  
**HERMES PAGANI**,  
Sesto S. Giovanni, Milano,  
**GIANCARLO VOLPE**,  
Milano,  
Italia.

(74) Fullmektig Siv.ing. Lars Brevig  
Bryns Patentkontor Å/S, Oslo.

(30) Prioritet begjært 07.04.79, Storbritannia,  
nr. 7912298.

(54) Oppfinnelsens benevnelse **FREMANGSMÅTE FOR FREMSTILLING AV GLYKOPEPTID-  
ANTIBIOTIKUM A/16686.**

(57) Sammendrag

Glycopeptid-antibiotikum som tilfeldig benevnes antibiotikum A/16686, og dets fysiologisk akseptable syreaddisjonssalter. Hydrokloridet av antibiotikum A/16686 er beskrevet. Antibiotikum A/16686 fri base og dets syreaddisjonssalter er antibakterielle midler, og spesielt aktive mot grampositive mikroorganismer. Fremgangsmåte for å fremstille antibiotikum A/16686 ved å dyrke en ny stamme av actinoplanesarten som betegnes Actinoplanes sp. ATCC 33076.

(56) Anførte publikasjoner Ingen.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av et antibiotikum som tilfeldig betegnes antibiotikum A/16686, ved å dyrke en inntil nå ubeskrevet stamme som har blitt karakterisert taksonomisk som en ny stamme av Actinoplanes-slekten.

Antibiotikum A/16686 er et glycopeptid-antibiotikum med basisk karakter som kan danne syreaddisjonssalter. Derfor er også de fysiologisk akseptable syreaddisjonssalter av antibiotikum A/16686 en del av oppfinnelsen.

For enkelhets skyld når det gjelder diskusjoner av anvendelighet, benyttes uttrykket "antibiotikum A/16686" for å referere til et antibiotikum som er valgt fra antibiotikum A/16686 fri base og dets fysiologisk akseptable syreaddisjonssalter.

Antibiotikum A/16686 hemmer in vitro veksten av visse patogene bakterier og spesielt grampositive bakterier. Videre vil parenteral tilførsel av antibiotikum A/16686 gi en høy grad av beskyttelse mot eksperimentelle infeksjoner i mus.

Ifølge foreliggende oppfinnelse er det således tilveiebragt en fremgangsmåte for fremstilling av antibiotikum A/16686 i fri baseform og fysiologisk akseptable syreaddisjonssalter derav, som i form av sitt hydroklorid har de kjennetegn som er angitt i krav 1 og i det nedenstående, og denne fremgangsmåten er kjennetegnet ved at man dyrker stammen Actinoplanes sp. ATCC 33076 i et kulturmedium som inneholder assimilerbare kilder av karbon, assimilerbare kilder av nitrogen og uorganiske salter under submerse aerobe betingelser inntil en vesentlig mengde av antibiotikum A/16686 er dannet, og utvinner nevnte antibiotikum.

En kultur av nevnte stamme ble isolert fra en jordprøve oppsamlet i Vaghalbod (India) og ble deponert 30. januar 1979 ved den permanente kultursamling hos ATCC (American Type Culture Collection), 1201 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, USA, hvor den har fått aksjonsnummer ATCC 33076.

De karakteristiske egenskaper ved Actinoplanes sp. ATCC 33076 er gitt i det nedenstående.

Morfologi

Stammen vokser godt på forskjellige media med en orange farge på substratmycelium. Det frembringer ikke pigment. Luftmycelium er alltid fraværende.

5 En mikroskopisk undersøkelse av det vegetative mycelium viser forgrenede hyfer med en diameter på ca. 1  $\mu$ m. Sporangene dannes spredt bare på potetagar og er globose med en meget ujevn overflate og en diameter fra 5,0 - 9,0  $\mu$ m. Sporangieell utløsning observeres etter  
10 brudd på veggen i sporangium. De subsfæriske sporer er motile (1,0 - 1,5  $\mu$ m diameter). Analyse av celleveggkomponenter viser meso-diaminopimelinsyre og sukker-  
15 mønster av typen D (Lechevalier et al., Chemical composition as a criterium in the classification of Actinomyces. Adv. Applied Microbiology, 14, 1971, Academic Press N.Y.).

Dyrkningsegenskaper

Tabell 1 gjengir dyrkningsegenskapene hos Actinoplanes ATCC 33076 dyrket på forskjellige standardmedia anbefalt av Shirling og Gottlieb (Intern. J. System. Bact. 16, 313 - 340, 1966) og andre media anbefalt av Waksman (The Actinomycetes, bind II - The Williams and Wilkins Co. 1961). Dyrkningsegenskapene ble bestemt etter 6 - 14 dager ved inkubering ved 30°C.

25

T a b e l l IDyrkningsegenskaper

Tallet ved noen av kulturmediene refererer til de som gjengis av Shirling og Gottlieb in Methods for characterization of Streptomyces species - Intern. J. System. Bact. 16, 313 - 340, 1966.

30

35

| Kulturmedium                                   | Dyrkningsegenskaper                                      |
|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Medium nr. 2 (gjærekstrakt-maltagar)           | Rikelig vekst, rynket overflate, lys brunt 12 H 12       |
| 5 Medium nr. 3 (havremelagar)                  | Spredt vekst, tynn, lys orange 9 B 6                     |
| Medium nr. 4 (uorganiske salter-stivelsesagar) | Moderat vekst, skorpeaktig overflate, orange 11 L 12     |
| 10 Medium nr. 5 (glycerol-asparaginagar)       | Spredt vekst, hyalin                                     |
| Medium nr. 6 (pepton-gjærekstrakt-jernagar)    | Spredt vekst, hyalin til lys brun                        |
| 15 Medium nr. 7 (tyrosinagar)                  | Spredt vekst, glatt overflate, brun 5 D 11               |
| Havremelagar (ifølge Waksman)                  | Rikelig vekst, rynket overflate, orange til brun 12 C 10 |
| 20 Hickey og Tresner's agar                    | Rikelig vekst, skorpeaktig overflate, orange 11 G 8      |
| Czapek glucoseagar                             | Moderat vekst, skorpeaktig overflate, orange 11 G 8      |
| 25 Glucoseasparaginagar                        | Spredt vekst, skorpeaktig overflate, lys orange 11 F 6   |
| Næringsagar                                    | Moderat vekst, glatt overflate, orange 11 G 8            |
| 30 Potetagar                                   | Rikelig vekst, rynket overflate, ravbrun 12 E 10         |
| Bennett's agar                                 | Rikelig vekst, rynket overflate, orange 11 C 8           |
| 35 Kalsiummalatagar                            | Moderat vekst, glatt overflate, lys orange 10 C 6        |
| Skummet melk-agar                              | Rikelig vekst, rynket overflate, orange 9 C 2            |

155496

4

Tab. I forts.

| Kulturmedium         | Dyrkningsegenskaper                                   |
|----------------------|-------------------------------------------------------|
| 5 Czapek-agar        | Moderat vekst, skorpet overflate, orange 10 D 7       |
| Eggagar              | Moderat vekst, glatt overflate, hyalin til lys orange |
| 10 Peptonglucoseagar | Rikelig vekst, rynket overflate, orange 11 G 11       |
| Agar                 | Meget liten vekst, glatt overflate, hyalin            |
| Loefflerserum        | Meget dårlig vekst, glatt overflate, orange           |
| 15 Potet             | Spredt vekst, skorpeaktig, lys brun                   |
| Gelatin              | Spredt vekst, lys orange                              |
| 20 Cellulose         | Meget dårlig vekst, tynn, hyalin                      |

25

#### Karbonutnyttelse

Tabell II gjengir utnyttelsen av karbonkilder undersøkt ifølge fremgangsmåten til Fridham og Gottlieb  
30 (J. Bact. 56, 107, 1948).

35

T a b e l l   I I

| Karbonkilde  | Anvendelse |
|--------------|------------|
| 5 Inositol   | -          |
| Fruktose     | +          |
| Rhamnose     | +          |
| Mannitol     | -          |
| Xylose       | +          |
| 10 Raffinose | -          |
| Arabinose    | +          |
| Cellulose    | -          |
| Sukrose      | +          |
| Glukose      | +          |
| 15 Mannose   | +          |
| Laktose      | -          |
| Salicin      | +          |

+ = positiv utnyttelse

20 - = ingen vekst

Fysiologiske egenskaper

25 Tabell III gjengir de fysiologiske egenskapene i stammen.

T a b e l l   I I I

| Pröve                         | Resultater |
|-------------------------------|------------|
| Hydrolyse av stivelse         | positiv    |
| 30 H <sub>2</sub> S-dannelse  | positiv    |
| Tyrosinasereaksjon            | negativ    |
| Kaseinhydrolyse               | positiv    |
| Oppløselighet av kalsiummalat | negativ    |
| Flytendegjøring av gelatin    | positiv    |
| 35 Lakmusmelk                 | positiv    |
| koagulering                   | positiv    |
| peptonisering                 | negativ    |
| Cellulosedekomponering        | negativ    |

For å fremstille antibiotikum A/16686 dyrkes stammen *Actinoplanes* sp. ATCC 33076 som nevnt under aerobe betingelser i et vandig næringsmedium som inneholder en assimilerbar karbonkilde, en assimilerbar nitrogenkilde og uorganiske salter. Nevnte kulturmedium kan være et hvilket som helst av et antall næringsmedier som vanligvis benyttes under slik dyrking, men visse media er foretrukne. Således er f.eks. foretrukne karbonkilder glukose, fruktose, mannose, sukrose, o.l. Foretrukne nitrogenkilder er soya-bönnemel, pepton, kjøttekstrakt, gjærekstrakt, trypton, aminosyrer o.l. Blant de uorganiske salter som kan tilføres kulturmediene er de vanlige oppløselige salter som er i stand til å gi natrium-, kalium-, jern-, sink-, kobolt-, magnesium-, kalsium-, klorid-, karbonat-, sulfat-, nitrat- og lignende ioner. Vanligvis fordyrkes stammen som skal frembringe antibiotikum i en rysteflaske, hvoretter kulturen benyttes til å inokulere krukkefermentere for fremstilling av vesentlige mengder antibiotikum A/16686. Mediet som benyttes for fordyrkningen, kan være det samme som det som benyttes for større fermenteringer, men andre medier kan også benyttes.

Stammen som produserer A/16686, kan dyrkes ved temperaturer mellom 20 og 37°C og fortrinnsvis ved temperaturer mellom 28 og 30°C.

Under fermenteringen kan antibiotikumproduksjonen følges ved å ta prøver av væsken eller av ekstrakter av mycelie-faststoffene med hensyn til antibiotisk aktivitet. Organismer man vet er følsomme overfor antibiotikum A/16686, er nyttige for dette formål. En spesielt nyttig prøveorganisme er *Sarcina lutea*. Bioprøven utføres fortrinnsvis ved agardiffusjonsmetoden på agarplater. Maksimal antibiotisk aktivitet får man vanligvis mellom den tredje og den femte dag. Det antibiotikum som fremstilles ved fermentering av stammen *Actinoplanes* sp. ATCC 33076, finnes både i væsken og i myceliemassen. Utvinning av antibiotikum A/16686 kan derfor utføres ved separat ekstraksjon av buljong og mycelium.

Ekstraksjon av myceliemassen utføres fortrinnsvis med metanol, men andre lavere alkoholer og kloroform kan også

benyttes. Antibiotikum A/16686 utvinnes som et råprodukt fra det ekstraherende oppløsningsmiddel ved i og for seg kjente metoder. På tilsvarende måte blir også buljongen ekstrahert fortrinnsvis med n-butanol, og en ytterligere mengde urensset antibiotikum A/16686 tilveiebringes ved utfelling fra denne oppløsning. Rensing av det urensede antibiotikum A/16686 oppnås ved å behandle produktet som utvinnes fra ekstraksjonsoppløsningsmidlene med en blanding av kloroform:vann 4:7:2, utskilling av det oljeaktige produktet som dannes, og overhelling av dette i vann. Denne behandling forårsaker størkning av produktet som utvinnes ved filtrering, og som renses ytterligere ved hjelp av silisiumdioksydgel-kolonnekromatografi mens man eluerer med en blanding av acetonitril:0,01N HCl 1:1. Antibiotikum A/16686 som ifølge fremgangsmåten utvinnes i form av et hydroklorid, avsaltet deretter ved kromatografering på en kryssbundet dekstrangelkolonne.

Hvert trinn i den ovennevnte rensingsprosedyre overvåkes ved tynnsjikt-kromatografi under anvendelse av et passende oppløsningsmiddelsystem, såsom basisk oppløsnings-system, f.eks. n-propanol:n-butanol:N:ammoniumhydroksyd 2:3:4 (övre fase) eller metanol:10% vandig ammoniumacetat:10% ammoniumhydroksyd 10:9:1, hvor et eventuelt syre-addisjons salt av antibiotikum A/16686 omdannes til den frie base. Alle de ovennevnte trinn er derfor rettet mot å isolere rent antibiotikum A/16686 kjennetegnet ved en spesiell  $R_f$ -verdi i det spesielle oppløsningsmiddelsystem som benyttes.

Andre rensingsmetoder kan benyttes omfattende konvensjonell ekstraksjon og adsorpsjon. Nevnte alternative fremgangsmåter kan lett settes opp, trinn for trinn, ved å overvåke rensingen ved tynnsjikt-kromatografi, som beskrevet ovenfor. Når man følger t.l.c.-flekken av antibiotikum A/16686 med en spesiell  $R_f$ -verdi, vil det således fremgå hvilke operasjoner som bør utføres for å isolere rent antibiotikum A/16686.

Om ønsket kan det rene antibiotikum A/16686-hydroklorid, som man får etter den fremgangsmåte som er nevnt

ovenfor, deretter omdannes til den tilsvarende frie base eller til et annet fysiologisk akseptabelt syreaddisjons-salt ved kjente metoder.

5 Antibiotikum A/16686 er et antimikrobielt middel, og det er spesielt aktivt mot grampositive mikroorganismer. Nærmere bestemt er aktivitetsspekteret av antibiotikum A/16686 in vitro oppsummert i følgende tabell IV.

T a b e l l   I V

| 10 | Organismer                          | M.I.C. ( $\mu\text{g/ml}$ )<br>Antibiotikum A/16686 |
|----|-------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|    | S. aureus ATCC 6538                 | 0,16                                                |
|    | S. aureus ATCC 9144                 | 0,16                                                |
| 15 | S. aureus Tour                      | 0,31                                                |
|    | Staphylococcus 10B Ciba             | 0,08                                                |
|    | S. epidermidis ATCC 12228           | 0,08                                                |
|    | S. saprophyticus NCTC 7292          | 0,16                                                |
|    | M. flavus ATCC 10240                | 0,016                                               |
| 20 | S. lutea ATCC 9341                  | 0,02                                                |
|    | S. pyogenes C 203 SKF 13400         | 0,01                                                |
|    | S.pneumoniae Felton UC 41           | 0,05                                                |
|    | S. faecalis ATCC 7080               | 0,31                                                |
|    | S. foecium ATCC 10541               | 0,08                                                |
| 25 | S. agalactiae ATCC 7077             | 0,02                                                |
|    | S. mutans ATCC 27607                | 0,08                                                |
|    | C. diphtheriae var.mitis ATCC 11051 | 0,31                                                |
|    | C. xerosis NCTC 9755                | 0,02                                                |
|    | B. subtilis ATCC 6633               | 0,062                                               |
| 30 | B. cereus var.mycoides ATCC 11778   | 0,08                                                |
|    | C. perfringens ISS 30543            | 0,16                                                |
|    | P. acnes ATCC 6919                  | 0,4                                                 |
|    | P. acnes ATCC 6922                  | 0,8                                                 |
|    | P. acnes ATCC 25746                 | 0,4                                                 |
| 35 |                                     |                                                     |

Tabell V gjengir resultater av prøver hvor antibiotikum A/16686 ble prøvet på en rekke Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae og Streptococcus faecalis-stammer som var klinisk isolert.

T a b e l l V

| Organismer                | M.I.C. ( $\mu\text{g/ml}$ )<br>Antibiotikum A/16686 |
|---------------------------|-----------------------------------------------------|
| 10 S. aureus 54310 L 1096 | 0,62                                                |
| S. aureus 54560/I L 1097  | 0,31                                                |
| S. aureus 54635 L 1098    | 0,31                                                |
| S. pyogenes L 33          | 0,04                                                |
| 15 S. pyogenes L 794      | 0,08                                                |
| S. pyogenes L 800         | 0,04                                                |
| S. pyogenes L 801         | 0,16                                                |
| S. pyogenes L 802         | 0,08                                                |
| S. pyogenes L 803         | 0,08                                                |
| 20 S. pyogenes L 704      | 0,62                                                |
| S. pyogenes L 805         | 0,08                                                |
| S. pneumoniae L 1055      | 0,04                                                |
| S. pneumoniae L 1102      | 0,04                                                |
| S. pneumoniae L 1174      | 0,08                                                |
| 25 S. faecalis L 768      | 0,31                                                |
| S. faecalis L 876         | 0,31                                                |
| S. faecalis L 922         | 0,31                                                |
| S. faecalis L 949         | 0,31                                                |
| S. faecalis L 965         | 0,31                                                |
| 30 S. faecalis L 1139     | 0,62                                                |
| S. foecium L 763          | 0,16                                                |

Antibiotikum A/16686 har også vist seg å ha en høy grad av aktivitet in vivo mot forskjellige patogene organismer. Effektiviteten av antibiotikum A/16686 går tydelig frem fra tabell VI hvor man har gjengitt ED<sub>50</sub>-verdiene i mus mot tre forskjellige mikroorganismer.

155496

10

T a b e l l VI

| 5       | ED <sub>50</sub> mg/kg s.c. |                        |                              |
|---------|-----------------------------|------------------------|------------------------------|
|         | S.aureus Tour               | S.pyogenes<br>C203 ISM | S.pneumoniae<br>Felton UC 41 |
| A/16686 | 24,6                        | 0,09                   | 0,2                          |

10 Antibiotikum A/16686 har vist seg å ha et relativt lavt toksisitetnivå når det ble brukt på prøvedyr. F.eks. var LD<sub>50</sub>-verdien når antibiotikumet ble tilført intraperitonealt på mus ca. mellom 500 og 750 mg/kg.

15 Farmasøytiske preparater inneholdende antibiotikum A/16686 for oral, topisk eller parenteral tilførsel, kan fremstilles på i og for seg kjent måte. Eksempler på disse preparatene er beskrevet f.eks. i Remington's Pharmaceutical Sciences 15. utgave, 1975, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, USA. Disse omfatter tabletter, kapsler, pulvere, 20 salver, flytende oppløsninger, oppløsninger for innsprøyting o.l. Doseringseenheten kan inneholde 0,5 - 99%, og fortrinnsvis 5 - 80% aktiv bestanddel. Den daglige dose kan bestemmes under betraktning av flere faktorer såsom kroppsvekt, den infiserende organisme, graden av infeksjon, perioden og 25 tilførselsmetoden.

For å illustrere oppfinnelsen ytterligere vises til følgende eksempler.

### 30 Eksempel 1

#### Fermentering av stammen Actinoplanes sp. ATCC 33076

En kultur av Actinoplanes sp. ATCC 33076 fordyrkes ved å dyrke stammen i en rysteflaskekultur med følgende sammensetning:

35

|   |                     |         |
|---|---------------------|---------|
|   | kjøtttekstrakt      | 3 g/l   |
|   | gjærekstrakt        | 5 g/l   |
|   | trypton             | 5 g/l   |
|   | oppløselig stivelse | 24 g/l  |
| 5 | glukose             | 1 g/l   |
|   | CACO <sub>3</sub>   | 4 g/l   |
|   | ledningsvann        | 1 liter |

10 Flaskene rystes i ca. 96 timer ved 28 - 30°C og deretter benyttes forkulturen (1 liter) for å inokulere krukkefermentene, som hver inneholder 10 liter av følgende næringsmedium:

|    |                   |          |
|----|-------------------|----------|
|    | kjøtttekstrakt    | 40 g     |
| 15 | pepton            | 40 g     |
|    | gjærekstrakt      | 10 g     |
|    | natriumklorid     | 25 g     |
|    | soyabönnemel      | 100 g    |
|    | glukose           | 250 g    |
| 20 | CACO <sub>3</sub> | 50 g     |
|    | ledningsvann      | 10 liter |

25 Fermenteringssatsene inkuberes aerobisk under omrøring ved 28 - 30°C. Ved intervaller undersøkes den antibiotiske aktivitet mikrobiologisk ved agardiffusjonsmetoden under anvendelse av *Sarcina lutea* som prøveorganisme. Den maksimale aktivitet får man etter 72 - 120 timers fermentering.

#### Eksempel 2

#### 30 Utvinning av antibiotikum A/16686

Hel fermenteringsbuljong (170 l) fremstilt som beskrevet i eksempel 1, avkjøles til 10°C og bringes til pH 3,5 ved hjelp av 18% HCl. Den resulterende sure buljong filtreres under anvendelse av et filterhjelpemiddel ("Clarcel Flow-Ma"), og myceliekaken vaskes med vann. Deretter be-  
35 handles den filtrerte buljong og mycelium hver for seg.

a) Metanol (30 l) benyttes for å ekstrahere myceliemasse som, etter filtrering, igjen ekstraheres med en blanding av metanol/vann (30 l metanol pluss 5 l vann). Det benyttede mycelium kastes, og de to metanolekstraktene konsentreres under vakuum ved en temperatur på lavere enn 40<sup>o</sup> til et vandig konsentrat (6 liter). Dette vandige konsentrat ekstraheres med tre porsjoner, hver på 10 liter, n-butanol, som kombineres og konsentreres til et lite volum under vakuum.

Dette konsentratet tilsettes petroleumeter, og den resulterende utfelling fraskilles ved dekantering og tilsettes en ytterligere mengde petroleumeter. Utfellingen fraskilles ved filtrering og tørkes under vakuum ved værelsestemperatur til 80 g antibiotikum A/16686 som et råmateriale som har en M.I.C. mot *S. pneumoniae* UC 41 på 0,1 µg/ml.

b) Den filtrerte buljong pluss vaskevæske (165 l) avkjøles til 10<sup>o</sup>C og justeres til pH 3,5 ved tilsats av konsentrert HCl (2,5 l). Den tilveiebragte oppløsning ekstraheres med n-butanol (80 l), og det organiske ekstrakt konsentreres deretter under vakuum ved en temperatur lavere enn 35<sup>o</sup>C for å gi et butanolkonsentrat (6 l). Dette konsentrat tilsettes til petroleumeter, og den oppnådde utfelling, fraskilt ved dekantering, tilsettes til en ytterligere mengde petroleumeter. Det faste stoff fraskilles ved filtrering og tørkes under vakuum ved værelsestemperatur og gir 26,3 g urensset antibiotikum A/16686 med en M.I.C. mot *S. pneumoniae* UC 41 på 0,8 µg/ml.

#### Eksempel 3

#### Rensing av antibiotikum A/16686

47,7 g urensset antibiotikum A/16686 fra eksempel 2a) behandles med 1,4 l kloroform:etanol:vannblanding (4:7:2) (volumforhold), og det oljeaktige produkt som dannes, fraskilles fra oppløsningen ved dekantering. Ytterligere 70 ml av den ovennevnte blanding tilsettes deretter til det oljeaktige produkt, og separasjonen gjentas. Ved behandling av det oljeaktige produkt med vann (440 ml) storkner det og fraskilles ved sentrifugering og filtrering:

a) Det faste stoff, som fraskilles, suspenderes i vann (170 ml), oppløses ved tilsats av metanol (400 ml) og filtreres. Deretter stripkes oppløsningsmidlene under vakuu ved å tilsette n-butanol ved en temperatur som aldri er høyere enn 35°C, og man får et butanolkonsentrat på ca. 50 ml. Ved tilsats av dietyleter (500 ml) dannes en utfelling som fraskilles ved filtrering og tørkes under vakuu ved værelsestemperatur og som gir 1,012 g av et nokså rent antibiotikum A/16686 med en M.I.C. på *S.pyogenes* på 0,025 µg/ml. Det nokså rene antibiotikum A/16686 tilveiebragt på denne måten underkastes deretter følgende rensemetoder: 1,58 g av det ovennevnte antibiotikum A/16686 karakterisert ved en M.I.C. mot *S. pyogenes* på 0,025 µg/ml oppløses i acetonitril: vann 1:1 og den resulterende oppløsning påføres en kolonne som inneholder 430 g "Silicagel 60" (0,06 - 0,2 mm) fremstilt i den samme blanding. Kolonnen utvikles først under anvendelse av den samme acetonitril-vannblanding og man samler opp 70 fraksjoner på hver 20 ml hvoretter man benytter acetonitril:N/100 HCl 1:1 og oppsamler ytterligere 290 fraksjoner, hver på 20 ml. Eluering av kolonnen overvåkes ved tynnsjikt-kromatografi på "60 F<sub>254</sub>-Silicagel-plater og ved å prøve fraksjonene mot *Sarcina lutea*. Fraksjonene 130 - 265 slås sammen og oppløsningsmidlene stripkes under vakuu med n-butanol slik at man får et n-butanolkonsentrat på 20 ml. Dette restvolum helles over i en stor mengde etyleter og utfellingen som dannes fraskilles ved filtrering og tørkes under vakuu ved værelsestemperatur over P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, og man får 1,015 g antibiotikum A/16686.

0,67 g av den ovennevnte substans oppløses i 24 ml vann og 76 ml metanol. Den resulterende oppløsning påføres en 3,0 x 62,0 cm kolonne som inneholder 220 g "Sephadex LH-20" fremstilt i metanol:vann 7:3. Kolonnen utvikles med den samme blanding og man samler opp 10 ml

fraksjoner. Fraksjonene 24 - 32 slås sammen og oppløsningsmidlene strippest under vakuum ved en temperatur lavere enn 35°C med n-butanol slik at man får et restbutanolvolum på ca. 10 ml. Denne oppløsning tilsettes til etyl-  
5 eter for å utfelle det ønskede rene antibiotikum A/16686. Utfellingen fraskilles ved filtrering, vaskes med etyl-  
eter og tørkes under vakuum over P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ved værelsestemperatur og man får 0,26 g rent antibiotikum A/16686.

b) Filtratet strippest under vakuum ved en temperatur lavere enn 35°C ved tilsats av n-butanol, slik at  
10 man får et n-butanolkonsentrat på 50 ml. Ved tilsats av petroleumeter dannes en utfelling som fraskilles ved filtrering og tørkes under vakuum ved værelsestemperatur, og dette gir 42,9 g av delvis rensset antibiotikum A/16686  
15 karakterisert med en M.I.C.-verdi mot S.pyogenes på 0,2 µg/ml. Denne antibiotiske substans suspenderes i vann (2,5 l) og oppløses ved tilsats av NaOH 1N opp til pH 7. Deretter ekstraheres den tilveiebragte vandige oppløsning med tre porsjoner, 5 l hver, n-butanol og denne organiske  
20 fase, etter vasking med vann, konsentreres til 200 ml under vakuum ved en temperatur lavere enn 35°C.

Ved tilsats av dietyleter til konsentratet dannes det en utfelling som frafiltreres og tørkes under vakuum ved værelsestemperatur. Det tørkede produkt opp-  
25 løses i 160 ml av det øvre lag av en n-propanol:n-butanol:1N ammoniumhydroksydblanding 2:3:4 (volumforhold). Den resulterende oppløsning tilføres en 100 cm høy kolonne, 7,5 cm i diameter, som inneholder 1,7kg silisiumdioksydgel 60 (0,06 - 0,2 mm) fremstilt i den ovennevnte blanding  
30 av oppløsningsmidler. Kolonnen utvikles under anvendelse av den samme blanding og man samler opp 300 ml fraksjoner. Eluering av kolonnen overvåkes med tynnsjikt-kromatografi. Fraksjonene 21 - 26 slås sammen og strippest under vakuum ved en temperatur lavere enn 35°C med n-butanol slik at man får et n-butanolkonsentrat på 50 ml. Ved  
35 tilsats av dietyleter dannes en utfelling som fraskilles ved filtrering, vaskes med dietyleter og tørkes under

vakuum over  $P_2O_5$  ved værelsestemperatur. Et utbytte på 1,875 g av nokså rent antibiotikum A/16686 tilveiebringes som renses ytterligere ved å følge den samme metode som er beskrevet under punkt a) ovenfor.

5 Antibiotikum A/16686 som hydrokloridet er et hvitt, krystallinsk materiale som er svakt hydroskopisk og som smelter ved  $224 - 226^{\circ}C$ . Det er meget oppløselig i vann og dimetylformamid, oppløselig i metanol, etanol, propanol og butanol, men er uoppløselig i etyleter, petroleter og benzen. Elementæranalyse av antibiotikum  
10 A/16686-hydroklorid, som på forhånd er tørket ved  $140^{\circ}C$  under en inert atmosfære, angir den følgende prosentvise sammensetning (som et gjennomsnitt av flere analyser): karbon 51,73%, hydrogen 6,34%, nitrogen 9,96%, klor (totalt  
15 innhold) 5,84%, klorioner 4,74% og en rest 1%.

Infrarødt absorpsjonsspektrum i nujol er vist i fig. 1 i de vedheftede tegninger.

Følgende absorpsjonsmaksima observeres (i  $cm^{-1}$ ):  
3290-3070, 2930 og 2860 (nujol), 1765, 1630, 1510, 1455,  
20 1375 (nujol), 1230, 1175, 1130, 1065, 1030, 1015, 980, 840 og 820.

Det ultraviolette absorpsjonsspekteret vises i fig. 2 i de vedheftede tegninger og har følgende absorpsjonsmaksima:

25 a) i metanol  
232 nm  $(E^{1\%}_{1\text{ cm}} = 178)$

265 nm  $(E^{1\%}_{1\text{ cm}} = 107)$

30 b) i metanol som inneholder 0,1N HCl

231 nm  $(E^{1\%}_{1\text{ cm}} = 167)$

270 nm  $(E^{1\%}_{1\text{ cm}} = 96)$

35 c) i metanol som inneholder 0,1N NaOH

155496

16

250 nm  $(E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 232)$

295 nm (skulder)

5 d) i metanol som inneholder pH 7,38 buffer

231 nm  $(E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 167)$

270 nm  $(E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 96)$

10

Ultrafiolett absorpsjonsspektrum ble registrert med et Beckmann DK-2 spektrofotometer.

Antibiotikum A/16686 hydroklorid har en spesi-  
fikk rotasjon  $[\alpha]_D^{24}$  på + 49,7° (c=0,43% i DMF)

15 Antibiotikum A/16686 har følgende karakter-  
istiske reaksjon:

|                                                                                        |                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| ninhydrin (3% etanolisk oppløsning)                                                    | negativ            |
| ninhydrin (3% etanolisk oppløsning<br>+ natriumacetat)                                 | positiv<br>positiv |
| 20 1% FeCl <sub>3</sub> - 1% K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> (vandig<br>oppløsning) | positiv<br>grønn   |
| Molisch                                                                                | positiv            |
| Fehling                                                                                | negativ            |
| Biuret                                                                                 | positiv            |
| 25 Anthrone                                                                            | positiv            |
| Millon                                                                                 | negativ            |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> kons.                                                   | negativ            |
| vandig KMnO <sub>4</sub>                                                               | positiv            |

R<sub>F</sub>-verdiene for antibiotikum A/16686 i papir-  
30 kromatografi fra forskjellige elueringsystemer og S.  
aureus ATCC 6538 som påvisningsorganisme er gitt i den  
følgende tabell:

35

T a b e l l VII

Kromatografisk atferd (Whatman nr. 1 papir)\* av  
antibiotikum A/16686

|    | <u>Elueringssystemer</u>                                             | <u>R<sub>f</sub>-verdier</u> |
|----|----------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| 5  | 1) n-butanol mettet med Sørensen-buffer pH 6,0                       | 0,00                         |
|    | 2) n-butanol mettet med vann som inneholder<br>2% p-toluensulfonsyre | 0,00                         |
|    | 3) n-butanol mettet med vann som inneholder<br>2% ammoniumhydroksyd  | 0,00                         |
| 10 | 4) Sørensen-buffer, pH 6,0, mettet med n-<br>butanol                 | 0,05                         |
|    | 5) n-butanol:metanol:vann 4:1:2                                      | 0,43                         |
|    | 6) etylacetat mettet med vann                                        | 0,00                         |
| 15 | 7) n-butanol:eddiksyre:vann 2:1:1                                    | 0,52                         |
|    | 8) n-butanol:pyridin:vann 4:3:7                                      | 0,87                         |

\* nedstigende kromatografi

Rm: 40 cm

Mengder: 20 µg av forbindelsen oppløst i vannmetanol  
20 (2 mg/ml).

Rf-verdiene av antibiotikum A-16686 i forskjellige tynnsjikt-kromatografisystemer er gjengitt i den følgende tabell (betingelsene er angitt nedenfor tabellen).

|    | <u>T a b e l l VIII</u>                                              |                              |
|----|----------------------------------------------------------------------|------------------------------|
|    | <u>Elueringssystemer (Volumforhold)</u>                              | <u>R<sub>f</sub>-verdier</u> |
| 25 | 1) n-propanol:n-butanol:N ammoniumhydroksyd<br>2:3:4 (övre fase)     | 0,15                         |
| 30 | 2) n-butanol:eddiksyre:vann 4:2:5                                    | 0,61                         |
|    | 3) n-butanol:etanol:0,1N saltsyre                                    | 0,61                         |
|    | 4) kloroform:etanol:10% eddiksyre 4:7:2                              | 0,00                         |
|    | 5) n-butanol:eddiksyre:vann 4:1:5                                    | 0,17                         |
|    | 6) metanol:10% vandig ammoniumacetat:10%<br>ammoniumhydroksyd 10:9:1 | 0,52                         |
| 35 | 7) n-butanol:pyridin:vann:eddiksyre 6:4:3:1                          | 0,45                         |

155496

18

forts. tab. VIII

|   | <u>Elueringssystemer (volumforhold)</u>                              | <u>R<sub>f</sub>-verdier</u> |
|---|----------------------------------------------------------------------|------------------------------|
|   | 8) metanol:10% vandig ammoniumacetat:10%<br>ammoniumhydroksyd 10:9:1 | 0,11                         |
| 5 | 9) 0,25M vandig NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :acetonitril 1:1    | 0,68                         |
|   | 10) metanol:10% vandig ammoniumacetat 1:1                            | 0,65                         |
|   | 11) n-butanol:eddiksyre:vann 4:2:5                                   | 0,77                         |

Rm: ca. 140 mm

10 Mengder: 2,5  $\mu$ l av en oppløsning (1 mg/ml) av forbindelsen i acetonitril-vann 1:1

15 Visualisering: a) bioautografi på agarplater med B. subtilis TCC 6633; b) karbonisering ved oppvarming med  $\alpha$ -naftol-svovelsyre; c) joddamp; d) klor-toluidinreagens; e) UV-lys ved 254 nm

1 - 7 silisiumdioksydgel-plater 60F<sub>254</sub>; visualisering a, e, b, c, d, e

8,9 - silisiumdioksydgel 60 F<sub>254</sub> silanert; visualisering e,

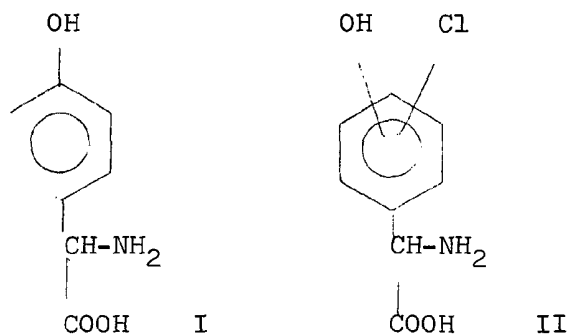
20 10, 11 - cellulose F-plater; visualisering a.

Som bestemt ved høyt effektive kromatografiske fremgangsmåter, består antibiotikum A/16686, isolert og rensert som beskrevet i eksempel 3, av en hovedkomponent som utgjør 70 - 80% mens de gjenværende 30 - 20% kan tilskrives minst to mindre komponenter.

30 Antibiotikum A/16686-hydroklorid isolert som beskrevet i de forangående eksempler er hydrokloridet av det basiske glycopeptid som inneholder klor som skiller seg fra antibiotika som tilhører den klassiske glycopeptidgruppen ved at den inneholder klor og i en rekke av sine aminosyrekomponenter. I virkeligheten antyder aminosyreanalyse av antibiotikum A/16686 etter syrehydrolyse i 6N saltsyre ved 110°C i 6 timer, ved hjelp av en aminosyre-autoanalysator, nærvær av følgende aminosyrer: ornitin (118  $\mu$ g/mg = 0,58  $\mu$ M/mg), aspartinsyre (29,2  $\mu$ g/mg = 0,22  $\mu$ M/mg), treonin (68  $\mu$ g/mg = 0,57  $\mu$ M/mg), glycin

(25  $\mu\text{g}/\text{mg}$  = 0,33  $\mu\text{M}/\text{mg}$ ), alanin (25  $\mu\text{g}/\text{mg}$  = 0,32  $\mu\text{M}/\text{mg}$ ), leudin (41  $\mu\text{g}/\text{mg}$  = 0,31  $\mu\text{M}/\text{mg}$ ) og fenylalanin (42  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . = 0,25  $\mu\text{M}/\text{mg}$ ).

Ytterligere fire topper ble påvist under anvendelse av kolonnen for nøytrale og sure aminosyrer. To av disse fire aminosyrene ble identifisert ved hjelp av gasskromatografi-massespektroskopi etter omdanning til sine tilsvarende metylester-trifluoracetylderviater og ble gitt følgende strukturer:



#### Eksempel 4

##### Isolering av den frie base

Ved behandling av en oppløsning av antibiotikum A/16686-hydroklorid (0,05 g) i vann (3 ml) - etanol (8 ml) med 1,2-epoksybutan (2 ml) dannes en utfelling som etter henstand ved lav temperatur 1 dag utskilles ved sentrifugering, vaskes med etanol og tørkes over  $\text{P}_2\text{O}_5$  under vakuum ved værelsestemperatur noe som gir 0,016 g av den tilsvarende frie base.

Behandling av nevnte antibiotikum A/16686 i form av dens fri base med en farmasøytisk akseptabel uorganisk eller organisk syre fører til dannelsen av det tilsvarende syreaddisjonssalt. Farmasøytisk akseptable syrer er ikke-toksiske syrer som passer for dannelsen av terapeutisk nyttige salter som i og for seg er kjent, f.eks. saltsyre, hydrobromsyre, svovelsyre, fosforsyre, salpetersyre, vinsyre, eddiksyre, ravsyre, melkesyre, glutaminsyre eller metansulfonsyre.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av antibiotikum A/16686 i fri baseform og fysiologisk akseptable syreaddisjonssalter derav, som i form av sitt hydroklorid er kjennetegnet ved

A) at det er et hvitt krystallinsk materiale som smelter ved 224 - 226°C;

B) at det er oppløselig i vann i dimetylformamid; oppløselig i metanol; etanol, propanol og butanol; men uoppløselig i etyleter, petroleumeter og benzen;

C) en omtrentlig elementær sammensetning på 51,73% karbon, 6,34% hydrogen, 9,96% nitrogen, 5,84% klor (totalt innhold), 4,74% klorioner og 1% rest;

D) et infrarødt absorpsjonsspektrum i nujol med følgende observerbare absorpsjonsmaksima (se fig. 1 i de vedheftede tegninger): 3290 - 3070, 2930 og 2860 (nujol), 1765, 1630, 1510, 1455, 1375 (nujol), 1230, 1175, 1130, 1065, 1010, 1015, 980, 840 og 820  $\text{cm}^{-1}$ ;

E) et ultrafiolett absorpsjonsspektrum med følgende absorpsjonsmaksima (se fig. 2 i de vedheftede tegninger):

a) i metanol:

232 nm ( $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 178$ )

265 nm ( $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 107$ )

b) i metanol som inneholder 0,1N HCl:

231 nm ( $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 167$ )

270 nm ( $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 96$ )

c) i metanol som inneholder 0,1N NaOH:

250 nm ( $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 232$ )

295 nm (skulder)

d) i metanol som inneholder pH 7,38 buffer:

231 nm ( $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 167$ )

270 nm ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 96$ )

F) en spesifikk rotasjon,  $[\alpha]_D^{24}$  på  $+49,7^\circ$  ( $c = 0,43\%$  i DMF);

5 G) følgende karakteristiske reaksjoner:

ninhydrin (3% etanolisk oppløsning) negativ

ninhydrin (3% etanolisk oppløsning + natriumacetat) positiv

1%  $\text{FeCl}_3$  - 1%  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  positiv (grønn)

10 Molish positiv

Fehling negativ

Biuret positiv

Anthrone positiv

Millon negativ

15  $\text{H}_2\text{SO}_4$  kons. negativ

$\text{KMnO}_4$  positiv

H) følgende  $R_f$ -verdier i papirkromatografi på Whatman Nr. 1 papir under anvendelse av *S.aureus* ATCC 6538 som en påvisningsorganisme:

| 20 | Elueringssystemer                                                 | $R_f$ -verdier |
|----|-------------------------------------------------------------------|----------------|
|    | 1) n-butanol mettet med Sörensenbuffer pH 6,0                     | 0,00           |
|    | 2) n-butanol mettet med vann som inneholder 2% p-toluensulfonsyre | 0,00           |
|    | 3) n-butanol mettet med vann som inneholder                       |                |
| 25 | 2% ammoniumhydroksyd                                              | 0,00           |
|    | 4) Sörensenbuffer pH 6,0, mettet med n-butanol                    | 0,05           |
|    | 5) n-butanol:metanol:vann 4:1:2                                   | 0,43           |
|    | 6) etylacetat mettet med vann                                     | 0,00           |
|    | 7) n-butanol:eddiksyre:vann 2:1:1                                 | 0,52           |
| 30 | 8) n-butanol:pyridin:vann 4:3:7                                   | 0,87           |

I) De følgende  $R_f$ -verdier i forskjellige tynnsjikt-kromatografiske systemer angitt nedenunder:

|    | Elueringssystemer (volumforhold)            | $R_f$ -verdier |
|----|---------------------------------------------|----------------|
|    | 1) n-propanol:n-butanol:N ammoniumhydroksyd |                |
| 35 | 2:3:4 (övre fase)                           | 0,15           |
|    | 2) n-butanol:eddiksyre:vann 4:2:5           | 0,61           |

155496

22

|    |                                                         |      |
|----|---------------------------------------------------------|------|
| 3) | n-butanol:etanol:0,1N saltsyre                          | 0,61 |
| 4) | kloroform:etanol:10% eddiksyre 4:7:2                    | 0,00 |
| 5) | n-butanol:eddiksyre:vann 4:1:5                          | 0,17 |
| 6) | metanol:10% vandig ammoniumacetat:10%                   |      |
| 5  | ammoniumhydroksyd 10:9:1                                | 0,52 |
| 7) | n-butanol:pyridin:vann:eddiksyre 6:4:3:1                | 0,45 |
| 8) | metanol:10% vandig ammoniumacetat:10%                   |      |
|    | ammoniumhydroksyd 10:9:1                                | 0,11 |
| 9) | 0,25M vandig $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ :acetonitril 1:1 | 0,68 |
| 10 | 10) metanol:10% vandig ammoniumacetat 1:1               | 0,65 |
|    | 11) n-butanol:eddiksyre:vann 4:2:5                      | 0,77 |

1 - 7 på silisiumdioksydgel 60  $\text{F}_{254}$ -plater; 8, 9 på silisium-  
dioksydgel 60  $\text{F}_{254}$  silanisert og 10, 11 på cellulose F-  
15 plater;

J) en aminosyreanalyse, etter syrehydrolyse i 6N saltsyre  
ved 110°C i 6 timer, som antyder nærvær av i det minste  
følgende gjenkjente aminosyrer: ornitin, asparginsyre, treo-  
20 nin, glycin, alanin, leucin, fenylalanin, p-hydroksyfenyl-  
glycin og hydroksy, klor-substituert fenylglycin;  
k a r a k t e r i s e r t v e d at man dyrker stammen  
Actinoplanes sp. ATCC 33076 i et kulturmedium som inneholder  
assimilerbare kilder av karbon, assimilerbare kilder av  
25 nitrogen og uorganiske salter under submerse aerobe be-  
tingelser inntil en vesentlig mengde av antibiotikum A/16686  
er dannet, og utvinner nevnte antibiotikum.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i -  
30 s e r t v e d at man utvinner nevnte antibiotikum  
ved separat ekstraksjon av næringsvæsken og mycelium  
med et organisk oppløsningsmiddel valgt fra lavere  
alkanoler og kloroform, behandler den antibiotiske substans  
utvunnet fra ekstraheringsvæskene med en blanding av kloro-  
35 form:etanol:vann 4:7:2, heller det oljeaktige produkt som  
utskilles i vann, fraskiller det størknede produkt og  
rensner det ytterligere ved silisiumdioksydgel-kolonnekromatografi

155496

23

ved eluering med en blanding av acetonitril: 0,01N HCl 1:1  
slik at antibiotisk A/16686-hydroklorid utvinnes som av-  
saltes ved kromatografi på en kryssbundet dekstrangel-kolonne,  
og ved at man, om ønsket, omdanner antibiotikum A/16686-  
5 hydroklorid videre til den tilsvarende frie base eller til  
et annet fysiologisk akseptabelt syreaddisjonssalt ved  
kjente metoder.

10

15

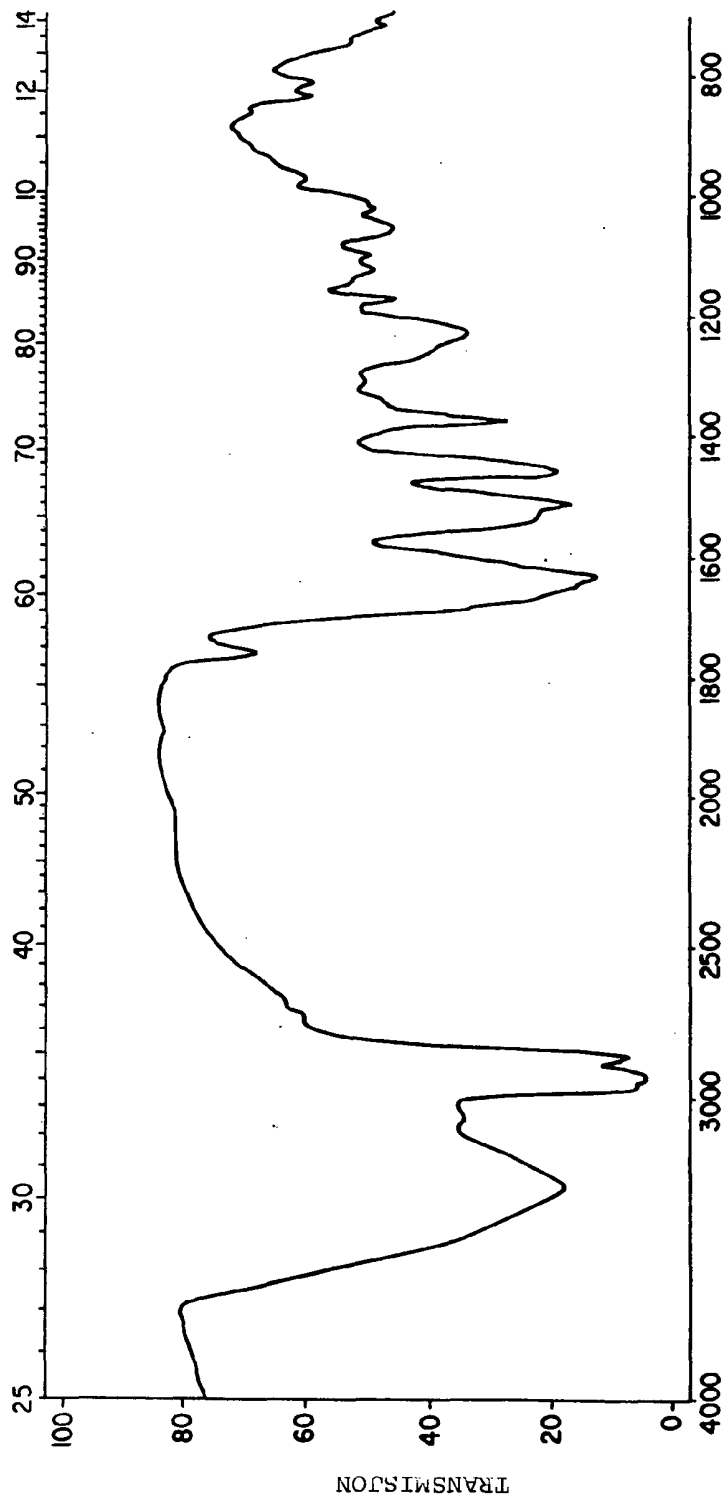
20

25

30

35

I.R. SPEKTRUM (nujol)



BØLGETALL

FIG. I

155496

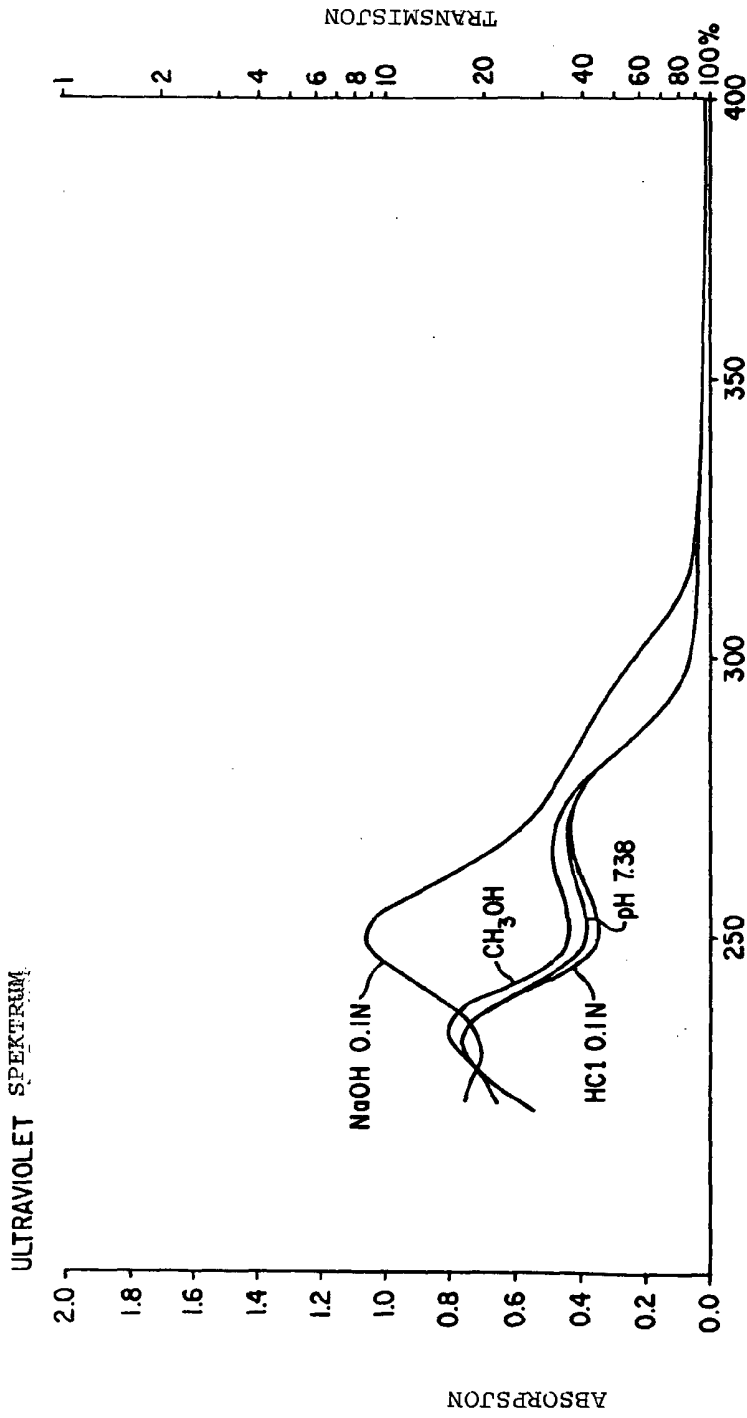


FIG. 2