



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

80046

C

- (45) Patentti myönnetty - Patent beviljats
Patent beviljats 10.01.1980
(51) Kv.1k.4 - Int.cl.4

C 07H 17/08, 1/08, C 07D 313/00
// C 12P 19/62, 17/08

- | | |
|---|---------------------|
| (21) Patenttihakemus - Patentansökning | 860426 |
| (22) Hakemispäivä - Ansökningsdag | 29.01.86 |
| (24) Alkupäivä - Löpdag | 31.05.85 |
| (41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig | 29.01.86 |
| (44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. -
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad | 29.12.89 |
| (86) Kv. hakemus - Int. ansökan | HU85/00034 |
| (32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet | |
| 31.05.84 HU 2125/84 | 26.07.84 HU 2869/84 |

(71) Hakija - Sökande

1. CHINOIN Gyógyszér és Vegyészeti Termékek Gyára Rt, To u. 1-5, Budapest, Hungary, (HU)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Szilágyi, Imre, Apostol u.3, Budapest, Hungary, (HU)
2. Dékány, Gyula, Ipar u. 2, Budapest, Hungary, (HU)
3. Frank, Judit, Szöllő köz 2, Budapest, Hungary, (HU)
4. Horváth, Gábor, Puk Lajosa u. 5/c, Budapest, Hungary, (HU)
5. Kulcsár, Gábor, Szlovák u. 100, Budapest, Hungary, (HU)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä primysiiniantibioottikompleksin erottamiseksi
Förfarande för separering av ett primycinantibiotikakomplex

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

The Journal of Antibiotics, vol. 34 (1981) nro 9, Fiedler, H.-P.,
et al., Metabolic products of microorganisms, 200, p. 1107-1118

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Kyseessä oleva keksintö koskee primysiini-
antibioottikompleksin komponentteja sekä
niiden suoloja ja yksityisten komponent-
tien erottamista kromatografian avulla.
Keksinnön lisäkohteena on synergistinen,
mikrobienvastainen koostumus, joka sisäl-
tää mainittuja komponentteja sekä sen val-
mistusmenetelmä.

Ifrågavarande uppfinning avser komponenterna av
ett primycinantibiotikakomplex och salten därav
och ett förfarande för separering av de
individuella komponenterna genom kromatografi.
Uppfinningen avser ytterligare en synergistisk,
antimikrobiell komposition, vilken innehåller de
nämnda komponenterna, och ett förfarande för
framställning av denna.

Menetelmä primysiiniantibioottikompleksin erottamiseksi

Tekninen alue

5 Kyseessä oleva keksintö koskee spesifistä kromatografista menetelmää aikaisemmin eristämättömien primysiinikomponenttien erottamiseksi primysiiniantibioottikompleksista.

Keksinnön tausta

10 Primysiiniantibiootti voidaan saada kannan *Termonopolyspora galeriensis* viljelmästä, joka kanta kuuluu *Streptomycetaceae*-lajeihin, sen valmistusta käymisen avulla kuvaa HU-patenttijulkaisu nro 513 593.

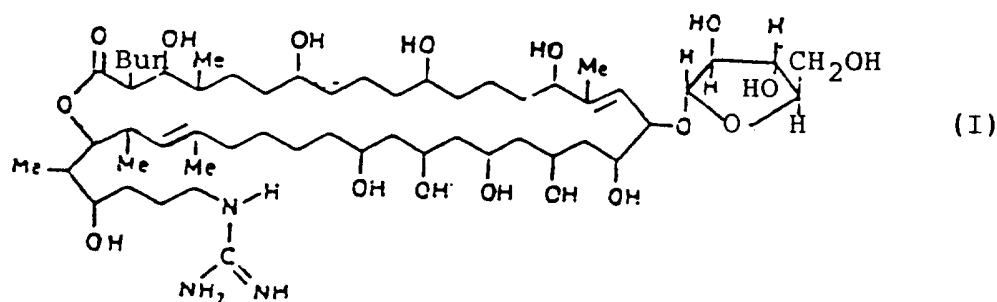
15 Primysiini on makrolidityyppinen antibiootti, joka on identifoitu (J. Chem. Soc., Perkin I. sivu 816, 1974) seuraavalla kaavalla: [5-[18-(α -D-arabinofuranosyylioksi)-2-butyyl-3,7,11,15,19,21,23,25,27-nonahydroksi-4,16,32,34-tetrametyyli-1-okso-oksasykloheksatriakonta-16,32-dien-35-yyli]-4-hydroksiheksyyli]guanidiniumsulfaatti.

20 Primysiini on tehokas antibiootti, jota voidaan käyttää laajalti, se on ennen kaikkea tehokas gram-positiivisia bakteereita vastaan, mutta myös polyresistenttejä, ihmiselle patogeenisiä kantoja vastaan. Resistenssiä ei ole vielä kehittynyt sitä vastaan.

25 Kyseessä olevien patentin hakijoiden suorittamat aiemmat kokeet ovat jo viitanneet siihen, että primysiini ei ole homogeeninen aine. Kromatografian viimeaikainen kehitys on tehnyt mahdolliseksi suorittaa primysiiniseokselle yksityiskohtaisempi, perusteellinen tutkimus.

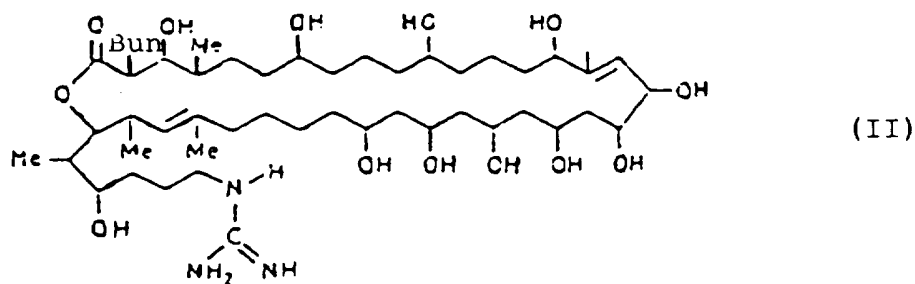
Keksintöä koskeva yksityiskohtainen kuvaus

30 Keksinnön kohteena on menetelmä primysiiniantibioottikompleksin erottamiseksi komponenteiksi A_1 , A_2 , A_3 , C_1 , C_2 , C_3 , B_1 , B_2 ja B_3 , jolloin primysiinin komponentilla A_1 (kinoprissiini) on kaava I



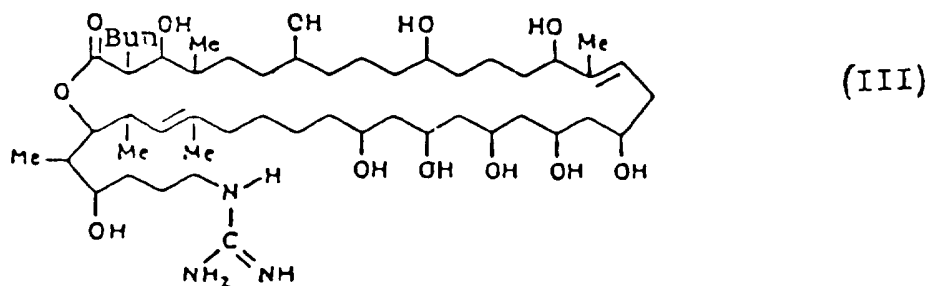
sen R_f -arvo on 0,29 ja molekyylipaino on 1078, ja primy-
 siinin komponentin A_2 (midoprisiini), komponentin A_1 homo-
 10 login, R_f -arvo on 0,31 ja sen molekyylipaino on 1092, ja
 primysiinin komponentin A_3 (metiprisiini), komponentin A_1
 homologin, R_f -arvo on 0,33 ja sen molekyylipaino on 1106,
 ja primysiinin komponentilla C_1 (oksiprisiini) on kaava II

15



sen R_f -arvo on 0,35 ja sen molekyylipaino on 946, ja pri-
 mysiinin komponentin C_2 (oksिमiprisiini), komponentin C_1
 25 homologin, R_f -arvo on 0,37 ja sen molekyylipaino on 960,
 ja primysiinin komponentin C_3 (oksimetiprisiini), kompo-
 nentin C_1 homologin, R_f -arvo on 0,39 ja sen molekyylipai-
 no on 974, ja primysiinin komponentilla B_1 (hydroprisiini)
 30 on kaava III

35



sen R_f -arvo on 0,54 ja sen molekyylipaino on 930, ja primysiinin komponentin B_2 (hymiprisiinini), komponentin B_1 homologin, R_f -arvo on 0,56 ja sen molekyylipaino on 944, ja primysiinin komponentin B_3 (hymetiprisiinini), komponentin B_1 homologin, R_f -arvo on 0,58 ja sen molekyylipaino on 960.

Havaittiin, että käymisen avulla saatu primysiini käsittää kolme pääkomponenttia ja kuusi sivukomponenttia. Kyseessä olevan keksinnön mukainen menetelmä soveltuu näiden komponenttien kvalitatiiviseen sekä mikropreparatiiviseen erottamiseen. Havaittiin myös, että komponentit lisäävät toistensa vaikutusta, so. niillä on synergististä aktiivisuutta.

Ponnistelut kohdistettiin Termopolyspora galeriensis -kannan valmistaman antibioottikompleksin eri komponenttien erottamiseen ja eristämiseen. Testattiin useita kromatografisia menetelmiä ja havaittiin, että ohutlevykromatografia ja pylväskromatografia ovat tehokkaimmat yllä mainittuihin tarkoituksiin.

Ohutlevykromatografian (TLC) alalla kaupallisten kromatografialevyjen käyttö piihappogeelin ollessa adsorbenttikerroksena ja tämän jälkeen suurpaineohutkerroskromatografia sopivin liuotinjärjestelmin antoi komponenttien erottamisessa yllättävän korkean resoluution.

Keksinnön mukaisen menetelmän tunnusomaiset piirteet on kuvattu patenttivaatimuksen 1 tunnusmerkkiosassa.

Kyseessä olevan keksinnön mukaisen erotusmenetelmän edullisen suoritusmuodon mukaisesti Thermopolyspora galeriensis -kannan huovastosta saadun rasvattoman, raa'an, puolipuhtaan tai puhtaan tuotteen varastoliuosta pannaan TLC-kromatografialevylle, kehitetään, täten saadut täplät osoitetaan ja antibioottikompleksin pääkomponentit ja/tai sivukomponentit erotetaan.

Viljelyväliaineesta kootun raa'an, puolipuhtaan tai puhtaan tuotteen varastoliuoksen valmistamiseen käytetään

alkoholien, joissa on 1-4 hiiliatomia, tai niiden seosten vesiliuoksia, edullisesti etanoli:n-butanoli:vesiseosta tilavuussuhteessa 25:25:50. Yllä mainitun seoksen avulla valmistetaan 0,5 - 1 paino/tilavuus-%:inen liuos ja 50-200 µg tutkittavaa ainetta asetetaan levylle.

Kyseessä olevissa kokeissa ensimmäisellä kerralla käytettiin kaupallista piihappogeelikromatografialevyä, tyyppiltään Kieselgel 60 F₂₅₄, (koko: 20 x 20 cm, piihappogeelikerroksen paksuus: 0,2 mm). Tällä levyllä testattiin useita liuotinseoksia primysiiniseoksen parhaan erottumisen saavuttamiseksi.

Paras erottuminen saavutetaan, kun käytetty eluentti koostuu halogenoidu(i)sta hiilivedy(i)stä, orgaanise(i)sta hapo(i)sta, alkoho(e)ista, vedestä ja edullisesti aldehyd(e)istä.

Eluenttina voidaan käyttää seuraavia liuottimia: halogenoituja, alifaattisia hiilivetyjä (esim. kloroformia, dikloorimetaania), orgaanisia happoja, edullisesti alifaattisia karboksyylihappoja, joissa on 1-4 hiiliatomia (esim. muurahaishappoa, etikkahappoa), halogenoituja, alifaattisia karboksyylihappoja (esim. monokloori-, dikloori- ja trikloorietikkahappoa, trifluorietikkahappoa), aromaattisia karboksyylihappoja (esim. bentsoehappoa), orgaanisia sulfonihappoja (esim. metaanisulfonihappoa, tolueenisulfonihappoa), alkoholeja, edullisesti alifaattisia, suora- tai haaraketjuisia alkoholeja, joissa on 1-10 hiiliatomia (esim. metanolia, etanolia, n-butanolia, isopropanolia), aldehydejä, edullisesti alifaattisia aldehydejä, joissa on 1-4 hiiliatomia (esim. 36 % formaldehydiä) tai niiden vettä sisältäviä seoksia.

Primysiiniantibioottikompleksin komponenttien erottamiseen seuraava liuotinjärjestelmä osoittautui kaikkein tehokkaimmaksi:

I. n-butanolin, jääetikan ja veden seoksen (60:10:30) ylempi kerros,

II. n-butanolin, metanolin, jääetikan ja veden seos 75:2:8:15,

III. kloroformin, metanolin, jääetikan ja veden seoksen (45:30:15:20), alempi kerros,

5 IV. kloroformin, metanolin, muurahaishapon ja veden seos 50:35:14:1,

V. kloroformin, metanolin, muurahaishapon, veden, formaldehydin ja n-butanolin seos 130:53:6:9:3:3,

10 VI. kloroformin, metanolin, muurahaishapon, veden, formaldehydin ja n-butanolin seos suhteessa 160:53:6:9:3:3,

VII. 15 paino-osaa monokloorietikkahappoa liuotettuna kloroformin, metanolin, veden, formaldehydin ja n-butanolin seokseen, jonka seossuhde oli 125:53:9:3:3,

15 VIII. liuotinjärjestelmän III, kloroformin ja metanolin seos suhteessa 15:2:1.

Liuotinseoksilla I ja II on suurempi kapasiteetti, kun taas liuotinseokset III, IV, V, VI, VII ja VIII ovat selektiivisempiä ja kehitysaika on edullisesti lyhyempi, 20 mikä on edullista teollisten sarjakokeiden näkökulmasta. Liuotinjärjestelmät IV, V ja VI ovat kemiallisesti metastabiileja, mikä johtuu metyyliformiaatin muodostumisesta, kun taas liuotin III on fysikaalisesti metastabiili. Iso-termisten käyriensä mukaisesti järjestelmää IV voidaan 25 käyttää 16-24 tunnin kuluessa laskettuna sen valmistumisesta, järjestelmiä V, VI, VII ja VIII voidaan käyttää heti sen jälkeen kun komponentit on lisätty toisiinsa, kun taas järjestelmää III voidaan säilyttää yhden viikon ajan, jos lisätään 1-2 % metanolia. Liuotinjärjestelmät IV, V, 30 VI, VII ja VIII ovat edullisia. Eluentissa IV voidaan sopiva erottuminen saavuttaa, jos kehitys suoritetaan kahdesti, kun antibioottikompleksin eri komponenttien R_f -arvot ovat hyvin samankaltaiset, kun taas jopa yksi kehitys voi johtaa sopivaan erottumiseen, jos käytetään liuotin- 35 järjestelmiä V, VI tai VII. Edullisimmat liuotinjärjestel-

mät ovat järjestelmät V, VI, VII ja VIII. Liuotinta V voidaan käyttää ohutlevykromatografiaa varten normaaleille kromatografialevyille, kun taas eluenttia VI voidaan käyttää HPTLC-levyille. Liuotinjärjestelmä VII soveltuu kyl-
5 lästetyille levyille ja liuotinseosta VIII käytetään edullisesti Lobar-pylväälle.

Primysiiniaineseoksen komponentit, jotka oli erotettu ohutlevykromatografian avulla, voidaan ilmaista kemiallisin menetelmin ja/tai bioautografian avulla.

10 Kemiaalliseen ilmaisuun kaikista tehokkaimpia ovat vanilliinirikkihappo, klooritoluidiini, fosfomolybdeenihappo, bentsidiini, muunnettu Sakaguchin reagenssi ja/tai etanolia sisältävä rikkihappo, jotka tunnetaan aiempien tutkimusten perusteella ja/tai lämpökäsittely, jotka an-
15 tavat spesifisen, tunnusomaisen ja herkän värireaktion. Täplät voidaan paikantaa edullisesti upottamalla kehitys-kromatografialevyt sopiviin reagensseihin ja kuivauksen jälkeen joissakin tapauksissa ne voidaan arvioida Shimad-
20 zudensitometrillä.

20 Bioautografinen kehitys suoritetaan seuraavalla tavalla:

Levy leikataan suikaleisiksi kohtisuoraan täplien sivua vastaan ohutlevykromatografian kehityksen sekä kemiallisen ilmaisun jälkeen. Tällä välin valmistetaan agar-
25 levy ja ympätään *Bacillus subtilis* ATCC 6633:lla. Leikattu nauha painetaan agarlevylle, sen jälkeen kun täplät on merkitty vastakkaiselle puolelle tai kaistale leikataan kohtisuoraan kahdeksi palaksi ja ainoastaan yksi paloista painetaan agarlevylle. Tämän jälkeen agarlevyjä inkuboidaan 37°C:ssa 20-24 tunnin ajan. Termostaatista pois-
30 tettaessa voidaan hyvin havaita täplät, joissa bakteerit eivät voineet kasvaa. Täplät, joissa bakteereiden kasvu oli inhibioitunut, voitiin identifioida suikaleen merkityn vastakkaisen puolen perusteella, jos käytetään koko kaistaa tai toisen nauhapuolikkaan perusteella, joka oli aset-
35 tettu alkuperäisen kaistan rinnalle.

Yllä esitetyn menetelmän valaisemiseksi kuviossa 1 esitetään kuva ohutlevykromatografiasta, joka saatiin liuotinjärjestelmällä IV suoritettun kaksoiskehityksen jälkeen. Eri täplät, jotka saatiin eri viljelyväliaineista
5 saatujen primysiininäytteiden kehityksen jälkeen (täplät 1-4) tukevat hyvin käsitystä, että primysiini on seos. Kuviossa voidaan nähdä myös eristetyt pääkomponentit A_1 , B_1 ja C_1 sekä kompleksin bioautogrammi.

Kun primysiiniseosta kehitetään kerran liuotinjärjestelmällä V, seos erottuu seuraaviksi komponenteiksi,
10 joita luonnehtivat suluissa esitetyt R_f -arvot, A_1 (0,29), A_2 (0,31), A_3 (0,33), C_1 (0,35), C_2 (0,37), C_3 (0,39), B_1 (0,54), B_2 (0,56), B_3 (0,58). Voidaan havaita myös joitakin muita, pieniä tunnistamattomia komponentteja.

15 Erottumisen tehokkuutta voidaan lisätä käyttämällä HTPLC-levyä. Sitten käytetään eluenttina liuotinjärjestelmää VI sopivan erottumisen aikaansaamiseksi.

Samoin voidaan saada erinomainen erottuminen aikaan, kun Kieselgel 60 F_{254} -kromatografialevy kyllästetään sopivalla metallisuolalla, edullisesti käytetään hopeasuolaa vaikeasti saatavissa olevan ja kalliin HPTLC-levyn sijaan. Kyllästyksen aikana kromatografialevy upotetaan vesipitoiseen ja/tai orgaaniseen liuottimeen, esim. metallisuolan asetonitriililiuokseen, edullisesti käytetään 20-%:ista vesiliuosta. Metallisuoloina voidaan käyttää edullisesti hopeasuoloja, esim. hopeanitraattia, rautasuoloja, esim. rauta(II)fosfaattia. Kyllästetyn kerroksen pintakosteus kuivataan, tämän jälkeen levy aktivoidaan 120°C:ssa tunnin ajan poistamalla valo. Kromatogrammin
25 kehittämiseen liuotinjärjestelmät V ja VI ovat erittäin käyttökelpoisia myös tässä tapauksessa, mutta paras erottuminen voidaan saavuttaa, kun käytetään liuotinjärjestelmää VII. Erottumisen tehokkuus lisääntyy tässä järjestelmässä voimakkaasti siten, että yksityisten komponenttien
30 R_f -arvojen ero lisääntyy.

Havaittiin, että primysiini on kolmen pääkomponentin (A_1 , B_1 , C_1) sekä useamman sivukomponentin seos.

Yksityiset komponentit kiteytyvät yhdessä liukoisuusolosuhteista riippuen. Antibioottikompleksin prosentuaaliseen koostumukseen voidaan vaikuttaa muuttamalla käymisolosuhteita (elatusainetta, viljelyaikaa sekä lämpötilaa, ilmaston astetta jne.).

Ohutlevykromatografian eluution etuja parannettiin suorittamalla primysiiniseoksen preparatiivinen erottaminen pylväskromatografisella menetelmällä. Tutkittiin partitiio- ja adsorptiokromatografiaa.

Kyseessä olevan keksinnön mukaisesti partitiopylväskromatografinen erottaminen suoritetaan käyttämällä kiinteää kantaja-ainetta (Sephadex LH-20) sekä vastavirtaa (pisaravastavirtakromatografiaa, jota edelleen nimitetään DCCC:ksi).

Tähän menetelmään voidaan käyttää samoja liuotinjärjestelmiä kuin ohutlevykromatografiaan, so. kaksieroksisia liuotinjärjestelmiä, jotka sisältävät orgaanisia happoja ja/tai kloorattuja hiilivetyjä ja/tai alkanoleja, joissa on 1-4 hiiliatomia ja/tai vettä. Liuotinjärjestelmä I on edullinen (kiinteäfaasiosuus), jossa kiinteää kantaja-ainetta (Sephadex LH-20) turvotetaan kahden päivän ajan, tämän jälkeen se täytetään kromatografiapylvääseen ja sitä pestään n-butanolin, jääetikan ja veden seoksen (30:10:60) alemmalla jakeella (liikkuva jae). Primysiini liuotetaan liikkuvan ja kiinteän faasiosuuden seokseen (suhde 20:1), suodatetaan lasisuodattimella ja pannaan pylvääseen. Alempaa, liikkuvaa jaetta käytetään eluenttina, edullisesti käyttämällä peristalttista pumppua sekä kerääjää. Jakeiden koostumusta ja puhtautta kontrolloidaan ohutlevykromatografian avulla, erottumista tarkastellaan ultraviolettivalossa 206 nm:ssä.

Jakeet, joilla on sama koostumus, yhdistetään ja niille suoritetaan tyhjötislaus ja saannot määritetään.

Tuotteesta, joka on pantu pylvääseen, saadaan takaisin 90-95 %.

5 Eluaatti, joka sisältää pääasiallisesti pääkomponentteja A_1 , B_1 ja C_1 , puhdistetaan edelleen kromatografian avulla.

10 Komponentille A_1 suoritettiin kromatografia liuotinjärjestelmällä I, komponentti B_1 saatiin liuottimella, joka sisälsi bentseeniä, n-butanolia, metanolia, jääetikkaa sekä vettä, kun taas komponentti C_1 erotettiin DCCC-menetelmällä liuotinjärjestelmän avulla, joka koostui kloroformista, metanolista, jääetikasta ja vedestä.

15 Havaittiin, että primysiiniseoksen komponentit voidaan edullisimmin erottaa pylväskromatografian avulla lieväen paineen alla käyttämällä sopivaa piihappogeelipakkausta. Testattiin seuraavat pylväät: piihappogeelipylväs, jonka testaajat itse täyttivät; käyttöön valmis Lobar-pylväs (Merck), sopivalla metallisuolalla kyllästetyllä piihappogeelillä täytetty pylväs (samalla tavoin kuin ohutkerroskromatografiaalevy).

20 Erottumisen tehokkuus lisääntyy voimakkaasti, jos käytetään Lobar-pylvästä tai tämän pylvään puuttuessa pylvästä, joka on täytetty kyllästetyllä piihappogeelillä, pylvään sijasta, joka on täytetty puhtaalla piihappogeelillä. Vähäinen ylipaine (1,1 - 5,0 atm = 111,43 - 506,5 kPa) voi olla käyttökelpoinen Lobar-pylvään sekä pylvään tapauksessa, joka on täytetty kyllästetyllä geelillä.

30 Kyllästyksen aikana piihappogeeli sekoitetaan sopivan metallisuolan kanssa, edullisesti se lietetään metallisuolan liuokseen, joka on valmistettu orgaanisen liuotimen kanssa, tämän jälkeen liuotin valinnaisesti poistetaan ja kyllästettyä piihappogeeliä voidaan käyttää pylvään pakkaukseen. Pylväs täytetään kyllästetyllä piihappogeelillä, joka on lietetty orgaaniseen liuottimeen, edullisesti halogenoituun, alifaattiseen hiilivetyyn
35 (esim. kloroformiin) ja tiivistetään vähäistä ylipainetta

käyttäen (1,1 - 2,5 atm = 111,43 + 253,25 kPa). Jos metallisuolana käytetään hopeasuolaa, on toivottavaa suojata pylväs valolta hopeasuolan pelkistymisen estämiseksi.

5 Erotettava primysiiniseos tai sen erotetut komponentit pannaan pylvään päähän eluenttina käytettyyn liuotineseokseen liuotettuna ja adsorboidaan vähäisen ylipaineen avulla.

10 Erotettava aineoseos voi olla teollinen primysiinisulfaatti tai muu primysiinisuola, edullisesti primysiiniasettaatti tai primysiinin monoklooriasetaatti, joka on valmistettu primysiinisulfaatista HU-patenttijulkaisun nro 257/84 mukaisesti.

15 Liuottimina voidaan käyttää liuotinjärjestelmiä V, VI, VII ja VIII. Paras erottuminen voidaan saavuttaa, jos Lobar-pylvään eluointiin käytetään liuotineseosta V, VI tai VIII, kun taas liuotineseos VII on edullisin metallisuolalla kyllästetyllä piihappogeelillä täytettyä pylvästä eluotaessa.

20 Kootaan jakeet, joiden tilavuus on sama virtausnopeuden ollessa vakio ja niiden koostumusta kontrolloidaan ohutlevykromatografian avulla. Jakeet, jotka sisältävät aineen, jolla on sama R_f -arvo, yhdistetään ja yksityiset komponentit otetaan talteen liuotinsaostuksen avulla.

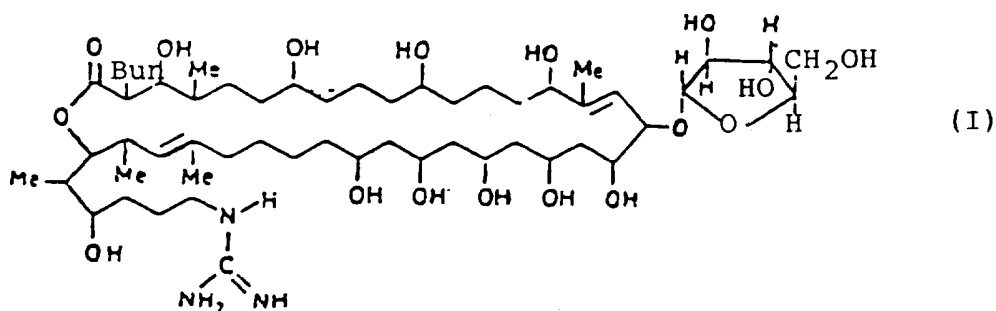
25 Pylväskromatografian avulla suoritettua erottamisen tuloksena eristettiin seuraavat komponentit:

- A_1 = kinoprisiini (R_f = 0,29)
- A_2 = midoprisiini (R_f = 0,31)
- A_3 = metiprisiini (R_f = 0,33)
- C_1 = oksiprisiini (R_f = 0,35)
- 30 C_2 = oksimiprisiini (R_f = 0,37)
- C_3 = oksimetiprisiini (R_f = 0,39)
- B_1 = hidroprisiini (R_f = 0,54)
- B_2 = himiprisiini (R_f = 0,56)
- B_3 = himetiprisiini (R_f = 0,58)

35 Erotetut komponentit tutkittiin ja saatiin seuraavat tulokset:

1. A_1 = kinoprisiini (R_f = 0,29)

Molekyyllipaino mitattuna massaspektrometrian (fast atom bombardment, FAB-MS) avulla on 1078 (kuvio 3). Eristetty komponentti A_1 havaittiin kemiallisesti yhdenmukaiseksi analysoimalla se ohutlevykromatografialla ja FAB-MS:n avulla. Sen rakennetta, joka on määritetty molekyyllipainon, IR:n ja yksi- ja kaksidimensionaalisten ^1H - ja ^{13}C NMR-spektrin perusteella, kuvaa kaavaa I.



2. A_2 = midoprisiini (R_f = 0,31) ja A_3 = metiprisiini (R_f = 0,33)

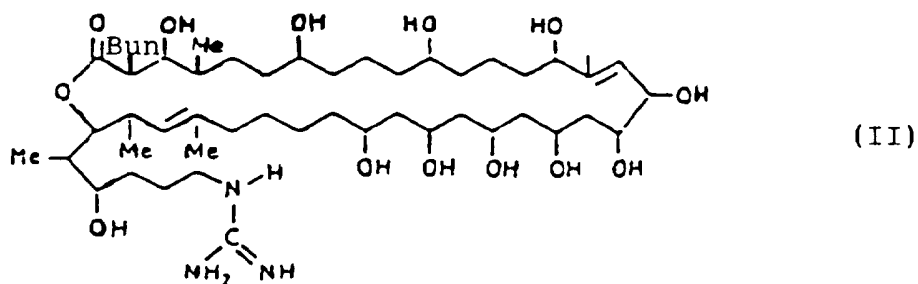
20 Molekyyllipaino (FAB-MS) : 1092 ja 1106.

Molekyyllipainon, kemiallisen menetelmän ja ^1H sekä ^{13}C NMR -spektroskooppisten tutkimusten, jotka olivat yksi- ja kaksidimensionaalisia, perusteella havaittiin, että komponentit A_2 ja A_3 ovat homologisia komponentin A_1 kanssa, A_2 :n sivuketju on metyleeniryhmän verran pitempi, kun taas A_3 :n sivuketju on etyleeniryhmän verran pitempi kuin A_1 :n sivuketju.

3. C_1 = oksiprisiini (R_f = 0,35)

Molekyyllipaino: 946 (FAB-MS).

30 Yllä esitettyjen analyttisten menetelmien perusteella yhdistettä C_1 voidaan kuvata seuraavalla kaavalla II.



Komponentin C_1 ja A_1 välinen ero on se, että sokeriosan sijasta hydroksyyliiryhmä on sidottu hiiliatomiin asemassa 18.

4. C_2 = osimiprisiini (R_f = 0,37) ja C_3 = oksime-
5 tiprisiini (R_f = 0,39)

Molekyylipaino (FAB-MS): 960 ja 974.

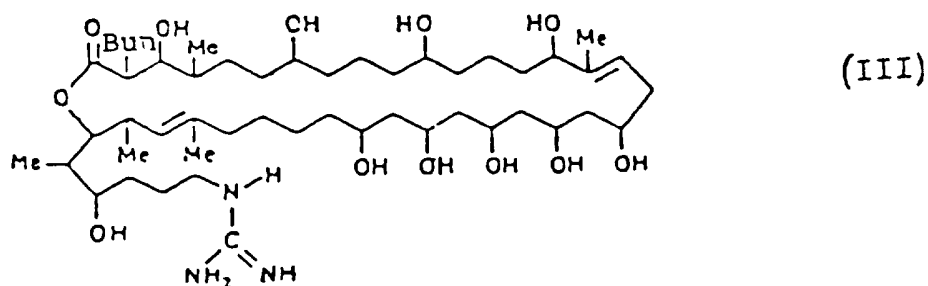
Yllä esitettyjen analyttisten menetelmien perus-
teella havaittiin, että komponentin C_2 sivuketju on mety-
leeniryhmän verran pitempi, kun taas C_3 :n sivuketju on
10 etyleeniryhmän verran pitempi kuin C_1 :n sivuketju.

5. B_1 = hydroprisiini (R_f = 0,54)

Molekyylipaino (FAB-MS): 930.

Yllä esitettyjen analyttisten menetelmien perus-
teella yhdiste voidaan kuvata kaavalla III.

15



- jossa sokeriosan sijasta on vety sidottu hiiliatomiin ase-
25 massa 18.

6. B_2 = hymiprisiini (R_f = 0,56) ja B_3 = hymetipri-
siini (R_f = 0,58)

Molekyylipaino (FAB-MS): 944 ja 960.

Yllä esitettyjen analyttisten menetelmien perus-
30 teella havaittiin, että komponentin B_2 sivuketju on mety-
leeniryhmän verran pitempi ja komponentin B_3 sivuketju on
etyleeniryhmän verran pitempi kuin B_1 :n sivuketju.

Tavalliset fysikaaliset vakiot (sulamispiste, alku-
aineanalyysiä koskevat tiedot, optinen aktiivisuus, UV- ja
35 IR-spektri jne.) eivät ole yksityisille yhdisteille luon-
teenomaisia. Esim. yksinkertaisten komponenttien sulamis-

piste on 160-170°C, niiden seoksen sulamispiste on 167-168°C. Alkuaineanalyysiä koskevat tulokset eivät myöskään ole yksityisille komponenteille luonteenomaisia, vaikka niillä on samanlainen rakenne, suuri molekyyllipaino, siitä
5 syystä erot alkuaineanalyysiä koskevissa tiedoissa ovat mittausvirheen alueella. Pääosa primysiiniseoksesta käsittää komponentteja A_1 , B_2 sekä C_3 , sen tähden niitä nimitetään pääkomponenteiksi. Muita komponentteja, joita on läsnä vähemmässä määrin, nimitetään sivukomponenteiksi.

10 Primysiinikomponentit eristettiin sulfaatin tai muiden, sulfaatista eroavien suolojen, edullisesti asetatiinin tai monoklooriasetaatin muodossa, lähtöaineena käytetyn primysiinin rakenteesta riippuen.

Eristettyjen primysiinikomponenttien sulfaattisuolat voidaan muuttaa muiksi suoloiksi erilaisten orgaanisten ja epäorgaanisten happojen avulla, kuten kuvataan HUPa tenttihakemuksessa nro 2571/84.

Primysiiniseoksen sekä kolmen sivukomponentin (A_1 , B_1 ja C_1) mikrobienvastainen spektri esitetään taulukossa
15 0 (ks. myöhemmin sivulta 24). Taulukko sisältää MIC-arvot ($\mu\text{g/ml}$) ihmiselle patogeenisillä, polyresistenteillä kannoilla mitattuina. Erilaiset arvot tarkoittavat sitä, että kolme pääkomponenttia käyttää mikrobienvastaista aktiivisuutta eri tavoin, ts. ne vaikuttavat mikro-organismin eri
20 kohtiin.

Havaittiin myös, että komponentit vahvistavat toistensa vaikutusta, so. niillä on potensoivaa synergismiä. Pääkomponenttien synergistisen vaikutuksen ja oletetun erilaisen vaikutuskohdan perusteella voidaan saavuttaa seuraavia, edullisia vaikutuksia komponenttien yhdistelmää käyttämällä:
25

1. Vaikuttamalla samanaikaisesti patogeenien metaboliaan eri kohdissa, "cid-vaikutus", ts. mikro-organismin tuhoaminen voidaan saavuttaa varmemmin, mikä on edullisempaa kuin staattinen vaikutus, ts. pelkkä mikro-organismien kasvun ehkäisy.
30

2. Jos samanaikaisesti vaikutetaan metabolian eri teihin, ei voi kehittyä resistenssiä aktiivista ainesosayhdistelmää kohtaan tai se kehittyy hitaasti.

5 3. Yksityisten komponenttien käytettyä määrää voidaan huomattavasti vähentää. Siitä on etuna, että haitalliset sivuvaikutukset vähenevät tai häviävät täydellisesti. Tämä vaikutus on erittäin edullinen terapeuttiselta kannalta. Kun annetaan vähemmän aktiivista ainetta, kustannukset myös laskevat, mikä on edullista taloudelliselta
10 kannalta.

Synergistisessä koostumuksessa voidaan käyttää pri-mysiinin pääkomponentteja (A_1 , B_1 , C_1) sekä sivukomponentteja tai niiden johdannaisia, edullisesti suoloja. Koostumus voi käsittää kahta tai kolmea eri komponenttia.

15 Jos koostumuksessa käytetään kahta pääkomponenttia, komponenttien painosuhte on alueella 5:95 - 25:75, kun taas jos käytetään kolmea komponenttia, komponenttien painosuhte on alueella 4:3:3 - 7:1:2. Synergististen koostumusten edullisia suoritusmuotoja valaistaan seuraavin esimerkein, joissa on myös esitetty MIC-arvot, jotka on mitattu käyttämällä erilaisia mikro-organismikantoja sekä
20 additiivisen ja synergistisen vaikutuksen aste. Termillä "additiivinen vaikutus" tarkoitetaan, että komponenttien vaikutus summautuu, täten esimerkiksi lisäämällä yhden
25 komponentin MIC-arvon puolikas toisen komponentin MIC-arvon puolikkaaseen, saadaan kahden aktiivisen aineen yhdistelmän MIC-arvo. Kun mikrobinvastainen aktiivisuus ylittää additiivisen vaikutuksen, joka johtuu komponenttien edullisesta vuorovaikutuksesta, tulee näkyviin potensioiva synergismi ja täten saatu vaikutus on synergistinen vaikutus.
30

MIC-arvot määritettiin Difco-Buillon-ravintoalustalla. Arviointi suoritettiin sen jälkeen, kun oli inkuboitu 37°C:ssa 24 tunnin ajan ja ympättiin $5 \cdot 10^5$ itiötä/ml. Esimerkeissä 13-25, 197 tapausta selvästi valaisivat, että koostumus, joka sisältää enemmän aktiivisia ai-
35

neosia, on aktiivisuudeltaan synergistinen, täten aktiivisia aineita voidaan antaa vain osa tai pieni osa alkuperäisestä määrästä, jotta saavutetaan sama vaikutus.

Keksinnön mukaisesti saatuja primysiinikomponentteja voidaan antaa yksinään tai toistensa kanssa sekoitetuina, valinnaisesti yhdessä muiden farmaseuttisesti aktiivisten aineiden kanssa. Niitä voidaan antaa yksinään, mutta yleensä niitä annetaan farmaseuttisen kantaja-aineen kanssa, joka valitaan annostelutavan ja farmaseuttisen normaalikäytännön perusteella. Aktiivista ainetta voidaan antaa kiinteinä annosmuotoina, kuten esimerkiksi kapselina, tabletteina, rakeina, peräpuikkoina, puolikiinteässä muodossa, kuten esimerkiksi voiteina tai geeleinä tai nestemäisinä annosmuotoina, kuten esimerkiksi injektoitavina liuoksina, suspensioina tai siirappeina. Edullisia annosmuotoja ovat geelit, voiteet, kirurgiset ihojauheet, ruiskeet, suspensiot ja jauheampulli-liuotinampulli-yhdistelmät.

Koostumuksia voidaan antaa suun kautta, parenteraalisesti, peräaukon kautta tai paikallisesti (esim. voiteet). Ne sisältävät tavallisia farmaseuttisia kantaja-aineita (esim. magnesiumkarbonaattia, magnesiumstearaattia, tärkkelystä, talkkia, vettä jne) tai uusia kantaja-aineita, esim. syklodekstriiniä ja valinnaisia täyteaineita, hajottavia aineita, emulgoimisaineita jne.

Suun kautta suoritettavaan antamiseen sopivia annosmuotoja ovat esimerkiksi tabletit, rakeet ja kapselit. Synergistisiä koostumuksia, jotka sisältävät enemmän aktiivista ainetta, voidaan käyttää myös eläinlääkinnällisessä käytössä, esim. rehuun sekoitetun nesteen muodossa. Parenteraaliseen annosteluun sopivat annosmuodot voivat olla vesiemulsioita, liuoksia tai suspensioita. Ihojauheita, voiteita, vesi- tai öljyemulsioita tai siteitä, jotka on kyllästetty näillä emulsioilla tai suspensioilla tai ruiskeita voidaan käyttää paikalliseen antamiseen.

Kyseessä olevaa keksintöä valaistaan seuraavin esimerkein, jotka eivät rajoita keksintöä.

Esimerkki 1

Primysiinin erottaminen Kieselgel-ohutlevykromatografian avulla kaksinkertaista kehitystä käyttäen

0,5-%:inen liuos primysiinikompleksia valmistetaan seokseen, jossa on n-butanolia, etanolia ja vettä tai metanolia suhteessa 1:1:2. 10 µl (50 µg aktiivista ainetta) liuosta tiputetaan Kieselgel-levyille (DC muovikalvo, Kieselgel 60 F₂₅₄ tai DC-alumiinikalvo Kieselgel 60, jotka Merck on valmistanut, kerrosvahvuus: 0,2 mm). Käytetään liuotinjärjestelmää IV eluenttina, kromatogrammi kehitetään 16 cm:n etäisyydelle. Kehitys toistetaan. Täplät tehdään näkyviksi värireaktion avulla ja arviointi suoritetaan densitometrin avulla 590 nm:ssä. Biologinen aktiivisuus ilmaistaan bioautografisella pitoisuusmäärittelyksellä.

Viljelyalustan koostumus, jota käytetään bioautografisessa pitoisuusmäärittelyksessä, on seuraava:

	Lihauute (Difco)	3 g
20	Bacto-peptoni (Difco)	5 g
	Natriumkloridi	5 g
	Dinatriumvetyfosfaatti	10 g
	Kaliumdivetyfosfaatti	1 g
	Bacto-agar (Difco)	18 g
25	Tislattu vesi	1 000 ml:ksi

Viljelyalustaa inkuboidaan 121°C:ssa, jonka jälkeen pH säädetään 8,0:ksi. 130 ml viljelyalustaa, jonka lämpötila on 53°C, täytetään steriileihin lasimaljoihin (18 x 25 cm) ja Bacillus subtilis ATCC 6633:n itiösuspensiota lisätään suhteessa 1:2 000. Kromatogrammista leikataan 5 mm:n levyiset kaistaleet, kuivataan liuottimen suhteen ja asetetaan agarlevyn pinnalle sekä inkuboidaan 18-24 tunnin ajan 37°C:n lämpötilassa.

Esimerkki 2

Primysiiniseoksen erottaminen Kieselgelillä yksin-

kertaista ohutlevykromatografista kehitystä käyttämällä

Noudatetaan esimerkin 1 mukaista menetelmää, paitsi että liuotinseosta V käytetään eluenttina, sen tähden kehitys suoritetaan kerran.

5 Esimerkki 3

Primysiiniseoksen erottaminen HPTLC-levyllä yksinkertaista kehitystä käyttäen

4 µl (20 µg aktiivista ainetta) 0,5-%:ista liuosta, joka on valmistettu esimerkin 1 mukaisesti, pannaan HPTLC (Merck) levyille ja kehitetään 18 cm:n etäisyydelle. Muut vaiheet ovat samat kuin esimerkissä 1.

Esimerkki 4

Primysiiniseoksen erottaminen kyllästetyllä Kieselgel-levyllä yksinkertaista kehitystä käyttäen

15 Noudatetaan esimerkin 1 mukaista menetelmää, paitsi että kehitykseen käytetään liuotinseosta VII ja Kieselgel 60 F₂₅₄-levy impregnoidaan metallisuolalla, tässä yhteydessä edellä kuvatun menetelmän mukaisesti.

20 Muut vaiheet ovat samat kuin on kuvattu esimerkissä 1.

Esimerkki 5

Primysiiniseoksen erottaminen preparatiivisella ohut levykromatografisella levyllä

25 2 ml 1-%:ista tutkittavan näytteen liuosta pannaan PSC-valmislevylle, Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck). Levyjä kehitetään liuotinjärjestelmällä IV useita kertoja. Jos 3-3 cm:n levyinen suikale, joka on asetettu lasilevyjen oikealle ja vasemmalle sivulle, upotetaan esikuumennettuun Sakaguchin reagenssiin, täplät tulevat näkyviin kirkkaanpunaisina täplinä huoneen lämpötilassa. Erilliset jakeet raaputetaan ja eluoidaan mikroperkolaatiosuppilossa 10-%:isella etikkahappoisella metanolilla, kunnes ei havaita mitään reaktiota rikkihappoista vanilliinia lisättäessä. Eluaatti tislataan tyhjössä, kuiva jäännös liuotetaan liuotinjärjestelmään I ja uutetaan viidesosatilavuudella tislattua vettä useita kertoja.

Antibioottikomponentit ovat ylemmässä kerroksessa, kun taas "kuolleen painon kerros" ("layer dead weight") on alemmassa jakeessa. Ylempää jaetta haihduttamalla saadut komponentit puhdistetaan edelleen esimerkin 1 menetelmän mukaisesti.

Esimerkki 6

Primysiinin "A"-komponenttien erottaminen partitiopylväskromatografian avulla

Käytetty liuotinjärjestelmä:

- 10 kiinteäfaasiosuus: liuotinjärjestelmä I
liikkuva faasi: n-butanolin, jääetikan ja veden seoksen (suhteessa 30:10:60) alempi jae

Pylvään valmistus:

- 15 720 g Sephadex LH-20 geeliä turvotetaan 3 l:ssa liuotinjärjestelmää I yhden päivän ajan. Suspensio täytetään kromatografiapylvääseen (58 x 1 150 mm), annetaan laskeutua, tämän jälkeen se pestään 1,5 l:lla liikkuvaa jaetta.

Kromatografinen menetelmä:

- 20 2 g primysiiniä liuotetaan seokseen, jossa on 300 ml liikkuvaa jaetta ja 15 ml kiinteäfaasiosuutta, liuotin suodatetaan ja pannaan pylvääseen. Eluointi suoritetaan liikkuvan faasin avulla virtausnopeudella 50-60 pisaraa minuutissa.

- 25 Yleensä kootaan jakeet, jotka ovat tilavuudeltaan 17 ml (= 800 pisaraa) ja eluointia jatketaan, kunnes saadaan 300-400 jaetta.

- 30 Kiinteäfaasista Sephadex LH-20 -pylvästä voidaan käyttää 3-4 kertaa, jos faasi vaihdetaan. Geeli voidaan regeneroida seuraavasti: se lietetään asetoniin, suodataan, palautusjäähdytetään kahden tunnin ajan siten, että asetonia on höyrytilassa, tämän jälkeen se kuivataan. Eri jakeissa olevat aineet identifioidaan ohutlevykromatografian ja UV-spektroskopian avulla.

Komponenttien eristäminen:

Jakeet, joiden havaitaan sisältävän samaa ainetta analyysitulosten (UV ja TLC) perusteella, yhdistetään.

Jäännös, joka saadaan liuottimen haihduttamisen jälkeen,
5 liuotetaan metanolin ja bentseenin seokseen, jonka suhde on 2:1 ja se haihdutetaan jälleen.

Täten saadaan 743 mg komponenttien A seosta sekä 570 mg seosjaetta, joka sisältää komponentteja A sekä C. B-komponentit jäävät pylvääseen tässä järjestelmässä, ne
10 voidaan liuottaa liuotinjärjestelmällä I, jolloin saadaan 480 mg komponenttia B. A-komponenttiseoksen lisäkromatografia yllä mainituissa olosuhteissa antaa pääkomponentin A_1 , jonka puhtaus on suurempi kuin 98 %.

Esimerkki 7

15 Primysiinin B-komponenttien erottaminen partitiopylväskromatografian avulla

Komponentit B, jotka on saatu esimerkissä 6 kuvatulla tavalla, puhdistetaan edelleen yllä kuvatun kromatografisen menetelmän avulla, paitsi että eluenttina käytetään ns. "B-selektiivistä" liuotinjärjestelmää. Täten voidaan saada pääkomponentti B_1 , jonka puhtaus on suurempi kuin 96 %.

"B-selektiivisen" liuotinjärjestelmän koostumus on seuraava:

25 liikkumaton faasi: bentseenin, n-butanolin, metanoli-jää-etikkahapon, veden seoksen (suhteessa 1:41:10:5:43) ylempi jae,

liikkuva faasi: bentseenin, n-butanolin, metanolin, jääetikkahapon ja veden seoksen (suh-
30 teessa 1:24:10:5:60) alempi jae.

Esimerkki 8

Primysiinin komponenttien erottaminen DCCC:llä (pi-sara-vastavirtakromatografia)

Esimerkissä 6 saadut, sekoitetut jakeet puhdistetaan edelleen DCC:llä.
35

Liuotinjärjestelmä on seuraava:

liikkumaton faasi: kloroformin, metanolin, jääetikan ja
veden seoksen (suhteessa 26:39:9:26)
alempi jae,

5 liikkuva faasi: saman seoksen ylempi kerros.

Eluointi:

Liuotinjärjestelmää sekoitetaan kahden tunnin ajan,
se jätetään seisomaan 16 tunniksi ja faasit erotetaan.
DCCC-instrumentti (sisäläpimitta = 2,0 mm, 300 putkea)
10 täytetään alemmalla jakeella (stationäärifaasilla). 130
mg tutkittavaa ainetta liuotetaan 12 ml:aan ylempää faasia
(liikkuvaa faasia), suodatetaan ja pumpataan säiliöön.
Eluointi suoritetaan ylemmän faasin avulla käyttäen
172,2 - 182,3 kPa:n (1,7 - 1,8 atm) ylipainetta, virtaus-
15 nopeutta 15 ml/h ja kootaan jakeet, joiden tilavuus on 3,7
ml (= 220 pisaraa). Täten saadaan pääkomponentti C_1 , jonka
puhtaus on 90 %.

Esimerkki 9

Primysiinin komponenttien erottaminen adsorptiopyl-
20 väskromatografian avulla piihappogeelillä, joka on kylläs-
tetty metallisuolalla

Pylvään valmistaminen:

Liuokseen, jossa on 40 g hopeanitraattia ja 500 ml
asetonitriiliä, lietetään 200 g Kieselgel $HF_{2,4}$ -piiham-
25 geeliä, tämän jälkeen liuotin haihdutetaan tyhjössä. Kyl-
lästetty piihappogeeli lietetään 500 ml:aan kloroformia ja
täytetään kromatografiapylvääseen. Laskeutumisen ja ti-
vistämisen edistämiseksi käytetään vähäistä ylipainetta
(101,3 - 153,3 kPa, 1,1 - 2,5 atm), kunnes pakkauskerrok-
30 sen korkeus alenee. Valosta johtuvan hopeanitraatin pel-
kistymisen välttämiseksi pylväs peitetään alumiinifoliol-
la.

Kromatografinen menetelmä:

400 mg primysiiniä liuotetaan 12 ml:aan liuotinjär-
35 jestelmää VII, joka on juuri valmistettua. Liuos adsorboi-

daan vähäisen ylipaineen alla (101,3 kPa = 1,1 atm) pak-
kauserrokseen. 30 ml eluenttia (liuotinjärjestelmä VII)
pannaan pakkauksen päälle ja eluointi aloitetaan virtaus-
nopeudella 1,1 ml/min, 152 -253,3 kPa:n (1,5 - 2,5 atm)
5 suuruisen ylipaineen alla.

Toiminta:

Fraktioitavat aineet identifioidaan ohutlevykroma-
tografian avulla. 10 µl kutakin jaetta pannaan Kieselgel
60 F₂₅₄ (Merck) -levyjen aloituskohtiin ja kehitetään 16
10 cm:n etäisyydelle liuotinjärjestelmällä V. Täplät paikan-
netaan kehittämällä klooritolidiinireagenssilla ja/tai
riikkihapolla ja/tai lämpökäsittelyllä kylmässä ilmassa
suoritetun kuivauksen jälkeen.

Samaa ainetta sisältävät jakeet yhdistetään ja pri-
15 mysiinikomponentti saostetaan lisäämällä eetteriä. Saos-
tettu kiinteä aine poistetaan suodattamalla ja se pestään
vähäisellä määrällä asetonitriiliä ja eetteriä. Jäännös
liuotetaan n-butanolin, etikkahapon ja veden seoksen (suh-
de 4:1:5) ylemmän kerrokseen ja pestään kolme kertaa 5
20 ml:lla vettä. Liuotin haihdutetaan aineesta, joka on ero-
tetussa ylemmässä kerroksessa tyhjössä, jäännös hierretään
kuivana eetterin kanssa, suodatetaan ja kuivataan tyhjö-
ssä.

Täten saadaan

25 135 mg komponenttia A₁ = kinoprasiiniä,
30 mg komponenttia A₂ = midoprasiiniä,
40 mg komponenttia A₃ = metiprasiiniä,
20 mg komponenttia C₁ = oksiprasiiniä,
20 mg komponenttia B₁ = hydroprasiiniä

30 Huomautus: valolta suojatussa pylväässä olevan ho-
peanitraatin pääosa voidaan saada takaisin pesemällä ase-
tonitriilillä ja käyttää uudelleen.

Esimerkki 10

35 Primysiinin komponenttien erottaminen absorptiopyl-
väskromatografian avulla valmiissa Lobar-pylväässä

Käytetty pylväs:

Lobar C (Merck) -pylväs, joka on täytetty LiChro-prepillä, edullisesti kaksi pylvästä tai useampia yhteenliitettynä.

5 Kromatografinen menetelmä:

Noudatetaan esimerkkiä 9, paitsi että eluenttina käytetään liuotinjärjestelmää VIII. 3 400 mg primysiiniä liuotetaan 40 ml:aan liuotinjärjestelmää VIII, tämän jälkeen tämä liuos pannaan pylväsjärjestelmän huipulle, joka
10 järjestelmä sisältää neljä pylvästä sarjaan kytkettyinä.

Työskentely:

Jakeet, jotka sisältävät samoja aineita, yhdistetään, lisätään n-butanolia määrä, joka vastaa 10 % jakeiden kokonaistilavuudesta ja liuokset haihdutetaan tyhjö-
15 sä maksimaalisessa 45°C:n lämpötilassa. Kiinteä jäännös jauhetaan kuivana eetterin kanssa ja suodatetaan.

Täten saadaan

1 100 mg komponenttia A₁ = kinoprisiiniä,
110 mg komponenttia A₂ = midoprisiiniä,
20 80 mg komponenttia A₃ = metiprisiiniä,
110 mg komponenttia C₁ = oksiprisiiniä,
20 mg komponenttia C₂ = oksimiprisiiniä,
15 mg komponenttia C₃ = oksimetiprisiiniä,
150 mg komponenttia B₁ = hydroprisiiniä,
25 50 mg komponenttia B₂ = hymiprisiiniä,
40 mg komponenttia B₃ = hymetiprisiiniä.

Esimerkki 11

Primysiinin komponenttien sulfaattisuolojen valmistus

30 Noudatetaan esimerkin 10 mukaista menetelmää, paitsi että yhdistettyihin jakeisiin lisätään 5 ml metanolia ja 0,3 ml 1N rikkihappoa. Saostamista täydennetään lisäämällä 300 ml eetteriä.

Täten saadaan esimerkin 10 mukaisia primysiinikomponentteja sulfaattisuolan muodossa.
35

Esimerkki 12

Primysiinikomponenttien suolojen, muiden kuin sulfaattisuolojen valmistus

5 Primysiinin komponenttien sulfaattisuoloista valmistetaan muita suoloja, jotka eivät ole sulfaattisuoloja, lisäämällä bariumsuoloja HU-patenttihakemuksen nro 2571/84 mukaisesti.

10 Täten saadaan primysiinikomponenttien suoloja, jotka eivät ole sulfaattisuoloja, esimerkiksi formiaatin, asetaatin, monoklooriasetaatin, oksalaatin, bentsoaatin, tosylaatin, perkloraatin, kloridin jne. muodossa.

 Primysiinikompleksin ja sen komponenttien mikrobienvastainen aktiivisuus tutkitaan erilaisilla mikro-organismikannoilla. Tulokset esitetään taulukossa 0.

Taulukko 0

Primysiinin pääkomponenttien mikrobienvastainen
spektri

(Ymppäys: 5×10^5 /ml, inkubointi 37°C:ssa 24 tun-

5 nin ajan)

Ihmiselle patogeeniset, polyre-
sistentit kannat

MIC. /,ug/ml/
Pääkomponentit

A₁ C₁ B₁

10	1./ Staphylococcus aureus	CCM.885.	0,25	0,075	0,5
	2./ Staphylococcus aureus	DSM.20231	0,05	0,05	0,1
	3./ Staphylococcus aureus	CCM.2317.	0,25	0,05	0,1
	4./ Staphylococcus aureus	CCM.2326.	0,25	0,05	0,25
15	5./ Staphylococcus aureus	CCM.2514	0,25	0,05	0,1
	6./ Staphylococcus aureus	CCM.2515.	0,25	0,025	0,1
	7./ Staphylococcus epidermidis	CCM.2271	0,75	0,025	0,25
	8./ Staphylococcus aureus Smith		0,25	0,05	0,5
20	9./ Streptococcus faecalis	CCM.1875.	2,5	0,75	2,5
	10./ Streptococcus agalactiae	CCM.5153.	0,75	0,075	0,5
	11./ Streptococcus agalactiae	CCM.5534.	1,0	0,25	1,0
	12./ Streptococcus disgalactiae	ATTC.9926	2,5	0,5	2,5
	13./ Bacillus subtilis	ATTC.6633.	0,25	0,025	0,1
25	14./ Bacillus cereus	CCM.2010.	0,25	0,025	0,25
	15./ Bacillus licheniformis	CCM.2182.	0,25	0,025	0,25
	16./ Bacillus licheniformis	CCM.2205.	0,25	0,025	0,25
	17./ Bacillus subtilis	CCM.1718.	0,25	0,05	0,25
	18./ Listeria monocytogenes	CCM.5576.	0,5	0,075	0,25
30	19./ Micrococcus flavus	ATCC.10240.	0,075	0,01	0,05
	20./ Micrococcus luteus	DSM.20030.	0,05	0,01	0,075
	21./ Sporcsarcina ureae	DSM.317	0,025	0,01	0,025
	22./ Pseudomonas aeruginosa	CCM.1960.	25	25	25
	23./ Pseudomonas fluorescens	CCM.2115.	25	25	25
	24./ Pseudomonas acidoverans	CCM.283	25	25	25
35	25./ Proteus vulgaris	CCM.1799.	50	50	50
	26./ Shigella sonnei	CCM.1373.	50	50	50
	27./ Salmonella typhimurium	CCM.5445.	50	50	50
	28./ Escherichia coli	DSM.30038.	50	50	50

Taulukko 0/a

Primysiiniantibioottikompleksin mikrobienvastainen
spektri ihmiselle patogeenisia mikro-organismikantoja koh-
taan

5	Kannat	MIC / ,ug/ml /
10	1./ Bacillus subtilis	ATCC.6633. 0,02
	2./ Bacillus subtilis	CCM.1718 0,1
	3./ Bacillus cereus	CCM.2010 0,1
	4./ Bacillus licheniformis	CCM.2182 0,075
	5./ Bacillus licheniformis	CCM.2205 0,075
15	6./ Staphylococcus aureus	CCM.885. 0,25
	7./ Staphylococcus aureus	CCM.2317 0,1
	8./ Staphylococcus aureus	CCM.2514 0,25
	9./ Staphylococcus aureus	CCM.2515 0,25
	10./ Streptococcus faecalis	CCM.1875 0,5
20	11./ Streptococcus agalactiae	CCM.5534. 0,5
	12./ Streptococcus dysgalactiae	CCM.5548. 0,5
	13./ Streptococcus agalactiae	CCM.5153. 0,5
	14./ Mycobacterium tuberculosis ^{tyyp-} pi hu H ₃₇ Rv.	0,05
	15./ Mycobacterium tuberculosis " härän E ₅	0,8-1,0
25	16./ Mycobacterium tuberculosis 607	0,5
	17./ Micrococcus flavus	ATCC.10240 0,075
	18./ Pseudomonas aeruginosa	CCM.1960. 25
	19./ Pseudomonas fluorescens	CCM.2115. 25
	20./ Pseudomonas acidoverans	CCM.283. 25
30	21./ Pseudomonas pictorum	CCM.284 10
	22./ Proteus vulgaris	CCM.1799. 25
	23./ Shigella sonnei	CCM.1373. 25
	24./ Salmonella typhi-murium	CCM.5445. 50
	25./ Salmonella cholerae-sus Inst. Pasteur-kanta	CCM.5438 50

Taulukko 0/a (jatkoa)

	Kannat	MIC / ,ug/ml /	
5	26./ Escherichia coli	DSM.30038	50
	27./ Escherichia haemolyticus	CCM.5863	50
	28./ Escherichia coli /ATCC11775, cystitis/	CCM.5172	50
10	29./ Escherichia coli lysegenic, colicinogenic	CCM.180	50
	30./ Escherichia coli	OTKI.17963	25
	31./ Escherichia coli	OTKI.23473	50
	32./ Klebsiella pneumoniae	CCM.1848	50
	33./ Serratia Marcescens	CCM.303	25
15	34./ Pasteurella multocida	CCM.5419	25
	35./ Vibrio parahaemolyticus	CCM.5938	25
	36./ Candida albicans	CBS.562	25
	37./ Candida tropicalis	CBS.433	25
20	38./ Candida pseudotropicalis 372		5
	39./ Candida krusei K-47		10
	40./ Cryptococcus neoformans K-16		5
	41./ Saccharomyces cerevisiae	OKI.1282	10
25	Seuraavassa on kuvattu keksinnön mukaisella menetelmällä saatuja primysiinikomponentteja sisältäviä synergistisiä koostumuksia:		
	<u>Synergistinen koostumus nro I:</u>		
	n (komponenttien lukumäärä) = 2		
30	komponenttien suhde $A_1:B_1 = 75:25$		
	Tulokset esitetään yhteenvetona taulukossa I.		
	Taulukon selitys:		
	Pylväs I: komponentin A_1 MIC-arvo ($\mu\text{g/ml}$),		
	Pylväs II: komponentin B_1 MIC-arvo,		
35	Pylväs III: komponentteja A_1 ja B_1 sisältävän koostumuksen MIC-arvo,		
	Pylväs IV: koostumukseen sisältyvän A_1 :n määrä suhteessa A_1 :n MIC-arvoon (%),		

Pylväs V: koostumukseen sisältyvän B_1 :n määrä suhteessa B_1 :n MIC-arvoon (%),

Pylväs VI: $(IV + V)/n$,

5 Pylväs VII: mikrobienvastaisen aktiivisuuden additiivinen osuus $(IV + V)$,

Pylväs VIII: mikrobienvastaisen aktiivisuuden synergistinen osuus $(100 \% - VII)$.

Taulukko I

10	Tutkittujen kantojen merkki	Kokeelliset tulokset							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
	1	0,25	0,5	0,2	60	10	35	70	30
	6	0,25	0,1	0,06	18	15	16.5	33	67
15	8	0,25	0,5	0,2	60	10	35	70	30
	10	0,75	0,5	0,4	40	20	30	60	40
	11	1	1	0,8	60	20	35	80	20
	12	2,5	2,5	1	30	10	20	40	60
	13	0,25	0,1	0,08	24	20	22	44	56
20	14	0,25	0,25	0,1	30	10	20	40	60
	15	0,25	0,25	0,08	24	8	16	32	68
	16	0,25	0,25	0,08	24	8	16	32	68
	17	0,25	0,25	0,05	12	5	8,5	17	83
	18	0,5	0,25	0,2	30	20	25	50	50
25	19	0,075	0,05	0,02	20	10	15	30	70

Synergistinen koostumus nro II:

$n = 2$

30 komponenttien suhde: $A_1:B_1 = 50:5$

Koostumuksen mikrobienvastainen aktiivisuus esitetään yhteenvetona taulukossa II

Taulukko II

Tutkittujen kantojen merkki		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
5									
	1	0,25	0,5	0,2	40	20	30	60	40
	4	0,25	0,25	0,08	16	16	16	32	68
	5	0,25	0,1	0,08	16	40	28	56	44
	6	0,25	0,1	0,04	8	20	14	28	72
10	7	0,75	0,25	0,06	4	12	8	16	84
	8	0,25	0,5	0,2	40	20	30	60	40
	9	2,5	2,5	1	20	20	20	40	60
	10	0,75	0,5	0,08	5,3	8	6,6	13,3	86,7
	11	1	1	0,6	30	30	30	60	40
15	12	2,5	2,5	0,8	16	16	16	32	68
	13	0,25	0,1	0,08	16	40	28	56	44
	14	0,25	0,25	0,1	20	20	20	40	60
	15	0,25	0,25	0,06	12	12	12	24	76
	16	0,25	0,25	0,06	12	12	12	24	76
20	17	0,25	0,25	0,05	10	10	10	20	80
	19	0,075	0,05	0,03	20	30	25	50	50
	20	0,05	0,075	0,03	30	20	25	50	50

25 Synergistinen koostumus nro III:

n = 2

komponenttien suhde: $A_1:B_1 = 25:75$

Mikrobienvastaisen aktiivisuuden kokeelliset tulokset esitetään yhteenvetona taulukossa III. (Lyhennykset
30 ovat samat kuin taulukossa I.)

Taulukko III

Tutkittujen kantojen merkki		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
5									
	1	0,25	0,5	0,2	20	30	25	50	50
	4	0,25	0,25	0,1	25	30	27,5	55	45
	6	0,25	0,1	0,03	3	22,5	11,7	25,5	74,5
10	7	0,75	0,25	0,1	3,3	30	16,7	33,3	66,7
	8	0,25	0,5	0,2	20	30	25	50	50
	9	2,5	2,5	1	10	30	20	40	60
	10	0,75	0,5	0,2	6,7	30	18,4	36,7	63,3
	11	1	1	0,6	15	45	30	60	40
15	13	0,25	0,1	0,05	5	37,5	21,2	42,5	57,5
	14	0,25	0,25	0,1	10	30	20	40	60
	15	0,25	0,25	0,08	8	24	16	32	68
	16	0,25	0,25	0,08	8	24	16	32	68
	17	0,25	0,25	0,06	10	18	12	24	76
20	19	0,075	0,05	0,03	10	45	27,5	55	45
	20	0,05	0,075	0,03	15	30	22,5	45	55

Synergistinen koostumus nro IV:

25 n = 2

komponenttien suhde: $A_1:C_1 = 75:25$

Koostumuksen mikrobienvastaista aktiivisuutta koskevat tulokset esitetään yhteenvedona taulukossa IV. (lyhenykset ovat samat kuin esimerkissä 13, paitsi että komponenttia C_1 käytetään $B_1:n$ asemesta.)

30

Taulukko IV

Tutkittujen kantojen merkki		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
5									
	1	0,25	0,075	0,03	9	10	9,5	19	31
	2	0,05	0,05	0,03	45	15	30	60	40
	3	0,25	0,05	0,02	6	10	8	16	84
	4	0,25	0,05	0,03	9	15	12	24	76
10	5	0,25	0,05	0,04	12	20	16	32	68
	6	0,25	0,025	0,02	6	20	13	26	74
	7	0,75	0,025	0,01	1	10	5,5	11	89
	8	0,25	0,05	0,01	3	5	4	8	92
	9	2,5	0,75	0,8	24	26,6	25,3	50,6	49,4
15	10	0,75	0,075	0,03	3	10	6,5	13	87
	11	1	0,25	0,2	15	20	17,5	35	65
	12	2,5	0,5	0,4	12	20	16	32	68
	13	0,25	0,025	0,02	6	20	13	26	74
	14	0,25	0,025	0,03	9	20	13	26	74
20	15	0,25	0,025	0,03	9	30	19,5	39	61
	16	0,25	0,025	0,03	9	30	19,5	39	61
	17	0,25	0,05	0,03	9	15	12	24	76
	18	0,5	0,075	0,06	9	20	14,5	29	71
	19	0,075	0,01	0,02	20	50	35	70	30
25	20	0,05	0,01	0,02	30	50	40	80	20

Synergistinen koostumus nro V:

n = 2

30 komponenttien suhde: $A_2:C_1 = 50:50$

Koostumuksen mikrobienvastaista aktiivisuutta koskevat tulokset esitetään yhteenvetona taulukossa V. (Lyhennykset ovat samat kuin esimerkissä 13, paitsi että käytetään komponenttia C_1 komponentin B_1 asemasta.)

Taulukko V

Tutkittujen kantojen merkki		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
5	1	0,25	0,075	0,04	8	26,6	17,3	34,6	63,4
	2	0,05	0,05	0,02	20	20	20	40	60
	3	0,25	0,05	0,02	4	20	12	24	76
	4	0,25	0,05	0,02	4	20	12	24	76
10	5	0,25	0,05	0,02	4	20	12	24	76
	6	0,25	0,025	0,01	2	20	11	22	78
	7	0,75	0,025	0,02	1,3	40	20,6	41,3	58,7
	8	0,25	0,05	0,01	2	10	6	12	88
15	10	0,75	0,075	0,02	1,3	13,3	7,3	14,6	83,4
	12	2,5	0,5	0,6	12	60	36	72	28
	13	0,25	0,025	0,02	4	40	22	44	56
	14	0,25	0,025	0,02	4	40	22	44	56
20	15	0,25	0,025	0,02	4	40	22	44	56
	16	0,25	0,025	0,02	4	40	22	44	56
	17	0,25	0,05	0,04	8	40	24	48	52
	18	0,5	0,075	0,1	10	66,6	38,3	76,6	23,4

Synergistinen koostumus nro VI:

25

n = 2

komponenttien suhde: $A_1:C_1 = 25:75$

Koostumuksen mikrobienvastaista aktiivisuutta koskevat tulokset esitetään yhteenvetona taulukossa VI. (Lyhennykset ovat samat kuin esimerkissä 13, paitsi että käytetään komponenttia C_1 komponentin B_1 asemesta.)

30

Taulukko VI

Tutkittujen kantojen merkki		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
35	3	0,25	0,05	0,05	5	75	40	80	20
	12	2,5	0,5	0,6	6	90	48	96	4

Synergistinen koostumus nro VII:

n = 2

komponenttien suhde: $C_1:B_1 = 75:25$

- Koostumuksen mikrobienvastaista aktiivisuutta kos-
 5 kevat tulokset esitetään yhteenvedona taulukossa VII. (Ly-
 hennykset ovat samat kuin esimerkissä 13, paitsi että käy-
 tetään komponenttia C_1 komponentin A_1 asemesta.)

Taulukko VII

10	Tutkittujen kantojen merkki								
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
	1	0,075	0,5	0,04	40	2	21	42	58
	2	0,1	0,5	0,02	15	1	8	16	84
	3	0,05	0,1	0,02	30	5	17,5	35	65
15	4	0,05	0,25	0,03	45	3	24	48	52
	5	0,05	0,1	0,03	45	7,5	26,3	52,5	47,5
	6	0,025	0,1	0,02	60	5	32,5	65	35
	8	0,05	0,5	0,02	30	1	15,5	31	69
	10	0,075	0,5	0,06	60	3	31,5	63	37
20	11	0,25	1	0,2	60	5	32,5	65	35
	12	0,5	2,5	0,04	6	0,4	3,2	6,4	93,6
	17	0,05	0,25	0,02	30	2	16	32	68

25 Synergistinen koostumus nro VIII:

n = 2

komponenttien suhde: $C_1:B_1 = 50:50$

- Koostumuksen mikrobienvastaista aktiivisuutta kos-
 kevat tulokset esitetään yhteenvedona taulukossa VIII.
 30 (Lyhennykset ovat samat kuin esimerkissä 13, paitsi että
 käytetään komponenttia C_1 komponentin A_2 asemesta.)

Taulukko VIII

Tutkittujen kantojen merkki		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
5									
	1	0,075	0,5	0,08	53,3	8	30,6	61,3	38,7
	2	0,05	0,1	0,03	30	15	22,5	45	55
	3	0,05	0,1	0,03	30	15	22,5	45	55
10	4	0,05	0,25	0,03	30	6	18	36	64
	5	0,05	0,1	0,03	30	15	22,5	45	55
	6	0,025	0,1	0,02	40	10	25	50	50
	7	0,025	0,25	0,02	40	4	22	44	66
	8	0,05	0,5	0,03	30	3	16,5	33	67
15	9	0,75	2,5	0,8	53,3	16	34,6	69,3	30,7
	10	0,075	0,5	0,1	66,6	10	38,3	76,6	23,4
	11	0,25	1	0,06	12	3	7,5	15	85
	12	0,5	2,5	0,03	3	0,6	1,8	3,6	96,4
	13	0,025	0,1	0,02	40	10	25	50	50
20	15	0,025	0,25	0,02	40	4	22	44	66
	16	0,025	0,25	0,02	40	4	22	44	66
	17	0,05	0,25	0,02	20	4	12	24	76
	18	0,075	0,25	0,08	53,3	10	34,6	69,3	30,7

25

Synergistinen koostumus nro IX:

n = 2

komponenttien suhde: $C_1:B_1 = 25:75$

Koostumuksen mikrobienvastaista aktiivisuutta koskevat tulokset esitetään yhteenvetona taulukossa IX. (Lyhennykset ovat samat kuin esimerkissä 13, paitsi että käytetään komponenttia C_1 komponentin A_1 asemesta.)

30

Taulukko IX

Tutkittujen kantojen merkki		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
5	1	0,075	0,5	0,1	33,3	15	24,1	48,3	51,7
	2	0,05	0,5	0,04	20	6	13	26	74
	3	0,05	0,1	0,04	20	30	25	50	50
	4	0,05	0,25	0,08	40	8	24	48	52
10	6	0,025	0,1	0,02	20	15	17,5	35	65
	7	0,025	0,25	0,03	30	9	19,5	39	61
	8	0,05	0,5	0,06	30	9	19,5	39	61
	11	0,25	1	0,4	40	30	35	70	30
	12	0,5	2,5	0,1	5	3	4	8	92
15	13	0,025	0,1	0,02	20	15	17,5	35	65
	14	0,025	0,25	0,03	30	9	19,5	39	61
	15	0,025	0,25	0,03	30	9	19,5	39	61
	16	0,025	0,25	0,03	30	9	19,5	39	61
	17	0,05	0,25	0,03	15	9	12	24	76
20	18	0,075	0,25	0,1	33,3	30	31,6	63,3	36,7
	19	0,01	0,05	0,02	50	30	40	80	20
	20	0,01	0,075	0,02	50	20	35	70	30

25 Synergistinen koostumus nro X:

n = 3

komponenttien suhde: $A_1:C_1:B_1 = 40:30:30$

Koostumuksen mikrobienvastaista aktiivisuutta koskevat tulokset esitetään yhteenvetona taulukossa X.

30 Taulukon X lyhennykset ovat seuraavat:

Sarake I: komponentti A_1 :n MIC-arvo ($\mu\text{g/ml}$)Sarake II: komponentin C_1 MIC-arvo ($\mu\text{g/ml}$)Sarake III: komponentin B_1 MIC-arvo ($\mu\text{g/ml}$)Sarake IV: koostumuksen $A_1 + B_1 + C_1$ sisältävän

35 koostumuksen MIC-arvo

Sarake V: koostumukseen sisältyvän A_1 :n määrä, joka on yhteydessä komponentti A_1 :n MIC-arvoon (%)

Sarake VI: koostumukseen sisältyvä C_1 :n määrä, joka on yhteydessä komponentti C_1 :n MIC-arvoon (%)

5 Sarake VII: koostumukseen sisältyvän B_1 :n määrä, joka on yhteydessä komponentin B_1 MIC-arvoon (%)

Sarake VIII: $(V + VI + VII) / n$

Sarake IX: mikrobinvastaisen aktiivisuuden additiivinen osuus $(V + VI + VII)$

10 Sarake X: mikrobinvastaisen aktiivisuuden synergistinen osuus $(100 \% - IX)$

Taulukko X

		Tutkittujen kantojen merkki									
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
15											
20	1	0,25	0,075	0,5	0,1	16	40	6	20,6	62	38
	2	0,05	0,05	0,1	0,05	40	30	15	28,3	85	15
	5	0,25	0,05	0,1	0,05	8	30	15	17,6	53	47
	6	0,25	0,025	0,1	0,03	4,8	36	9	16,6	49,8	50
	7	0,75	0,025	0,25	0,05	2,6	60	6	22,8	68,6	31,4
	8	0,25	0,05	0,5	0,08	12,8	48	4,8	21,8	65,6	34,4
	10	0,75	0,075	0,5	0,08	4,2	32	4,8	13,6	41	59
25	11	1	0,25	1	0,08	3,2	9,6	2,4	5,1	15,2	84,8
	12	2,5	0,5	1	0,6	9,6	36	7,2	17,6	52,8	47,2
	13	0,25	0,025	2,5	0,3	4,8	36	9	16,6	49,8	50,2
	14	0,25	0,025	0,1	0,03	4,8	36	3,6	14,8	44,4	55,6
30	15	0,25	0,025	0,25	0,03	4,8	36	3,6	14,8	44,4	55,6
	16	0,25	0,025	0,25	0,05	8	60	6	24,6	74	26
	17	0,25	0,05	0,25	0,02	3,2	12	2,4	5,8	17,6	82,4
	20	0,05	0,01	0,075	0,01	8	30	4	14	42	58

Synergistinen koostumus nro XI:

n = 3

komponenttien suhde: A.C.B = 50:25:25

Koostumuksen mikrobienvastaista aktiivisuutta kos-

- 5 kevat tulokset esitetään yhteenvetona taulukossa XI. (Taulukon lyhennykset ovat samat kuin taulukossa 22.)

Taulukko XI

10	Tutkittujen kantojen merkki										
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
15	1	0,25	0,075	0,5	0,1	20	33,3	5	19,4	58,3	41,7
	3	0,25	0,05	0,1	0,08	16	40	20	25,3	76	24
	4	0,25	0,05	0,25	0,1	20	50	10	26,6	80	20
	5	0,25	0,05	0,1	0,04	8	20	10	12,6	38	62
20	6	0,25	0,025	0,1	0,04	8	40	10	19,3	58	42
	7	0,75	0,025	0,25	0,05	3,3	50	5	19,4	58,3	41,7
	8	0,25	0,05	0,5	0,05	10	25	2,5	12,5	37,5	62,5
	9	2,5	0,75	2,5	1	20	33,3	10	21,1	63,3	36,7
25	10	0,75	0,075	0,5	0,1	6,6	33,3	5	14,9	44,9	55,1
	11	1	0,2	1	0,4	20	40	10	23,3	70	30
	12	2,5	0,5	2,5	0,4	8	20	4	10,6	32	68
	13	0,25	0,025	0,1	0,04	8	40	10	19,3	58	42
30	14	0,25	0,025	0,25	0,06	12	60	6	26	78	22
	15	0,25	0,025	0,25	0,03	6	30	3	13	39	61
	16	0,25	0,025	0,25	0,05	10	50	5	21,6	65	35
	17	0,25	0,05	0,25	0,05	10	25	5	13,3	40	60
30	18	0,5	0,075	0,25	0,08	8	26,6	8	14,2	42,6	57,3
	19	0,075	0,01	0,05	0,02	13,3	50	10	24,4	73,3	26,7
	20	0,05	0,01	0,075	0,02	20	50	6,6	25,5	76,6	23,4

Synergistinen koostumus nro XII:

n = 3

komponenttien suhde: A.C.B = 60:20:20

Koostumuksen mikrobienvastaista aktiivisuutta kos-

5 kevat tulokset esitetään yhteenvedona taulukossa XII.

(Taulukon lyhennykset ovat samat kuin esimerkissä 22.)

Taulukko XII

10	Tutkittujen kantojen merkki										
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
15	1	0,25	0,075	0,5	0,08	19,2	21,3	3,2	14,6	43,7	56,3
	4	0,25	0,05	0,25	0,1	24	40	8	24	72	28
	5	0,25	0,05	0,1	0,04	9,6	16	7,3	11	32,9	67,1
	6	0,25	0,025	0,1	0,03	7,2	24	6	12,4	37,2	62,8
	7	0,75	0,025	0,25	0,05	4	40	4	24	48	52
20	8	0,25	0,05	0,5	0,04	9,6	16	1,6	9,1	27,2	72,8
	9	2,5	0,75	2,5	1	24	26,7	8	19,6	58,7	41,3
	10	0,75	0,075	0,5	0,03	2,4	8	1,2	3,9	11,6	88,4
	11	1	0,25	1	0,4	24	32	8	21,3	64	36
	12	2,5	0,5	2,5	0,4	9,6	16	3,2	9,6	28,8	71,2
25	13	0,25	0,025	0,1	0,04	9,6	32	8	16,5	49,6	50,4
	14	0,25	0,025	0,25	0,04	9,6	32	3,2	14,9	44,8	55,2
	15	0,25	0,025	0,25	0,05	12	40	4	18,6	56	44
	16	0,25	0,025	0,25	0,04	9,6	32	3,2	14,9	44,8	55,2
	17	0,25	0,05	0,25	0,04	9,6	16	3,2	9,6	28,8	71,2
	19	0,075	0,01	0,05	0,02	16	40	8	21,3	64	36
	20	0,05	0,01	0,075	0,02	24	40	5,3	23,1	69,3	30,7

Synergistinen koostumus nro XIII:

$n = 3$

komponenttien suhde: $A_2:C_1:B_1 = 70:10:20$

Koostumuksen mikrobienvastaista aktiivisuutta koske-

5	Tutkittujen kantojen merkki										
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
10	2	0,05	0,05	0,1	0,04	56	8	8	24	72	28
	3	0,25	0,05	0,1	0,1	28	20	20	22,6	68	32
	4	0,25	0,05	0,25	0,1	28	20	8	18,6	56	44
	5	0,25	0,05	0,1	0,05	14	10	10	11,3	34	66
	6	0,25	0,025	0,1	0,03	8,4	12	6	8,8	26,4	73,6
	7	0,75	0,025	0,25	0,04	3,7	16	3,2	7,6	22,9	77,1
	8	0,25	0,05	0,5	0,08	22,4	16	3,2	13,8	41,6	58,4
15	10	0,75	0,075	0,5	0,2	18,6	26,6	8	17,7	53,2	46,8
	11	1	0,25	1	0,4	28	16	8	17,3	52	48
	12	2,5	0,5	2,5	0,6	16,8	12	4,8	11,2	33,6	66,4
	13	0,25	0,025	0,1	0,03	8,4	12	6	8,8	26,4	73,6
	14	0,25	0,025	0,25	0,04	11,2	16	3,2	10,1	30,4	69,6
20	15	0,25	0,025	0,25	0,06	16,8	24	4,8	15,2	45,6	54,4
	16	0,25	0,025	0,25	0,03	8,4	12	2,4	7,6	22,8	77,2
	17	0,25	0,5	0,25	0,04	11,2	8	3,2	7,4	22,4	77,6
	18	0,5	0,075	0,25	0,2	28	26,6	16	23,5	70,6	29,4
	19	0,075	0,01	0,05	0,02	18,6	20	8	15,3	46,6	53,4
25	20	0,05	0,01	0,075	0,01	14	10	2,6	8,8	26,6	73,4

Seuraavassa on kuvattu farmaseuttisia koostumuksia, jotka sisältävät primysiinin yksityisiä komponentteja tai niiden synergististä seosta aktiivisena aineena. Farmaseut-
30 tiset koostumukset valmistetaan sinänsä tunnetulla tavalla.

Termillä "aktiivinen aine" tarkoitetaan primysiinin komponentteja tai niiden seosta.

Koostumus 1

Iholauje nro I

Aktiivinen aine 1,0 g

Syklodekstriini 9,0 g

5 10,0 g

Koostumus 2

Ihojauhe nro II

Aktiivinen aine 1,0 g

Amylum non mucilaginosum 9,0 g

10 10,0 g

Koostumus 3

Ihojauhe nro III

Aktiivinen aine 1,0 g

Aetheroleum lavandulae 0,02 g

15 Acid silicum colloidalis 0,10 g

Magnesium stearinicum 0,10 g

Zincum oxidatum 0,20 g

Magnesium carbonicum hydroksidatum 1,00 g

Syklodekstriini 7,08 g

20 10,0 g

Koostumus 4

Ruiskutettava ihojauhe

Aktiivinen aine 0,20 g

Isopropyylimyristaatti 1,00 g

25 Freon 11/12 5050 (kantokaasu) 98,80 g

100,00 g

Koostumus 5

Vesiaerosoli

Aktiivinen aine 0,5 g

30 Etanoli (62,5 % tilavuutta) 10,0 g

Vesi 39,5 g

Kantokaasu 50,0 g

100,0 g

Koostumus 6

Ruiskutettava haavalaastari

	Aktiivinen aine	0,1 g
	Polyvinyyli-pyrrolidoni	1,50 g
5	Etanoli (62,5 tilavuus-%)	48,40 g
	Ponnekaasu	50,00 g

Koostumus 7

Geeli

	Aktiivinen aine	0,20 g
10	Lidokaiini	2,00 g
	Klorofilli	0,005 g
	Mentoli	0,20 g
	Carbopol 940	1,20 g
	Trietanoliamiini	1,50 g
15	Tween 20	1,50 g
	Isoadipaatti	5,00 g
	Etanoli 96 %	50,00 g
	Tislattu vesi	100,00 g:ksi

Aineet sekoitetaan ja täytetään pulloon.

20 Koostumus 8

Voide

	Aktiivinen aine	2,00 g
	Oleum paraffini	33,0 g
	Vaselinum album	31,0 g
25	Etanoli 96 %	20,0 g
	Tween 60	9,0 g
	Villarasva	5,0 g
		100,0 g

Aineet sekoitetaan ja täytetään pulloon tai astiaan.

30 Koostumus 9

Silmävoide

	Aktiivinen aine	0,04 g
	Etanoli 62,5 tilavuus-%	0,08 g
	Tislattu vesi	3,16 g
35	Mehiläisvaha	300,00 g

	Kolesteroli	25,00 g
	Steriili risiiniöljy	1 000,00 g:ksi
	<u>Koostumus 10</u>	
	Vedellä pestävä voide nro I	
5	Aktiivinen aine	2,0 g
	Tween 60	5,0 g
	Nestemäinen parafiini	5,0 g
	Setyylistearyylialkoholi	15,0 g
	Valkoinen vaseliini	25,0 g
10	Tislattu vesi	100,0 g:ksi
	<u>Koostumus 11</u>	
	Vedellä pestävä voide nro II	
	Aktiivinen aine	0,100 g
	Etanoli 62,5 tilavuus-%	2,00 g
15	Vesi	7,900 g
	Sorboksaateenistearaatti	3,600 g
	Nestemäinen parafiini	3,600 g
	Setyylistearyylialkoholi	10,800 g
	Valkoinen vaseliini	18,000 g
20	Propyyli-paraoksibentsoaatti	0,054 g
	Metyyliparaoksibentsoaatti	0,126 g
	Etanoli, 96 tilavuus-%	2,930 g
	Lidokaiinikloridi	1,000 g
	Tislattu vesi	1 000,000 g:ksi
25	<u>Koostumus 12</u>	
	Silmävoide	
	Aktiivinen aine	0,02 g
	Natriumvetykarbonaatti	18,00 g
	Viskoosiliuotin (4 g metyyli-	
30	luloosaa + 3,5 g NaCl + tislattua	
	vettä täytet. 510 g:ksi)	510,00 g
	Fenyyli-elohopea-boraatti (0,1 %)	15,1 g
	Tislattua vettä	1 000,0 g:ksi

Koostumus 13

Öljymäinen silmävoide

	Aktiivinen aine	0,02 g
	Etanoli, 62,5 tilavuus-%	0,40 g
5	Tislattua vettä	1,58 g
	Kolesteroli	25,00 g
	Steriili risiiniöljy	100,00 g:ksi

Koostumus 14

Emätinpuikko

10	Aktiivinen aine	0,02 g
	Etanoli, 61,5 tilavuus-%	0,262 g
	Gelatiini	1,40 g
	Natriumasetaatti	0,26 g
	Glyseroli	4,50 g
15	Tislattu vesi	9,50 g:ksi

Koostumus 15

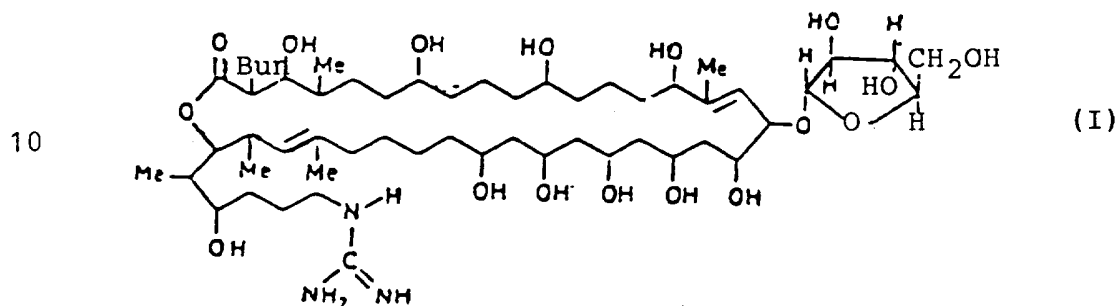
Mikrobeja vastustava side

- Primysiinin eristettyjen komponenttien tai niiden seoksen liuos valmistetaan edullisesti etanoliin, ja si-
- 20 teet, esimerkiksi harsokangasliina, kyllästetään sillä, tämän jälkeen side pakataan ja steriloidaan tavallisella tavalla.

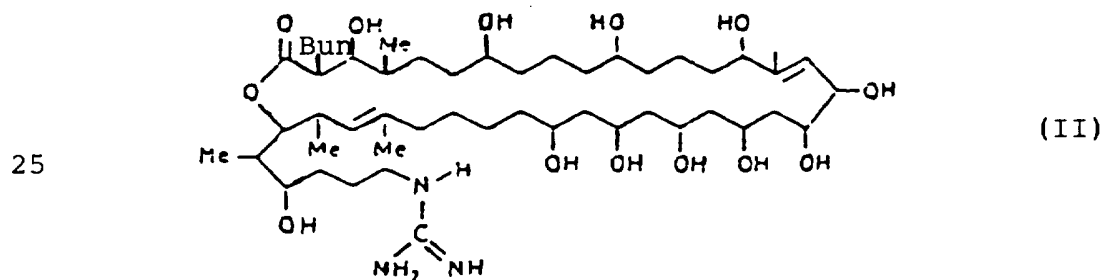
Täten valmistettua, antimikrobista sidettä voidaan käyttää milloin tahansa.

Patenttivaatimukset

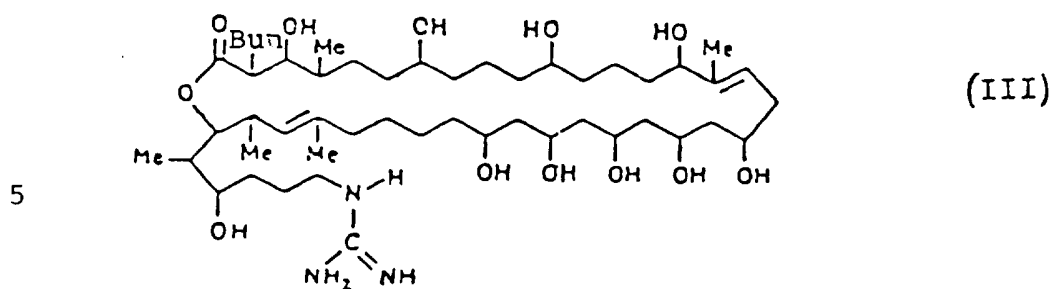
1. Menetelmä primysiiniantibioottikompleksin erot-
tamiseksi komponenteiksi A₁, A₂, A₃, C₁, C₂, C₃, B₁, B₂
5 ja B₃, jolloin primysiinin komponentilla A₁ (kinoprisiini)
on kaava I



- 15 sen R_f-arvo on 0,29 ja molekyylipaino on 1078, ja
primysiinin komponentin A₂ (midoprisiini), komponentin A₁
homologin, R_f-arvo on 0,31 ja sen molekyylipaino on 1092,
ja primysiinin komponentin A₃ (metiprisiini), komponentin
A₁ homologin, R_f-arvo on 0,33 ja sen molekyylipaino on
20 1106, ja primysiinin komponentilla C₁ (oksimiprisiini) on
kaava II



- sen R_f-arvo on 0,35 ja sen molekyylipaino on 946, ja
30 primysiinin komponentin C₂ (oksimiprisiini), komponentin
C₁ homologin, R_f-arvo on 0,37 ja sen molekyylipaino on
960, ja primysiinin komponentin C₃ (oksimetiprisiini),
komponentin C₁ homologin, R_f-arvo on 0,39 ja sen mole-
kyylipaino on 974, ja primysiinin komponentilla B₁ (hydro-
35 prisiini) on kaava III



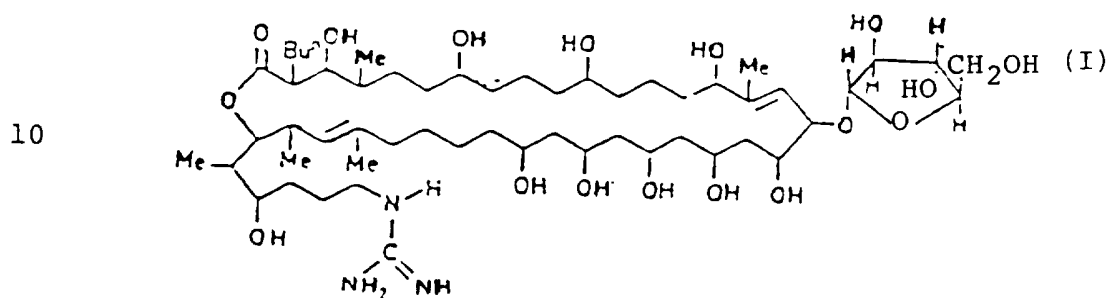
sen R_F -arvo on 0,54 ja sen molekyylipaino on 930, ja primysiinin komponentin B_2 (hymiprisiini), komponentin B_1 homologin, R_F -arvo on 0,56 ja sen molekyylipaino on 944, ja primysiinin komponentin B_3 (hymetiprisiini), komponentin B_1 homologin, R_F -arvo on 0,58 ja sen molekyylipaino on 960, t u n n e t t u siitä, että raa'ista, puolipuhdistusta tai puhtaista tuotteista, jotka on saatu käymisen avulla suoritettun primysiinin valmistuksen yhteydessä, erotetaan komponentit yhden kerran tai kaksi kertaa kehittämällä ohutlevykromatografisesti, jolloin erotettava antibioottikompleksi liuotetaan 0,5 - 1,0 %:iseen C_1 - C_4 -alkoholien ja/tai veden seokseen, ja kehitetään ohutlevy- tai suurpaineohutlevykromatografialevyllä, joka sisältää metallisuolalla impregnoitua piihappogeeliä kiinteänä kantaja-aineena, ja/tai käyttäen partitiotai adsorptiopylväskromatografiaa, jolloin adsorptiokromatografiassa käytetään valmista Lobar-tyyppistä pylvästä tai kromatografiapylvästä, joka on täytetty piihappogeelillä, joka on kyllästetty metallisuolalla, kuten hopea- ja/tai rautasuolalla, ja partitiokromatografiassa käytetään kiinteänä kantaja-aineena Sephadex LH-20:ntä ja kromatografia suoritetaan 30 110-510 kPa:n (1-5 atm) paineessa, ja/tai käyttäen pisaravastavirtakromatografiaa, jolloin pylväskromatografia suoritetaan paineen alaisena, ja jolloin käytetään yhdistettyä liuotinjärjestelmää, jossa eluenttina käytetään ylempää kerrosta seoksesta, joka sisältää n-butanolia, jääetikkaa ja vettä suhteessa 60:10:30 (liuotinjärjestelmä I), ja/tai 35 seosta, joka sisältää n-butanolia, metanolia, jääetikkaa

ja vettä suhteessa 75:2:8:15 (liuotinjärjestelmä II),
ja/tai alempaa kerrosta seoksesta, joka sisältää kloro-
formia, metanolia, jääetikkaa ja vettä suhteessa
45:30:15:20 (liuotinjärjestelmä III), ja/tai seosta, joka
5 sisältää kloroformia, metanolia, muurahaishappoa ja vettä
suhteessa 50:35:14:1 (liuotinjärjestelmä IV), ja/tai
seosta, joka sisältää kloroformia, metanolia, muurahaish-
happoa, vettä, formaldehydiä ja n-butanolia suhteessa
130:53:6:9:3:3 (liuotinjärjestelmä V), ja/tai seosta, joka
10 sisältää kloroformia, metanolia, muurahaishappoa, vettä,
formaldehydiä ja n-butanolia suhteessa 160:53:6:9:3:3
(liuotinjärjestelmä VI), ja/tai 15 paino-osaa monokloori-
etikkahappoa liuotettuna seokseen, joka sisältää kloroformia,
metanolia, vettä, formaldehydiä ja n-butanolia suhteessa
15 125:53:9:3:3 (liuotinjärjestelmä VII), ja/tai liuotinjär-
jestelmän III, kloroformin ja metanolin seosta suhteessa
15:2:1 (liuotinjärjestelmä VIII), ja haluttaessa eristetään
yksittäiset komponentit, jotka haluttaessa otetaan talteen
suolan muodossa, edullisesti asetaatti-, monoklooriasetaat-
20 ti-, sulfaatti- tai formiaattisuolan muodossa.

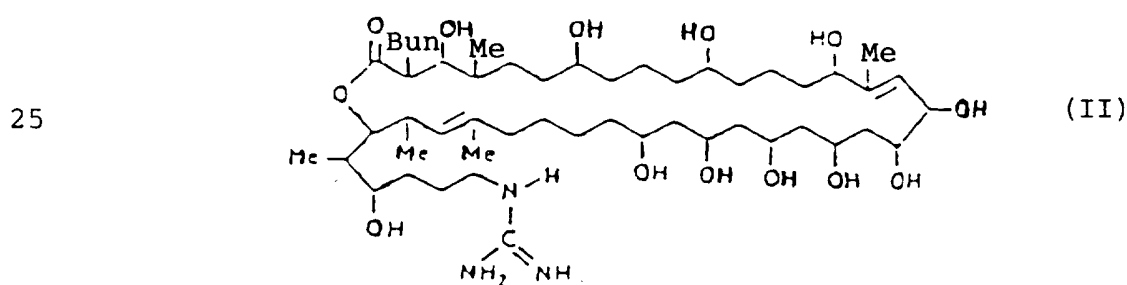
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että primysiinin komponenttien sulfaat-
tisuoloista muodostetaan ei-sulfaattisuoloja, lisäämällä
orgaanisten tai epäorgaanisten, muiden kuin rikkihapon,
25 bariumsuoloja, tai muodostetaan primysiinin komponenttien,
jotka on otettu talteen muussa kuin sulfaattimuodossa,
sulfaattisuoloja lisäämällä rikkihappoa.

Patentkrav

1. Förfarande för separering av ett primycinan-
tibirotikakomplex i komponenterna A_1 , A_2 , A_3 , C_1 , C_2 ,
5 C_3 , B_1 , B_2 och B_3 , varvid primycinkomponenten A_1
(kinopricin) har formeln I

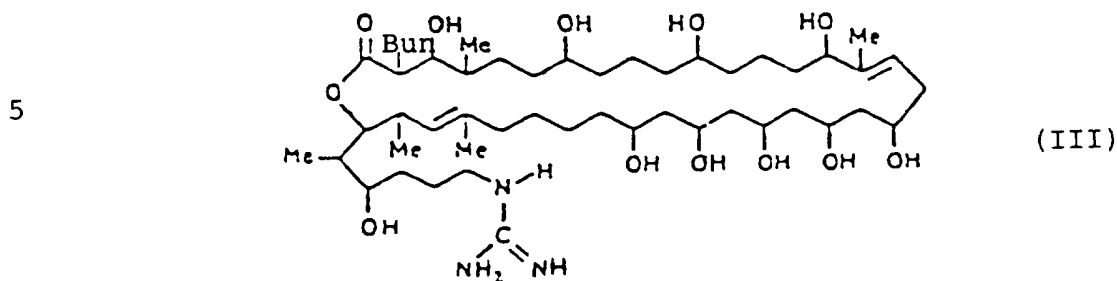


- 15 och ett R_f -värde av 0,29 och en molekyylvikt av 1078,
primycinkomponenten A_2 (midopricin), vilken utgör en
homolog till komponenten A_1 , har ett R_f -värde av 0,31
och en molekylvikt av 1092, primycinkomponenten A_3
(metipricin), vilken utgör en homolog till komponenten
20 A_1 , har ett R_f -värde av 0,33 och en molekylvikt av
1106, primycinkomponenten C_1 (oxipricin) har formeln II



- 30 och ett R_f -värde av 0,35 och en molekylvikt av 946,
primycinkomponenten C_2 (oximipricin), vilken utgör en
homolog till komponenten C_1 , har ett R_f -värde av 0,37
och en molekylvikt av 960, primycinkomponenten C_3 (oxi-
metipricin), vilken utgör en homolog till komponenten C_1 ,
35 har ett R_f -värde av 0,39 och en molekylvikt av 974, pri-

mycinkomponenten B₁ (hydropricin) har formeln III



10

och ett R_f-värde av 0,54 och en molekylvikt av 930, primycinkomponenten B₂ (hymipricin), vilken utgör en homolog till komponenten B₁, har ett R_f-värde av 0,56 och en molekylvikt av 944, och primycinkomponenten B₃ (hymetipricin),
 15 vilken utgör en homolog till komponenten B₁, har ett R_f-värde av 0,58 och en molekylvikt av 960, k ä n n e t e c k -
 n a t därav, att man separerar komponenten i de under framställningen av primycin genom fermentering erhållna råa, halverade eller rena produkterna under utnyttjande
 20 av tunnskiktskromatografi en eller två gånger, varvid antibiotikakomplexet som skall separeras löses i en 0,5 -
 1,0 %:ig blandning av C₁₋₄-alkoholer och/eller vatten och att man sedan framkallar på en tunnskikts- eller högtryck-tunnskiktskromatografiplåt, vilken innehåller kiselgel som
 25 mättats med ett metallsalt som fast bärare, och/eller partitions- eller adsorptionskolonnkromatografi, varvid man vid adsorptionskromatografi använder en driftklar kolonn av Lobar-typ eller en kromatografisk kolonn, vilken packats med kiselgel som mättats med ett metallsalt, såsom
 30 ett silver- och/eller järnsalt, och vid partitionskromatografin använder som fast bärare Sephadex LH-20 och utför kromatografin vid ett tryck av 110-510 kPa (1-5 atm),
 och/eller under användning av droppmotströmskromatografi, varvid kolonnkromatografin utförs under tryck och varvid
 35 man använder ett kombinerat lösningsmedelsystem, i vilket man som eluent använder det övre skiktet av en blandning av

n-butanol, isättika och vatten i förhållandet 60:10:30 (lös-
ningsmedelsystem I) och/eller en blandning av n-butanol,
metanol, isättika och vatten i förhållandet 75:2:8:15
(lösningsmedelsystem II), och/eller det nedre skiktet av
5 en blandning av kloroform, metanol, isättika och vatten i
förhållandet 45:30:15:20 (lösningsmedelsystem III), och/el-
ler en blandning av kloroform, metanol, myrsyra och vatten
i förhållandet 50:35:14:1 (lösningsmedelsystem IV), och/
eller en blandning av kloroform, metanol, myrsyra, vatten,
10 formaldehyd och n-butanol i förhållandet 130:53:6:9:3:3
(lösningsmedelsystem V), och/eller en blandning av kloro-
form, metanol, myrsyra, vatten, formaldehyd och n-butanol i
förhållandet 160:53:6:9:3:3 (lösningsmedelsystem VI), och/
eller 15 viktdelar monoklorätiksyra som lösts i en bland-
ning av kloroform, metanol, vatten, formaldehyd och n-butanol i
15 förhållandet 125:53:9:3:3 (lösningsmedelsystem VII), och/el-
ler en blandning av lösningssystem III, kloroform och
metanol i förhållandet 15:2:1 (lösningssystem VIII),
och, om så önskas, separeras de enskilda komponenterna,
20 vilka om så önskas tas tillvara i form av salter, företrä-
desvis i form av ett acetat-, monokloracetat-, sulfat- el-
ler formiatsalt.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att man av primycinkomponenternas
25 sulfatsalter bildar ej-sulfatsalter genom tillsats av ba-
riumsalter av andra organiska eller oorganiska syror än
svavelsyra, eller att man av primycinkomponenter, vilka ut-
vunnits i annan form än sulfat, bildar genom sulfatsalter
tillsats av svavelsyra.

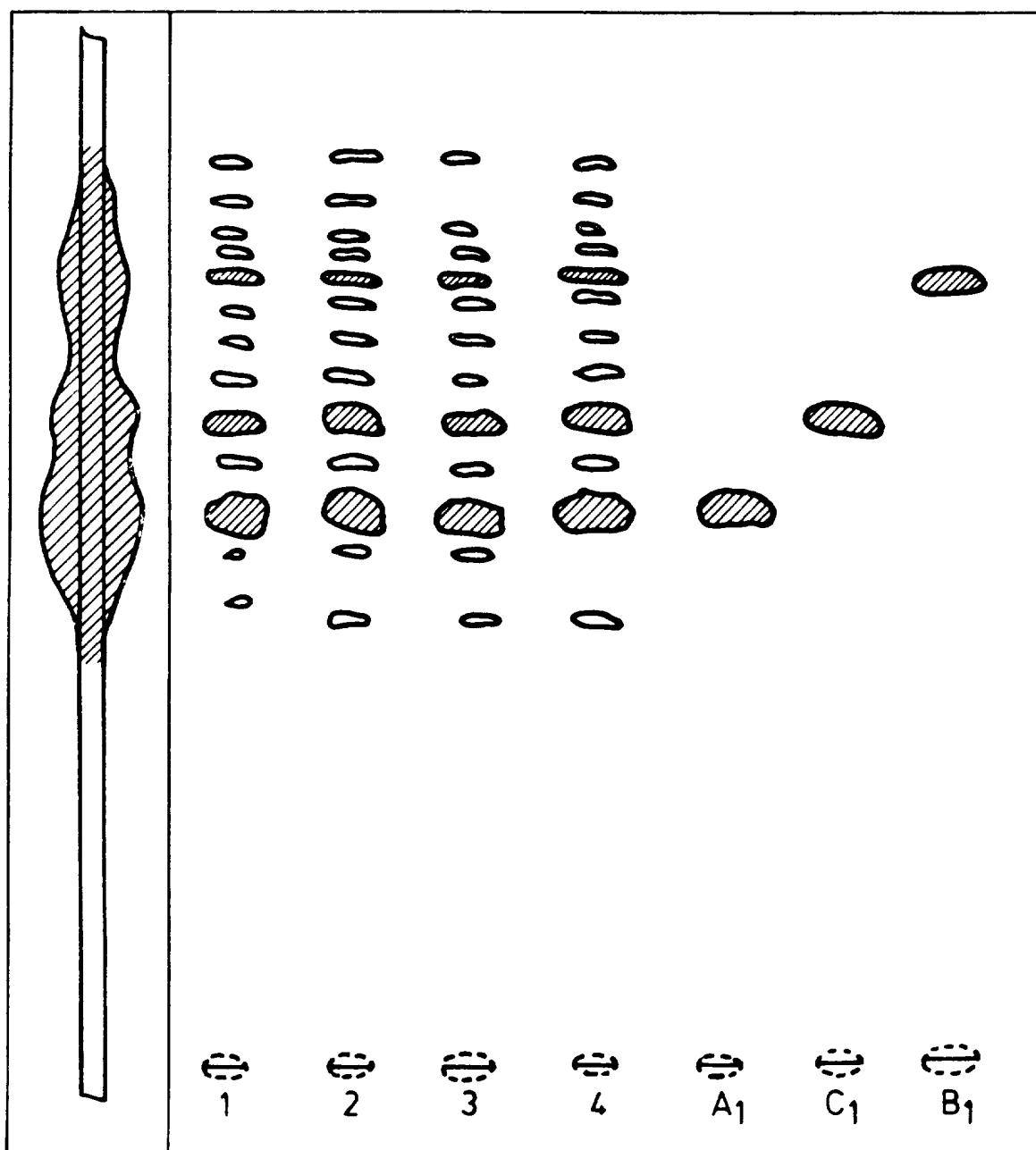


Fig.1

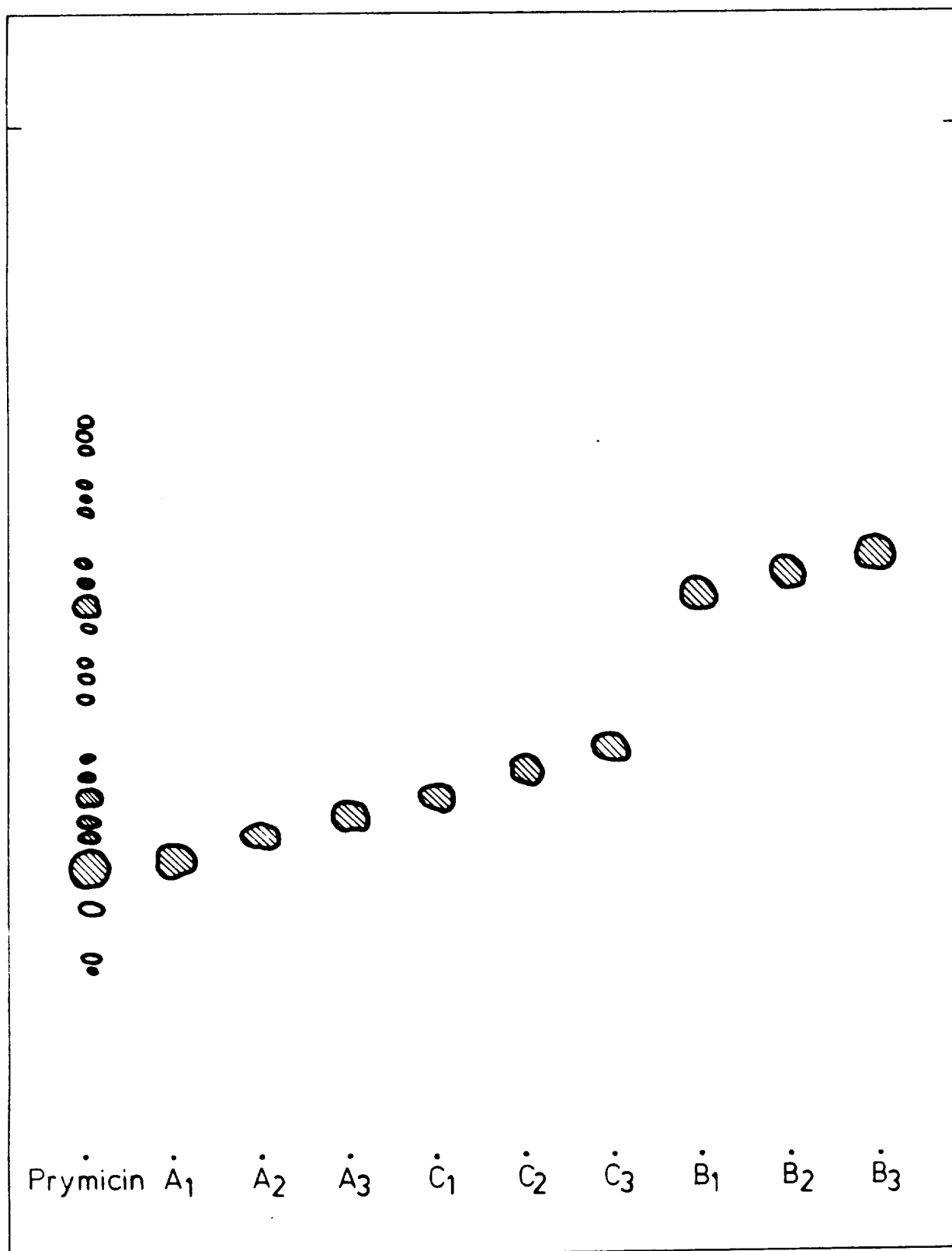


Fig.2

A1 Kinoprisiini FAB-MS

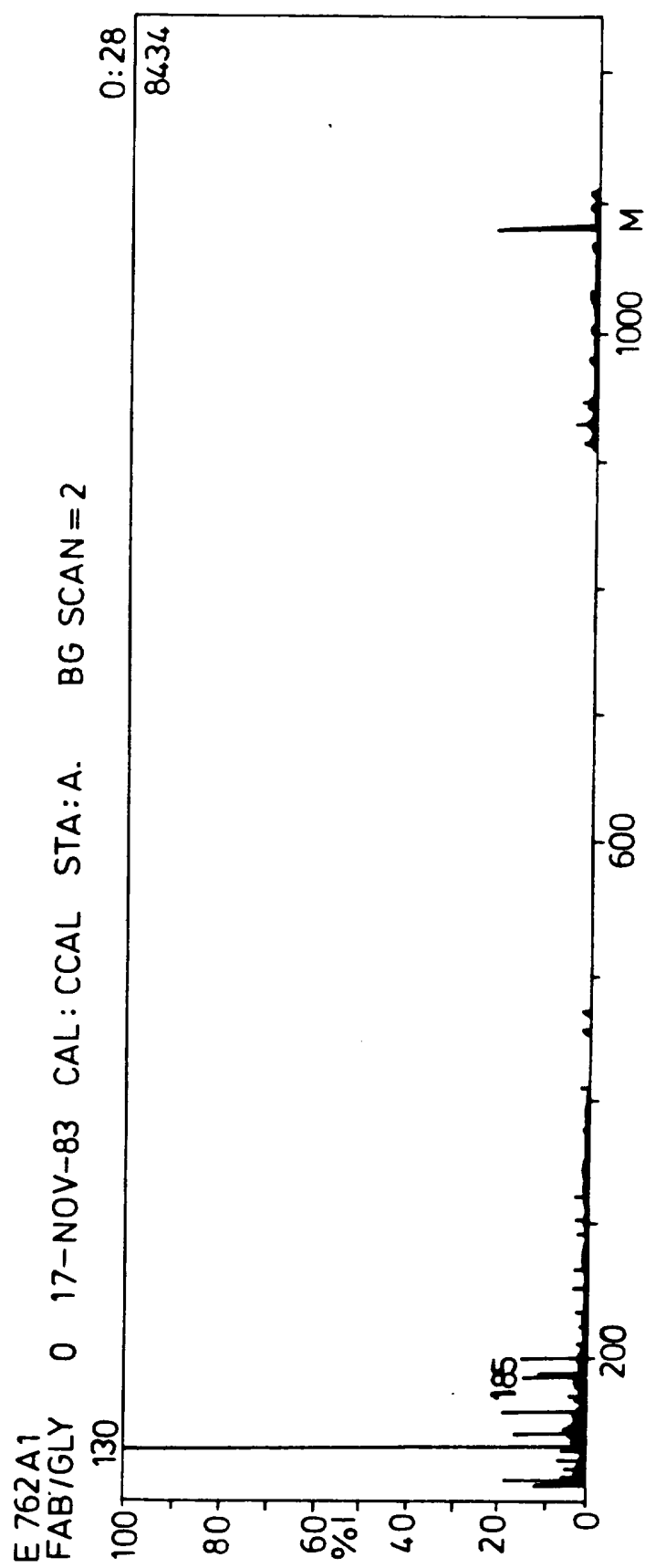


Fig. 3