

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 801772 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **801772**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12P

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **02.06.1980**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **02.06.1980**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **01.01.1981**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

08.06.1979 US 46744 03.03.1980 US 126,078

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Eli Lilly and Company, 307 East McCarty Street, Indianapolis, Ind. 46206, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Boeck, LaVerne Dwaine, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Kastner, Ralph Emil, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä A-30912-antibioottien valmistamiseksi.

Förfarande för framställning av A- 30912-antibiotika.

Eli Lilly and Company, 307 East McCarty Street, Indianapolis,
Indiana, Yhdysvallat.

Menetelmä A-30912-antibioottien valmistamiseksi - Förfarande
för framställning av A-30912-antibiotika

Tämä keksintö koskee menetelmää, jolla voidaan valmistaa A-42355-antibioottiseos, joka sisältää A-30912-tekijät A, B, D ja H, sekä erilliset tekijät siten, että vasta eristettyä *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440-kantaa viljellään elatusaineessa, joka sisältää assimiloituvia hiili- ja typpilähteitä ja epäorgaanisia suoloja, pinnanalaisviljelmässä aerobisissa olosuhteissa kunnes riittävä määrä antibioottista aktiivisuutta on kertynyt, antibioottiseos erotetaan elatusaineesta haluttaessa yksittäiset tekijät erotetaan antibioottiseoksesta.

Tämän keksinnön tarkoituksena on tarjota menetelmä, jolla voidaan valmistaa A-42355-antibioottiseos, joka sisältää A-30912-tekijät A, B, D ja H, sekä erilliset tekijät siten, että viljellään vasta eristettyä *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440 kantaa elatusaineessa, joka sisältää assimiloituvia hiili- ja typpilähteitä ja epäorgaanisia suoloja, pinnanalaisviljelmässä aerobisissa olosuhteissa kunnes riittävä määrä antibioottista aktiivisuutta on kertynyt, antibioottiseos erotetaan elatusaineesta ja yksittäiset tekijät erotetaan antibioottiseok-

sesta. A-30912-tekijä H on vasta löydetty antibiootti, jolla on sientenvastainen vaikutus.

Tämä keksintö tarjoaa menetelmän, jolla voidaan valmistaa A-42355-antibioottiseos, joka sisältää A-30912-tekijät A, B, D ja H, sekä antibiootti A-30912-tekijä A, antibiootti A-30912-tekijä B, antibiootti A-30912-tekijä D ja antibiootti A-30912-tekijä H, t u n n e t t u siitä, että a) viljellään *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440-kantaa elatusaineessa, joka sisältää assimiloituvia hiili- ja typpilähteitä ja epäorgaanisia suoloja, pinnanalaisviljelmässä aerobisissa olosuhteissa kunnes riittävä määrä antibioottista aktiivisuutta on muodostunut, b) haluttaessa erotetaan A-42355-antibioottiseos elatusaineesta ja c) haluttaessa erotetaan antibioottiset tekijät A-30912 A, B, D ja H A-42355-antibioottiseoksesta.

Keksintö tarjoaa myös biologisesti puhtaan *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440-kannan.

A-30912-tekijää A (antibiootti A-22082) ja sen valmistusta käyttämällä *Aspergillus nidulans* NRRL 8112-kantaa on selostettu U.S.A:n patenttijulkaisussa 4 024 246 ja A-30912-tekijöitä A, B, C, D, E, F ja G ja niiden valmistusta käyttämällä *Aspergillus rugulosus* NRRL 8113-kantaa on selostettu U.S.A:n patenttijulkaisussa 4 024 245. A-30912-tekijää H, joka on vasta löydetty A-30912-seoksen sisältämä pienenä määränä esiintyvä tekijä, on selostettu rinnakkaisessa patenttihakemuksessa, joka on jätetty virastoon tämän kanssa samana päivänä, ja jonka hakija on Karl H. Michel ja nimi "antibiottinen A-30912-tekijä H".

A-30912-tekijän H infrapuna-absorptiospektri KBr-kiekossa on esitetty liitteenä olevassa kuvassa 1.

Liitteenä olevassa kuvassa 2 on esitetty yhteenveto A-30912-tekijöiden suhteellisesta liikkumisesta ohutkerroskromografisessa analyysissä (TLC) käyttämällä adsorbenttina silikaageeliä (Merck-Darmstadt), liuotinsysteeminä etyyliasetaatimetanoliseos (3:2) ja ilmaisijana *Candida albicans*-bioautografia. Nuoli ilmaisee liuottimen kulkusuunnan ja "+" tarkoittaa lähtöpistettä. Hakasulkeilla on merkitty alueet, joissa pieninä määrinä esiintyvät tekijät E, F ja G voidaan nähdä. A-30912-tekijän A ja

pieninä määrinä esiintyvien tekijöiden E, F ja G R_f -arvojen keskinäinen vertailu on esitetty U.S.A:n patenttijulkaisussa 4 024 245 (ks. taulukko I sarakkeessa 4).

Tämä keksintö koskee uutta A-30912-antibioottien valmistusmenetelmää. A-30912-antibiootit muodostuvat seoksena, joka sisältää useita erillisiä tekijöitä.

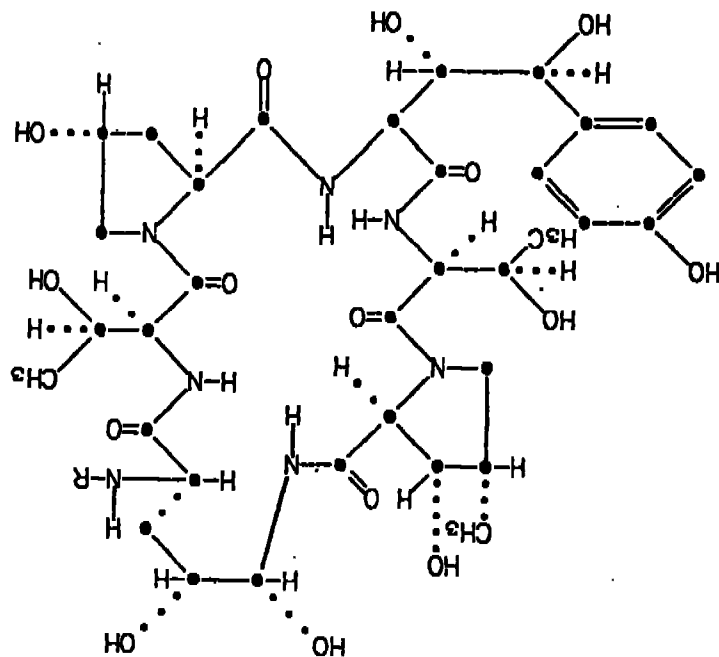
Termi "antibioottiseos", jota tässä selostuksessa ja fermentointialalla käytetään, tarkoittaa seosta, joka sisältää useita erillisiä samanaikaisesti syntyneitä antibioottitekijöitä. Kuten henkilöt, jotka ovat perehtyneet antibioottien tuotantoon fermentaatiolla, tietävät, syntyvien erillisten tekijöiden suhteelliset määrät antibioottiseoksessa vaihtelevat fermentaatio-olosuhteista riippuen.

Tämän keksinnön sisältämälle antibioottiseokselle on mielivaltaisesti annettu nimi A-42355-antibioottiseos. Sekaannuksen välttämiseksi käytetään kuitenkin A-42355-seoksen sisältämistä erillisistä tekijöistä A-30912-nimitystä, jos nämä ovat identtisiä A-30912-tekijöiden kanssa.

Samoin kuin A-30912-antibioottiseoksessa, A-30912-tekijää A esiintyy eniten myös A-42355-antibioottiseoksessa, ja A-30912-tekijöitä B, D ja H esiintyy edelleen pieninä määrinä A-42355-seoksessa.

A-30912-tekijää A (antibiootti A-22082) selostetaan U.S.A:n patenttijulkaisuissa 4 024 245 ja 4 024 246. Siinä vaiheessa, kun nämä patentit julkaistiin, uskottiin, että A-30912-tekijä A ei ole sama kuin echinocandin B (vert. F. Benz et al., Helv. Chim. Acta 57, 2459-2477 (1974) ja sveitsiläinen patenttijulkaisu 568 386 (Derwent Abstract 75884W). Myöhemmin on ilmennyt, että A-30912-tekijä A ja echinocandin B ovat identtisiä. Antibiootti SL 7810/F on myös identifioitu echinocandin B:ksi (C. Keller-Juslen, et al., Tetrahedron Letters 1976 (46), 4147 - 4150 ja belgialainen patenttijulkaisu 834 289 (Derwent Abstract 30159X).

Keller-Juslen, et al., ovat ehdottaneet echinocandin B:lle (SL 7810/F) kaavan 1 mukaista rakennetta:



1 R = linoleoyyli

Echinocandin B:tä (antibiootti 32204) valmistetaan fermentoimalla kantaa *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus* A 32204 (NRRL 3860) sveitsiläisessä patenttijulkaisussa no. 568 386 (Derwent no. 75884W) kuvatulla tavalla. Antibioottia SL 7810/F tuotetaan kannalla *Aspergillus rugulosus*, Thom and Raper (NRRL 8039) belgialaisessa patenttijulkaisussa no. 834 289 (Derwent no. 30159X) kuvatulla tavalla. Tämän keksinnön mukainen menetelmä, jolla valmistetaan A-30912-tekijää A (echinocandin B, SL 7810/F) viljelemällä *Aspergillus nidulans* var. *roseus*-kantaa, eroaa ennestään tunnetuista menetelmistä. Yksinkertaisuuden vuoksi tästä antibiootista käytetään seuraavassa nimitystä A-30912.

A-30912-tekijöitä on selostettu U.S.A:n patenttijulkaisussa 4 024 245. A-30912-tekijä B on samanlainen kuin antibiootti SL 7810/II ja saattaa olla sen kanssa identtinen. A-30912-tekijä D on samanlainen kuin antibiootti SL 7810/III ja saattaa olla sen kanssa identtinen. Antibiootteja SL 7810/II ja SL 7810/III tuotetaan kannalla *Aspergillus rugulosus*, Thom and Raper (NRRL 8039) belgialaisessa patenttijulkaisussa 834 289 (Derwent no. 30159X) kuvatulla tavalla.

A-30912-tekijä H

A-30912-tekijä H (A-30912H), joka on A-30912-antibiottiseoksesta vasta löydetty komponentti, on hyvin samantapainen kuin A-30912-tekijä A. Tähän asti tunnetuissa olosuhteissa A-30912H on läsnä vähäisenä määränä A-30912-seoksessa, määrän ollessa noin 0,01-1,0 % koko komponenttiseoksesta. A-30912-seoksesta on tunnistettu vielä eräs pienenä määränä esiintyvä tekijä, mutta sitä ei ole vielä voitu eristää riittävää määrää identifiointia varten. A-30912-tekijä H voidaan parhaiten erottaa tästä tekijästä silikageeliohutkerroskromatografisesti käyttämällä liuotinsysteeminä etyyliasetaatti-metanoliseosta (3:2) tai asetonitriili-vesiseosta (95:5). Kummassakin näistä systeemeistä tunnistamaton pienempi tekijä on polaarisempi kuin muut A-30912-tekijät.

A-30912-tekijä H on valkoinen amorfinen kiinteä aine. A-30912H:n alkuaineanalyysi antoi seuraavan likimääräisen prosentuaalisen koostumuksen: hiili 58,27 %, vety 7,49 %, typpi 8,67 %, happi 24,99 %.

A-30912-tekijän H molekyylipaino on noin 1073. Tämä molekyylipaino perustuu A-30912-tekijän A ($C_{52}H_{81}N_7O_{16}$) ja A-30912-tekijän H kvasimolekulaaristen ionien piikkien sovitukseseen (FD/FD). A-30912-tekijän H kvasimolekulaarisella ionilla (+Na) massaksi todettiin 1096,5782, 1096,5814. Keskimääräinen massa 1096,5798 vastaa koevirhe mukaanluettuna kaavassa $C_{53}H_{83}N_7O_{16} \cdot Na$, jonka teoreettinen massa on 1096,57940.

Näin ollen A-30912-tekijän H keskimääräisen empiirisen kaavan uskotaan olevan $C_{53}H_{83}N_7O_{16}$. A-30912-tekijän H alkuaineanalyysi vastaa erittäin hyvin empiiristä kaavaa $C_{53}H_{83}N_7O_{16} \cdot H_2O$ (laskettu: C 58,30, H 7,79, N 8,98, O 24,93).

A-30912-tekijän H infrapuna-absorptiospektri KBr-kiekoissa on esitetty liitteenä olevassa kuvassa 1. Seuraavat karakteristiset absorptiohuiput ovat havaittavissa: 2,9 (hyvin voimakas), 3,4 (voimakas), 3,5 (keskimääräinen), 5,9-6,1 (hyvin voimakas), 6,6 (voimakas), 6,9 (voimakas), 7,9-8,1 (keskimääräinen) ja 9,1 (voimakas) mikronia.

A-30912-tekijän H ultraviolettiaabsorptiospektreissä sekä neutraalissa että happamassa metanolissa on absorptiomaksimit kohdissa 223 nm (ϵ 13 100) ja 275 nm, leveä piikki (ϵ 2 100). A-30912-tekijän H ultraviolettispektrissä emäksisessä metanolissa

on absorptiomaksimit kohdissa 245 nm (ϵ 14 700) ja 290 nm, leveä piikki (ϵ 3 500) ja myös pääteabsorptio.

A-30912 tekijän H ^{13}C -nmr-spektrillä perdeuterometanolissa on seuraavat ominaisuudet:

δ 176.07, 174.15, 173.49, 172.56, 172.47, 169.88, 158.45, 133.01, 130.90, 129.52, 129.04, 116.21, 82.15, 77.00, 75.98, 75.71, 71.27, 69.55, 69.42, 68.22, 62.44, 58.69, 57.25, 56.81, 56.08, 52.88, 51.32, 39.08, 38.60, 36.89, 32.65, 30.77, 30.45, 30.26, 28.18, 27.14, 26.55, 20.11, 19.60, 11.33.

A-30912-tekijällä H on seuraavat keskimääräiset kiertymät:

$\langle \alpha \rangle_{\text{D}}^{25} -40^\circ$ (c 0,5, CH_3OH)

$\langle \alpha \rangle_{365}^{25} -151^\circ$ (c 0,5, CH_3OH)

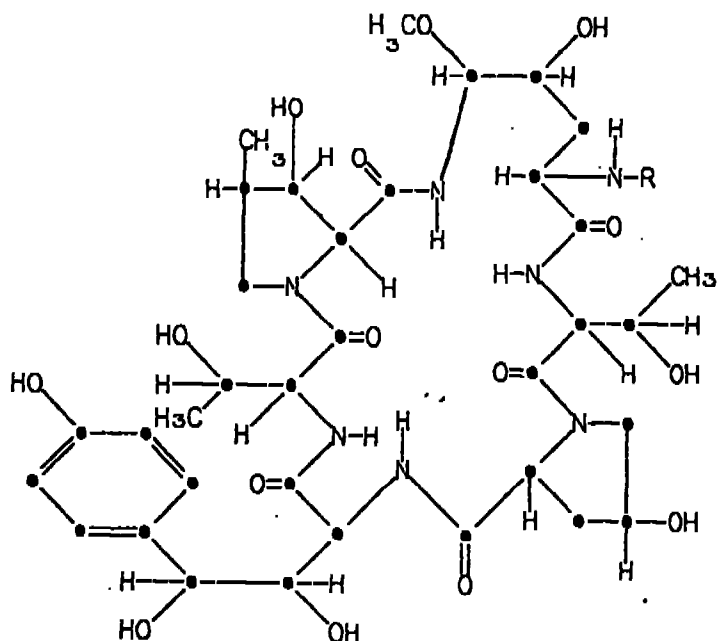
Kun A-30912-tekijä H titrattiin elektrometrisesti dime-tyyliformamidin 66 % vesiliuoksessa, havaittiin sen sisältävän titrattavan ryhmän, jonka pK_a -arvo on noin 12,90 (alku-pH 7,12).

A-30912-tekijän H aminohappoanalyysi hydrolysoinnin jälkeen osoitti sen sisältävän treoniinia ja neljää muuta vielä tunnistamatonta aminohappoa.

A-30912-tekijä H liukenee useihin orgaanisiin liuottimiin kuten metanoliin, etanoliin, dimetyyliformamidiin, dimetyyli-sulfoksidiin ja etyyliasetaattiin, mutta se on liukenematon ei-polaarisiin orgaanisiin liuottimiin kuten dietyylieetteriin ja petrolieetteriin. A-30912-tekijä H liukenee myös vesiliuoksiin ja varsinkin sellaisiin, joiden pH on yli 7,0.

A-30912-tekijä H (molekyylipaino 1073) eroaa A-30912-tekijästä A (molekyylipaino 1059) vain 14 massayksiköllä. Molemmat komponentit ovat fysikaalisilta ja kemiallisilta ominaisuuksiltaan hyvin samanlaisia ja kummastakin vapautuu hydrolysoitaessa linoleenihappoa. A-30912H sisältää lisäksi yksikön $-\text{CH}_2-$, joka on läsnä ryhmänä $-\text{O}-\text{CH}_3$ korvaten yhden $-\text{OH}$ -ryhmän molekyylin syklisessä peptidiosassa.

Tekijän A-30912H rakenne on esitetty kaavalla 2:



2 R = linoleoyyli

Tämän keksinnön mukaisessa A-30912-antibioottien tuotantomenetelmässä viljellään tässä selostuksessa kuvatulla tavalla uutta *Aspergillus nidulans*-mikro-organismia. Uudelle mikro-organismille on annettu nimi *Aspergillus nidulans* var. *roseus*.

Tämän keksinnön sisältämä uusi mikro-organismi on biologisesti puhdas kanta, joka on eristetty maanäytteestä Greenfieldistä Indianasta. Eräs tämän kannan erityisominaisuus on kyky tuottaa A-30912-antibiootteja. Tästä mikro-organismista tehty viljelmä on toimitettu Northern Regional Research Laboratoryyn, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Peoria, Illinois 61604, kokoelmiin, jossa sille on annettu numero NRRL 11440, ja josta se voidaan tällä numerolla tilata.

Samoin kuin muissa organismeissa, saattaa myös kannassa *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440 tapahtua muutoksia. Kannasta NRRL 11440 voidaan saada keinotekoisia muunnoksia ja mutantteja käsittelemällä erilaisilla tunnetuilla mutageeneilla, ultraviolettisäteillä, röntgensäteillä, korkeataajuisilla aalloilla, radioaktiivisella säteilyllä ja kemikaaleilla. Kaikkia luonnollista ja keinotekoisia kannan *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440 muunnoksia ja mutantteja, joilla on kyky tuottaa A-30912-antibiootteja, voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä.

Tämän keksinnön sisältämän uuden mikro-organismin tutki ja tunnisti Thomas H. Sands, Lilly Research Laboratories.

Yksinkertaisuuden vuoksi uutta *Aspergillus nidulans* var. *roseuskantaa* nimitetään tässä selostuksessa kannaksi A-42355. Seuraavissa kappaleissa selostetaan syistä, miksi tämä kanta on luokiteltu uudeksi *Aspergillus nidulans*-muunnokseksi, jolle on annettu nimi *A. nidulans* var. *roseus*. Tässä selostuksessa termit "ISCC-NBS" tarkoittavat värinimiä, jotka perustuvat ISCC-NBS-menetelmään (K.L. Kelly ja D.B. Judd, "The ISCC-NBS Methods of Designating Colors and A Dictionary of Color Names", U.S. Department of Commerce, Circ. 553, Washington, D.C., 1955). Termi "Maerz ja Paul" viittaa väriryhmiin, joita A. Maerz ja M.R. Paul ovat selostaneet teoksessa "Dictionary of Color", McGraw-Hill Book Company, New York, N.Y., 1950.

Vertailut perustuvat teokseen K.B. Raper and D.I. Fennel, "The Genus *Aspergillus*", Williams and Wilkins, 1965.

A42355-viljelmä saavuttaa seitsemässä vuorokaudessa halkaisijan 14 mm ja 21 vuorokaudessa halkaisijan 35 mm, kun sitä kasvatetaan 25°C:ssa Czapek-agarissa. Pesäkkeen pinta on säteen suunnassa taipunut kuperaksi ja alussa samettimainen tai hieman villakarvainen. Pinnan ulkonäkö muuttuu ajan mittaan, koska siitä tihkuu vaaleanpunaista nestettä, joka kuivumisen myötä johtaa pinnan täplikkyyteen. Reuna on hyvin nyhälaitainen tai liuskainen eikä lainkaan suora ja ääreinen pinnanalainen kasvu on vain vähäistä. Pesäkkeen vanhetessa pigmentin muutos aiheuttaa vyöhykkeisyyttä. Kääntöpuoli on kovera ja vain sen reunat koskettavat agarია. Muodostuu vaaleanpunainen liukoinen pigmentti. Huovastomatto on hyvin sitkeä eikä siinä ole mitään selvää hajua. Nuorten pesäkkeiden värjäytymiseen vaikuttavat kypsymättömät konidiot, jotka ovat vaaleanvihertävän keltaisia (ISCC-NBS 101 ja Maerz ja Paul 11-K-1). Lopulta tämä väri esiintyy vain pesäkkeen ääri-laidoilla. 10 vuorokauden kuluttua pyöreähköjä kuorisoluryhmiä, jotka peittävät mustanvioletteja kotelorakkoja, on koko pesäkkeen alueella, mutta selvimmin keskustaan ryhmittyneinä. 21 vuorokauden kuluessa kapea, hieman litistynyt reuna on muuttunut harmaanvihertävän keltaiseksi (ISCC-NBS 105 ja Maerz ja Paul 12-I-2).

Reunan sisäpuolella pesäke on väriltään kohtalaisen kellanvaaleanpunainen (ISCC-NBS 29 ja Maerz ja Paul 11-A-6) ja tihkuva neste vaikuttaa väriin. 21 vuorokauden kuluttua keskusta tummenee harmaanvihreistä konidioista ja kuorisolujen peittämisestä mustanvioletista kotelorakoista. Kääntöpuolen värit vaihtelevat vaaleanruskeasta (ISCC-NBS 57) ja Maerz ja Paul 13-A-7) kohtalaisen punertavan ruskeaan (ISCC-NBS 43 ja Maerz ja Paul 6-F-9). Kolmen viikon ja sitä pitemmän ajan kuluttua kääntöpuoli on väriltään hyvin tumman violetti, lähes musta.

Konidion pää on ensin pyöreä ja kirkkaan keltainen ja sitten se muuttuu tummanvihreäksi ja kireän pylväsmäiseksi. Kypsinä päät ovat $93,4 - 116,7 \mu$ pitkiä ja niiden keskimääräinen koko on $106 \times 47 \mu$. Vesikkeli on suunnilleen lusikkamainen tai päärynänmuotoinen, ja kuten konidiofori, väriltään vaaleanruskea. Vesikkelit ovat hedelmällisiä yli ylemmältä kahdelta kolmasosaltaan ja ovat kooltaan $10-12 \mu \times 8 - 10 \mu$ (keskimääräinen koko $9,2 \mu \times 11,3 \mu$). Konidioforit ovat venkuraisia, pehmeitä ja suhteellisen paksuseinäisiä. Niiden pituus on $88 - 112 \mu$ (keskimäärin 101μ). Niiden leveys vaihtelee välillä $4 - 6 \mu$, mutta se on keskimäärin 6μ .

Itiöperät ovat kaksisarjaisia, lasimaisia tai vaaleanruskeita ja sileäseinäisiä. Primääriset itiöperät ovat lähes kiilanmuotoisia. Ne ovat $6,3 - 10,3 \mu$ pitkiä ja $2-3 \mu$ leveitä leveimmästä kohdastaan (keskimääräinen koko: $9,3 \times 2,7 \mu$). Sekundääriset itiöperät ovat muodoltaan munanmuotoisen ja ylösalaisin olevan päärynänmuotoisen välillä ja kooltaan $5,5 - 11,0 \mu \times 2,4 - 3,2 \mu$ (keskimääräinen koko: $9,9 \times 2,9 \mu$). Konidiot ovat pallonmuotoisia, hieman karheita tai piikkisiä ja tummanvihreitä. Niiden halkaisija on $2,4 - 4,0 \mu$, keskimäärin $3,2 \mu$.

Mallasuuteagarilla muodostuu 7 vuorokaudessa 35°C :ssa pesäke, jonka halkaisija on 14 mm . 21 vuorokaudessa pesäkkeen halkaisija saavuttaa 30 mm . Alussa pesäke muodostuu valkoisesta ilmavasta rihmastosta. Konidionmuodostus tapahtuu ensimmäisen viikon aikana ja suhteellisen litteä, samettimainen, nyhälaitainen pesäke muuttuu tumman kellertävän vihreäksi (ISCC-NBS 137 ja Maerz ja Paul 24-J-6). Pesäkkeessä on vyöhykkeitä, jotka johtuvat samankeskisistä keltaisista kuorisolumassoista, jotka ympäröivät tai peittävät tummanvioletteja kotelorakkoja. Mallasuutteil-

la kasvanut konidioaste muistuttaa Czapek-agarilla kasvanutta muuten paitsi dimensioiltaan.

Konidion päiden pituus on 100 - 170 μ , keskimääräinen koko 138 x 50 μ . Konidioforit ovat 100 - 210 μ pitkiä (keskimäärin 182 μ) ja 6 μ leveitä. Vesikkelit ovat kooltaan 8 - 12 x 6 - 12 μ (keskimäärin 12 x 9,2 μ). Primääriset itiöperät ovat kooltaan 5,5 - 8,7 μ x 2,4 - 4,0 μ (keskimäärin 7,2 x 6,6 μ). Sekundääriset itiöperät ovat kooltaan 5,5 - 10,3 μ x 2,0 - 3,6 μ (keskimäärin 7,4 x 3,5 μ). Konidioiden halkaisija on 2,3-3,2 μ , keskimäärin 3,2 μ .

Koteloaste on samanlainen molemmissa agarissa. Lukuksia tummanvioletteja kotelorakkoja peittävät pallomaiset tai lähes pallomaiset, paksuseinäiset lasimaiset tai vaaleankeltaiset kuorisolut, joiden halkaisija on 12,6 - 18,2 μ (keskimääräinen koko 15,3 μ). Kotelorakot ovat muodoltaan pallomaisia tai lähes pallomaisia ja niillä on jopa kolmikerroksiset seinät, joista ulommainen kerros muodostuu pseudotylppysolukosta. Kotelorakkojen halkaisija on 140 - 800 μ , tavallisimmin 165-250 μ , keskimäärin 229 μ . Kahdeksan itiötä sisältävät lasimaiset itiökotelot ovat muodoltaan pallomaisia tai lähes pallomaisia tai epäsäännöllisen ellipsoidisia. Pallomaisten itiöiden halkaisija on 9,2 μ , josta on vain vähän poikkeamia. Elipsoidisten itiökoteloiden dimensiot ovat 9,3 x 8,3 μ . Koteloitiöt ovat väriltään oranssinpunaisia ja pinnasta katsottuina pallomaisia ja sivulta katsottuina linssimäisiä. Linssimäisen suunnan pituusakselilla on kaksi hienosti laskostettua, koko pituudelta jatkuvaa yhdensuuntaista ekvatoriaalista harjaa. Pinnalta katsottuna yksi harja ympäröi itiön runkoa, joka on sileä ja kaksikuorinen. Harja on 0,5 μ leveä ja itiön rungon halkaisija on 4,4 μ . Linssimäiseltä suunnalta keskimääräinen koko on 4,7 x 3,7 μ .

Kellanvihreiden ryppyisten kondioiden, pylväsmäisten konidion päiden, sileäseinäisten vaaleanruskeiden konidioforien ja vesikkelien, kaksisarjaisten itiöperien ja pallomaisten, paksuseinäisten kuorisolujen vuoksi A42355 kuuluu Aspergillus nidulans-ryhmään. Nämä seikat sekä se, että kannalla on koteloaste, jossa tummanvioletit pallomaiset kotelorakot ovat kiinteässä yhteydessä kuorisoluihin tai niiden peittämiä, sekä

oranssinpunaiset linssimäiset koteloitiöt, joita koristaa kaksi laskostettua, yhdensuuntaista ekvatoriaalista harjaa, sijoittavat kannan A42355 sukuun *Emericella* ja ryhmään *Aspergillus nidulans*.

A42355 ei kuvaukseltaan tarkoin sovi mihinkään julkaistuun *A. nidulans*-ryhmän lajin tai muunnoksen kuvaukseen. Kantaa A42355 lähinnä muistuttava on *A. nidulans* (Eidam) Wint., kokoelmassa numerolla WB187 (NRRL 187). Nämä kannat ovat samanlaisia värinsä ja koteloitiöiden tyypin puolesta, mutta harjan leveys on erilainen. Kotelorakot ovat samanlaiset, mutta kannassa A42355 seinä on useampikerroksinen solukko eikä yksikerroksinen. Kummallakin kannalla on kellanvihreä vallitseva konidioaste mallasagarilla, mutta kannalla A42355 on selvempi koteloaste kuin vertailukanalla, jolla se on osittain päällekasvanut ja heikosti värjäytynyt. Kummassakin kannassa rihmasto, konidioforit ja vesikkelit ovat sileäseinäisiä ilman kuorta, mutta kannan A42355 vesikkeli on muodoltaan lusikkamainen tai päärynäimäinen, kun taas *A. nidulans*-vesikkeli on puolipallon muotoinen. Czapek-agarilla kasvatetut A42355- ja *A. nidulans*-kannat eroavat toisistaan kasvunopeudessa, tiheysteen muodostuksessa, konidion päiden määrässä ja koossa ja useimpien muiden mitattujen suureiden osalta.

Vaikka kantojen A42355 ja *A. nidulans* (Eidam) Wint., välillä onkin yhtäläisyyksiä, on myös eroavaisuuksia sen verran merkittävässä määrin, että A42355 katsotaan uudeksi muunnokseksi, jolle on annettu nimi *A. nidulans* var. *roseus*.

Aspergillus nidulans var. *roseus*-kantaa voidaan kasvattaa missä tahansa useista mahdollisista elatusaineista. Eräät elatusaineet ovat kuitenkin muita edullisempia tuotannon taloudellisuuden, optimaalisen saannon ja tuotteen erottamisen helppouden vuoksi. Niinpä esim. suurimittakaavaisessa fermentoinnissa on edullinen hiililähde pellavansiemenöljy tai glukoosi, mutta myös melassia, tärkkelystä, dekstriiniä, laktoosia, sakkaroosia, maltoosia, glyserolia, rasvahappoja tms. voidaan käyttää. Edullisia tyypilähteitä ovat entsyymaattisesti hydrolysoitu kaseiini, soijajauho ja liukoinen lihapeptoni, mutta myös rankki, nitraattisuolat, mononatriumglutamaatti tms. sopivat käytettäväiksi.

Elatusaineeseen voidaan lisätä epäorgaanisia ravinnesuoloja. Näitä ovat tavanomaiset liukenevat suolat, joista saadaan natriumia, magnesiumia, sinkkiä, rautaa, kalsiumia, ammoniumia, kloridia, karbonaattia, sulfaattia, nitraattia, fosfaattia tms. ioneja.

Elatusaineen tulisi sisältää organismin kasvun ja kehityksen kannalta oleelliset hivenaineet. Tällaisia hivenaineita on yleensä riittävä määrä epäpuhtauksina elatusaineen muissa komponenteissa.

Jos vaahdonmuodostus muuttuu ongelmaksi, saattaa olla edullista lisätä suurimittakaavaisessa fermentoinnissa pieni määrä (esim. 0,2 ml/l) vaandonestoainetta, kuten polypropyleeniglykolia.

Jotta saataisiin riittävä määrä A-42355-antibioottiseosta, on kasvatus edullista suorittaa aerobisissa olosuhteissa pinnanalaisesti. Pieniä määriä A-42355-antibioottiseosta voidaan saada ravisteluviljelmillä. Koska antibiootinmuodostus alkaa vasta melko pitkän ajan kuluttua, jos suurissa säiliöissä siirrostus suoritetaan käyttämällä itiöitä, on edullisempaa käyttää kasvuvaiheessa olevaa siirrostetta. Kasvuvaiheessa oleva siirroste valmistetaan siten, että pieneen määrään elatusainetta siirrostetaan itiöitä tai huovastoa ja siitä kasvatetaan voimakkaassa lisääntymisvaiheessa oleva kasvusto. Voimakkaassa lisääntymisvaiheessa oleva viljelmä siirretään suurempaan säiliöön. Siirrosteen kasvatuksessa voidaan käyttää samaa elatusainetta kuin suuremmissa fermentaatioissa, mutta myös muita aineita voidaan käyttää.

A. nidulas var. roseus NRRL 11440-kantaa voidaan kasvat-
taa lämpötiloissa, jotka ovat välillä 20-43°C, mutta paras kasvu on välillä 30-37°C. Optimaalinen A-30912-antibioottiseoksen tuotantolämpötila on alle 30°C:ssa.

Kuten aerobisissa pinnanalaiskasvatuksissa on tavanomaista, elatusaineen läpi puhalletaan steriiliä ilmaa. Tehokkaan antibioottituotannon kannalta pitäisi sekoituksen ja ilmastuksen olla sellaisia, että liuenneen hapen taso vastaa vähintään 40 prosentista ilman kyllästymisastetta ilmakehän paineessa. Sekoitus auttaa myös pitämään muuten paksun ja raskaan kasvuston hienojakoisessa muodossa fermentoinnin aikana.

A-42355-antibioottiseoksen tuotantoa fermentoinnin aikana voidaan seurata testaamalla käymisliuoksesta tai biomassan alkoholiuutteesta tai koko käymisseoksesta antibioottinen aktiivisuus sellaisen organismin suhteen, jonka tiedetään olevan herkkä A-30912-antibiooteille. Yksi A-30912-antibioottien läsnäolon testauksessa hyödyllinen organismi on *Candida albicans*. Biomääritys on edullista suorittaa paperikiekoilla tai agar-levyillä, joihin koeorganismia on tartutettu.

Antibioottista aktiivisuutta havaitaan tavallisesti jo toisena käymispäivänä. Maksimaalinen antibioottiaktiivisuus esiintyy tavallisesti kuudennen ja kahdeksannen päivän välillä.

Erilliset A-30912-tekijät voidaan erottaa ja identifioida A-42355-seoksesta ohutkerroskromatografisesti (vrt. liitteessä oleva kuva 2). Edullinen adsorbentti on silikageeli.

Taulukossa I on esitetty A-30912-tekijöiden A-G R_f -arvot käyttämällä silikageeli-TLC-analyysi (Merck, Darmstadt), bentseeni: metanoli-liuotinsysteemiä (7:3) ja *Candida albicans*-bioautografiaa.

Taulukko I

<u>A-30912-tekijä</u>	<u>R_f-arvo</u>
A	0,35
B	0,45
C	0,54
D	0,59
E	0,27
F	0,18
G	0,13

Taulukossa II on esitetty A-30912-tekijöiden A,B,C,D ja H likimääräiset R_f -arvot eri liuotinsysteemeissä käyttämällä silikageeli-TLC-analyysiä (Merck-Darmstadt silikageeli no. 60-levyt, 20 x 20 cm) ja *Candida albicans*-bioautografiaa.

Taulukko II

A-30912-tekijä

R_F-arvot eri liuotinsysteemeissä

	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>	<u>d</u>
Tekijä A	0.28	0.14	0.28	0.43
Tekijä B	0.39	0.21	0.42	0.47
Tekijä C	0.46	0.31	0.51	0.58
Tekijä D	0.50	0.38	0.57	0.61
Tekijä H	0.42	0.27	0.36	0.53

Liuotinsysteemit

a: etyyliasettaatti: metanoli (3:2)

b: etyyliasettaatti: metanoli (7:3)

c: asetonitriili: vesi (95:5)

d: etyyliasettaatti: etanoli: etikkahappo (40:60:0,25)

A-30912-antibiootit voidaan ottaa talteen käymisseoksesta fermentointialalla tunnetuilla menetelmillä. A-30912-antibiootit ovat yleensä myseeliosassa. Tuotetta saadaan talteen mahdollisimman suuri määrä, kun koko käymiseos uutetaan. On edullista lisätä käymisseoksen suuruinen määrä liuotinta, kuten metanolia, koko seokseen, suodattaa ja laskea suodoksen pH välille 4-6 ennen uuttua. Toinen mahdollisuus on erottaa myseeli, uuttaa myseeli metanolilla ja ottaa talteen antibiootit uuttamalla metanoliuute. Kloroformi on erittäin edullinen liuotin, kun halutaan uuttaa A-30912-antibiootit A-42355-seoksena, mutta muitakin liuottimia voidaan käyttää.

Yksittäiset A-30912-antibiootit voidaan erottaa A-42355-deoksesta kromatografisesti käyttämällä apuna erilaisia adsorbentteja. Sopivia adsorbentteja ovat mm. silikageeli, käänteisfaasihartsit kuten silikageeli/C₈, silikageeli/C₁₈, Quantum LP-1 tai Lichroprep RP-8 ja RP-18, Fluorisil, Sephadex G-25, LH-20 ja G-15, alumiinioksidi, Diaion HP-20, Amberlite XAD-4 ja X-384. Tuotteiden valmistajat ovat seuraavat: Diaion (Mitsubishi Chemical Industrien, Tokio), Amberlite (Rohm and Haas Co., Philadelphia, Pa.), Sephadex (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Ruotsi), Florisil (Floridin Co., Tallahassee, Fla.) ja silikageeli/C₈ ja silikageeli/C₁₈ (E. Merck, Darmstadt, Saksan Liittotasavalta). Kuormauskyvyltään suuren silikageeli/C₁₈:n valmistus LP-1 silikageelistä (Whatman) on selostettu esimerkiksi 8.

Korkean suorituskyvyn käänteisfaasi-alhaispainenestekromatografia (HPLPLC) käyttämällä silikageeli/C₁₈:ta adsorbenttina on edullinen menetelmä A-30912-antibioottien lopulliseksi puhdistamiseksi. Tässä menetelmässä A-42355-seos (saatu esim. uuttamalla suodatettu käymisseos kloroformilla) sijoitetaan liuokseen liuotettuna pylvääseen, joka on tasapainotettu samalla liuottimella. Sen jälkeen pylväs eluoidaan liuottimella. Metanoli: vesi:asetonitriili (7:2:1) on edullinen liuotinsysteemi. Jakeet kerätään talteen ja niitä seurataan Candida albicans-bioautografialla ja/tai UV-ilmaisulla (perustuen suhteellisiin retentioaikoihin). Jakeet, jotka sisältävät haluttua A-30912-tekijää, yhdistetään. Joskus on tarpeen suorittaa kromatografinen erotus uudestaan, jotta A-30912-tekijä saataisiin puhtaana.

A-30912-tekijät A, B, D ja H voidaan erottaa HPLPLC-menetelmällä käyttämällä seuraavia olosuhteita:

Pylväs: lasi, 0,8 x 15,0 cm

Täyte: Nucleosil^R 10-C₁₈ (Machery-Nagel and Company), täytetty käyttämällä lietetäyttekniikkaa, joka on selostettu esimerkissä 8.

Liuotin: metanoli: vesi:asetonitriili (7:2:1)

Näytetilavuus: 8 µl

Näytekoori: 8 µg

Pylvään lämpötila: ympäristön lämpötila

Virtausnopeus: 1,8 ml/min

Paine: noin 1380 kPa

Detektor: UV 222 nm (ISCO Model 1800 Variable Wavelength UV-Visible Absorbance Monitor)

Pumppu: LDC-Duplex pienoispumppu

Injektio: loop injection

Keskimääräiset A-30912 tekijöiden A, B, D ja H retentioajat näissä olosuhteissa on esitetty taulukossa III.

Taulukko III

A-30912-tekijä	Retentioaika (s)
A	792
B	870
H	990
D	1,140

Esimerkki 1

A-42355-antibioottiseoksen valmistus

A. Fermentointi ravistelupulloissa

Aspergillus nidulans var. roseus NRRL 11440-kannasta valmistetaan viljelmä agar-vinopinnoille (18 x 150 ml), joissa sitä säilytetään. Elatusaineen koostumus on seuraava:

<u>Aineosa</u>	<u>määrä</u>
glukoosi	5 g
hiivauute	2 g
CaCO ₃	3 g
kasvismehu*	200 ml
agar*	20 g
tislattu vesi	täydennetään litraksi
(alku-pH 6,1)	

*V-8 Juice, Campbell Soup Co., Camden, N.J.

**Meer Corp.

Vinopintaan siirrostetaan *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440-kantaa ja inkuboidaan noin 7 vuorokautta 25°C:ssa. Kypsään vinopintaviljelmään lisätään vettä ja sitä raaputetaan steriilillä silmukalla niin, että itiöitä irtoaa. Näin saatu suspensio sekoitetaan 10 ml:aan steriiliä tislattua vettä.

1 ml tätä vinopinnasta saatua suspensiota siirretään 55 ml:aan elatusainetta, joka on 250 ml:n pullossa. Elatusaineen koostumus on seuraava:

<u>Aineosa</u>	<u>Määrä</u>
sakkaroosi	25 g
sokeriruokomelassi	36 g
maissinliotusneste (Corn-steep liquor)	6 g
mallasuute	10 g
K ₂ HPO ₄	2 g
*entsymaattisesti hydrolysoitu kaseiini	10 g
johtovesi	1100 ml
(alku-pH 6,5-6,7)	

*N-Z-Case, Humko Sheffield Chemical, Lyndhurst, N, J.

Näin saatua elatusainetta, johon on siirrostettu mikrobikanta, inkuboidaan 48 tuntia 25°C:ssa pyörivää liikettä tekevässä ravistelulaitteessa nopeudella 250 r/min. 24 tunnin kuluttua seosta homogenoidaan 1 minuutti sekoittajassa matalassa nopeudella (Waring-tyyppinen), ja sen jälkeen se viedään takaisin inkubointiin jäljellä oleviksi 24 tunniksi. Vaihtoehtoisesti voidaan seosta inkuboida 48 tuntia ja sen jälkeen homogenoida 15 sekuntia pienellä nopeudella.

Tämä kasvuvaiheessa oleva inkuboitu seos voidaan käyttää ravistelupullovermentaation elatusliuoksen siirrostamiseen tai sillä voidaan siirrostaa toisen vaiheen kasvuliuos. Vaihtoehtoisesti sitä voidaan säilyttää nestemäisen typen kaasufaasissa mikrobikannan myöhempää käyttöä varten. Kasvusto valmistetaan varastoitavaan muotoon pieniin pulloihin seuraavalla tavalla:

Kasvuvaiheessa olevaa seosta sekoitetaan (tilavuusyks./tilavuusyks.) koostumukseltaan seuraavaan liuokseen:

<u>Aineosa</u>	<u>Määrä</u>
glyseroli	20 ml
laktoosi	10 g
tislattu vesi	täydennetään 100 ml:ksi

Valmistettu suspensiot jaetaan pieniin steriileihin kierrekorkilla varustettuihin putkiin (4 ml putkea kohti). Näitä putkia säilytetään nestemäisen typen kaasufaasissa.

Näin säilytetyjä suspensioita voidaan käyttää agar-vinopintojen tai nestemäisten elatusaineiden siirrostamiseen. Vinopintoja inkuboidaan 25°C:ssa valossa 7 vuorokautta.

B. Fermentointi säiliössä

Jotta saataisiin valmistetuksi suurempi määrä siirrostetta, 10 ml inkuboitua ensimmäisen vaiheen vegetatiivista seosta siirretään 400 ml:aan toisen vaiheen elatusliuoksella. Toisen vaiheen seosta inkuboidaan 2 litran Erlenmeyer-pullossa 24 tuntia 25°C:ssa ravistelulaitteessa. Joka tekee liikettä kaarta pitkin (halkaisija 5 cm) nopeudella 250 r/min.

Edellä kuvatulla tavalla inkuboidulla seoksella (800 ml) siirrostetaan 100 l steriiliä tuotantoliuosta, jonka koostumus on jokin seuraavista:

Tuotantoliuos I

<u>Aineosa</u>	<u>Määrä</u>
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,00455 g/l
liukoinen lihapeptoni*	30,5 g/l
soijajauho	15,5 g/l
tapiokadekstriini**	2,0 g/l
sokeriruokomelassi	10,5 g/l
entsymaattisesti hydrolysoitu kaseiini***	8,5 g/l
Na_2HPO_4	4,5 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,5 g/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g/l
pellavansiemenöljy	40,0 ml
(vaahdonestoaine)****	1,0 ml
johtovesi	1000,0 ml
(alku-pH 6,8-7,0)	

* O.M. Peptone, Amber Laboratories, Juneau, Wisc.

** Stadex 11; A.E. Staley Co., Decatur, Ill.

*** N-Z-Amine A, Humko Sheffield Chemical, Lyndhurst, N.J.

**** P2000, Dow Corning, Midland, Mich.

Tuotantoliuos II

<u>Aineosa</u>	<u>Määrä</u>
glukoosi	2,5 %
tärkkelys	1,0 %
Liukoinen lihapeptoni*	1,0 %
sokeriruokomelassi	1,0 %
CaCO_3	0,2 %
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 %
entsymaattisesti hydrolysoitu kaseiini**	0,4 %
(vaahdoestoaine)***	0,02 %
johtovesi	tarvittava määrä

* O.M. Peptone

** N-Z-Amine A

*** Antifoam "A", Dow Corning

Tuotantoliuosta, johon on siirrostettu mikrobikasvusto, fermentoidaan 165 litran fermentorissa 7 vuorokautta 25°C:ssa.

Käymisseokseen johdetaan steriiliä ilmaa niin, että liuenneen hapen taso vastaa keskimäärin yli 50 % ilman kyllästymisastetta.

C. Kolmannen vaiheen vegetatiivinen elatusliuos

Jos ferementointi suoritetaan suuremmissa ferementoreissa kuin 100 litran käymiselle tarvitaan, on suositeltavaa, että suurempaan säiliöön siirrostetaan kolmannen vaiheen vegetatiivinen seos. Edullinen kolmannen vaiheen vegetatiivinen elatusliuos on koostumukseltaan seuraava:

<u>Aineosa</u>	<u>Määrä</u>
sakkaroosi	25 g
sokeriruokomelassi	25 g
maissiliuotusvesi (Corn-steep liquor)	6 g
entsymaattisesti hydrolysoitu kaseiini*	10 g
mallasuute	10 g
K_2HPO_4	2 g
johtovesi	1000 ml
(alku-pH 6,1)	

* N-Z-Case

Esimerkki 2

A-42355-antibioottiseoksen erottaminen

Koko käymisseosta (4127 litraa), joka oli saatu esimerkisessä 1 kuvatulla menetelmällä käyttämällä tuotantoliuosta II, sekoitettiin perusteellisesti metanolin (4289 l) kanssa 1 tunti ja sen jälkeen se suodatettiin käyttämällä suodatusapuaainetta (Hyflo Super-cel, piimaa, Johns-Manville Products Corp.). Suodoksen pH säädettiin arvoon pH 4,0 lisäämällä 5 N suolahappoa. Hapan suodos uutettiin kahdesti tilavuudellaan kloroformiuutteet yhdistettiin ja haihdutettiin vakuuissa 20 litran tilavuuteen. Tähän konsentraattiin lisättiin 200 litraa dietyylieetteriä niin, että A-42355-seos saostui. Kun sakka suodatettiin talteen, saatiin 2775 g A-42355-seosta harmaanvalkoisena jauheena.

Esimerkki 3

A-30912-tekijän A erottaminen

1 g esimerkin 2 mukaisesti valmistettua A-42355-antibioot-tiseosta liuotettiin 7 ml:aan metanoli-vesi-asetonitriiliseosta (7:2:1). Tämä liuos suodatettiin ja vietiin loopin läpi venttiilisteemin avulla lasipylvääseen, jonka sisähalkaisija oli 3,7 cm ja pituus 35 cm Michel-Miller High Performance Low Pressure (HPLPLC) Chromatography Columns, Ace Glass Incorporated, Vineland, NJ 08360/, ja joka oli täytetty LP-1/C₁₈-silikageelikäänteisfaasi-hartsilla (10-20 mikronia), joka oli valmistettu esimerkissä 7 kuvatulla tavalla. Pylväs oli pakattu metanoli-vesi-asetonitriiliseokseen (7:2:1) lietetäytöntekniikalla esimerkissä 8 kuvatulla tavalla. F.M.I.-pumppua, jossa oli venttiilitön mäntärakenne (maksimivirtaus 19,5 ml/min) käytettiin juoksuttamaan liuotinta pylvään läpi virtausnopeudella 9 ml/min 689 kPa paineessa ja jakeet kerätään kerran minuutissa. Antibiootin eluoitumista seurattiin UV-monitorilla (ISCO Model UA-5, Instrument Specialista Co., 4700 Superior Ave., Lincoln, Nebraska 68504) optisen yksikön (ISCO Type 6) avulla.

Jakeet 112-140 yhdistettiin ja lisättiin 20 ml:aan vettä. Tämän liuoksen pH säädettiin 1N suolahapolla arvoon 4,0. Saatu liuos uutettiin kahdesti tilavuudellaan kloroformia. Kun molemmat kloroformiuutteet yhdistettiin ja haihdutettiin vakuuissa, saatiin öljymäinen jäännös. Kun tämä öljy liuotettiin tertiääriinseen butanoliin ja tämä liuos lyofilisoitiin, saatiin 524 mg A-42355-tekijää A (A-30912-tekijä A, A-22082).

Esimerkki 4

A-30912-tekijän B erottaminen

A-42355-seos erotettiin esimerkissä 2 kuvatulla tavalla muuten paitsi, että väkevöidyt kloroformiuutteet (285 l) kromatografoitiin silikageelipylväässä (150 l Grace-silikageeliä, laatu 62) virtausnopeudella 2 l/min. Pylväs pestiin kloroformilla (200 l), eluoiitiin asetonitriilillä (500 l) ja sen jälkeen eluoi-tiin jatkuvasti asetonitriili-vesiseoksella (98:2) virtausnopeu-della 1 l/min. Jakeet, joiden tilavuus oli 200 l, analysoitiin yksitellen biologisen aktiivisuuden suhteen. Biologinen analyysi

suoritettiin paperikiekkomittauksena agarlevyillä, joihin oli istutettu *Candida albicans*-sientä. Jakeet 77 - 103 (1365 l) yhdistettiin ja väkevöitiin vakuuissa. Väkevöity liuos (4,5 l) sisälsi sakan ja kun se suodatettiin talteen, saatiin 119 g tekijällä B rikastettua A-42355-seosta. Suodos väkevöitiin kuiviin ja saatu jäännös liuotettiin tarvittavaan määrään metanolia. Kun metanolios lisättiin dietyylieetteriin (10-kertainen tilavuus), saostui B-tekijää sisältävä antibioottiseos. Kun tämä sakka suodatettiin talteen ja kuivattiin, saatiin vielä 24 g B-tekijällä rikastettua A-42355-seosta harmaana jauheena.

Näin saatu B-tekijällä rikastettu A-42355-seos (1,0 g) liuotettiin 8 ml:aan metanoli: vesi:asetonitriiliseosta (7:2:1). Liuos suodatettiin ja vietiin silikageelipylvääseen (Michel-Miller-pylväs, sisähalkaisija 3,7 cm, pituus 33 cm) loopin läpi venttiilisysteemin avulla. Pylväs oli pakattu LP-1/C₁₈-silikageelikäänteisfaasihartsilla (10-20 mikronia) metanoli:vesi:asetonitriiliseoksessa (7:2:1) esimerkissä 3 kuvatulla tavalla. Liuotin kulki pylvään läpi virtausnopeudella 10 ml/min noin 689 kPa paineessa kuten esimerkissä 3. Minuutissa otettiin talteen yksi jae. Antibiootin eluoitumista seurattiin 280 nm:ssä kuten esimerkissä 3. Jakeet 102-110 yhdistettiin ja haihdutettiin vakuuissa niin, että saatiin öljymäinen jäännös. Kun öljy liuotettiin pieneen määrään tertiääristä butanolia ja lyofilisoitiin, saatiin 22 mg A-30912-tekijää B.

Esimerkki 5

A-30912-tekijän D erottaminen

Konsentroidut kloroformiuutteet, jotka oli saatu kahdella esimerkin 1 mukaisella fermentaatiolla (3800 l ja 4007 l), yhdistettiin ja kromatografoitiin silikageelipylväässä esimerkin 4 mukaisesti. Jakeet 47-63 (850 l) yhdistettiin ja väkevöitiin vakuuissa. Kun väkevöity liuos (0,7 l) lisättiin dietyylieetteriin (10-kertainen tilavuus), D-tekijällä rikastettu A-42355-seos saostui. Kun tämä sakka suodatettiin talteen ja kuivattiin, saatiin 32 g D-tekijällä rikastettua seosta harmaana jauheena.

1,0 g näin saatua D-tekijällä rikastettua A-32355-seosta liuotettiin 5 ml:aan metanoli-vesi-asetonitriiliseosta (7:2:1). Tämä liuos suodatettiin ja vietiin loopin kautta venttiilisysteemin

avulla silikageelikolonniin (Michel-Miller Column, sisähalkaisija 3,7 cm, pituus 30 cm). Kolonni oli täytetty LP-1/C₁₈-silikageelikäänteisfaasihartsilla (10-20 mikronia). Täyttö tapahtui metanoli-vesi-asetonitriiliseoksessa (7:2:1) esimerkissä 3 kuvatulla tavalla. Liuotin virtasi kolonnin läpi nopeudella 8 ml/min 310 kPa paineessa kuten esimerkissä 3 on kuvattu. Antibiootin eluoitumista seurattiin 280 nm:ssä esimerkissä 3 kuvatulla tavalla. Kun jakeet 96-108 yhdistettiin ja väkevöitiin vakuuissa, saatiin öljymäinen jäännös. Kun tämä öljy liuotettiin pieneen määrään tert.-butanolia ja lyofilisoitiin, saatiin 89 mg A-30912-tekijää D.

Esimerkki 6

A-30912-tekijän H erottaminen

5,0 g esimerkin 2 mukaisesti valmistettua A-42355-antibioottiseosta liuotettiin 35 ml:aan metanoli-vesi-asetonitriiliseosta (7:2:1), saatu seos suodatettiin ja vietiin loopin kautta venttiilisysteemin avulla lasikolonniin (Michel-Miller Colum, sisähalkaisija 3,7 cm, pituus 42 cm). Kolonni oli täytetty LP-1/C₁₈-silikageelikäänteisfaasihartsilla (10-20 mikronia) metanoli-vesi-asetonitriiliseoksessa (7:2:1) esimerkissä 3 kuvatulla tavalla. Liuotin virtasi kolonnin läpi nopeudella 13 ml/min 827 kPa paineessa kuten esimerkissä 3 on kuvattu, ja yksi jae otettiin talteen kerran kahdessa minuutissa. Antibiootin eluoitumista seurattiin 280 nm:ssä esimerkissä 3 kuvatulla tavalla. Jakeet 112-132 yhdistettiin toisen samanlaisen puhdistuksen jakeisiin 106-117. Kun yhdistetyt jakeet haihdutettiin vakuuissa, saatiin öljymäinen jäännös. Kun öljy liuotettiin pieneen määrään tert.-butanolia ja lyofilisoitiin, saatiin 173 mg A-30912-tekijää H epäpuhtaana.

150 mg epäpuhdasta A-30912-tekijää H liuotettiin 8 ml:aan metanoli-vesi-asetonitriiliseosta (7:2:1), saatu liuos suodatettiin ja vietiin lasikolonniin (sisähalkaisija 2,0 cm, pituus 32 cm) kuten edellä on kuvattu. Liuotin virtasi kolonnin läpi nopeudella 8 ml/min 551 kPa paineessa kuten esimerkissä 3 on kuvattu, ja yksi jae kerättiin talteen kerran kolmessa minuutissa. Antibiootin

eluoitumista seurattiin 280 nm:ssä esimerkissä 3 kuvatulla tavalla. Kun jakeet 17 ja 18 yhdistettiin ja väkevöitiin vakuu-
missa, saatiin öljymäinen jäännös. Kun tämä öljy liuotettiin
pieneen määrään tert.-butanolia ja lyofilisoitiin, saatiin 29 mg
A-30912-tekijää H.

Esimerkki 7

Silikageeli/C₁₈-käänteisfaasihartsin valmistus

Vaihe 1: Hydrolysointi

1000 g LP-1-silikageeliä (Quantum Corp., nyt Whatman)
lisätään 5 litran pyörökolvissa väkevän rikkihapon (1650 ml) ja
väkevän typpihapon (1650 ml) seokseen ja ravistellaan niin, että
syntyy hyvä suspensio. Kolviin liitetään vesivaippainen jäähdytin
ja seosta kuumennetaan höyryhauteella yön yli (16 tuntia).

Seos jäähdytetään jäähauteella ja suodatetaan varovaisesti
sintterin läpi. Sitten silikageeli pestään tislatusella vedellä
neutraaliksi. Lopuksi silikageeli pestään asetonilla (4 l) ja
kuivataan vakuuissa 100°C:ssa 2 vuorokautta.

Vaihe 2: Ensimmäinen silylointi

Vaiheessa 1 saatu kuiva silikageeli siirretään pyörö-
kolviin ja suspendoidaan tolueeniin (3,5 l). Kolvia kuumenne-
taan 2 tuntia höyryhauteella niin, että hieman jäljelle jäänyttä
vettä saadaan aseotropoiduksi pois. 321 ml oktadekyylitrikloori-
silaania (Aldrich Chemical Company) lisätään ja reaktioseosta
palautusjäähdytetään yön yli (16 tuntia) samalla hitaasti sekoit-
taen 60°C:ssa. Samalla pidetään huoli siitä, että sekoittaja ei
ulotu lähelle kolvin pohjaa. Tämä siksi, etteivät silikageeli-
hiukkaset jauhaudu.

Seoksen annetaan jäähtyä, pestään tolueenilla (3 l) ja
asetonilla (3 l) ja sen jälkeen kuivataan ilmalla (16-20 tuntia).
Kuivattu silikageeli suspendoidaan 5 litran kolvissa 3,5 litraan
asetonitriililiveseosta (1:1), suspensiota sekoitetaan varovai-
sesti huoneenlämpötilassa 2 tuntia, suodatetaan, pestään aseto-
nilla (3 l) ja kuivataan ilmalla yön ajan.

Vaihe 3: Toinen silylointi

Ensimmäisen silyloinnin menettely toistetaan käyttämällä 200 ml oktadekyylitrikloorisilaania. Suspensiota palautusjäähdytetään 60°C:ssa 2 tuntia samalla varovaisesti sekoittaen. Lopputuote suodatetaan talteen, pestään tolueenilla (3 l) ja metanolilla (6 l) ja sen jälkeen kuivataan vakuumissa 50°C:ssa yön yli (16-20 tuntia).

Esimerkki 8

Michel-Miller-kolonnien täyttö lietetäyttötekniikalla

Yleistä informaatiota

A. Tällä tekniikalla voidaan täyttää analyyttisiä ja preparatiivisia kolonneja.

B. Suositeltavia täytteitä ovat silikageelit ja silikageelikäänteisfaasitäytteet (esim. Quantum LP-1, hikkaskoko 10-20 mikronia, LiChroprep PR-8 ja RP-18, hiukkaskoko 25-40 mikronia). Tällä tekniikalla on täyttö suoritettu onnistuneesti myös muilla silikageeleillä (esim. Shandons ODS Hypersil, hiukkaskoko 5 mikronia) sekä muun tyyppisillä hartseilla.

C. Tässä lietetäyttötekniikassa tarvitaan tavallisesti alle 1378 kPa painetta ja välillä 5-40 ml/min olevaa virtausnopeutta, jotka riippuvat kolonnin tilavuudesta ja koosta. Huom! Täytön aikaisen paineen tulisi olla 207 - 345 kPa korkeampi kuin varsinaisessa erotusvaiheessa, sillä näin voidaan varmistaa se, ettei adsorbentti painu enää kokoon erotuksen aikana. Kolonneja, jotka on täytetty tällä tavoin käänteisfaasilikageelillä, voidaan käyttää useita vuosia tehokkuuden siitä kärsimättä.

D. Nopeat paineenalenemat saattavat aiheuttaa täytteeseen halkeamia tai kanavia, jotka vähentävät pylvään tehokkuutta huomattavasti. Tästä syystä on tärkeätä antaa paineen pudota nolnaan hitaasti, kun pumppu pysäytetään.

E. Pylväiden keskimääräiset tilavuudet (Ace Glass Cat. No., pakkaamattomia): 5795-04 12 ml, 5795-10 110 ml, 5795-16 300 ml, 5795-24 635 ml ja 5796-34 34 ml.

F. Lasikolonnin pakkaamiseen tarvittava aika voi vaihdella muutamasta minuutista useaan tuntiin riippuen kolonnin koosta ja tutkijan kokemuksesta.

Esimerkki:

1. Kytke lasikolonne säiliökolonniin liittimellä (säiliökolonnin pitäisi olla tilavuudeltaan kaksi kertaa niin suuri kuin lasikolonnin). Aseta molemmat kolonnit pystyasentoon (säiliökolonne yläpuolelle).
2. Punnitse täyteaine (100 g/200 ml pylvästä).
3. Lisää täyteaineeseen 5-kertainen tilavuus liuotinta (70-80 % metanolia ja 20-30 % vettä).
4. Ravistele hyvin kunnes kaikki hiukkaset ovat koostuneet ja jätä seisomaan yön ajaksi, jotta kaikki hiukkaset varmasti kostuvat liuottimella. Dekantoi ylimääräinen liuotin.
5. Lietä hartsi riittävään määrään liuotinta niin, että säiliöpylväs täyttyy. Kaada seos nopeasti säiliöön. Huom! Kolonnin pitää olla esitäytetty samalla liuottimella ja säiliökolonnin pitäisi sisältää hieman liuotinta ennenkuin liete kaadetaan siihen. Suurempien lietetilavuuksien käyttö saattaa myös antaa hyviä tuloksia, mutta tällöin tarvitaan suurempi säiliö tai säiliö pitää täyttää useampaan kertaan kolonnin täytön aikana.
6. Sulje säiliö teflontulpalla kolonnin alapäästä (ks. kuva 1, tulppa no. 3 U.S.A:n patenttijulkaisussa no. 4 131 547), liitä pumppuun ja aloita välittömästi liuottimen pumppaus systeemin läpi maksimaalisella virtausnopeudella, jos käytetään Ace Cat. No. 13265-25-pumppua tai vastaavaa liuottimensyöttöjärjestelmää (20 ml/min).
7. Jatka kunnes kolonne on täynnä adsorbenttia. Paineen ei pitäisi tämän operaation aikana ylittää kolonnin maksimaalista sietokykyä (1378 kPa suurilla kolonneilla ja 2067 kPa pienillä kolonneilla). Useimmissa tapauksissa alle 1378 kPa paine riittää.
8. Jos paine nousee liikaa, pienennä virtausnopeutta, niin paine laskee.
9. Kun kolonne on täynnä adsorbenttia, kytke pumppu pois päältä, anna paineen pudota nolnaan, sijoita säiliön tilalla esipylväs, täytä esipylväs liuottimella ja pienellä määrällä adsorbenttia ja pumppaa maksimipaineella kunnes kolonne on täysin täytetty. Huom! Anna paineen aina laskea hitaasti paineen poiskytkennän jälkeen, sillä näin menettelemällä täytemateriaaliin

ei muodostu halkeamia eikä kanavia.

10. Anna paineen laskea ja kytke esipylväs varovaisesti irti. Poista pylvään päältä muutama milli (2-4 mm) täytettä, laita 1 tai 2 suodatinpaperia kolonnin yläpäähän ja paina niillä varovasti täytemateriaalia päältä päin ja laita kolonnin yläpäähän teflontulppa kunnes sulku saadaan vahvistetuksi. Kytke kolonni pumppuun, anna paineen nousta (tavallisesti alle 1378 kPa) ja tarkkaile lasiseinän läpi laskeutuuko täytemateriaali vielä kolonnin yläpäässä. Jos täyteaine laskeutuu (kuten usein saattaa olla suurissa kolonneissa), muodostuu kuollutta tilaa tai kanavia, ja vaihe 9 pitäisi toistaa.

Patenttivaatimukset.

1. Menetelmä, jolla voidaan valmistaa A-42355-antibioottiseos, joka sisältää A-30912-tekijät A, B, D ja H, sekä antibiootti A-30912-tekijä A, antibiootti A-30912-tekijä B, antibiootti A-30912-tekijä D ja antibiootti A-30912-tekijä H, t u n n e t t u siitä, että

a) viljellään *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440-kantaa elatusaineessa, joka sisältää assimiloituvia hiili- ja typpilähteitä ja epäorgaanisia suoloja, pinnanalaisviljelmässä aerobisissa olosuhteissa kunnes riittävä määrä antibioottista aktiivisuutta on muodostunut,

b) haluttaessa erotetaan A-42355-antibioottiseos elatusaineesta ja

c) haluttaessa erotetaan antibioottiset tekijät A-30912 A, B, D ja H A-42355-antibioottiseoksesta.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jolla voidaan valmistaa A-42355-antibioottiseos, joka sisältää tekijät A-30912 A, B, D ja H, t u n n e t t u siitä, että

a) viljellään *Aspergillus nidulans* var. *roseus* 11440-kantaa elatusaineessa, joka sisältää assimiloituvia hiili- ja typpilähteitä ja epäorgaanisia suoloja, pinnanalaisviljelmässä aerobisissa olosuhteissa kunnes riittävä määrä antibioottista aktiivisuutta on muodostunut ja

b) erotetaan A-42355-antibioottiseos elatusseoksesta.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jolla voidaan valmistaa A-30912-tekijä A, t u n n e t t u siitä, että

a) viljellään *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440-kantaa elatusaineessa, joka sisältää assimiloituvia hiili- ja typpilähteitä ja epäorgaanisia suoloja, pinnanalaisviljelmässä aerobisissa olosuhteissa kunnes riittävä määrä antibioottista aktiivisuutta on muodostunut,

b) erotetaan A-42355-antibioottiseos elatusseoksesta ja

c) erotetaan A-30912-tekijä A erotetusta A-42355-antibioottiseoksesta.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jolla voidaan valmistaa A-30912-tekijä B, t u n n e t t u siitä, että

a) viljellään *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440-kantaa elatusaineessa, joka sisältää assimiloituvia hiili- ja typpilähteitä ja epäorgaanisia suoloja, pinnanalaisviljelmässä aerobisissa olosuhteissa kunnes riittävä määrä antibioottiaktiivisuutta on muodostunut,

b) mahdollisesti erotetaan A-42355-antibioottiseos elatusseoksesta ja

c) erotetaan A-30912-tekijä B erotetusta A-42355-antibioottiseoksesta.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jolla voidaan valmistaa A-30912-tekijä D, t u n n e t t u siitä, että

a) viljellään *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440-kantaa elatusaineessa, joka sisältää assimiloituvia hiili- ja typpilähteitä ja epäorgaanisia suoloja, pinnanalaisviljelmässä aerobisissa olosuhteissa kunnes riittävä määrä antibioottista aktiivisuutta on muodostunut,

b) mahdollisesti erotetaan A-42355-antibioottiseos elatusseoksesta ja

c) erotetaan A-30912-tekijä D erotetusta A-42355-antibioottiseoksesta.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jolla voidaan valmistaa A-30912-tekijä H, t u n n e t t u siitä, että

a) viljellään *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440-kantaa elatusaineessa, joka sisältää assimiloituvia hiili- ja typpilähteitä ja epäorgaanisia suoloja, pinnanalaisviljelmässä aerobisissa olosuhteissa kunnes riittävä määrä antibioottista aktiivisuutta on muodostunut,

b) erotetaan A-42355-antibioottiseos elatusseoksesta ja

c) erotetaan A-30912-tekijä H erotetusta A-42355-antibioottiseoksesta.

7. Biologisesti puhdas mikro-organismiviljelmä, t u n n e t t u siitä, että mikro-organismi on *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440.

8. A-42355-antibioottiseos, joka sisältää A-30912-tekijät A, B, D ja H, t u n n e t t u siitä, että se on valmistettu patenttivaatimuksen 2 mukaisella menetelmällä.

9. A-30912-tekijä A, t u n n e t t u siitä, että se on valmistettu patenttivaatimuksen 3 mukaisella menetelmällä.

10. A-30912-tekijä B, t u n n e t t u siitä, että se on valmistettu patenttivaatimuksen 4 mukaisella menetelmällä.

11. A-30912-tekijä D, t u n n e t t u siitä, että se on valmistettu patenttivaatimuksen 5 mukaisella menetelmällä.

12. A-30912-tekijä H, t u n n e t t u siitä, että se on valmistettu patenttivaatimuksen 6 mukaisella menetelmällä.

Patentkrav.

1. Förfarande för framställning av antibiotikablandning A-42355 som omfattar A-30912 faktorerna A, B, D och H; och antibiotikum A-30912 faktor A, antibiotikum A-30912 faktor B, antibiotikum A-30912 faktor D och antibiotikum A-30912 faktor H, k ä n n e t e c k n a t därav, att man

a) odlar *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440 i ett kulturmedium som innehåller assimilerbar källor av kolhydrat, kväve och oorganiska salt under indränkta aerobiska jäsningsförhållanden tills en väsentlig mängd av antibiotisk aktivitet alstrats;

b) eventuellt separerar A-42355 antibiotikablandningen från kulturmediet; och

c) valfritt isolerar antibiotikum A-30912 faktorerna A, B, D och H från A-42355 antibiotikablandningen.

2. Förfarande enligt patentkravet 1 för framställning av A-42355 antibiotikablandning som omfattar A-30912 faktorer A, B, D och H, k ä n n e t e c k n a t därav, att man

a) odlar *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440 i ett kulturmedium som innehåller assimilerbara källor av kolhydrat, kväve och oorganiska salt under indränkta aerobiska jäsningsförhållanden tills en väsentlig mängd av antibiotisk aktivitet alstrats;

b) separera A-42355 antibiotikablandningen från kulturmediet; och

c) isolerar A-30912 faktor A från den separerade A-42355 antibiotikablandningen.

4. Förfarande enligt patentkravet 1 för framställning av A-30912 faktor B, k ä n n e t e c k n a t därav, att man

a) odlar *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440 i ett kulturmedium som innehåller assimilerbara källor av kolhydrat, kväve och oorganiska salt under indränkta aerobiska jäsningsförhållanden tills en väsentlig mängd av antibiotisk aktivitet alstrats;

b) eventuellt separerar A-42355 antibiotikablandningen från kulturmediet: och

c) isolerar A-30912 faktor B från den separerade A-42355 antibiotikablandningen.

5. Förfarande enligt patentkravet 1 för framställning av A-30912 faktor D, k ä n n e t e c k n a t därav, att man

a) odlar *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440 i ett kulturmedium som innehåller assimilerbara källor av kolhydrat, kväve och oorganiska salt under indränkta aerobiska jäsningsförhållanden tills en väsentlig mängd av antibiotisk aktivitet alstrats;

b) eventuellt separerar A-42355 antibiotikablandningen från kulturmediet; och

c) isolerar A-30912 faktor D från den separerade A-42355 antibiotikablandningen.

6. Förfarande enligt patentkravet 1 för framställning av A-30912 faktor H, k ä n n e t e c k n a t därav, att man

a) odlar *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440 i ett kulturmedium som innehåller assimilerbara källor av kolhydrat, kväve och oorganiska salt under indränkta aerobiska jäsningsförhållanden tills en väsentlig mängd av antibiotisk aktivitet alstrats;

b) separerar A-42355 antibiotikablandningen från kulturmediet; och

c) isolerar A-30912 faktor H från separerade A-42355 antibiotikablandningen.

7. Biologiskt ren kultur av mikroorganismen *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 11440.

8. A-42355 antibiotikablandning omfattande A-30912 faktorerna A, B, D och H då den framställts enligt förfarandet i patentkravet 2.

9. A-30912 faktor A då den framställts enligt förfarandet i patentkravet 3.

10. A-30912 faktor B då den framställts enligt förfarandet i patentkravet 4.

11. A-30912 faktor D då den framställts enligt förfarandet i patentkravet 5.

12. A-30912 faktor H då den framställts enligt förfarandet i patentkravet 6.

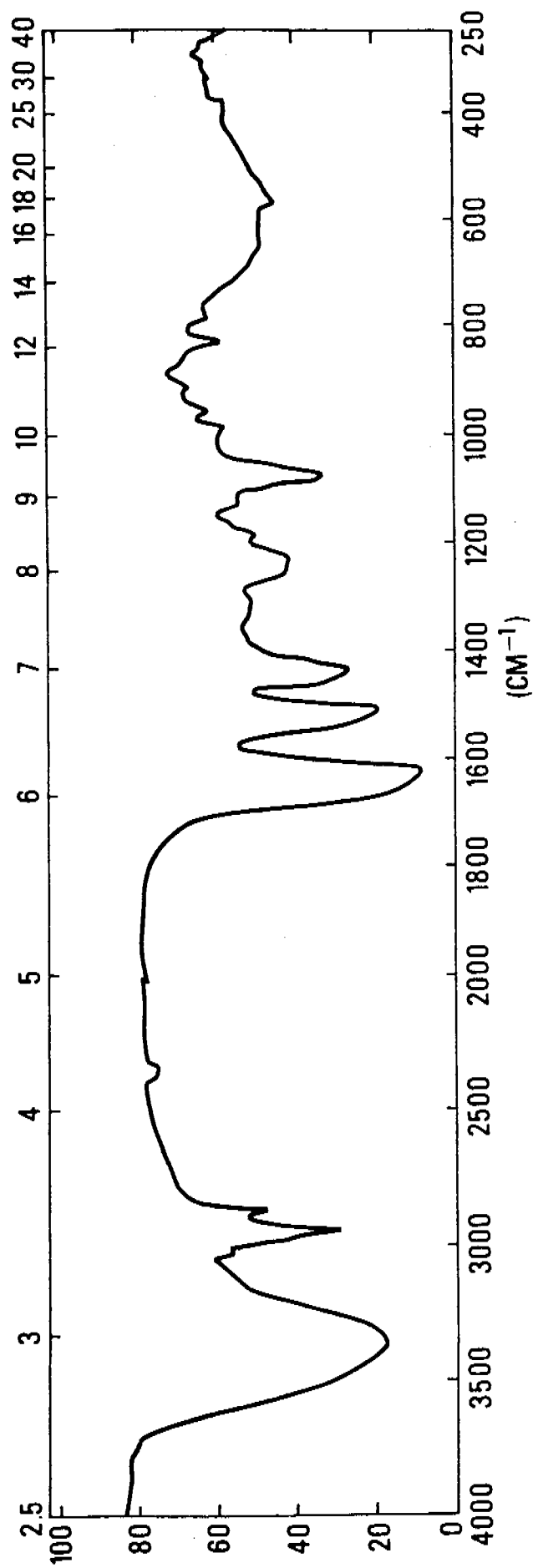


FIG. 1

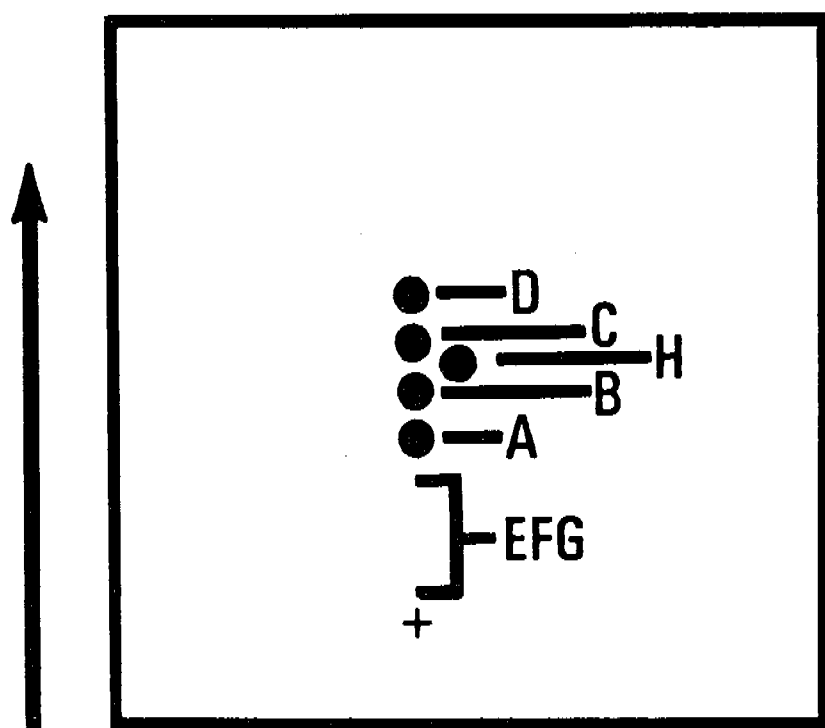


FIG. 2