



Patentdirektoratet
TAASTRUP

- (21) Patentansøgning nr.: 4575/85
 (22) Indleveringsdag: 08 okt 1985
 (41) Alm. tilgængelig: 10 apr 1986
 (44) Fremlagt: 23 nov 1992
 (86) International ansøgning nr.: -
 (83) Deponering af mikroorganismer
 (30) Prioritet: 09 okt 1984 US 658979

(51) Int.Cl.5

C 12 P 21/02
 //(C 12 P 21/02,
 C 12 R 1:465)

(71) Ansøger: *ELI LILLY AND COMPANY; Lilly Corporate Center; Indianapolis; Indiana 46285, US

(72) Opfinder: Floyd Milton *Huber; US, Richard Louis *Pieper; US, Anthony Joseph *Tietz; US, Tom Edward *Eaton; US, Lynda Maxine *Ford; US, Otis Webster *Godfrey Jr.; US, Mary Louise Braun *Huber; US, Milton Joseph *Zmijewski Jr.; US

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af derivater af det antibiotisk virksomme cycliske peptid A-21978C

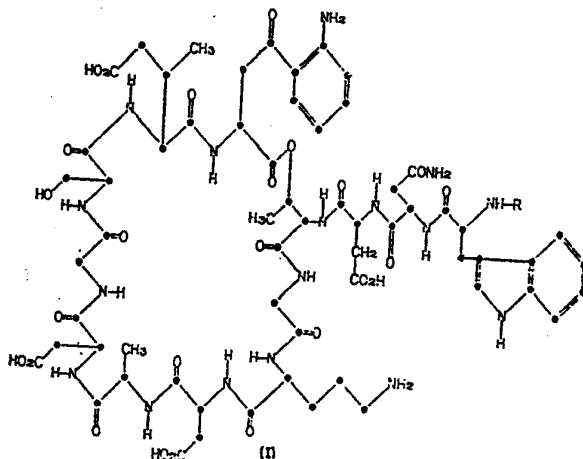
(56) Fremdragne publikationer

EP off.g.skrift nr. 95295

(57) Sammen drag:

4575-85

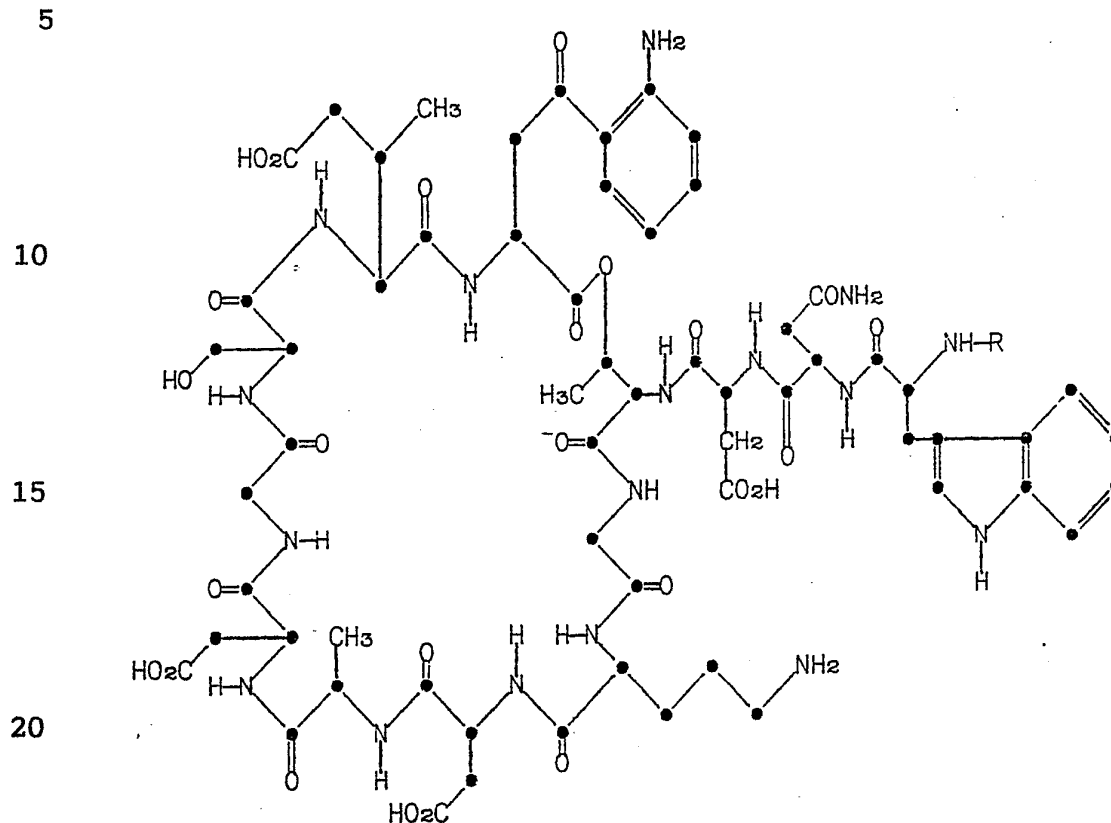
Derivater af det antibiotisk virksomme cycliske peptid
 A-21978C med formlen



hvor R er C₂-C₁₄-alkanoyl, fremstilles ved at sætte en C₂-C₁₄-alkansyre, eller en ester eller et salt deraf, til en A-21978C-producerende kultur under fermenteringen. Der anvendes fortrinsvis en kultur af organismen *Streptomyces roseosporus* NRRL 15998 eller en mutant, variant eller rekombinant deraf.

Herved opnås en forenkelt fremstilling af derivaterne, som tilmed fås i væsentlig større udbytte end ved de kendte processer.

Den foreliggende opfindelse angår en forbedret fremgangs-
måde til fremstilling af kendte og hidtil ukendte deriva-
ter af det antibiotisk virksomme cycliske peptid benævnt
A-21978C, som har den almene formel



I

25 hvori R betegner C₈-C₁₂-alkanoyl. Fremgangsmåden er egen-
dommelig ved, at man leder den tilsvarende C₈-C₁₂-alkan-
syre eller en ester eller et salt deraf til dyrknings-
mediet af en voksende A-21978C - producerende Strepto-
myces roseosporus kultur udvalgt blandt NRRL 11379, NRRL
30 15998 eller en mutant deraf med væsentligt samme egenska-
ber, under produktionstrinnet af fermenteringen. Fordele-
ne ved den omhandlede fremgangsmåde er, (1) at der er in-
volveret færre reaktionstrin end i de kendte processer,
35 mindre tid til gennemførelse af fremgangsmåden.

A-21978C-familien af antibiotika er fremragende antibakterielle midler (se også Bernard J. Abbott, David, David S. Fukuda og Manuel Debono, US patentskrift nr. 4 537 717). Tidligere krævede fremstillingen af disse derivater en proces i adskillige trin, som var tidsforbrugende og kostbar, og som gav ringe udbytter. Med den foreliggende opfindelse tilvejebringes en forbedret fremgangsmåde, hvormed man direkte kan fremstille disse A-21978C-derivater. Den kendte fremgangsmåde til fremstilling af et derivat med formel I, såsom n-decanoyl-derivatet af A-21978C, krævede de følgende reaktionstrin:

1. Fermentering af den A-21978C-producerende kultur.
 - a. Opstart med en ampul med flydende nitrogen.
 - 15 b. Primært podningstrin (48 timer).
 - c. Sekundært podningstrin (24 timer).
 - d. Tertiært podningstrin (24 timer).
 - e. Fermentering (140 timer).
- 20 2. Filtrering, adsorption på harpiks og eluering samt koncentrering.
3. Fremstilling af t-Boc (t-butoxycarbonyl-beskyttet) kompleks.
- 25 4. Koncentrering af det beskyttede kompleks.
5. Fermentering af den deacylerende kultur ved brug af f.eks. *Actinoplanes utahensis*.
 - 30 a. Opstart med en ampul med flydende nitrogen.
 - b. Primært podningstrin (72 timer).
 - c. Sekundært podningstrin (48 timer).
 - d. Fermentering (67 timer).
- 35 6. Deacylering af komplekset med den deacylerende kultur.

7. Filtrering, adsorption på harpiks og eluering samt koncentration.

8. Reacylering.

5

9. Hydrolyse af den beskyttende gruppe.

10. Endelig rensning.

10 Ved den omhandlede nye fremgangsmåde sætter man en C₈-
C₁₂-alkansyre (en ROH-forbindelse, hvori R har den oven-
for angivne betydning), eller en ester eller et salt der-
af, til den A-21978C-producerende kultur under produ-
ktionstrinnet af fermenteringen (trin 1e) til dannelse af
15 den tilsvarende forbindelse med formel I. Med den omhand-
lede fremgangsmåde kan man eliminere trinnene 3, 4, 5, 6,
7, 8 og 9 i den kendte proces. Desuden bevirker den nye
fremgangsmåde en væsentlig forøgelse af de opnåede udbyt-
ter i forhold til de udbytter, som kan opnås ved den
20 kendte fremgangsmåde.

Streptomyces roseosporus stammerne NRRL 11379 (A-21978.6)
og NRRL 15998 (A-21978.65), en mutantstamme af NRRL
11379, er nyttige A-21978C-producerende kulturer. Disse
25 kulturer indgår i samlingen af stamkulturer hos the
Northern Regional Research Center, US Department of
Agriculture, Agricultural Research Service, Peoria Illi-
nois 61604, hvorfra de er tilgængelige for offentligheden
under deponeringsnumrene NRRL 11379 og NRRL 15998. S.
30 roseosporus NRRL 11379 kulturen og betingelserne for den-
nes anvendelse ved produktion af A-21978C-antibiotika er
beskrevet af Robert L. Hamill og Marvin M. Hoehn i US pa-
tentskrift nr. 4 331 594.

35 S. roseosporus NRRL 15998 kulturen og betingelserne for
dennes anvendelse ved produktion af A-21978C-antibiotikum
er beskrevet i den af foreliggende patentansøgning af-

delte danske patentansøgning nr. 1487/91. Yderligere skal det nævnes at NRRL 15998 kulturen er deponeret den 5. september 1985 i henhold til Budapesttraktaten.

5 De naturligt forekommende A-21978C-faktorer beskrevet i US patentskrift nr. 4 331 594 er faktorerne C_0 , C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , og C_5 . I faktorerne C_1 , C_2 , C_3 , C_4 og C_5 betegner R i formel I en specifik C_{10} - C_{12} -alkanoylgruppe. A-21978C faktor C_0 , som tidligere formodedes at indeholde en
10 enkelt forgrenet C_{10} -alkanoyl-sidekæde, har vist sig at bestå af en blanding af to komponenter i et omtrentligt forhold på 2:1. Hovedkomponenten indeholder en forgrenet C_{10} -sidekæde, mens den mindre betydende komponent indeholder en ligekædet C_{10} -sidekæde.

15 Når en forbindelse med formel I fremstilles ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, betegnes den af bekvemlighedsgrunde også som en A-21978C-faktor. Med undtagelse af de naturligt forekommende faktorer benytter man længden af sidekæden til at betegne faktoren. Eksempelvis vil
20 en forbindelse med formel I, hvori R betegner octanoyl, blive benævnt en A-21978C₈-faktor, når den er fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

25 Alkyl-delen af C_8 - C_{12} -alkansyren, eller af esteren eller saltet deraf (substratet), som benyttes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, kan være en ligekædet eller forgrenet gruppe. Til fremstilling af de naturligt forekommende A-21978C-faktorer C_1 , C_2 , C_3 vil man f. eks. anvende en 8-methyldecan-, 10-methyldodecan- eller 10-methylundecansyre eller en ester eller et salt deraf. Det
30 foretrækkes at anvende de ligekædede C_8 - C_{12} -syre, estere og salte deraf ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, fordi de er let tilgængelige og billige. Et særligt foretrukket substrat er n-decansyre samt estere og salte
35 deraf.

Når man anvender en ester af en C_8 - C_{12} -alkansyre, foretrækker man C_1 - C_4 -alkylestere. I en sådan ester kan C_1 - C_4 -alkylgruppen også være ligekædet eller forgrenet.

- 5 Repræsentative egnede salte af C_8 - C_{12} -alkansyrer, som kan anvendes ved fremgangsmåden, omfatter salte dannet med alkalimetaller og jordalkalimetaller, såsom natrium, kalium, lithium, cæsium, rubidium, barium, calcium eller magnesium. Egnede aminsalte omfatter ammoniumsalte, primære, sekundære og tertiære C_1 - C_4 -alkylammoniumsalte og
- 10 hydroxy- C_2 - C_4 -alkylammoniumsalte.

Fortrinsvis sættes substratet til fermenteringsmediet i form af en steril opløsning. Et særligt nyttigt opløsningsmiddel til dette er methyloleat, selv om man også

15 kan anvende andre opløsningsmidler, såsom ethanol, ethylacetat og C_1 - C_4 -estere af umættede fedtsyrer. Hvis substratet er tilstrækkeligt flydende ved fermenteringstemperaturen, kan det tilsættes direkte.

20 Den hastighed, hvormed man tilsætter substratet, skal være tilstrækkeligt lav til, at man undgår at frembringe en toksisk indvirkning på fermenteringen, men også tilstrækkeligt højt til at forøge udbyttet af den ønskede forbindelse med formel I. Tilsætningshastigheder på mellem ca. 0,05 og ca. 0,5 ml pr. liter fermenteringsvæske pr. time er at foretrække. En hastighed på mellem ca. 0,1 og ca. 0,2 ml pr. liter fermenteringsvæske er særligt foretruk-

25 ken.

30 Substratet sættes til den voksende A-21978C-producerende kultur under produktionstrinnet af fermenteringen, idet tilsætningen påbegyndes efter mellem ca. 15 og ca. 32 timer og fortsættes indtil fermenteringen er tilendebragt.

35 Substratet kan tilsættes ved forskellige metoder, men det tilsættes fortrinsvis ved en metode, som giver den bedste tilnærmelse til en stabil strømning.

Efter fermenteringen kan man, om ønsket, udvinde den frembragte forbindelse med formel I ved anvendelse af i sig selv kendte procedurer (se f. eks. US patentskrift nr. 4 331 594).

5

Dyrkningsmediet, som benyttes til dyrkning af kulturen *Streptomyces roseosporus* NRRL 15998, kan være valgt blandt en række forskellige medier. Af hensyn til en økonomisk produktion, et optimalt udbytte og en bekvem isolation af produktet foretrækker man imidlertid bestemte dyrkningsmedier. En foretrukken carbon-kilde til fermentering i stor målestok er således tapioca-dextrin, selv om man også kan anvende glucose, fructose, galactose, maltose, mannose, bomuldsfrøolie, methyloleat, glycerol, raffineret sojabønneolie og lignende. En foretrukken nitrogen-kilde er enzym-hydrolyseret casein, selv om man også kan anvende opløseligt kød-pepton, sojabønnemel, sojabønnehydrolysat, grovmalede sojabønner, gær, aminosyrer, såsom L-asparagin og DL-leucin, og lignende. Nærende uorganiske salte, som kan inkorporeres i dyrkningsmediet, er opløselige salte, som kan tilvejebringe kaliumioner, ammoniumioner, chloridioner, sulfationer, nitrationer og lignende. Blandt disse salte er K_2SO_4 særligt nyttigt til antibiotisk produktion. Melasse-aske, aske-dialysater og syntetiske mineralblandinger er ligeledes nyttige.

Til produktion af A-21978C-antibiotika foretrækker man at anvende destilleret eller demineraliseret vand i fermenteringsmediet. Visse af de mineraler, som findes i almindeligt ledningsvand, såsom calcium og carbonat, synes at påvirke den antibiotiske produktion i uheldig retning.

Væsentlige sporstoffer, som er nødvendige for organismens vækst og udvikling, bør også forefindes i dyrkningsmediet. Sådanne sporstoffer optræder sædvanligvis som urenheder i de øvrige bestanddele af mediet i mængder,

35

som er tilstrækkelige til at imødekomme organismens vækstkrav.

5 Det kan være nødvendigt at tilsætte små mængder (eksem-
pelvis 0,2 ml/liter) af et anti-skummiddel, såsom poly-
propylenglycol, ved fermentering i stor målestok, hvis
skumning bliver et problem.

10 For at opnå tilpas store mængder A-21978C-antibiotika
foretrækker man submers aerob fermentering i tanke. Imid-
lertid kan man også opnå små mængder A-21978C-antibiotika
ved rysteflaskedyrkning. På grund af den tidsforsinkelse,
i den antibiotiske produktion, som sædvanligvis er for-
bundet med podning af store tanke med en sporeform af or-
15 ganismen, foretrækkes det at anvende et vegetativt pode-
stof. Dette vegetative podestof fremstilles ved at pode
et lille volumen af dyrkningsmediet med sporeformen eller
med myceliske fragmenter af organismen med henblik på at
opnå en frisk, aktivt voksende kultur af organismen. Det
20 vegetative podestof overføres derefter til en større
tank.

Den A-21978C-producerende organisme kan dyrkes ved tempe-
raturer på mellem ca. 20 og ca. 40 °C. Den optimale A-
25 21978C-produktion synes at optræde ved temperaturer på
omkring 30 - 32 °C.

Som det er sædvane ved aerobe submerse dyrkningsproces-
ser, dispergerer man steril luft i dyrkningsmediet. For
30 at opnå en effektiv produktion af A-21978C-antibiotikum-
met bør den procentvise luftmætning ved tankproduktion
være over 20%, fortrinsvis over 30% (ved 30 °C og et tryk
på 1 atmosfære).

35 Ved tankfermentering foretrækkes det at holde fermente-
ringsmediets pH-niveau i et område fra omkring 6,5 til
omkring 7,0. Dette kan gøres ved at tilsætte passende

mængder af eksempelvis natriumhydroxid (i de tidlige trin) og saltsyre (i de senere trin).

5 Produktionen af A-21978C-antibiotikummet kan følges under fermenteringen ved at teste prøver af væsken eller af ekstrakter af myceliets faste bestanddele for antibiotisk aktivitet over for organismer, som vides at være sensitive over for disse antibiotika. En sådan prøveorganisme, som er nyttig til at teste disse antibiotika, er 10 *Micrococcus luteus*. Prøven gennemføres fortrinsvis som en papirskive-prøve på agarplader.

Alternativt kan de faste bestanddele fra dyrkningen, herunder bestanddele af mediet og myceliet, benyttes uden 15 ekstraktion eller separation, men fortrinsvis efter fjernelse af vand, som en kilde for de omhandlede A-21978C-antibiotika. Efter produktion af den antibiotiske A-21978C-aktivitet kan man f. eks. tørre dyrkningsmediet ved lyofilisering og blande det direkte med en foderbland- 20 ding.

De ved den omhandlede fremgangsmåde fremstillede forbindelser med formel I er fremragende antibakterielle mid- 25 ler.

Opfindelsen illustreres nærmere ved de følgende eksem- 30 pler.

30

35

EKSEMPEL 1Fremstilling af A-21978C-komplekset

5

Man fremstillede en stamkultur, som holdes i dampfasen af flydende nitrogen. *Streptomyces roseosporus* NRRL 15998, som indtil anvendelsen var blevet opbevaret i dampfasen af flydende nitrogen, benyttedes til at pøde 50 ml af et vegetativt medium med følgende sammensætning:

10

<u>Ingrediens</u>	<u>Mængde (%)</u>
Trypticase-sojavæske	3,0
15 Dextrin	2,5
Vand (demineraliseret)	94,5

|Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD.

20

Det podede medium blev inkuberet i en 250 ml Erlenmeyer-kolbe ved 30 °C i 48 timer på et rysteapparat, der roterede i en bue med diameter 5 cm og med en omdrejningshastighed på 250 omdr./min. Den modne vegetative kultur blev fordelt i et antal beholdere (0,5 ml/beholder) og opbevaret i dampfasen af flydende nitrogen.

25

30

Med henblik på at opnå en større ensartet forsyning af opbevaret materiale benyttede man 1 ml af kulturen, som opbevarede i flydende nitrogen, til at pøde 80 ml af det ovenfor beskrevne vegetative medium. Det podede vegetative medium blev inkuberet i en 250 ml Erlenmeyer-kolbe ved 30 °C i 48 timer på et rysteapparat, der roterede i en bue med en diameter på 5 cm og en omdrejningshastighed på 250 omdr./min.

35

10 ml af en sådan kultur blev benyttet til at pøde 450 ml af et vegetativt vækstmedium i andet trin, hvilket medi-

um havde samme sammensætning som det primære vegetative medium beskrevet ovenfor. Dette medium i andet trin blev inkuberet i 2 liter Erlenmeyer-kolbe i 24 timer ved 30 °C på et rysteapparat, der roterede i en cirkelbue med en diameter på 5 cm og med en omdrejningshastighed på 250 omdr./min.

1 liter af den vegetative kultur i andet trin blev benyttet til at pøde 39 liter af et sterilt tertiært udviklingsmedium med følgende sammensætning:

	<u>Ingrediens</u>	<u>Mængde (%)</u>
	Sojabønneemel	0,5
15	Gærekstrakt	0,5
	Calciumgluconat	1,0
	KCl ^b	0,02
	MgSO ₄ ·7H ₂ O ^b	0,02
	FeSO ₄ ·7H ₂ O ^b	0,0004
20	Sag 471 (antiskummiddel) ^c	0,03
	Vand	97,9296

^aDifco Laboratories, Detroit MI

^b Sporminerallerne fremstilledes som følger: FeSO₄·7H₂O (7,6 g) blev opløst i koncentreret HCl (76 ml). MgSO₄·7H₂O (380 g), KCl (380 g) og demineraliseret vand tilsattes til opnåelse af et totalt volumen på 3800 ml. Til opnåelse af de specificerede mineraler benyttedes 80 ml af opløsningen pr. 39 liter tertiært podningsmedium.

^c Union Carbide, Danbury CT.

Det podede medium blev inkuberet i 24 timer i en rustfri stålbeholder ved 30 °C. Beholderen blev beluftet med steril luft i en mængde på 0,85 v/v/min. og omrørt med konventionelle omrøringsorganer, der roterede med 350 - 450

omdr./min. Trykket i beholderen blev holdt på 0,35 kg/cm².

1 liter af det inkuberede tertiære podningstrin blev be-
 5 nyttet til at pøde 119 liter af et sterilt produktions-
 medium med følgende sammensætning:

	<u>Ingrediens</u>	<u>Mængde (%)</u>
10	Sojabønneemel	2,2
	Fe(NH ₄) ₂ SO ₄ ·6H ₂ O	0,066
	Dextrose	0,825
	Sag 471	0,022
	Kartoffeldextrin	3,3
15	Melasse (mørk sirup)	0,275
	Ledningsvand	93,312

Efter tilsætning af de første 2 ingredienser blev pH ind-
 stillet til 7,0, og denne indstilling blev gentaget, ef-
 20 ter at alle ingredienser var blevet tilsat umiddelbart
 før sterilisation.

Det podede produktionsmedium blev inkuberet i 6 dage i en
 rustfri stålbeholder ved 30 °C og beluftet med steril
 25 luft i en mængde på 0,5 v/v/min. Mediet blev omrørt ved
 hjælp af konventionelle omrøringsorganer, der roterede
 med en omdrejningshastighed på 250 omdr./min. i de første
 15 timer og derefter med 350 omdr./min. Blandingens pH-
 værdi blev holdt på eller over 6,5 ved tilsætning af en
 30 ammoniumhydroxidopløsning. Udbyttet af A-21978C-komplek-
 set var 0,282 g pr. liter fermenteringsvæske ved afslut-
 ningen af fermenteringen. Fordelingen af faktorer fremgår
 af den efterfølgende tabel 1.

EKSEMPEL 2Forøget produktion af A-21978C₈

5

Det primære, sekundære og tertiære væksttrin blev gennemført som beskrevet i eksempel 1. Produktionstrinnet blev iværksat som beskrevet i eksempel 1 med den undtagelse, at man efter 28 timers forløb begyndte at lede en steril opløsning, der bestod af 50% (v/v) caprylsyre (octansyre) og methyloleat, til fermenteringsvæsken med en hastighed på 0,13 ml pr. liter fermenteringsvæske pr. time, idet man opretholdt denne tilsætningshastighed indtil afslutningen af fermenteringen efter 144 timers forløb. Udbyttet af A-21978C-komplekset var 1,255 g pr. liter væske svarende til en udbyttestigning på 445% i forhold til udbyttet fra eksempel 1. Faktor A-21978C₈ (forbindelsen med formel I, hvori R er octanoyl) repræsenterede 9% af det totale A-21978C-kompleks fremstillet ved denne metode. Der kunne ikke påvises nogen faktor A-21978C₈ i det A-21978C-kompleks, der fremstilledes ved metoden fra eksempel 1.

10

15

20

EKSEMPEL 3

25

Forøget produktion af A-21978C₉

De primære, sekundære og tertiære podnings- og udviklingstrin blev gennemført som beskrevet i eksempel 1. Produktionstrinnet blev påbegyndt som beskrevet i eksempel 1 med den undtagelse, at man efter 28 timers forløb begyndte at lede en steril opløsning, der bestod af 25% (v/v) nonansyre og 75% methyloleat, til fermenteringsvæsken i en mængde på 0,13 ml pr. liter fermenteringsvæske pr. time, idet man opretholdt denne tilledningshastighed indtil afslutningen af fermenteringen ef-

30

35

ter 144 timers forløb. Udbyttet af A-21978C-komplekset var 0,821 g pr. liter væske, hvilket svarede til en forøgelse på 293% i forhold til det udbytte, der opnåedes i eksempel 1. Faktor A-21978C₉ (formel I, hvor R er nonanoyl) repræsenterede 10% af det totale A-21978C-kompleks fremstillet ved denne metode. Der kunne ikke påvises nogen faktor A-21978C₉ i det A-21978C-kompleks, der blev fremstillet ved metoden ifølge eksempel 1.

10 EKSEMPEL 4

Forøget produktion af A-21978C₁₀-faktoren (formel I, hvor R er n-decanoyl)

15 De primære og sekundære vegetative væksttrin blev dyrket som beskrevet i eksempel 1. I det tertiære trin benyttes 800 ml af den sekundære podekultur til at pode 950 liter af et sterilt tertiært udviklingsmedium med følgende sammensætning:

	<u>Ingrediens</u>	<u>Mængde (%)</u>
	Dextrose	2,0
25	Calciumcarbonat	0,2
	Sojabønneemel	2,0
	Gærekstrakt	0,1
	KCl ^a	0,02
	MgSO ₄ ·7H ₂ O ^a	0,02
30	FeSO ₄ ·7H ₂ O ^a	0,0004
	Sag 471 (antiskummiddel)	0,02
	Vand	95,6396

^a Opløsningen af spormineraler fremstilledes som beskrevet i eksempel 1.

Det podede medium blev inkuberet i 24 timer i en rustfri stålbehodler ved 30 °C. Beholderen blev beluftet med steril luft i en mængde på 0,8 v/v/min. og omrørt med konventionelle omrøringsorganer. 1 liter af dette tertiære podningsmedium blev benyttet til at pøde 119 liter af et produktionsmedium med den i eksempel 1 beskrevne sammensætning. Produktionstrinnet blev også påbegyndt som beskrevet i eksempel 1 med den undtagelse, at man efter 28 timers forløb begyndte at lede en steril opløsning, der bestod af 50% (v/v) caprinsyre (decansyre) og 50% methyloleat, til fermenteringsvæsken i en mængde på 0,26 ml pr. liter fermenteringsvæske pr. time, idet man opretholdt denne tilledningshastighed, indtil fermenteringen blev afsluttet efter 283 timers forløb. Udbyttet af A-21978C-komplekset var 1,94 g pr. liter fermenteringsvæske, hvilket svarede til en forøgelse på 687% i forhold til udbyttet opnået i eksempel 1. Koncentrationen af faktor A-21978C₁₀ (formel I, hvor R er n-decanoyl) var 1,63 g pr. liter eller 84% af det totale A-21978C-kompleks. Denne mængde var 13583% større end den mængde A-21978C₁₀, som opnåedes ved anvendelse af proceduren fra eksempel 1.

EKSEMPEL 5

25 Alternativ metode til forøget produktion af A-21978C₁₀

De primære, sekundære og tertiære podnings- og udviklingstrin blev gennemført som beskrevet i eksempel 1. Produktionstrinnet blev iværksat som beskrevet i eksempel 1 med den undtagelse, at man efter 28 timers forløb begyndte at lede en steril opløsning, der bestod af 25% (v/v) caprinsyreethylester (ethylcaprat) og 75% methyloleat, til fermenteringsvæsken med en hastighed på 0,13 ml pr. liter fermenteringsvæske pr. time. Man opretholdt denne tilledningshastighed, indtil fermenteringen blev afsluttet efter 144 timers forløb. Udbyttet af A-21978C-

komplekset var 1,022 g pr. liter væske, hvilket var en forøgelse på 362% i forhold til udbyttet fra eksempel 1. Koncentrationen af faktor A-21978C₁₀ var 0,202 g pr. liter eller 20% af det totale A-21978C-kompleks. Denne
5 koncentration var 1683% større end koncentrationen af A-21978C₁₀ opnået ved metoden fra eksempel 1.

EKSEMPEL 6

10 Alternativ metode til forøgelse af produktionen af A-21978C₁₀

15 De primære og sekundære vegetative væksttrin blev dyrket som beskrevet i eksempel 1. Det tertiære podestof blev dyrket som beskrevet i eksempel 4 med den undtagelse, at mediets volumen var 1900 liter, og at varigheden af dette trin blev forøget til 48 timer. Beluftningshastigheden var 0,3 v/v/min. i timerne 0 - 24, 0,45 v/v/min. i timerne
20 ne 24 - 40 og 0,90 v/v/min. i timerne 40 - 48. Produktionstrinnet blev iværksat som beskrevet i eksempel 1. Efter 23 timers forløb blev en steril opløsning af 0,004% gærekstrakt portionsvis sat til fermenteringsmediet. Efter 36 timers forløb begyndte man at tilsætte en
25 opløsning af glycerol og ammoniumdecanoat, som tilførtes med en hastighed på 0,84 ml pr. liter fermenteringsvæske pr. time. Denne fødeopløsning indeholdt glycerol (3600 g), demineraliseret vand (9000 ml), caprinsyre (1 liter) og en koncentreret ammoniumhydroxidopløsning (620 ml).
30 Tilledningen fortsattes med denne hastighed, indtil fermenteringen afsluttedes efter 143 timers forløb. Udbyttet af A-21978C-komplekset var 1,772 g pr. liter, hvilket svarede til en forøgelse på 628% i forhold til udbyttet fra eksempel 1. Koncentrationen af faktor A-21978C₁₀ blev
35 bestemt til at være 0,739 g pr. liter eller 42% af det totale A-21978C-kompleks. Denne koncentration var 6158% større end koncentrationen af A-21978C₁₀ fremstillet ved

metoden beskrevet i eksempel 1.

EKSEMPEL 7

5 Forøget produktion af A-21978C₁₁

10 De primære, sekundære og tertiære podningstrin blev gennemført som beskrevet i eksempel 1. Produktionstrinnet blev iværksat som beskrevet i eksempel 1 med den undtagelse, at man efter 28 timers forløb begyndte at lede en steril opløsning, der bestod af 25% (v/v) undecansyre og 75% methyoleat, til fermenteringsmediet med en hastighed på 0,13 ml pr. liter fermenteringsvæske pr. time, idet 15 man fortsatte denne tilledning, indtil fermenteringen blev afsluttet efter 144 timers forløb. Udbyttet af A-21978C-komplekset var 1,62 g pr. liter væske, hvilket svarede til en forøgelse på 574% i forhold til udbyttet opnået i eksempel 1. Faktor A-21978C₁₁ (formel I, hvor R er undecanoyl) blev bestemt til at være 0,70 g pr. liter 20 eller 43% af det totale A-21978C-kompleks. Faktor A-21978C₁₁ kunne ikke påvises i det A-21978C-kompleks, som fremstilledes ved metoden ifølge eksempel 1.

25 EKSEMPEL 8

Forøget produktion af A-21978C₅

30 De primære, sekundære og tertiære podningstrin blev gennemført som beskrevet i eksempel 1. Produktionstrinnet blev iværksat som beskrevet i eksempel 1 med den undtagelse, at man efter 28 timers forløb begyndte at lede en steril opløsning, der bestod af 25% (v/v) laurinsyre og 35 75% methyoleat, til fermenteringsmediet med en hastighed på 0,13 ml pr. liter fermenteringsvæske pr. time. Man fortsatte tilledningen indtil fermenteringens afslutning

efter 144 timers forløb. Udbyttet af A-21978C-komplekset var 1,12 g pr. liter væske, svarende til en forøgelse på 400% i forhold til udbyttet opnået i eksempel 1. Koncentrationen af faktor A-21978C₅ (formel I, hvor R er dodecanoyl) blev bestemt til at være 0,372 g pr. liter eller 33% af det totale A-21978C-kompleks. Denne koncentration var 5314% større end koncentrationen af A-21978C₅, som blev fundet i A-21978C₉C-komplekset fremstillet ved metoden fra eksempel 1.

10

15

20

25

30

35

Tabel 1

Indvirkning af forskellige lipid-substrater på produktionen af A-21978C-kompleks
Eks. nr. Lipid-substrat A-21978C-komponent ($\mu\text{g/ml}$)^{a, b}

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₅	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁
1	77	113	72	7	--	--	12 ^c	--
2	276	312	214	175	113	--	170	--
3	147	177	125	192	--	83	90	--
4	135	50	48	77	--	--	1630 ^d	--
5	168	246	156	251	--	--	202 ^d	--
6	335	371	228	98	--	--	739 ^d	--
7	163	206	158	273	--	--	118	700
8	204	236	141	372	--	--	173	--

18

^aKoncentrationen af de antibiotiske komponenter i den filtrerede væske blev bestemt ved højtryksvæskechromatografi; de forskellige komponenter blev påvist ved ultraviolet absorption.

^bC₀, C₁, C₂, C₃ og C₅ = naturligt forekommende A-21978C-faktorer; C₈, C₉, C₁₀ og C₁₁ = forbindelser med formel I, hvori R er henholdsvis C₈-, C₉-, C₁₀- og C₁₁-alkanoyl.

^cNaturlig faktor C₀

^dfundet at være i det væsentlige R = n-decanoyl

EKSEMPEL 9Alternativ fremstilling af A-21978C-komplekset

5

Man fremstiller A-21978C-komplekset ved anvendelse af proceduren fra eksempel 1, idet man dog benytter kulturen *Streptomyces roseosporus* NRRL 11379.

10

EKSEMPEL 10Alternativ metode til forøget A-21978C₁₀-produktion

15

Man fremstiller A-21978C₁₀ ved anvendelse af fremgangsmåden ifølge eksempel 6, idet man benytter kulturen *Streptomyces roseosporus* NRRL 11379.

EKSEMPEL 11

20

Rysteflaske-produktion af A-21978C-komplekset

25

Man benytter den generelle procedure beskrevet i eksempel 1, idet man dog anvender rysteflaske-betingelser med følgende fermenteringsmedium:

	<u>Ingrediens</u>	<u>Mængde (g/l)</u>
30	Glucose	7,5
	Dextrin ^a	30
	Enzym-hydrolyseret casein ^b	5
	Pepton	5
	Melasse	2,5
35	Demineraliseret vand	op til 1 liter

^aStadex 11, A.E. Staley Co., Decatur IL

^bNZ Amine A, Humko Sheffield Chemical, Lyndhurst NJ

5 ^cBiosate, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville
MD.

Udbyttet af A-21978C-kompleks ved denne fermentering er
1800 µg pr. ml fermenteringsvæske.

10

15

20

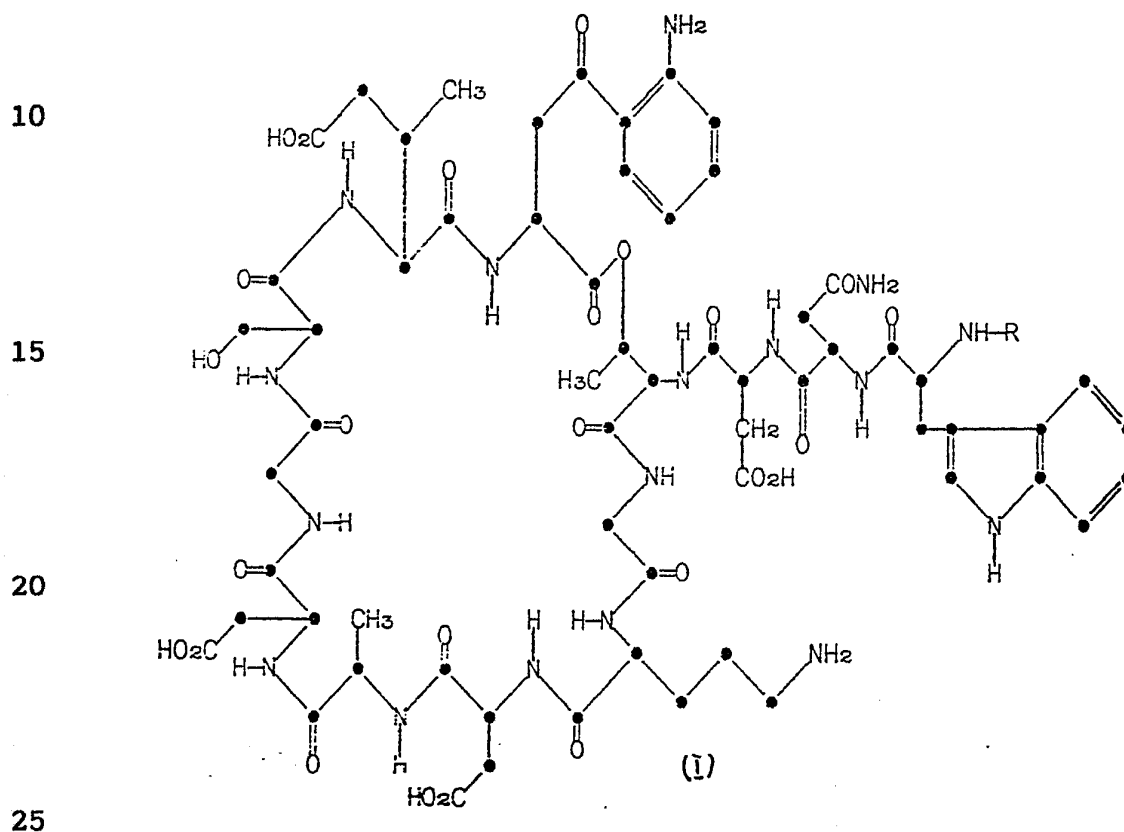
25

30

35

P a t e n t k r a v:

1. Fremgangsmåde til fremstilling af derivater af et antibiotisk virksomt cyclisk peptid benævnt A-21978C, hvilke derivater har den almene formel



hvor i R betegner en C_8-C_{12} -alkanoylgruppe, k e n d e -
t e g n e t ved, at man leder den tilsvarende C_8-C_{12} -
alkansyre eller en ester eller et salt deraf til dyrk-
ningsmediet af en voksende A-21978C-producerende Strep-
tomyces roseosporus kultur udvalgt blandt NRRL 11379,
NRRL 15998 eller en mutant deraf med væsentligt samme
egenskaber, under produktionstrinnet af fermenteringen.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
ved, at man anvender en C_8-C_{12} -alkansyre.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at man anvender en C_1-C_4 -alkylester af en C_8-C_{12} -alkansyre.

5 4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at man anvender et salt af en C_8-C_{12} -alkansyre.

10 5. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1 - 4, k e n - d e t e g n e t ved, at man anvender caprinsyre eller en ester eller et salt deraf.

15 6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den anvendte C_8-C_{12} -alkansyre er caprylsyre, nonansyre, undecansyre, laurinsyre eller en ester eller et salt af en af disse syrer.

20

25

30

35