



**SUOMI—FINLAND**  
**(FI)**

**Patentti- ja rekisterihallitus**  
**Patent- och registerstyrelsen**

[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU** 71950  
**UTLÄGGNINGSSKRIFT**

C Patentti myönnetty  
(45) Patent maldolat 00 03 1987

(51) Kv.ik./Int.Cl.<sup>4</sup> C 12 P 17/18, C 07 D 493/10

(21) Patentihakemus — Patentansökning 822544

(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag 19.07.82

(23) Alkupäivä — Giltighetsdag 19.07.82

(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig 21.01.83

(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. —  
Ansökan utlagd och utskriften publicerad 28.11.86

(86) Kv. hakemus — Int. ansökan

(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet 20.07.81

USA(US) 285264 Toteennäytetty-Styrkt

(71) Pfizer Inc., 235 East 42nd Street, New York, New York, USA(US)

(72) Walter Daniel Celmer, New London, Connecticut,  
Walter Patrick Cullen, New London, Connecticut, USA(US),  
Riichiro Shibakawa, Aichi-ken, Junsuke Tone, Aichi-ken,  
Japani-Japan(JP)

(74) Oy Kolster Ab

(54) Menetelmä uuden polysyklisen eetteriantibiootin valmistamiseksi viljelemällä kantaa *Streptomyces halstedii* ATCC 31812 - Förfarande för framställning av ett nytt polycykliskt eterantibiotikum genom odling av stammen *Streptomyces halstedii* ATCC 31812

(57) Tiivistelmä

CP-53 607, uusi hapan polysyklinen eetteriantibiootti ja sen kationisia suoloja, jotka on tuotettu saatamalla *Streptomyces halstedii* ATCC 31812, joka on eristetty maaperänäytteestä Japanissa, lisääntymään upoksissa aerobisesti, menetelmä tämän antibiootin tuottamiseksi sekä menetelmiä sen käyttämiseksi parantamaan rehun hyödyntämistä ja edistämään nautakarjan ja sikojen kasvua.

(57) Sammandrag

CP-53 607, ett nytt surt polycykliskt eterantibiotikum och katjonsalter därav, producerat genom submers aerobisk fortplantning av *Streptomyces halstedii* ATCC 31812, som isolerats från ett jordprov i Japan, ett förfarande för att producera detta antibiotikum och metoder för dess användning för att förbättra foderutnyttjandet och befrämja tillväxten av nötkreatur och svin.

Menetelmä uuden polysyklisen eetteriantibiootin valmistamiseksi viljelemällä kantaa *Streptomyces halstedii* ATCC 31812.

Keksinnön kohteena on uuden happamen polysyklisen eetteriantibiootin valmistus, jolle antibioottiryhmälle on biologisesti ominaista vaikutus kationien kuljetukseen mitokondrioidissa. Tähän antibioottisukuun kuuluvat monensiini [*J. Amer. Chem. Soc.*, 89-5737 (1967)]; nigerisiini [*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 33: 29, 1968)]; grisoriksiini [*J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1421 (1970)]; dianemysiini [*J. Antibiotics*, 22: 161 (1969)]; salinomyysiini [*J. Antibiotics*, 27: 814 (1974)]; X-537A [*J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 967 (1972)]; X-206 [*J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 927, (1971)]; A204A [*J. Amer. Chem. Soc.*, 95: 3399 (1973)]; mutalomysiini [*J. Antibiotics*, 30: 903, (1977)]; ionomyysiini [*J. Amer. Chem. Soc.*, 101: 3344 (1979)]; K-41B [*J. Antibiotics*, 32: 169 (1979)]; A-130B ja A-130C [*J. Antibiotics*, 33:94 (1980)]; leuseramysiini [*J. Antibiotics*, 33: 137, (1980)]; ja A-28695B [*J. Antibiotics*, 33: 252, (1980)]. Aihetta on myös yleisesti käsitellyt Westley, "Polyether Antibiotics", *Adv. Appl. Microbiol.*, 22: 177 (1977).

Julkaisussa *Chem. Abstr.* vol. 87 (1977) 165946 x: *Biotechnol.* 1977, 27 (6) 318-325, *Chem. Abstr.* vol. 90 (1979) 101947 c: Jp-A- 78141202, *Chem. Abstr.* vol. 92 (1980) 56810 f: Jp-A-79103801 on kuvattu *Streptomyces halstedii*-kantojen tuottamia antibiootteja, ja US-patenttijulkaisussa 4 269 971 on kuvattu polyeetteriantibiootti TM-531, jota tuottaa *Streptomyces hygrosopicus*.

Edellä luetellut polysykliset eetteriantibiootit ovat aktiivisia gram-positiivisia bakteereita, sieniä ja alkueläimiä vastaan. Näillä antibiooteilla on voimakas antikokkidi-aalinen aktiivisuus.

Hyvin tunnettu alkueläinsairaus, kokkidioosi, on jatkuvasti vakava ongelma ja sen torjuminen on taloudellisesti tärkeää eläinlääketieteelle, erityisesti siipikarjateollisuudelle. Kokkidioosi on seuraus yhden tai useamman *Eimeria*- tai *Isosporalajien* aiheuttamasta infektiosta (yhteenvedon ovat esittäneet Lund ja Farr julkaisussa "Diseases of Poultry", 5. painos,

Biester ja Schwarte, toim., Iowa State University Press, Ames, Ia., 1965, sivut 1056-1096). On olemassa kuusi kokkidialajia, jotka aiheuttavat helposti havaittavissa olevia taudin oireita herkissä kananpojissa. *Eimeria tenella*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. acervulina*, *E. maxima* ja *E. mivati* aiheuttavat vahinkoa joko suoraan tuhoamalla ruoansulatuskanavan epiteelisoluja tai epäsuorasti tuottamalla toksiineja. Kolmea muuta alkueläinlajia, jotka kuuluvat samaan sukuun, pidetään suhteellisen vaarattomina; kuitenkin *E. mitis*, *E. hagani* ja *E. praecox* pystyvät vähentämään painon lisääntymistä, alentamaan rehun hyväksikäyttöä ja vaikuttamaan vahingollisesti munien tuotantoon.

Ottaen huomioon kokkidioosista aiheutuvat suuret taloudelliset menetykset ja joidenkin tunnettujen antikokkidiaalisten aineiden etsintä.

Enteritis (suolitulehdus) on toinen sairaus, joka voi aiheuttaa vakavia taloudellisia menetyksiä kotieläintuottajille. Enteritistä esiintyy kanoilla, sialla, nautakarjalla ja lampailla ja se aiheutuu pääasiallisesti anaerobisista bakteereista, erityisesti *Clostridium perfringens*'istä sekä viruksista. Enterotoksemia (suolisyntyinen myrkytys) märehitijöillä, josta "ylensyöntitauti" lampaalla on esimerkki, on *C. perfringens*-infektion aiheuttama tila.

Sian punatauti on eräs Yhdysvalloissa esiintyvistä tavallisimmista sikasairauksista. Lisäksi tämä tauti on vallitseva monissa muissa maissa ja aiheuttaa vuosittain monien tuhansien dollareiden menetykset karjassa siankasvattajille kautta maailman. Äskettäin on havaittu, että suuri spirokeetta on tämän taudin aiheuttava organismi. Tämä organismi, *Treponema hyodysenteriae*, on nyt eristetty ja sen on osoitettu pystyvän aiheuttamaan tätä tautia /Harris, D.E. et al.: "Swine Dysentery-1 Inoculation of Pigs with *Treponema hyodysenteriae* (New Species) and Reproduction of the Disease", *Vet. Med/SAC*, 67: 61-64: 1972/. Tämän jälkeen luetellut testiärvot koskevat testejä, jotka on suoritettu tällä organismilla. On huomattava, että ei ole tunnettua, onko *T. hyodysenteriae* ainoa sian punatautia aiheuttava organismi. Käytettävissä olevista tiedoista voidaan kuitenkin päätellä, että se on infektion ensisijainen lähde.

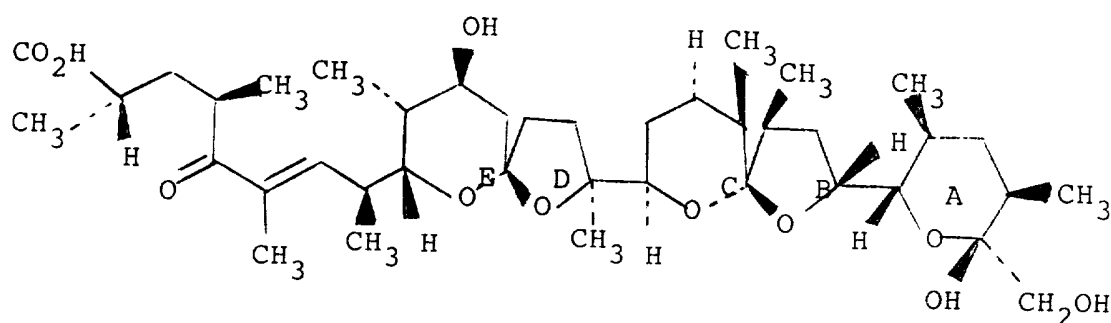
Hyötysuhteen parantaminen (lisääntynyt kasvunopeus ja/tai rehun hyödyntämisen lisääntynyt tehokkuus) märehitjöllä, kuten nautakarjalla, on toinen eläinlääketieteen taloudellisesti toivottava tavoite. Erityisen kiinnostavaa on kasvun edistyminen, joka on saavutettu lisäämällä rehun hyödyntämistehokkuutta. Mekanismi märehitjoiden rehun ravitsevan pääosan (hiilihydraattien) hyväksikäyttämiseksi on hyvin tunnettu. Mikro-organismit eläimen pötsissä hajottavat hiilihydraattimolekyylejä monosakkaridien tuottamiseksi ja muuttavat sitten nämä monosakkaridit pyruvaattiyhdisteiksi (palorypälehapon estereiksi). Pyruvaatit metabolisoituvat sitten mikrobiologisten prosessien vaikutuksesta muodostaen asetaatteja, butyraatteja tai propionaatteja, jotka yhteisesti tunnetaan haihtuvina rasvahappoina (VFA). Yksityiskoh-  
15 taisempaa kuvausta varten, ks. Leng julkaisussa "Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant", Phillipson et al., toim., Oriel Press, Newcastle-Upon-Tyne, Englanti, 1970, sivut 408-410.

VFA:n hyödyntämisen suhteellista tehokkuutta ovat kuvanneet McCullough julkaisussa "Feedstuffs", kesäkuu 20 19, 1971, sivu 19; Eskeland et al. julkaisussa J. An. Sci. 33, 282 (1971); ja Church et al. julkaisussa "Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants", nide 2, 1971, sivut 25 622 ja 625. Vaikka asetaatteja ja butyraatteja käytetään hyväksi, käytetään propionaatteja hyväksi suuremmalla tehokkuudella. Lisäksi, kun propionaattia on käytettävissä liian vähän, voi eläimissä kehittyä ketonimyrkytys. Siten edullinen yhdiste kiihottaa eläimiä tuottamaan suuremman osan propionaatteja hiilihydraateista lisäten siten hii-  
30 lihydraatin hyväksikäytön tehokkuutta ja pienentäen myös ketonimyrkytyksen esiintymismahdollisuutta.

Vielä eräs tauti, joka aiheuttaa taloudellisia menetyksiä kotieläintuottajille, aiheutuu Theileria-suvun alkueläinloisen vaikutuksesta. Tämä tauti, teilerioosi, tunnetaan myös "itärannikon kuumeena", "rannikkokuumeena" tai "Rhodesian punkkikuumeena". Theileria-loinen elää punaisissa verisoluisissa, mutta ei tuhoa niitä, mikä aiheuttaa akuutteja tai

kroonisia kuumeisia infektoita. Nautakarjassa taudille on ominaista korkea kuume, imusolmukkeiden turpoaminen, laihtuminen ja suuri kuolleisuus. Tämä tauti on hyvin vakava ongelma Itä- ja Keski-Afrikassa. Yksityiskohtaisempaa kuvausta varten teilerioosista, ks. "The Merck Veterinary Manual", Siegmund et al., toim. Merck & Co., Rahway, N.J., 5. painos, sivut 431-433 (1979).

Tämän keksinnön kohteena on menetelmä polysyklisen eetteriantibiootin valmistamiseksi, jolla on kaava



Menetelmässä viljellään mikro-organismia *Streptomyces halstedii* ATCC 31812 vesipitoisissa viljelyvälineaineissa, jotka sisältävät assimiloituvan hiililähteen, tyypeä ja epäorgaanisia suoloja, upotetuissa aerobisissa fermentointiolosuhteissa, kunnes saadaan olennainen määrä tätä antibioottia. *Streptomyces halstedii* ATCC 31812 on eristetty Japanista saadusta maaperänäytteestä.

Piirroksissa on esitetty seuraavat infrapuna-absorptio-kirjot kaliumbromidissa:

Kuvio 1 - antibiootti 53.607 natriumsuolan muodossa;

kuvio 2 - antibiootti 53.607 vapaassa happomuodossa.

Tämän keksinnön antibioottia tuottava mikro-organismi eristettiin maaperänäytteestä, joka oli kerätty Hiroshimassa, Japanissa. Mikro-organismilla havaittiin tutkittaessa olevan *Streptomyces*'in morfologisia ominaispiirteitä. Sillä havaittiin olevan *Actinomycetales*'in hyffit ja ilmahuovasto, jossa on itiöketjuja, jotka ovat luonteenomaisia *Streptomyces*-suvulle. Suvun identtisyys vahvistettiin lisäksi soluseinäanalyysillä.

Tämän mikroorganismien viljelmä ympätettiin vinopinnasta nestemäiseen ATCC # 172 -väliaineeseen ja kasvatettiin neljä päivää 28°C:ssa täristemellä. Se poistettiin sitten täristi-

meltä, lingottiin, pestiin kolme kertaa steriilillä tislatusella vedellä ja ympätettiin väliaineisiin, joita tavallisesti käytetään Actinomycetales'in jäsenten tunnistamiseen.

Inkubointi tapahtui 28°C:ssa, paitsi missä toisin on esitetty ja tulokset merkittiin muistiin sopivina ajankohtina; tässä annetut tulokset ovat kaksi viikkoa inkuboinnin jälkeen paitsi missä toisin on esitetty.

Tunnistamisväliaineet, joita käytettiin viljelmän karakterisointiin, sekä viitteet niiden koostumukseen olivat seuraavat:

1. Tryptoni-hiivauuteliemi - (ISP # 1 väliaine, Difco).
2. Hiivauute-mallasuute-agar - (ISP # 2 väliaine, Difco).
3. Kaurajauho-agar - (ISP # 3 väliaine, Difco).
4. Epäorgaanisia suoloja-tärkkelys-agar - (ISP # 4 väliaine, Difco).
5. Glyseroli-asparagiini-agar - (ISP # 5 väliaine, Difco).
6. Peptoni-hiivauute-rauta-agar - (ISP # 6 väliaine, Difco).
7. Czapek-sakkaroosi-agar - (S.A. Waksman, "The Actinomycetes", nide 2, väliaine nro 1, s. 328, 1961).
8. Glukoosi-asparagiini-agar - sama, väliaine nro 2, s. 328.
9. Bennett'in agar - sama, väliaine nro 30, s. 331.
10. Enerson'in agar - sama, väliaine nro 28, s. 331.
11. Ravintoaine-agar - sama, väliaine nro 14, s. 330.
12. Gordon'in ja Smith'in tyrosiini-agar - R.E. Gordon ja M.M. Smith, Jr. Bact. 69: 147-150, 1955.
13. Kaseiini-agar - sama.
14. Kalsium-malaatti-agar - S.A. Waksman, Bact. Rev. 21: 1-29, 1957.
15. Gelatiini - R.E. Gordon ja J.M. Mihm, Jr. Bact. 73: 15-27, 1957.
16. Tärkkelys - sama.
17. Orgaaninen nitraatti-liemi - sama.
18. Dekstroosi-nitraatti-liemi - S.A. Waksman, "The Actinomycetes", nide 2, väliaine nro 1, s. 328, 1961, jolloin 30 g sakkaroosia on korvattu 3 g:lla dekstroosia ja agar jätetty pois.

19. Peruna-porkkana-agar - M.P. Lechevalier, Jr. Lab. and Clin. Med. 71: 934-944, 1968, mutta käyttäen ainoastaan 30 g perunoita, 2,5 g porkkanoita ja 20 g agaria.

20. 2 %:n vesijohtovesi-agar.

5 21. Kuorittu maito - Difco.

22. Selluloosan hyväksikäyttö -

a) H.L. Jensen, Proc. Lin. Soc. N.S.W. 55: 231-248, 1930.

10 b) M. Levine ja H.W. Schoenlein, "A Compilation of Culture Media", väliaine nro 2511, 1930.

23. Hiilihydraatit - ISP # 9 väliaine, Difco; Nonomura'n ja Ohara'n C-2 väliaine julkaisussa Nonomura, H. ja Y. Ohara, J. Ferment. Technol. 49: 887-894, 1971.

15 24. Lämpötila-alue - ATCC väliaine 172 julkaisussa "ATCC Culture Collection Catalogue", 14. painos, s. 518, 1980.

20 Utta viljelmää (Pfizer N393-39) kuvattiin seuraavasti eri väliaineilla värein, joita on selostettu yleisessä terminologiassa, mutta tarkat värit määritettiin vertaamalla väriliuskoihin käsikirjasta Color Harmony Manual, 4. painos:

25 Hiivauute-mallasuute-agar - kasvu hyvä, kermanvärisestä vaaleankellertävään (lähellä 2 ca), kohtuullisesti nousnut, sileä, karheni ryppyiseksi, ei ilmahuovastoa; kääntöpuoli sama kuin pinta; ei liukoista pigmenttiä.

30 Kaurajauho-agar - kasvu kohtuullinen, harmaasta ruskehtavan harmaaseen (2 ge, 2 lg-2 ni), ohuesta lievästi nousseeseen, sileä, pieniä valkoisia pisteitä; ilmahuovasto hajanainen, valkoisesta vaaleanharmahtavaan; kääntöpuoli sama kuin pinta; liukoinen pigmentti vaaleankellertävä.

Epäorgaanisia suoloja-tärkkelys-agar - kasvu kohtalainen, kellertävän ruskeasta ruskeaan (2 ic, 3 ne:stä 3 le:hen), ohut, sileä, ei ilmahuovastoa; kääntöpuoli sama kuin pinta; ei liukoista pigmenttiä.

35 Glyseroli-asparagiini-agar - kasvu huonosta kohtalaiseen, himmeän valkoinen, ohut, sileä, muutamia pieniä

valkoisia pisteitä; ilmahuovasto hajanainen, valkoinen; kääntöpuoli sama kuin pinta; ei liukoista pigmenttiä.

Gordon'in ja Smith'in tyrosiini-agar - kasvu heikosta kohtuulliseen, värittömästä kermanväriseen (2 ca), ohut, 5 sileä, ei ilmahuovastoa; kääntöpuoli sama kuin pinta; ei ilmahuovastoa; kääntöpuoli sama kuin pinta; ei liukoista pigmenttiä.

Czapek-sakkaroosi-agar - kasvu heikko, värittömästä himmeään valkoiseen, ohut, sileä, ilmahuovastossa joitakin 10 pieniä valkoisia pisteitä; kääntöpuoli sama kuin pinta; ei liukoista pigmenttiä.

Glukoosi-asparagiini-agar - kasvu kohtalainen, kellertävän harmaasta laventelin harmaaseen (2 ig, 3 ge:stä 3 ig:hen), ohut, sileä, mutta lievästi rypistynyt lähellä 15 reunaa; ilmahuovasto vaaleanharmahtava (2 ge); kääntöpuoli sama kuin pinta; liukoinen pigmentti vaalean kellertävä.

Kalsium-malaatti-agar - kasvu heikko, väritön, himmeään valkoinen reunus, upoksissa, sileä, harmahtavassa (lähellä harmaata sarjaa 2 dc:stä 2 fe:hen) ilmahuovastossa pie- 20 niä pisteitä; kääntöpuoli sama kuin pinta; ei liukoista pigmenttiä.

Kaseiini-agar - kasvu kohtalainen, vaalean ruskehtava (2 ne:stä 3 ne:hen), ohut, sileästä lievästi karhenevaan, ei ilmahuovastoa; kääntöpuoli sama kuin pinta; ei liukoista 25 pigmenttiä.

Bennett'in agar - kasvu hyvä, ruskea (3 ng:stä 3 ni:hin), noussut, rypistynyt, ei ilmahuovastoa; kääntöpuoli sama kuin pinta; liukoinen pigmentti vaalean kellertävä (2 ca).

Emerson'in agar - kasvu kohtalaisesta hyvään, vaalean kellertävän ruskeasta (2 ca:sta 3 ca:han) vihertävän harmaaseen (23 ge:stä 23 ig:hen), ohuesta nousseeseen, sileästä lievästi karhenevaan tai esiintyy membraanikuppeina, jotka ovat epäsäännöllisesti rypistyneet, ei ilmahuo- 35 vastoa; kääntöpuoli sama kuin pinta; ei liukoista pigmenttiä.



Ravintoaine-agar - kasvu heikosta kohtuulliseen; vaalean kellertävä (2 ca), ohut, sileä, ei ilmahuovastoa, kääntöpuoli sama kuin pinta; ei liukoista pigmenttiä.

5 Gelatiini-agar - kasvu kohtalainen, vaalean kellertävä (2 ca), ohut, sileä, ei ilmahuovastoa; kääntöpuoli sama kuin pinta, ei liukoista pigmenttiä.

10 Tärkkelys-agar - kasvu hyvä, kermanvärinen, vaalean kellertävästä ruskeaan (2 ca:sta lähelle 3 gc), ohuesta lievästi nousseeseen, sileä, mutta rypistynyt reunaa kohti, ei ilmahuovastoa; kääntöpuoli sama kuin pinta; ei liukoista pigmenttiä.

15 Peruna-porkkana-agar - kasvu kohtalainen, kermanvärinen (2 ca), reunus harmahtavasta tumman harmahtavaan (lähellä harmaata sarjaa 2 fe, 2 ih:sta 2 ml:ään), ohut, sileä, ilmahuovasto harmaasta tumman harmaaseen; kääntöpuoli sama kuin pinta, ei liukoista pigmenttiä.

20 Vesijohtovesi-agar - kasvu heikko, värittömästä himmeään valkoiseen, ohut, sileä, joitakin pieniä valkoisia pisteitä ilmahuovastossa; kääntöpuoli sama kuin pinta. Ei liukoista pigmenttiä.

Huomautukset biokemiallisista ominaisuuksista on koottu yhteenvedoksi seuraavasti:

1. Melaniinia ei syntynyt.
2. Rikkivetyä ei syntynyt.
- 25 3. Gelatiini nesteytyi.
4. Tärkkelys hydrolysoitui.
5. Nitraatti pelkistyi nitriitiksi.
6. Heikko kasvu Jensen'in selluloosalla.
7. Ei kasvua Levine'n ja Schoenlein'in selluloosalla.
- 30 8. Ei hajoamista kummallakaan selluloosa-väliaineella.
9. Ei koaguloitumista maidolla.
10. Ei peptonisoitumista maidolla.
11. Ei kaseiinin, kalsiummalaatin eikä tyrosiinin digeroitumista.
- 35 12. Hiilihydraatin hyväksikäyttö;

I. Nonomura'n väliaineella käytettiin hyväksi glukoosia, arabinoosia ja ksyloosia: raffinoosia epävarmasti; sakkaroosia, inositolia, mannitolia, fruktoosia ja raffinoosia ei käytetty hyväksi.

II. ISP  $\neq$  9 väliaineella käytettiin hyväksi glukoosia, arabinoosia, ksyloosia ja sakkaroosia; fruktoosia, inositoosia, mannitolia, raffinoosia ja ramnoosia ei käytetty hyväksi.

Peruna-porkka-agarilla tehtiin seuraavat morfologiset havainnot 15 päivää inkuboinnin jälkeen:

10 Itiömassa harmaassa värisarjassa; itiöketjut suorina, käyrystyneinä, epäsäännöllisesti mutkitteleviä tai aaltoilevia, harvoin koukistuneita, 10-30 itiötä itiöketjua kohti, harvemmin vähemmän kuin 10 itiötä itiöketjua kohti; itiöt soikeita, ellipsin muotoisista sauvan muotoisiin,  
15 1 - 1,8 x 0,8 - 0,9  $\mu$ m, sileitä, kuten pyyhkäisyelektronimikroskoopilla paljastettiin.

Lämpötilan suhde kasvunopeuteen havaittiin seuraavaksi:

	Lämpötila	Kasvu
20	21°C	hyvästä erinomaiseen
	28°C	hyvä
	37°C	kohtuullinen
	45°C	heikko

Kuten edellä mainittiin, vahvasti soluseinän analyysi viljelmän kuuluvan *Streptomyces*-lajiin. Koko solun analyysi osoitti LL-diaminopimeliinihapon ja glysiinin läsnäolon, mutta diagnostisten sokereiden poissaolon. Menetelmät, joita käytettiin kokosolun aminohappo- ja sokerianalyysijä varten, ovat kuvanneet Becker, B. et al. julkaisussa Appl. Microbiol., 12: 421-423, 1964; ja Lechevalier, M.P. julkaisussa J. Lab. Clin. Med., 71: 934-944, 1968.

35 Viljelmälle N393-39 on ominaista massassa olevien itiöiden väri vaaleanharmaasta harmaaseen, itiöketjut suorista mutkitteleviin, sileät itiöt ja kyvyttömyys tuottaa melaniinia. LL-diaminopimeliinihapon läsnäolo ja diagnostisten sokereiden poissaolo kokosolu-hydrolysaateissa vahvistaa sen kuulumisen *Streptomyces*-sukuun. Viljelmä muistuttaa

läheisesti Streptomyces halstedii'ta, jonka ovat kuvanneet Schirling, E.B. ja Gottlieb, D., 1968, Int. J. Syst. Bacteriol., 18:69-189 ja siten käytettiin vertailuun tyyppikantaa S. halstedii ATCC 10897. Molemmat viljelmät ovat yhdenmukaisia toisensa kanssa seuraavissa ominaisuuksissa: itiöketjujen morfologia, itiöpinnan morfologia, negatiivinen melaniinin tuotanto ja useimmat biokemialliset ominaisuudet. Viljelmä N393-39 poikkeaa S. halstedii'sta siinä, että ilmahuovasto puuttuu monilla väliaineilla, pesäkkeen kääntöpuoli on ruskea mieluummin kuin harmahtavasta mustaan ISP  $\neq$  2-, ISP  $\neq$  3- ja ISP  $\neq$  4-väliaineilla; H<sub>2</sub>S-tuotanto on negatiivinen eikä viljelmä käytä hyväksikäyttöä fruktoosia. Koska nämä erot ovat pelkästään pieniä muunnoksia Streptomyces-lajien kantojen joukossa, pidetään viljelmää N393-39 Streptomyces halstedii'n uutena kantana (Waksman ja Curtis) Waksman ja Henrici.

Tämä uusi viljelmä (Pfizer N393-39) talletettiin 23. helmikuuta 1981 kokoelmaan American Type Culture Collection, Rockville, Maryland tunnusnumerolla Streptomyces halstedii ATCC 31813. Tämän viljelmän tallennuksen pysyvyys kokoelmassa The American Type Culture Collection Rockville'ssä Maryland'issa ja sen yleinen saatavuus mahdollistetaan kautta patentin koko voimassaoloajan siinä tapauksessa, että patentti myönnetään. Viljelmän saatavuus on mahdollista patenttihakemuksen vireilläoloaikana tietyin rajoituksin (37 CFR 1.14 ja 35 USC 112). Kaikki rajoitukset tallennetun viljelmän saatavuudelle poistetaan peruuttamattomasti patentin myöntämisen jälkeen.

Viljelmän Streptomyces halstedii ATCC 31812 viljely voidaan suorittaa samanlaisissa olosuhteissa kuin tähän asti käytetyissä polyeetteriantibioottien fermentoinneissa. Ks. esimerkiksi US-patentti 4 195 079. Viljely tapahtuu edullisesti vesipitoisissa ravintoväliaineissa upotetuissa aerobisissa olosuhteissa sekoittaen lämpötilassa väliltä 24-36°C. Viljelyyn käyttökelpoiset ravintovälineet sisältävät assimiloituvan hiilen lähteen, kuten sokereita, tärkkelyksiä ja glyserolia;

orgaanisen typpilähteen, kuten kaseiinia, kaseiinin entsy-  
maattista uutetta, soijapapujauhoa, puuvillansiemenjauhoa,  
maapähkinäjauhoa, vehnän gluteenia, soijajauhoa, lihajauhoa  
ja kalajauhoa. Kasvuaineiden lähdettä, kuten jyvien liu-  
5 koisia aineita ja hiivauutetta sekä myös suoloja, kuten  
natriumkloridia ja kalsiumkarbonaattia sekä hivenalkuainei-  
ta, kuten rautaa, magnesiumia, sinkkiä, kobolttia ja man-  
gaania käytetään myös hyväksi edullisin tuloksin. Jos fer-  
mentoinnin aikana tapahtuu liiallista kuohuntaa, voidaan  
10 lisätä vaahtoamisen estoaineita, kuten kasviöljyjä tai si-  
likoneja käymisväliaineeseen. Väliaineen ilmastus säiliössä  
upotettua kasvua varten ylläpidetään edullisesti määrässä  
1/2 - 2 tilavuusosaa steriiliä vapaata ilmaa tilavuusosaa  
kohti käymislientä/minuutti, joka johdetaan käymisliemeen  
15 spargetin läpi. Sekoitus voidaan ylläpitää sekoittimien  
avulla, jotka ovat yleensä fermentointialaan perehtyneiden  
yleisesti tuntemia. Sekoittamisnopeus riippuu käytetystä  
sekoitintyypistä. Ravistuspulloa käytetään yleensä taajuu-  
della 150-200 sykliä/minuutti, kun taas käymisastiaa taval-  
20 lisesti pyöritetään nopeudella 300-600 r/min. Aseptiset  
olosuhteet täytyy tietenkin ylläpitää organismin siirrostuk-  
sen ja koko sen viljelyn ajan.

Ympäri tämän keksinnön mukaisen antibiootin valmis-  
tusta varten saadaan käyttäen vinopintaviljelmästä otettua  
25 näytettä. Näytteellä ympätään joko ravistuspulloja tai ympäys-  
säiliöitä tai ympäyssäiliöt voidaan ympätä ravistuspullois-  
ta. Ravistuspulloissa kasvu yleensä saavuttaa maksiminsa  
2-4 päivässä, kun taas ympäri upotetuissa ympäyssäiliöissä  
tavallisesti on edullisimmassa vaiheessa 1,5 - 3 päivässä.

30 Antibioottituotannon edistymistä fermentoinnin ai-  
kana ja fermentointiliemen bioaktiivisuutta voidaan tark-  
kailla liemen biologisella määrityksellä käyttäen *Staphylo-*  
*coccus aureus* tai *Bacillus subtilis* herkkää kantaa.  
*S. aureus* ATCC 6538 ja *B. subtilis* ATCC 6633 ovat sopivia  
35 kantoja tähän tarkoitukseen. Käytetään standardilevymääri-  
tysmenetelmää, jossa inhibiiovyöhykettä, joka ympäröi suodatin  
paperikiekkoa, joka on kyllästetty käymisliemellä, käytetään

antibioottisen tehon mittana. Myös ohutlevykromatografia pihappogeeliä käyttäen on käyttökelpoinen tapa käymisväliaineessa tuotetun antibiootin ja käymisliemistä uutettujen raakojen ja puhdistettujen aineiden koostumuksen analysointia varten. Analtech-pihappogeeli GF-kromatogrammit 5 kehitetään etyyliasetaatti/metanolilla (9:1) tai kloroformi/metanolilla (9:1). Antibioottiyhdiste tehdään näkyväksi suihkuttamalla vanilliinilla etanolipitoisessa rikkihapossa (3 g vanilliinia 97 ml:ssa etanolia ja 3 ml:ssa 10 väkevää rikkihappoa) ja kuumentamalla TLC-levy 80°C:ssa. Antibiootti näkyy vaaleanpunertavana täplänä. Levy voidaan myös päällystää agarilla, joka on ympätty joko S. aureuksella tai B. subtiliksella ja inkuboida 37°C:ssa 16 tuntia antibiootin tekemiseksi näkyväksi.

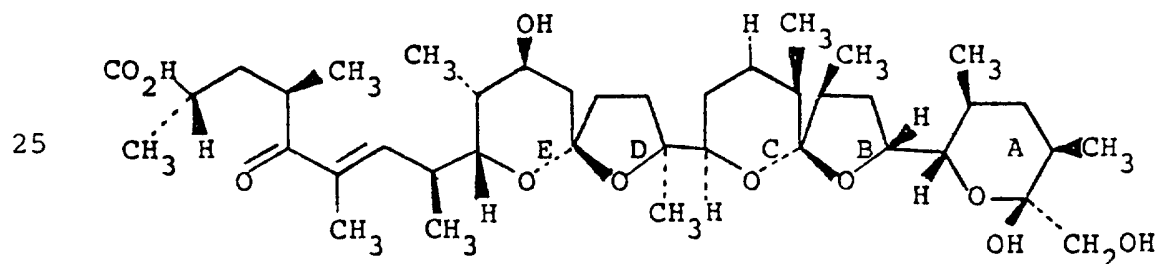
15 S. halstedii ATCC 31812:n fermentoinnilla tuotettu antibiootti erotetaan ja otetaan talteen uuttamalla koko suodattamatonta käymislientä orgaanisella liuottimella, kuten kloroformilla, etyyliasetaatilla, metyyli-isobutyyliketoneilla tai butanolilla luonnostaan vallitsevassa pH:ssa. 20 Liuotinuute voidaan sitten väkevoidä tyhjössä ohueksi siirapiksi.

Tyypillinen menetelmä tämän keksinnön antibiootin (tämän jälkeen "antibioottinen yhdiste 53 607") erottamiseksi ja talteenottamiseksi on seuraava:

25 Koko liemi S. halstedii ATCC 31812:n fermentoinnista uutettiin metyyli-isobutyyliketoneilla. Liuotinuute antoi tumman öljyn liuottimen haihduttamisen jälkeen tyhjössä. Öljy liuotettiin kloroformiin ja kaadettiin pihappogeelikerrokseen. Pihappogeelikerros pestiin sitten peräkkäin kloroformilla, etyyliasetaatilla ja asetonilla. Pesujakeet 30 tutkittiin ohutlevykromatografialla ja antibioottiyhdiste 53 607 löytyi miltei yksinomaan etyyliasetaattijakeesta. Etyyliasetaattijae haihdutettiin kuiviin ja muut jakeet hylättiin. Kuivaa etyyliasetaattijaetta puhdistettiin edelleen 35 pylväskromatografisesti kokoamalla se etyyliasetaattiin ja pantiin pylvääseen, joka oli täytetty pihappogeelillä, joka oli lietetty etyyliasetaattiin, ja eluoitiin etyyli-

asetaatilla. Pylväsjakeet, jotka sisälsivät antibiootti-  
yhdistettä 53 607 (määritetty ohutlevykromatografialla)  
yhdistettiin ja konsentroitiin haihduttamalla. Tä-  
mä aine kromatografoitiin sitten pylväässä, joka oli täy-  
5 tetty Sephadex LH-20:llä metanolissa ja jakeet, jotka si-  
sälsivät antibioottiyhdistettä 53 607, yhdistettiin, haih-  
dutettiin pienempään tilavuuteen ja koottiin sitten kloro-  
formiin. Kloroformiliuosta pestiin 5-%:isella mononatrium-  
fosfaattipuskurilla, jonka pH oli säädetty 4,5:een fosfori-  
10 hapolla. Liuotinfaasi pestiin sitten 5-%:isella, paino/  
tilavuus, dinatriumfosfaattipuskurilla, jonka pH säädet-  
tiin 9,0:aan natriumhydroksidiliuoksella. Liuotinfaasi kuivat-  
tiin sitten vedettömällä natriumsulfaattilla ja haihdute-  
taan. Jäännös koottiin asetoniin ja pantiin jääkaappiin,  
15 minkä jälkeen antibioottiyhdiste 53 607 kiteytyi natrium-  
suolana. Vapaa happo voidaan saada pesemällä natriumsuolan  
etyyliasetattiliuosta vedellä, jonka pH on säädetty 4,5:een.  
Liuottimen haihduttaminen antoi antibioottiyhdisteen 53 607  
vapaan hapon kiteitä.

20 Antibioottiyhdisteen 53 607 analyysi ilmaisee seu-  
raavan rakenteen:



30 Antibioottiyhdisteellä 53 607 on estävä vaikutus  
joukon gram-positiivisia mikro-organismeja kasvua vastaan.  
Seuraavaan taulukkoon I on koottu in vitro MIC-testien tu-  
lokset. Tätä testiä varten jokainen organismi ympäröidään sar-  
jaan koeputkia, jotka sisältävät ravintoväliainetta ja  
35 yhdisteen 53 607 vaihtelevia pitoisuuksia, antibiootin mini-  
miväkevyyden (µg/ml) määrittämiseksi, joka estää organis-  
min kasvun 24 tunnin jakson ajan (MIC).

Taulukko I

	Organismi	MIC, $\mu\text{g/ml}$ yhdistettä 53 607 (natriumsuola)
5	<u>Staphylococcus aureus</u>	01A005 0,78
		01A052 0,78
		01A110 1,56
		01A400 1,56
	<u>Streptococcus faecalis</u>	02A006 1,56
10	<u>Streptococcus pyogenes</u>	020203 <0,01
	<u>Corynebacterium pyogenes</u>	11D001 25
	<u>Bacillus subtilis</u>	06A001 0,39
	<u>Bacteroides fragilis</u>	78C004 12,5
		78C009 6,25
15		78C010 6,25
	<u>Bacteroides vulgatis</u>	78E032 3,12
	<u>Haemophilus influenza</u>	54A036 6,25
		54A037 3,12
		54A059 12,5
20	<u>Pasteurella multocida</u>	59A001 >200
	<u>Clostridium perfringens</u>	10A002 0,98
		10A003 0,98
	<u>Neisseria sicca</u>	66C000 25
	<u>Staphylococcus epidermidis</u>	01B087R 0,78
25		01B111RR 0,78
		01B126 1,56
	<u>Fusobacterium necrophorum</u>	84C004 3,12
	<u>Treponema hyodysenteriae</u>	94A001 0,39
		94A002 0,098
30		

Gram-negatiivisia bakteereita, kuten Escherichia colia, Pseudomonas aeruginosaa, Klebsiella pneumoniaeta, Serratia marcescens'ia ja Enterobacteriaceae aerogenes'tä, vastaan MIC-arvot olivat kaikissa tapauksissa >50.

Antibioottiyhdisteellä 53 607 ja sen kationisuoloilla on erinomainen aktiivisuus kokkidioosi-infektioita vastaan siipikarjassa. Kun sitä lisätään kanojen ravintoon määrissä 50-200 ppm, nämä yhdisteet ovat tehokkaita torjumaan

5 Eimeria tenella'sta, E. acervulina'sta, E. maxima'sta, E. brunetti'sta ja E. necatrix'istä aiheutuvat infektiot.

Antibioottiyhdisteen 53 607 ja sen suolojen tehokkuus kokkidioosi-infektioita vastaan kananpojissa määritettiin seuraavalla tavalla. 3-5:n kymmenen päivän ikäisen SPF val-

10 koisen Leghorn kukonpojan ryhmälle syötettiin ravintoseosta, joka sisälsi antibioottiyhdistettä 53 607 tai sen natrium- ja/tai kaliumsuolaa siihen tasaisesti dispergoituna. Oltuaan tällä ravinnolla 24 tuntia, jokainen kukonpoika ympätettiin per os (suun kautta) testattavan nimenomaisen

15 Eimeria-lajin itiörakkulalla. Muita 3-5:n kymmenen päivän ikäisen kukonpojan ryhmiä syötettiin samanlaisella sekaravinnolla, jossa ei ollut antibioottiyhdistettä 53 607 tai sen suoloja. Ne infektoitiin myös 24 tunnin kuluttua ja toimivat infektoituina kontrolleina. Vielä yksi 3-5:n 10

20 päivän ikäisen kukonpojan ryhmä syötettiin ravintoseoksella, jossa ei ollut antibioottiyhdistettä 53 607 ja joita ei infektoitu kokkidialla. Nämä toimivat normaalikontrolleina. Käsittelyn tulokset arvosteltiin viiden päivän kuluttua E. acervulina'n tapauksessa ja kuuden päivän jälkeen kai-

25 kille muille tapauksille. Saadut tulokset on koottu taulukkoon II.



Taulukko II

	Infektointiin käytetty laji	Annos (ppm)	Infektion keskim. aste <sup>1</sup>	Suhde <sup>1</sup>	Painon lisäys (%)
5	<u>Eimeria tenella</u>	200	1,3	0,41	37
		100	1,0 (1,3)	0,32 (0,37)	57 (60)
		50	2,7 (0,3)	0,86 (0,09)	22 (97)
		25	3,0 (1,7)	0,95 (0,49)	47 (102)
	<u>Eimeria acervulina</u>	200	1,5	0,75	2
10		100	1,2	0,60	22
		50	2,0	1,00	18
		25	2,0	1,00	7
	<u>Eimeria necatrix</u>	200	--	--	--
		100	0,0	0,00	69
15		50	0,2	0,11	99
		25	0,6	0,33	111
	<u>Eimeria maxima</u>	200	1,5	0,94	10
		100	0,8	0,50	37
		50	1,0	0,63	70
20		25	1,4	0,88	51
	<u>Eimeria brunetti</u>	200	--	--	--
		100	0,4	0,22	47
		50	1,0	0,55	49
25		25	2,6	1,44	47

<sup>1</sup>Arvosteluperusteet, joita käytettiin antikokkidiaalisen aktiivisuuden mittaamiseen, käsittivät sairaustumisarvioinnit nollasta neljään E. tenella'lle J.E. Lynch'in, "A New Method for the Primary Evaluation of Anticoccidial Activity", Am. J. Vet. Res. 22: 324-326 (1969) mukaan; ja nollasta kolmeen muille lajeille, mikä perustuu arviointijärjestelmän muunnokseen, jonka ovat suunnitelleet J. Johnson ja W.H. Reid, "Anticoccidial Drugs. Lesion Scoring Techniques in Battery and Floor Pen Experiments in Chicks", Exp. Parasit. 28: 30-36 (1970). Vakiosuhde määritettiin jakamalla jokaisen käsitellyn ryhmän sairastumisarvio infektoidun kontrollin sairastumisarviolla.

Eläinrehujen arvo on yleensä määritetty suoraan eläimiä syöttämällä. GB-patentissa 1 197 826 esitetään yksityiskohtaisesti in vitro pötsimenetelmä, jolla rehuissa tapahtuvat mikro-organismien aikaansaamat muutokset mitataan helpommin suuremmalla tarkkuudella arvioitaessa eläinrehuja. Tämä menetelmä käsittää laitteen käytön, jossa eläinten ruoansulatusprosessit saatetaan tapahtumaan ja tutkitaan in vitro. Eläinrehut, pötsiympä ja erilaiset kasvua edistävät aineet viedään laboratorioyksikköön ja poistetaan siitä huolellisesti valvotuissa olosuhteissa ja tapahtuneita muutoksia tutkitaan kriittisesti ja progressiivisesti sinä aikana, jona mikro-organismit kuluttavat rehua. Lisäys pötsinesteen propionihappopitoisuudessa osoittaa, että haluttu vaste märehelijän kokonaissuorituksessa on saatu aikaan kasvua edistävällä aineella rehuyhdistelmässä. Muutos propionihappopitoisuudessa ilmaistaan prosenttina propionihappopitoisuudesta, joka havaittiin vertailupötsinesteissä. Pitkäaikaisia in vivo syöttötutkimuksia käytetään osoittamaan luotettava vastaavuussuhde pötsinesteen propionihappolisäyksen ja eläimen parantuneen suoritustehon välillä.

Pötsinestettä kerätään lehmästä, jolle on tehty avanne ja jota syötetään kaupallisella lihottavalla ravinnolla plus heinillä. Pötsineste suodatetaan välittömästi juustokankaan läpi ja 10 ml pannaan 50 ml:n kartiomaiseen pulloon, joka sisältää 400 mg standardisubstraattia (68 % maissitärkkelystä plus 17 % selluloosaa plus 15 % uutettua soijapapujauhoa), 10 ml pH 6,8 puskuria ja testiyhdistettä. Pulloja kaasutetaan happivapaalla tyypellä n. kaksi minuuttia ja inkuboidaan täryvesihauteella 39°C:ssa n. 16 tuntia. Kaikki testit suoritetaan kolminkertaisina.

Inkuboinnin jälkeen sekoitetaan 5 ml:n näyte 1 ml:n kanssa 25-%:ista metafosforihappoa. 10 minuutin kuluttua lisätään 0,25 ml muurahaishappoa ja seosta lingotaan kierrosnopeudella 1 500 r/min 10 minuuttia. Näytteitä analysoidaan sitten kaasu-neste-kromatografiolla D.W. Kellog'in menetelmällä, J. Dairy Science, 52, 1690 (1969). Huippujen

korkeudet etikka-, propioni- ja voihapoille määritetään käsittelemättömistä ja käsitellyistä inkubointipulloista otetuille näytteille.

5 Testattaessa tällä in vitro -menetelmällä antoi antibioottiyhdiste 53 607 pitoisuudessa  $\mu\text{g/ml}$  n. 57 %:n lisäyk-  
sen propionihapon tuotantoon verrattuna tähän tuotteeseen vertailuliuksessa ilman lisättyä antibioottiyhdistettä  
10 53 607. Vertailun vuoksi mainittakoon, että kaupallisesti saatava monensiini (eräs toinen polysyklinen eetterianti-  
biootti) antoi määrässä  $10 \mu\text{g/ml}$  propionihapon n. 20 %:n lisäyksen kontrolliin nähden [J. Amer. Chem. Soc., 89, 5737 (1967)].

Verrattuna salinomysiiniin [J. Antibiotics, 27: 814, (1974)], aikaansai antibioottiyhdiste 53 607 n. 43 %:n li-  
15 säyksen propionihapossa väkevyydellä  $20 \mu\text{g/ml}$  ja n. 40 %:n lisäyksen väkevyydellä  $5 \mu\text{g/ml}$ , vastaavasti salinomyysiini aiheutti n. 52%:n lisäykseen väkevyydellä  $5 \mu\text{g/ml}$ .

Näiden lukuarvojen perusteella voidaan päätellä että antibioottiyhdiste 53 607 parantaa märehäntajien, ku-  
20 ten nautakarjan ja lampaiden sekä yksimahaisten eläinten, kuten sikojen ja kaniinien rehun hyväksikäyttöä. Antibioottiyhdistettä 53 607 voidaan yhdistää rehuyhdistelmiin va-  
paana happona, natriumsuolana, kaliumsuolana tai niiden seoksina. Antibioottiyhdisteen 53 607 raakoja muotoja tai  
25 kuivattua käymislientä, joka sisältää antibioottia, voidaan yhdistää rehuyhdistelmiin halutuissa voimakkuuspitoisuuksissa.

Seuraavat esimerkit valaisevat lähemmin tämän keksinnön toimintaa,

30 Esimerkki 1

Ympäri

Valmistettiin steriili vesipitoinen väliaine, jolla oli seuraava koostumus:

	Aineosa	grammaa/litra
	sereloosi	10
	tärkkelys	20
	hiivauute	5
5	NZ Amine YTT <sup>X</sup>	5
	dikalium-vetyfosfaatti	0,5
	lihajauho	5
	kobolttikloridi	0,002
	kalsiumkarbonaatti	4

10 pH 7,1 - 7,2

Soluja *Streptomyces halstedii* ATCC 31812:n vinopintaviljelmästä siirrettiin sarjaan 300 ml:n pulloja, joista jokainen sisälsi 40 ml tätä steriiliä väliainetta ja ravisteltiin pyörötäryttimellä 28-36°C:ssa 3-4 päivää.

15 Fermentointi

Erä kasvatetusta viljelmästä, riittävä aikaansaamaan 2 %:n, tilavuus/tilavuus, ympin, siirrettiin neljän litran käymisastioihin, joista jokainen sisälsi kaksi litraa seuraavaa steriiliä väliainetta:

	Aineosa	grammaa/litra
20	sereloosi	10
	NZ Amine A <sup>X</sup>	5
	tärkkelys	20
	hiivauute	5,0
25	kalsiumkarbonaatti	1,0
	kobolttikloridi	0,002

vettä täydentämään 1 000 ml:ksi

(<sup>X</sup>Rekisteröity tavaramerkki kaseiinin entsyymaattiselle hajotustuotteelle, Humko Sheffield Chemical Co., Inc.)

30 Fermentointi tapahtui 30°C:ssa sekoittaen kierrosnopeudella 1 700 kierrosta minuutissa (r/min) ja ilmastamalla yhdellä tilavuusosalla ilmaa yhtä tilavuusosaa kohti lientä minuutissa, kunnes havaittiin olennainen aktiivisuus (antibiootti-levy-määrityksen perusteella *B. subtilis* ATCC

6633'ea vastaan<sup>x</sup>), tavallisesti 3-5 päivää. Koko liemi suodatettiin neutraalissa pH:ssa käyttäen suodatusapuaainetta "Super-Cel" tai "Celite" ja suodosta uutettiin joko metyyli-iso-butyyliketonilla tai n-butanolilla. Orgaaninen faasi erotettiin vesipitoisesta faasista imemällä ja suodatettiin suspendoidun aineksen poistamiseksi. Suodatuskakku lietetettiin metanolilla, suodatettiin, metanoli haihdutettiin ja jäännöstä uutettiin samalla liuottimella, jota käytettiin suodatetun liemen uuttamiseen. Uutteet yhdistettiin ja haihdutettiin tyhjässä, jolloin saatiin viskoosi öljy. Öljy suspendoitiin heptaaniin, sekoitettiin pihappogeelin kanssa ja suodatettiin. Suodatuskakkua pestiin toistuvasti heptaanilla ja tuotetta eluoitiin vaiheittain kloroformilla pelkästään, kloroformin ja etyyliasetaatin seoksilla ja lopuksi pelkästään etyyliasetaatilla. Jakeiden ohutlevykromatografisen (TLC) ja biomäärityksen jälkeen aktiiviset jakeet yhdistettiin, haihdutettiin tyhjässä ja jäännös kromatografoitiin uudelleen antibioottiyhdisteen 53 607 saamiseksi kiinteänä aineena. Infrapunakirjo (KBr-levy) /um: 2,95  
 3,42, 6,00, 6,37, 6,85, 7,14, 7,30, 7,65, 7,90, 8,10, 9,05,

<sup>x</sup>Liemen ja myöhemmin talteenotettujen jakeiden bioaktiivisuutta seurattiin käyttäen *Bacillus subtilis* ATCC 6633:n tai *Staphylococcus aureus* ATCC 6538:n herkkää kantaa. Liemessä ja talteenotetuissa jakeissa olevat aineosat tehtiin silminnähtäviksi käyttäen pihappogeelilevyjä seuraavassa systeemissä: etyyliasetaatti/metanoli 9:1 tai kloroformi/metanoli 9:1 ja levyä suihkutettiin vanilliinilla (3 g vanilliinia 97,0 ml:ssa etanolia ja 3,0 ml:ssa väkevää rikkihappoa) ja kuumennettiin sitten 80°C:ssa. Yhdiste 53 607 ilmestyy näkyviin vaaleanpunertavana täplänä. Vaihtoehtoisesti levy päällystettiin agarilla, ympätettiin joko *S. aureus*ella tai *B. subtilis*ella, johon oli lisätty 1,0 ml 1-%:ista tetratsoliumliuosta ja inkuboitiin 37°C:ssa 16 tuntia antibiootin tekemiseksi näkyväksi. (Kirkkaat alueet vaaleanpunaista taustaa vastaan.)

9,15, 9,67, 10,00, 10,18, 10,53, 11,15, 11,40, 11,75, 13,25. Sen havaittiin olevan liukoinen kloroformiin, etyyliasetaat-  
tiin, metanoliin ja metyyli-isobutyryliketoniin; ja liukene-  
maton veteen.

5 Esimerkki 2

Valmistettiin ymppi, kuten edellisessä esimerkissä selostettiin, paitsi että käytettiin 700 ml väliainetta pulloa kohti, ravistuspulloymppiä fermentoitiin 3-4 päivää 28°C:ssa, yhdistettynä kahteen sivuhaarapulloon.

1700 gallonan (6400 l) käymislaite, joka sisälsi 1200 gallonaa (4200 l) steriiliä seuraavassa esitettyä väliainetta, ympättiin kuudella litralla (0,1%) edellä esitettyä ymppiä:

Käymisväliaine

	Aineosa	Grammaa/litra
15	sereloosi	1,0
	kaseiini	5,0
	tärkkelys	5,0
	maissin liuotusneste	5,0 ml
	kalsiumkarbonaatti	3,0
20	kobolttikloridi	0,002
	vettä täydentämään 1 litraksi	

pH 6,9 - 7,0

Käymisastia pidettiin 28°C:ssa ja ilmastettiin ja sekoitettiin kierrosluvulla 1 700 r/min. 120 tunnin kulut-  
25 tua käymisastiasta koottiin tuote. Koko liemi (1200 gallo-  
naa) uutettiin 250 gallonalla (950 l) metyyli-isobutyryliketonia,  
kerrokset erotettiin uuttolaitteessa (Podbielniak) ja orgaa-  
ninen faasi haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin 8 gallonaa  
(30l) öljyä. Öljyä väkevöitiin edelleen tyhjöissä pyöröhaih-  
30 duttimella. Jäljelle jäänyt siirappi suspendoitiin heptaa-  
niin, sekoitettiin piihappogeelin kanssa ja suodatettiin  
ja pestiin useita kertoja heptaanilla. Pesty suodatuskakku  
käsiteltiin valmiiksi, kuten esimerkissä 1 selostettiin, jolloin  
saatiin 300 g öljyä. Öljy liuotettiin pieneen määrään kloro-  
35 formia, liuos kaadettiin suodattimelle (Lapp), joka sisälsi  
3,5 kg piihappogeeliä (Merck, aste 60), ja piihappogeeliä  
pestiin peräkkäin kloroformilla, etyyliasetaatilla ja aseto-

nilla, viidellä gallonalla (20 l) kukin. Jakeet tutkittiin ohutlevykromatografiolla. Tuotteen havaittiin olevan, miltei yksinomaan, etyyliasetaatijakeessa. Muut jakeet hylättiin, etyyliasetaatijae haihdutettiin kuiviin tyhjöissä, jolloin saatiin 5 150 g väkevöitettä. Väkevöitettä puhdistettiin edelleen kromatografisesti 8,0 x 1 000 cm:n pylväessä, joka oli täytetty piihappogeelillä (Merck, aste 60) liettämällä etyyliasetaatilla. Pylväs eluoiitiin etyyliasetaatilla ottaen yhden litran jakeita 60 ml minuutissa. Tuotteen sisältävät jakeet 10 yhdistettiin ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin 85 g tuotetta.

Tuote johdettiin pylvään läpi, joka sisälsi 1 kg Sephadex LH-20, ja eluoiitiin metanolilla virtausnopeudella 25 ml/min. Otettiin 300 ml:n jakeita. Yhdistämällä tuotetta 15 sisältävät jakeet ja haihduttamalla liuotin, saatiin 30 g kiinteää ainetta. Tämä liuotettiin 500 ml:aan kloroformia ja liuos pestiin yhtä suurella tilavuusmäärällä 5-%:ista  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -puskuria, jonka pH oli säädetty 4,5:een 85%:isella fosforihapolla. Orgaaninen faasi erotettiin, pestiin 20 500 ml:lla 5-%:ista  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -puskuria, jonka pH oli säädetty 9,0:aan 1N natriumhydroksidilla. Uute kuivattiin sitten vedettömällä natriumsulfaatilla ja haihdutettiin tyhjöissä kuiviin. Jäännös koottiin asetoniin ja sen annettiin kiteytyä jääkaapissa. Kiteet kerättiin suodattamalla ja kuivattiin suurtyhjöissä huoneen lämpötilassa, jolloin saatiin 25 antibioottiyhdisteen 53 607 natriumsuolaa, sp. 199-204°C.

Optinen rotaatio:  $[\alpha]_D + 44^\circ$  (c = 1, kloroformi)

$[\alpha]_D + 37^\circ$  (c = 1, metanoli).

Ultraviolettikirjo:  $\lambda_{\text{max}}$ , 233 nm (metanoli)

30  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 212$ .

Infrapunakirjo (KBr-levy) mikronia: 2,95, 3,42, 6,00, 6,37, 6,85, 7,14, 7,30, 7,65, 7,90, 8,10, 9,05, 9,15, 9,67, 10,00, 10,18, 10,53, 11,15, 11,40, 11,75 ja 13,25.

Infrapunakirjo on esitetty kuviossa 1.

35 Alkuaineanalyysi: C 57,54 H 7,74 N 0,0.

Käyttämällä edellä esitettyssä menetelmässä  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - (pH 4,5) ja  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -puskuria, jonka pH on säädetty 9,0:aan 1N

kaliumhydroksidilla, saadaan antibioottiyhdisteen 53 607 kaliumsuola samalla tavalla.

Samoin saadaan ammoniumsuola käyttämällä edellä esitettyssä menetelmässä  $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ :ää ja  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ :ää.

5 Esimerkki 3

Erä edellä saatua antibioottiyhdisteen 53 607 natriumsuolaa liuotettiin etyyliasetaattiin, lisättiin vettä ja vesipitoisen faasin pH säädettiin 5,4:een 85%:isella fosforihapolla. Orgaaninen kerros erotettiin, kuivattiin  $(\text{Na}_2\text{SO}_4)$  ja haihdutettiin tyhjöissä, jolloin saatiin yhdisteen 53 607 vapaa happo, sp. 84-94°C. Alkuaineanalyysi tehtiin näytteellä, joka oli kuivattu yli yön suurtyhjöissä huoneen lämpötilassa ja se oli:

C 64,69 H 8,91 N 0,0.

15 Hapon havaittiin olevan veteen liukenematon; liukoinen kloroformiin, etyyliasetaattiin, metanoliin ja metyyliisobutyryliketoniin.

$[\alpha]_D + 74,5^\circ$  (c = 1, kloroformi)

$[\alpha]_D + 49,7^\circ$  (c = 1, metanoli)

20 Ultraviolettikirjo:  $\lambda_{\text{max}}$  233 nm (metanoli)  
 $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 189.$

Infrapunakirjo (KBr-levy) mikronia: 2,95, 3,45, 6,00, 6,85, 7,28, 8,13, 9,05, 9,67, 10,20, 10,55, 11,12 ja 11,48.

Kirjo on esitetty kuviossa 2.

25 Bariumsuola valmistetaan ravistelemalla 2,0 g vapaa-  
 ta happoa, joka on liuotettu 80 ml:aan etyyliasetaattia,  
 yhtä suuren tilavuusmäärän kanssa vettä, joka sisältää  
 2,4 g bariumhydroksidioktahydraattia. Kerrokset erotetaan,  
 orgaaninen faasi pestään  $\text{Ba}(\text{OH}) \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ :n tuoreella liuoksella,  
 30 la, kuivataan  $(\text{Na}_2\text{SO}_4)$  ja haihdutetaan tyhjöissä antamaan  
 antibioottiyhdisteen 53,607 haluttu suola.

Kalsiumsuola valmistetaan edellä esitetyllä menetelmällä, mutta käyttäen kalsiumhydroksidia bariumhydroksidioktahydraatin asemasta.

35 Esimerkki 4

Toteutetaan esimerkin 1 menettely, mutta käytetään 4 %, tilavuus/tilavuus, ympäriä 4 litran käymisastioissa,



joista jokainen sisältää kaksi litraa seuraavaa steriiliä väliainetta:

	Aineosa	Grammaa/litra
	sereloosi	10
5	maissitärkkelys	10
	soijapapujauho	10
	kalsiumkarbonaatti	1
	maissin fermentoituvat kiintoaineet	5
	natriumkloridi	5
10	pH = 7,0	

Fermentointi suoritettiin kahden päivän aikana 36°C:ssa sekoittaen kierrosluvulla 1 700 r/min ja johtamalla ilmaa spargerilla määrässä kaksi tilavuusosaa yhtä tilavuusosaa kohti lientä minuutissa. Koko liemi uutettiin kloroformilla ja käsiteltiin valmiiksi, kuten esimerkissä 1 selostettiin, jolloin saatiin antibioottiyhdiste 53 607 natrium-, kalium- ja kalsiumsuolojensa seoksena.

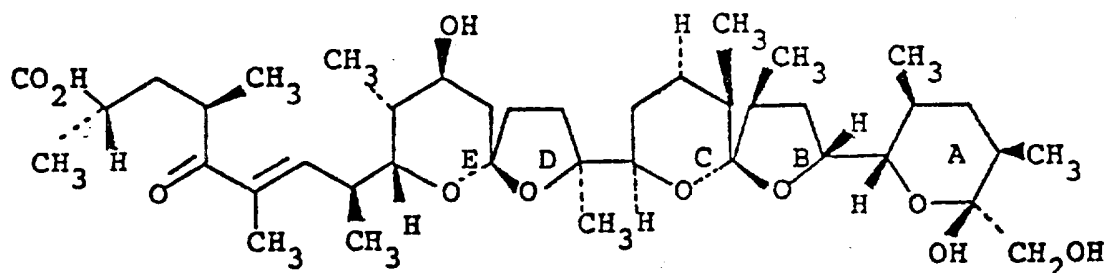
Kun edellä esitetty menettely toistetaan, mutta käyttäen käymisväliainetta, joka sisältää glyserolia sereloo-  
 20 sin asemesta, kalajauhoa tai puuvillansiemenjauhoa maissin fermentoituvien kiintoaineiden asemesta ja saattamalla fermentointi tapahtumaan pH 8,0:ssa, 28°C:ssa kuuden päivän aikana, ovat tulokset pääasiallisesti muuttumattomat.

## Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä polysyklisen eetteriantibiootin valmistamiseksi, jolla on kaava

5

10



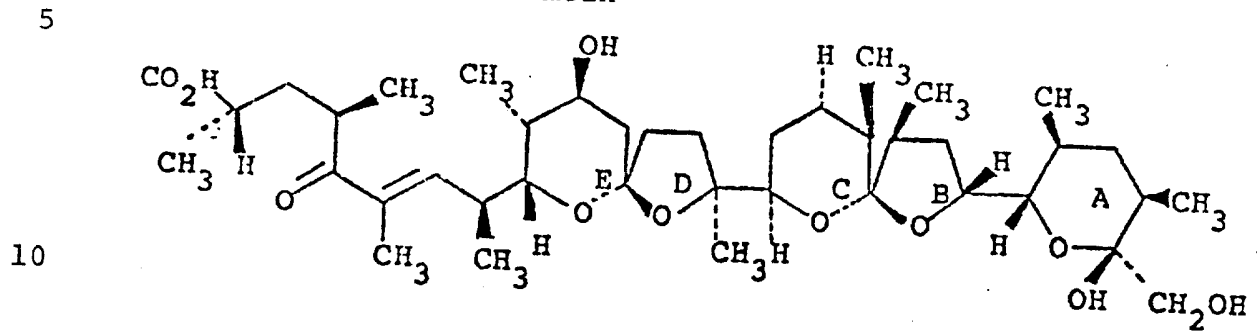
t u n n e t t u siitä, että viljellään mikro-organismia Streptomyces halstedii ATCC 31812 vesipitoisissa viljelyväliaineissa, jotka sisältävät assimiloituvan hiililähteen, tyypeä ja epäorgaanisia suoloja, upotetuissa aerobisissa fermentointiolosuhteissa, kunnes saadaan olennainen määrä tätä antibioottia.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että antibiootti erotetaan käymisväliaineesta.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käymisväliaine haihdutetaan kuiviin.

## Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av ett polycykliskt eterantibiotikum med formeln



k ä n n e t e c k n a t därav, att mikroorganismen *Streptomyces halstedii* ATCC 31812 odlas i vattenhaltiga odlingsmedier som innehåller en assimilerbar källa av kol, kväve och oorganiska salter under nedsänkta aerobiska fermentationsbetingelser tills en väsentlig mängd av detta antibiotikum erhålles.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att antibiotikumet separeras från fermentationsmediet.

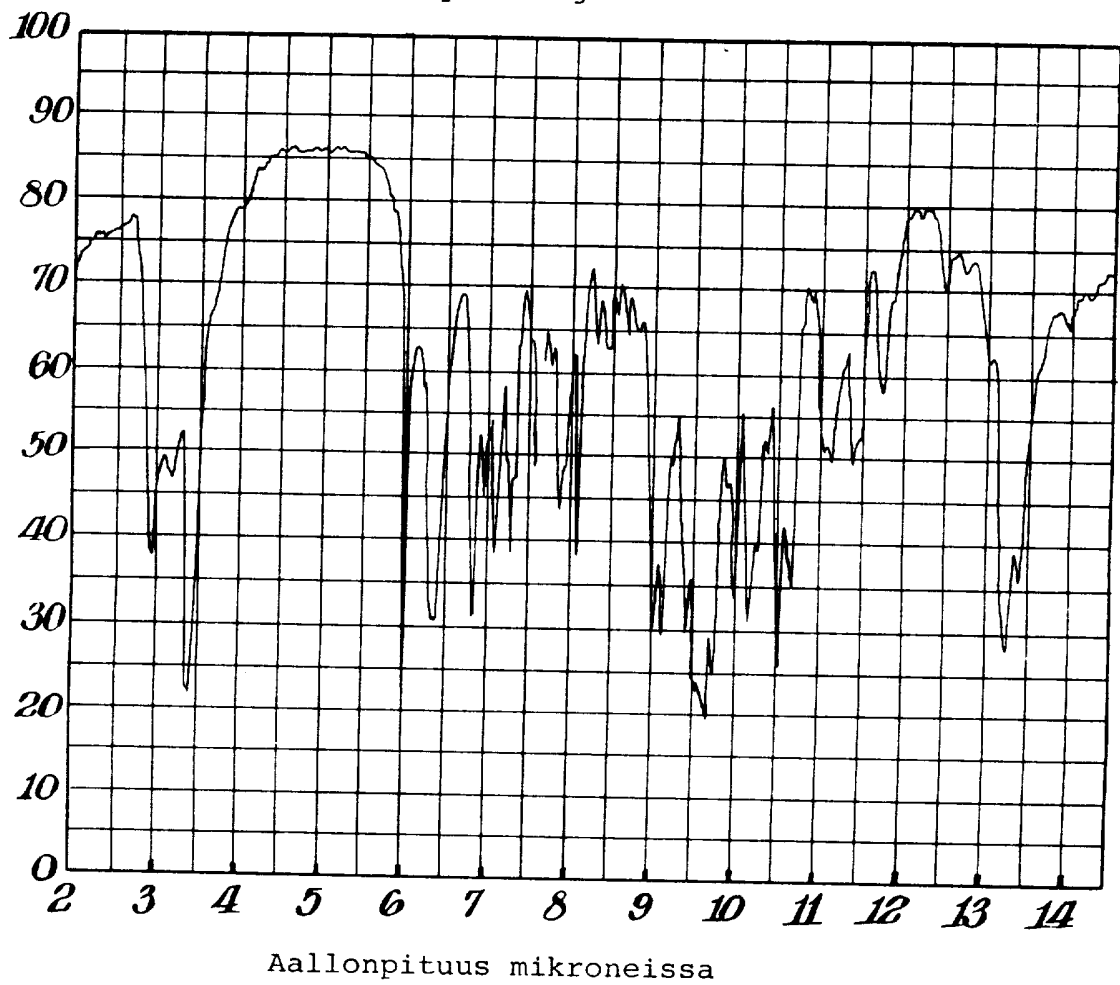
3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att fermentationsmediet avdunstar till torrhet.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Patentjulkaisuja:-Patentskrifter: USA(US) 4 269 971 (A 61 K 31/71).  
 Muita julkaisuja:-Andra publikationer: Chem. Abstr. vol. 87 (1977), 165946x, Chem. Abstr. vol. 90 (1979), 101947c, Chem. Abstr. vol. 92 (1980), 56810f.

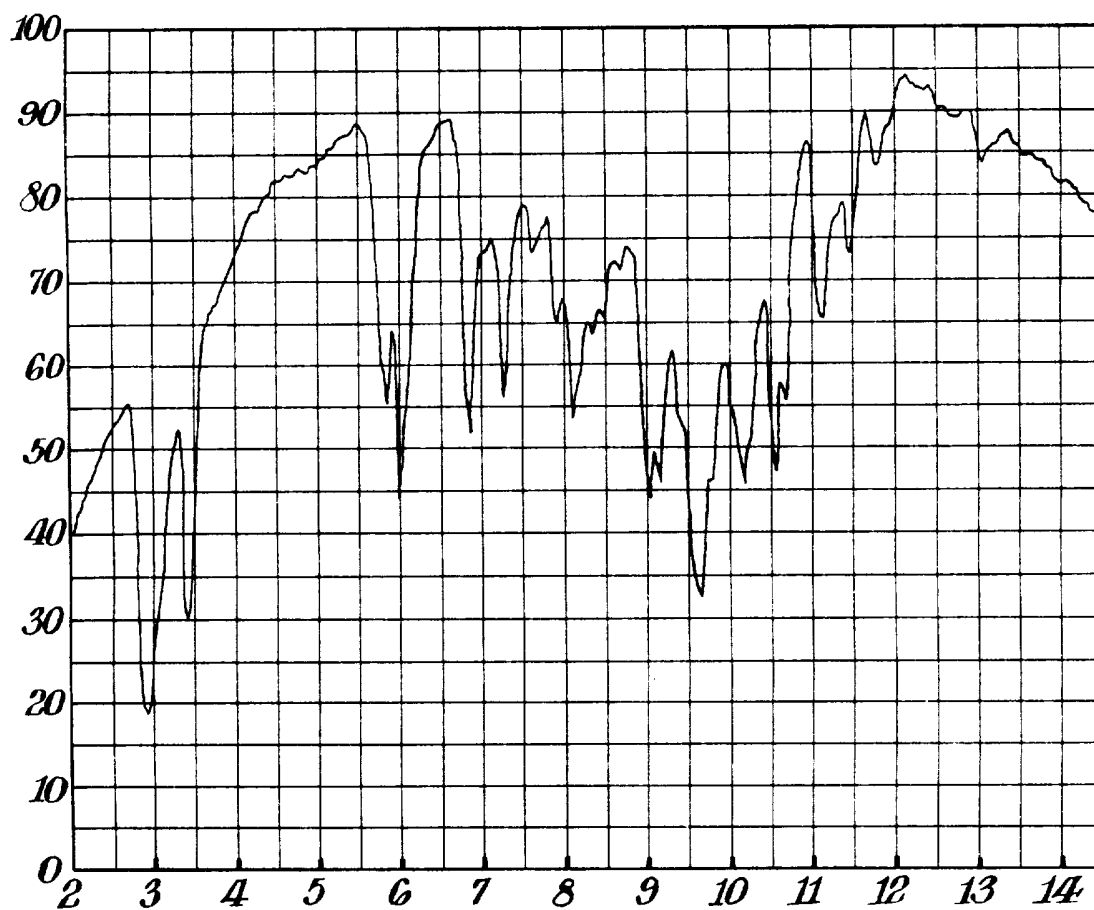
*Fig. 1.*

Polyeetteriantibioottiyhdisteen 53 607 natrium-  
suolan infrapuna-absorptiokirjo



*Fig. 2.*

Polyeetteriantibioottiyhdisteen 53 607 infrapuna-  
absorptiokirjo



Aallonpituus mikroneissa