



**SUOMI-FINLAND**

(FI)

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

- C (48) Patentti myönnetty  
Patent beviljadt 11 01 1983
- (51) Kv.1k.5 - Int.cl.5  
C 12P 1/06, C 12N 1/20
- (21) Patenttihakemus - Patentansökning 872860
- (22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 29.06.87
- (24) Alkupäivä - Löpdag 29.06.87
- (41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 30.01.88
- (44) Nähtävaksipanon ja kuul.julkaisun pvm. -  
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 30.09.92
- (32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet  
29.07.86 GB 8618445 P

(71) Hakija - Sökande

1. Gruppo Lepetit S.p.A., 23, Via Murat, 20159 Milano, Italia, (IT)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Riva, Ernesto, 119, Corso di Porta Romana, 20122 Milano, Italia, (IT)
2. Selva, Enrico, 35, Via Carlo Cantoni, 27027 Gropello Cairoli Pavia, Italia, (IT)
3. Denaro, Maurizio, 41, Viale Bligny, 20136 Milano, Italia, (IT)
4. Cassani, Giovanni, 3, Via Vittadini, 27100 Pavia, Italia, (IT)
5. Parenti, Francesco, 24, Via Benvenuto Cellini, 20020 Lainate (Milano), Italia, (IT)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä antibiootin A 42867 ja sen additiosuolojen valmistamiseksi  
Förfarande för framställning av antibiotikum A 42867 och dess additionssalter**

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: 53492 ATCC

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

US A 3067099 (424-115), US A 2990329 (424-124), US A 4558009 (C 12P 19/60)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Tämä keksintö koskee uutta antibiootti A 42867:ää, jota valmistetaan viljelemällä kantaa *Nocardia* sp. ATCC 53492 tai sen antibiootti A 42867:ää tuottavaa mutanttia tai muunnosta, submerssisissa, aerobisissa oloissa assimiloituvien hiili-, typpilähteiden ja epäorgaanisten suolojen läsnäollessa. Antibiootti ja sen additiosuolat ovat käyttökelpoisia hoidettaessa infektiosairauksia ja kasvua edistävinä aineina.

Denna uppfinning avser ett nytt antibiotikum A 42867, som framställes genom odling av stammen *Nocardia* sp. ATCC 53492 eller dess antibiotikum A 42867 producerande mutant eller variant, under genomdränkt, aerobiska förhållanden i närvaro av assimilerbara kol-, kvävekällor och av oorganiska salter. Antibiotikumet och dess additionsalter är användbara för vårdning av infektionsjukdomar och som växt befordrande ämnen.

Menetelmä antibiootin A 42867 ja sen additiosuolojen valmistamiseksi

Tämä keksintö koskee menetelmää uuden antibiootin, jota merkitään antibiootti A 42867 ja sen additiosuolojen valmistamiseksi. Uutta antibioottia ja sen farmaseuttisia koostumuksia voidaan käyttää lääkkeinä, erityisesti niille herkkien mikro-organismien aiheuttamien infektiosairauksien hoidossa.

Keksinnön mukaiset yhdisteet ovat myös aktiivisia kasvua edistävinä aineina eläimillä, kuten siipikarjalla, sioilla, märehijöillä, jne.

10 Erityisesti keksinnön kohteena on menetelmä antibiootti A 42867:n valmistamiseksi, jossa menetelmässä viljellään uutta kantaa *Nocardia* sp. ATCC 53492 tai sen antibioottia A 42867 tuottavaa muunnosta tai mutanttia.

15 *Nocardia* sp. ATCC 53492 on eristetty maanäytteestä ja tallennettu 23. toukokuuta 1986 kokoelmaan American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, 20852 Maryland, USA, Budapestin sopimuksen sopimusehtojen mukaisesti. Kannalle on annettu liittymisnumero ATCC 53492.

20 Koska antibiootti A 42867:n ja vastaavien farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen antimikrobiset aktiivisuudet ovat hyvin samankaltaiset, tässä keksinnössä käsiteltäessä antibiootti A 42867:n biologisia ominaisuuksia tarkoitetaan myös vastaavia suoloja, ja päinvastoin, käsiteltäessä antibiootti A 42867:n farmaseuttisesti hyväksyttävän additiosuolan biologia ominaisuuksia tarkoitetaan myös vastaavaa "ei-additiosuola"-muotoa.

30 Antibiootti A 42867:n tuotanto aikaansaadaan viljelemällä kantaa *Nocardia* sp., joka pystyy tuottamaan sitä, t.s. kantaa *Nocardia* sp. ATCC 53492 tai sen antibioottia A 42867 tuottavaa muunnosta tai mutanttia, aerobisissa olosuhteissa, vesipitoisessa ravintoalustassa, joka sisältää assi-

miloituvat hiili-, typpilähteet ja epäorgaanisia suoloja. Monia ravintoalustoja, joita tavallisesti käytetään fermentoitaessa, voidaan käyttää, kuitenkin tietyt kasvualustat ovat edullisia. Edullisia hiililähteitä ovat glukoo-  
5 mannoosi, galaktoosi, tärkkelys, maissijauho ja vastaavat. Edullisia typpilähteitä ovat ammoniakki, nitraatit, soijapapujauho, peptoni, lihauute, hiivauute, tryptoni, aminohapot ja vastaavat. Epäorgaanisia suoloja, joita voidaan lisätä kasvualustoihin, ovat tavanomaiset liukoiset suo-  
10 lat, jotka pystyvät muodostamaan natrium-, kalium-, rauta-, sinkki-, koboltti-, magnesium-, kalsium-, ammonium-, kloridi-, karbonaatti-, sulfaatti-, fosfaatti-, nitraatti-ioneja ja vastaavia.

Tavallisesti antibioottia tuottavaa kantaa esiviljellään ravistuspullossa, sen jälkeen viljelmää käytetään ympä-  
15 täessä käymisfermentorit oleellisten määrien antibioottia tuottamiseksi. Esikasvatukseen käytetty kasvualusta voi olla sama kuin mitä käytetään suuremmissa fermentoreissa, mutta myös muita kasvualustoja voidaan käyttää. Antibioot-  
20 tia A 42867 tuottava kanta voi kasvaa lämpötiloissa, jotka ovat 20<sup>o</sup>C - 40<sup>o</sup>C, mieluummin 24-35<sup>o</sup>C.

Fermentoinnin kuluessa antibioottituotantoa voidaan seura-  
ta testaamalla kasvuliemen ja myseelin uutenäytteistä an-  
25 bioottinen aktiivisuus esimerkiksi kasvukokeilla tai TLC- tai HPLC-menetelmillä.

Antibiootti A 42867:lle herkkiä organismeja, kuten kanto-  
ja Bacillus subtilis ja S.aureus, voidaan käyttää testi-  
organismeina. Kasvukoe suoritetaan edullisesti agar-dif-  
fuusiomenetelmällä agarlevyillä. Antibioottisen aktiivi-  
30 suuden maksimituotanto tapahtuu tavallisesti fermentoinnin toisen ja viidennen päivän välisenä aikana.

Antibiootti A 42867:ää tuotetaan viljelemällä kantaa Nocardia sp. ATCC 53492 tai sen antibioottia A 42867

tuottavaa mutanttia tai muunnosta, ja antibiootti on pääasiassa löydettävissä kasvatusliemistä.

Kannan Nocardia sp. ATCC 53492 morfologiset ominaisuudet

5 Tämän kannan morfologia kasvatettuna maa-agarkasvualustalla on samanlainen kuin aktinomykeeteillä osoittaen runsasta ilmamyseelin kehittymistä, jossa pitkät hyyfit kohtalaisen haarautuneina. Tämän kannan pääasiallinen morfologinen tunnusmerkki on substraatti- ja ilmamyseelin pilkkoutuminen tankomaisiksi kappaleiksi. Substraattimyseelin pilkkoutuminen havaittiin kaikilla agarkasvualustoilla, joita käytettiin viljelytunnusmerkkien määrittämiseksi, 10 paitsi kasvualustalla No 5, kasvualustalla No 7, Hickey-Tresner- ja munavalkuaisagareilla todettiin täydellinen pilkkoutuminen.

15 Kannan Nocardia sp. ATCC 53492 substraattihyyfit kehittyivät täysin, haarautuminen ja pilkkoutuminen tankomaisiksi kappaleiksi riippuen viljelmän iästä.

Ilmamyseeli kehittyi hyvin maa-agarilla ja vesiagarilla. Ilmahyyfit olivat pitkiä suoria maa-agarilla, muodostaen 20 joskus solmuja tai pesämäisiä tiheikköjä. Tämän kannan morfologia muistuttaa Nocardia-suvun morfologiaa.

Tämän kannan morfologinen karakterisointi suoritettiin samoilla levyillä, joita käytettiin viljelyominaisuuksien tutkimiseen. Sen seikan varmentamiseksi, oliko agarlevyillä tapahtunut pilkkoutumista, kasvualustan pintaa leikattiin muoviveitsellä ja näyte tutkittiin lasilevyllä optisella mikroskoopilla. Nestemäisessä viljelmässä tällä kannalla havaittiin laaja pilkkoutuminen sauvamaisiksi kappaleiksi. 25

Kannan Nocardia sp. ATCC 53492 viljelytunnusmerkit

Viljelytunnusmerkkien tutkimiseksi kantaa Nocardia sp. ATCC 53492 viljeltiin erilaisilla standardikasvualustoilla, joita Shirling ja Gottlieb ovat esittäneet (Shirling  
 5 E.B. and Gottlieb D., 1966 - Method for characterization of Streptomyces species - Int. J. Syst. Bacteriol, 16, 313-340), sekä lisäksi useilla kasvualustoilla, joita Waksman suosittelee (Waksman, S.A. 1961 - The Actinomyces - The Williams and Wilkins Co. Baltimore; Vol. 2,  
 10 328-334).

Väriin määrittäminen suoritettiin tarvittaessa menetelmällä, jonka ovat esittäneet Maerz ja Paul (Maerz A. and M. Rea Paul, 1950 - A Dictionary of Color -2nd Edition McGraw - Hill Book Company Inc., New York)

15 Organismien kykyä käyttää hyväkseen erilaisia hiililähteitä tutkittiin menetelmällä, jonka ovat kuvanneet Shirling ja Gottlieb.

Viljely- ja fysiologiset tunnusmerkit ja hiililähteiden hyväksikäyttö on esitetty Taulukoissa I, II, III, IV ja  
 20 V.

Taulukossa I esitetyt lukemat on saatu kahden viikon inkuboinnin jälkeen 28<sup>0</sup>C:ssa.

TAULUKKO I

KANNAN NOCARDIA sp. ATCC 53492 VILJELYTUNNUSMERKIT

25	Viljelyalusta	Tunnusmerkit
	Kasvualusta No 2 (hiivauute-mallasagar)	runsasta kasvua, rypistynyt pinta, väri ruskea 15/H/11, liukeneva pigmentti keltainen
30	Kasvualusta No 3 (kaurajauhoagar)	kohtuullista kasvua, pehmeä pinta, väri oranssi 12/L/12, jälkiä ilmamyseelistä valkoinen

## TAULUKKO I (jatk.)

	Viljelyalusta	Tunnusmerkit
5	Kasvualusta No 4 (epäorgaanisia suoloja- tärkkelysagar)	runsasta kasvua, rypistynyt pin- ta, väri tummaoranssi 13/L/12, jälkiä ilmamyseelistä valkoinen, jälkiä liukenevasta pigmentistä, väri roosa
10	Kasvualusta No 5 (glyseroli-asparagiini- agar)	runsasta kasvua, rypistynyt pin- ta, väri tummaoranssi 13/L/12, jälkiä ilmamyseelistä valkoinen
	Kasvualusta No 6 (peptoni-hiivauute- rauta-agar)	kohtuullista kasvua, pinta hiu- kan rypistynyt, väri aprikoosi 10/F/7
15	Kasvualusta No 7 (tyrosiiniagar)	runsasta kasvua, pinta rypisty- nyt, väri ruskea 15/H/11, jälkiä ilmamyseelistä valkoinen
	Czapek-sakkaroosiagar	runsasta kasvua, pinta pehmeä, väri keltainen-oranssi 9/G/8, jälkiä ilmamyseelistä
20	Kaurajauhoagar	runsasta kasvua, pinta hiukan rypistynyt, väri oranssi 12/F/10, jälkiä ilmamyseelistä valkoinen, jälkiä liukenevasta pigmentistä roosa
25	Hickey'n ja Tresner'n agar	runsasta kasvua, pinta rypistynyt, väri kultainen 9/I/6
	Kalsium-malaatti agar	runsasta kasvua, pinta pehmeä, väri vaaleankeltainen 10/C/4, jälkiä ilmamyseelistä valkoinen
30	Bennett'n agar	runsasta kasvua, pinta rypisty- nyt, väri ruskea 15/H/11
	Czapek-glukoosiagar	runsasta kasvua, pinta rypisty- nyt, väri ruskea, 7/E/12, jälkiä ilmamyseelistä valkoinen, liuke- neva pigmentti tummankeltainen
35	Glukoosi-asparagiini- agar	kohtuullista kasvua, pinta hiu- kan kova, väri keltainen 10/L/5
	Ravintoagar	runsasta kasvua, pinta pehmeä, väri keltainen-oranssi 9/G/6

## TAULUKKO I (jatk.)

Viljelyalusta	Tunnusmerkit
5 Kuorittumaitoagar	runsasta kasvua, pinta pehmeä, persikan värinen 9/I/5, jälkiä ilmamyseelistä valkoinen
Munanvalkuaisagar	kohtuullista kasvua, pinta pehmeä, väritön, jälkiä ilmamyseelistä
10 Sabouraud-agar	runsasta kasvua, pinta rypistynyt, väri ruskea 10/L/10
Peruna-agar	runsasta kasvua, pinta rypistynyt, väri keltainen 10/L/7, jälkiä ilmamyseelistä valkoinen, liukeneva pigmentti roosa
15 Vesiagar	hyvin niukkaa kasvua, pinta pehmeä, väritön, hyvin muodostuvaa ilmamyseeliä valkoinen
20 Maa-agar	kohtuullista kasvua, pinta pehmeä, väritön, runsasta ilmamyseelin muodostumista
Dekstroosi-tryptoniagar	runsasta kasvua, pinta rypistynyt, väri keltainen 10/L/7

Kirjaimet ja numerot viittaavat värin määrittämiseen Maerzin ja Paulin (2) mukaan.

## TAULUKKO II

KANNAN NOCARDIA sp. ATCC 53492 FYSILOGISET  
TUNNUSMERKIT

	<u>Kokeet</u>	<u>Tulokset</u>
5	Tärkkelyshydrolyysi	positiivinen
	Tyrosiinireaktio	positiivinen
	Kaseiinihydrolyysi	positiivinen
	Kalsium-malaatin liu- koiseksi tekeminen	negatiivinen
10	Nitriitti nitraatista	negatiivinen
	Selluloosan hajottaminen	negatiivinen
	Rikkivedyn muodostus	positiivinen lyijyasetaatti- liuskoilla
15	Lakmusmaito {	positiivinen
	peptonisaatio	
	koagulaatio	negatiivinen



TAULUKKO III  
LÄMPÖTILA-TOLERANSSI

5	15 <sup>0</sup> C	=	-
	22 <sup>0</sup> C	=	+
	28 <sup>0</sup> C	=	++
	37 <sup>0</sup> C	=	++
	42 <sup>0</sup> C	=	+
	50 <sup>0</sup> C	=	-

10 Kaikkein sopivin lämpötila pesäkkeiden kehittymiselle havaittiin olevan alue noin 22<sup>0</sup>C:sta noin 42<sup>0</sup>C:seen. Optimilämpötila on 28<sup>0</sup>C:sta 37<sup>0</sup>C:seen.

TAULUKKO IV  
pH-TOLERANSSI

15	pH 3	=	-
	pH 4	=	-
	pH 5	=	++
	pH 6	=	++
	pH 7	=	++
	pH 8	=	++
20	pH 9	=	++
	pH 10	=	-
	pH 11	=	-

- = ei kasvua

+ = kohtuullista kasvua

25 ++ = runsasta kasvua

Fysiologisten tunnusmerkkien, pH- ja lämpötilatoleranssi-kokeiden suorittamiseksi käytettiin Hickey'n ja Tresner'in agarkasvualustaa.

TAULUKKO V  
HIILEN HYVÄKSIKÄYTTÖ

	<u>Hiililähde</u>	<u>Kasvu</u>
	Laktoosi	++
5	Arabinoosi	++
	Ksyloosi	++
	Mannoosi	++
	Fruktoosi	++
	Sellobioosi	++
10	Galaktoosi	++
	Inositoli	++
	Glukoosi	++
	Raffinoosi	-
	Riboosi	++
15	Sakkaroosi	-
	Salisiini	+
	Selluloosa	-
	Ramnoosi	-

- = ei kasvua

10 + = kohtuullista kasvua

++ = runsasta kasvua

Tähän kokeeseen käytettiin kasvualustaa No 8 ja tulokset luettiin sen jälkeen kun oli inkuboitu 10 päivää 28<sup>0</sup>C - 30<sup>0</sup>C:ssa.

## KEMOTAKSONOMISET TUTKIMUKSET

5 Kantaa viljeltiin V-6 kasvualustassa (lihautetta 0,5 %, autolysoitua hiivaa 0,5 %, peptonia 0,5 %, hydrolysoitua kaseiinia 0,3 %, glukoosia 2 %, NaCl:ää 0,15 %) inkuboiden kiertoravistelijassa 200 kierr./min. 30<sup>0</sup>C:ssa 72 tun-  
10 tia. V-6 kasvualustassa kasvanut myseeli otettiin talteen sentrifugoimalla (3000 kierr./min. x 10 minuuttia) ja pestiin kaksi kertaa tislattulla vedellä. Myseeli pestiin edelleen etanolilla, jonka jälkeen kuivattiin huoneen lämpötilassa laminaarisessa virtauksessa.

Kuivattua myseeliä käytettiin kokosoluvalmisteena.

## AMINOHAPPOJEN ANALYYSI:

15 Aminohappojen analysointi, joka suoritettiin menetelmällä, jonka ovat esittäneet Becker et al., ("Rapid differentiation between Nocardia and Streptomyces by paper chromatography of whole cell hydrolysates", Appl. Microbiol. 12, 421-423 (1964)), osoitti, että läsnä oli meso-diaminopimeliinihappoja.

## SOKERIANALYYSI:

20 Sokeripitoisuuden analyysi, joka suoritettiin menetelmällä, jonka ovat esittäneet M.P. Lechevalier ("Identification of aerobic actinomycetes of clinical importance", J. Lab. Clin. Med. 71, 934-944 (1968)), käyttäen ohutkerroskromatografiassa kalvoja, kuten ovat esittäneet J.L. Staneck ja G.D. Roberts ("Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography", 28, 226-231 1971)), osoitti, että läsnä oli arabinoosia ja galaktoosia.

## KANNAN NOCARDIA sp. ATCC 53492 IDENTIFIINTI

Meso-diaminopimeliinihappojen esiintyminen yhdessä tunnussokereiden, kuten galaktoosin ja arabinoosin kanssa, osoittaa, että tämä kanta on aktinomycetes, jonka soluseinätyyppi on IV, luokituksen mukaan, jonka ovat esittä-

5 neet Lechevalier M.P. ja H. Lechevalier ("Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes", Int. Journ. Syst. Bacteriol. 20, 435-443 (1970)).

Kuten on laita muilla mikro-organismeilla, antibioottia A 42867 tuottavan kannan tunnusmerkit ovat alttiina muutokselle. Esimerkiksi kannan keinotekoiset muunnokset ja mutantit voidaan saada käsittelemällä erilaisilla, tunnetuilla mutageeneilla, kuten UV-säteillä, röntgensäteillä,

10 suurtaajuusaalloilla, radioaktiivisilla säteillä ja kemikaaleilla, kuten typpihapolla, N-metyyli-N'-nitro-N-nitrosoguanidiinilla ja monilla muilla. Kaikkia luonnollisia ja keinotekoisia muunnoksia ja mutanteja, jotka kuuluvat

15 Nocardia-suvun lajeihin ja tuottavat A 42867 antibiootteja, pidetään ekvivalentteina kannan Nocardia sp. ATCC 53492 suhteen ja katsotaan kuuluvaksi tämän keksinnön piiriin.

Antibioottien A 42867 talteenotto tuottavan mikro-organismin käymisliemistä tapahtuu sinänsä tunnettujen menetelmien mukaisesti, jolloin suoritetaan uutto liuottimilla, saostaminen lisäämällä ei-liuottimia tai muuttamalla liuoksen pH-arvoa, jakaantumiskromatografia, käänteis-faasinen-jakaantumiskromatografia, ioninvaihtokromatografia, affiniteettikromatografia ja vastaavat toimenpiteet.

20

25

Edullisessa menetelmässä käytetään affiniteettikromatografiaa immobilisoidulla D-alanyyli-D-alaniinilla, jonka jälkeen seuraa käänteisfaasinen pylväskromatografia.

30

Immobilisoituja D-alanyyli-D-alaniini-matriiseja, jotka ovat sopivia tähän talteenottomenetelmään, on esitetty eurooppalaisessa patenttihakemuksessa No 83112555. Edullinen matriisi tässä menetelmässä on D-alanyyli-D-alaniini kytkettynä tasahuokoiseen ristiinkytettyyn polydekstraaniiin.

Sen jälkeen suodatetuille käymisliemille suoritetaan affiniteettikromatografia immobilisoidulla D-alanyyli-D-alaniinilla joko pylväässä tai panoksittain.

10 Antibiootti A 42867:n sitoutuminen affiniteettimatriisiin tapahtuu mieluummin pH:ssa noin 7,0 - 8,0 ja sen eluointi suoritetaan emäksisemmillä pH-arvoilla (mieluummin välillä 9,0 - 11,5) vesipitoisella emäksellä. Tämä vesipitoi-

15 nen emäs voi olla ammoniakki, haihtuva amiini, alkali- tai alkalimetallihydroksidi tai emäksinen, puskuroitu liuos mahdollisesti polaarisen orgaanisen liuottimen, kuten polaarisen veteensekoittuvan liuottimen, joita jäljempänä määritellään, läsnäollessa.

Sen jälkeen, kun epäpuhtaudet on poistettu huuhtomalla pylväs vesipitoisella puskurilla, jonka pH on 4-8 ja joka mahdollisesti sisältää suoloja, karbamideja ja/tai veteen sekoittuvia liuottimia, antibiootti A 42867 eluoidaan edellä esitetyllä eluointiseoksella. Sen jälkeen raaka antibiootti otetaan talteen mieluummin poistamalla vesi täysin yhdistetyistä antibioottia sisältävistä fraktioista tislamalla atseotrooppisesti yhdessä orgaanisen liuottimen kanssa, joka pystyy muodostamaan veden kanssa atseotrooppisia minimiseoksia, jonka jälkeen, lisäämällä ei-liuotinta, saostetaan toivottu tuote.

30 Tyypillisiä esimerkkejä orgaanisista liuottimista, jotka pystyvät muodostamaan atseotrooppisia minimiseoksia veden kanssa, ovat n-butanoli, bentseeni, tolueeni, butyyliete-

teri, hiilitetrakloridi, kloroformi, sykloheksaani,

2,5-dimetyylifuraani, heksaani ja m-ksyleeni; edullinen liuotin on n-butanoli.

5 Esimerkkejä ei-liuottimista ovat petrolieetteri, alempialkyylieetterit, kuten etyyliieetteri, propyyliieetteri ja butyyliieetteri ja alempialkyyliketoni, kuten asetoni.

10 Vaihtoehtoisesti yhdistetyt antibioottia sisältävät fraktiot konsentroidaan pieneen tilavuuteen, mieluummin tislamalla atseotrooppisesti edellä määritellyn orgaanisen liuottimen kanssa ja muodostunut vesipitoinen liuos lyofilisoidaan.

Jos eluointiin käytetty vesipitoinen emäs on haihtumaton, voi olla tarpeen suorittaa neutralointi ja suolan poistaminen konsentraatista ennen saostamista tai pakastuskuivausta.

15 Sopiva suolanpoistomenetelmä käsittää antibioottia sisältävän vesipitoisen liuoksen valuttamisen läpi silanoidusta piihappogeelipylvästä, joka pestään tislattulla vedellä ja eluoidaan polaarisen veteen sekoittuvan liuottimen ja veden seoksella.

20 Tyypillisiä esimerkkejä polaarisisista, veteen sekoittuvista liuottimista ovat vesiliukoiset alkoholit (kuten metanoli, etanoli, isopropanoli, n-butanoli), asetoni, asetonitriili, alempialkyylialkanoaatit (kuten etyyliasetatti), tetrahydrofuraani, dioksaani ja dimetyyliformamidi ja näiden seokset; edullinen polaarinen, veteen sekoittuva liuotin on asetonitriili.

25  
30 Vaihtoehtoisesti suolan poistaminen voidaan suorittaa käyttäen antibioottia sisältävälle liuokselle edellä kuvattua affiniteettipylvästä, joka pestään tislattulla vedellä ja eluoidaan haihtuvalla, vesipitoisella emäksellä, kuten edellä esitettiin affiniteettikromatografian eluinnin yhteydessä.

Näin saatu tuote on antibiootti A 42867. Sopiva menetelmä puhtaan antibiootti A 42867:n saamiseksi on sellainen, jossa edellä saatu antibiootti puhdistetaan edelleen affiniteettikromatografiapylväässä. Tavallisesti käytetään samaa stationäärifaasia (immobilisoitu D-alanyyli-D-alaniini) ja toivottu antibiootti eluoidaan edellä kuvatun affiniteettikromatografia-menetelmän mukaisesti immobilisoidulla D-alanyyli-D-alaniinilla.

Edullinen immobilisoitu D-alanyyli-D-alaniini on Sepharose- $\xi$ -aminokaproyyli-D-alanyyli-D-alaniini, edullinen tasapainoitusseos on 0,16 %:inen (paino/til.) ammoniakki, joka sisältää 2 M NaCl:ää, pH säädettyinä arvoon 7 - 8, edullinen huuhtelios on 0,16 %:inen (paino/til.) ammoniakki, joka sisältää 2M natriumkloridia, pH säädettyinä arvoon 7 - 8, edullinen eluointiseos on 16 %:inen (paino/til.) ammoniakki.

Vaihtoehtoisesti keksinnön mukainen antibiootti voidaan eristää käymisliemestä tai se voidaan edelleen puhdistaa vahvojen tai heikkojen anionihartsien avulla, mukaanluettuna funktionalisoidut polystyreeni-, akryyli- tai polydeks-traanimatriisit. Esimerkkejä heikoista anioninvaihtohartseista ovat sellaiset, joita myydään seuraavilla kauppanimillä: Dowex MWA-1 tai WGR (Dow Chemical), Amberlite IRA-73 (Rohm and Haas), DEAE-Sephadex (Pharmacia). Esimerkkejä vahvoista anioninvaihtohartseista, joita voidaan käyttää keksinnön mukaisesti, ovat sellaiset, joita myydään seuraavilla kauppanimillä: Dowex MSA-1, SBR, SBR-P (Dow Chemical), Amberlite IR-904 (Rohm and Haas) ja QAE-Sephadex (Pharmacia).

Antibiootti A 42867:n eluointi näistä hartseista suoritetaan elektrolyyttien, kuten natrium- tai kaliumhydrokloridien vesipitoisen liuoksen lineaaristen gradienttiseoksien avulla vedessä tai veden ja orgaanisen veteensekoittuvan liuottimen, kuten alempiä alkoholin (esim. (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkanolin) tai alempiä alkyyliketonein (esim. asetonin, metyylietyylketonin jne) seoksissa.

## ANTIBIOOTTI A 42867:n FYSIKO-KEMIAALLISET TUNNUSMERKIT

A) ultraviolettiaabsorptiospektri, joka on esitetty liitteenä olevien piirustusten Kuviossa 1 ja jossa on seuraavat absorptiomaksimit:

		$\lambda_{\text{maks}}$ (nm)
5	a) 0,1 N HCl	282
	b) vesi	282
	c) fosfaattipuskuri pH 7,4	282
	d) fosfaattipuskuri pH 9	282
		305 (olka)
10	e) 0,1 N NaOH	305
		265 (olka)

B) infrapuna-absorptiospektri, joka on esitetty liitteenä olevien piirustusten Kuviossa 2 ja jossa on seuraavat absorptiomaksimit ( $\text{cm}^{-1}$ ):

15 3700-3100, 3000-2800 (nujoli); 1650; 1580; 1460 (nujoli)  
1375 (nujoli); 1300; 1235; 1210; 1160; 1130; 1060; 1025;  
1000; 970; 840; 790-700; 720 (nujoli)

C)  $^1\text{H}$ -NMR-spektri, joka on esitetty Kuviossa 3 ja jossa on seuraavat signaaliryhmä (ppm:ssä) 270 MHz, rekisteröity DMSO  $d_6$ :ssa (heksadeuterodimetyylisulfoksidi) sisäisenä standardina käytettiin TMS:ää (0,00 ppm), ( $\delta$  = ppm):

0,90, d  $[(\text{CH}_3)_2-(\text{CH})]$ ; 1,02, d  $[\text{CH}_3-(\text{CH})]$ ; 1,23, d  $[\text{CH}_3-(\text{CH})]$ ; 1,52, s  $[\text{CH}_3-\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}]$ ; 1,77, m  $[\text{CH}(\text{CH}_3)_2]$ ; 2,38, s (N- $\text{CH}_3$ ); 3,0-6,35, s ja m (aromaattiset sokeri- ja peptidiset CH:t); 6,27-9,29 (aromaattiset CH:t, peptidiset NH:t ja fenoliset OH:t)

d = dupletti

s = singletti

m = multiplletti



D) retentioaika ( $R_t$ ) = 0,537 suhteessa vankomysiini.  
HCl:ään (Vancocin, Eli Lilly,  $R_t$  = 16,36 min) analysoi-  
taessa käänteisfaasi-HPLC:llä seuraavissa olosuhteissa:

5 kolonni: Ultrasphere ODS (5  $\mu$ m) Altex (Beckman)  
4,6 mm (sisähalkaisija) x 250 mm

esikolonni: Brownlee Labs RP 18 (5  $\mu$ m)

eluentti: vesi:asetonitriili:2-etanoliamiini:  
trifluorietikkahappo 9:1:0,01:0,01  
(til./til.)

10 virtausnopeus: 1,6 ml/min

UV-detektori: 254 nm

sisäinen standardi: vankomysiini.HCl ( $R_t$  = 16,36 min)  
(Vancocin, Eli Lilly)

15 E) retentioaika ( $R_t$ ) = 0,665 suhteessa vankomysiini.  
HCl:ään (Vancocin, Eli Lilly,  $R_t$  = 9,96 min) analysoitaes-  
sa käänteisfaasi-HPLC:llä seuraavissa olosuhteissa:

kolonni: Ultrasphere ODS (5  $\mu$ m) Altex (Beckman)  
4,6 mm (sisähalkaisija) x 250 mm

esikolonni Brownlee Labs RP 18 (5  $\mu$ m)

20 eluentti A:  $\text{CH}_3\text{CN}$  2% } säädetty pH-  
(2,5 g/l)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  98% } arvoon 6,0

eluentti B:  $\text{CH}_3\text{CN}$  70% } säädetty pH-  
(2,5 g/l)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  30% } arvoon 6,0

25 eluointi: lineaarinen gradientti 5 %:sta  
60 %:iin eluenttia B eluenttissa A,  
40 minuutissa

virtausnopeus: 1,6 ml/min

UV-detektorit: 254 nm

sisäinen standardi: vankomysiini-HCl ( $R_t = 9,96$ )  
(Vancocin, Eli Lilly)

5 F) alkuaineanalyysi, sen jälkeen kun näytettä on ensin kuivattu  $140^{\circ}\text{C}$ :ssa inerttikaasuatmosfäärissä, antaa tulokseksi seuraavan likimääräisen prosentuaalisen koostumuksen (keskiarvo): hiiltä 53,3 %; vetyä 5,9 %; typpeä 7,85 %; klooria (kokonais) 4,41 %; klooria (ioneja) 2,22 %; epäorgaaninen jäännös  $900^{\circ}\text{C}$ :ssa ilmassa: 0,875 %

10 G) happo-emästitrauskäyrällä vedessä, titrattaessa 0,05 N vesipitoisella KOH:lla näyte, johon on etukäteen lisätty ylimäärin vesipitoista HCl:tä, esiintyy pKa-arvot 3,2, 7,1 ja 8,3

H)  $R_f$ -arvo 0,56 seuraavassa kromatografiasysteemissä:  
15 (vesipitoinen natriumkloridi 87,5 g/l:  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g/l) 70 % } pH säädetty  
CH<sub>3</sub>CN 30 % } arvoon 6

käytetään käänteisfaasisia silanoituja piihappogeeli-levyjä (RA-18 F<sub>254</sub>)

20 näkyväksi tekeminen:

- UV-valo 254 nm
- keltainen väri Pauly-reagenssilla, t.s. diatsotoidulla sulfaniliinihapolla (J. Chromatog. 20, 171 (1965), Z. Physiol. Chem. 292, 99, (1953))
- 25 - bioautografiassa käytetään B.subtilis ATCC 6633:a Davisin minimialustalla

I) molekyylipaino noin 1559 arvioituna FAB-massaspekt-ristä, jossa  $M+H^+$  -piikki 1560.

Antibiootti A 42867 sisältää happamia ja emäksisiä funktioita ja lisäksi muodostaa sisäisiä suoloja, sopivissa pH-oloissa se voi muodostaa suoloja orgaanisten ja epäorgaanisten vastaionien kanssa tavanomaisten menetelmien mukaisesti.

Tyypillisiä ja sopivia keksinnön mukaisten yhdisteiden happoadditiosuoloja ovat sellaiset suolat, jotka muodostetaan standardireaktiolla sekä orgaanisten että epäorgaanisten happojen, kuten esimerkiksi kloorivety-, bromivety-, rikki-, fosfori-, etikka-, trifluorietikka-, trikloorietikka-, meripihka-, sitruuna-, askorbiini-, maito-, omena-, fumaari-, palmitiini-, kooli-, pamoe-, lima-, glutamiini-, kamferi-, glutaari-, glykoli-, ftaali-, viini-, lauriini-, steariini-, salisyyli-, metaanisulfony-, bentseenisulfony-, sorbiini-, pikriini-, bentsoe-, kanelihapon ja vastaavien kanssa.

Tyypillisiä esimerkkejä emäksistä ovat: alkalimetalli- tai maa-alkalimetallihydroksidi, kuten natrium-, kalium-, kalsium-, magnesium-, bariumhydroksidi; ammoniakki ja alifaattiset, alisykliset tai aromaattiset, orgaaniset amiinit, kuten metyyliamiini, dimetyyliamiini, trimetyyliamiini ja pikoliini.

Keksinnön mukaisten "ei-suola" yhdisteiden muuttaminen vastaaviksi additiosuoloiksi ja päinvastoin, t.s. keksinnön mukaisen yhdisteen additiosuolan muuttaminen ei-suolamuotoon, ovat alan ammattimiehen suoritettavissa ja kuuluvat tämän keksinnön piiriin.

Esimerkiksi antibiootti A 42867 voidaan muuttaa vastaavaksi happoadditiosuolaksi liuottamalla ei-suolamuoto vesipitoiseen liuottimeen ja lisäämällä pieni ylimäärä valittua happoa tai emästä. Sen jälkeen muodostunut liuos tai suspensio lyofilisoidaan toivotun suolan talteenottamiseksi.

Siinä tapauksessa, että lopullinen suola on liukenematon liuottimeen, johon ei-suolamuoto liukenee, se saadaan talteen suodattamalla ei-suolamuodon orgaanisesta liuoksesta, sen jälkeen kun stökiometrinen määrä tai pieni ylimäärä valittua happoa tai emästä on lisätty.

Ei-suolamuoto voidaan valmistaa vastaavasta happo- tai emässuolasta liuottamalla vesipitoiseen liuottimeen, joka sen jälkeen neutraloidaan vapaaksi ei-suolamuodoksi.

Kun neutralointia seuraava ylimääräisen hapon tai emäksen poistaminen on tarpeen, voidaan käyttää tavallista suolanpoistomenetelmää.

Esimerkiksi pylväskromatografiaa silanoidulla piihappogee-  
lillä, ei-funktionalisoidulla polystyreeni-, akryyli- ja  
tasahuokoisilla polydekstraanihartseilla (kuten Sephadex  
LH 20) tai voidaan edullisesti käyttää aktivoitua hiiltä.  
Sen jälkeen kun ei-toivotut suolat on eluoitu vesipitoi-  
sella liuoksella, toivottu tuote eluoidaan lineaarisella  
gradientilla tai veden ja polaarisen tai apolaarisen liuot-  
timen seoksen vaihegradientilla, kuten asetonitriili/vesi  
50:50 - noin 100 %:iin asetonitriiliä.

Kuten on tunnettua suolan muodostusta joko farmaseutti-  
sesti hyväksyttävien happojen (tai emästen) tai ei-farma-  
seuttisesti hyväksyttävien happojen (tai emästen) kanssa  
voidaan käyttää sopivana puhdistusmenetelmänä. Muodosta-  
misen ja eristämisen jälkeen antibiootti A 42867:n suola-  
muoto voidaan muuttaa vastaavaksi ei-suolamuodoksi tai  
farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi.

Eräissä tapauksissa antibiootti A 42867:n emäsadditio-  
suola on liukenevampi veteen ja hydrofiilisiin liuotti-  
miin.

Keksinnön mukaisten yhdisteiden antibakteerinen aktiivisuus voidaan todeta in vitro standardilaimennustestien avulla erilaisilla mikro-organismeilla.

Viljelyolot ja kasvuolot MIC-arvojen (minimaalinen inhibiitio-konsentraatio) määrittämiselle olivat seuraavat:

5 Isosensitest-kasvuliemi (Oxoid), 24 h, stafylokokit, Strep.faecalis ja gram-negatiiviset bakteerit (Escherichia coli); Todd-Hewitt-kasvuliemi (Difco), 24 h, muut streptokokkilajit; GC-peruskasvuliemi (Difco) +

10 1 % Isovitalex (BBL), 48 h, CO<sub>2</sub>-rikastettu atmosfääri Neisseria gonorrhoeae; Brain-Heart-kasvuliemi (Difco) + 1 % Supplement C (Difco), 48 h, Haemophilus influenzae; AC-kasvuliemi (Difco), 24 h, anaerobinen atmosfääri, Clostridium perfringens; Wilkins-Chalgren-agar (viit. T.D.

15 Wilkins & S. Chalgren, 1976, Antimicrob. Ag. Chemother. 10, 926), 48 h, anaerobinen atmosfääri anaeroobeille (C.difficile, Propionibacterium acnes, Bacteroides fragilis); PPLO-kasvuliemi (Difco) + 10 % hevosen seerumia + 1 % glukoosia, 48 h, Mycoplasma gallisepticum; PPLO-kasvuliemi yhdessä lisäysten kanssa, kuten R.T. Evans ja D.

20 Taylor-Robinson ovat esittäneet (J. Antimicrob. Chemother. 4, 57), 24 h, U.urealyticum.

Inkubointi suoritettiin 37<sup>0</sup>C:ssa. Ympäykset olivat seuraavat: M.gallisepticum 1 % (til./til.) 48 tunnin kasvulieviljelmää; noin 10<sup>4</sup> väriä-vaihtavaa yksikköä/ml U.urealyticum; noin 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> pesäkettä muodostavaa yksikköä/ml

25 muissa kasvuliemilaimennoksissa MIC-kokeissa; noin 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> bakteeria/täplä (ympäys monipiste ympäyslaitteella) agar-laimennus-MIC-kokeissa (C.difficile, P.acnes, B.fragilis).

30

Pienimmät estävät konsentraatiot (MIC, µg/l) eräille mikroorganismeille on esitetty seuraavassa Taulukossa VI.

TAULUKKO VI

Kanta	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) antibiootti A 42867
Staph. aureus L165 ( $10^4$ cfu/ml)	0,25
Staph. epidermidis L 147 ATCC 12228 (koagulointi negatiivinen)	1
Strep. pyogenes L49 C203	0,13
Strep. pneumoniae L44 UC41	0,13
Strep. faecalis L149 ATCC 7080	1
Strep. mitis L 796 (kliinisesti eristetty)	0,25
Clostridium perfringens L290 ISS 30543	0,13
Clostridium difficile L1363 ATCC 9689	2
Propionibacterium acnes L1014 ATCC 6919	0,5
Neisseria gonorrhoeae L997 ISM68/126	>128
Haemophilus influenzae type b L 970 ATCC 19418	>128
Proteus vulgaris ATCC 881 L 79	>128
Escherichia coli L47 SKF 12140	>128
P. aeruginosa ATCC 10145 L 4	>128
Candida albicans SKF 2270 L 145	>128
Mycoplasma gallisepticum L431 S6 Weybridge	>128

Antibiootti A 42867 on todettu aktiiviseksi koagulaasi-negatiivisia stafylokokkeja vastaan. MIC-arvot ( $\mu\text{g/ml}$ ) suhteessa *S.epidermidis*- ja *S.haemolyticus*-kantojen kliinisesti eristettyyn sarjaan on esitetty seuraavassa:

5

## TAULUKKO VII

Kanta	Antibiootti A 42867 MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )
-------	---

---

S. epidermidis L 393	1
S. epidermidis L 408	1
10 S. epidermidis L 410	0,5
S. haemolyticus L 381	4
S. haemolyticus L 382	8
S. haemolyticus L 383	1

---

15

Keksinnön mukaisten yhdisteiden antimikrobinen aktiivisuus vahvistettiin myös hiiren kokeellisessa verenmyrkytyksessä (experimental septicemia).

20

Kontrolli- ja käsittelyryhmissä oli 10 CD-1-hiirtä (Charles River) paino 18-22 g. Ne infektoitiin intraperitoneaalisesti 0,5 ml:lla bakteerisuspensiota, joka oli valmistettu laimentamalla yön yli viljeltyä *S.pyogenes* C 203 (L49)-viljelmää steriilillä peptonoidulla suolaliuoksella. Ympäykset laskettiin siten, että käsittelemättömät eläimet kuolivat verenmyrkytykseen 48 tunnin sisällä.

25

Testattavat yhdisteet annostettiin subkutaanisesti välittömästi infektion jälkeen. Seitsemäntenä päivänä  $\text{ED}_{50}$ -arvo laskettiin mg/kg:ssa menetelmällä, jonka ovat esittäneet

Spearman ja Kärber (D.J. Finney "Statistical Methods in Biological Assay", Griffin, sivu 524, 1952) elossa olevien eläinten prosentuaalisesta määrästä jokaisella annoksella.

- 5 Näissä olosuhteissa antibiootti A 42867:n ED<sub>50</sub>-arvo oli 1,54 mg/kg.

Yleensä antibakteerisessa hoidossa antibiootti A 42867:ää sekä sen myrkyttömiä, farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja tai näiden seoksia voidaan annostaa eri tavoin, kuten topikaalisesti tai parenteraalisesti. Parenteraalinen annostus on yleensä edullinen annostamistapa.

- 10 Injektoitavat koostumukset voivat olla suspensioita, liuoksia tai emulsioita öljymäisissä tai vesipitoisissa kantaineissa ja ne voivat sisältää apuaineita, kuten suspendoivia, stabiloivia ja/tai dispergoivia aineita.

Vaihtoehtoisesti aktiiviyhdiste voi olla jauhemuodossa, josta se valmistetaan annostushetkellä lisäämällä sopivaa kantainetta, kuten steriiliä vettä.

- 20 Riippuen annostamistavasta, nämä yhdisteet voidaan valmistaa erilaisina annosmuotoina.

Eräissä tapauksissa voi olla mahdollista valmistaa keksinnön mukaiset yhdisteet enteropäällysteisinä annosmuotoina oraaliseen annostukseen, mikä voidaan tehdä alalla tunnetulla tavalla (kts. esimerkiksi "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15th edition, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, USA, sivu 1614).

- 25 Näin voi olla erityisesti silloin, kun antimikrobisen aineen absorptio halutaan tapahtuvan suolistossa (enteric tract) samalla kun niiden toivotaan ohittavan maha-alueen (gastric tract) muuttumattomina.

30



Annostettavan aktiiviaineen määrä riippuu erilaisista tekijöistä, kuten hoidettavan koosta ja kunnosta, annostamistavasta ja -tiheydestä ja taudin aiheuttajasta.

5 Tämän keksinnön mukaiset antibiootit ja niiden fysiologisesti hyväksyttävät suolat ovat yleensä tehokkaita päivittäisen annoksen ollessa 0,5 - 50 mg aktiiviainetta per potilaan painokilo, mahdollisesti jaettuna 1-4 annokseen per päivä.

10 Erityisen toivottuja koostumuksia ovat sellaiset, jotka valmistetaan annosyksikköinä ja jotka sisältävät noin 100 - noin 5000 mg per yksikkö.

Tyypillisiä esimerkkejä injektioon sopivista kantoaineista ovat steriili vesi injektioon, Ringerin liuos, 0,9 %:inen suolaliuos ja 5 %:inen dekstroosi.

15 Antibiootin sopiva konsentraatio kantoaineessa suonensisäiseen (i.v.) infuusioon on noin 5 % - 10 %. Muita sopivia valmisteita annosyksiköiksi ovat hermeettisesti suljetut ampullit, muovipussit, steriilit, kumikorkilliset pienpullot ja vastaavat.

20 Lisäksi keksinnön mukainen antibiootti voidaan valmistaa topikaalisena valmisteena kuten liuoksena, voiteena tai lotionina. Nämä valmisteet sisältävät tavallisesti 0,1 - 15 % (paino/til.) aktiiviainetta.

25 Lisäksi keksinnön mukaiset antibiootit ovat käyttökelpoisia ehkäisten *Clostridium difficile*-kannan kasvun, joka aiheuttaa kalvoisen paksunsuolentulehduksen suolitossa. Näitä antibiootteja voitaisiin käyttää hoidettaessa kalvoista paksunsuolentulehdusta annostamalla tehokas määrä antibioottia tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa valmistettuna farmaseuttisesti hyväksyttävään annosmuotoon. Tällaisessa käytössä antibiootteja voidaan  
30 annostaa gelatiinikapseleissa tai nestemäisessä suspensiossa.

Paitsi, että antibiootti A 42867 tai sen hyväksyttävä suola ovat aktiivisia lääkkeinä, niitä voidaan käyttää eläinten kasvua edistävinä aineina.

5 Tätä tarkoitusta varten keksinnön mukaista yhdistettä annostetaan oraalisesti sopivassa ravintoaineessa. Tarkka käyttökonsentraatio on sellainen, joka on tarpeen kasvun edistämiseksi tehokkaasti käytettäessä normaaleja määriä ravintoa.

10 Keksinnön mukaisen aktiiviaineen lisääminen eläinten ravintoon suoritetaan mieluummin valmistamalla sopiva ennalta sekoitettu ravinto, joka sisältää aktiivisen yhdisteen tehokkaassa määrässä, ja tämä ennalta valmistettu ravinto yhdistetään valmiiseen päivän ravintoannokseen.

15 Vaihtoehtoisesti välituote konsentraatti tai ravintolisäaine, joka sisältää aktiivisen aineosan, voidaan sekoittaa ravintoon.

20 Tapa, jolla tällaiset ravintoseokset ja valmiit päivän ravintoannokset voidaan valmistaa ja annostaa, on kuvattu viitekirjoissa (kuten "Applied Animal Nutrition", W.H. Freedman and Co., S. Francisco, USA, 1969 tai "Livestock Feeds and Feeding" O and B Books, Corvallis, Oregon, USA 1977) ja liitetään tähän selitykseen viitteinä.

Seuraavat esimerkit kuvaavat edelleen keksintöä eikä niiden tarkoitus ole rajoittaa keksinnön piiriä.

## ESIMERKKI 1

## ANTIBIOOTTI A 42867:n TUOTTAMINEN

5 Tuottavan organismin (*Nocardia* sp. ATCC 53492) varastoviljelmää sivellään kaurajauhoagarvinopinnoille ja inkuboidaan 28°C:ssa 2 viikkoa.

10 Yksi silmukallinen kasvatettua kantaa ympätään 500 ml:n erlenmeyerpulloon, jossa on 100 ml ymppialustaa, muodostuen dekstroosista 2,0 %, soijapapujauhosta 0,8 %, hiivauutteesta 0,2 %, NaCl:stä 0,1 % ja CaCO<sub>3</sub>:sta 0,4 % ja jonka pH on säädetty arvoon 7,3 ennen sterilointia. Pulloa inkuboidaan kiertoravistelijassa 28°C:ssa 72 tuntia. Sen jälkeen 100 ml:n erä viljelmää ympätään käymisastiaan, jossa on 4 litraa samaa ymppialustaa ja viljelmää inkuboidaan 28°C:ssa 15 48 tuntia ravistellen noin 900 kierr./min ja ilmastaen yksi litra ilmaa per tilavuus per minuutti. Ympätään neljällä litralla ymppiviljelmää käymisastiat, jotka sisältävät 200 l käymisalustaa, jonka koostumus on sama kuin ymppiviljelmän, käyminen suoritetaan 96 tunnin ajan samalla sekoittaen noin 250 kierr./min ja ilmastaen yksi litra ilmaa 20 per tilavuus per minuutti.

Antibiootin aktiivisuutta seurattiin mikrobiologisella kokeella käyttäen *B.subtilis*-viljelmää Davisin minimialustalla.

## ESIMERKKI 2

## 25 ANTIBIOOTTI A 42867:n TALTEENOTTO

Koko käymisliemi (400 l), joka saadaan esimerkissä 1 kuvattulla tavalla, suodatetaan käyttäen suodatusapuainetta (Hyflo-FloMa<sup>®</sup>) kiertosuodattimella (a rotary filter). Suodatetun liemen pH säädetään arvoon 7,5 2 N kloorivetyhapolla ja lisätään 1000 ml:aan etukäteen turvotettua 30

D-Ala-D-Ala-aminokaproyyli-Sepharose-4B-modifioitua matriisia (valmistetaan kuten eurooppalaisessa patenttihakemuksessa No 83112555.4 esitetään) ja annetaan seistä yön yli samalla varovasti sekoittaen.

5 Hartsia otetaan talteen suodattamalla ja pestään noin 10 litralla 0,5 %:ista (paino/til.) HCl-tris-puskuria pH 7,5, joka sisältää 5 % (paino/til.) NaCl:ää, jonka jälkeen vedellä (4 x 5 l), liemi hylätään.

10 Tuote, joka on selektiivisesti sitoutunut hartsiin, eluoidaan 1,5 %:isella (paino/til.) ammoniumhydroksidilla (4 x 5 l) ja konsentroidaan pieneen tilavuuteen (noin 1800 ml) tislamalla atseotrooppisesti yhdessä n-butanolin kanssa alennetussa paineessa.

15 Konsentroidu, vesipitoinen liuos lyofilisoidaan, saadaan raaka antibiootti A 42867 (75,6 g).

### ESIMERKKI 3

#### RAA'AN ANTIBIOOTTI A 42867:n PUHDISTAMINEN

20 Raaka antibiootti A 42867 (75 g), joka saadaan esimerkin 2 menetelmän mukaisesti, liuotetaan 2 litraan vettä, joka sisältää 2 M natriumkloridia, pH säädetään arvoon 7,5 0,1 N natriumhydroksidiliuoksella, jonka jälkeen suodatetaan.

25 Suodosta siirretään 500 ml/tunti 1000 ml:n pylväaseen (0,1 x 0,1 m), jossa etukäteen turvotettua D-Ala-D-Ala-6-aminokaproyyli-Sepharose-4B-modifioitua matriisia (valmistettu eurooppalaisessa patenttihakemuksessa No 83112555.4 kuvatulla tavalla) ja joka pylväs on etukäteen tasapainotettu 0,04 M boraattipuskurilla, pH 7,5 sisältäen 2 M natriumkloridia ja 0,6 ml Triton x 100 (Baker grade).

30 Pylväs pestään 8 litralla 8 M karbamidia (pH 7,5), virtausnopeuden ollessa 500 ml/h, jonka jälkeen 70 litralla vesi-

pitoista NaOH:ta, pH-arvossa 10, kerätään fraktiot, joista jokainen 1000 ml.

5 Nämä fraktiot testataan B.subtilis-viljelmillä agar-kiekkokokeessa ja ne fraktiot, jotka ovat inaktiivisia, hylätään, kun taas aktiiviset (kuten fraktiot 63-70 tässä tapauksessa) yhdistetään, konsentroidaan pieneen tilavuuteen (500 ml) alennetussa paineessa tislaamalla atseotrooppisesti n-butanolin kanssa ja lyofilisoidaan jolloin saadaan antibiootti A 42867 (4 g).

#### 10 ESIMERKKI 4

##### ANTIBIOOTTI A 42867:n PUHDISTAMINEN JA SUOLAN POISTAMINEN

15 3,5 g antibiootti A 42867:ää, joka saadaan esimerkin 3 menetelmän mukaisesti, liuotetaan 70 ml:aan liuosta, jossa on natriumdivetyfosfaattimonohydraattia (2,5 g/l) ja asetonitriiliä (91:1), ja suodatetaan.

10 ml tätä suodosta laitetaan ruostumattomaan teräspylväeseen (2 x 50 cm), joka on pakattu 40 g:lla 10 µm RP 18 Lichrosorb-käänteis-faasi-piuhappogeeliä (Merck).

20 Pylväs on osa Chromatospac Modulprep-yksikköä (Jobin Yvon, 16-18 Rue de Canal 91169 Longjumeau, Ranska).

Pylväs eluoidaan nopeudella 8 ml/min samalla liuoksella, jota käytettiin näytteen liuottamiseksi, ja kerätään fraktiot, joista jokainen on 50 ml.

25 Jokainen fraktio tarkastetaan HPLC:llä ja paperi-kiekkokasvukokeella käyttäen herkkiä mikro-organismeja, kuten B.subtilista.

30 Fraktiot, jotka ovat aktiivisia seitsemän sarjan B.subtilista vastaan, yhdistetään, asetonitriili poistetaan tislaamalla alennetussa paineessa ja jäännös laimennetaan vesimäärällä, joka on suurin piirtein sama kuin alkupe-

räinen tilavuus.

5 Liuoksen pH säädetään arvoon 7,5, jonka jälkeen siirretään nopeudella 100 ml/h pylvääseen (5 x 15 cm), joka on täytetty etukäteen turvotetulla D-Ala-D-Ala-6-aminokaproyyli-Sepharose-4B-modifioidulla matriisilla (valmistetaan kuten eurooppalaisessa patenttihakemuksessa No 83112555.4 on esitetty), ja joka pylväs etukäteen tasapainoitetaan 0,04 M boraattipuskuria pH 7,5.

10 Pylväs pestään 8 litralla vettä (hapotettu 0,5 ml/l 1 N kloorivetyhappoa).

Sen jälkeen pylväs eluoidaan 1,5%:isella (paino/til.) ammoniumhydroksidilla, kerätään fraktiot, joista jokainen 100 ml.

15 Ne fraktiot, jotka ovat aktiivisia B.subtilista vastaan, yhdistetään, konsentroidaan alennetussa paineessa ja lyofilisoidaan, saadaan 1,2 g antibiootti A 42867:n tuotetta ei-suolamuodossa, jonka fysiko-kemialliset tunnusmerkit on edellä esitetty.

## PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä antibiootin A 42867 tai sen suolan valmistamiseksi, jolla on ei-suolamuodossa seuraavat tunnusmerkit:

antibiootti A 42867:n fysiko-kemialliset tunnusmerkit

5 A) ultraviolettiaabsorptiospektri, joka on esitetty liitteenä olevien piirustusten kuviossa 1 ja jossa on seuraavat absorptiomaksimit:

	$\lambda$ maks (nm)
10 a) 0,1 N HCl	282
b) vesi	282
c) fosfaattipuskuri pH 7,4	282
d) fosfaattipuskuri pH 9	282
	305 (olka)
15 e) 0,1 N NaOH	305
	265 (olka)

B) infrapuna-absorptiospektri, joka on esitetty liitteenä olevien piirustusten kuviossa 2 ja jossa on seuraavat absorptiomaksimit ( $\text{cm}^{-1}$ ):

3700-3100, 3000-2800 (nujoli); 1650; 1580; 1460 (nujoli)  
 1375 (nujoli); 1300; 1235; 1210; 1160; 1130; 1060; 1025;  
 1000; 970; 840; 790-700; 720 (nujoli)

25 C)  $^1\text{H}$ -NMR-spektri, joka on esitetty kuviossa 3 ja jossa on seuraavat signaaliryhmät (ppm:ssä) 270 MHz, rekisteröity DMSO  $d_6$ :ssa (heksadeuterodimetyylisulfoksidi) sisäisenä standardina käytettiin TMS:ää (0,00 ppm), ( $\delta$  = ppm):

0,90, d  $[(\text{CH}_3)_2-(\text{CH})]$ ; 1,02, d  $[\text{CH}_3-(\text{CH})]$ ; 1,23, d  
 $[\text{CH}_3-(\text{CH})]$ ; 1,52, s  $[\text{CH}_3-\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}]$ ; 1,77, m  $[\text{CH}(\text{CH}_3)_2]$ ; 2,38,  
 s (N- $\text{CH}_3$ ); 3,0-6,35, s ja m (aromaattiset sokeri- ja  
 peptidiset CH:t); 6,27-9,29 (aromaattiset CH:t, peptidiset NH:t ja fenoliset OH:t)

d = dupletti s = singletti m = multipletti

D) retentioaika ( $R_t$ ) = 0,537 suhteessa vankomysiini.  
HCl:ään (Vancocin, Eli Lilly,  $R_t$  = 16,36 min) analysoi-  
taessa käänteisfaasi-HPLC:llä seuraavissa olosuhteissa:

5 kolonni: Ultrasphere ODS (5  $\mu$ m) Altex (Beckman)  
4,6 mm (sisähalkaisija) x 250 mm

esikolonni: Brownlee Labs RP 18 (5  $\mu$ m)

eluentti: vesi:asetonitriili:2-etanoliamiini:  
trifluorietikkahappo 9:1:0,01:0,01  
(til./til.)

10 virtausnopeus: 1,6 ml/min

UV-detektori: 254 nm

sisäinen standardi: vankomysiini.HCl ( $R_t$  = 16,36 min)  
(Vancocin, Eli Lilly)

E) retentioaika ( $R_t$ ) = 0,665 suhteessa vankomysiini.  
15 HCl:ään (Vancocin, Eli Lilly,  $R_t$  = 9,96 min) analysoitaes-  
sa käänteisfaasi-HPLC:llä seuraavissa olosuhteissa:

kolonni: Ultrasphere ODS (5  $\mu$ m) Altex (Beckman)  
4,6 mm (sisähalkaisija) x 250 mm

esikolonni Brownlee Labs RP 18 (5  $\mu$ m)

20 eluentti A:  $\text{CH}_3\text{CN}$  2% } säädetty pH-  
(2,5 g/l)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  98% } arvoon 6,0

eluentti B:  $\text{CH}_3\text{CN}$  70% } säädetty pH-  
(2,5 g/l)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  30% } arvoon 6,0

25 eluointi: lineaarinen gradientti 5 %:sta  
60 %:iin eluenttia B eluenttissa A,  
40 minuutissa

virtausnopeus: 1,6 ml/min



UV-detektorii: 254 nm

sisäinen standardi: vankomysiini-HCl ( $R_t = 9,96$ )  
(Vancocin, Eli Lilly)

- 5 F) alkuaineanalyysi, sen jälkeen kun näytettä on ensin kuivattu  $140^{\circ}\text{C}$ :ssa inerttikaasuatmosfäärissä, antaa tulokseksi seuraavan likimääräisen prosentuaalisen koostumuksen (keskiarvo): hiiltä 53,3 %; vetyä 5,9 %; typpeä 7,85 %; klooria (kokonais) 4,41 %; klooria (ioneja) 2,22 %; epäorgaaninen jäännös  $900^{\circ}\text{C}$ :ssa ilmassa: 0,875 %
- 10 G) happo-emästitrauskäyrällä vedessä, titrattaessa 0,05 N vesipitoisella KOH:lla näyte, johon on etukäteen lisätty ylimäärin vesipitoista HCl:ää, esiintyy pKa-arvot 3,2, 7,1 ja 8,3
- H)  $R_f$ -arvo 0,56 seuraavassa kromatografiasysteemissä:  
15 (vesipitoinen natriumkloridi 87,5 g/l:  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g/l) 70 % } pH säädetty  
CH<sub>3</sub>CN 30 % } arvoon 6
- käytetään käänteisfaasisia silanoituja pihappogeeli-  
levyjä (RA-18 F<sub>254</sub>)
- 20 näkyväksi tekeminen:
- UV-valo 254 nm
  - keltainen väri Pauly-reagenssilla, t.s. diatsotoidulla sulfaniliinihapolla (J. Chromatog. 20, 171 (1965), Z. Physiol. Chem. 292, 99, (1953))
- 25 - bioautografiassa käytetään B.subtilis ATCC 6633:a Davisin minimalustalla
- I) molekyylipaino noin 1559 arvioituna FAB-massaspekt-  
ristä, jossa M+H<sup>+</sup>-piikki 1560,

- t u n n e t t u siitä, että viljellään kantaa *Nocardia* sp. ATCC 53492 tai sen antibioottia A 42867:ää tuottavaa mutanttia tai muunnosta submerssisissa, aerobisissa oloissa assimiloituvien hiili-, typpilähteiden ja epäor-
- 5 gaanisten suolojen läsnäollessa, mainittu antibiootti otetaan talteen ja eristetään käymisliemistä ja haluttaessa se muutetaan halutuksi suolaksi.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n -
- 10 n e t t u siitä, että kantaa viljellään lämpötilassa, joka on 20°C - 40°C.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n -
- n e t t u siitä, että lämpötila on 24°C - 35°C.
- 15
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n -
- n e t t u siitä, että antibiootin talteenottaminen ja eristäminen tehdään suorittamalla suodatetulle käymis-
- 20 liemelle affiniteettikromatografia immobilisoidulla D-Alanyyli-D-Alaniinilla, jonka jälkeen käytetään jakaantu-
- mis-, käänteisfaasi- tai ioninvaihtokromatografiaa.
5. *Nocardia* sp. ATCC 53492.

## PATENTKRAV

1. Förfarande för framställning av antibiotikumet A  
42867 eller ett salt därav, som har i en icke-saltform de  
5 förjande kännetecken:

fysikalisk-kemiska kännetecken av antibiotikumet A 42867

A) ultravioletabsorptionsspektrum, som anges i figur 1  
10 av de bifogade ritningarna, och som har följande absorp-  
tionsmaxima:

	$\lambda$ max (nm)
15 a) 0,1 N HCl	282
b) vatten	282
c) fosfatbuffer pH 7,4	282
d) fosfatbuffer pH 9	282
	305 (skuldra)
20 e) 0,1 N NaOH	305
	265 (skuldra)

B) infraröd-absorptionsspektrum, som anges i figur 2 av  
de bifogade ritningarna, och som har följande absorp-  
tionsmaxima ( $\text{cm}^{-1}$ ):

25

3700-3100, 3000-2800 (nujol); 1650; 1580; 1460 (nujol),  
1375 (nujol); 1300; 1235; 1210; 1160; 1130; 1060; 1025;  
1000; 970; 840; 790-700; 720 (nujol),

30

C)  $^1\text{H}$ -NMR-spektrum, som framställts i figur 3, och som  
har följande signalgrupper (i ppm) 270 MHz, registrerad i  
DMSO  $d_6$  (hexadeuterodimetylsulfoxid), såsom inre standard  
användes TMS (0,00 ppm), ( $\delta$  = ppm):

35

0,90, d  $[(\text{CH}_3)_2-(\text{CH})]$ ; 1,02, d  $[\text{CH}_3-(\text{CH})]$ ; 1,23, d  $[\text{CH}_3-$   
 $(\text{CH})]$ ; 1,52, s  $[\text{CH}_3-\text{C}]$ ; 1,77, m  $[\text{CH}(\text{CH}_3)_2]$ ; 2,38, s (N-  
 $\text{CH}_3)$ ; 3,0-6,35, s och m (aromatiska socker- och peptidiska

CH); 6,27-9,29 (aromatiska CH, peptidiska NH och fenoliska OH),

d = dublett s = singlett m = multiplett

- 5 D) retentionstid ( $R_t$ ) = 0,537 med avseende på vankomycin.HCl (Vancocin, Eli Lilly,  $R_t$  = 16,36 min) genom att analysera med omvänt fas-HPLC i följande förhållanden:

10 kolonn: Ultrasphere ODS (5  $\mu$ m) Altex (Beckman) 4,6 mm (inre diameter) x 250 mm

prekolonn: Brownlee Labs RP 18 (5  $\mu$ m)

15 eluent: vatten:acetonitril:2-etanolamin:trifluorättiksyra 9:1:0,01:0,01 (vol/vol)

flödes hastighet: 1,6 ml/min

20 UV-detektor: 254 nm

inre standard: vankomycin.HCl ( $R_t$  = 16,36 min) (Vancocin, Eli Lilly)

- 25 E) retentionstid ( $R_t$ ) = 0,665 med avseende på vankomycin.HCl (Vancocin, Eli Lilly,  $R_t$  = 9,96 min) genom att analysera med omvänt fas-HPLC i följande förhållanden:

30 kolonn: Ultrasphere ODS (5  $\mu$ m) Altex (Beckman) 4,6 mm (inre diameter) x 250 mm

prekolonn: Brownlee Labs RP 18 (5  $\mu$ m)

35 eluent A: CH<sub>3</sub>CN 2% justerat till  
 (2,5 g/l) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 98% pH-värdet 6,0  
 eluent B: CH<sub>3</sub>CN 70% justerat till  
 (2,5 g/l) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 30% pH-värdet 6,0

eluering: lineär gradient från 5 % till 60 % av  
eluent B i eluent A, i 40 minuter

flödes hastighet: 1,6 ml/min

5

UV-detektor: 254 nm

inre standard: vankomycin.HCl ( $R_t = 9,96$  min) (Van-  
cocin, Eli Lilly)

10

F) elementanalys efter torkning av provet i 140 °C i  
inert gasatmosfär ger som resultat den följande approxi-  
mativa procentuella sammansättningen (genomsnittsvärde):  
kol 53,3 %; väte 5,9 %; kväve 7,85 %; klor (total) 4,41  
15 %; klor (joner) 2,22 %; oorganisk rest i 900 °C, i luft:  
0,0875 %

20

G) på syra-bas-titreringskurvan i vatten, vid titrering  
av ett prov, som på förhand tillsätts vattenhaltig HCl i  
överskott, med 0,05 N vattenhaltig KOH, förekommer pKa-  
värdena 3,2, 7,1 och 8,3

H)  $R_f$ -värdet 0,56 i det följande kromatografisystemet:

25

(vattenhaltig natriumklorid

87,5 g/l : NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g/l)

CH<sub>3</sub>CN

70 % pH justerat

30 % till värdet 6

man använder omvänd fas silanerade kiselsyrageplattor

30

(RA-18 F<sub>254</sub>)

visualisering:

- UV-ljus 254 nm

35

- gul färg med Pauly-reagens, dvs med diazoterad sulfani-  
linsyra (J. Chromatog. 20, 171 (1965), Z. Physiol. Chem.  
292, 99, (1953))

- i bioautografi använder man *B. subtilis* ATCC 6633 på Davis minimimedium

I) molekylvikt ca 1559 uppskattat från FAB-masspektrum,  
5 vari  $M+H^+$  -spetsen är 1560,

k ä n n e t e c k n a t därav, att man odlar stammen  
*Nocardia* sp. ATCC 53492 eller en mutant eller variant  
därav, som producerar antibiotikumet A 42867, i aeroba  
10 undervattensförhållanden i närvaro av assimilerbara kol-,  
kvävekällor och oorganiska salter, tillvaratar och isole-  
rar det nämnda antibiotikumet från fermenteringslagen,  
och, om så önskas, omvandlar det till ett önskat salt.

15 2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -  
t e c k n a t därav, att stammen odlas i en temperatur,  
som är 20°C - 40°C.

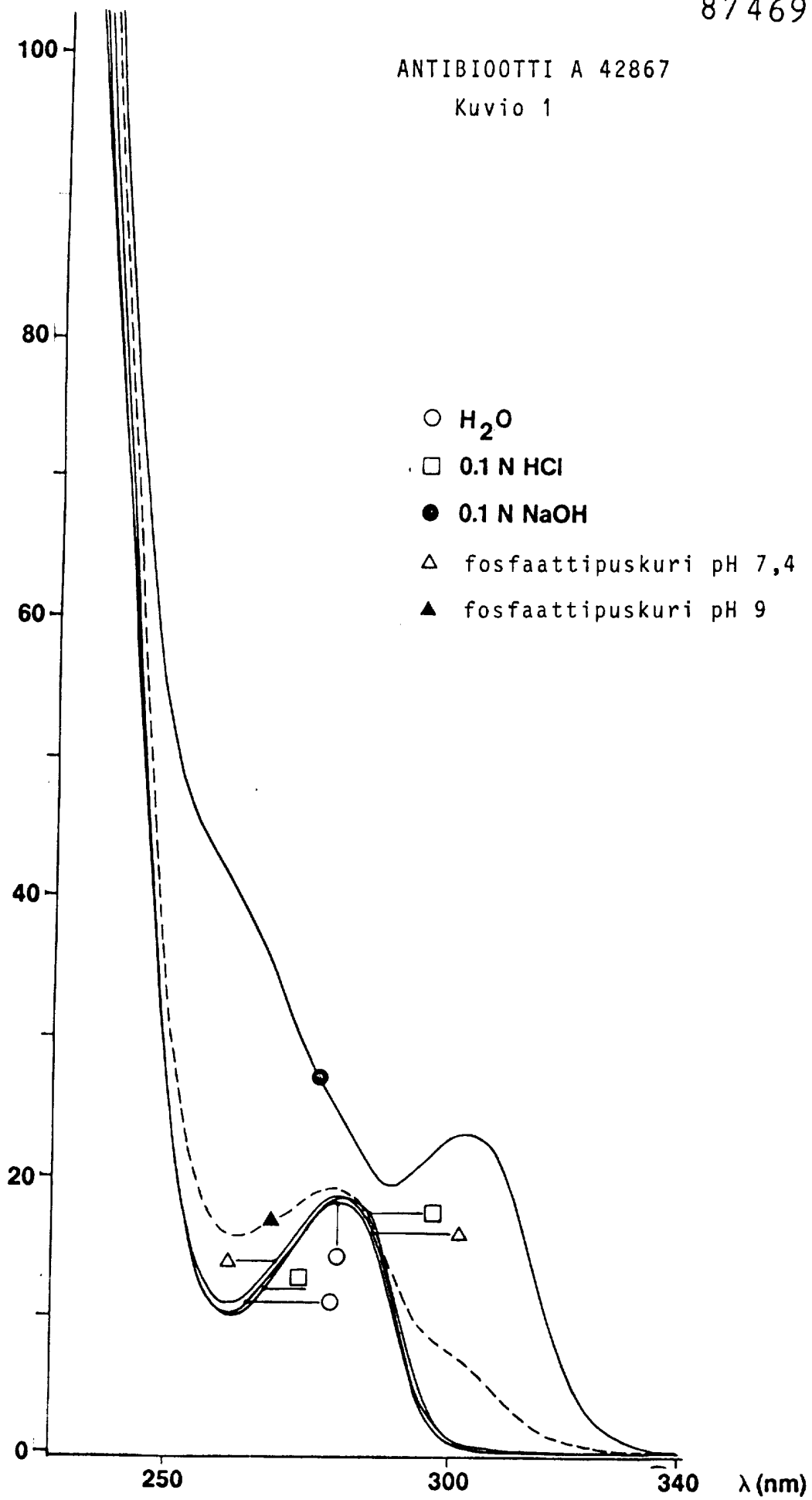
20 3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -  
t e c k n a t därav, att temperaturen är 24°C - 35°C.

25 4. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -  
t e c k n a t därav, att man utför tillvaratagningen och  
isoleringen av antibiotikumet genom att utföra affini-  
tetskromatografi med immobiliserad D-Alanyl-D-Alanin till  
den filtrerade fermenteringslagen, varefter man använder  
fördelnings-, omvänd fas- eller jonbyteskromatografi.

5. *Nocardia* sp. ATCC 53492.

## ANTIBIOOTTI A 42867

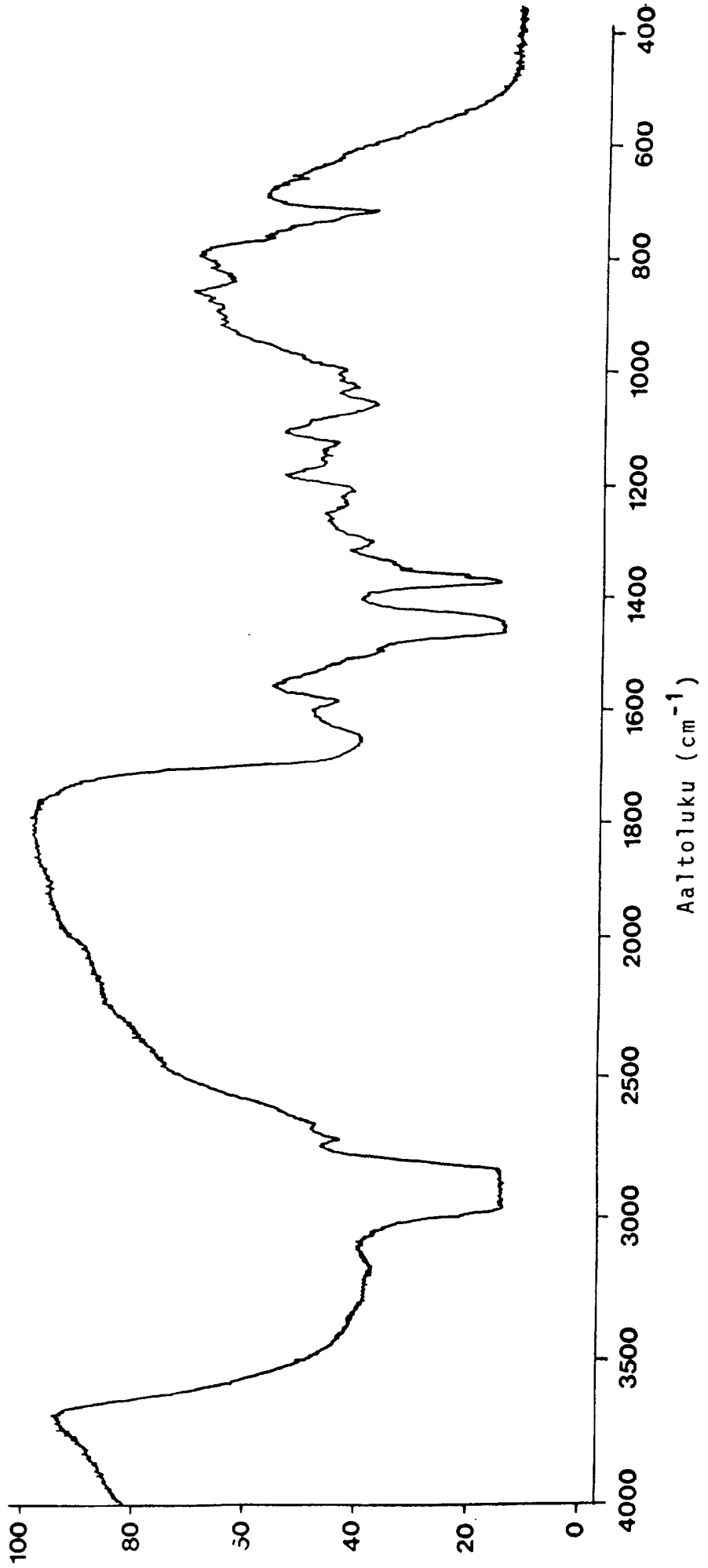
Kuvio 1



ANTIBIOOTTI A 42867

ANTIBIOOTTI A 42867

Kuvio 2





ANTIBIOTTI A. 42867

Kuvio 3

87469

