

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 144658 B

DIREKTORATET FOR  
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

---

(21) Ansøgning nr. 5144/78

(51) Int.Cl.<sup>3</sup> C 12 P 17/18

(22) Indleveringsdag 17. nov. 1978

(24) Løbedag 17. nov. 1978

(41) Alm. tilgængelig 19. maj 1979

(44) Fremlagt 3. maj 1982

(86) International ansøgning nr. -

(86) International indleveringsdag -

(85) Videreførelsesdag -

(62) Stamansøgning nr. -

(30) Prioritet 18. nov. 1977, 139384/77, JP

(71) Ansøger TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD., Osaka, JP.

(72) Opfinder Eiji Higashide, JP: Kazunori Hatano, JP: Mitsuko  
Asai, JP.

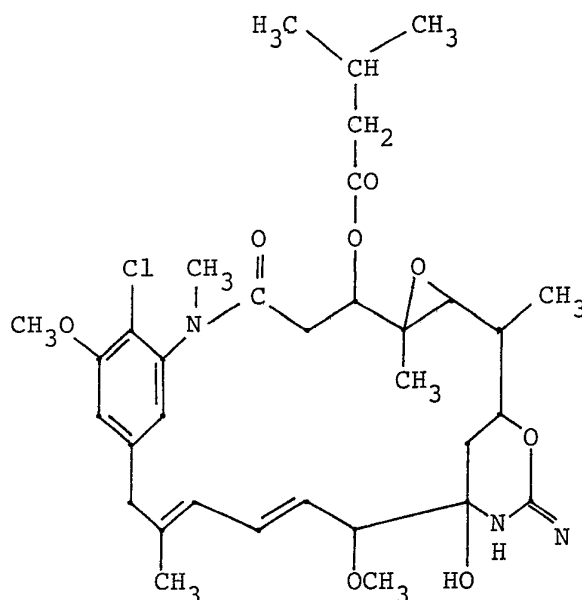
(74) Fuldmægtig Dansk Patent Kontor ApS.

---

(54) Fremgangsmåde til fremstilling  
af antibiotikum C-15003 P-4.

DK 144658 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af antibiotikum C-15003 P-4 med formlen



ved dyrkning af en mikroorganisme, som hører til den art, hvortil stammen *Nocardia* nr. C-15003 (IFO 13726) hører, i et dyrkningsmedium, der indeholder assimilerbare carbonkilder og omsættelige nitrogenkilder.

Antibiotikum C-15003 P-4 er i det følgende forkortet til P-4.

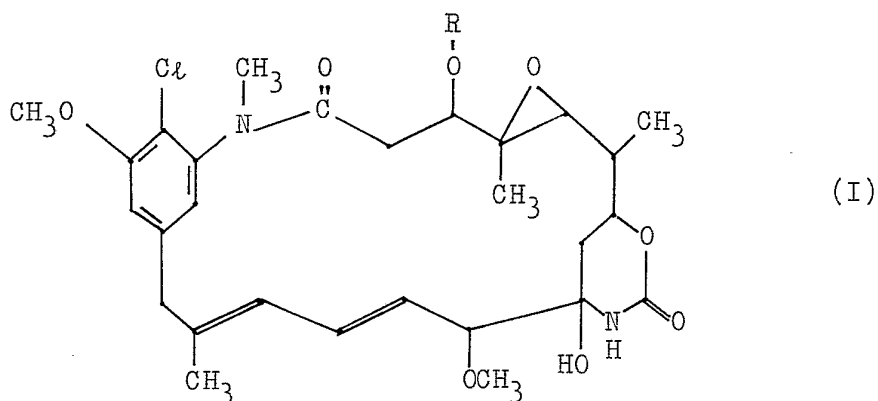
De ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse anvendte mikroorganismer frembringer, når de dyrkes i konventionelle dyrkningsmedier, almindeligvis forskellige komponenter af antibiotikum C-15003 samtidigt, se beskrivelsen til dansk patentansøgning nr. 4588/77. Til fraskillelse af den enkelte komponent fra dyrkningsmediet kræves meget komplicerede processer, som uundgåeligt giver et lavere udbytte af den ønskede komponent.

For at overvinde denne ulempe er der foretaget omfattende undersøgelser, især med henblik på specifik udvinding af P-4, og det har vist sig, at P-4 kan produceres i en bemærkelsesværdig stor mængde i forhold til det totale indhold

af antibiotikum C-15003, hvis der anvendes et dyrkningsmedium med en specifik sammensætning.

I overensstemmelse hermed er fremgangsmåden ifølge opfindelsen ejendommelig ved, at dyrkningsmediet indeholder leucin og/eller derivater deraf.

I sammenhæng med denne opfindelse er udtrykket "antibiotikum C-15003" eller "C-15003" en fællesbetegnelse for de fire forbindelser med den følgende almene formel som en gruppe eller en blanding af to eller tre af disse forbindelser eller enhver af disse forbindelser hver for sig.



(hvori R står for  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CO}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  
 $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$  eller  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ )

Idet der henvises til den almene formel I, kaldes den forbindelse, hvori R er  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ , heri "antibiotikum C-15003 P-2" eller mere kortfattet "P-2", den forbindelse,

hvori R er  $-\text{CO}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , kaldes heri "antibiotikum C-15003 P-3"

eller mere kortfattet "P-3", den forbindelse, hvori R er

-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, kaldes heri "antibiotikum C-15003 P-3' " eller mere kortfattet "P-3' ", og den forbindelse, hvori

R er  $\text{-CO-CH}_2\text{-CH} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$ , kaldes heri "antibiotikum C-15003 P-4"

eller mere kortfattet "P-4". Antibiotikum C-15003 P-2 er den samme forbindelse som maytansinolpropionat, der er beskrevet i Kupchan et al.'s rapport [The Journal of American Chemical Society 97, 5294 (1975)], med hensyn til elementaranalyse, specifik drejning, absorption af ultraviolet lys, absorption af infrarødt lys, massespektrum m.m.

De mikrobiologiske karakteristika af stamme nr. C-15003 undersøgtes ved metoder, der er analoge til dem, der foreslås af Shirling & Gottlieb (International Journal of Systematic Bacteriology 16, 313-340 (1966)). Resultaterne af observationerne ved 28°C i 21 dage er som følger:

#### 1) Morfologiske karakteristika.

Det vegetative mycelium er veludviklet og forgrenet, både på agar og i flydende medium. Mange af hyferne måler 0,8 til 1,2 μ i diameter og kan i visse tilfælde dele sig i fragmenter, som ligner stavformede bakterier eller forgrenede korte hyfestykker. Stammen giver god vækst på forskellige taksonomiske medier, idet luftmyceliet er overlejret på det vegetative mycelium, selv om den ofte danner coremia-lignende legemer (50-200 x 200-1000μ), ovenpå hvilken luftmyceliet vokser videre. Mange af luftmycelierne er bugtede, og lige eller åbent spirallignende konfigurationer træffes ved nogle få lejligheder. Mikroskopisk undersøgelse af ældre kulturer afslører, at de konidielignende celler kun i få tilfælde optræder i kæder, medens de celledensuspensioner, der opnåedes fra overfladerne af sådanne kulturer, ved mikroskopisk undersøgelse viste sig at indeholde mange langstrakt ellipsoide (0,8-1,2 μ x 4,8-6,8 μ) og ellipsoide (0,8-1,2 x 1,0-2,0 μ) legemer, som lignede arthrosporer.

Elektronmikroskopiske undersøgelser viste, at disse legemer havde glatte overflader.

## 2) Cellebestanddele.

Stammen dyrkedes under omrystning i modificeret ISP nr. 1 medium ved 28°C i 66 til 90 timer, hvorefter cellerne opsamledes og skylledes. Ved metoden ifølge B.Becker et al. (Applied Microbiology 12, 421 (1964)) og metoden ifølge M.P. Lechevalier (Journal of Laboratory and Clinical Medicine 71, 934 (1963)) undersøgte de ovennævnte hele celler for diaminopimelinsyre og sukkersammensætning. Førstnævnte viste sig at være meso-formen, medens der påvistes pletter, som svarede til galactose og arabinose.

## 3) Karakteristika for taksonomiske medier.

Stammen viste forholdsvis god vækst på forskellige medier, idet det vegetative mycelium var farveløst til bleggult i de indledende dyrkningsfaser og lyst gulbrunt til gulbrunt i senere faser. Stammen producerer opløselige pigmenter, gule til gulbrune, i forskellige taksonomiske medier. Luftmyceliet er pulveragtigt og giver generelt moderat vækst, idet det er hvidt til gult eller lyst gulbrunt. Karakteristika for stammen i forskellige taksonomiske medier er opført i tabel 1.

Tabel 1.

Dyrkningskarakteristika for stamme nr. C-15003 på taksonomiske medier.

## (A) Sucrose-nitrat-agar:

Vækst (G): Moderat, "Brite Melon Yellow" (3 ia)\*  
til "Amber Tan" (3 lc)\*, coremialignende  
legemer dannet.

Luftmycelium (AM): Sparsomt, hvidt.

Opløseligt pigment (SP): Intet eller blegt gulbrunt.

## (B) Glycerol-nitrat-agar:

G: Moderat, "Lt Ivory" (2 ca)\*, coremialignende legemer dannet.

AM: Moderat, hvidt.

SP: Intet.

- (C) Glucose-asparagin-agar:  
G: Moderat, "Brite Marigold" (3 pa)\* til "Brite Yellow" (2 pa)\*.  
AM: Sparsomt, hvidt.  
SP: "Brite Yellow" (2 pa)\*.
- (D) Glycerol-asparagin-agar:  
G: Moderat, "Lt Ivory" (2 ca)\*, coremialignende legemer dannet.  
AM: Sparsomt, hvidt.  
SP: Intet.
- (E) Stivelsesagar:  
G: Moderat, "Lt Ivory" (2 ca)\* til "Lt Wheat" (2 ea)\*, coremialignende legemer dannet.  
AM: Rigeligt, "Lt Ivory" (2 ca)\*.  
SP: Intet.
- (F) Næringsagar:  
G: Moderat, "Lt Ivory" (2 ca)\* til "Colonial Yellow" (2 ga)\*, coremialignende legemer dannet.  
AM: Sparsomt, hvidt.  
SP: Intet.
- (G) Calciummalatagar:  
G: Moderat, "Lt Ivory" (2 ca)\* til "Lt Wheat" (2 ea)\*, coremialignende legemer dannet.  
AM: Moderat, hvidt til "Lt Ivory" (2 ca)\*.  
SP: Intet.
- (H) Gærekstrakt-maltekstrakt-agar:  
G: Moderat, "Amber" (3 lc)\* til "Brite Yellow" (3 la)\*, coremialignende legemer dannet.  
AM: Moderat, hvidt til "Lt Ivory" (2 ca)\*.  
SP: Intet.
- (I) Havremelagar:  
G: Moderat, "Lt Ivory" (2 ca)\* til "Colonial Yellow" (2 ga)\*, coremialignende legemer dannet.  
AM: Sparsomt, hvidt til lysegult.  
SP: Intet.
- (J) Pepton-gærekstrakt-jern-agar:  
G: Moderat, "Colonial Yellow" (2 ga)\*.  
AM: Intet.  
SP: "Colonial Yellow" (2 ga)\*.

(K) Tyrosinagar:

G: Moderat, "Lt Ivory" (2 ca)\* til "Lt Melon Yellow" (3 ea)\*, coremialignende legemer dannet.

AM: Moderat, hvidt til "Lt Ivory" (2 ca)\*.

SP: "Camel" (3 ie)\*.

\* Farvekoderne svarer til "Color Harmony Manual", 4. udgave.

(Container Corporation of America, 1958).

4) Fysiologiske karakteristika:

De fysiologiske karakteristika af stammen er vist i tabel

2. Temperaturområde for vækst: 12 til 38°C. Temperaturområdet, hvori der optræder god luftvækst på agar (ISP nr. 2), er 20 til 35°C.

Tabel 2.

De fysiologiske karakteristika af stamme nr. C-15003.

Temperaturområde for vækst: 12 til 38°C.

Temperaturområde for luftvækst: 20 til 35°C.

Gelatinesmeltning: Positiv.

Hydrolyse af stivelse: Positiv.

Reduktion af nitrater: Positiv.

Peptonisering af mælk: Positiv.

Koagulation af mælk: Negativ.

Dekomposition af kasein: Positiv.

Produktion af melanoide pigmenter:

Negativ: (pepton-gærekstrakt-jern-agar),

positiv: (tyrosinagar).

Dekomposition af tyrosin: Positiv.

Dekomposition af xanthin: Negativ.

Dekomposition af hypoxanthin: Negativ.

Tolerance overfor lysozym: Positiv.

Tolerance overfor natriumchlorid: 2%.

5) Udnyttelse af forskellige carbonkilder:

Udnyttelsen af forskellige carbonkilder undersøgte under anvendelse af et medium beskrevet i Pridham og Gottlieb (Journal of Bacteriology 56, 107 (1948)) og et basalmedium med samme sammensætning plus 0,1% gærekstrakt. Det resulterende spektrum er vist i tabel 3.

Tabel 3.

Udnyttelsen af carbonkilder af stamme nr. C-15003.

<u>Carbonkilde</u>	<u>Vækst</u>	<u>Carbonkilde</u>	<u>Vækst</u>
D-Xylose	+ ++*	Raffinose	± ± *
L-Arabinose	+ +	Melibiose	+ +
D-Glucose	++ ++	i-Inositol	- -
D-Galactose	+ +	D-Sorbitol	- -
D-Fructose	+++ ++	D-Mannitol	++ ++
L-Rhamnose	+ +	Glycerol	- ±
D-Mannose	+++ ++	Opløselig sti- velse	+ +
Sucrose	++ ++	Kontrol	- -
Lactose	- -		
Maltose	± +		
Trehalose	+ ++		

\* Basalmedium med 0,1% gærekstrakt tilsat.

Note: +++: Rig vækst

++: God vækst

+: Vækst

±: Ringe vækst

-: Ingen vækst

6) Andre karakteristika.

Cellerne opsamledes ved den tidligere i 2) beskrevne metode, og DNA'et præpareredes analogt med metoden ifølge J. Marmur et al. (Journal of Molecular Biology 3, 208, 1961). G-C (guanin-cytosin)-indholdet i DNA'et fandtes at være ca. 71 mol-%.

Gram-farvning af det vegetative mycelium af denne stamme var positiv.

De ovenstående karakteristika for stamme nr. C-15003 sammenlignedes med beskrivelserne i S.A. Waksman's "The Actinomycetes Vol. 2" (The Williams and Wilkins Co., 1961), R.E. Buchanan og N.E. Gibbons, "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed., 1974", og anden litteratur.



Da denne stamme formodedes at høre til gruppe III i slægten *Nocardia*, og da man ikke fandt arter med de hidtil beskrevne karakteristika blandt de kendte stammer, konkluderede man, at denne stamme repræsenterer en ny mikroorganismeart.

Den foreliggende stamme nr. C-15003 er deponeret hos Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology (FERM), Japan, under accessionsnummeret FERM-P nr. 3992, hos The Institute for Fermentation, Osaka (IFO), Japan, under accessionsnummeret IFO 13726 og hos The American Type Culture Collection (ATCC), Maryland, U.S.A., under accessionsnummeret ATCC-31281.

En mikroorganisme af slægten *Nocardia* er ligesom mikroorganismer generelt tilbøjelig til at undergå variationer og mutationer, enten spontant eller induceret. De mange varianter af stammen, hvilke varianter er opnåelige ved bestråling med røntgenstråler, gammestråler, ultraviolet lys og lignende, ved isolering af enkelte celler, ved dyrkning på medier indeholdende forskellige kemikalier eller ved enhver anden mutagen behandling, såvel som de mutanter, der spontant afledes af stammen, og hvis egenskaber ikke afviger væsentligt fra de givne karakteristika, og som er i stand til at frembringe C-15003 P-2, P-3, P-3' og/eller P-4, kan udnyttes ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse. Når stamme nr. C-15003 eksempelvis underkastes forskellige mutagene behandlinger, dannes mutanter, som i det væsentlige mangler evnen til at producere opløselige pigmenter, mutanter med substratmycelier, som er farveløse, gulgrønne, rødbrune eller orangerøde, mutanter, hvis hyfer er rede til at fragmentere i bacillare elementer eller forgrenede korte hyfefragmenter, og mutanter med rigeligt, hvidt luftmycelium eller i det væsentlige uden luftmycelier.

Leucin kan ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse anvendes i form af et derivat. Eksempler på deriva-

ter er alkylestere med 1 til 2 carbonatomer (f.eks. methylestere og ethylestere) af leucin, amider, såsom amidet, eller alkylamider med 1 til 2 carbonatomer (f.eks. N-methylamidet og N-ethylamidet) af leucin, dets ketosyrer (f.eks.  $\alpha$ -ketoisocaproinsyre) eller salte af de ovennævnte forbindelser (f.eks. hydrochlorider). L-formen af leucin er ønskelig. Blandingen af leucin i fri form og dets derivater eller en blanding af derivater kan også anvendes.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendes de ovennævnte stoffer generelt i mediet i en mængde på ca. 0,01 til 1,0% (vægt/vol.), fortrinsvis ca. 0,1 til 0,5% (vægt/vol.), på ethvert tidspunkt af dyrkningen, så længe dyrkningen af *Nocardia* sp. nr. C-15003 finder sted, fortrinsvis under den indledende dyrkningsfase.

Mediet, der anvendes til dyrkningen af en sådan antibiotikum C-15003 P-4-producerende stamme, kan være et hvilket som helst flydende eller fast medium, hvis det blot indeholder næringsstoffer, som stammen kan udnytte. Til større produktioner foretrækkes almindeligvis et flydende medium.

Mediet skal indeholde det nævnte tilsætningsstof samt carbon- og nitrogenkilder, som den antibiotikum C-15003 P-4-producerende stamme kan assimilere og omsætte. Desuden kan mediet indeholde uorganisk stof, mikronæringsstoffer og lignende. Som eksempler på carbonkilder kan nævnes glucose, lactose, sucrose, maltose, dextrin, stivelse, glycerol, mannitol, sorbitol, fedtstoffer og olier (f.eks. sojabønneolie, svinefedt og hønsefedt). Nitrogenkilderne kan f.eks. være kødekstrakt, gærekstrakt, tørgær, sojabønneemel, majsstøbevand, pepton, bomuldsfrømel, melasse, urinstof, ammoniumsalte (f.eks. ammoniumsulfat, ammoniumchlorid og ammoniumnitrat) og nitratsalte (f.eks. natriumnitrat og kaliumnitrat). Mediet kan yderligere indeholde salte af natrium, kalium, calcium, magnesium og lignende, salte af jern, mangan, zink, cobalt, nikkel og lignende og salte af phosphorsyre, borsyre m.m. Endvidere kan mediet indeholde vitaminer (f.eks. B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, nicotinsyre, B<sub>12</sub>, C og E), nucleinsyrer (f.eks. af purin, pyrimidin og derivater deraf) m.m. Til

indstilling af mediets pH kan der f.eks. tilsættes en mineralsyre og/eller et alkali eller ammoniak såvel som de tilsvarende baser som pH-justerende midler. Endvidere kan olier og fedtstoffer, overfladeaktive midler og antiskummidler også sættes til mediet, om ønsket.

Dyrkningen kan gennemføres stationært, under omrystning, submers aerobt og under enhver anden dyrkningsbetingelse. Til større produktioner foretrækkes selvfølgelig submers aerob dyrkning. Selv om dyrkningsbetingelserne naturligvis afhænger af fermentationsbetingelserne og sammensætningen af mediet, den anvendte stamme, dyrkningsmetoden og andre faktorer, foretrækkes det normalt at gennemføre inkubationen ved 20 til 35°C med et udgangs-pH på ca. 5,5-8,5, især ved 23 til 30°C med et udgangs-pH på 6,5 til 7,5. Da dyrkningstiden også er variabel ifølge de samme faktorer som nævnt ovenfor, er det tilrådeligt at fortsætte dyrkningen, indtil styrken af P-4 bliver maksimal. I tilfælde af en rystemkultur eller en aerob submers kultur i flydende medium er den nødvendige tid normalt fra ca. 48 til 240 timer.

Det følgende er et konkret eksempel på metoden til fremstilling af P-4.

Stamme nr. C-15003 inokuleredes i et dyrkningsmedium (I), indeholdende 3% opløselig stivelse, 0,2% ammoniumchlorid, 0,05% magnesiumsulfat, 1,09% kaliumdihydrogenphosphat, 2,09% dikaliumhydrogenphosphat, 0,001% ferrosulfat og tilsætningsstoffet, eller et dyrkningsmedium (II), indeholdende 5% dextrin, 3% majsstøbevand, 0,1% pepton, 0,5% calciumcarbonat og tilsætningsstoffet, og dyrkedes ved 28°C i 144 timer i en roterende rystemaskine (200 omdr/min.) eller i en fermentor.

Tabel 4 og 5 viser resultaterne under anvendelse af mediet (I) henholdsvis (II).

Styrken af det totale C-15003 prøvedes med *Talaromyces avellaneus* IFO 7721 som prøveorganisme med papirskivemetoden. Prøve mediet bestod af 3,5 g dinatriumhydrogenphosphat, 0,5 g kaliumdihydrogenphosphat, 5 g gærekstrakt (Difco), 10 g glucose, 15 g agar og 1000 ml destilleret vand (pH 7,0),

Bestemmelsen af det i dyrkningsmediet akkumulerede P-2, P-3 og P-4 udførtes som følger:

Dyrkningsmediet ekstraheredes med det samme volumen ethylacetat. Opløsningsmiddellaget koncentreredes og tørredes. Det tørrede stof opløste i ethylacetat til et volumen på 1/100 af dyrkningsmediet. Produkterne elueredes ved silica-geltyndtlagskromatografi (silicagelplade 60F<sub>254</sub> med vandmættet ethylacetat. Mængden af antibiotikumet og forholdet mellem komponenterne bestemtes ved hjælp af en "Shimazu Dual-wave length TIC-scanner", model CS-910, på basis af integraltætheden af hver plet på kromatogrammet ved 254 nm. Forholdet mellem komponenterne er angivet som vægt/vægt-% i det totale produkt af P-2, P-3 og P-4.

Som vist i tabel 4 og 5 producerede stamme nr. C-15003 antibiotikum P-4 i en mængde på 65 til 84% af det totale under tilstedeværelse af de specifikke additiver og 25% eller mindre under fravær af sådanne komponenter. Derfor bliver udvinningen af P-4 fra dyrkningsmediet mere effektiv i det førstnævnte tilfælde end i det sidstnævnte.

Tabel 4.

Forhold mellem komponenterne (vægt/vægt-%)

Tilsætningsstof	Tilsætningsmængde (%)	Tilsætnings-tids-punkt (time)*	Forhold mellem komponenterne (%)			Total styrke (µg/ml)
			P-2	P-3	P-4	
Ikke tilsat	-	-	10	65	25	10
L-Leucin	0,1	0	5	28	67	13,5
L-Leucin	0,3	0	8	13	79	11,5
L-Leucin	0,1	72	5	30	65	10

\* Tidspunktet 0 betyder, at tilsætningsstoffet sættes til mediet som en af bestanddelene.

Tabel 5.

Forhold mellem komponenterne (vægt/vægt-%)

Tilsætningsstof	Tilsætningsmængde (%)	Tilsætnings-tids-punkt (time)*	Forhold mellem komponenterne (%)			Total styrke (µg/ml)
			P-2	P-3	P-4	
Ikke tilsat	-	-	15	60	25	18
L-Leucin	0,3	0	7	21	72	20
L-Leucin	0,5	0	5	11	84	15

\* Tidspunktet 0 har samme betydning som i noten til tabel 4.

Da P-4, som således produceres i fermentationsvæsken er et lipofilt, neutralt stof, kan det bekvemt udvindes fra fermentationsvæsken ved adskillelses- og rensningsmetoder, som normalt anvendes til udvinding af sådanne mikrobielle metaboliter. P-4 ekstraheres let fra kulturfiltratet med vand ikke blandbare organiske opløsningsmidler, såsom fedtsyreestere, f.eks. ethylacetat og amylacetat, alkoholer, f.eks. butanol, halogenerede carbonhydrider, f.eks. chloroform, og ketoner, f.eks. methylisobutylketon. Ekstraktionen af P-4 fra filtratet udføres ved et pH nær

neutralpunktet, fortrinsvis med ethylacetat ved pH 7. Ekstrakten vaskes med vand og koncentrerer under reduceret tryk. Derefter sættes et upolært opløsningsmiddel, såsom petroleumsether eller hexan, til koncentratet, og råproduktet, der indeholder den aktive forbindelse, udvindes som et bundfald. Råproduktet underkastes fortløbende passende rensningsmetoder, om ønsket. Som en rutinemæssig rensningsmetode er adsorptionskromatografi således nyttig, og til dette formål kan anvendes almindelige adsorptionsmidler, såsom silicagel, aktivt aluminiumoxid og makroporøs, ikke-ionisk, adsorberende harpiks. P-4 i råproduktet underkastes silicagelkromatografi, f.eks. med petroleumsether og hexan, og elueres ved tilsætning af et polært opløsningsmiddel, såsom ethylacetat, acetone, ethanol eller methanol, eller et halogeneret carbonhydrid, såsom dichlormethan eller chloroform, indeholdende et polært opløsningsmiddel, såsom en alkohol, f.eks. methanol eller ethanol, en keton, f.eks. acetone eller methylethylketon, eller lignende. På denne måde elueres, fraskilles og udvindes P-4.

Når en makroporøs, adsorberende harpiks anvendes til rensning af P-4, udføres elueringen af P-4 fra søjlen med en blanding af vand og en lavere alkohol, en lavere keton eller en ester. Den lavere alkohol kan f.eks. være methanol, ethanol, propanol eller butanol, og den lavere keton kan f.eks. være acetone eller methylethylketon. Esteren kan f.eks. være ethylacetat eller butylacetat. I en typisk fremgangsmåde opløses råproduktet II i 60%'s methanolvand og adsorberes på en søjle af "Diaion HP-10", som er en non-ionisk makroporøs ionbytterharpiks. Søjlen vaskes med 70%'s methanolvand, og P-4 elueres med 90%'s methanolvand.

I den ovenfor beskrevne fremgangsmåde samles fraktionerne, der indeholder P-4, og de koncentrerer under reduceret tryk. Til det tørre produkt sættes 5 til 8 volumen ethylacetat, og blandingen henstår, hvorefter P-4 udskilles som krystaller.

Ifølge den omhandlede fremgangsmåde når produktionsandelen af P-4 i C-15003-produkterne ca. 65% eller mere, og P-4 udvindes let fra dyrkningsmediet. Den omhandlede fremgangsmåde er derfor meget fordelagtig til en industriel fremstilling af P-4.

De fysisk-kemiske egenskaber af det i eksempel 1 opnåede P-4 er vist i tabel 6.

Tabel 6.

Antibiotikumet C-15003 P-4  $C_{33}H_{45}ClN_2O_9 = 649.196$

Smeltepunkt ( $^{\circ}C$ )	177-180
Specifik drejning $[\alpha]_D^{22^{\circ}}$	$-142^{\circ} \pm 10^{\circ}$ ( $c = 0,522 \text{ CHCl}_3$ )
Elementaranalyse Fundet (%)	C 60,65 H 7,05 N 4,25 Cl 5,23
Elementaranalyse Beregnet (%)	C 61,05 H 6,99 N 4,32 Cl 5,46
Ultraviolet absorptions- spektrum nm ( $\epsilon$ ) (i methanol)	233 (29900) 240 (sh 28240) 252 (27590) 280 (5712) 288 (5680)
Infrarødt absorptions- spektrum ( $\text{cm}^{-1}$ ) KBr	1740, 1730, 1670, 1580, 1445, 1385, 1340, 1255, 1180, 1150, 1100, 1080, 1038
Nuclearmagnetisk resonans- spektrum (ppm) 100 MHz i $\text{CDCl}_3$	1,03(d) (6H)
Massespektrum (m/e)	587, 485, 470, 450

Tabellen fortsat.

Opløselighed	Uopløseligt i petroleumsether, hexan og vand. Lidt opløseligt i benzen og ether. Opløseligt i chloroform, ethylacetat, acetone, ethanol, methanol, pyridin, tetrahydrofuran og dimethylsulfoxid
Farvereaktioner	Dragendorff: Positiv Beilstein: Positiv

Den biologiske aktivitet af P-4 er som følger:

A) Antimikrobiel aktivitet:

Med trypticase-sojaagar (BBL) som prøvemedium undersøgte de inhibitoriske koncentrationer overfor de nedennævnte mikroorganismer ved papirskivemetoden. Filtrerpapirskiver (Toyo Seisakusho, tynd type, 8 mm i diameter), som hver var imprægneret med 0,02 ml af en 300 µg/ml opløsning af P-4, placeredes på agarplader, der hver især var inokuleret en af de nedennævnte mikroorganismer. P-4 havde ingen aktivitet mod de følgende bakterier:

*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* og *Mycobacterium avium*.

På den anden side inkuberedes væksten af en svamp, *Talaromyces avellaneus*, af P-4 på en agarplade bestående af 3,5 g dinatriumhydrogenphosphat, 0,5 g monokaliumdihydrogenphosphat, 5 g gærekstrakt (Difco), 10 g glucose, 15 g agar og 1000 ml destilleret vand, pH 7,0. Den minimale inhibitoriske koncentration var 1,0 til 1,5 µg/ml for P-4. Endvidere dyrkedes *Tetrahymena pyriformis* W på et prøvemedium [sammensat af 20 g proteose-pepton (Difco), 1 g gærekstrakt, 2 g glucose, 1000 ml destilleret vand og 10 ml 1 M phosphatpuffer, pH 7,0] ved 28°C i 44 til 48 timer, og den vækstinhibitoriske aktivitet af P-4 mod denne protozo bestemtes ved seriefortyndingsmetoden. Vækstinhibition optrådte ved 0,5 µg/ml for C-15003 P-4.



P-4 havde aktivitet mod de følgende mikroorganismer:  
Fusicladium levieri, Helminthosporium sigmoidium var.  
irregulare, Pyricularia oryzae, Cochlioborus miyabeanus,  
Sclerotinia sclerotiorum, Pellicularia sasakii, Tricho-  
phyton rubrum, Rhodotorula rubra og Cryptococcus neoformans.

B) Antitumoraktivitet:

De terapeutiske virkninger af P-4 (indgivet intraperitonealt i 9 på hinanden følgende dage) på P388-leukæmi hos mus ( $1 \times 10^6$  celler/dyr, mus, intraperitonealt transplanteret) undersøgtes. P-4 havde en antitumoraktivitet så høj som 180% levetidsforøgelse ved en dosisstørrelse på 0,00625 mg/kg/dag.

C) Toksicitet:

I en foreløbig akut-toksicitetstest med mus som forsøgsdyr med intraperitoneale injektioner af P-4 viste dette antibiotikum en LD<sub>50</sub>-værdi på over 0,313 mg/kg.

Som førnævnt har P-4 stærk inhibitorisk aktivitet mod fungi og protozoer og er derfor værdifuldt som antifungalt eller antiprotozoisk middel. Da P-4 viser en levetidsforøgende virkning på tumorbærende pattedyr (f.eks. mus), forventes det også, at forbindelsen vil være anvendelig som antitumorlægemiddel.

P-4 kan som antifungalt og antiprotozoisk middel med fordel anvendes til en vurdering af den bakterielle økologi i jorden, i aktivt slam, i dyrs legemsvæske eller lignende, således når værdifulde bakterier skal isoleres fra jordprøver, eller når virkningerne af bakterier skal vurderes uafhængigt af virkningerne af fungi og protozoer i forbindelse med funktionen og analysen af et aktivt slamanlæg anvendt til behandling af spildevand, kan det foreliggende antibiotikum udnyttes til opnåelse af en selektiv vækst af den bakterielle flora uden at tillade vækst af de ledsagende fungi og protozoer i prøven. I et typisk tilfælde sættes prøven til et flydende eller fast medium, og der tilsættes 0,1 ml af en 10 til 100 µg/ml opløsning af P-4 i 1%'s methanol-vand pr. ml af mediet, som derefter inkuberes.

P-4 kan også anvendes som antimikrobielt middel til behandling af plantesygdomme forårsaget af de mikroorganismer, der er nævnt i det ovenstående. I den typiske anvendelse bruges P-4 i form af en 1%'s methanolisk vandig opløsning indeholdende 0,5 µg/ml til 5 µg/ml af antibiotikumet. P-4 kan f.eks. anvendes til at kontrollere bladpest, helminthosporium-bladpletsyge og skedevissen hos risplanter.

De følgende eksempler skal belyse opfindelsen nærmere; dele er vægtdele, såfremt andet ikke er angivet, forholdet mellem dele og volumendele svarer til forholdet mellem g og ml, og % er baseret på vægt/volumen, med mindre andet er angivet.

#### Eksempel 1.

##### A.

40 volumendele podningskulturmedium (1,0% glucose, 2,0% bacto-trypton og 1,2% bacto-gærekstrakt, pH 7,0) hældes i en 200 volumendele Erlenmeyer-kolbe.

Efter sterilisation inokuleredes *Nocardia* nr. C-15003 (IFO 13726) i mediet. Det inokulerede medium inkuberedes ved 28°C i en roterende rystemaskine (200 omdr./min.), hvorved der opnåedes en podningskultur. Cellerne i kulturen vaskedes tre gange med steriliseret, destilleret vand, og de vaskede celler genopslæmmedes i steriliseret, destilleret vand med samme volumen som det oprindelige medium.

En volumendel af den ovenstående blanding inokuleredes i 40 volumendele hovedkulturmedium bestående af 3% opløselig stivelse, 0,2% ammoniumchlorid, 0,05% magnesiumsulfat, 1,09% kaliumdihydrogenphosphat, 2,09% dikaliumhydrogenphosphat, 0,001% ferrosulfat og 0,3% L-leucin, og dyrkningen udførtes ved 28°C i 8 dage i en roterende rystemaskine (200 omdr./min.).

Den totale produktionsmængde af C-15003 var 12 µg/ml, og andelen af P-4 heri var 80% (vægt/vægt).

B.

500 volumendele af den under A opnåede podningskultur inokuleredes i en 2000 volumendele Sakaguchi-kolbe og dyrkedes ved 28°C i 48 timer i en frem- og tilbagegående ry-stemaskine (110 slag/min.), hvilket gav et inokulum. Inokulumet overførtes til 100 x 10<sup>3</sup> volumendele af et medium bestående af 2,0% glucose, 3,0% opløselig stivelse, 1,0% majsstøbevand, 1,0% sojabønneemel, 0,5% polypepton, 0,3% natriumchlorid, 0,5% calciumcarbonat (vægt/vol.), pH 7,0, i en 200 x 10<sup>3</sup> volumendele rustfri stålfermentor.

Dyrkningen gennemførtes ved 28°C i 48 timer under gennemluftning (100 l/min.) og omrøring (200 omdr./min.). Dyrkningsmediet (10 x 10<sup>3</sup> volumendele) overførtes til 100 x 10<sup>3</sup> volumendele af et fermentationsmedium (5% dextrin, 3% majsstøbevand, 0,1% pepton, 0,5% L-leucin og 0,5% calciumcarbonat (vægt/vol.), pH 7,0) i en 200 x 10<sup>3</sup> volumendele rustfri stålfermentor.

Fermentationen udførtes ved 28°C i 4 dage under gennemluftning (100 x 10<sup>3</sup> volumendele/min.) og omrøring (150 omdr./min.).

Den totale produktion af C-15003 var 12 µg/ml, og andelen af P-4 i C-15003 var ca. 85% (vægt/vægt).

C.

Til 95 x 10<sup>3</sup> volumendele af det under B opnåede dyrkningsmedium sattes 50 x 10<sup>3</sup> volumendele acetone. Blandingen omrørtes i 30 minutter. Til den resulterende blanding sattes 2 x 10<sup>3</sup> dele "Hyflo Super-Cel", og blandingen omrørtes godt.

Blandingen filtreredes gennem et trykfilter, hvorved der opnåedes 135 x 10<sup>3</sup> volumendele filtrat. Til filtratet sattes 50 x 10<sup>3</sup> volumendele vand og 90 x 10<sup>3</sup> volumendele ethylacetat, og blandingen omrørtes og ekstraheredes to gange.

De opnåede ethylacetatlag samledes og vaskedes to gange med vand, hver gang med  $80 \times 10^3$  volumendele. Til det opnåede ethylacetatlag sattes  $1 \times 10^3$  dele vandfrit natriumsulfat, og blandingen tørredes og koncentreredes til 200 volumendele. Til koncentratet sattes petroleumsether, og det fremkomne bundfald udvandt ved filtrering, hvilket gav 35 dele af råproduktet.

Til det således opnåede råprodukt sattes 50 volumendele ethylacetat, og blandingen omrørtes.

De uopløselige bestanddele fjernedes ved filtrering, og til filtratet satte 10 dele silicagel (0,05 til 0,2 mm). Efter omrøring af blandingen fjernedes ethylacetatet ved destillation under reduceret tryk. Remanensen anbragtes øverst i en silicagelsøjle (500 volumendele). Antibiotikaerne elueredes trinvis med 500 volumendele n-hexan, 500 volumendele af en blanding af n-hexan og ethylacetat (3:1), 2000 volumendele af en blanding af n-hexan og ethylacetat (1:1) og 2000 volumendele vandmættet ethylacetat, og eluatet opsamledes i fraktioner på hver 50 volumendele.

En volumendel af hver fraktion koncentreredes til tørhed, og 0,1 volumendel ethylacetat sattes til koncentratet, hvorved der opnåedes en blanding. Blandingens anbragtes i en plet 2,5 cm fra den nederste kant af en silicagelglasplade (60 F<sub>254</sub>, 0,25 mm, 20 x 20) og elueredes ca. 17 cm med vandmættet ethylacetat. Efter eluering gennemførtes påvisning med ultraviolet lys (2357 Å). De aktive fraktioner med R<sub>f</sub> 0,42 opsamledes og koncentreredes under reduceret tryk til ca. 2 volumendele. Til dette koncentrat sattes 20 volumendele petroleumsether, hvorved der opnåedes 1,08 dele rå krystaller. De rå krystaller opløstes i 20 volumendele varmt ethylacetat. Efter afkøling udvandt 0,92 dele P-4. Renhedsgraden af de opnåede P-4 krystaller var 94% (vægt/vægt), og deres smeltepunkt var 178-180°C.

D.

I 400 volumendele 50%'s methanol opløstes 20 dele af det under C opnåede råprodukt. 1000 volumendele "Diaion HP-10" anbragtes i en søjle (2,5 cm i diameter) sammen med 3000 volumendele 50%'s methanol-vand. Den ovenfor fremstillede prøveopløsning sendtes gennem søjlen og vaskedes med 1000 volumendele 60%'s methanol, og der udførtes kontinuerlig gradienteluering under anvendelse af 7500 volumendele 60%'s methanol-vand og 7500 volumendele 95%'s methanol-vand.

Eluatet opsamledes i 75 volumendele fraktioner, og hver fraktion underkastedes silicageltyndtlagskromatografi som beskrevet under C.

De aktive fraktioner nr. 182 til 190 opsamledes og koncentreredes. Til koncentratet sattes 500 volumendele vand og 1000 volumendele ethylacetat.

Blandingen omrystedes i en skilletragt, og det vandige lag fraskiltes, og efter to ganges vaskning med 300 volumendele vand tørredes ethylacetatlaget over vandfrit natriumsulfat, koncentreredes og henstilledes.

De resulterende krystaller af P-4 opsamledes ved filtrering og tørredes (0,950 dele P-4).

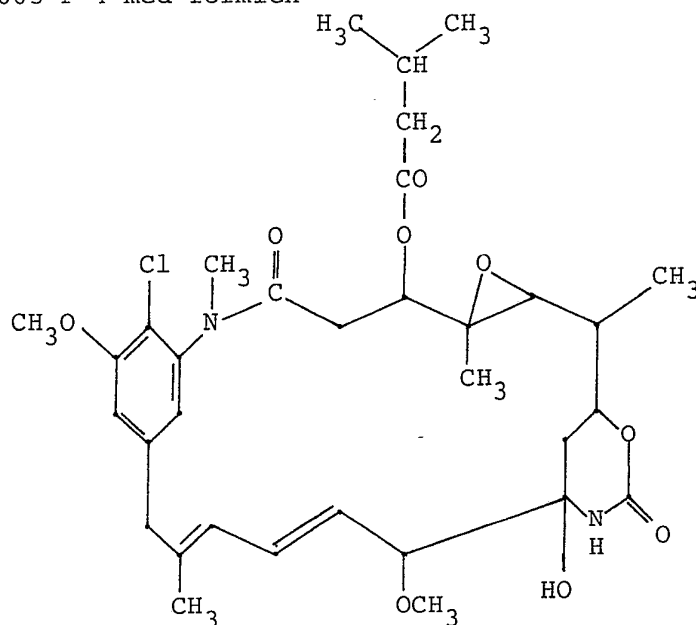
Renhedsgraden af de opnåede P-4 krystaller var 92% (vægt/vægt), og deres smeltepunkt var 177-179°C.

Eksempel 2.

På samme måde som i eksempel 1 anvendtes methylesteren af leucin, N-methylamidet af leucin,  $\alpha$ -keto-isocaprønsyre eller hydrochloridet af leucin i stedet for L-leucin, hvorved der opnåedes lignende resultater, dvs. specifik produktion af det omhandlede P-4.

## P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til fremstilling af antibiotikum C-15003 P-4 med formlen



ved dyrkning af en mikroorganisme, som hører til den art, hvortil stammen *Nocardia* nr. C-15003 (IFO 13726) hører, i et dyrkningsmedium, der indeholder assimilerbare carbonkilder og omsættelige nitrogenkilder, k e n d e t e g n e t ved, at dyrkningsmediet indeholder leucin og/eller derivater deraf.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at mikroorganismen er *Nocardia* nr. C-15003 (IFO 13726).

Fremdragne publikationer:

---