

(19) HU

MAGYAR  
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATAL

# SZABADALMI LEÍRÁS

B

(11)

196229

Nemzetközi  
osztályjelzet:

(51) NSZO,  
C 07 K 9/00,  
A 61 K 31/70

(22) A bejelentés napja: 86. 12. 29. (21) (5504/86)

A bejelentés elsőbbsége:

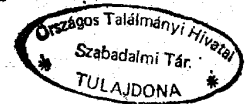
(33) GB

(32) 86. 04. 11.

(31) (8608809)

(41) (42) Közzététel napja: 87. 12. 28.

(45) A leírás megjelent: 89. 12. 12.



Feltaláló(k): (72)

SELVA Enrico, Gropello Cairoli, RIVA Ernesto, Milánó, CASSA-  
NI Giovanni, Pavia, PARENTI Francesco, Lainate, IT

Szabadalmas: (73)

Gruppo Lepetit S. p. A., Milánó, IT

(54) ELJÁRÁS AZ A 40926 ANTIBIOTIKUM N-ACILAMINOGLUKURONIL AGLIKONJAI ÉS AZ  
A 40926 ANTIBIOTIKUM AGLIKONJA, VALAMINT AZ ILYEN HATÓANYAGOT  
TARTALMAZÓ GYÓGYSZERKÉSZÍTMÉNYEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya: eljárás új antibiotikumok — nevezetesen az A 40926 AB komplex N-acilaminoglukuronil aglikonja, az A 40926 antibiotikum A faktor N-acilaminoglukuronil aglikonja, az A 540926 antibiotikum B<sub>0</sub> faktor N-acilaminoglukuronil aglikonja, az A 40926 antibiotikum B<sub>1</sub> faktor N-acilaminoglukuronil aglikonja, az A 40926 anti-

biotikum aglikonja és ezek addíciós sói előállítására, az A 40926 antibiotikum komplexből vagy ennek egy faktorából kiindulva, valamint az említett új antibiotikumok alkalmazása a rájuk érzékeny mikroorganizmusok által okozott fertőző betegségek kezelésére.

A találmány tárgya: eljárás új antibiotikumok — nevezetesen az A 40926 antibiotikum AB komplex N-acilaminoglukuronil-aglikonja, az A 40926 antibiotikum A faktor N-acilaminoglukuronil-aglikonja, az A 40926 antibiotikum B<sub>0</sub> faktor N-acilaminoglukuronil-aglikonja, az A 40926 antibiotikum B<sub>1</sub> faktor N-acilaminoglukuronil-aglikonja, az A 40926 antibiotikum aglikonja — és ezek addíciós sói előállítására, az A 40926 antibiotikum komplexből vagy ennek valamelyik faktorából kiindulva. Az új antibiotikumok alkalmasak fertőző betegségek kezelésére, amelyek a rájuk érzékeny mikroorganizmusokkal kapcsolatosak.

Az A 40926 antibiotikum komplex és ennek faktorai Gram-pozitív baktériumok és Neisseria törzsek ellen aktív antibiotikumok, amelyeket Actinomadura törzsek termelnek.

Az Actinomadura genushoz tartozó egyik, A 40926 antibiotikum komplexet termelő törzset 1984. június 8-án helyezték letétbe az American Type Culture Collection-nél (ATCC, Rockville, Maryland, Amerikai Egyesült Államok), a Budapesti Szerződés előírásai szerint.

Az A 40926 antibiotikumot és faktorait, az ezeket termelő mikroorganizmusokat és az előállításukra irányuló eljárást a 177882 számú, 1986. április 16-án közzétett európai szabadalmi bejelentés ismerteti. A fizikokémiai adatok alapján és ismert antibiotikumok szerkezetére való hivatkozással az A 40926 faktoroknak az (I) általános képlet tulajdonítható (a számozás analóg azzal, amelyet J. Williams a J. A. C. S. 106, 4895—4908, 1984 helyen javasol); e képletben

A jelentése N-(11—12 szénatomos)-acilaminoglukuronil-csoport és

B jelentése mannozil- vagy acetyl-mannozil-csoport.

Közelebbről:

— az A 40926 antibiotikum A faktor olyan előbbi képletű vegyület, amelyben A jelentése undekanoilaminoglukuronil-csoport és B jelentése mannozil-csoport;

— az A 40926 antibiotikum B<sub>0</sub> faktor olyan előbbi képletű vegyület, amelyben A jelentése izododekanoilaminoglukuronil-csoport és B jelentése mannozil-csoport és

— az A 40926 antibiotikum B<sub>1</sub> faktor olyan előbbi (I) általános képletű vegyület, amelyben A jelentése dodekanoilaminoglukuronil-csoport és B jelentése mannozil-csoport.

Az A 40926 antibiotikum PA és PB faktor abban különbözik a megfelelő A és B faktortól, hogy bennük a mannoz-egység helyett acetyl-mannóz egység van jelen.

Az A 40926 antibiotikum a komplex antibiotikumok közé tartozik; 5 komponensét különítették el, amelyeket PA, PB, A, B, és B<sub>0</sub> faktorként azonosítottak.

Legalábbis bizonyos fermentációs körülmények között az A 40926 antibiotikumot termelő törzsek fő terméke az A 40926 antibiotikum PA és PB faktor.

Az A 40926 antibiotikum A és B faktor elsősorban az A 40926 antibiotikum PA ill. PB faktor átalakulási terméke és gyakran már a fermentációban jelen van.

Azt találták, hogy az A 40926 antibiotikum PA faktor bázisos körülmények között átalakítható A 40926 antibiotikum A faktorrá, az A 40926 antibiotikum PB faktor pedig A 40926 antibiotikum B faktorrá.

Következésképp: ha egy fermentlevet vagy egy ebből előállított, A 40926 antibiotikumot tartalmazó kivonatot vagy koncentrátumot bizonyos ideig bázisos körülmények között állni hagyunk (pl. pH 9 felett, egy nukleofil bázis vizes oldatában egy éjjelen át), olyan A 40926 antibiotikum komplexet kapunk, amely A 40926 antibiotikum A és B faktorban feldúsult.

A leírásban és az igénypontokban az „A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronilaglikonjai” kifejezés az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplexre és/vagy ennek egy faktorára utal, amilyen az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon A faktor, A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B faktor, A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B<sub>0</sub> faktor és az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B<sub>1</sub> faktor.

Az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplex (nem-addíciós só alakban) a következő jellemzőket mutatja:

A) az 1. ábra szerinti UV abszorpciós spektrum, a következő abszorpciós maximumokkal:

	lambda <sub>max</sub> (nm)
a) 0,1N HCl	282
b) pH 7,4 foszfát puffer	282, 310 (váll)
c) 0,1N KOH	302

B) a 2. ábra szerinti IR spektrum, a következő abszorpciós maximumokkal (cm<sup>-1</sup>): 3700—3100; 3000—2800 (nujol); 1650; 1620—1550; 1500; 1460 (nujol); 1375 (nujol); 1300; 1250—1180; 1150; 1060; 1010; 970; 930; 840; 820

C) a 3. ábra szerinti <sup>1</sup>H-NMR spektrum, amely a következő jelcsoportokat (ppm-ben) mutatja 270 MHz-en, DMSO-d<sub>6</sub> (hexadeutero-dimetilszulfoxid) és CF<sub>3</sub>COOH elegyében felvéve, belső standardként TMS-t (0,00 ppm) alkalmazva (delta, ppm):

0,84, d és t (izopropil-CH<sub>3</sub>-ek és terminális CH<sub>3</sub>); 1,14, m [(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>]; 1,44, m (—CH<sub>2</sub>—C—CO és izopropil—CH); 2,00, t (—CH<sub>2</sub>—CO); 2,5, s (DMSO-d<sub>6</sub>); 2,5, s (N—CH<sub>3</sub>); 2,93, m (CH, (Z2)); 3,33, m [CH, (Z'2)]; 3,20—3,80, m (cukor CH-k); 5,34, d (az acilaminoglukuronsav anomer protonja); 4,10, m (X6); 4,33, d (X5); 4,43, d (X7); 4,9, m (X2); 5,1 (4F és Z6); 5,4, s (X1); 5,58, d (X4); 5,7, s (4B); 6,06, d (X3); 7,73, s (6B); 6,26—8,42, s és m (aromás CH-k és peptid NH-k); 8,70—10,5, széles s (fenolos OH-k és NH<sub>2</sub>)

d = duplett  
m = multiplett  
s = szingulett  
t = triplett

D) retenciós idő (R<sub>t</sub>) 1,20 és 1,30 a teikoplanin A<sub>2</sub> komponenshez (R<sub>t</sub> = 20,3 perc) viszonyítva, fordított fázisú HPLC-vel meghatározva, a következő körülmények között:

oszlop: Ultrasphere ODS (5 μm/Altex/Beckman) 4,6 mm (belső átmérő) × 250 mm  
elő-oszlop: Brownlee Labs RP 18 (5 μm)

A eluálószer: CH<sub>3</sub>CN 10%  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (2,5 g/l) 90%  
pH 6,0-ra beállítva

B eluálószer: CH<sub>3</sub>CN 70%  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (2,5 g/l) 30%  
pH 6,0-ra beállítva

eluálás: lineáris grádiens (5%—60% B eluálószer az A eluálószerben), 40 perc alatt

áramlási sebesség: 1,8 ml/perc

UV detektor: 254 nm

belső standard: teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponens (Gruppo Lepetit S. p. A.)

E) sóképzésre képes savas csoportok

F) sóképzésre képes amino-csoportok

G) a maghoz nem kapcsolódik mannóz-egység.

Az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon A faktor (nem-só alakban) a következő jellemzőket mutatja:

A) a következő abszorpciós maximumokat tartalmazó UV abszorpciós spektrum:

	lambda <sub>max</sub> (nm)
a) 0,1N HCl	282
b) pH 7,4 foszfát puffer	282; 310 (váll)
c) 0,1N KOH	302

B) a 4. ábra szerinti IR abszorpciós spektrum, amely a következő abszorpciós maximumokat mutatja (cm<sup>-1</sup>):

3700—3000; 3000—2800; 1650; 1585; 1505; 1460 (nujol); 1375 (nujol); 1295; 1230; 1210; 1150; 1070; 1060; 1010; 845; 820; 720 (nujol)

C) az 5. ábra szerinti <sup>1</sup>H-NMR spektrum, amely a következő jelcsoportokat mutatja (ppm-ben) 270 MHz-en DMSO-d<sub>6</sub>-ban (hexadeutero-dimetilszulfoxid) felvéve, belső standardként (0,00 ppm) TMS-t alkalmazva (delta, ppm):

0,85, t (terminális CH<sub>3</sub>); 1,0—1,3 (alifás CH<sub>2</sub>-ek); 1,42, m (OC—C—CH<sub>2</sub>); 2,00, t (CO—CH<sub>2</sub>); 2,35, s (NCH<sub>3</sub>); 2,49, s (DMSO<sub>d</sub>); 2,82, m (Z2); 2,8—3,8 (cukor-protonok és Z'2); 4,12, m (X6); 4,56, s (X1); 4,34, d (X5); 4,41, d (X7); 4,96, m (X2); 5,08—5,12 (4F és Z6); 5,40 (az acilaminoglukuronilsav anomer protonja); 5,58, d (X4); 5,74, s (4B); 6,05, d (X3); 7,75, s (6B); 6,25—8,40, s, d és m (aromás CH-k és peptid—NH-k).

D) retenciós idő (R<sub>t</sub>) 1,20 a teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponenshez viszonyítva, amelynek R<sub>t</sub> értéke 20,3 perc, az elemzést fordított fázisú HPLC technikával végezve a következő körülmények között: oszlop: Ultrasphere ODS (5 µm/Altex/Beckman) 4,6 mm (belső átmérő) × 250 mm

előoszlop: Brownlee Labs RP 18 (5 µm)

A eluálószer: CH<sub>3</sub>CN 10%  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (2,5 g/l) 90%  
pH 6,0-ra beállítva

B eluálószer: CH<sub>3</sub>CN 70%  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (2,5 g/l) 30%  
pH 6,0-ra beállítva

eluálás: lineáris grádiens (5%—60% B eluálószer A eluálószerben), 40 perc alatt

áramlási sebesség: 1,8 ml/perc

UV detektor: 254 nm

belső standard: teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponens (Gruppo Lepetit S. p. A.)

E) molekulatömeg kb. 1554, FAB—MS-sel meghatározva

F) sóképzésre képes savas funkciók

G) sóképzésre képes amino-funkció

H) a maghoz nem kapcsolódik mannóz-egység.

Az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B<sub>0</sub> faktor (a nem-addíciós só alakban) a következő tulajdonságokkal rendelkezik:

A) UV abszorpciós spektruma a következő abszorpciós maximumokat mutatja:

	lambda <sub>max</sub> (nm)
a) 0,1N HCl	282
b) pH 7,4 foszfát puffer	282; 310 (váll)
c) 0,1N KOH	302

B) a 6. ábrán bemutatott IR abszorpciós spektrum, amely a következő abszorpciós maximumokat mutatja (cm<sup>-1</sup>):

3700—3100; 3000—2800 (nujol); 1650; 1585; 1505; 1460 (nujol); 1375 (nujol); 1295; 1230; 1210; 1150; 1060; 1010; 980; 840; 820; 720 (nujol);

C) a 7. ábrán bemutatott <sup>1</sup>H-NMR spektrum, amely a következő jelcsoportokat (ppm-ben) mutatja 270 MHz-en, DMSO-d<sub>6</sub>-ban (hexadeutero-dimetilszulfoxid) felvéve, belső standardként (0,00 ppm) TMS-t alkalmazva (delta, ppm):

0,84, d (izopropil—CH<sub>3</sub>-ek); 1,0—1,3 (alifás CH<sub>2</sub>-ek); 1,3—1,6 (OC—C—CH<sub>2</sub> és izopropil—CH); 2,00, t (OC—CH<sub>2</sub>); 2,32, s (NCH<sub>3</sub>); 2,49, s (DMSO<sub>d</sub>); 2,82, m (Z2); 2,9—3,8 (cukor protonok); 4,12, m (X6); 4,44, s (X1); 4,33, d (X5); 4,37, d (X7); 4,95, m (X2); 5,06—5,10 (4F és Z6); 5,38, d (az acilaminoglukuronilsav anomer protonja); 5,59, d (X4); 5,72, s (4B); 6,05, d (X3); 7,74, s (6B); 6,27—8,5 (aromás és peptid NH-k)

D) retenciós idő (R<sub>t</sub>) 1,30 a teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponenshez (R<sub>t</sub> = 20,3 perc) viszonyítva, az elemzést fordított fázisú HPLC-vel a következő körülmények között végezve:

oszlop: Ultrasphere ODS (5 µm/Altex/Beckman) 4,6 mm (belső átmérő) × 250 mm

elő-oszlop: Brownlee Labs RP 18 (5 µm)

A eluálószer: CH<sub>3</sub>CN 10%  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (2,5 g/l) 90%  
pH 6,0-ra beállítva

B eluálószer: CH<sub>3</sub>CN 70%  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (2,5 g/l) 30%  
pH 6,0-ra beállítva

eluálás: lineáris grádiens (5%—60% B eluálószer A eluálószerben), 40 perc alatt

áramlási sebesség: 1,8 ml/perc

UV detektor: 254 nm

belső standard: teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponens (Gruppo Lepetit S. p. A.)

E) molekulatömeg kb. 1568, FAB—MS-sel meghatározva

F) sóképzésre képes savas csoportok

G) sóképzésre képes amino-csoport

H) a maghoz nem kapcsolódik mannóz-egység

Az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B<sub>1</sub> faktor molekulatömege kb. 1569, FAB—MS-sel meghatározva, és fizikokémiai tulajdonságai lényegében megegyeznek az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B<sub>0</sub> faktor előbbieken ismertetett jellemzőivel, a következő eltérésekkel: 0,84-nél (delta, ppm) triplettel rendelkezik (amely egy n-propil-csoport metilcsoportjának tulajdonítható) az előbbieken leírt NMR rendszerben, és retenciós ideje a teikoplanin

A<sub>2</sub> 2 komponenséhez viszonyítva 1,32 az előbbieken ismertetett rendszerben.

Az A 40926 antibiotikum aglikonja a következő tulajdonságokat mutatja:

A) a 8. ábra szerinti UV abszorpció spektruma a következő abszorpció maximumokat mutatja:

	lambda <sub>max</sub> (nm)
a) 0,1N HCl	280
b) pH 7,4 foszfát puffer	280; 310 (váll)
c) 0,1N KOH	299

B) a 9. ábra szerinti IR abszorpció spektruma a következő abszorpció maximumokat mutatja (cm<sup>-1</sup>):

3700—3100; 3000—2800 (nujol); 1655; 1620—1550; 1500; 1460 (nujol); 1375 (nujol); 1300; 1205; 1145; 1010; 970; 930; 840

C) a 10. ábra szerinti <sup>1</sup>H—NMR spektruma a következő jel-csoportokat (ppm-ben) mutatja 270 MHz-en DMSO—d<sub>6</sub> (hexametildeutero-dimetil-szulfoxid) és CF<sub>3</sub>COOH elegyében felvéve, belső standardként (0,00 ppm) ZTMS-t alkalmazva (delta, ppm):

2,51, s (DMSO—d<sub>2</sub>); 2,50, s (NCH<sub>3</sub>); 2,88, m (Z2); 3,33, m (Z'2); 4,10, m (X6); 4,34, d (X5); 4,43, d (X7); 4,93, m (X2); 5,04, s (4F); 5,09, s (Z6); 5,54, d (X4); 5,75, s (4B); 6,05, d (X3); 7,76, s (6B); 6,3—8,4 (aromás és peptid NH-k)

D) retenciós idő (R<sub>t</sub>) 0,59 a teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponenséhez (R<sub>t</sub> = 20,3 perc) viszonyítva, fordított fázisú HPLC-vel a következő körülmények között végezve a meghatározást:

oszlop: Ultrasphere ODS (5 μm/Altex/Beckman)

4,6 mm (belső átmérő) × 250 mm

elő-oszlop: Brownlee Labs RP 18 (5 μm)

A eluálószer: CH<sub>3</sub>CN 10%  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (2,5 g/l) 90%  
pH 6,0-ra beállítva

B eluálószer: CH<sub>3</sub>CN 70%  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (2,5 g/l) 30%  
pH 6,0-ra beállítva

eluálás: lineáris grádiens (5%—60% B eluálószer A eluálószerben), 40 perc alatt

áramlási sebesség: 1,8 ml/perc

UV detektor: 254 nm

belső standard: teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponens (Gruppo Lepetit S. p. A.)

Ugyanilyen körülmények között az L 17054 antibiotikumhoz (Gruppo Lepetit S. p. A., 119575 sz. európai szabadalmi bejelentés, közzétéve 1984. szeptember 26-án) viszonyított retenciós idő 1,42.

E) molekulatömege kb. 1211 FAB—MS-sel meghatározva

F) sóképzésre képes savas csoportok

G) sóképzésre képes amino-csoport

H) a maghoz nem kapcsolódik mannóz-egység.

A fizikokémiai adatok alapján és az ugyanezen osztályba tartozó ismert antibiotikumok szerkezetének ismeretében az A 40926 antibiotikumnak N-acilaminoglukuronil-aglikonnak az olyan előbbi (I) általános képlet tulajdonítható, amelyben A jelentése N-(11—12: szénatomos)-acilaminoglukuronil-csoport és B jelentése hidrogénatom.

Közelebbről:

— az olyan előbbi (I) általános képlet, amelyben A jelentése n-undekanoilaminoglukuronil-csoport és B jelentése hidrogénatom, az A 40926 antibioti-

kum N-acilaminoglukuronil-aglikon A faktornak tulajdonítható;

— az olyan előbbi (I) általános képlet, amelyben A jelentése izododekanoilaminoglukuronil-csoport és B jelentése hidrogénatom, az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B<sub>0</sub> faktornak tulajdonítható;

— az olyan előbbi (I) általános képlet, amelyben A jelentése n-dodekanoilaminoglukuronil-csoport és B jelentése hidrogénatom, az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B<sub>1</sub> faktornak tulajdonítható.

Ez utóbbi a találmány szerinti eljárással az A 40926 antibiotikum B<sub>1</sub> faktorból állítható elő, amely faktor az A 40926 antibiotikum B faktor komponense; R<sub>t</sub> értéke a teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponenshez viszonyítva 1,27 a 177882 sz. európai szabadalmi bejelentésben leírt és az alábbiakban ismertetett fordított fázisú rendszerben. Az A 40926 antibiotikum B faktorból a B<sub>0</sub> faktor (a nagyobb mennyiségben jelenlevő faktor) elkülönítése után állítható elő.

Az olyan előbbi (I) általános képlet, amelyben A és B jelentése hidrogénatom, az A 40926 antibiotikum aglikonnak tulajdonítható.

A leírásban és az igénypontokban A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon komplexről vagy ennek faktorairól vagy az A 40926 antibiotikum aglikonról mondtak magukban foglalják a „belső só” alakot, valamint az esetleges savas és bázisos addíciós sókat is.

A találmány szerinti vegyületek antibakteriális aktivitása in vitro a standard hígítási próba segítségével mutatható ki, különböző mikroorganizmusok alkalmazásával.

Az MIC érték (minimális gátló koncentráció) meghatározásához alkalmazott táptalajok és tenyésztési körülmények a következők:

— Isosensitest húsleves (Oxoid) — 24 óra a Staphylococcus törzsek, a Streptococcus faecalis és a Gram-negatív baktériumok (E. coli) esetében;

— Todd—Hewitt húsleves (Difco) — 24 óra más Streptococcus törzsek esetében;

— GC alap-húsleves (Difco) + 1% Isovitalex (BBL), 48 óra, CO<sub>2</sub>-ban dúsított atmoszféra a Neisseria gonorrhoeae esetében;

— Brain Heart húsleves (Difco) + 1% C adalék (Difco) — 48 óra a Haemophilus influenzae esetében;

— AC leves (Difco), 24 óra, anaerob atmoszféra a Clostridium perfringens esetében;

— Wilkins-Chalgren agar (T. D. Wilkins és S. Chalgren, Antimicrob. Ag. Chemother. 10, 926, 1976), 48 óra, anaerob atmoszféra a többi anaerob (C. difficile, Propionibacterium acnes, Bacteroides fragilis) esetében;

— PPLO leves (Difco) + 10% lószérum + 1% glükóz, 48 óra a Mycoplasma gallisepticum esetében;

— PPLO leves adalékokkal (R. T. Evans, D. Taylor-Robinson, J. Antimicrob. Chemother. 4, 57), 24 óra az U. urealyticum esetében.

Az inkubálást 37 °C-on végezzük.

Az inokulumok a következők:

— 1% (térf./térf.) 48 órás leves tenyészetből a M. gallisepticum esetében;

— kb.  $10^4$  színváltoztató egység/ml az U. urealyticum esetében;

— kb.  $10^4$ — $10^5$  telepképző egység/ml más levehígítási MIC értékek esetében;

— kb.  $10^4$ — $10^5$  baktérium (folt) a beoltást többpontos inokulátorral végezve (az agar-hígítási MIC értékek esetében) C. difficile, P. acnes, B. fragilis).

Az egyes mikroorganizmusokra vonatkozó néhány MIC értéket a következő I. Táblázatban tüntetünk fel.

I. Táblázat

Törzs	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) A 40926 antibiotikum	
	N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplex	aglikon
1	0,13	0,13
2	0,13	0,25
3	0,13	0,13
4	0,06	0,5
5	0,13	1
6	0,13	0,5
7	0,06	0,5
8		0,25
9	0,25	1
10	0,06	1
11	16	32
12	4	16
13		32
14	128 felett	128
15	64	128 felett

Törzs	A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon	
	A faktor	B, B <sub>0</sub> és B <sub>1</sub> faktor
1	0,06	0,06
2	0,13	0,13
16	0,25	0,25
3	0,06	0,06
4	0,06	0,06
5	0,06	0,06
6	0,13	0,13
7	0,06	0,06
8	0,03	0,03
12	8	8
13	32	32
14	128 felett	128 felett
17	128 felett	128 felett

1. Staph. aureus L165
2. Staph. aureus L165 ( $10^6$  telepképző egység/ml)
3. Staph. epidermidis L147 ATCC 12228 (koaguláz negatív)
4. Strep. pyogenes L49 C203
5. Strep. pneumoniae L44 UC41
6. Strep. faecalis L149 ATCC 7080
7. Strep. mitis L796 (klinikai izolátum)
8. Clostridium perfringens L290 ISS 30543
9. Clostridium difficile L1363 ATCC 9689
10. Propionibacterium acnes L1014 ATCC 6919
11. Bacteroides fragilis L1010 ATCC 23745
12. Neisseria gonorrhoeae L997 ISM68/126
13. Haemophilus influenzae L 970 b típus ATCC 19418

14. Escherichia coli L47 SKF 12140

15. Mycoplasma gallisepticum L431 S6 Weybridge

16. Staph. haemolyticus L602 (koaguláz negatív)

17. Ureaplasma urealyticum L 1479 (klinikai izolátum)

Azt találtuk, hogy az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplex és faktorai különösen aktívak koaguláz negatív Staphylococcusokkal szemben. A különböző klinikai izolátumokból származó S. epidermidis és S. haemolyticus törzsekre vonatkozó MIC értékeket ( $\mu\text{g/ml}$ ) a következőkben mutatjuk be:

II. Táblázat

Törzs	A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplex MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )
S. epidermidis L 393	0,06
S. epidermidis L 408	0,13
S. epidermidis L 410	0,06
S. haemolyticus L 381	0,25
S. haemolyticus L 382	0,13
S. haemolyticus L 383	0,5
S. haemolyticus L 403	0,25

Ezenkívül azt találtuk, hogy az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplex MIC<sub>90</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ ) értéke — azaz az a koncentráció, amely 36 koaguláz negatív Staphylococcus klinikai izolátum közül legalább 90% növekedését gátolja — 0,5  $\mu\text{g/ml}$ .

A találmány szerinti vegyületek antimikrobiális aktivitását egérben, kísérleti vérmérgezés esetében is megerősítettük.

A kontroll és a kezelt csoportok 10—10 db, 18—22 g tömegű CD—1 egeret (Charles River) tartalmaztak. Ezeket intraperitoneálisan fertőztük 0,5—0,5 ml baktérium-szuszpenzióval, amelyet úgy állítottunk elő, hogy S. pyogenes C 203 (L49) egy éjszakán át növesztett tenyészetét steril peptonizált sóoldattal hígítottuk. Az inokulumokat úgy állítottuk be, hogy a nem-kezelt állatok 48 órán belül elpusztuljanak a vérmérgezésben. A megvizsgálandó vegyületeket közvetlenül a fertőzés után szubkután adagoltuk be. A hetedik napon, Spearman és Kärber módszerével (D. J. Finney: Statistical Methods in Biological Assay, Griffin, p. 524, 1952) az egyes dózisokhoz tartozó túlélő állatok százalékos mennyisége alapján kiszámítottuk az ED<sub>50</sub> értékeket (mg/kg-ban).

Ilyen körülmények között az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplex, ill. az A 40926 antibiotikum aglikon ED<sub>50</sub> értéke 0,54 ill. 6,2 mg/kg.

Az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplex, ennek faktorai és az A 40926 antibiotikum aglikon savas és bázisos csoportokat tartalmaz és szerves, ill. szervetlen ellenionokkal a szokásos eljárások keretében sókat képez.

A találmány szerinti vegyületek jellegzetes és megfelelő savaddíciós sói a szokásos reakciókkal állíthatók elő, szerves, ill. szervetlen savakkal, amilyenek pl. a következők: sósav, hidrogénbro-

mid, kénsav, foszforsav, ecetsav, trifluorecetsav, triklórecetsav, borostyánkősav, citromsav, aszkorbinsav, tejsav, maleinsav, fumársav, palmitinsav, kólsav, pamoinsav, nyálkasav, glutaminsav, kámforsav, glutársav, glikolsav, ftálsav, borkősav, laurinsav, sztearinsav, szalicilsav, metánszulfonsav, benzolszulfonsav, szorbinsav, pikrinsav, benzoészav, fahéjsav stb.

A bázisok jellegzetes példái: alkálifém- vagy alkáliföldfém-hidroxidok (pl. nátrium-, kálium-, kalcium-, magnézium-, báriumhidroxid), ammónia és az alifás, aliciklusos vagy aromás szerves aminok (pl. metilamin, dimetilamin, trimetilamin és a pikolin).

A találmány szerinti „nem-só” vegyületek átalakítása a megfelelő addíciós sókká és viszont (azaz egy találmány szerinti vegyület addíciós sójának átalakítása a nem-só alakká) a szakember tudásához tartozik és a találmány kiterjed ezekre a műveletekre.

Az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplex és/vagy ennek faktorai és az A 40926 antibiotikum aglikon pl. úgy alakítható át a megfelelő sav- vagy bázis-addíciós sóvá, hogy a nem-só alakot vizes oldószerben oldjuk és kis moláris feleslegben az oldathoz adjuk a kiválasztott savat vagy bázist. A keresett só kinyerésére ezután a kapott oldatot vagy szuszpenziót liofilizáljuk.

Abban az esetben, ha a végeredményként kapott só oldhatatlan abban az oldószerben, amelyben a nem-só alak oldható, a sót szűrővel nyerjük ki a nem-só alak szerves oldószeres oldatából, a kiválasztott sav vagy bázis sztöchiometrikus mennyiségben vagy kis moláris feleslegben való hozzáadása után.

Ezekre az oldhatatlan sókra példák a kalcium-, magnézium- és a bárium-sók.

A nem-só alak úgy állítható elő, hogy a megfelelő savval vagy bázissal képezett sót vizes oldószerben oldjuk, majd az oldatot a nem-só alak felszabadítására semlegesítjük.

Ha a semlegesítést követően a sav vagy a bázis feleslegének eltávolítására van szükség, a szokásos sómentesítési eljárást alkalmazhatjuk.

Előnyösen alkalmazható pl. a szilanizált szilikagélén végzett oszlopkromatográfia; erre a célra használhatunk funkcionálisan át nem alakított polisztirolt, akril- és ellenőrzött pórusnagyságú polidextrán-gyantákat (amilyen pl. a Sephadex LH 20) is, valamint aktív szén. Miután a nem-keresett sókat vizes oldattal eluáljuk, a keresett terméket víz és egy poláris vagy apoláris szerves oldószer elegyével (pl. 50:50 acetonitril:víz elegy — kb. 100% acetonitril) eluáljuk, lineáris grádiens vagy lépcsős grádiens alkalmazása mellett.

Mint ez a szakember számára ismert, a gyógyászati szempontból elfogadható savakkal (vagy bázisokkal) vagy a gyógyászati szempontból nem elfogadható savakkal (vagy bázisokkal) végzett sóképzés célszerű tisztítási technikaként alkalmazható. Kialakulása és elkülönítése után egy A 40926 antibiotikum só-alakja átalakítható a megfelelő nem-só alakká vagy egy gyógyászati szempontból elfogadható só-alakká.

Egyes esetekben az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplex, vagy egy

faktora, illetőleg az A 40926 antibiotikum aglikon bázis-addíciós sója oldhatóbb vízben és hidrofíli oldószerben.

5 Az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikonok és az A 40926 antibiotikum aglikon előállítására:

10 Az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplexet, az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon A faktort, az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B faktort, az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B<sub>0</sub> faktort, az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B<sub>1</sub> faktort és az A 40926 antibiotikum aglikont ellenőrzött savas hidrolízissel állítjuk elő az A 40926 antibiotikum komplexből, ennek valamelyik faktorából (ezek: az A 40926 A faktor, A 40926 B faktor, A 40926 PA faktor, A 40926 PB faktor, A 40926 B<sub>0</sub> faktor és A 40926 B<sub>1</sub> faktor) vagy ezek faktorok tetszőleges arányú keverékéből.

20 Ezt a hidrolízist általában egy erős sav jelenlétében végezzük, megfelelő szerves oldószerben. A reakció hőmérséklete tág határok között változtatható: előnyösen 4 °C és 100 °C között, legelőnyösebben pedig 25 °C és 80 °C között helyezkedik el.

25 A reakció időtartama a konkrét reakció-körülmények függvényében változik.

A reakcióidő általában 30 perc és 120 óra közötti időtartam.

30 Mivel azonban a reakció lefolyása TLC-vel vagy HPLC-vel követhető, a szakember képes annak eldöntésére, hogy a kiindulási anyagok hidrolízisét mikor kell teljesnek tekinteni és mikor indítható meg a kinyerési eljárás.

35 Az erős savakra jellegzetes példák az ásványi és az erős szerves savak, amilyenek a hidrogénhalogénidok (pl. a hidrogénklór, hidrogénbromid és hidrogénjodid), a foszforsavak, kénsav, halogénecetsavak (pl. a triklórecetsav, trifluorecetsav, klór-difluorecetsav) stb.

40 Megfelelőnek tekintjük azt a szerves oldószert, amely a következő tulajdonságokkal rendelkezik:

45 a) legalább részben képes oldatba vinni a kiindulási anyagokat;

b) az előállított termékek vagy kiválnak az oldószerből vagy a szokásos eljárásokkal elkülöníthetők;

50 c) semmiképpen sem befolyásolja kedvezőtlenül a reakció lefolyását.

55 Az ilyen szerves oldószerekre példák a protikus vagy aprotikus oldószerek, pl. az 1—4 szénatomos alkil-szulfoxidok (pl. a dimetil-szulfoxid és a dietil-szulfoxid), az 1—4 szénatomos alkil-formamidok (pl. a dimetil-formamid és a dietil-formamid), a dioxán, tetrahydrofuran és hasonló oldószerek, amelyek a kiválasztott savval kompatibilisek.

60 A hidrolízist általában korlátozott mennyiségű víz (pl. a reakcióelegy 0,1—10%-ának (tömeg/tömeg/megfelelő mennyiségű víz) jelenlétében hajtjuk végre. Ez a vízmennyiség nyilvánvalóan már jelen lehet vagy a kiindulási anyagokban, az oldószerekben vagy a reagensekben, vagy szükség esetén ad hoc hozzáadható.

65 A találmány szerinti eljárás egyik előnyös változata szerint dimetil-szulfoxid/cc. sósav elegyet használunk, 40 °C és 80 °C közötti hőmérsékleten.

A dimetil-szulfoxid/cc. sósav aránya általában 8:2—9,5:0,5. Tömény sósavként kitüntetetten a 37%-os (tömeg/tömeg) sósavat alkalmazzuk.

A reakció terméke általában az N-acilaminoglukuronil-aglikon és az aglikon elegye. A hőmérséklet ellenőrzésével és egyes esetekben a sav koncentrációja és erőssége beállításával az eljárást — legalábbis bizonyos mértékben — úgy irányíthatjuk, hogy a két főtermék — azaz az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikonok és az A 40926 antibiotikum aglikon — közül valamelyikhez jussunk. Közlelebből: viszonylag alacsony hőmérséklet fenntartásával, a sav-keverék töménységének lehetséges csökkentésével és a reakcióidő megfelelő ellenőrzésével az N-acilaminoglukuronil-aglikonok kitermelése növelhető, míg aránylag magasabb hőmérsékleteken és hosszabb idők alatt egyedül az aglikont kapjuk.

A reakció lefolyását ebben az esetben is TLC-vel vagy előnyösen HPLC-vel követjük és a reakciót leállíthatjuk, amint a keresett anyag optimális termelését elértük, annak érdekében, hogy a további kinyerési eljárás kitermelését a maximálisra növeljük.

Ha olyan terméket kapunk, amely az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikonok és az A 40926 antibiotikum aglikon keveréke, ez kromatográfiával (így folyadék-folyadék kromatográfiával, gyorskromatográfiával, HPLC-vel = nagy nyomású folyadékkromatográfiával és affinitáskromatográfiával) választható szét.

Ha affinitáskromatográfiát alkalmazunk, egy kitüntetett adsorbens az immobilizált D-alanil-D-alanin, amelyet a 122969 sz. európai szabadalmi leírás (közvetéve 1984. október 31-én) ismertet. Különösen kitüntetett az agaróz-epszilon-aminokaproil-D-alanil-D-alanin. Az eluáló elegy vizes pufferből és egy sóoldatból áll. A pH és a sókoncentráció beállítása hatására az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikonjai elkülönülnek az A 40926 antibiotikum aglikontól.

A találmány további tárgya és előnyös kiviteli módja eljárás az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplex vagy ennek egyik faktora túlnyomó mennyiségben való előállítására, amely abból áll, hogy az A 40926 antibiotikum komplexet vagy ennek egyik faktorát (azaz az A 40926 antibiotikum AB komplexet, az A 40926 antibiotikum A faktort, az A 40926 antibiotikum B faktort, az A 40926 antibiotikum B<sub>0</sub> faktort, az A 40926 antibiotikum B<sub>1</sub> faktort, az A 40926 antibiotikum PA faktort vagy az A 40926 antibiotikum PB faktort) ellenőrzött savas hidrolízisnek vetjük alá egy poláris aprotikus oldószer és egy erős ásványi vagy szerves sav keverékével, korlátozott (0,1—10 tömeg/tömeg%) mennyiségű víz jelenlétében, a szobahőmérséklet és 100 °C (előnyösen 40 °C és 65 °C) közötti hőmérsékleten, 3—120 órán át.

Legelőnyösebben a hidrolizáló elegy dimetil-szulfoxid és 37%-os sósav 9:1—9,5:0,5 arányú elegye, a hőmérséklet 65 °C és a reakcióidő 5 óra.

Ha az N-acilaminoglukuronil-aglikonok előállításához kiindulási anyagként az A 40926 antibiotikum komplexet alkalmazzuk, olyan végerterméket kapunk, amely lényegében az eredeti komplex faktorainak megfelelő keverék, míg ha egyetlen fak-

tort — pl. az A 40926 antibiotikum A faktort vagy B faktort — alkalmazunk, egyetlen N-acilaminoglukuronil-aglikon faktort kapunk, amely az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon A faktorról, illetőleg az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B, B<sub>0</sub> vagy B<sub>1</sub> faktorról azonos.

Ha az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplexet kapjuk, ez ismert módon — pl. folyadék-folyadék kromatográfiával vagy előnyösen preparatív HPLC-vel — választható szét az egyes faktorokra.

Egy kitüntetett eljárás szerint fordított fázisú folyadék-kromatográfiát végzünk, előnyösen saválló acél oszlopokon, mérsékelt nyomáson (5—50 bar), vagy nagy nyomáson (100—200 bar). A szilárd fázis lehet egy szilanizált szilikagél, 2—18 (legelőnyösebben 18) szénatommal vagy fenilcsoporttal a szénhidrogén fázistalan; az eluálószer egy poláris, vízzel elegyedő (az előzőekben meghatározott) oldószer és egy, a gyantával kompatibilis pH-jú (előnyösen pH 4—8) vizes puffer elegye.

Legelőnyösebben lineáris gradiens elúciót végzünk egy poláris vízoldható aprotikus oldószer — pl. acetónitril — és egy pH 4—8, előnyösen pH kb. 6 vizes puffer oldat elegyével. Így 5%—45% közötti lineáris gradienst képezhetünk acetónitril: pH 6 foszfát puffer 70:30 arányú elegyével és acetónitril: pH 6 foszfát puffer 10:90 arányú elegyével.

A találmány egy további tárgya és kitüntetett foganatosítási módja eljárás az A 40926 antibiotikum aglikon szelektív előállítására, amely abból áll, hogy az A 40926 antibiotikum komplexet vagy ennek egyik faktorát — azaz az A 40926 antibiotikum AB komplexet, az A 40926 antibiotikum A faktort, az A 40926 antibiotikum B faktort, az A 40926 antibiotikum PA faktort, az A 40926 antibiotikum PB faktort, az A 40926 antibiotikum B<sub>0</sub> faktort vagy az A 40926 antibiotikum B<sub>1</sub> faktort —, az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikont vagy az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikont (az AB komplexet vagy ennek valamelyik faktorát) ellenőrzött savas hidrolízisnek vetjük alá

(a) egy szerves aprotikus oldószer jelenlétében, amelyet a következők közül választunk ki: a reakció hőmérsékletén cseppfolyós alifás savak és alfa-halogénezett alifás savak; a reakció hőmérsékletén vízzel enyhén elegyedő folyékony alifás és cikloalifás alkanolok; a reakció hőmérsékletén vízzel enyhén elegyedő folyékony fenil-helyettesített rövidszénláncú alkanolok, ahol a fenil-csoport adott esetben 1—4 szénatomos alkil-, 1—4 szénatomos alkoxi-csoportokat vagy halogénatomokat tartalmazhat helyettesítőként; és a reakció hőmérsékletén folyékony beta-poli-halogénezett rövidszénláncú alkanolok; vagy

(b) egy erős sav jelenlétében, amely kompatibilis az oldószerrel (ez lehet egy erős ásványi sav, erős szerves sav vagy hidrogén alakban egy erős savas kationcserélő gyanta) és

(c) kb. 20 °C és kb. 100 °C közötti reakcióhőmérsékleten.

Ha aprotikus oldószerként alifás savat vagy alfa-halogénezett alifás savat alkalmazunk, előnyben részesítjük az 1—5 szénatomos alifás savakat és a 2—5 szénatomos alfa-halogénezett alifás savakat,

bár eredményesen használható bármelyik alifás sav vagy alfa-halogénezett alifás sav, amely a reakció hőmérsékletén képes a kiindulási anyagok kellő mennyiségben való feloldására.

Példák az előbbi savakra: a hangyasav, ecetsav, propionsav, vajsav, izovajsav, valeriánsav, izovaleriánsav, trimetil-ecetsav, fluor-ecetsav, klór-ecetsav, difluor-ecetsav, diklór-ecetsav, trifluor-ecetsav, triklór-ecetsav, pentafluor-propionsav, 2,2,3,4,4,4-hexafluor-vajsav, heptafluor-vajsav stb.

A találmány egyik foganatosítási módja szerint előnyben részesített oldószerek a rövidszénláncú alifás savak — pl. az ecetsav és a propionsav —, vagy a rövidszénláncú alfa-halogénezett alifás savak — pl. a klór-ecetsav, diklór-ecetsav, triklór-ecetsav, difluor-ecetsav, klór-difluor-ecetsav, trifluor-ecetsav és pentafluor-propionsav. Ezen savas oldószerek közül azok, amelyek nagy sav-erősségűek, egyidejűleg képesek hatni oldószerként és erős savként, amely a hidrolitikus reakciót elősegíti, így nincs szükség egy erős sav további hozzáadására a hidrolízis-reakció elősegítésére. Erre a célra különösen hasznosnak bizonyul a trifluor-ecetsav, 75—95% közötti koncentrációban és 60 °C—90 °C közötti hőmérsékleten alkalmazva, mi mellett a reakció időtartama 0,5—8 óra között változik.

A leginkább kitüntetett foganatosítási mód szerint 5—10 szénatomos primer és szekunder alkanolokat és szekunder cikloalkanolokat alkalmazunk célszerűen a reakcióelegy oldószereiként ennek az ellenőrzött savas hidrolízisnek a lefolytatására. Példák az ilyen alkanolokra: 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 4-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol, 2,2-dimetil-3-pentanol, 2,4-dimetil-3-pentanol, 4,4-dimetil-2-pentanol, 5-metil-2-hexanol, 1-heptanol, 2-heptanol, 5-metil-1-hexanol, 2-etil-1-hexanol, 2-metil-3-hexanol, 1-oktanol, 2-oktanol, ciklopentanol, 2-ciklopentil-etanol, 3-ciklopentil-1-propanol, ciklohexanol, cikloheptanol, ciklooktanol, 2,3-dimetil-ciklohexanol, 4-etil-ciklohexanol, ciklooktil-metanol, 6-metil-5-hepten-2-ol, 1-nonanol, 2-nonanol, 1-dekanol, 2-dekanol és 3-dekanol.

A fenilcsoporttal helyettesített rövidszénláncú alkanolokra példák a következők: benzilalkohol, m-klór-benzilalkohol, o-fluor-benzilalkohol, m-fluor-benzilalkohol, p-fluor-benzilalkohol, m-metil-benzilalkohol, m-metoxi-benzilalkohol, o-etoxi-benzilalkohol, m-butoxi-benzilalkohol, p-terc. butoxi-benzilalkohol, p-terc.-butil-benzilalkohol, fenetilalkohol, e-klór-fenetilalkohol, m-klór-fenetilalkohol, o-metoxi-fenetilalkohol, m-metoxi-fenetilalkohol, o-propil-fenetilalkohol, e-etoxi-fenetilalkohol, p-fluor-fenetilalkohol, p-bróm-fenetilalkohol, o-propoxi-fenetilalkohol, o-butoxi-fenetilalkohol, 1-(p-izopropil-fenil)-etanol, 3-fenil-1-propanol, 2-fenil-1-propanol, 4-fenil-1-butanol és 3-fenil-1-butanol.

Ha a szerves protikus oldószert a beta-polihalogénezett rövidszénláncú alkanolok közül választjuk ki, amelyek a reakció hőmérsékletén folyékonnyak, előnyben részesítjük az 1—4 szénatomos beta-klór- és/vagy -fluor-alkanolokat. Példák az ilyen beta-polihalogénezett rövidszénláncú alkanolokra: a diklór-etanol, triklór-etanol, diklór-fluor-etanol, difluor-klór-etanol, difluor-etanol, trifluor-

or-etanol, 1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol, 2,2,3,4,4,4-hexafluor-butanol és a 2,2,3,3,4,4,4-heptafluor-butanol.

Az A 40926 antibiotikum aglikon előállítására előnyben részesített hidrolízis-körülmények a következők: az ellenőrzött hidrolízist egy poláris aprotikus oldószert és egy erős ásványi vagy szerves sav keverékével végezzük, korlátozott mennyiségű (0,1—10 tömeg/tömeg%) víz jelenlétében, 40 °C és 100 °C — előnyösen 65 °C és 90 °C — közötti hőmérsékleten, 1—4 óra időtartamon át.

Legelőnyösebben a következő körülményeket alkalmazhatjuk: a hidrolizáló elegy dimetil-szulfoxid és 37%-os sósav 8:2—9,5:0,5 arányú elegye; a hőmérséklet kb. 80 °C; a reakcióidő kb. 3 óra.

Mint az előbbieken erre utaltunk, ilyen körülmények között az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikonja és az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon (az AB komplex vagy ennek valamelyik faktora) — amelyek az A 40926 antibiotikum komplex (vagy ennek egyik faktora vagy az ilyen faktorok keveréke) cukor-maradékai részleges hidrolízisének termékei — ugyancsak átalakulnak A 40926 antibiotikum aglikonná.

Az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplex, ennek egyes faktora (A, B, B<sub>0</sub> és B<sub>1</sub>) és az A 40926 antibiotikum aglikon aktív Gram-pozitív baktériumokkal szemben, amelyek számos, széles körben elterjedt fertőző betegségért felelősek. Mivel ezekre a patogénekre fokozódó rezisztencia jellemző a szokásos gyógyászati kezelésekkal szemben, még mindig nagy szükség van arra, hogy új antibiotikumokat állítsunk elő.

Az antibakteriális kezeléshez az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplex, ennek valamelyik faktora és/vagy az A 40926 antibiotikum aglikon, valamint ezeknek vagy keverékeiknek nem-toxikus, gyógyászati szempontból elfogadható sói különböző módokon — pl. helyileg vagy parenterálisan — adagolhatók be. Általában előnyben részesítjük a parenterális beviteli módot.

Az injekciós készítmények olajos vagy vizes hordozókkal elkészített szuszpenziók, oldatok vagy emulziók, és hatásfokozókat tartalmazhatnak, amilyenek a szuszpendáló, stabilizáló és/vagy diszpergáló szerek.

Egy másik megoldás szerint az aktív komponens poralakú lehet, amely az adagolás időpontjában szolgáltatja a kívánt oldatot egy megfelelő vívőanyag, pl. steril víz hozzáadásakor.

A beviteli módtól függően ezek a vegyületek különböző adagolási formákban készíthetők ki.

Egyes esetekben a találmány szerinti vegyületek enterális bevonattal rendelkező adagolási alakban készíthetők ki, orális bevitel céljából, amint ez a szakember számára ismeretes (l. pl.: Remington's Pharmaceutical Sciences, 15. kiadás, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, Amerikai Egyesült Államok, p. 1614).

Erre különösen abban az esetben lehet szükség, ha főként az enterális szakaszban kívánatos az antimikrobiális anyag abszorpciója, tehát annak elváltozás nélkül kell áthaladnia a gyomor-szakaszon.

A beviendő aktív komponens mennyisége különböző tényezőktől függ, amilyen a kezelésre szoruló



beteg tömege és állapota, a bevitel módja és gyakorisága és a szóbanforgó betegségkiváltó ok.

A találmány szerinti antibiotikumok, nevezetesen az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon és az A 40926 antibiotikum aglikon, valamint ezek fiziológiailag elfogadható sói általában hatékonyak kb. 0,5—50 mg aktív komponens/testtömeg-kg napi bevétele mellett; ezt a mennyiséget tetszőlegesen osztjuk szét, napi 1—4 adagra.

Különösen előnyösen olyan adagolási egységalakban készíthetjük ki a készítményeket, amelyek kb. 100—kb. 5000 mg/egység hatóanyagot tartalmaznak.

Különböző mechanizmusok és módszerek alapulvételével készített hatású készítmények állíthatók elő, amint ez a szakember számára ismert.

Egy kitüntetett eljárás olyan készítmény hatású készítmény előállítására, amely A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikont vagy A 40926 antibiotikum aglikont tartalmaz, abból áll, hogy ennek az antibiotikumnak egy vízoldható alakját alkalmazzuk, vizes vagy olajos közegben szuszpendálva.

#### *Gyógyszerkészítmények előállítása*

Intramuszkuláris injekció céljára szolgáló egységadagolási alakot állítunk elő 5 ml steril szuszpenzióval (USP) — ez 8% propilénglikolt tartalmaz — és 500 mg fiziológiailag elfogadható bázis-addíciós sóval, amelyet az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplexből állítottunk elő.

Intramuszkuláris injekció céljára szolgáló egységadagolási alakot állítunk elő 5 ml steril szuszpenzióval (USP) — ez 8% propilénglikolt tartalmaz — és 500 mg fiziológiailag elfogadható bázis-addíciós sóval, amelyet az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon A faktorból állítottunk elő.

Intramuszkuláris injekció céljára szolgáló egységadagolási alakot állítunk elő 5 ml steril szuszpenzióval (USP) — ez 8% propilénglikolt tartalmaz — és 500 mg bázis-addíciós, fiziológiailag elfogadható sóval, amelyet az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B faktorból állítottunk elő.

Intramuszkuláris injekció céljára szolgáló egységadagolási alakot állítunk elő 1,000 mg A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon keverékkel, amelyet vízben nem oldható alakban 5 ml steril vízben (pro inj.) szuszpendáltunk.

Továbbá: a találmány szerinti antibiotikumok felhasználhatók a Clostridium difficile növekedésének elnyomására, amely a bélrendszerben pszeudomembrán-kolitist okoz. Ezek az antibiotikumok alkalmazhatók voltak a pszeudomembrán-kolitisz kezelésében az antibiotikumok vagy ezek gyógyászati szempontból elfogadható sói hatékony adagjának orális bevétele segítségével, miután a hatóanyagot gyógyászati szempontból elfogadható adagolási alakban kikészítettük. Ilyen alkalmazás esetén az antibiotikumok zselatin kapszulában vagy folyékony szuszpenzió alakjában vihetők be.

Gyógyszerként való aktivitásuk mellett az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikonjai és az A 40926 antibiotikum aglikon, valamint ezek gyógyászati szempontból elfogadható

sói felhasználhatók az állati növekedés elősegítésére.

Erre a célra a találmány szerinti vegyületeket orálisan, megfelelő takarmányban adagoljuk be. Az alkalmazott pontos koncentráció azonos azzal, amely ahhoz szükséges, hogy az aktív komponens a növekedést elősegítő hatásos mennyiségben biztosítsa normál mennyiségű takarmány elfogyasztása mellett.

A találmány szerinti aktív vegyületnek az állattakarmányhoz való hozzáadását előnyösen úgy hajtjuk végre, hogy megfelelő takarmány-premixet készítsünk elő, amely az aktív vegyületet hatásos mennyiségben tartalmazza, és a premixet belekeverjük a teljes takarmányadagba.

Egy másik megoldás szerint egy közti koncentrátum vagy takarmányadalék — amely az aktív komponens tartalmazza — keverhető össze a takarmánnyal.

A takarmány-premixek és a teljes takarmányok előállítási és beviteli módja kézikönyvekben található leírva, amilyenek pl. a következők: W. H. Freedman & Co., Applied Animal Nutrition, San Francisco, Amerikai Egyesült Államok, 1969, vagy Livestock Feeds and Feeding, O & B books, Corvallis, Oregon, Amerikai Egyesült Államok, 1977. Ezeket, a hivatkozás révén, a leírás részeivé tesszük.

#### *Az A 40926 kiindulási anyagok leírása és előállítása*

Az A 40926 antibiotikum komplex, az A 40926 antibiotikum A faktor, B faktor, B<sub>0</sub> faktor, PA faktor vagy PB faktor előállítása úgy történik, hogy egy annak termelésére képes Actinomadura sp. törzset — azaz az Actinomadura sp. ATCC 39727 törzset vagy ennek egy A 40926 antibiotikumot termelő variánsát vagy mutánsát — aerob körülmények között vizes táptalajban (amely asszimilálható szén- és nitrogénforrásokat és szervesen tartalmaz) tenyésztjük. A fermentációs iparban rendszerint alkalmazott táptalajok közül sok felhasználható, egyes táptalajokat azonban előnyben részesítünk. Kitüntetett szénforrás a glükóz, mannóz, galaktóz, keményítő, kukoricaliszt stb. Kitüntetett nitrogénforrás az ammónia, a nitrátok, szójaliszt, pepton, húskivonat, élesztőkivonat, tripton, aminosavak stb. A táptalajban alkalmazható szervesen sók azonosak azokkal a szokásosan alkalmazott oldható sókkal, amelyek képesek nátrium, kálium, vas, cink, kobalt, magnézium, kalcium, ammónium, klorid, karbonát, szulfát, foszfát, nitrát stb. ionok biztosítására.

Az antibiotikum-termelő törzset rendszerint rázólabdikban előtenyésztjük, majd a tenyészetet üvegfermentorok beoltására használjuk fel, jelentősebb mennyiségű antibiotikum előállítására. Az elő-tenyésztéshez alkalmazott táptalaj azonos lehet azzal, amelyet a nagyobb méretű fermentációkhoz használunk, de más táptalajok szintén felhasználhatók. Az A 40926 antibiotikumot termelő törzs 20 °C és 40 °C közötti hőmérsékleten, előnyösen 24 °C és 35 °C között tenyésztendő. A fermentáció alatt az antibiotikum termelést oly módon követelhetjük, hogy pl. biológiai vizsgálatokkal vagy vékonyréteg-kromatográfiával (TLC) vagy nagynyomású folyadékromatográfiával (HPLC) meg-

tározzuk a fermentlé-minták vagy a micélium kivonat minták antibiotikus aktivitását.

Vizsgálati organizmusként az A 40926 antibiotikumokra érzékeny organizmusokat használhatunk fel, amilyen a *Bacillus subtilis* és a *Streptococcus aureus*. A biológiai meghatározást előnyösen agar-diffúziós módszerrel végezzük, agar lemezekben. A maximális antibiotikum termelés általában a fermentáció 2. és 5. napja között következik be.

Az A 40926 antibiotikumot az *Actinomadura* sp. ATCC 39727 törzs — vagy ennek egy A 40926 antibiotikumot termelő mutánsa vagy variánsa — tenyésztésével állítjuk elő. Az antibiotikum főtömegében a fermentlében van jelen.

Az A 40926 antibiotikumot termelő *Actinomadura* sp. ATCC 39727 törzs jellemzését a következőkben adjuk meg:

#### Makroszkópos és mikroszkópos vizsgálat

A vegetatív micélium hajlékony, elágazó hifákból áll (átmérő kb. 0,8  $\mu$ m), amely egyes táptalajokon — ezeket a III. Táblázatban csillaggal jelöljük — többnapos növekedés után enyhe tendenciát mutat a pálcacsalakú elemekké való fragmentálásra, míg glükóz-aszparagin táptalajon kokkoid elemekké fragmentál.

Erre a törzsre egyes táptalajokon a vegetatív micélium borvörös színe jellemző.

Légmicélium csak néhány táptalajon van jelen. Közlelebről: a III. Táblázatban feltüntetettek közül csak zabliszt agaron és talaj agaron képződik. Ezek a táptalajokon a légmicélium fehér-szürke és spórahordozókat képez — amelyek sarló alakban rendeződnek el —, valamint rövid, kb. 10—20 spórából álló spirálokat.

A spórák hengeresek és átlagos méretük 0,8  $\times$  1,2  $\mu$ m.

#### A növekedési jellemzők meghatározása

A tenyésztési jellemzők meghatározásához az *Actinomadura* sp. ATCC 39727 törzset különböző, Shirling és Gottlieb által javasolt standard táptalajokon tenyésztjük (E. B. Shirling, D. Gottlieb, Method for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 16, 313—340, 1966), és ezek mellett néhány, Waksman által ajánlott táptalajt is felhasználunk (S. A. Waksman, The Actinomycetes. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Vol. 2, 328—334.).

A színmeghatározást, ha ez szükségesnek bizonyult, Maerz és Paul módszerének alkalmazásával végeztük (A. Maerz, M. Rea Paul, A Dictionary of Color, 2<sup>nd</sup> ed., McGraw-Hill Book Company Inc., New York, 1950).

Az organizmus különböző szénforrások hasznosítására irányuló képességét a Shirling és Gottlieb által leírt módszerrel határoztuk meg.

A tenyésztési és fiziológiai jellemzőket, valamint a szénforrás hasznosítást a III., IV. és V. Táblázatban mutatjuk be.

A III. Táblázat elkészítéséhez a leolvasásokat 2 hetes, 28 °C-on végzett tenyésztés után hajtottuk végre.

III. Táblázat  
Az *Actinomadura* sp. ATCC 39727 törzs  
tenyésztési jellemzői

	Táptalaj	Jellemzők
5	2. sz. táptalaj (élesztőkivonat-malátá agar)	bőséges növekedés, kérges felülettel, nyomokban borostyánszínű-rózsaszínű oldható pigment (8/L/8)
10	3. sz. táptalaj (zabliszt agar)	bőséges növekedés, sima felület, ibolyaszínű (55/E/4), nagyon gyér szürke légmicélium, lila oldható pigment (55/H/4)
15	4. sz. táptalaj (szervetlen só-keményítő agar)	mérsékelt növekedés, nagyon sima és vékony felszín, krémszínű (10/D/2)
	5. sz. táptalaj (glicerin-aszparagin agar)	mérsékelt növekedés, sima és vékony felszín (10/B/2), sárgabarack
20	6. sz. táptalaj* (pepton-élesztőkivonat vas agar)	mérsékelt növekedés, enyhén kérges felület, borostyánszínű (12/D/9)
	7. sz. táptalaj* (tirozin agar)	bőséges növekedés, sima és vékony felszín, borostyánszínű-barna (13/K/12)
25	Zabliszt agar*	intenzív növekedés, sima felszín, borvörös (8/L/7); légmicélium mérsékelt világos-sárgászürke (44/B/2)
30	Hickey—Tresner agar*	intenzív növekedés, ráncos felület, borostyánszínű-barna (13/K/12)
35	Czapek-f. glükóz agar Glükóz-aszparagin agar* Tápagar	mérsékelt növekedés, sima felület, világossárga (9/I/3) gyér növekedés, krémszínű felszín, szalmasárga (9/E/1) intenzív növekedés, ráncos felület, világossárga (11/C/7)
40	Burgonyás agar*	intenzív növekedés, ráncos felület, borvörös (8/L/9)
	Bennet-f. agar*	intenzív növekedés, kérges felület, borvörös (8/L/9); mély borostyán-rózsaszínű oldható pigment (5/J/10)
45	Kalcium-malát agar	mérsékelt növekedés, sima felszín, sárgabarack (10/E/3)
50	Lefőltözött tej-agar	intenzív növekedés, enyhén ráncos felület, narancs (9/B/9)
	Czapek-f. szacharóz agar	intenzív növekedés, sima felület, sárgabarack (10/B/6)
55	Tojásalbumin agar*	intenzív növekedés, sima felület, rózsaszínű oldható pigment nyomok (52/B/3)
	Sabouraud-f. agar	nincs növekedés
60	Talaj agar	gyér növekedés, szintelen; fehér-sárga légmicélium
	Dextróz-tripton agar*	mérsékelt növekedés, sima és vékony felület, világossárga (10/C/2)
65	Burgonyaszelet	intenzív növekedés, narancs-barna; nyomokban fehér-szürke légmicélium

Az *Actinomadura* törzs sp. ATCC 39727 törzs  
tenyésztési jellemzői  
(folytatás)

IV. Táblázat  
Fiziológiai jellemzők

Vizsgálat	Eredmények	
keményítő-hidrolízis	negatív	
H <sub>2</sub> S képződés	a 6. sz. táptalajon negatív, ólomacetátos szalagokon pozitív	10
tirozin-reakció	pozitív	
kazein-hidrolízis	pozitív	
kalcium-malát hidrolízis	negatív	15
zselatin-folyósítás	pozitív	
lakmusz-tej koagulálás	negatív	
peptonizálás	pozitív	20
cellulóz-bontás	negatív	
nitrát-redukció	pozitív	

V. Táblázat  
Szénforrás-hasznosítás

Szénforrás	Növekedés	
arabinóz	+	
xilóz	+	
mannóz	+	30
fruktóz	+	
raffinóz	+	
ramnóz	+	
glukóz	+	
laktóz	+	35
galaktóz	+	
inozit	—	
szacharóz	+	
cellulóz	—	
szalicin	+	40
mannit	+	
ribóz	—	

+ = növekedés észlelhető  
- = nincs növekedés

*Kemotaxonomiai jellemzés*

*Sejtfal elemzés*

A sejtfalban jelenlevő aminosavak elemzését Becker és munkatársai módszereivel végeztük (Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.* 12, 421—423, 1964).

A teljes sejti-hidrolizátum elemzése mezo-diaminopimelinsav jelenlétére mutat.

A Kawamoto és munkatársai módszereivel (I. Kawamoto, T. Oka, T. Mara: Cell-wall composition of *Micromonospora olivoasterospora*, *Micromonospora sagamiensis* and related organisms, *J. Bact.* 146, 527—534, 1981) előállított tiszta sejtfal elemzése glicin távollétére mutat.

*Cukorelemzés*

A cukortartalom meghatározását M. P. Lechevalier módszere szerint végeztük (Identification of aerobic *Actinomycetes* of clinical importance, *J. Lab. Clin. Med.* 71, 934—944, 1968), vékonyréteg-kromatográfiás lemezek alkalmazásával, a J. L.

Staneck és G. D. Roberts által leírt módon (Simplified approach to identification of aerobic *Actinomycetes* by thin-layer chromatography, 28, 226—231, 1974), a következő oldószer-rendszer alkalmazásával (térf./térf.): etilacetát:piridin:víz 100:35:25.

A kapott eredmények arra mutatnak, hogy főleg glükóz és ribóz van jelen, és kisebb mennyiségben ugyancsak kimutatható a galaktóz, mannóz és a maduróz.

*Mikolsavak*

A mikolsavak jelenlétének kimutatására irányuló vizsgálatokat Minnikin és munkatársai (D. E. Minnikin, L. Alshamaony, M. Goodfellow: Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia* and related taxa by thin layer chromatography analysis of whole organism methanolsates, *J. Gen. Microbiol.* 88, 200—204, 1975) módszere szerint hajtottuk végre.

A vizsgálat eredménye negatív: mikolsavak nem találhatóak.

*A törzs azonosítása*

A törzset az „*Actinomycetes*, *Actinomadura* genus” rendszertani helyre soroljuk be a következő ismérvek alapján: jelen van a mezo-diaminopimelinsav és a maduróz, nincs jelen a peptidoglikánban a glicin, hiányzik a mikolsav és mérsékelten hosszú spóraláncokat hordozó légmicélium képződik.

Más mikroorganizmusokhoz hasonlóan az A 40926 antibiotikumot termelő törzs jellemzői is változásoknak vannak kitéve. Például előállíthatjuk a törzs mesterséges variánsait és mutánsait, különböző ismert mutagénekkel (pl. UV-besugárral, röntgensugárral, nagyfrekvenciájú hullámokkal, radioaktív sugárral), vegyi anyagokkal (pl. salétromsavval, N-metil-N'-nitro-N-nitrozo-guanidinnel) és más módon való kezeléssel. Valamennyi természetes és mesterséges variánst és mutánst, amely az *Actinomadura* genus speciésai közé tartozik és A 40926 antibiotikumot termel, az *Actinomadura* sp. ATCC 39727 törzssel egyenértékűnek tekintünk.

A találmány szerinti antibiotikumoknak a termelő mikroorganizmus fermentlevéből való kinyerését ismert módon végezzük. Ezek a módszerek a következőket foglalják magukban: oldószeres extrakció, kicsapás nem-oldószerrel hozzáadásával vagy az oldat pH-jának változtatásával, megosztásos kromatográfia, fordított fázisú megosztásos kromatográfia, ioncserélő kromatográfia, affinitáskromatográfia stb.

Kitüntetett eljárás a rögzített D-alanil-D-alaninon végzett affinitáskromatográfia, amelyet fordított fázisú oszlopkromatográfia követ.

A találmány szerinti kinyerési eljárás szempontjából megfelelő rögzített D-alanil-D-alanin mátrixokat ismert a 112555 sz. európai szabadalmi bejelentés. A találmány szerinti eljárás vonatkozásában a kitüntetett mátrix a meghatározott porusméretű keresztkötéses polidextránnal összekapcsolt D-alanil-D-alanin.

A fermentlé közvetlenül szűrés után vagy előzetes tisztítási eljárás után vethető alá affinitáskromatográfiának. Az utóbbi esetben a teljes fermentlevet meglúgosítjuk — a pH-t előnyösen 8,5 és 10,5

közé állítjuk be — a micéliumon adszorbeálódott antibiotikum oldatba vitelére, majd a fermentlevet szűrjük. A tiszta szűrlet pH-ját 2,5—4,5-re állítjuk be és ismét szűrjük, szűrést elősegítő anyag jelenlétében. A szűrletet elvetjük, a kinyert szűrőlepenyt pedig vízben szuszpendáljuk, a pH-t lúgosra — előnyösen 8 és 9 közé — állítjuk be, majd a szuszpenziót szűrjük. A szűrőlepenyt ugyanilyen módon kezeljük, az A 40926 antibiotikumot tartalmazó szűrleteket pedig összegyűjtjük.

Ezeket a szűrleteket vagy a szűrt fermentleveket ezután rögzített D-alanil-D-alaninon — oszlopban vagy szakaszosan — affinitáskromatográfiának vetjük alá.

Az A 40926 antibiotikumnak az affinitást mutató mátrixhoz való kötését előnyösen kb. 7,0—8,0 pH-n végezzük és az eluálást magasabb pH értéken (előnyösen 9,0 és 10,5 között) hajtjuk végre, vizes bázis segítségével. Ez a vizes bázis lehet ammónia, egy illékony amin, egy alkáli-fém- vagy alkáliföldfém-hidroxid vagy lúgos pufferoldat, adott esetben egy poláris szerves oldószer — pl. a következőkben meghatározott poláris, vízzel elegyedő oldószer — jelenlétében.

A szennyezéseket úgy távolítjuk el, hogy az oszlopot pH 4—8 vizes pufferrel öblítjük át, amely adott esetben sókat, karbamidot és/vagy vízzel elegyedő oldószereket tartalmaz. Ezután az A 40926 antibiotikumot az előbbi eluáló szerekkel eluáljuk. A nyers antibiotikumot előnyösen úgy nyerjük ki, hogy az egyesített, antibiotikumot tartalmazó frakciókból a vizet egy szerves oldószerrel — amely vízzel minimális azeotróp keverékek képzésére képes — végzett azeotróp desztillációval eltávolítjuk, majd a keresett termék kicsapására egy nem-oldószert adagolunk.

A következőket jelöljük meg olyan oldószerek jellegzetes példáiként, amelyek vízzel minimális azeotróp elegyeket képesek alkotni: n-butanol, benzol, toluol, butiléter, széntetraklorid, kloroform, ciklohexán, 2,5-dimetil-furán, hexán és xilol. Az előnyben részesített oldószer az n-butanol.

Példák a nem-oldószerekre: petroléter, rövidszénláncú alkil-éterek (pl. etiléter, propiléter és butiléter) és rövidszénláncú alkil-ketonok, pl. acetone.

Egy másik megoldás szerint az egyesített, antibiotikumot tartalmazó frakciókat kis térfogatra töményítjük be — előnyösen egy, az előbbiekben meghatározott szerves oldószerrel végzett azeotróp desztilláció segítségével — és a kapott vizes oldatot liofilizáljuk.

Ha az eluáláshoz alkalmazott vizes bázis nem illékony, kicsapás vagy fagyasztva-száritás előtt szükségessé válhat a semlegesítés és a koncentráció sómentesítése.

Egy egyszerű sómentesítési eljárás szerint az antibiotikumot tartalmazó vizes oldatot szilanizált szilikagél oszlopra visszük fel, az oszlopot desztillált vízzel mossuk és poláris, vízzel elegyedő oldószer és víz elegyével eluáljuk.

A poláris, vízzel elegyedő oldószerek jellegzetes példái: vízben oldódó alkoholok (pl. metanol, etanol, izopropanol, n-butanol), acetone, acetonitril, rövidszénláncú alkánkarbonsavak rövidszénláncú alkilészterei (pl. etilacetát), tetrahydrofurán, dioxán, dimetil-formamid és ezek elegyei. A kitüntetett poláris, vízzel elegyedő oldószer az acetonitril.

Egy másik megoldás szerint a sómentesítést úgy hajthatjuk végre, hogy az antibiotikumot tartalmazó oldatot felvisszük az előbbiekben ismertetett affinitás-oszlopra, ezt desztillált vízzel mossuk és egy illékony vizes bázissal eluálunk, amint ezt az affinitáskromatográfiával kapcsolatos eluáció esetére az előbbiekben leírtuk.

Az így kapott termék az A 40926 antibiotikum komplex. Ezt szükség esetén tovább tisztíthatjuk vagy megosztásnak vethetjük alá az A, B, B<sub>0</sub>, PA és PB faktor előállítására.

Célszerű eljárást jelent a tiszta A 40926 antibiotikum komplex előállítására az előbbi módon kapott komplex további tisztítása affinitáskromatográfiás oszlopon. Általában az előbb említett stacionárius fázist (D-alanil-D-alanin) alkalmazzuk és a keresett antibiotikumot úgy eluáljuk, hogy az előbbiekben ismertetett, a rögzített D-alanil-D-alanin felhasználásán alapuló affinitáskromatográfiás eljárást követjük.

Kitüntetett rögzített D-alanil-D-alanin a Sepharose-epszilon-aminokaproil-D-alanil-D-alanin; puffer-elegyként előnyben részesítjük a pH 7—8-ra beállított, NaCl-ra nézve 2M 0,16%-os (tömeg/térf.) ammóniát. Előnyben részesítjük továbbá a következő oldatok alkalmazását: átöblítő oldatként pH 8—9,5-re beállított, Na—Cl-ra nézve 2M 0,16%-os (tömeg/térf.) ammónia-oldat; eluáló elegyként pH 10,5—12-re beállított, NaCl-ra nézve 2M 0,16%-os (tömeg/térf.) ammónia, mellel a leginkább kitüntetett eluáló-elegy az előbbi összetételű oldat, pH 11,5-re beállítva.

Az A 40926 antibiotikum faktorokat — nevezetesen az A 40926 antibiotikum A faktort, az A 40926 antibiotikum B faktort, az A 40926 antibiotikum B<sub>0</sub> faktort, az A 40926 antibiotikum PA faktort és az A 40926 antibiotikum PB faktort — az A 40926 antibiotikum komplex vizes oldatából oszlopkromatográfiával, előnyösen fordított fázisú oszlopkromatográfiával különítjük el. A fordított fázisú oszlopkromatográfia esetében a kitüntetett stacionárius fázis a szilanizált szilikagél. Jó eredményeket kapunk abban az esetben is, ha az oszlopkromatográfiát eredeti (funkcionálisan nem átalakított) polisztirol és akrilsv gyantákon hajtjuk végre. A kereskedelemben ezek a következő nevenek szerezhethők be: Amberlite XAD—2, XAD—4, XAD—7 és XAD—8 (Rohm és Haas), vagy Diaion HP 20 (Mitsubishi).

Abban az esetben, ha a fordított fázisú tisztítási lépést stacionárius fázisként szilanizált szilikagélén hajtjuk végre, az oszlopot — egy előnyös megoldás szerint — előzetesen egy pH 4—9 vizes pufferoldattal, előnyösen pH 5,5—6,5 puffer-oldattal hozzuk egyensúlyba, majd egy poláris, vízzel elegyedő oldószerrel (lineáris gradiens képzésével ugyanebben a pufferoldatban) eluáljuk. Jellemző példák a poláris, vízzel elegyedő oldószerekre: vízdoldható alkoholok (pl. metanol, etanol, izopropanol, n-butanol), acetone, acetonitril, tetrahydrofurán, dioxán és dimetil-formamid, illetőleg ezek elegyei. A kitüntetett poláris, vízzel elegyedő oldószer azeoacetonitril.

Az eluált frakciók antibiotikum-tartalmát a szokásos biológiai vizsgálatok segítségével — amelyen a papírkorongos vagy az agardiffúziós elemzés — határozzuk meg, valamely érzékeny mikroorganiz-

mussal. Az érzékeny mikroorganizmusok közé tartozik a *Bacillus subtilis* és a *Streptococcus aureus*.

A kromatográfiás eljárás lefolyása előnyösen követhető TLC vagy HPLC technikákkal is.

Kitüntetett HPLC technikát képvisel az olyan fordított fázisú HPLC, amelynek során porózus, gömbalakú szilanizált szilikagél részecskéket használunk fel az oszlop megtöltésére. Ezt az eljárást az előbbiekben ismertettük, a HPLC eljárásnak az A 40926 antibiotikumok elemzésére való felhasználása tárgyalásakor.

A hasonló antibiotikus aktivitást mutató frakciókat összeöntjük és az előbbiekben leírt módon sómentesítjük. Így lényegében tiszta A 40926 antibiotikum A, B, B<sub>0</sub>, PA és PB faktorhoz jutunk.

A lényegében tiszta A 40926 antibiotikum A faktort, A 40926 antibiotikum B faktort, A 40926 antibiotikum B<sub>0</sub> faktort, A 40926 antibiotikum PA faktort és A 40926 antibiotikum PB faktort az ezeket tartalmazó frakciókból számos ismert eljárással nyerhetjük ki, amilyen pl. a liofilizálás, kicsapás nem-oldószerrel vagy kicsapás a vizes oldat pH-jának megváltoztatásával.

Egy kitüntetett eljárás abból áll, hogy olyan oldószerrel adagolunk, amely képes vízzel azeotróp elegyeket képezni, azeotróp desztillációval eltávolítjuk a vizet, majd egy — pl. az előbbiekben ismertett — nem-oldószerrel adunk a maradékhoz és a képződött csapadékot szűréssel összegyűjtjük.

Legalábbis bizonyos fermentációs körülmények között az A 40926 antibiotikum PA és PB faktor az A 40926-ot termelő mikroorganizmus fő antibiotikum terméke.

Az A 40926 antibiotikum A és B faktor főként az A 40926 antibiotikum PA, illetőleg PB faktor átalakulási terméke és gyakran már a fermentleiben jelen van.

Azt találtuk, hogy az A 40926 antibiotikum PA faktor átalakítható az A 40926 antibiotikum A faktorrá, az A 40926 antibiotikum PB faktor pedig A 40926 antibiotikum B faktorrá, bázisos körülmények alkalmazásával. Az A 40926 antibiotikum PA faktor és az A 40926 antibiotikum PB faktor A 40926 antibiotikum A faktorrá, illetőleg B faktorrá alakítható át pl. 0,5—10%-os vizes ammóniával vagy más nukleofil bázissal — pl. egy szerves aminnal — szobahőmérsékleten, 8—24 órán át végzett kezeléssel.

Következésképp: ha egy A 40926 antibiotikumot tartalmazó fermentlevet, koncentrátumát vagy kivonatát bizonyos körülmények között állni hagyjuk (pl. egy nukleofil bázis vizes oldata hozzáadása után, pH 9 fölé, egy éjszakán át), olyan A 40926 antibiotikum komplexet kapunk, amely az A 40926 antibiotikum A és B faktorban feldúsult. Ha rövid az az idő, amelyen át a fermentlevet, ennek kivonatát vagy koncentrátumát a bázisos körülményeknek kitesszük, olyan A 40926 antibiotikum komplexet kapunk, amely az A 40926 antibiotikum PA és PB faktorban dúsult fel.

Ezért egy kitüntetett eljárás az olyan A 40926 antibiotikum komplex előállítására, amely A és B faktorban feldúsult, abból áll, hogy az A 40926 antibiotikum komplex oldatát (amely főként A 40926 antibiotikum PA és PB faktort tartalmaz) szobahőmérsékleten 8—12 órán át állni hagyjuk egy vizes nukleofil bázis oldatban — pl. vizes ammónia

oldatban —, majd az előbbiekben leírt módon elkülönítjük a keresett antibiotikum komplexet.

Az A 40926 antibiotikumot tartalmazó oldatokra példák a fermentlevek, kivonatok és az affinitáskromatográfia során eluált frakciók.

Ha a nyers komplexet az előbbiekben leírt módon, affinitáskromatográfiával tovább tisztítjuk, tiszta A 40926 antibiotikumot kaphatunk.

Az így kapott termékre, amely a tiszta faktorokból leszármaztatható biológiai és fizikokémiai tulajdonságokkal rendelkezik, a példákban mint A 40926 antibiotikum AB komplexre fogunk hivatkozni.

Egy kitüntetett eljárás egy A 40926 antibiotikum komplex készítmény PA és PB faktorban való dúsítására abból áll, hogy az affinitáskromatográfia során eluált frakciókat gyorsan semlegesítjük egy savval, előnyösen egy ásványi savval, pl. kénsavval vagy sósavval.

A tiszta A 40926 antibiotikum PA és PB faktor ebből a komplexből való elkülönítését valamelyik, az előbbiekben ismertett eljárás szerint végezhetjük.

Egy kitüntetett eljárást képvisel a fordított fázisú folyadékkromatográfia, előnyösen saválló acél oszlopban mérsékelt nyomáson (5—50 bar), vagy nagy nyomáson (100—200 bar). A szilárd fázis lehet egy szilanizált szilikagél, amely a szénhidrogén fázisban 2—18 (legelőnyösebben 18) szénatomos csoportokat vagy fenil-csoportot tartalmaz, az eluálószer pedig egy, az előbbiekben meghatározott poláris, vízzel elegyedő oldószer és a gyantával kompatibilis pH-jú (előnyösen pH 4—8) vizes oldat — puffer — elegye.

Az eluációt a szokásos módon követjük, a homogén antibiotikumot tartalmazó frakciókat összeöntjük és a tiszta vegyületek elkülönítésére, amelyek az alábbi jellemzőkkel rendelkeznek, az előbbiekben leírt módon kezeljük.

Bonyolult HPLC elemzéssel kimutatható, hogy az A 40926 antibiotikum B faktor ténylegesen két, B<sub>0</sub> és B<sub>1</sub> faktornak nevezett komponens keveréke.

Az A 40926 antibiotikum B<sub>0</sub> faktor — amely az A 40926 antibiotikumnak kb. 90%-át teszi ki — azzal jellemezhető, hogy R<sub>1</sub> értéke a teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponenséhez viszonyítva 1,22 a B faktor fizikokémiai jellemzőivel kapcsolatban a következő D) pontban leírt rendszerben; a B<sub>1</sub> faktor megfelelő R<sub>1</sub> értéke pedig — ez az A 40926 antibiotikum B faktor kb. 1,0%-át képviseli — ugyanebben a rendszerben 1,27.

A tiszta A 40926 antibiotikum B<sub>0</sub> faktort az A 40926 antibiotikum B faktor tovább-tisztításával állítjuk elő, pl. oly módon, hogy megismételjük az elkülönítéshez alkalmazott fordított fázisú kromatográfiás eljárást.

Az A 40926 antibiotikum B<sub>0</sub> faktor fizikokémiai és biológiai jellemzői lényegében azonosak az A 40926 antibiotikum B faktoreival, azzal a különbséggel, hogy az előbbiekben említett rendszerekben végzett HPLC elemzés során csak egy csúcsot mutat (a teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponenséhez viszonyított R<sub>1</sub> érték a leírt HPLC rendszerben 1,22).

Az A 40926 antibiotikum B faktor és az A 40926 antibiotikum B<sub>0</sub> faktor között fennálló, az előbbiekben részletezett hasonlóságok miatt a leírásban az A 40926 antibiotikum B faktor biológiai tulaj-

donságaival kapcsolatban szereplő utalásokat úgy kell érteni, hogy azok egyben az A 40926 antibiotikum B<sub>0</sub> faktorra is vonatkoznak, amely az A 40926 antibiotikum B faktor fő komponense (annak kb. 90%-át teszi ki) és nagy mértékben hozzájárul annak biológiai tulajdonságaihoz.

Egy másik megoldás szerint a találmány szerinti antibiotikumok erős vagy gyenge anioncserélő gyanták — ideértve a funkcionálisan átalakított polisztirolt, akril- vagy polidextrán mátrixokat — alkalmazásával különíthetők el a fermentléből vagy tisztíthatók tovább. A gyenge anioncserélők pl. a következő kereskedelmi neveken forgalomba hozott gyanták közül kerülnek ki: Dowex MWA-1 vagy WGR (Dow Chemical), Amberlite IRA-73 (Rohm & Haas), DEAE-Sephadex (Pharmacia). A találmány szerinti eljárásban használható erős anioncserélő gyanták pl. a következő kereskedelmi néven forgalomba hozott termékeket foglalják magukban: Dowex MSA-1, SBR, SBR-P (Dow Chemical), Amberlite IR-904 (Rohm & Haas) és QAF—Sephadex (Pharmacia).

A találmány szerinti antibiotikumoknak az ilyen gyantákról való eluálását elektrolitok — pl. nátrium- vagy káliumklorid — vizes oldatainak lineáris gradiens elegyeivel végezzük, amelyeket vízzel vagy víz és egy szerves, vízzel elegyedő oldószer — pl. rövidszénláncú alkohol (pl. 1—4 szénatomos alkohol) vagy egy rövidszénláncú alkil-keton (pl. acetone) — elegyeivel állítunk elő.

Az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikont úgy állítjuk elő, hogy az A és B faktorban feldúsított A 40926 antibiotikum komplexet, az A 40926 antibiotikum A faktort, B faktort, B<sub>0</sub> faktort vagy ezek elegyeit ellenőrzött savas körülmények között hidrolizáljuk.

Ezeket az ellenőrzött savas körülményeket úgy biztosítjuk, hogy egy ásványi vagy egy erős szerves sav tömény vizes oldatát alkalmazzuk, kívánt esetben egy aprotikus szerves oldószer jelenlétében. Kitüntetett példák az erős ásványi savakra a kén-sav és a foszforsav.

Kitüntetett erős szerves sav a trifluorecetsav.

Kitüntetett aprotikus szerves oldószer az aliciklusos vagy ciklikus alkil-éterek, amilyen pl. a dioxán és a tetrahidrofurán; a rövidszénláncú alkil-szulfoxidok — pl. a dimetil-szulfoxid — és a rövidszénláncú alkil-amidok, pl. a dimetil-formamid.

A reakció hőmérsékletét általában 0 °C és a reakcióelegy visszafolytatási hőmérséklete között tartjuk. Sok esetben ez 15 °C és 75 °C között helyezkedik el, míg kitüntetettek a 20 °C és 55 °C közötti hőmérsékletek, és leginkább kitüntetett a szobahőmérséklet.

A reakcióidő a reakció konkrét paramétereinek függvényében változik és mivel a reakció lefolyása TLC vagy HPLC technikával követhető, a szakember képes a reakció előrehaladásának figyelésére és annak meghatározására, hogy a reakció mikor tekinthető teljesnek.

Ennek az eljárásnak egy kitüntetett foganatosítási módját képviseli az A 40926 antibiotikum komplexnek vagy egy tiszta komponensének 80—95%-os vizes trifluorecetsav jelenlétében szobahőmérsékleten végzett ellenőrzött hidrolízise, az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon előállítására.

Ennek az eljárásnak egy másik előnyös módját képviseli az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikonjának 2:1—1:2 vizes 1—2N kénsav és dioxán elegye jelenlétében végzett ellenőrzött hidrolízise.

5 A hidrolízis-lépés végén kinyert nyers A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon tisztítása önmagukban ismert eljárások szerint történhet, amilyen a nem-oldószeres hozzáadásával végzett kicsapás, az oldószerrel végzett extrakció és a kromatográfia.

10 A kitüntetett kromatográfiai eljárások közé tartozik az oszlopkromatográfia, és a leginkább kitüntetett kromatográfiai eljárás a fordított fázisú oszlop-kromatográfia.

15 Egy alkalmas fordított fázisú folyadék-kromatográfiai eljárás során előnyösen saválló acél oszlopot alkalmazunk mérsékelt (5—50 bar) vagy nagy nyomáson (100—200 bar). A szilárd fázis lehet egy szilanizált szilikagél, 2—18 (előnyösen 18) szénatomos szénhidrogén fázissal, vagy fenil-csoporttal. Az eluálószer egy poláris, vízzel elegyedő oldószer és a gyantával kompatibilis pH-jú (előnyösen pH 3—8) vizes puffer elegye.

20 Jellemző példák a poláris, vízzel elegyedő oldószerre: vízdoldható alkoholok (pl. a metanol, etanol, izopropanol, n-butanol), acetone, acetonitril, alkánkarbonsavak rövidszénláncú alkilészterei (pl. az etilacetát), tetrahidrofurán, dioxán, dimetil-formamid és ezek elegyei. A kitüntetett poláris, vízzel elegyedő oldószer az acetonitril.

25 Az eluált frakciók antibiotikum tartalmát a szokásos biológiai vizsgálatok valamelyikével — amilyen a papírkorongos vagy az agardiffúziós meghatározás —, érzékeny mikroorganizmusok alkalmazásával állapítjuk meg. Az érzékeny organizmusokra példa a *Bacillus subtilis* és a *S. aureus*.

A tisztítás, akárcsak a reakció, ugyancsak előnyösen TLC vagy HPLC technikákkal követhető.

30 Egy kitüntetett HPLC technikát képvisel olyan fordított fázisú HPLC, amelynek során 18 szénatomos alkil-csoportokkal funkcionizált, porózus, gömbalakú szilanizált szilikagélt használunk fel; a gömbalakú részecskék átmérője előnyösen 5 μ (ilyen pl. az 5 μm Ultrasphere<sup>®</sup> ODS Altex, Beckman Co.). Elő-oszlopként 18 szénatomos alkil-csoportokkal funkcionizált szilikagéllal töltött oszlopot használunk (ilyen pl. az RP 18 Brownlee Labs), eluálószerként pedig egy — pl. az előbbiekből leírt — poláris, vízzel elegyedő oldószer és egy vizes puffer-oldat lineáris gradiens elegyét.

35 Ezt az oldatot előnyösen pH 5—7-re állítjuk be. Egy kitüntetett eluálószer 5—60% B eluens tartalmaz — lineáris gradiens szerinti eloszlásban — A eluensben, ahol

50 az A eluens acetonitril: pH 5—7 vizes puffer 10:90 elegye és

a B eluens acetonitril: pH 5—7 vizes puffer 10:90 elegye.

60 Mint ez a szakember számára ismert, belső standardként számos anyag alkalmazható. Ebben esetben nagyon célszerű belső standard az L 17054 antibiotikum, amelynek retenciósideje ebben a HPLC rendszerben közel áll a találmány szerinti vegyületekéhez. Ez a standard anyag ismert: a 0119575 sz. európai szabadalmi bejelentésben írják le.

A találmány szerinti vegyületek antibakteriális aktivitását in vitro standard hígítási vizsgálatokkal határozhatjuk meg, különböző mikroorganizmus tenyészetek alkalmazásával.

*Az A 40926 antibiotikum A faktor fizikokémiai jellemzői*

A) a 11. ábra szerinti UV abszorpciós spektrum, amely a következő abszorpciós maximumokat mutatja:

	lambda <sub>max</sub> (nm)
a) 0,1N HCl	281
b) pH 7,38 foszfát puffer	281; 300 (váll)
c) 0,1N nátrium- vagy káliumhidroxid	300
d) metanol	282
e) pH 9,0 foszfát puffer	282
f)	300 (váll)

B) a 12. ábrán bemutatott IR abszorpciós spektrum, amely a következő abszorpciós maximumokat mutatja (cm<sup>-1</sup>):

3700—3100; 3100—2800; (nujol); 1635; 1620—1560; 1510; 1480—1410 (nujol); 1375 (nujol); 1320—1250; 1250—1190; 1100—950; 845; 810; 720 (nujol)

C) a 15. ábrán bemutatott <sup>1</sup>H—NMR spektrum, amely a következő jel-csoportokat mutatja (ppm-ben) 270 MHz-en, DMSO—d<sub>6</sub>-ban (hexadeutero-dimetil-szulfoxid) felvéve, belső standardként TMS-t (0,00 ppm) alkalmazva (delta, ppm): 0,86 (t-k, 6H); 1,21 (kb. 11H); 1,43 (2H); 2,01 (2H); 2,31—2,34 (3H); 4—6,2 (kb. 16H); 6,2—8 (kb. 23H); 8,44; 9,22; 9,66 (széles sávok, mozgékony protonok) 2,5—4: interferencia a H<sub>2</sub>O csúcs hatására

D) retenciós idő (R<sub>t</sub>) 1,22 a teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponenséhez viszonyítva (R<sub>t</sub> = 20,3 perc) az elemzést fordított fázisú HPLC-vel a következő körülmények között végezve:

oszlop: Ultrasphere ODS (5 μm/Altex/Beckman) 4,6 mm (belső átmérő) × 250 mm

elő-oszlop: Brownlee Labs RP 18 (5 μm)

A eluálószer:

CH <sub>3</sub> CN	10%
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (2,5 g/l)	90%
pH 6,0-ra beállítva	

B eluálószer:

CH <sub>3</sub> CN	70%
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (2,5 g/l)	30%
pH 6,0-ra beállítva	

eluálás: lineáris gradiens 5%—60% B eluálószer az A eluálószerben, 40 perc alatt

áramlási sebesség: 1,8 ml/perc

UV detektor: 256 nm

belső standard: teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponens (Gruppo Lepetit S. p. A.)

Ugyanilyen körülmények között a tesztoszteronhoz (Roussel Uclaf) viszonyított retenciós idő 0,60.

E) Az elem-analízis — miután a mintát előzetesen kb. 140 °C-on közömbös atmoszférában megszáritottuk (súlyvesztés 4,6%)

— a következő közelítő (átlagos) százalékos összetételt mutatja: szén 55,82%; hidrogén 5,17%; nitrogén 6,31%; klór (összes) 4,24%; klór (ionos) 0,37%. Szervetlen maradék 900 °C-on, levegőn: 1,2%.

F) Sav-bázis titrálási görbe 2-metoxi-etanol (MCS); víz 4:1 elegyben. A HCl-felesleg hozzáadása KOH-dal végzett titrálás 4 ionizálható funkció jelenlétére utal, amelyek pK<sub>MCS</sub> értékei a következők: 4,6; 5,6; 7,2; 9,2.

G) R<sub>t</sub> érték 0,24 és a teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponenséhez viszonyított R<sub>t</sub> érték 0,70 a következő kromatográfiás rendszerben:

5% -os (súly/térf.) vizes Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 70  
acetónitril 30  
szilanzált szilikagél (60 F<sub>254</sub>, Merck) lemezeket alkalmazva (rétegvastagság 0,25 mm)

Előhívás:

— UV fény

15 — Pauly-reagenssel — azaz diazotált szulfanilsavval (J. Chromatogr. 20, 171, 1965; Z. Physiol. Chem. 292, 99, 1953) sárga szín

— bioautográfia Bac. subtilis ATCC 6633 felhasználásával, minimális Davis táptalajon

20 H) molekulatömeg kb. 1716 a FAB—MS spektrumból levezetve, amely 1717-nél mutatja az M + H<sup>+</sup> csúcsot.

*Az A 40926 antibiotikum B faktor fizikokémiai jellemzői*

25 A) a 14. ábrán bemutatott UV abszorpciós spektrum a következő abszorpciós maximumokat mutatja:

	lambda <sub>max</sub> (nm)
a) 0,1N HCl	282
b) pH 7,38 foszfát puffer	281, 300 (váll)
c) 0,1N nátrium- vagy káliumhidroxid	300
d) pH 9,0 foszfát-puffer	283; 300 (váll)
e) metanol	282

B) a 15. ábrán bemutatott IR abszorpciós spektrum a következő abszorpciós maximumokat mutatja (cm<sup>-1</sup>):

3700—3080; 3080—2700 (nujol); 1720—1625; 1625—1560; 1505; 1460 (nujol); 1375 (nujol); 1295; 1230; 1210; 1150; 1100—1040; 1030; 1015; 970; 890; 840; 810; 720 (nujol)

C) a 16. ábrán bemutatott <sup>1</sup>H—NMR spektrum a következő jel-csoportokat mutatja (ppm) 270 MHz-nél; a spektrumot DMSO—d<sub>6</sub>-ban (hexadeutero-dimetilszulfoxid) vettük fel, belső standardként (0,00 ppm) TMS-t alkalmazva; delta (ppm): 0,85 (d, izopropil-metilek); 1,15 (kb. 13H); 1,44 (kb. 2H); 2,02 (2H); 2,32—2,35 (3H); 4—6,1 (kb. 16H); 6,1—8 (kb. 23H); 8,52; 9,30; 9,68 (széles sávok, mozgékony protonok); 2,5—4: interferencia a H<sub>2</sub>O csúcsok miatt

D) retenciós idő (R<sub>t</sub>) a teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponenséhez viszonyítva (R<sub>t</sub> = 20,3 perc) 1,22 és 1,27 a következő körülmények között fordított fázisú HPLC módszerrel végzett elemzés során:

oszlop: Ultrasphere ODS (5 μm/Altex/Beckman) 4,6 mm (belső átmérő) × 250 mm

elő-oszlop: Brownlee Labs RP 18 (5 μm)

A eluálószer:

CH <sub>3</sub> CN	10%
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (2,5 g/l)	90%
pH 6,0-ra beállítva	

B eluálószer:

CH <sub>3</sub> CN	70%
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (2,5 g/l)	30%
pH 6,0-ra beállítva	

eluálás: lineáris gradiens 5%—60% között (B eluálószer az A eluálószerben), 40 perc alatt  
áramlási sebesség: 1,8 ml/perc

UV detektor: 254 nm

belső standard: teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponens  
(Gruppo Lepetit S. p. A.)

E) az elem-analízis — a minta előzetes, kb. 140 °C-on közömbös atmoszférában való szárítása után (súlyvesztés 9,6%) — a következő közelítő (átlagos) százalékos összetételt mutatja: szén 54,09; hidrogén 5,13; nitrogén 6,34; klór (összes) 4,12; klór (ionos) 0,39%.

Szervetlen maradék 900 °C-on levegőn végzett szárítás után: 5%.

F) Sav-bázis titrálási görbe 2-metoxi-etanol (MCS): víz 4:1 elegyben; a HCl-felesleg hozzáadása után (pH 2,7) KOH-dal végzett titrálás 4 ionizálható funkció jelenlétére mutat, amelyek pK<sub>MCS</sub> értékei a következők: 4,5; 5,6; 7,2; 9,2.

G) R<sub>f</sub> érték 0,21 és a teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponenséhez viszonyított R<sub>f</sub> érték 0,53 a következő kromatográfiás rendszerben:

5% -os (tömeg/térf.) vizes Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 70  
acetonitril 30

szilanzált szilikagél lemezek (60 F<sub>254</sub> Merck, rétegvastagság 0,25 mm)

Kimutatás:

— UV fény

— Pauly-reagenssel — azaz diazotált szulfanilsavval (J. Chromatogr. 20, 171, 1965; és Z. Physiol. Chem. 292, 99, 1953) sárga szín

— bioautográfia Bac. subtilis ATCC 6633 felhasználásával, Davis-f. táptalajon

H) Molekulatömeg kb. 1730 a FAB—MS spektrum alapján, amely az M+H<sup>+</sup> csúcsot 1731-nél mutatja.

Az A 40926 antibiotikum B<sub>0</sub> faktor fizikokémiai jellemzői

A) a 14. ábrán bemutatott UV abszorpciós spektrum a következő abszorpciós maximumokat mutatja:

	lambda <sub>max</sub> (nm)
a) 0,1N HCl	282
b) pH 7,38 foszfát puffer	281, 300 (váll)
c) 0,1N nátrium- vagy káliumhidroxid	300
d) pH 0,9 foszfát puffer	283; 300 (váll)
e) metanol	282

B) a 15. ábrán bemutatott IR abszorpciós spektrum a következő abszorpciós maximumokat mutatja (cm<sup>-1</sup>):

3700—3080; 3080—2700 (nujol); 1720—1625; 1625—1560; 1505; 1460 (nujol); 1375 (nujol); 1295; 1230; 1210; 1150; 1100—1040; 1030; 1015; 970; 890; 840; 810; 720 (nujol)

C) a 16. ábra szerinti <sup>1</sup>H—NMR spektrum a következő jel-csoportokat (ppm) mutatja 270 MHz-en, DMSO—d<sub>6</sub>-ban (hexadeutero-dimetilszulfid) felvéve, belső standardként TMS-t (0,00 ppm) alkalmazva; delta, ppm:

0,85 (d, izopropil-metilek); 1,15 (kb. 13H); 1,44 (kb. 2H); 2,02 (2H); 2,32—2,35 (3H); 4—6,1 (kb. 16H); 6,1—8 (kb. 23H); 8,52; 9,50; 9,68 (széles sávok, mozgékony protonok);

2,5—4: interferencia a H<sub>2</sub>O csúcsok miatt

D) retenciós idő (R<sub>t</sub>) 1,22 a teikoplanin A<sub>2</sub> 2

komponenséhez viszonyítva (R<sub>t</sub> = 20,3 perc) fordított fázisú HPLC technikával a következő körülmények között végzett elemzés során:

oszlop: Ultrasphere ODS (5 μm/Altex/Beckman)

4,6 mm (belső átmérő) × 250 mm

elő-oszlop: Brownlee Labs RP 18 (5 μm)

A eluálószer:

CH<sub>3</sub>CN 10%

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (2,5 g/l) 90%

pH 6,0-ra beállítva

B eluálószer:

CH<sub>3</sub>CN 70%

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (2,5 g/l) 30%

pH 6,0-ra beállítva

15 eluálás: lineáris gradiens 5%—60% között (B eluálószer az A oldószerben), 40 perc alatt  
áramlási sebesség: 1,8 ml/perc  
UV detektor: 254 nm

belső standard: teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponens

(Gruppo Lepetit S. p. A.)

20 E) az elem-analízis — miután a mintát előzetesen kb. 140 °C-on közömbös atmoszférában szárítottuk (tömegvesztés 9,6%) — a következő közelítő (átlagos) százalékos összetételt mutatja: szén 54,09%; hidrogén 5,13%; nitrogén 6,34%; klór (összes) 4,12%; klór (ionos) 0,39%.

Szervetlen maradék 900 °C-on levegőn végzett iztitás után: 5%.

30 F) A sav-bázis titrálási görbe 4:1 2-metoxi-etanol (MCS): víz elegyben — HCl-felesleg hozzáadása után KOH-dal végzett titrálással — 4 ionizálható funkció jelenlétére mutat, amelyek pK<sub>MCS</sub> értékei a következők: 4,5; 5,6; 7,2; 9,2.

35 G) Az R<sub>f</sub> érték 0,21 és a teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponenséhez viszonyított R<sub>f</sub> érték 0,53 a következő kromatográfiás rendszerben:

5% -os (tömeg/térf.) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 70%  
acetonitril 30%

szilanzált szilikagél lemezeket (60 F<sub>254</sub> Merck, rétegvastagság 0,25 mm) alkalmazva

Kimutatás:

— UV fény

— Pauly-reagenssel — azaz diazotált szulfanilsavval (J. Chromatogr. 20, 171, 1965 és Z. Physiol. Chem. 292, 99, 1953) sárga szín

— bioautográfia Bac. subtilis ATCC 6633 alkalmazásával, Davis-f. minimális táptalajon.

50 H) A molekulatömeg kb. 1730 az FAB—MS spektrum alapján, amely szerint az M+H<sup>+</sup> csúcs 1731-nél helyezkedik el.

Az A 40926 antibiotikum PA faktor fizikokémiai jellemzői:

55 A) a 17. ábra szerinti UV abszorpciós spektrum a következő abszorpciós maximumokat mutatja:

	lambda <sub>max</sub> (nm)
a) 0,1N HCl	282
b) 0,1N KOH	300
c) pH 7,38 foszfát puffer	282; 300 (váll)
d) pH 9,6 foszfát puffer	283; 300 (váll)

60 B) a 18. ábra szerinti IR abszorpciós spektrum a következő abszorpciós maximumokat mutatja (cm<sup>-1</sup>):

65 3700—3100; 3000—2800 (nujol); 1760—1710; 1655; 1620—1550; 1505; 1460 (nujol); 1375 (nujol); 1260; 1250—950; 845; 805; 720 (nujol)



C) a 19. ábra szerinti <sup>1</sup>H-NMR spektrum a következő jel-csoportokat (ppm-ben) mutatja 270 MHz-nél DMSC-d<sub>6</sub>-ben (hexadeutero-dimetil-szulfoxid) felvéve, belső standardként TMS-t (0,00 ppm) alkalmazva (delta, ppm):

0,86 (CH<sub>3</sub>-dublettek); 1,15—1,22 [m, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>]; 1,41 (m, CH<sub>2</sub>); 2,01 (s, CH<sub>3</sub>); 2,01 (m, CH<sub>2</sub>); 2,28 (s, N—CH<sub>3</sub>); 4,26—5,96 (széles, peptid- és aromás metilek); 6,33—7,73 (széles, aromás CH-csoportok és peptid-NH-csoportok)

D) retenció idő (R<sub>t</sub>) 1,15 a teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponenshez (R<sub>t</sub> = 20,3 perc) viszonyítva fordított fázisú HPLC módszerrel a következő körülmények között végzett elemzés során:

oszlop: Ultrasphere ODS (5 μm/Altex/Beckman) 4,6 mm (belső átmérő) × 250 mm

elő-oszlop: Brownlee Labs RP 18 (5 μm)

A eluálószer:

CH<sub>3</sub>CN 10%

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O (2,5 g/l) 90%

pH 6,0-ra beállítva

B eluálószer:

CH<sub>3</sub>CN 70%

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O (2,5 g/l) 30%

pH 6,0-ra beállítva

eluálás: lineáris gradiens 5%—60% között (B eluálószer az A eluálószerben), 40 perc alatt

áramlási sebesség: 1,8 ml/perc

UV detektor: 254 nm

belső standard: teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponens (Gruppo Lepetit S. p. A.)

E) az R<sub>t</sub> érték 0,62 a teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponenshez viszonyítva a következő kromatográfiás rendszerben:

5%-os (tömeg/térf.) vizes Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 70

acetonitril 30

szilanizált szilikagél lemezek (60 F<sub>254</sub> Merck, rétegvastagság 0,25 mm)

Kimutatás:

— UV fény

— Pauly reagenssel-diazotált szulfanilsav (J. Chromatogr. 20, 171, 1965 és Z. Physiol. Chem. 292, 99, 1953) — sárga szín

— bioautográfia Bac. subtilis ATCC 6633 alkalmazásával, Davis-f. minimális táptalajon.

F) Molekulatömeg kb. 1758 az FAB—MS spektrum alapján, amelyen számos csúcs látható, a legintenzívebb 1761-nél. Az FAB—MS elemzés műveleti körülményei a következők:

berendezés: VG Mod ZAB SE, FAB ágyúval (Ion Tech) ellátva

körülmények: pozitív FAB, Xe gyorsítófeszültség 8 kV

mátrix: tioglicerin:glicerin 1:1 (térf./térf.)

Az A 40926 antibiotikum PB faktor fizikokémiai jellemzői

A) a 20. ábra szerinti UV abszorpciós spektrum a következő abszorpciós maximumokat mutatja:

	lambda <sub>max</sub> (nm)
a) 0,1N HCl	282
b) 0,1N KOH	300
c) pH 7,38 foszfát puffer	282; 300 (váll)
d) pH 9,0 foszfát puffer	282; 300 (váll)

B) a 21. ábra szerinti IR abszorpciós spektrum a következő abszorpciós maximumokat mutatja (cm<sup>-1</sup>):

3700—3100; 3000—2800 (nujol); 1760—1710; 1655; 1620—1560; 1605; 1480—1420 (nujol); 1375 (nujol); 1320—1270; 1230—1190; 1150; 1120—920; 845; 810; 720 (nujol)

C.1. a 12. ábra szerinti <sup>1</sup>H-NMR spektrum a következő jel-csoportokat mutatja (ppm-ben) 270 MHz-nél DMSO-d<sub>6</sub>-ben (hexadeutero-dimetil-szulfoxid) felvéve, belső standardként (0,00 ppm) TMS-t használva (delta, ppm):

0,84 (d, izopropil-metilek); 1,17 [m, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>]; 1,43 (m, CH<sub>2</sub>); 1,99 (s, CH<sub>3</sub>); 2,01 (m, CH<sub>2</sub>); 2,31 (s, N—CH<sub>3</sub>); 2,79 (dd, CH); 3,70 (m, CH); 4,06—6,02 (széles, peptid és aromás CH-csoportok); 6,45—7,74 (széles, aromás CH-csoportok és peptid NH-csoportok); 8,19—9,99 (széles, peptid NH-csoportok és fenolos OH-csoportok)

C.2. a 23. ábra szerinti <sup>1</sup>H-NMR spektrum a következő jel-csoportokat mutatja (ppm-ben) 270 MHz-nél, DMSO-d<sub>6</sub> + CF<sub>3</sub>COOD közegben felvéve, belső standardként (0,00 ppm) TMS-t alkalmazva (delta, ppm):

0,84 (d, izopropil-metilek); 1,13 [m, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>]; 1,40 (m, CH<sub>2</sub>); 1,98 (s, CH<sub>3</sub>); 2,00 (m, CH<sub>2</sub>); 2,92 (dd, CH); 3,29—3,71 (m, cukor-CH-csoportok); 4,07—6,09 (s és m, peptid és aromás CH-csoportok); 6,45—7,83 (s és m, aromás CH-csoportok és peptid NH-csoportok); 8,17—10,38 (peptid NH-csoportok, fenolos OH-csoportok)

D) retenció idő (R<sub>t</sub>) 1,27 és 1,32 a teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponenshez viszonyítva (R<sub>t</sub> = 20,3 perc) a fordított fázisú HPLC technikával a következő körülmények között végzett elemzés során:

oszlop: Ultrasphere ODS (5 μm/Altex/Beckman) 4,6 mm (belső átmérő) × 250 mm

elő-oszlop: Brownlee Labs RP 18 (5 μm)

A eluálószer: CH<sub>3</sub>CN 10%

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O (2,5 g/l) 90%

pH 6,0-ra beállítva

B eluálószer: CH<sub>3</sub>CN 70%

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O (2,5 g/l) 30%

pH 6,0-ra beállítva

eluálás: lineáris gradiens 5%—60% között (B eluálószer az A eluálószerben), 40 perc alatt

áramlási sebesség: 1,8 ml/perc

UV detektor: 254 nm

belső standard: teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponens (Gruppo Lepetit S. p. A.)

E) R<sub>t</sub> érték a teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponenséhez viszonyítva 0,53 a következő kromatográfiás rendszerben:

5%-os (tömeg/térf.) vizes Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 70

acetonitril 30

szilanizált szilikagél lemezek (60 F<sub>254</sub> Merck) alkalmazásával (rétegvastagság 0,25 mm)

Kimutatás:

— UV fény

— Pauly reagenssel — diazotált szulfanilsav (J. Chromatogr. 20, 171, 1965 és Z. Physiol. Chem. 292, 99, 1953) sárga szín

— bioautográfia Bac. subtilis ATCC 6633 alkalmazásával, minimális Davis-f. táptalajon.

F) Molekulatömeg kb. 1772 az FAB—MS spektrum alapján, amelyen számos csúcs látható, a

legintenzívebb csúcs 1776-nál. Az FAB—MS elemzés műveleti körülményei a következők:

berendezés: VG Mod ZAB, FAB ágyúval (Ion Tech) ellátva

körülmények: pozitív FAB, Xe gyorsító feszültség 8 kV mátrix: tioglicerín:glicerín 1:1 (térf./térf.).

Az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon a következő tulajdonságokkal rendelkezik:

A) a 24. ábra szerinti UV abszorpciós spektrum a következő abszorpciós maximumokat mutatja:

	lambda <sub>max</sub> (nm)
a) 0,1N HCl	280
b) pH 7,38 foszfát puffer	280; 300 (váll)
c) 0,1N káliumhidroxid	298
d) pH 9,0 foszfát puffer	282; 300 (váll)

B) a 25. ábra szerinti IR abszorpciós spektrum a következő abszorpciós maximumokat mutatja (cm<sup>-1</sup>):

3700—3100; 3000—2800 (nujol); 1655; 1620—1540; 1505; 1460 (nujol); 1375 (nujol); 1350—1250; 1210; 1150; 1020; 970; 850; 810

C) a 26. ábra szerinti <sup>1</sup>H—NMR spektrum, amely a következő jel-csoportokat (ppm-ben) mutatja 270 MHz-en, DMSO—d<sub>6</sub> (hexadeutero-dimetilszulfoxid) és CF<sub>3</sub>COOH elegyében felvéve, belső standardként (0,00 ppm) TMS-t alkalmazva (delta, ppm):

2,51 (s, DMSO-d<sub>6</sub>); 2,50 (s, NCH<sub>3</sub>); 2,88 (m, Z2); 3,30 (m, Z'2); 4,08 (m, X6); 4,44 (d, X5); 4,49 (d, X7); 4,83 (m, X2); 5,02 (s, 4F); 5,08 (s, Z6); 5,31 (s, a mannoz anomer protonja); 5,53 (d, X4); 5,78 (s, 4B); 6,08 (d, X3); 7,70 (s, 6B); 6,44—8,52 (aromás és peptid NH-k)

D) retenciósi idő (R<sub>t</sub>) 1,18 az L 17054 (TA3—1) antibiotikumhoz (R<sub>t</sub> = 8,78 perc) viszonyítva, az elemzést fordított fázisú HPLC-vel a következő körülmények között végezve:

oszlop: Ultrasphere ODS (5 μm/Altex/Beckman)

4,6 mm (belső átmérő) × 250 mm

elő-oszlop: Brownlee Labs RP 18 (5 μm)

A eluálószer: CH<sub>3</sub>CN 10%

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (2,5 g/l) 90%

pH 6,0-ra beállítva

B eluálószer: CH<sub>3</sub>CN 70%

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (2,5 g/l) 30%

pH 6,0-ra beállítva

eluálás: lineáris grádiens (5%—60% B eluálószer

A eluálószerben), 40 perc alatt

áramlási sebesség: 1,6 ml/perc

UV detektor: 254 nm

belső standard: L 17054 (TA3—1) antibiotikum (Gruppo Lepetit S. p. A.)

E) R<sub>f</sub> érték 0,39 a következő kromatográfiás rendszerben:

5 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O-t tartalmazó 1M NaCl 70

acetonitril 30

pH 6,0-ra beállítva, 60 F<sub>254</sub> Merck lemezeket (szilánizált szilikagél, rétegvastagság 0,25 mm) használva

Kimutatás:

— UV fény

— sárga szín Pauly reagenssel — azaz diazotált szulfanilsavval (J. Chromatogr. 20, 171, 1965; Z. Physiol. Chem. 292, 99, 1953)

— bioautográfia B. subtilis ATCC 6633-mal minimális Davis-f. táptalajon

F) a gyors atom bombázásos (FAB) tömegspektrumban M + H<sup>+</sup> kb. 1374-nél található.

5

Az A 40926 antibiotikum B faktor N-acilaminoglukuronil-aglikon fizikokémiai jellemzői

A) Dinátrium-só

10 C 52,11%; H 5,33%; N 6,31%; Cl (összes) 4,0%; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hamu 8%; tömegvesztés 140 °C-on: 9%

B) Nátrium-só

15 C 52,90%; H 5,44%; N 6,41%; Cl (összes) 4,05%; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hamu 4,06%; tömegvesztés 140 °C-on: 8,9%

C) Hidroklorid

15 C 52,63%; H 5,44%; N 6,37%; Cl (összes) 6,05%; tömegvesztés 140 °C-on: 8,5%

20 Az A 40926 antibiotikum A faktor N-acilaminoglukuronil-aglikon fizikokémiai jellemzői

A) Dinátrium-só

20 C 51,74%; H 5,27%; N 6,35%; Cl (összes) 4,02%; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hamu 8,08%; tömegvesztés 140 °C-on: 9,3%

25 B) Nátrium-só

25 C 52,77%; H 5,34%; N 6,48%; Cl (összes) 4,01%; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hamu 4,09%; tömegvesztés 140 °C-on: 8,7%

30 C) Hidroklorid

30 C 52,47%; H 5,41%; N 6,44%; Cl (összes) 6,11%; tömegvesztés 140 °C-on: 8,5%

35 Az A 40926 antibiotikum aglikon fizikokémiai jellemzői

A) Nátrium-só

35 C 53,19%; H 4,30%; N 7,36%; Cl (összes) 5,32%; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hamu 5,35%; tömegvesztés 140 °C-on: 7,3%

40 B) Hidroklorid

40 C 51,86%; H 4,50%; N 7,17%; Cl (összes) 7,78%; tömegvesztés 140 °C-on: 8,8%

Az addíciós sóknál a tömegvesztéséget nitrogén atmoszférában 140 °C-on való szárítás után, míg a hamutartalmat az USP XXII módszer szerint mértük.

A találmány további szemléltetésére a következő példákat mutatjuk be, amelyek önmagukban nem tekinthetők korlátozó jellegűnek a találmány oltalmi köre vonatkozásában.

50

1. példa

Az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplex és az A 40926 antibiotikum aglikon előállítására

55

a) 750 mg A 40926 antibiotikum AB komplexet (amelyet lényegében a 3. eljárás szerint állítottunk elő) feloldunk 150 ml 9:1 (térf./térf.) dimetilszulfoxid:37 (tömeg/tömeg)%-os sósav (DMSO: HCl) elegyben és a reakcióelegyet kb. 65 °C-ra melegítjük fel.

60

A reakció lefolyását HPLC-vel követjük, és miután a kiindulási anyagok teljes mértékben reagáltak egymással (kb. 5 óra elteltével), a reakciót hideg víz (600 ml) hozzáadásával leállítjuk és a kapott elegy pH-ját kb. 7,5-re állítjuk be.

65

Ez az anyag a cím szerinti vegyületek keverékét tartalmazza, amelyet affinitáskromatográfiával, a

következő eljárás szerint választunk szét két fő összetevőjére.

b) Az előbbieket szerint kapott vizes elegyet (750 ml) felvisszük egy Sepharose-D-alanil-D-alanin kromatográfiás oszlopra, amelyet a 8. eljárással kapcsolatban leírt módon állítottunk elő (100 ml duzzasztott gyanta 10mM trisz-HCl pufferben, pH 7,5; az ágy magassága 10 cm). 200 ml, NaCl-ra 2M pH 7,5 0,05M  $\text{NH}_4\text{OH} \cdot \text{HCl}$  puffert (B puffer) vezetünk át az oszlopon, majd az A 40926 antibiotikum aglikont szelektíve eltávolítjuk az oszlopról, 1500 ml, NaCl-ra 2M pH 9,5 0,05M  $\text{NH}_4\text{OH} \cdot \text{HCl}$ -el (C puffer) végezve az eluálást.

Ezután az N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplexet 0,1M vizes ammóniával (D puffer) eluáljuk.

Az eluált frakciókat kb. pH 7,5-re állítjuk be és antibiotikum tartalmuknak megfelelően összeöntjük, majd a különböző antibiotikum-tartalmú oldatokat Sepharose-D-alanil-D-alanin oszlopon kromatografáljuk (100 ml duzzasztott gyanta 10mM trisz-HCl pufferben, pH 7,5; az ágy magassága 10 cm). Desztillált vizet vezetünk át az oszlopon, a szervesetlen sók kimosásáig. Ezt követően az antibiotikumokat 0,1N vizes ammóniával eluáljuk. Ezeket az eluált frakciókat antibiotikum tartalmuknak megfelelően összeöntjük, csökkentett nyomáson, n-butanollal végzett azeotróp desztillációval kis térfogatra töményítjük be és liofilizáljuk. Így 201 mg N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplexet ill. 236 mg A 40926 antibiotikum aglikont kapunk.

Az előbbieken leírt kísérletet megismételve, de 95:5 DMSO:37%-os HCl elegyet alkalmazva, kb. 40 °C-on kb. 5 napon át, az N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplex kitermelése kb. 15%-kal nő, míg az A 40926 antibiotikum aglikon kitermelése megfelelően csökken.

Ezeket a kísérleteket A 40926 antibiotikum komplexből, A 40926 antibiotikum A faktorból, A 40926 antibiotikum B faktorból, A 40926 antibiotikum B<sub>0</sub> faktorból, A 40926 antibiotikum PA faktorból és A 40926 antibiotikum PB faktorból kiindulva megismételve lényegében ugyanezeket az eredményeket kapjuk (azaz a kitermelések a  $\pm$  5% tartományban váltakoznak).

Közelebbről: A 40926 antibiotikum A faktorból vagy PA faktorból kiindulva a kapott termék az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon A faktor, míg az A 40926 antibiotikum PB faktorból vagy B<sub>0</sub> faktorból kiindulva a kapott termék az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B<sub>0</sub> faktor.

Az A 40926 antibiotikum B faktorból kiindulva az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B<sub>0</sub> és B<sub>1</sub> faktor keverékét kapjuk, amelyet HPLC-vel választhatunk szét.

### 2. példa

Az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon A, B<sub>0</sub> és B<sub>1</sub> faktor szétválasztása.

20 mg A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplexet 1 ml pH 6,0 18mM nátriumfoszfát pufferben oldunk, amely 10% acetonnitritet tartalmaz. Az oldatot egy preparatív HPLC oszlopba injektáljuk (7 mm belső átmé-

rő  $\times$  250 mm; 7  $\mu\text{m}$  részecskenagyságú Lichrosorb RP 18 — Merck Co. — szilanizált szilikagél).

Az oszlopot 5 ml/perc sebességgel A és B fázissal eluáljuk (lineáris gradiens 10%—55% A fázissal, 55 perc alatt).

A fázis: 30/70 18mM nátriumfoszfát/ $\text{CH}_3\text{CN}$ , NaOH-dal pH 6,0-ra beállítva

B fázis: 90:10 18mM nátriumfoszfát/ $\text{CH}_3\text{CN}$ , NaOH-dal pH 6,0-ra beállítva.

Meghatározzuk az oszlopról eluált frakciók UV abszorpcióját 254 nm-en és az azonos koncentrációjú eluált frakciókat összeöntjük. Három eluátum-csoportot különítünk el; ezek az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon A, B<sub>0</sub>, illetve B<sub>1</sub> frakciót tartalmazzák.

A tisztított A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon faktorokat tartalmazó eluátumokat, amelyeket 11 egymásutáni kromatográfiás elemzés során kapunk, összeöntjük és a szokásos módon sómentesítjük: felvisszük egy oszlopra, amely 5 ml duzzasztott Sepharose-D-alanil-D-alanin (1. a 8. eljárást) tartalmaz. A sókat 10 ml 1mM HCl-lel, majd 5  $\times$  10 ml desztillált vízzel eltávolítjuk, majd az antibiotikumot 5  $\times$  10 ml 1 tömeg/térf. %-os vizes ammóniával eluáljuk. Az ammóniás eluátumokat ezután külön-külön összegyűjtjük és fagyaszttva szárítjuk. 15 mg A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon A faktort, 51 mg A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B<sub>0</sub> faktort és 3 mg A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B<sub>1</sub> faktort kapunk, amelyek fizikokémiai adatait és kémiai képletét a leírásban az előbbieken közöltük.

### 3. példa

Az A 40926 antibiotikum aglikon szelektív előállítás

a) az A 40926 antibiotikum AB komplexből

750 mg A 40926 antibiotikum AB komplexet — amelyet lényegében a 3. eljárás szerint állítottunk elő — feloldunk 150 ml 9:1 (térf./térf.) dimetilszulfoxid 37%-os sósav elegyben és a reakcióelegyet kb. 80 °C-ra melegítjük fel. A reakció előrehaladását HPLC-vel követjük és miután a kiindulási anyagok teljes mértékben reagáltak egymással (kb. 3 óra után), a reakciót (600 ml) hideg vízzel leállítjuk és a kapott keverék pH-ját kb. 7,5-re állítjuk be.

Ez az elegy (750 ml) tartalmazza az A 40926 antibiotikum aglikont, amelyet affinitáskromatográfiával különítünk el, Sepharose-D-alanil-D-alanin kromatográfiás oszlopon, amelyet a 8. eljárással kapcsolatban írtunk le (100 ml duzzasztott gyanta 10mM pH 7,5 trisz-HCl pufferben; az ágy magassága 10 cm).

200 ml 0,05M  $\text{NH}_4\text{OH} \cdot \text{HCl}$ -t — amely NaCl-re 2M töménységű — (B puffer) vezetünk át az oszlopon, majd az A 40926 antibiotikum aglikont szelektíve eltávolítjuk az oszlopról oly módon, hogy azt 1500 ml, NaCl-re 2M pH 9,5 0,05M  $\text{NH}_4\text{OH} \cdot \text{HCl}$ -el (C puffer) eluáljuk. Az eluált frakciókat ezután antibiotikum tartalmuknak megfelelően összeöntjük, kb. pH 7,5-re állítjuk be és Sepharose-D-alanil-D-alanin oszlopon kromatografáljuk (100 ml duzzasztott gyanta 10mM pH 7,5 trisz-HCl pufferben; az oszlopban az ágy magassága 10 cm). A szervesetlen sók kimosásáig desz-

tillált vizet vezetünk át az oszlopon. Az A 40926 antibiotikum aglikont 0,1N vizes ammóniával eluáljuk. Ezeket az eluátumokat csökkentett nyomáson, n-butanollal végzett azeotróp desztillációval kis térfogatra töményítjük be, majd liofilizáljuk. 530 mg A 40926 antibiotikum aglikont kapunk.

#### 4. példa

Az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplex és az A 40926 antibiotikum aglikon előállítása

Az 1. példa szerinti eljárással, azonban kiindulási anyagként az AB komplex helyett 750 mg A 40926 antibiotikum PA és PB faktor elegyét alkalmazva, 195 mg N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplexet és 230 mg A 40926 antibiotikum aglikont állítunk elő.

#### A kiindulási anyagok előállítása

##### 1. eljárás:

Fermentáció az *Actinomadura* sp. ATCC 39727 törzssel

Az A 40926 antibiotikumot termelő *Actinomadura* sp. ATCC 39727 törzs ferde zabliszt agar tenyészteték — amelyet 2—3 héten át 28 °C-on növesztettünk — használjuk fel egy 500 ml-es Erlenmeyer lombik beoltására, amely 100 ml következő összetételű táptalajt tartalmaz:

- 0,5% húskivonat
- 0,5% autolizált élesztő
- 0,5% pepton
- 0,3% hidrolizált kazein
- 2% glükóz
- 0,15% NaCl

pH 7,5 sterilizálás előtt.

A lombikot 28 °C-on forgó rázógépen inkubálják, 200 ford./perc sebességgel, kb. 72 órán át, majd a tenyészetet átviszzük egy fermentorba, amely 4 liter előbbi összetételű táptalajt tartalmaz. Ezt a tenyészetet kb. 72 órán át 28 °C-on tartjuk, miközben kb. 2 liter/perc sebességgel levegőt áramoltatunk be és kb. 900 ford./perc sebességgel kevertetjük a rendszert. Ezt a tenyészetet használjuk fel egy 200 literes fermentor beoltására, amely ugyanezt a táptalajt tartalmazza. Ezt a fermentort 100 liter/perc sebességgel steril levegővel levegőztetjük és kb. 28 °C-on 250 ford./perc sebességgel kevertetjük. Az antibiotikum-termelést papirkorongos agardiffúziós módszerrel követjük, minimális táptalajon *B. subtilis*-t alkalmazva kísérleti organizmusként. A maximális aktivitást 72—96 óra után érjük el.

##### 2. eljárás

Az A 40926 antibiotikum kinyerése

A) Az előbbieket szerint előállított fermentlevet 4 °C-ra hűtjük, pH-ját 9,5-re állítjuk be és kevertetjük. Kb. 1 óra elteltével szűrjük és a szűrlet pH-ját vizes ásványi savval kb. 3,5-re állítjuk be. A keveréket 30 percen át 4 °C-on kevertetjük, majd segédanyaggal (Hyflo—FloMa<sup>R</sup>) szűrjük. A tiszta szűrletet elvetjük és a szűrőlepenyt ionmentesített vízben szuszpendáljuk, a szuszpenzió pH-ját kb. 8,5-re állítjuk be, kevertetjük, majd szűrjük. A kinyert szűrőlepenyt ugyanennek az eljárásnak vetjük alá. Az összeöntött szűrletek tartalmazzák az A 40926 antibiotikumot.

20

B) Az 1. eljárás szerint előállított fermentléhez (miután szűrtük és a tiszta szűrlet pH-ját kb. 8,5-re állítottuk be), vagy a 2.A) eljárás szerint kapott összeöntött szűrlethez 2 liter módosított duzzasztott D-ala-D-ala-epszilon-aminokaproil-Sepharose mátrixot adunk. A szuszpenziót egy éjjelen át szobahőmérsékleten kevertetjük, a gyantát szűréssel kinyerjük és egymás után a következőkkel mossuk: kb. 2 × 10 liter 0,45mM pH 7,5 trisz—HCl puffer (trisz = 2-amino-2-hidroxi-metil-1,3-propándiol), amely 5 tömeg/térf.% NaCl-t tartalmaz, majd 4 × 20 liter desztillált víz. A gyantáról az antibiotikumot 2 × 20 liter 1 tömeg/térf.%-os ammóniumhidroxiddal eluáljuk. Az eluátumokat egy éjjelen át szobahőmérsékleten állni hagyjuk, majd kis térfogatra (kb. 2,5 liter) töményítjük be. A vizet n-butanollal végzett azeotróp desztillációval távolítjuk el. Ezután petrolétert adagolunk; ennek hatására 3,4 g nyers A 40926 antibiotikum komplex csapódik ki.

##### 3. eljárás

Az A 40926 antibiotikum AB komplex tisztítása

A lényegében a 2. eljárás szerint előállított nyers A 40926 antibiotikum komplexet (750 mg; HPLC titer 70%) 400 ml vízben oldjuk, az oldat pH-ját 7,5-re állítjuk be és szűrjük. A szűrletet affinitáskromatográfiának vetjük alá D-ala-D-ala-epszilon-aminokaproil-Sepharose oszlopon (50 ml duzzasztott gyanta; az ágy magassága 5 cm). Az oszlopot NaCl-ra 2M töménységű 0,16 tömeg/térf.%-os, pH 7,5-re sósavval beállított ammóniával hozzuk egyensúlyba és egymás után a következő három puffer oldattal fejlesztjük ki:

A puffer: NaCl-ra 2M, sósavval pH 7,5-re beállított 0,16%-os (tömeg/térf.) ammónia (2,6 ágy-térfogat);

B puffer: NaCl-ra 2M, sósavval pH 9,5-re beállított 0,16 súly/térf.%-os ammónia (16 ágy-térfogat);

C puffer: pH 11,4 1 tömeg/térf.%-os vizes ammónia (2,6 ágy-térfogat).

A C pufferrel az A 40926 antibiotikum komplexet egyetlen frakcióban eluáljuk. Ezt az eluált frakciót pH 7,0-re állítjuk be és újra felviszzük ugyanerre az affinitás-oszlopra, amelyet 10mM pH 7,0 trisz—HCl pufferrel hoztunk egyensúlyba. Az oszlopot a sómentesítés befejeződéséig desztillált vízzel mossuk.

Ezután 2 ágy-térfogatnyi pH 11,0 0,39 tömeg/térf.%-os vizes ammóniával eluáljuk az antibiotikumot.

Az eluált frakciókat kis térfogatú vizes eleggyé töményítjük be, majd fagyasztva szárítjuk. 374 mg tiszta A 40926 antibiotikum AB komplexet kapunk.

##### 4. eljárás

Az A 40926 antibiotikum A és B faktor szétválasztása

A) 3,3 g, a 2. eljárás szerint előállított A 40926 antibiotikum komplexet vagy 2,3 g, a 3. eljárás szerint előállított A 40926 antibiotikum AB komplexet 0,5 liter vízben szuszpendálunk, kevertetünk, majd szűrjük a szuszpenziót. A tiszta szűrletet felviszzük egy szilanizált szilikagél oszlopra (200 g; ágy-magasság 18 cm; szilanizált szilikagél 60; 70—

230 mesh, Merck Inc.), amelyet A oldattal előzetesen egyensúlyba hoztunk (0,25 súly/térf.%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -t és 2,5 tömeg/térf.%  $\text{NaCl}$ -t tartalmazó,  $\text{NaOH}$ -dal pH 6,0-ra beállított 0,001M vizes  $\text{Na-EDTA}$  oldat). Az oszlopot lineáris gradiens alkalmazásával eluáljuk (0%—40% — térf./térf.-acetonitril az A oldatban); összterfogat kb. 7 liter, kb. 48 óra alatt. Kb. 15,5 ml-es frakciókat szedünk; ezeket *Bac. subtilis* alkalmazásával biológiai vizsgálatnak vetjük alá és HPLC-vel elemezzük. A hasonló antibiotikum-tartalmú frakciókat összeöntjük. A 310—330 frakció tartalmazza az említett antibiotikumok közül az A 40926 antibiotikum A faktort, a 348—365 frakció pedig az A 40926 antibiotikum B frakciót.

B) az A 40926 antibiotikum A faktort, illetőleg az A 40926 antibiotikum B faktort tartalmazó egyesített frakciókat csökkentett nyomáson betöményítjük az acetonitril eltávolítására, vízzel hígítjuk (a kiindulási oldatok térfogatának kb. kétszeresére) és felvisszük az előbbieken leírt típusú szilanizált szilikagél oszlopra (a duzzasztott mátrix térfogata: 50 ml; az ágy magassága 15 cm). Az oszlopot a sók teljes eltávolításáig ionmentesített vízzel mossuk, majd 60:40 (térf./térf.) acetonitril:víz eleggyel fejlesztjük ki.

Az eluált frakciókat csökkentett nyomáson betöményítjük és a maradékot fagyaszttva szárítjuk. Az eluált frakciók első csoportjából (az előbbi 310—330 frakció) 134 mg A 40926 antibiotikum A faktort, az eluált frakciók második csoportjából (az előbbi 348—365 frakció) pedig 206 mg A 40926 antibiotikum B faktort kapunk.

#### 5. eljárás

Az A 40926 antibiotikum PA és PB faktor elkülönítése

Lényegében a 2. A) eljárást és a 2. B) eljárás első lépései szerinti műveleteket követve a gyantához kötött antibiotikumot  $2 \times 20$  liter 1 tömeg/térf.%-os ammóniumhidroxiddal eluáljuk. Az eluátumok pH-ját kénsavval 7,8-re állítjuk be és az oldatokat vákuumban, n-butanollal végzett azeotróp desztillációval kis térfogatra töményítjük be; így vizes tömény oldatot kapunk, amelyet papíron szűrünk. A kapott szűrlet az A 40926 antibiotikum PA faktort, az A 40926 antibiotikum PB faktort, valamint kisebb mennyiségű A 40926 antibiotikum A faktort és B faktort tartalmaz (HPLC).

Ebből a vizes koncentrátumból egy mintát (10 ml), amely kb. 50 mg/ml tiszta A 40926 antibiotikum komplexet (HPLC elemzés) tartalmaz, 5  $\mu\text{m}$  pórusméretű szűrőn (Acrodisc<sup>®</sup>, Gelman Science Inc.) szűrünk, majd a szűrletet felvisszük egy 2 cm átmérőjű saválló acél oszlopba töltött 20 g oktadecil-szilil fordított fázisú szilikagélre (Lichrosorb RP 18, Merck Inc.; részecskenyagyság 10  $\mu\text{m}$ ). A szilikagélt ezután mérsékelt nyomáson (névleges nyomás kb. 14 bar) betöltjük egy Chromatospac Modulprep berendezés saválló acél oszlopába (Joben Yvon, Franciaország) és kiegyensúlyozzuk egy olyan eleggyel, amely 25:75 (térf./térf.) arányban acetonitril és 18mM pH 6,0 nátriumfoszfát puffert tartalmaz. Az eluálást ugyanannak az oldószerkelegynek az alkalmazásával hajtjuk végre, amelyet a kiegyensúlyozáshoz használtunk fel;

áramlási sebesség kb. 10,5 ml/perc. Az elúciót *Bac. subtilis*-szel végzett biológiai vizsgálatral és HPLC-vel követjük.

A hasonló antibiotikum-tartalmú frakciókat összeöntjük és 5 kromatográfias futtatás homogén frakcióit betöményítjük, a szerves oldószer eltávolítására.

A kapott oldatot 1M nátriumkloriddal az eredeti térfogat kétszeresére hígítjuk és ezt az oldatot felvisszük egy szilanizált szilikagél oszlopra (50 g; ágy magasság 5 cm; szilanizált szilikagél 60, Merck Inc.), amelyet vízzel hoztunk egyensúlyba.

Az oszlopot a sók teljes eltávolításáig (vizes  $\text{AgNO}_3$  hozzáadása után az eluátumokban nem jelenik meg  $\text{AgCl}$  csapadék) ionmentesített vízzel mossuk, majd 1:1 térf./térf. acetonitril:víz eleggyel eluáljuk. A hasonló antibiotikum-tartalmú eluátumokat (HPLC elemzés) ezután összeöntjük, n-butanollal végzett azeotróp desztillációval kis térfogatra töményítjük be és így egy vizes fázist kapunk, amelyet fagyaszttva szárítunk. Kitermelések:

— A 40926 antibiotikum PA faktor:	55 mg
— A 40926 antibiotikum PB faktor:	51 ml
— A 40926 antibiotikum A faktor:	38 mg
— A 40926 antibiotikum B <sub>0</sub> faktor:	33 mg.

#### 6. eljárás

Alternatív eljárás az A 40926 antibiotikum B faktor elkülönítésére

A 2. eljárás szerint két kísérletet végzünk és az utolsó lépésből származó összeöntött koncentrátumot szűrjük, majd a szűrletet felvisszük egy szilanizált szilikagél oszlopra (400 g; az ágy magassága 30 cm; szilikagél 60, 70—230 mesh, Merck Inc.), amelyet előzetesen vízzel hoztunk egyensúlyba.

Az oszlopot 6 liter vízzel öblítjük át és az adszorbeált antibiotikumot acetonitril:víz eleggyel eluáljuk, a következő sorrend szerint:

— 2,7 liter	5 térf./térf.% acetonitril vízben
— 1,6 liter	10 térf./térf.% acetonitril vízben
— 2,97 liter	15 térf./térf.% acetonitril vízben
— 3,15 liter	20 térf./térf.% acetonitril vízben

Kb. 18 ml-es frakciókat szedünk.

Az eluált frakciók aktivitását papírkorongos biológiai elemzéssel, érzékeny mikroorganizmusok (pl. *Bac. subtilis*) alkalmazásával határozzuk meg, illetőleg HPLC-vel vizsgáljuk. A hasonló antibiotikum-tartalmú frakciókat (472—526) összeöntjük és az oldatot csökkentett nyomáson betöményítjük. Ehhez a koncentrátumhoz n-butanolt adagolunk a víz azeotrópos eltávolítására. A visszamaradó butanolos oldatot kis térfogatra töményítjük be az A 40926 antibiotikum B faktor (1,4 g) kicsapására. Ezt a terméket petroléterrel mossuk, kevertetés mellett, és szűrővel gyűjtjük össze (háromszor). Vákuumban való szárítás után 760 mg A 40926 antibiotikum B faktort kapunk.

Ha az A 40926 antibiotikum B faktort az előbbi oszlopkromatográfias eljárásnak vetjük alá, 540 mg A 40926 antibiotikum B<sub>0</sub> faktort kapunk végtermékként, amely az előbbieken az A 40926 antibiotikum B faktorra vonatkozóan közölt fizikokémiai tulajdonságokkal rendelkezik, azzal az eltéréssel, hogy HPLC elemzés során csak egy csúcspot mutat, nevezetesen azt a csúcspot, amelynek retenciósideje a teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponenshez viszo-

nyítva 1,22. A továbbiakban eluált másik vegyület retenciós ideje ebben a HPLC rendszerben 1,27; ezt A 40926 antibiotikum B<sub>1</sub> faktornak nevezzük. Ez a vegyület az előbbi módszerrel különíthető el (kitermelés 15 mg).

#### 7. eljárás

Az A 40926 antibiotikum PA faktor, illetőleg az A 40926 antibiotikum PB faktor átalakítása A 40926 antibiotikum A faktorrá, illetőleg B faktorrá

50—50 mg A 40926 antibiotikum PA faktort, illetőleg A 40926 antibiotikum PB faktort külön-külön feloldunk 2,5 ml vizes 1 tömeg/térf. %-os ammóniumhidroxidban és a kapott oldatokat kevertetés közben kb. 24 órán át szobahőmérsékleten állni hagyjuk.

A vizet n-butanollal végzett azeotrop desztillációval eltávolítva, etiléteres kicsapást végezve és a csapadékot szűréssel összegyűjtve az eredetileg A 40926 antibiotikum PA faktort tartalmazó oldatból A 40926 antibiotikum A faktort, az eredetileg A 40926 antibiotikum PB faktort tartalmazó oldatból pedig A 40926 antibiotikum B faktort kapunk (kitermelés kb. 75%).

#### 8. eljárás

A D-ala-D-ala-Sepharose előállítás

a) A Sepharose aktiválása epiklórhidrinrel.

1 liter Sepharose 4B-t (Pharmacia Fine Chemicals) porózus üvegszűrőn szűrünk, ionmentesített vízzel mosunk, majd enyhe kevertetés közben szobahőmérsékleten hozzáadjuk 1,2 liter 1N NaOH oldathoz. 100 ml epiklórhidrin hozzáadása után az anyagot kb. 20 °C-on hideg vízzel végzett külső hűtés mellett 24 órán át folyamatosan kevertetjük. A szuszpenziót szűrjük és a szilárd anyagot kb. 5 liter ionmentesített vízzel, semleges pH eléréséig, mossuk.

b) A Sepharose-epszilon-ACA-D-Ala-D-Ala előállítás.

17 g (62,2 mmól) epszilon-ACA-D-Ala-D-Ala-t 200 ml vízben oldunk, az oldat pH-ját 20%-os NaOH-dal 11-re állítjuk be és hozzáadjuk kb. 500 ml epiklórhidronnal kezelt Sepharose 4B oldatot (összes epoxid-tartalom kb. 15,5 m-egyenérték), mechanikai kevertetés mellett.

A szuszpenziót pH 11-en és szobahőmérsékleten kb. 2 napon át kevertetjük (amíg az epoxid-tartalom mérésére szolgáló próba negatív eredményt nem ad), szűrjük és a gyantát 300 ml vízzel mossuk. A szűrt gyantát ismét vízzel mossuk (kb. 3 liter), semleges pH eléréséig. 460 ml Sepharose-epszilon-ACA-D-Ala-D-Ala-t kapunk.

#### Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás (I) általános képletű antibiotikum, a képletben

A jelentése hidrogénatom vagy —N-(11—12 szénatomos)-acilaminoglukuronil-csoport és

B jelentése hidrogénatom, nevezetesen az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplex, az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon A faktor, az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B<sub>0</sub> faktor, az A 40926 antibiotikum N-

acilaminoglukuronil-aglikon B<sub>1</sub> faktor, az A 40926 antibiotikum-aglikon, amely a következő tulajdonságokkal jellemezhető:

5 A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplex (a nem-addíciós só alakban):

A) UV abszorpciós spektrum a következő abszorpciós maximumokkal:

	lambda <sub>max</sub> (nm)
10 a) 0,1N HCl	282
b) pH 7,4 foszfát puffer	282; 310 (váll)
c) 0,1N KOH	302

B) IR abszorpciós spektrum a következő abszorpciós maximumokkal (cm<sup>-1</sup>):

15 3700—3100; 3000—2800 (nujol); 1650; 1620—1550; 1500; 1460 (nujol); 1375 (nujol); 1300; 1250—1180; 1150; 1060; 1010; 970; 930; 840; 820

C) az <sup>1</sup>H—NMR spektrum a következő jelcsoportokat mutatja (ppm-ben) 270 MHz-en, DMSO-d<sub>6</sub>-ban (hexadeutero-dimetilszulfoxid) felvéve, CF<sub>3</sub>COOH hozzáadása mellett, belső standardként (0,00 ppm) TMS-t alkalmazva (delta, ppm):

25 0,84, d és t (izopropil-CH<sub>3</sub>-ek és terminális CH<sub>3</sub>); 1,14, m [(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>]; 1,44, m (—CH<sub>2</sub>—C—CO és izopropil—CH); 2,00, t (—CH<sub>2</sub>—CO); 2,5, s (DMSO-d<sub>6</sub>); 2,5, s (N—CH<sub>3</sub>); 2,93, m [CH, (Z2)]; 3,33, m [CH, (Z'2)]; 3,20—3,80, m (cukor CH-k); 5,34, d (az acilaminoglukuronsav anomer protonja); 4,10, m (X6); 4,33, d (X5); 4,43, d (X7); 4,9, m (X2); 5,1 (4F és Z6); 5,4, s (X1); 5,58, d (X4); 5,7, s (4B); 6,06, d (X3); 7,73, s (6B); 6,26—8,42, s és m (aromás CH-k és peptid—NH-k); 8,70—10,5, széles váll (fenolos OH-k és NH<sub>2</sub>)

35 d = duplett

m = multiplett

s = szingulett

t = triplett

40 D) retenciós idő (R<sub>i</sub>) 1,20 és 1,30 a teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponenshez viszonyítva (R<sub>i</sub> = 20,3 perc) az elemzést fordított fázisú HPLC-vel a következő körülmények között végezve:

oszlop: Ultrasphere ODS (5 μm/Altex/Beckman)

4,6 mm (belső átmérő) × 250 mm

45 elő-oszlop: Brownlee Labs RP 18 (5 μm)

eluálószer:

A eluálószer:

CH<sub>3</sub>CN 10%

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (2,5 g/l) 90%

pH 6,0-ra beállítva

50 B eluálószer:

CH<sub>3</sub>CN 70%

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (2,5 g/l) 30%

pH 6,0-ra beállítva

55 eluálás: lineáris gradiens (5%—60% B eluálószer

A eluálószerben), 40 perc alatt

áramlási sebesség: 1,8 ml/perc

UV detektor: 254 nm

belső standard: teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponens

(Gruppo Lepetit S. p. A.)

E) sóképzésre képes sav-csoportok

F) sóképzésre képes amino-csoportok

G) a maghoz nem kapcsolódik mannóz-egység.

65 A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon A faktor (a nem-addíciós só alakban):

A) UV abszorpciós spektrum a következő ab-

szorpciós maximumokkal:

	lambda <sub>max</sub> (nm)
a) 0,1N HCl	282
b) pH 7,4 foszfát puffer	282, 310 (váll)
c) 0,1N KOH	302

B) IR abszorpciós spektrum a következő abszorpciós maximumokkal (cm<sup>-1</sup>):

3700—3000; 3000—2800; 1650; 1585; 1505; 1460 (nujol); 1375 (nujol); 1295; 1230; 1210; 1150; 1070; 1060; 1010; 845; 820; 720 (nujol)

C) az <sup>1</sup>H—NMR spektrum a következő jelcsoportokat mutatja (ppm-ben) 270 MHz-en DMSO-d<sub>6</sub>-ban (hexadeutero-dimetilszulfoxid) felvéve, belső standardként (0,00 ppm) TMS-t alkalmazva (delta, ppm):

0,85, t (terminális CH<sub>3</sub>); 1,0—1,3 (alifás CH<sub>2</sub>-k); 1,42, m (OC—C—CH<sub>2</sub>); 2,00, t (CO—CH<sub>2</sub>); 2,35, s (n—CH<sub>3</sub>); 2,49, s (DMSO<sub>d</sub>); 2,82, m (Z2); 2,8—3,8 (cukor protonok és Z'21); 4,12, m (X6); 4,56, s (X1); 4,34, d (X5); 4,41, d (X7); 4,96, m (X2); 5,08—5,12 (4F és Z6); 5,40, d (az acilaminoglukuronsav anomer protonja); 5,58, d (X4); 5,74, s (4B); 6,05, d (X3); 7,75, s (6B); 6,25—8,40, s, d és m (aromás CH-k és peptid—NH-k).

D) a retenciós idő (R<sub>i</sub>) 1,20 a teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponenshez viszonyítva (R<sub>i</sub>=20,3 perc), az elemzést fordított fázisú HPLC-vel a következő körülmények között végezve:

oszlop: Ultrasphere ODS (5 μm/Altex/Beckman) 4,6 mm (belső átmérő) × 250 mm

elő-oszlop: Brownlee Labs RP 18 (5 μm)

A eluálószer:

CH <sub>3</sub> CN	10%
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (2,5 g/l)	90%

pH 6,0-ra beállítva

B eluálószer:

CH <sub>3</sub> CN	70%
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (2,5 g/l)	30%

pH 6,0-ra beállítva

eluálás: lineáris gradiens (5%—60% B eluálószer A eluálószerben), 40 perc alatt

áramlási sebesség: 1,8 ml/perc

UV detektor: 254 nm

belső standard: teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponens (Gruppo Lepetit S. p. A.)

E) molekulatömeg kb. 1554, FAB—MS-sel meghatározva

F) sóképzésre képes savas-csoportok

G) sóképzésre képes amino-csoport

H) a maghoz nem kapcsolódik mannóz-egység.

A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B<sub>0</sub> faktor (a nem-addíciós só alakban):

A) UV abszorpciós spektrum a következő abszorpciós maximumokkal:

	lambda <sub>max</sub> (nm)
a) 0,1N HCl	282
b) pH 7,4 foszfát puffer	282; 310 (váll)
c) 0,1N KOH	302

B) IR abszorpciós spektrum a következő abszorpciós maximumokkal (cm<sup>-1</sup>):

3700—3100; 3000—2800 (nujol); 1650; 1585; 1505; 1460 (nujol); 1375 (nujol); 1295; 1230; 1210; 1150; 1060; 1010; 980; 840; 820; 720 (nujol);

C) az <sup>1</sup>H—NMR spektrum a következő jelcsoportokat mutatja (ppm-ben), 270 MHz-en, DMSO—

d<sub>6</sub>-ban (hexadeutero-dimetilszulfoxid) felvéve, belső standardként (0,00 ppm) TMS-t alkalmazva (delta, ppm);

0,84, d (izopropil—CH<sub>3</sub>-ek); 1,10—1,3 (alifás CH<sub>2</sub>-ek); 1,3—1,6 (OC—CH<sub>2</sub> és izopropil—CH); 2,00, t (OC—CH<sub>2</sub>); 2,32, s (NCH<sub>3</sub>); 2,49, s (DMSO<sub>d</sub>); 2,82, m (Z2); 2,9—3,8 (cukor protonok); 4,12, m (X6); 4,44, s (X1); 4,33, d (X5); 4,37, d (X7); 4,95, m (X2); 5,06—5,10 (4F és Z6); 5,38, d (az acilaminoglukuronsav anomer protonja); 5,59, d (X4); 5,72, s (4B); 6,05, d (X3); 7,74, s (6B); 6,27—8,5 (aromás és peptid—NH-k)

D) a retenciós idő (R<sub>i</sub>) 1,30 a teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponenshez viszonyítva (R<sub>i</sub>=20,3 perc) az elemzést fordított fázisú HPLC-vel a következő körülmények között végezve:

oszlop: Ultrasphere ODS (5 μm/Altex/Beckman) 4,6 mm (belső átmérő) × 250 mm

elő-oszlop: Brownlee Labs RP 18 (5 μm)

A eluálószer:

CH <sub>3</sub> CN	10%
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (2,5 g/l)	90%

pH 6,0-ra beállítva

B eluálószer:

CH <sub>3</sub> CN	70%
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (2,5 g/l)	30%

pH 6,0-ra beállítva

eluálás: lineáris gradiens (5%—60% B eluálószer A eluálószerben), 40 perc alatt

áramlási sebesség: 1,8 ml/perc

UV detektor: 254 nm

belső standard: teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponens (Gruppo Lepetit S. p. A.)

E) molekulatömeg kb. 1568 FAB—MS-sel meghatározva

F) sóképzésre képes savas-funkciók

G) sóképzésre képes amino-funkció

H) a maghoz nem kapcsolódik mannóz-egység.

A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B<sub>1</sub> faktor (a nem-addíciós só alakban):

molekulatömege kb. 1568 FAB—MS-sel meghatározva és lényegében azokkal a fizikokémiai tulajdonságokkal rendelkezik, amelyeket az előbbiekben az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B<sub>0</sub> faktorra vonatkozóan ismertettünk, a következő eltérésekkel:

0,84 ppm-nél az előbbiekben leírt NMR-rendszerben triplettet mutat, amely egy n-propil-csoport metilcsoportjának tulajdonítható; retenciós ideje az előbbiekben leírt rendszerben a teikoplanin A<sub>2</sub> 2 komponenshez viszonyítva 1,32.

A 40926 antibiotikum aglikon (a nem-addíciós só alakban):

A) UV abszorpciós spektrum a következő abszorpciós maximumokkal:

	lambda <sub>max</sub> (nm)
a) 0,1N HCl	280
b) pH 7,4 foszfát puffer	280; 310 (váll)
c) 0,1N KOH	299

B) IR abszorpciós spektrum a következő abszorpciós maximumokkal (cm<sup>-1</sup>):

3700—3100; 3000—2800 (nujol); 1655; 1620—1550; 1500; 1460 (nujol); 1375 (nujol); 1300; 1205; 1145; 1010; 970; 930; 840

C) az <sup>1</sup>H—NMR spektrum a következő jelcso-

portokat mutatja (ppm-ben) 270 MHz-en, DMSO— $d_6$  (hexadeutero-dimetilszulfoxid) és  $CF_3COOH$  elegyében felvéve, belső standardként (0,00 ppm) TMS-t alkalmazva (delta, ppm):

2,51, s (DMSO— $d_6$ ); 2,50, s ( $NCH_3$ ); 2,88, m (Z2); 3,33, m (Z'2); 4,10, m (X6); 4,34, d (X5); 4,43, d (X7); 4,93, m (X2); 5,04, s (4F); 5,09, s (Z6); 5,54, d (X4); 5,75, s (4B); 6,05, d (X3); 7,76, s (6B); 6,3—8,4 (aromás és peptid-NH-k)

D) retenciósi idő ( $R_t$ ) 0,59 a teikoplanin  $A_2$  2 komponenshez viszonyítva ( $R_t = 20,3$  perc) az elemzést fordított fázisú HPLC-vel a következő körülmények között végezzük:

oszlop: Ultrasphere ODS (5  $\mu$ m/Altex/Beckman)

4,6 mm (belső átmérő)  $\times$  250 mm

elő-oszlop: Brownlee Labs RP 18 (5  $\mu$ m)

A eluálószer:

$CH_3CN$  10%

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  (2,5 g/l) 90%

pH 6,0-ra beállítva

B eluálószer:

$CH_3CN$  70%

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  (2,5 g/l) 30%

pH 6,0-ra beállítva

eluálás: lineáris gradiens (5%—60% B eluálószer

A eluálószerben), 40 perc alatt

áramlási sebesség: 1,8 ml/perc

UV detektor: 254 nm

belső standard: teikoplanin  $A_2$  2 komponens

(Gruppo Lepetit S. p. A.)

Ugyanilyen körülmények között az L 17054 antibiotikumhoz (Gruppo Lepetit, 119575 sz. európai szabadalmi bejelentés) viszonyított retenciósi idő 1,42.

E) molekulatömeg FAB—MS-sel meghatározva kb. 1211

F) sóképzésre képes sav-csoportok

G) sóképzésre képes amino-funkció

H) a maghoz nem kapcsolódik mannoz-egység, valamint addíciós sói előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

— az A 40926 antibiotikum komplexet, A 40926 antibiotikum AB komplexet, A 40926 antibiotikum A faktort, A 40926 antibiotikum B faktort, A 40926 antibiotikum  $B_0$  faktort, A 40926 antibiotikum PA faktort, A 40926 antibiotikum PB faktort ellenőrzött savas hidrolízisnek vetjük alá egy erős savval, megfelelő szerves oldószerben, korlátozott mennyiségű (0,1—10 tömeg/tömeg%) víz jelenlétében;

— ha a végtermékek keverékéhez jutunk, kívánt esetben ezeket kromatográfias eljárással választjuk szét.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a reakció hőmérsékletét 4 °C és 80 °C között tartjuk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy erős savként hidrogénhalogénideket, foszforsavakat, kénsavat vagy halogén-ecetsavakat alkalmazunk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy erős savként sósavat alkalmazunk.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szerves oldószerként 1—4 szénatomos alkil-szulfoxidot, 1—4 szénatomos alkil-formamidot, dioxánt, tetrahidrofuránt vagy hasonló oldószereket alkalmazunk.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hidrolízist dimetil-szulfoxid és tömény sósav 8:2—9,5:0,5 arányú keverékével, 40 °C—80 °C közötti hőmérsékleten hajtuk végre.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon komplex vagy egy faktora előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az A 40926 antibiotikum komplexet, A 40926 antibiotikum AB komplexet, A 40926 antibiotikum A faktort, A 40926 antibiotikum B faktort, A 40926 antibiotikum  $B_0$  faktort, A 40926 antibiotikum PA faktort, A 40926 antibiotikum PB faktort ellenőrzött savas hidrolízisnek vetjük alá 9:1—9,5:0,5 arányú dimetil-szulfoxid — 37 tömeg%-os sósav eleggyel, kb. 65 °C hőmérsékleten, kb. 5 órán át, és kívánt esetben kromatográfias eljárással szétválasztjuk az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon A faktort és az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon B faktort.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás az A 40926 antibiotikum aglikon előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az A 40926 antibiotikum komplexet vagy valamely faktorát, az A 40926 antibiotikum AB komplexet, az A 40926 antibiotikum A faktort, A 40926 antibiotikum B faktort, A 40926 antibiotikum PA faktort, A 40926 antibiotikum PB faktort, A 40926 antibiotikum  $B_0$  faktort, A 40926 antibiotikum mannozil-aglikont vagy az A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikont — az AB komplexet vagy valamelyik faktorát — ellenőrzött savas hidrolízisnek vetjük alá

(a) egy szerves protikus oldószer jelenlétében, amilyenek a reakció hőmérsékletén folyékony alifás és alfa-halogénezett alifás savak, a reakció hőmérsékletén folyékony, vízzel kissé elegyedő alifás és cikloalifás alkanolok, a reakció hőmérsékletén folyékony, vízzel kissé elegyedő fenil-helyettesített rövidszénláncú alkanolok — ahol a fenilcsoport kívánt esetben 1—4 szénatomos alkil-, 1—4 szénatomos alkoxi- vagy halogén-helyettesítőt tartalmazhat —, és a reakció hőmérsékletén folyékony beta-polihalogénezett rövidszénláncú alkanolok,

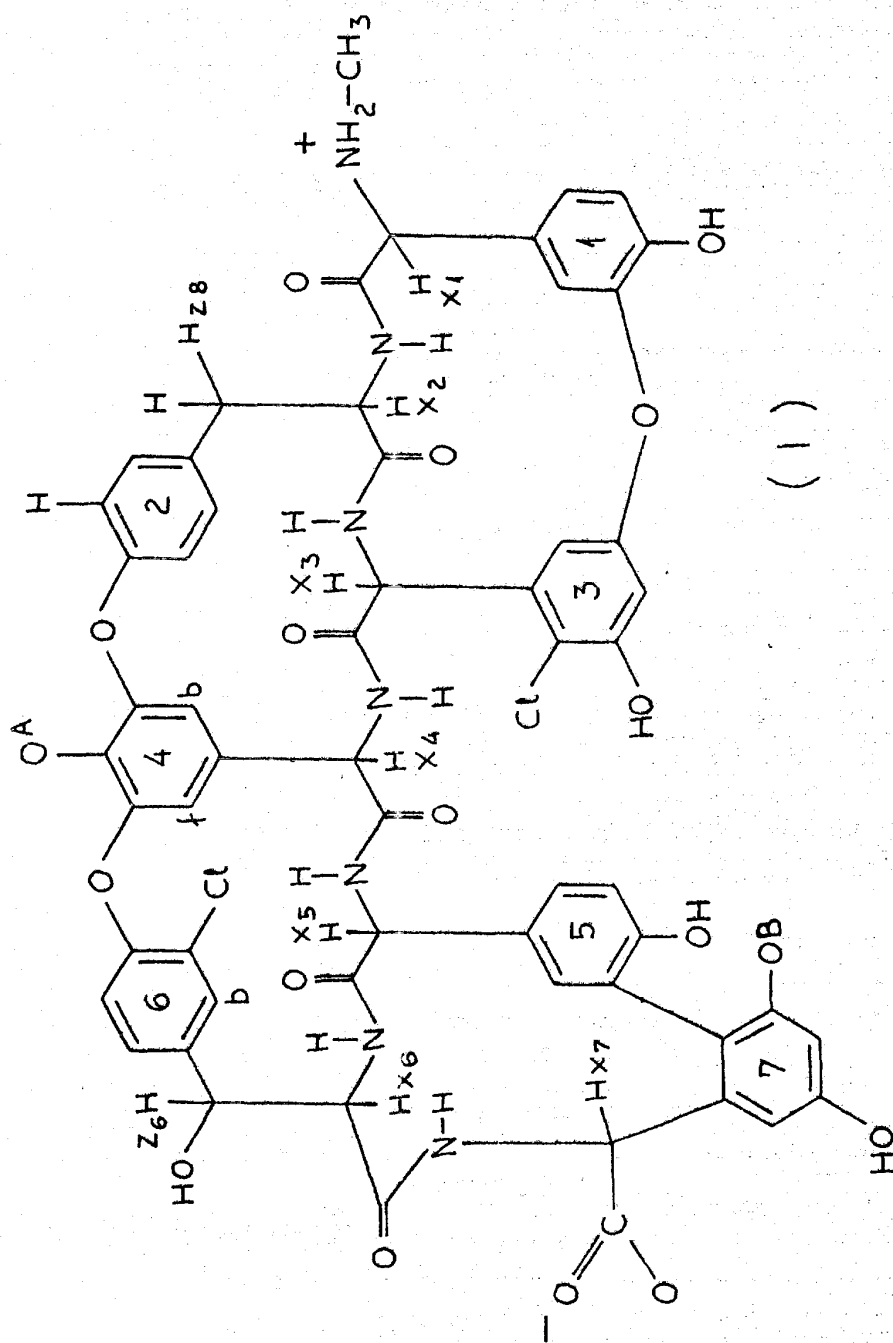
(b) egy, az oldószerrel kompatibilis oldószerrel, amilyenek az erős ásványi savak, erős szerves savak, és az erős savas kationcserélő gyanták, hidrogén alakban,

(c) kb. 20 °C és kb. 100 °C közötti reakció-hőmérsékleten.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás az A 40926 antibiotikum aglikon előállítására *azzal jellemezve*, hogy az A 40926 antibiotikum komplexet, A 40926 antibiotikum AB komplexet, A 40926 antibiotikum A faktort, A 40926 antibiotikum B faktort, A 40926 antibiotikum  $B_0$  faktort, A 40926 antibiotikum PA faktort, A 40926 antibiotikum PB faktort, A 40926 antibiotikum N-acilaminoglukuronil-aglikon AB komplexet vagy valamely faktorát, vagy az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikont ellenőrzött savas hidrolízisnek vetjük alá 8:2—9,5:0,5 dimetil-szulfoxid:37 tömeg%-os sósav eleggyel, kb. 80 °C hőmérsékleten.

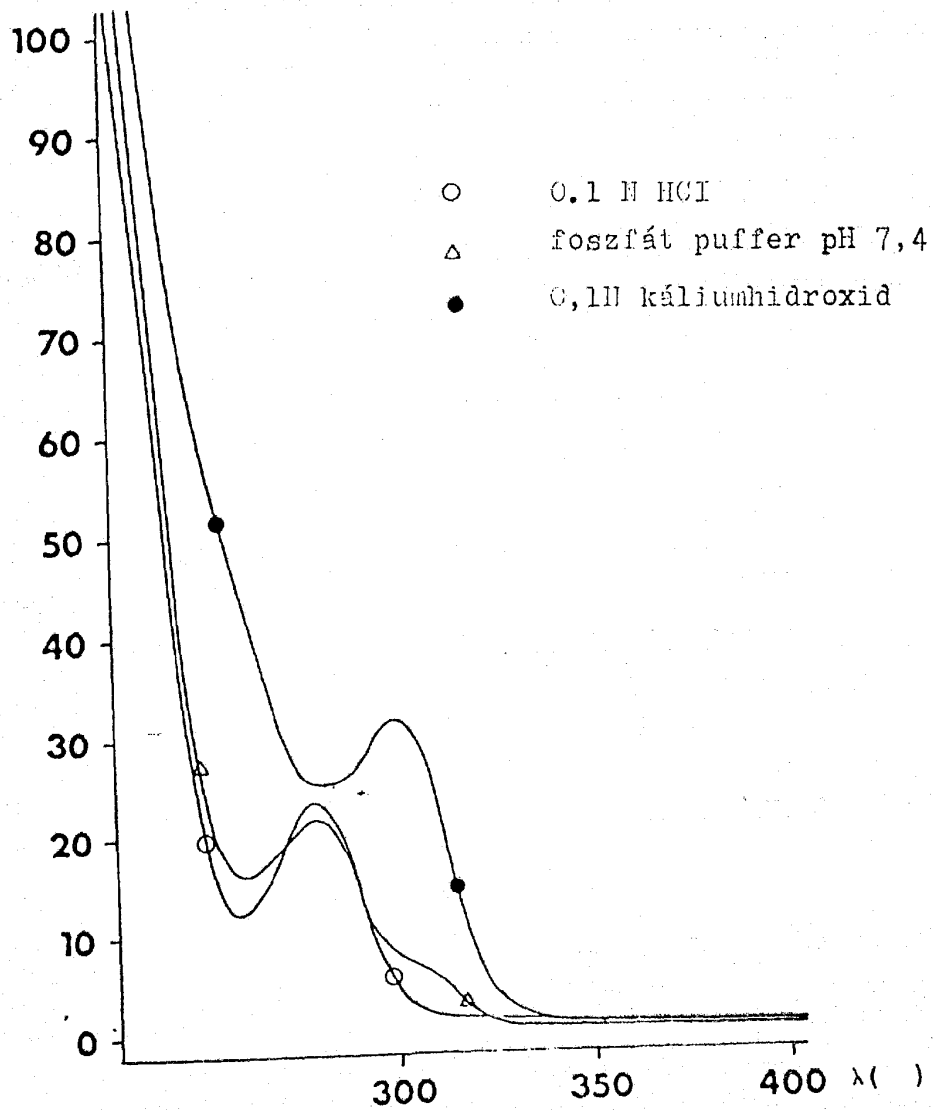
10. Eljárás gyógyszerkészítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy 1. igénypont szerinti eljárással előállított vegyületet egy gyógyászati szempontból elfogadható vivőanyaggal és adott esetben adalékanyagokkal gyógyszerkészítménnyé feldolgozzuk.





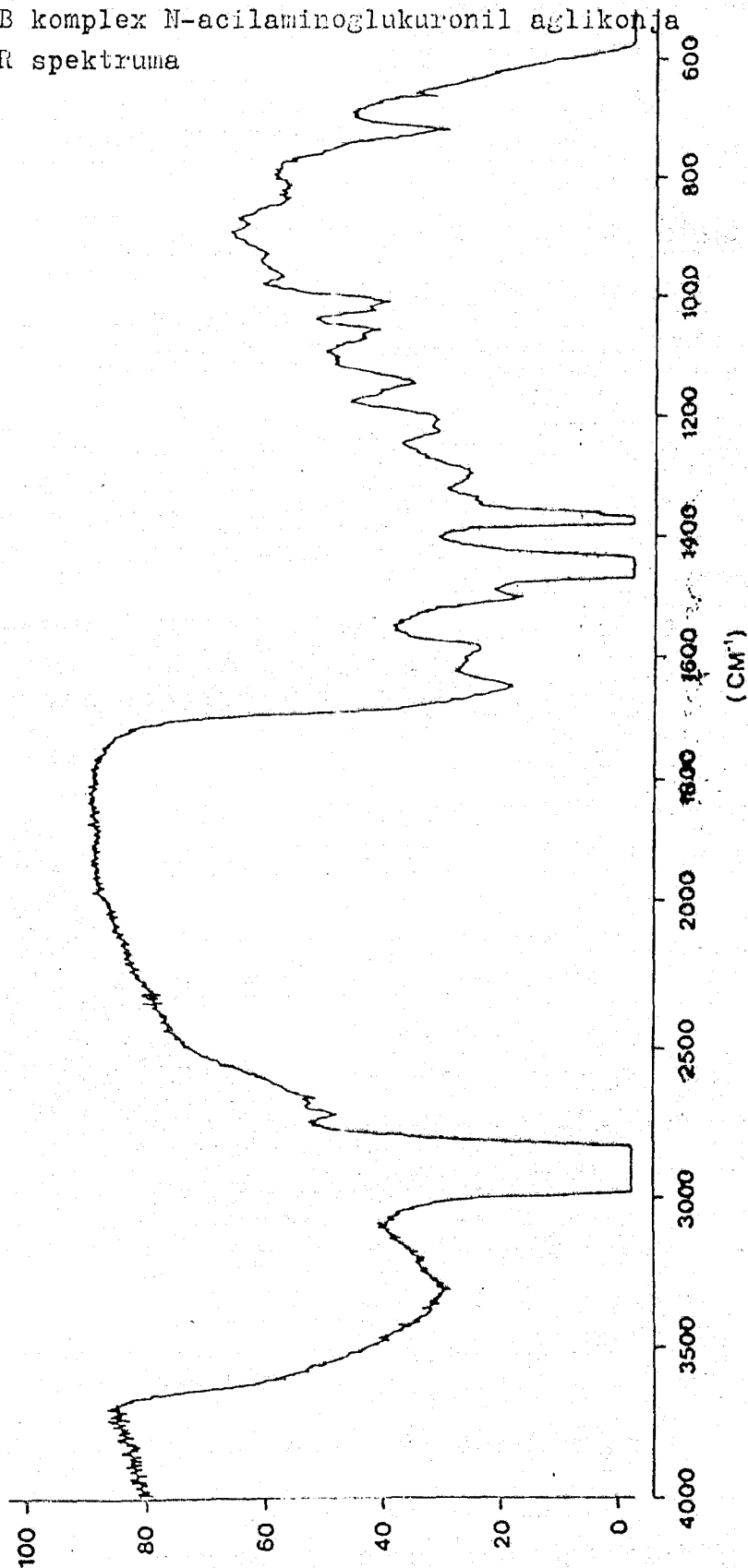
Az A 40926 antibiotikum AB komplex 196  
N-acilamino-glukuronil aglikonja UV spektruma

1. ábra



2. ábra

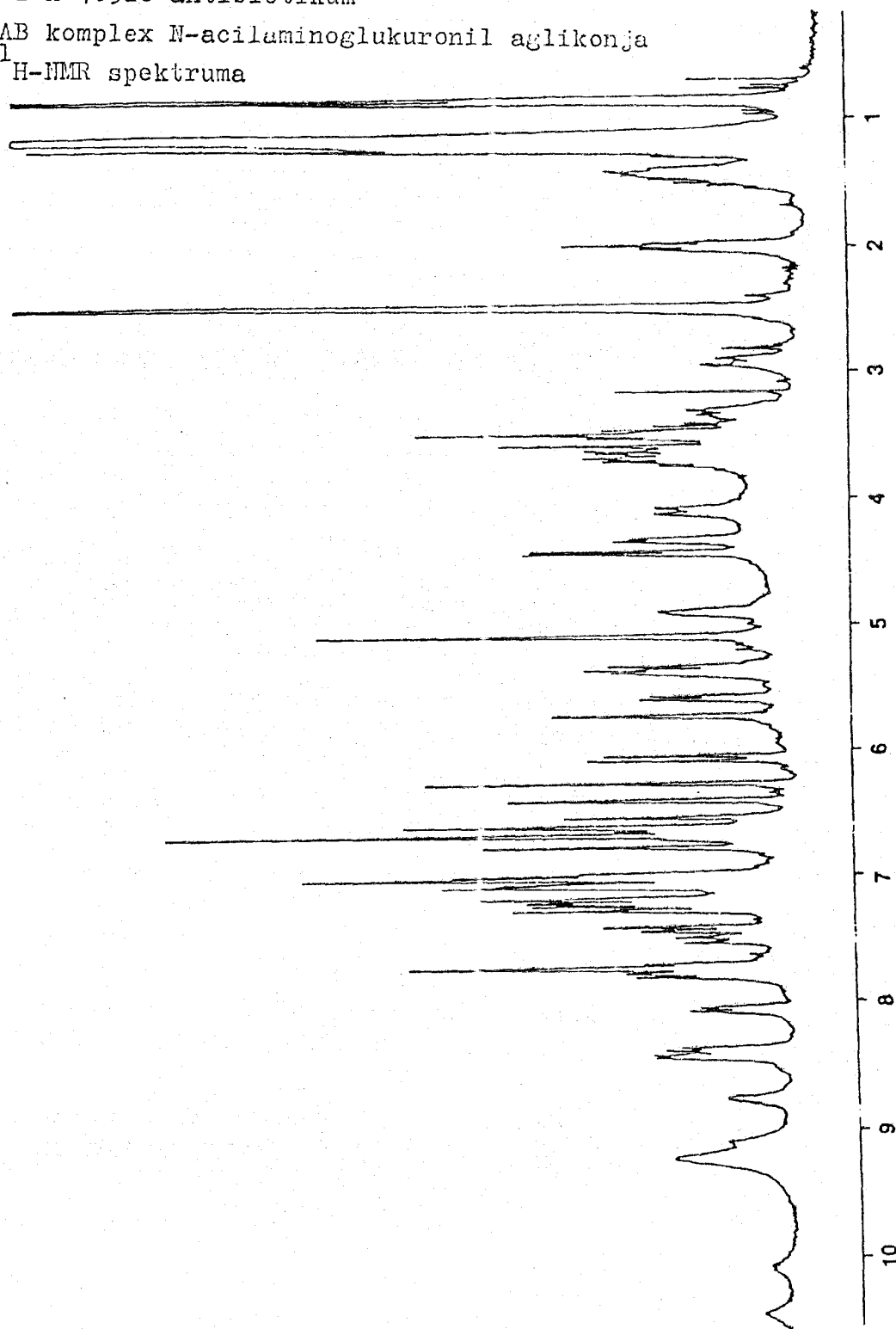
A 40926 antibiotikum

AB komplex N-acilaminoglukuronil aglikonja  
IR spektruma

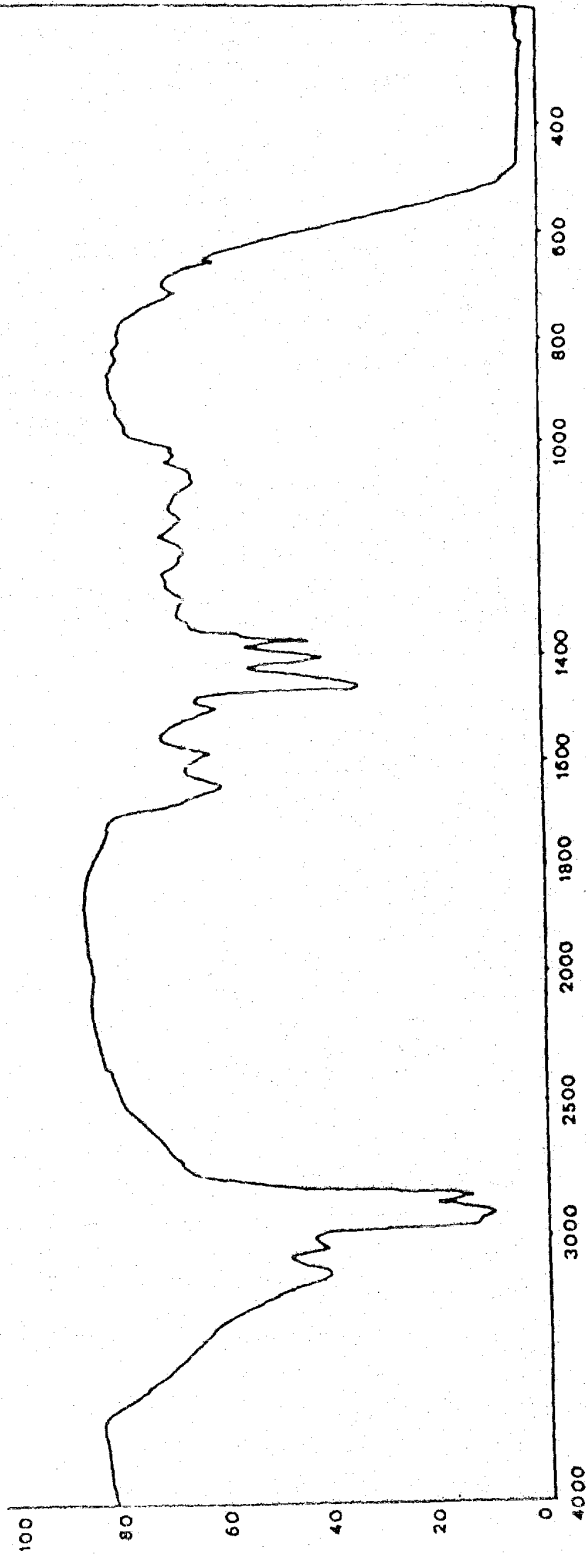
3. ábra

Az A 40926 antibiotikum

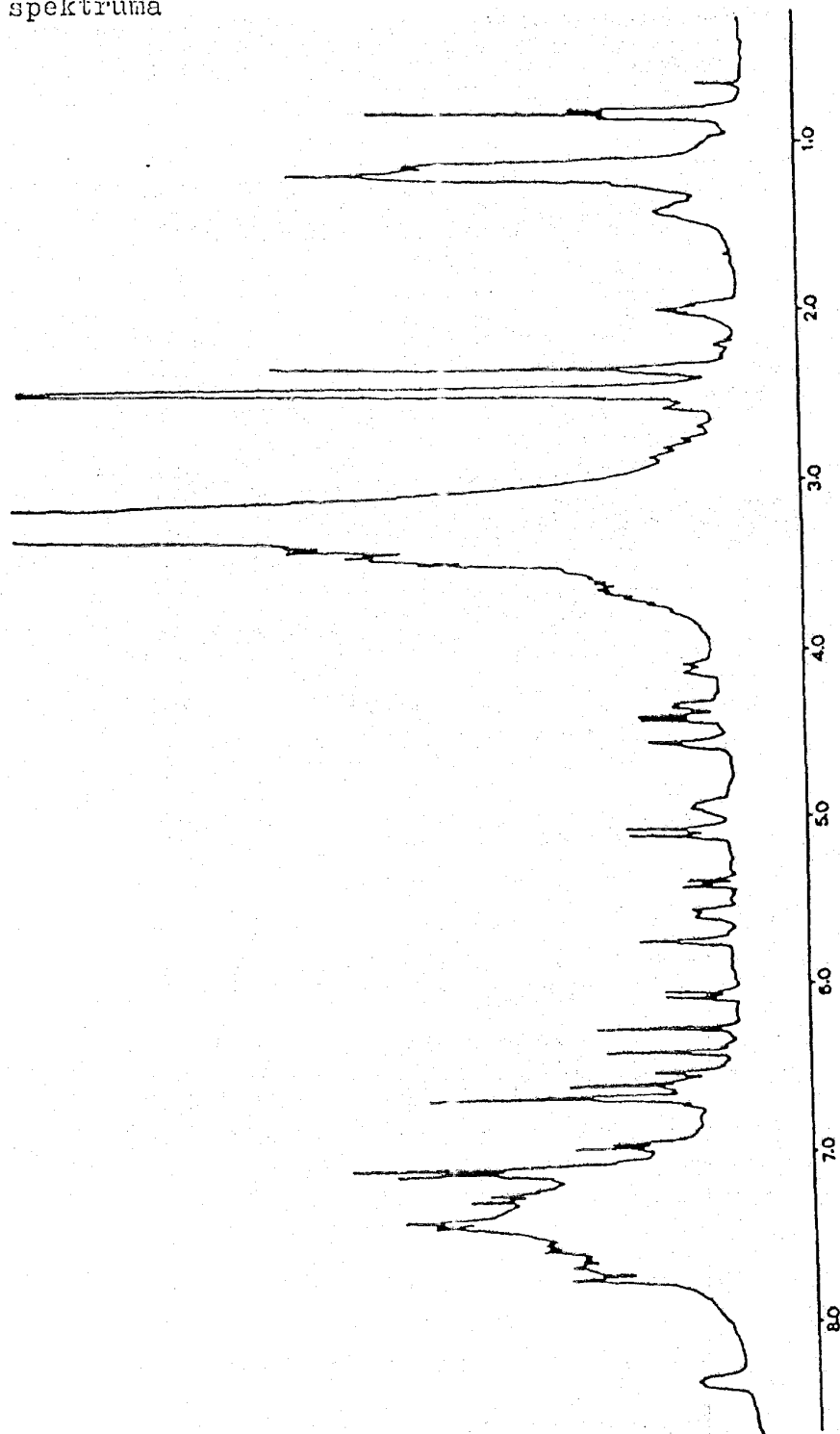
AB komplex N-acilaminoglukuronil aglikonja

<sup>1</sup>H-NMR spektruma

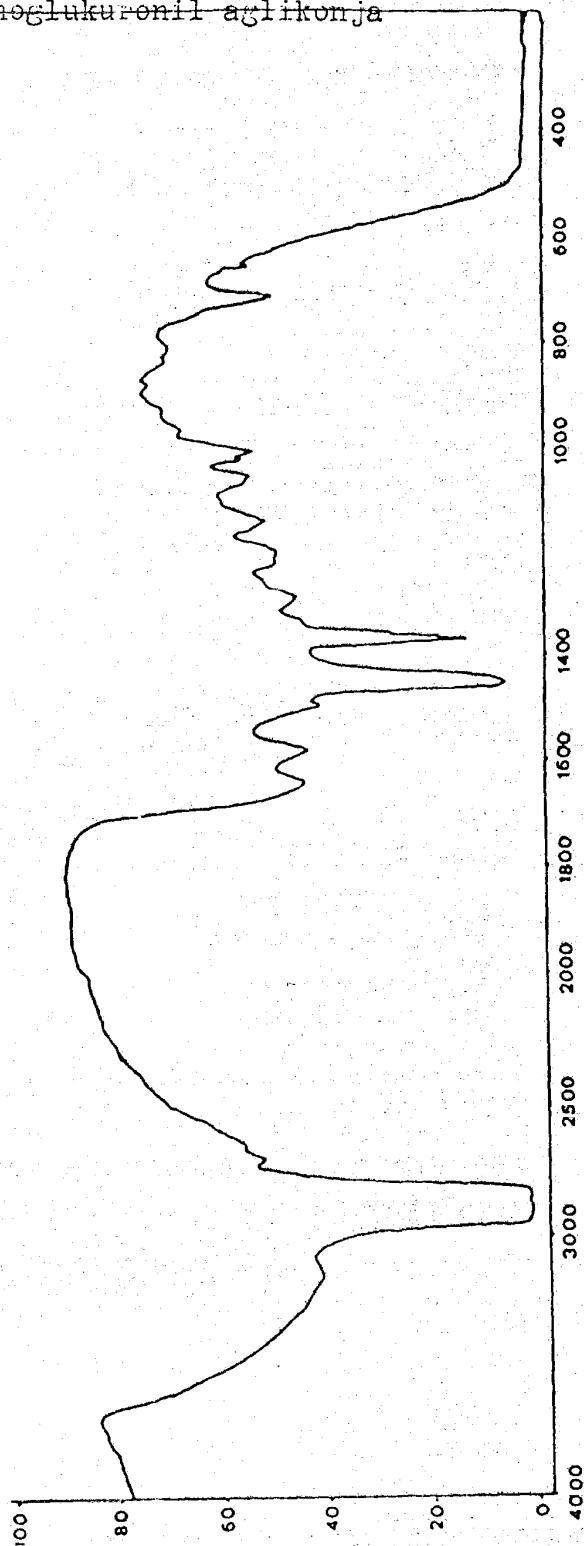
4. ábra

A 40926 antibiotikum A faktor N acilaminoglukuronil aglikonja  
IR spektruma

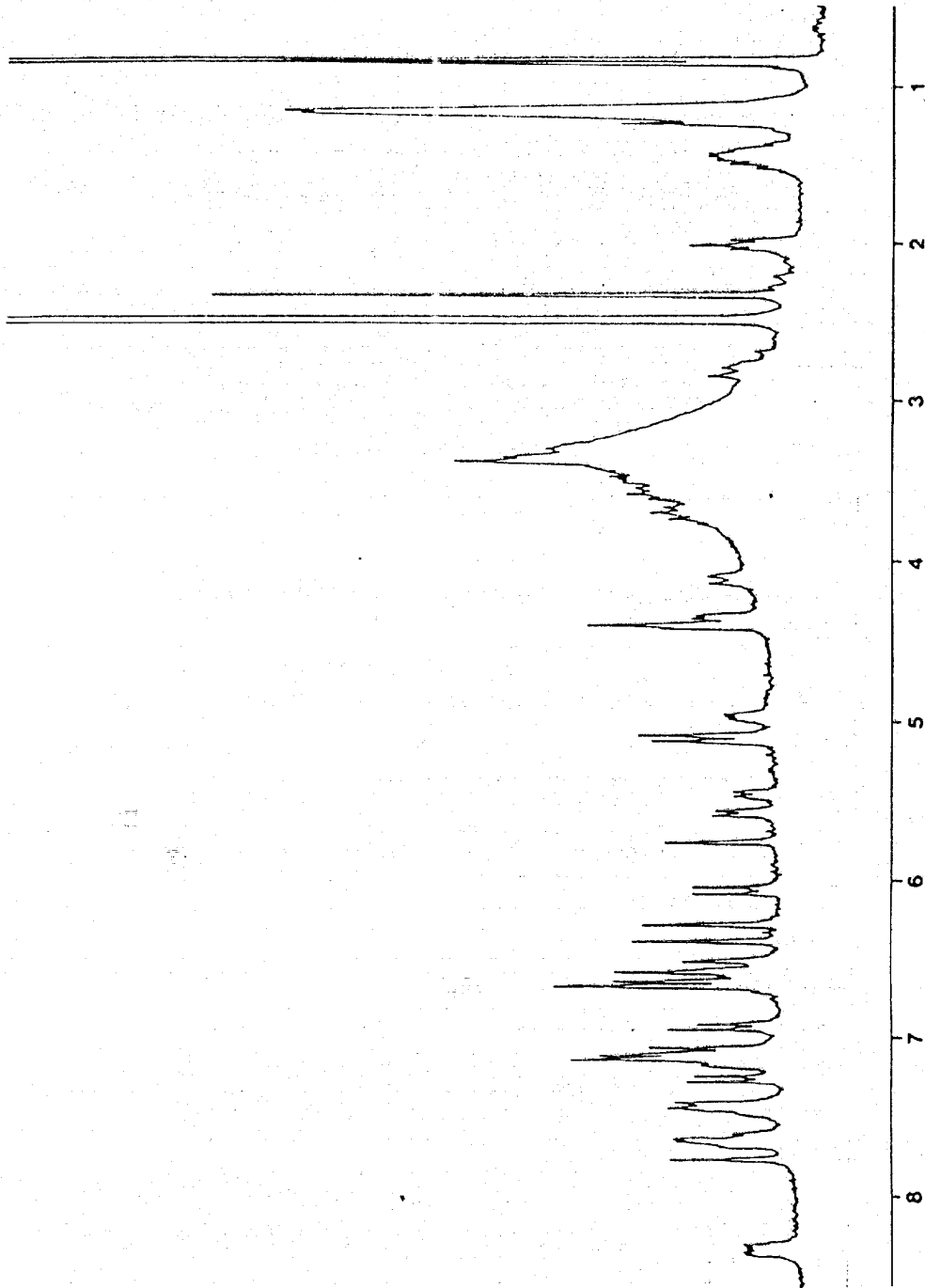
5. ábra  
A 40926 antibiotikum A faktor  
N-acilaminoglukuronil aglikonja  
 $^1\text{H}$ -NMR spektruma



6. ábra  
A 40926 antibiotikum  
B<sub>0</sub> faktor N-acilaminoglukuronil aglikonja  
IR spektruma



7. ábra

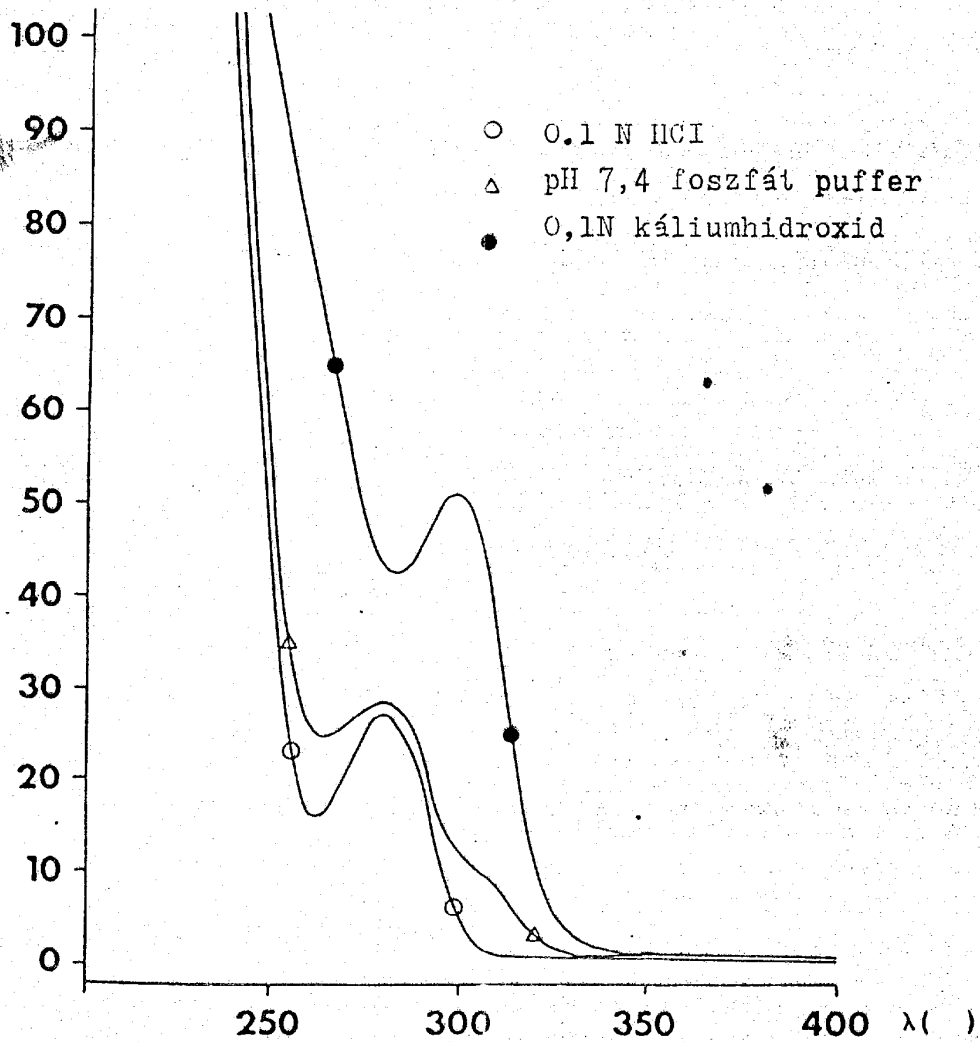
A 40926 antibiotikum B<sub>0</sub> faktor H-acilaminoglukuronil aglikonja  
<sup>1</sup>H-NMR spektruma



196229

Nemzetközi osztályozás: C 07 K 9/00  
A 61 K 31/70

8. ábra  
A 40926 antibiotikum aglikonja  
UV spektruma



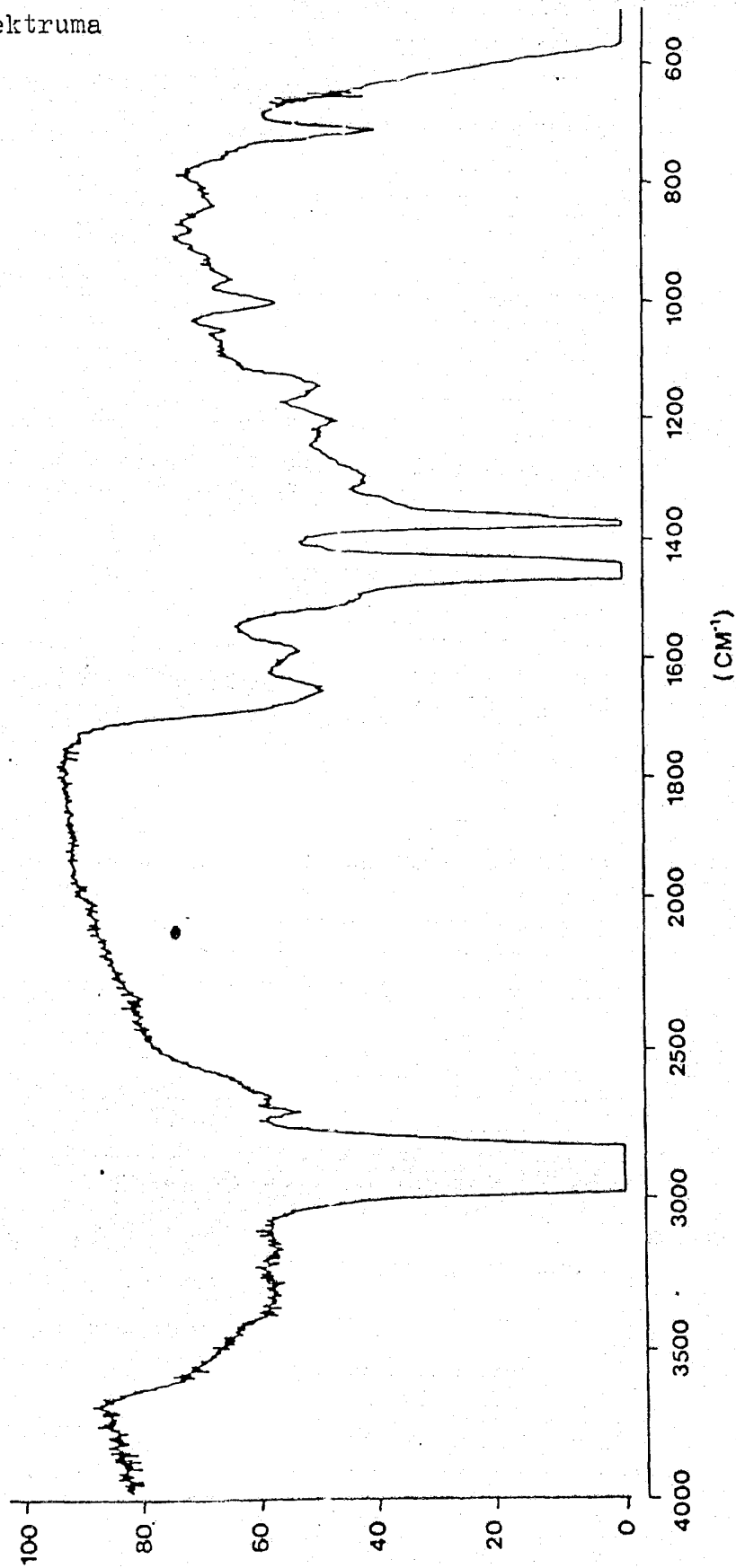
196229

9. ábra

Nemzetközi osztályozás: C 07 K 9/00  
A 61 K 31/70

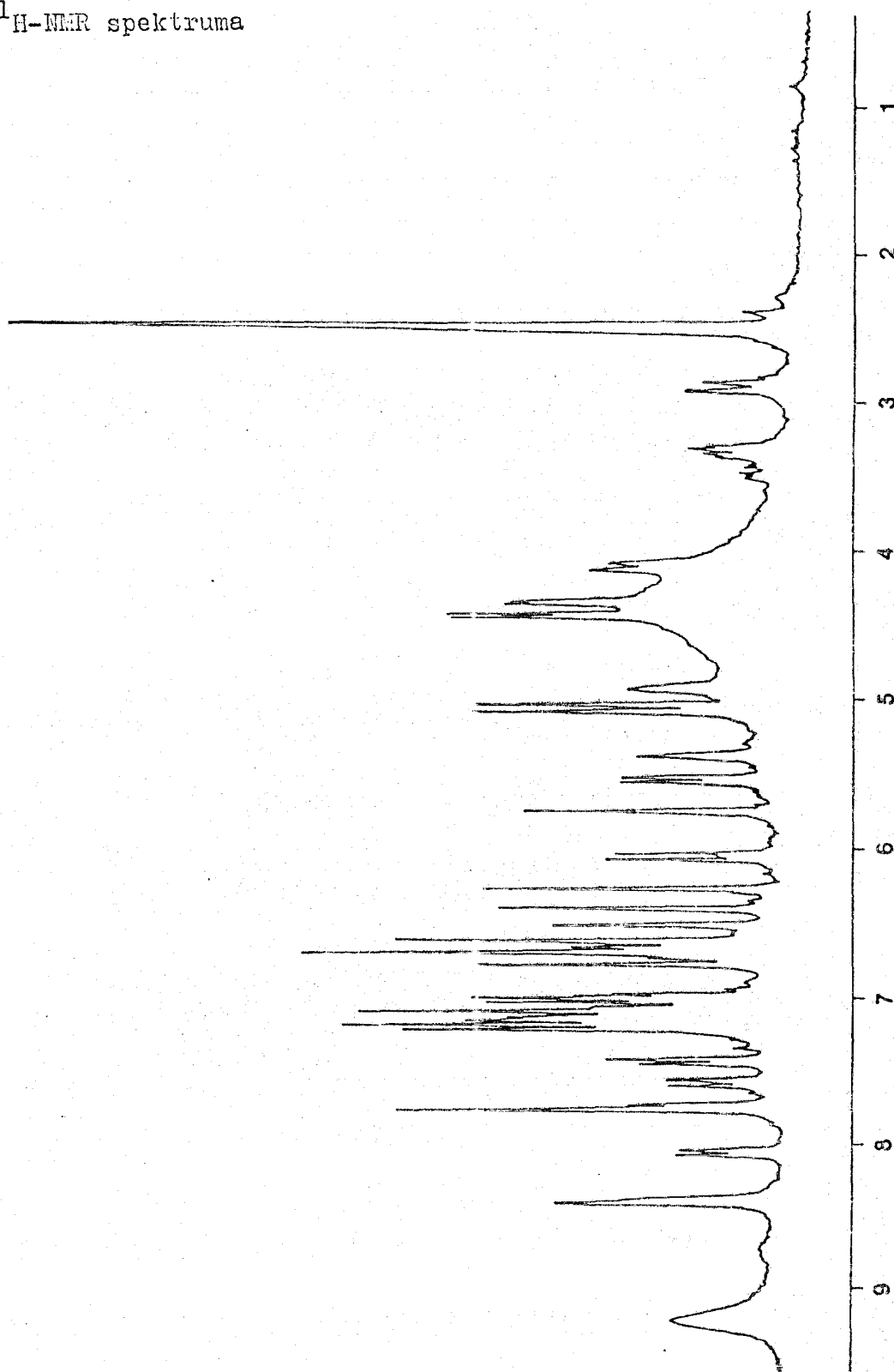
A 40926 antibiotium aglikonja

IR spektruma



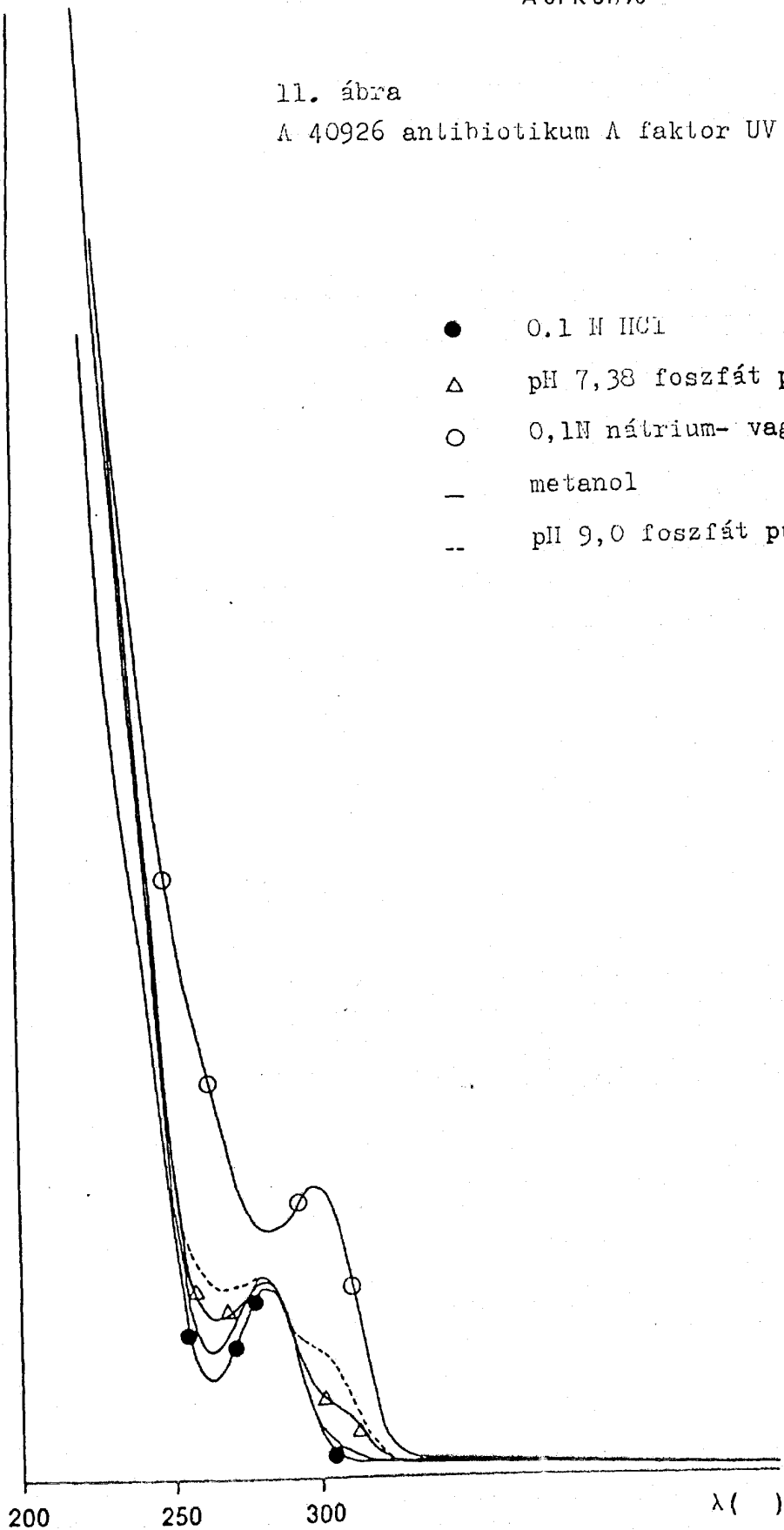
10. ábra

A 40926 antibiotium aglikonja

 $^1\text{H-NMR}$  spektruma

11. ábra

A 40926 antibiotikum A faktor UV spektruma



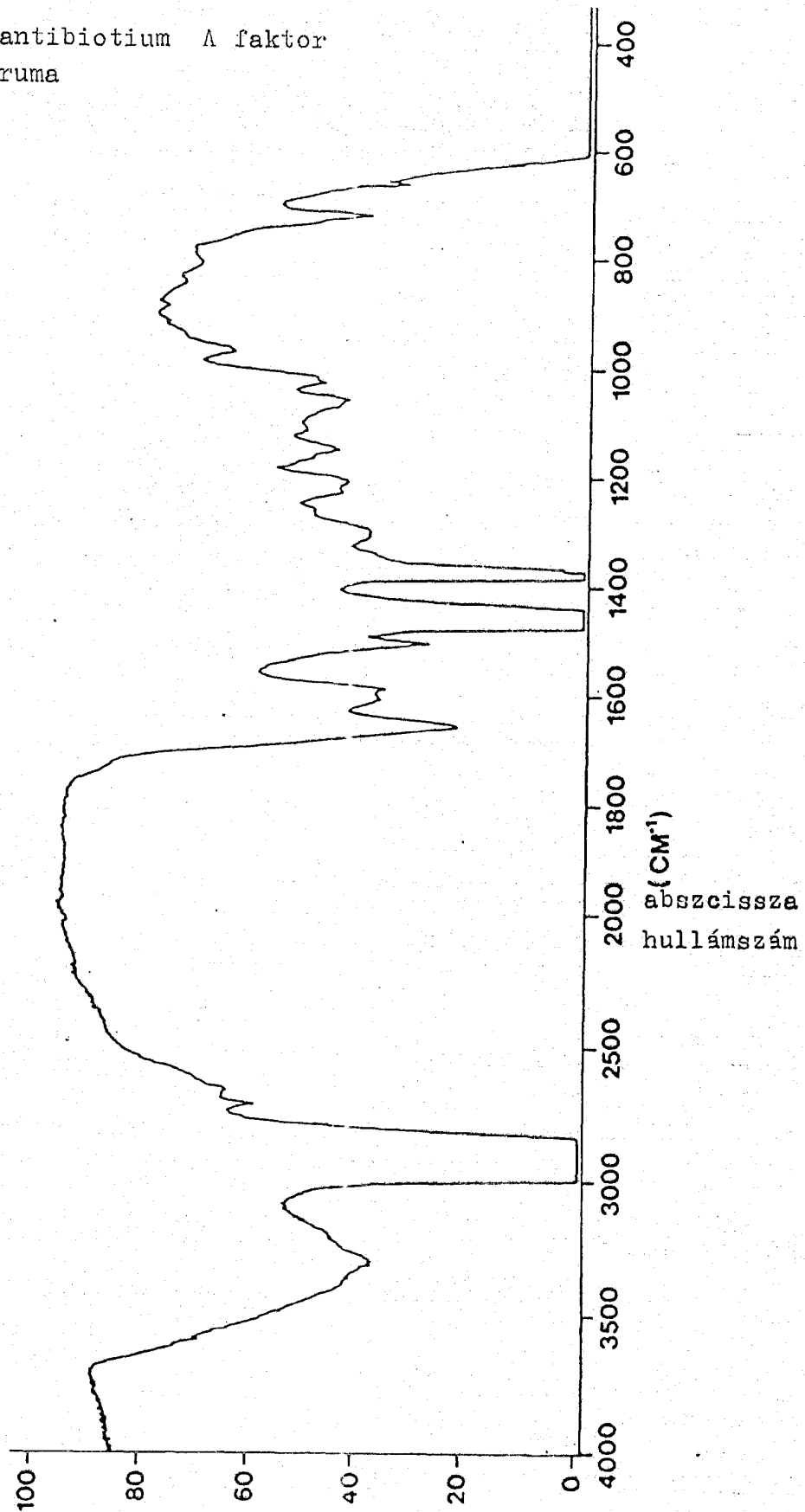
196229

Nemzetközi osztályozás: C 07 K 9/00  
A 61 K 31/70

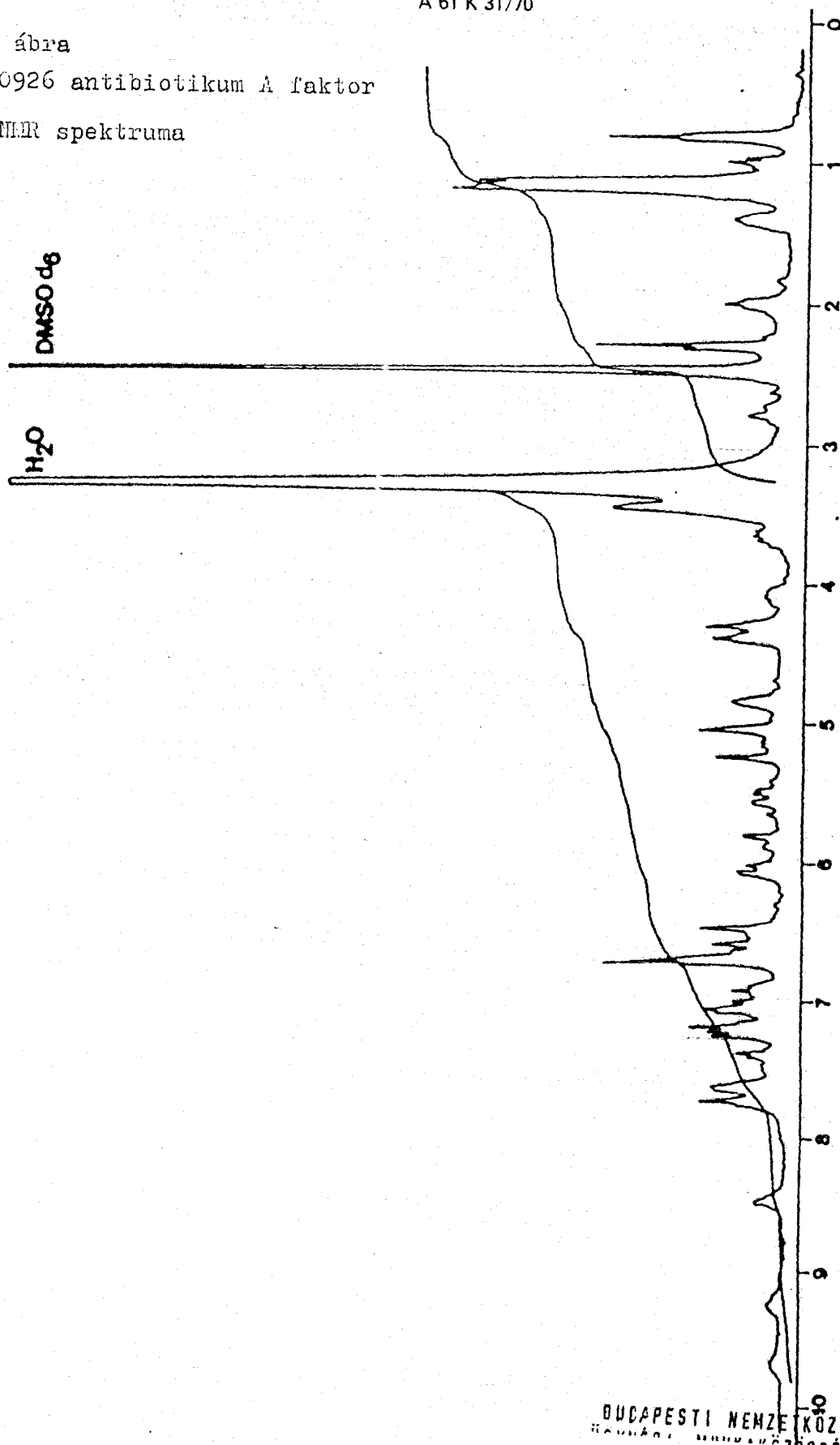
12. ábra

A 40926 antibiotium A faktor

IR spektruma

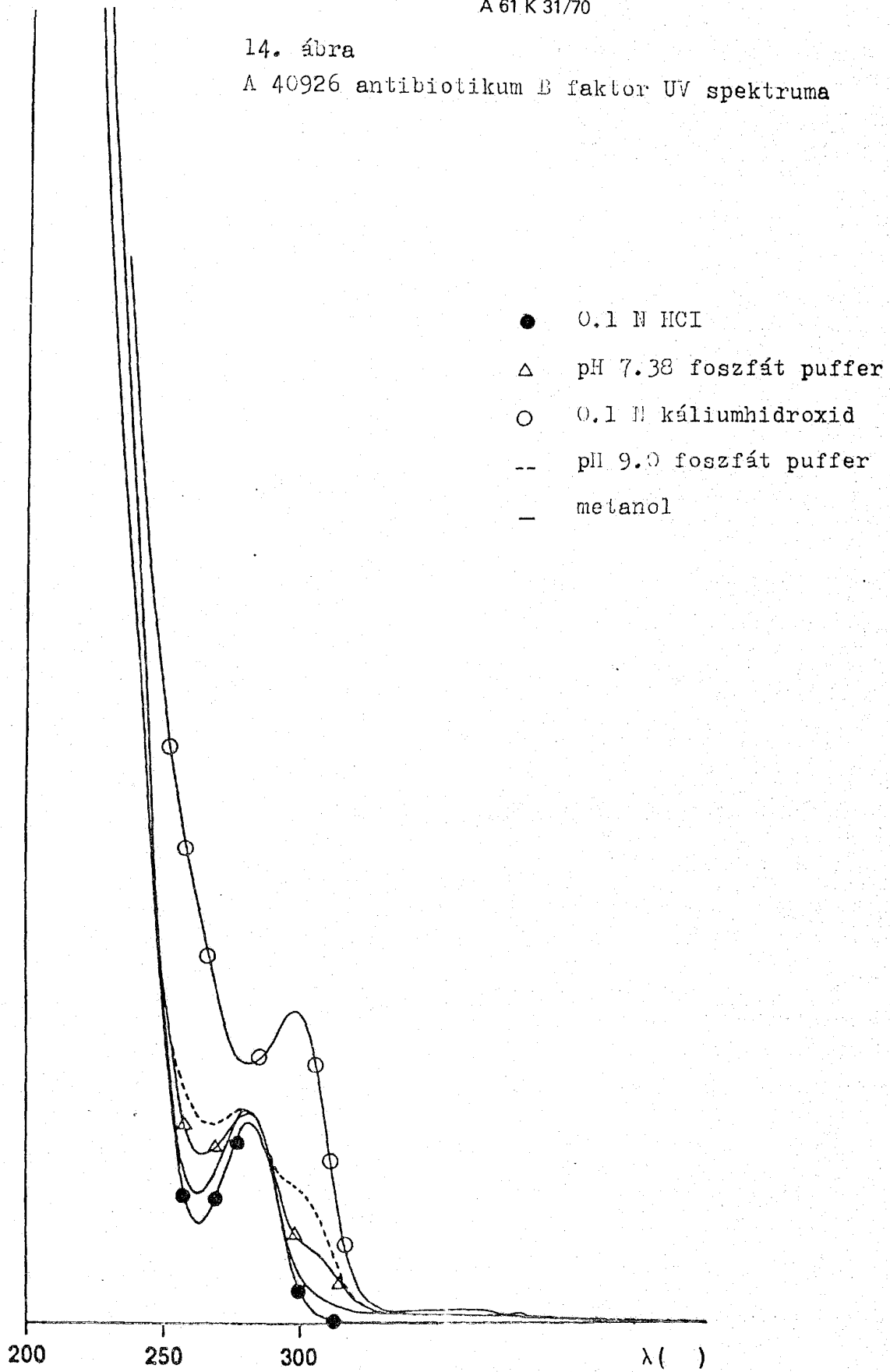


13. ábra  
A 40926 antibiotikum A faktor  
 $^1\text{H-NMR}$  spektruma

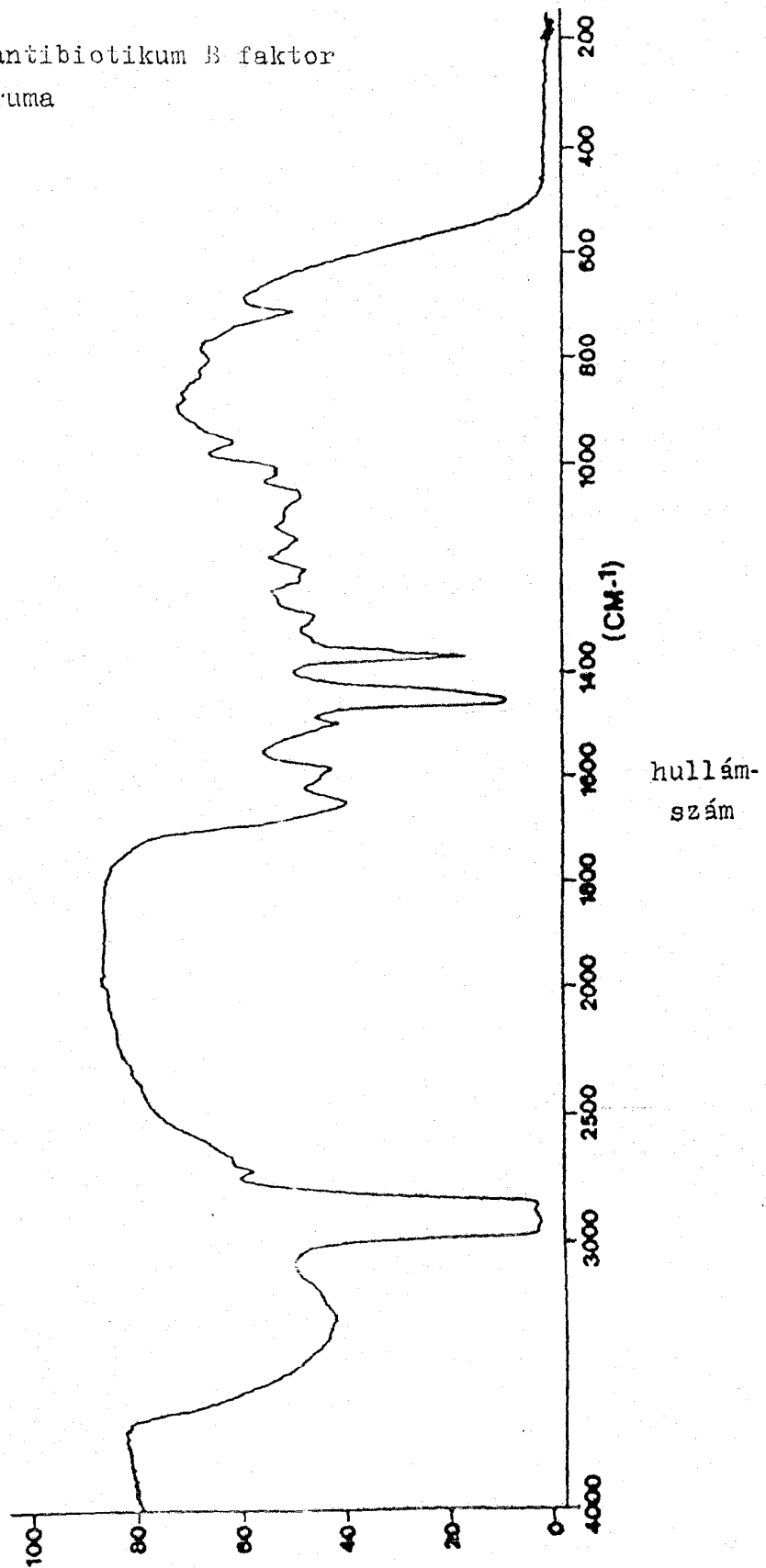


14. ábra

A 40926 antibiotikum B faktor UV spektruma



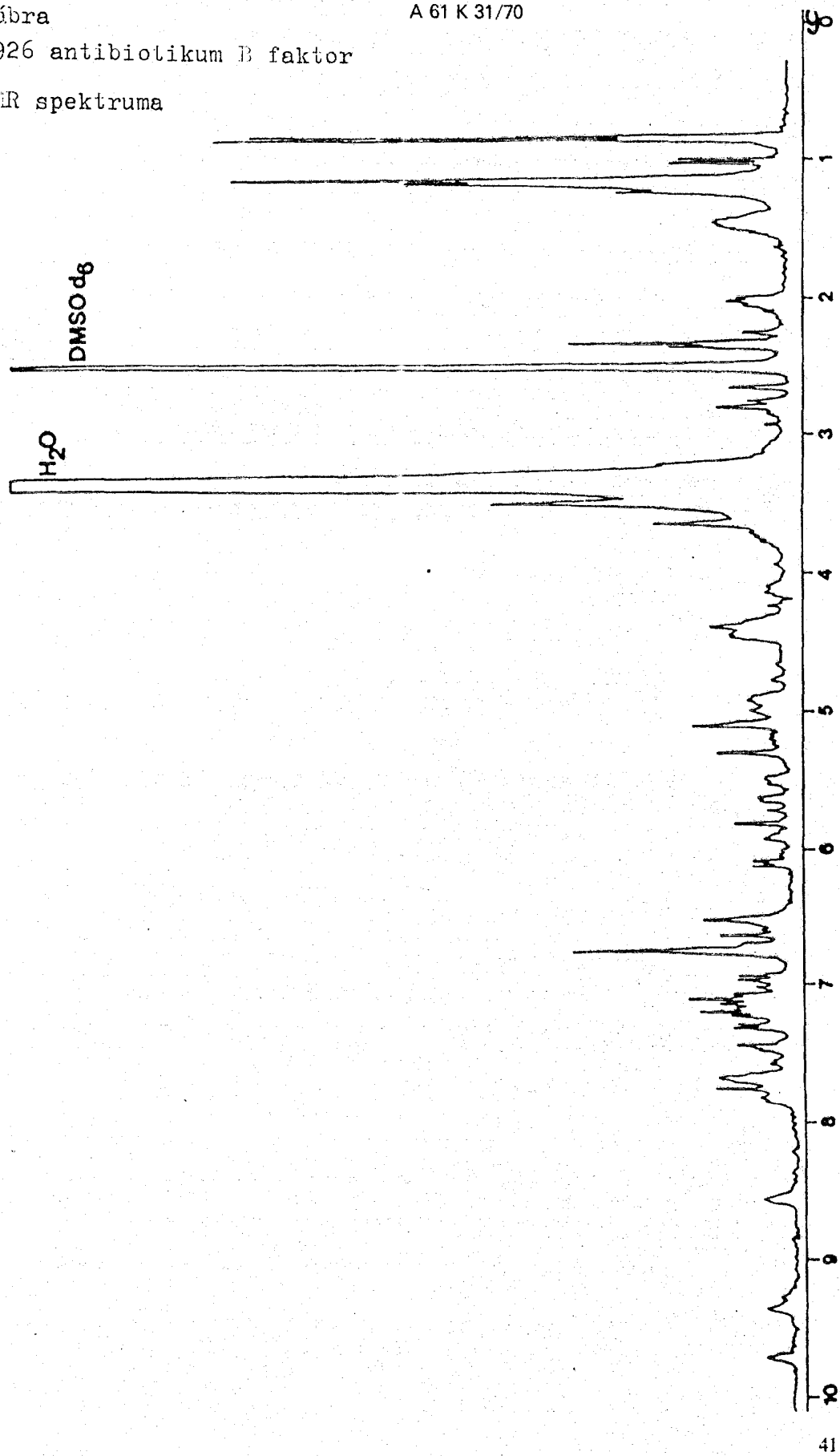
15. ábra  
A 40926 antibiotikum B faktor  
IR spektruma





16. ábra

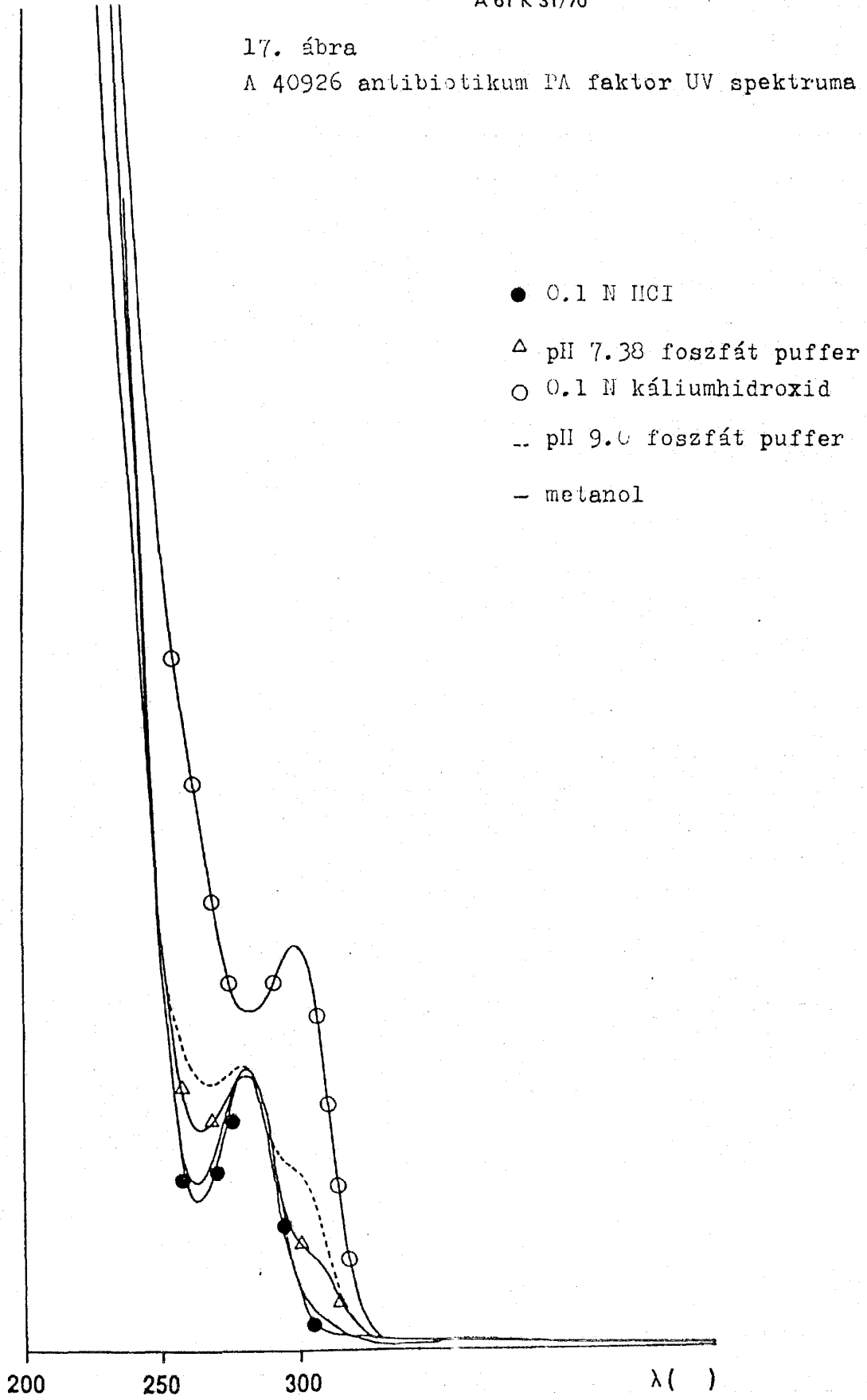
A 40926 antibiotikum B faktor

 $^1\text{H-NMR}$  spektruma

Nemzetközi osztályozás: C 07 K 9/00  
A 61 K 31/70

17. ábra

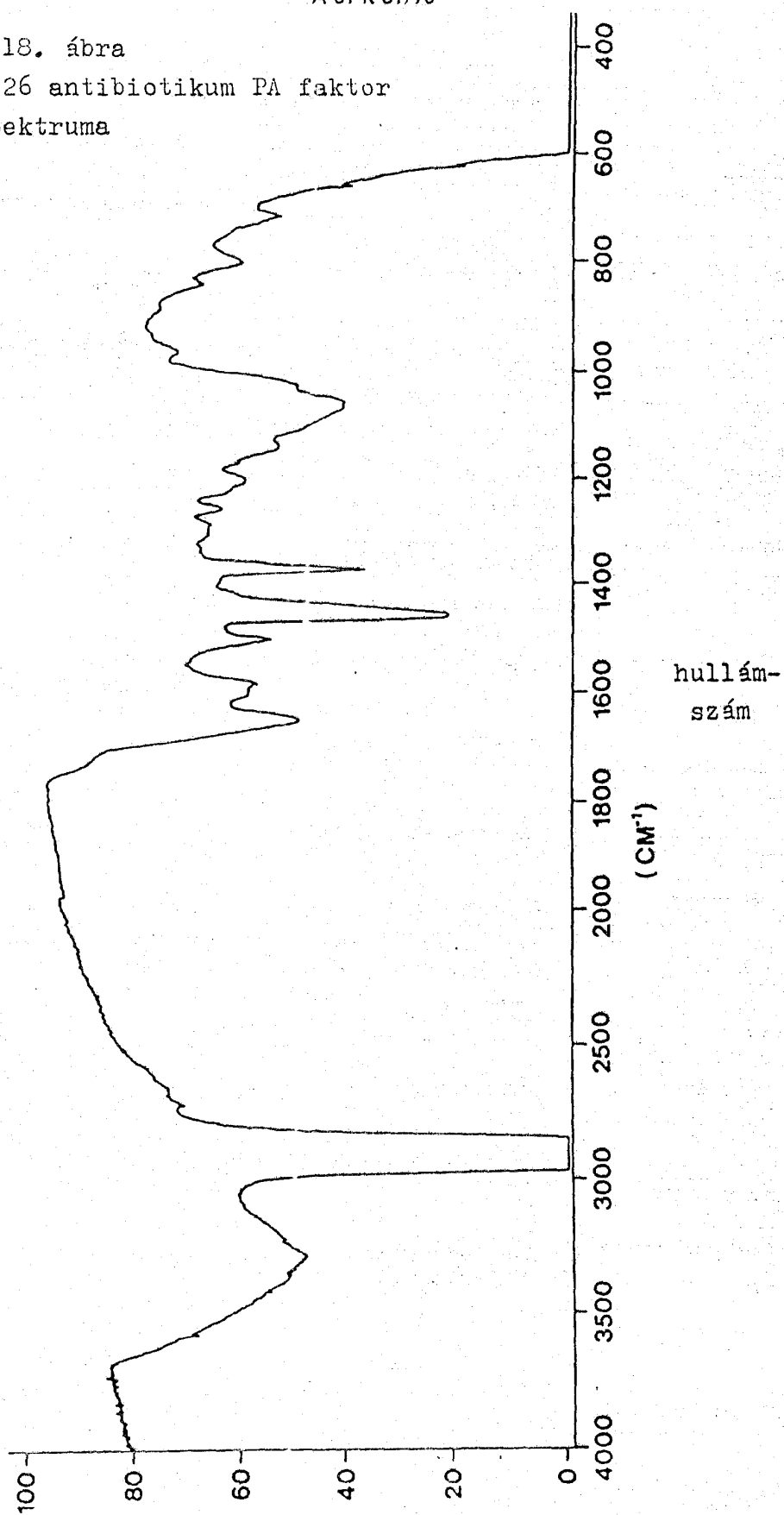
A 40926 antibiotikum PA faktor UV spektruma



196229

Nemzetközi osztályozás: C 07 K 9/00  
A 61 K 31/70

18. ábra  
A 40926 antibiotikum PA faktor  
IR spektruma

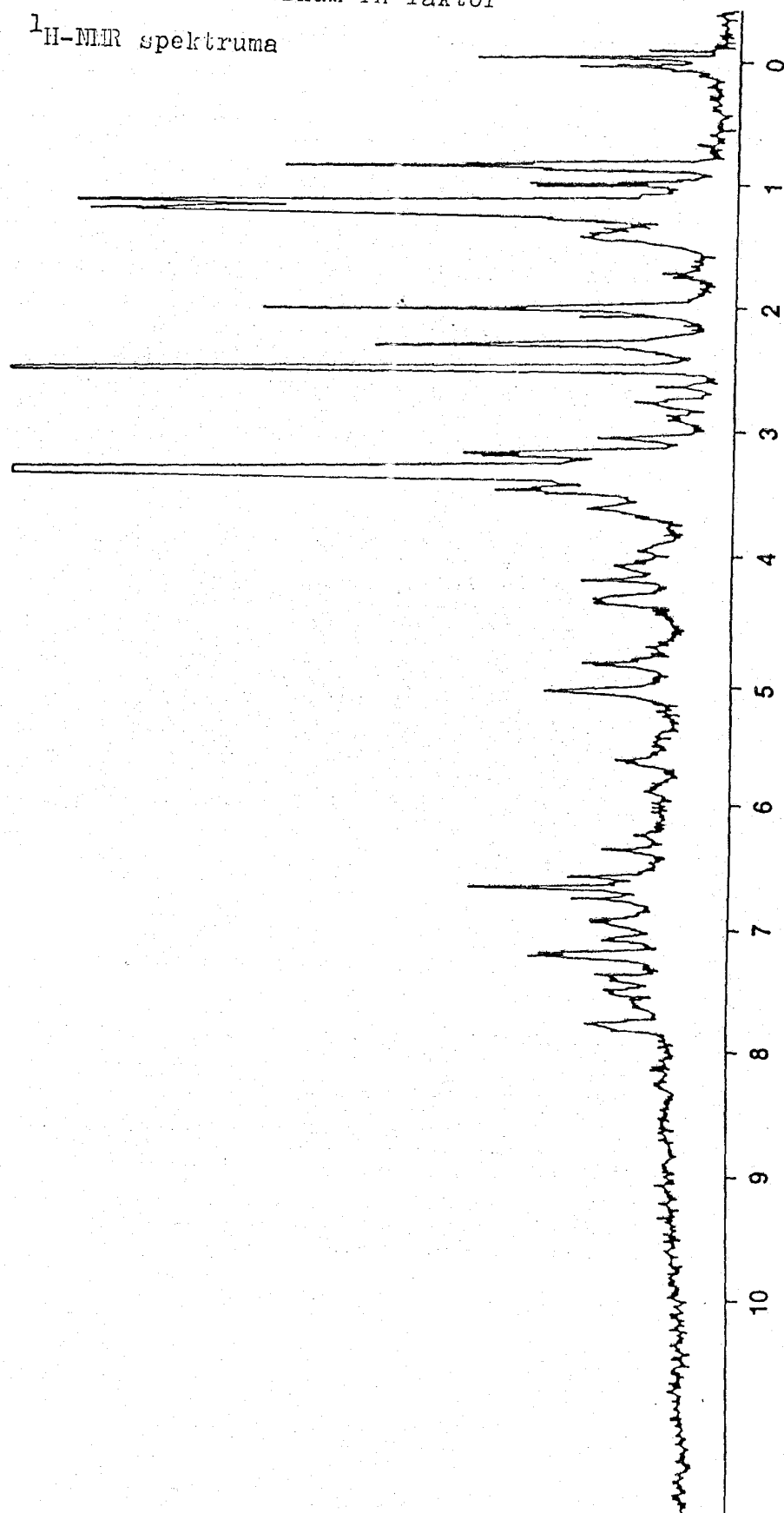


196 229

19. ábra Nemzetközi osztályozás: C 07 K 9/00  
A 61 K 31/70

A 40926 antibiotikum PA faktor

$^1\text{H-NMR}$  spektruma

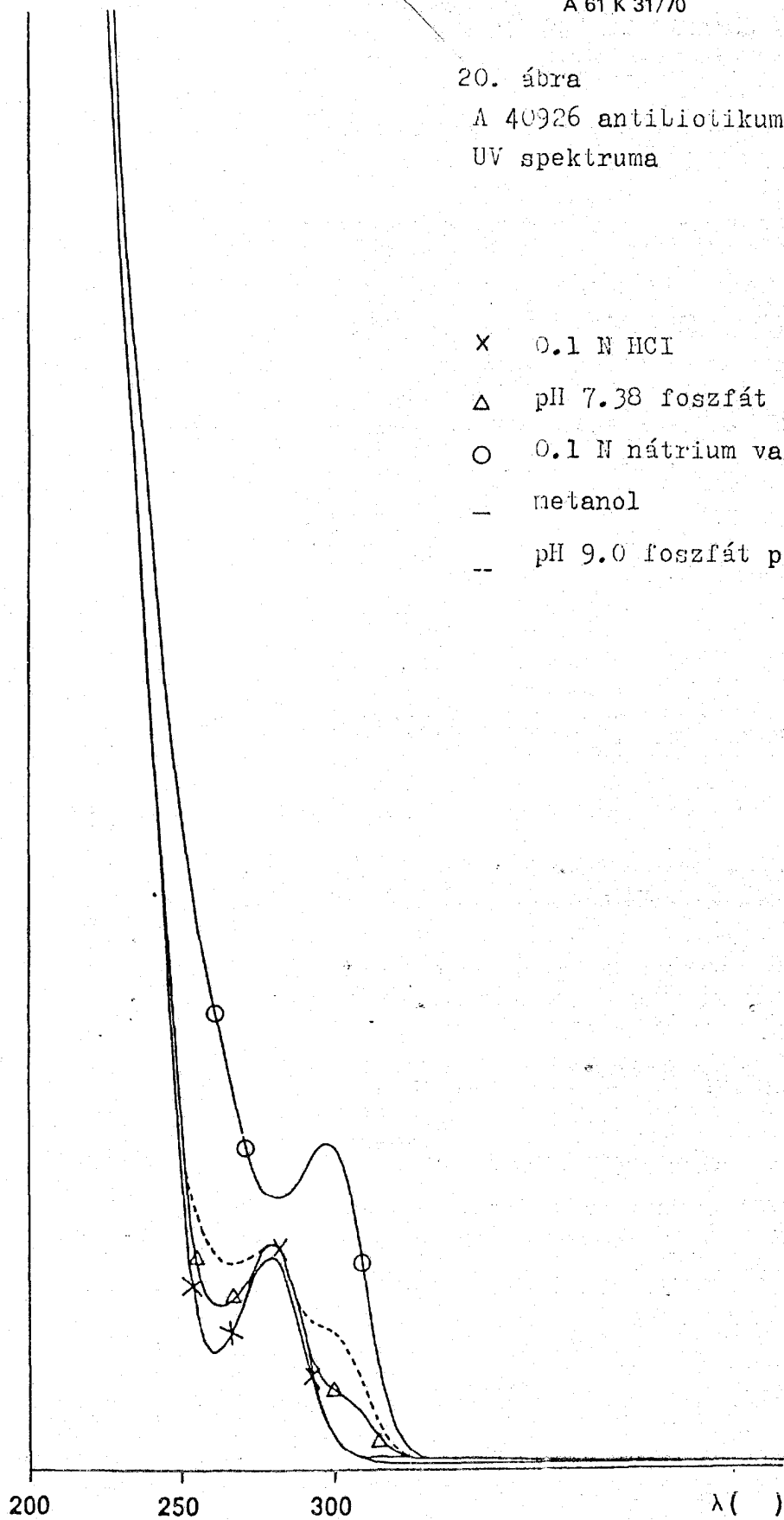


196229

Nemzetközi osztályozás: C 07 K 9/00  
A 61 K 31/70

20. ábra

A 40926 antibiotikum PB faktor  
UV spektruma



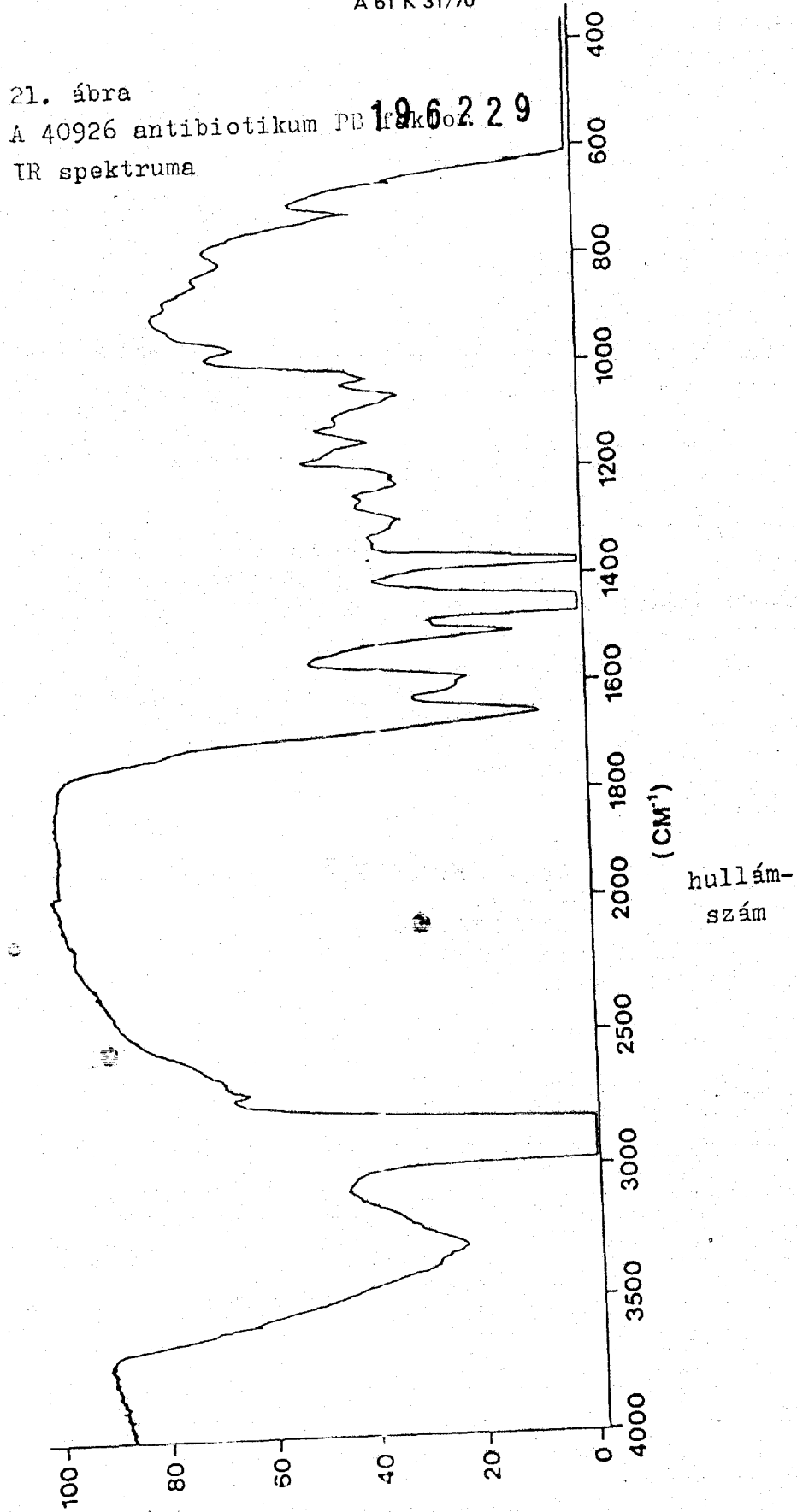
196229

Nemzetközi osztályozás: C 07 K 9/00  
A 61 K 31/70

21. ábra

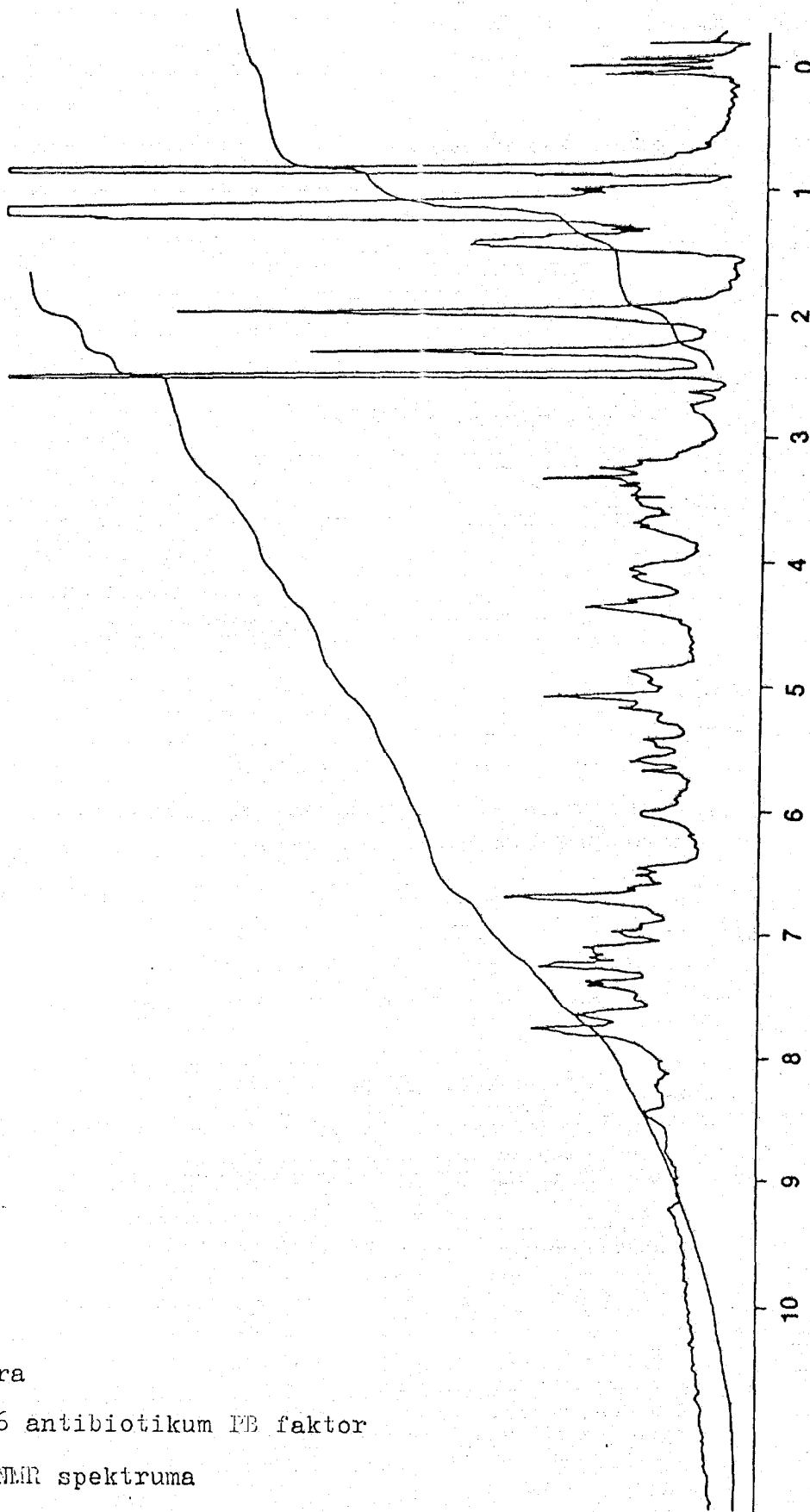
A 40926 antibiotikum PB 196229

IR spektruma



196229

Nemzetközi osztályozás: C 07 K 9/00  
A 61 K 31/70



22. ábra

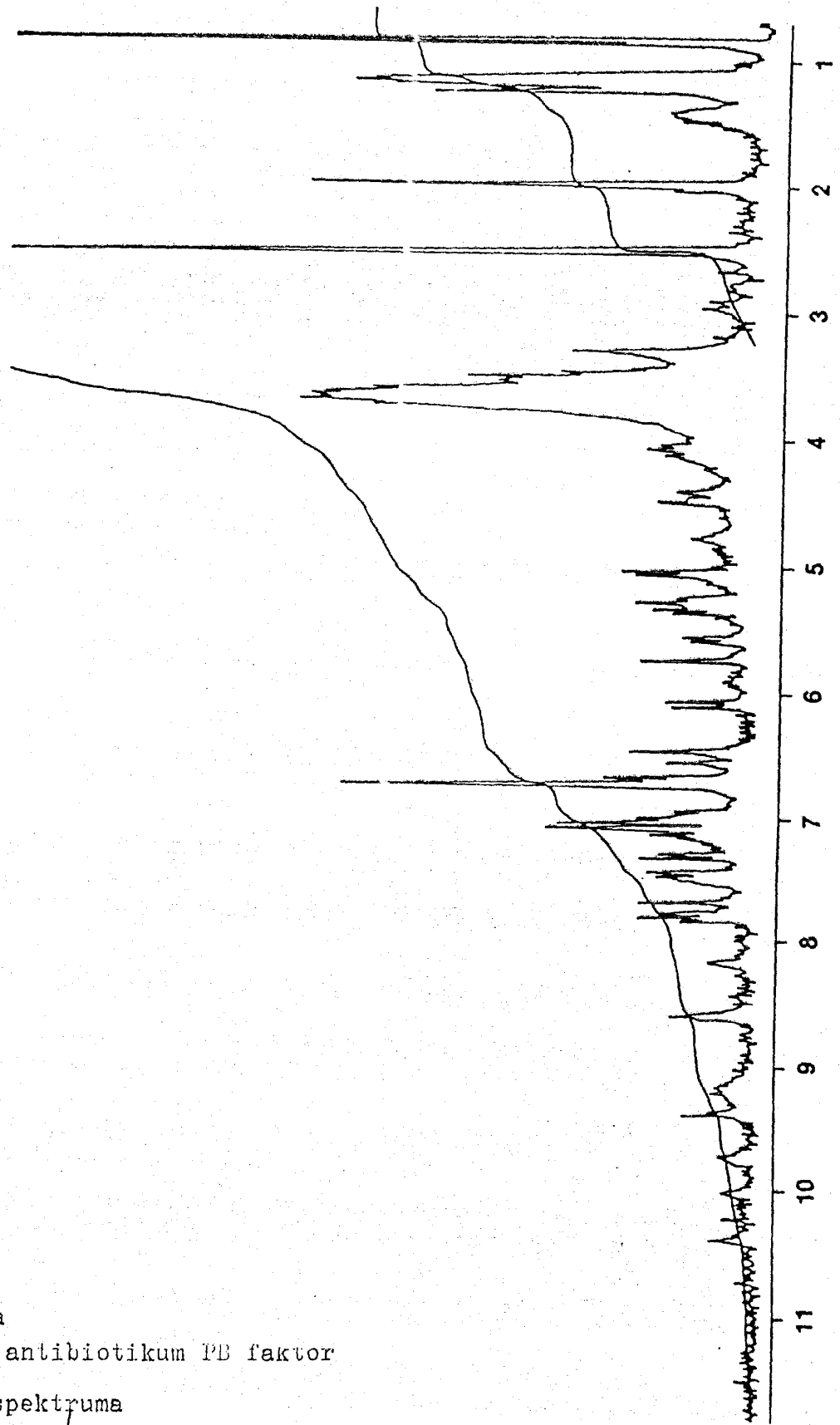
A 40926 antibiotikum PB faktor

$^1\text{H}$ -NMR spektruma

47

196 229

Nemzetközi osztályozás C 07 K 9/00  
A 61 K 31/70



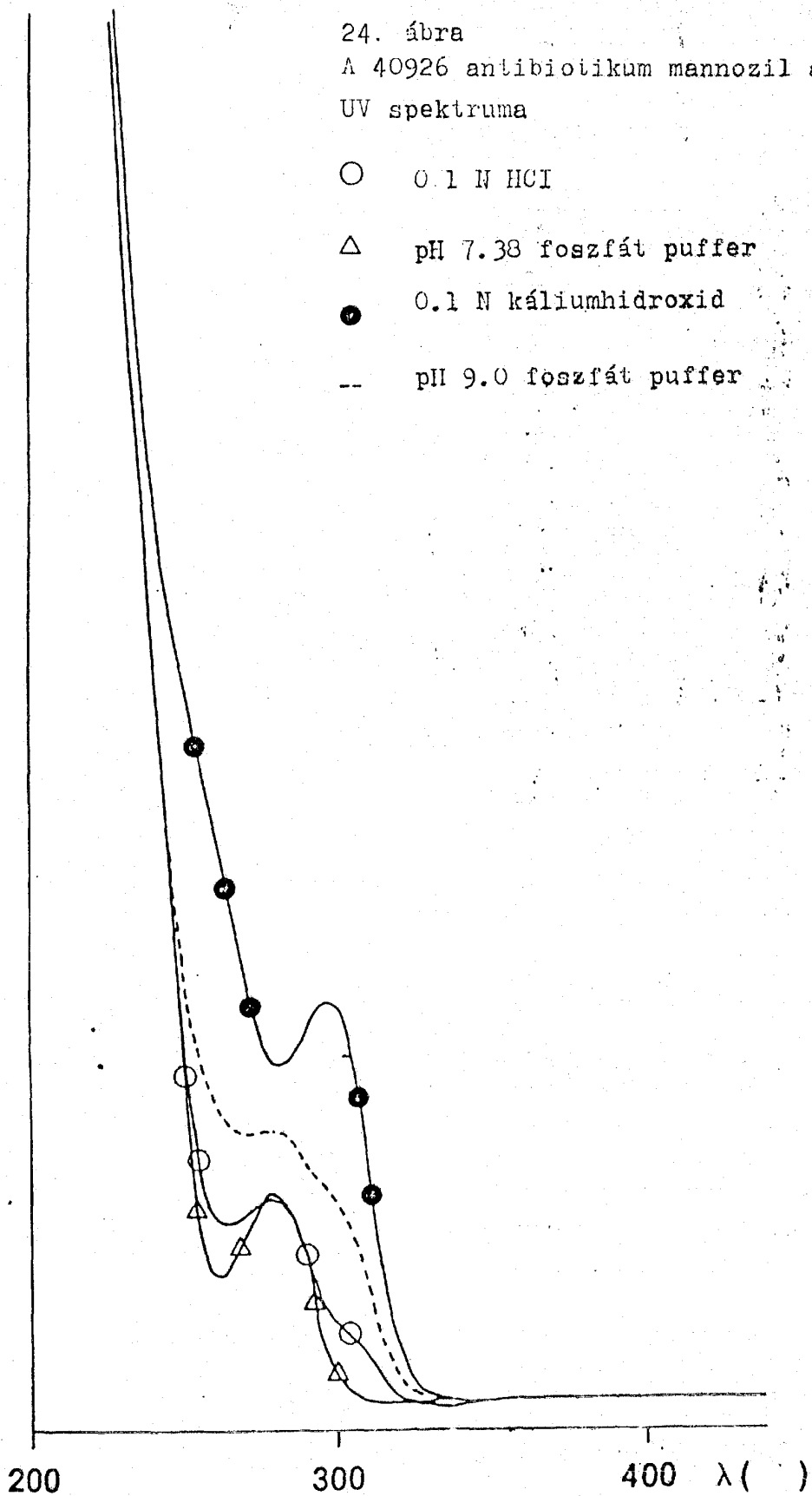
23. ábra  
A 40926 antibiotikum PB faktor

$^1\text{H-NMR}$  spektruma



Nemzetközi osztályozás: C 07 K 9/00  
A 61 K 31/70

24. ábra  
A 40926 antibiotikum mannozil aglikon  
UV spektruma



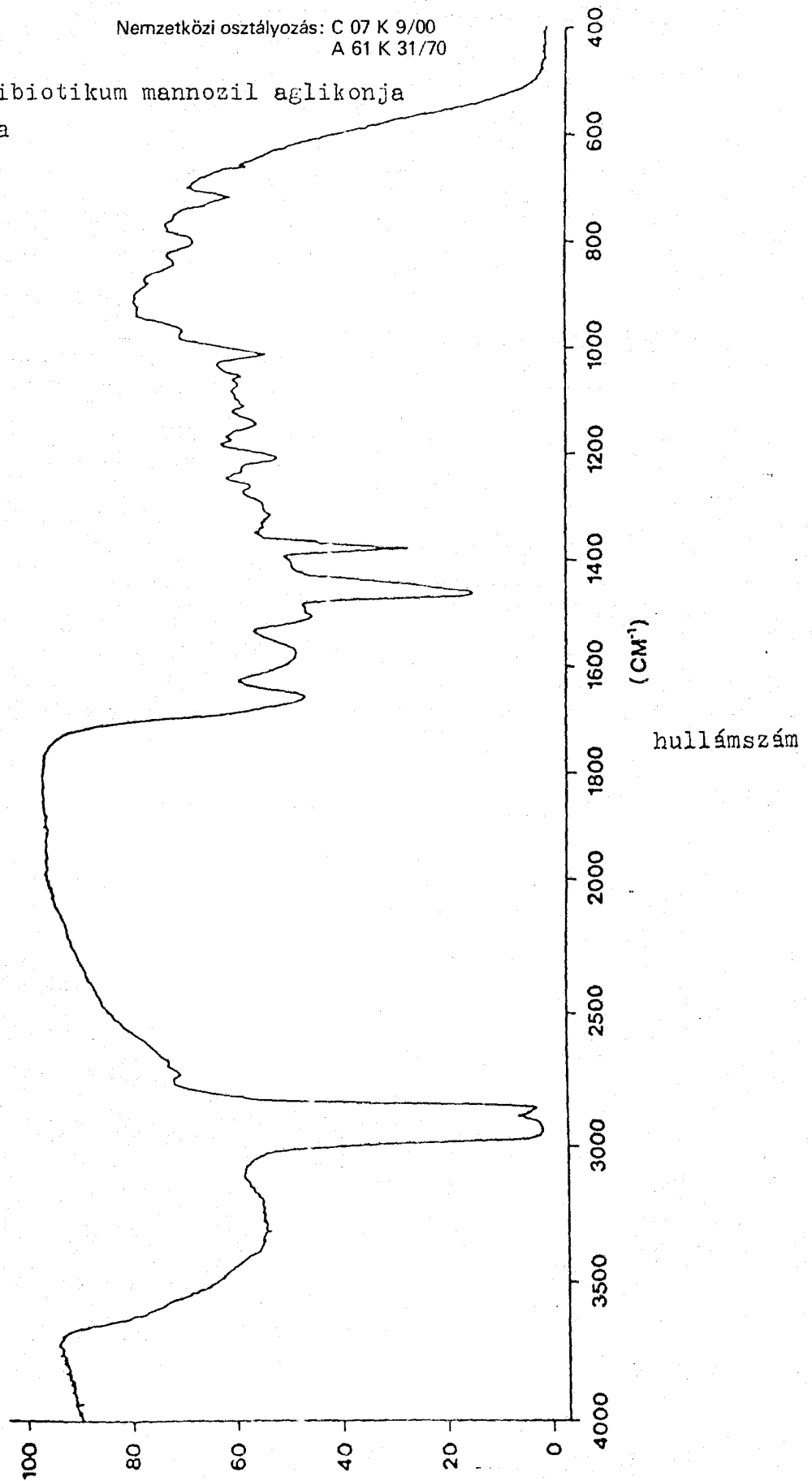
196229

Nemzetközi osztályozás: C 07 K 9/00  
A 61 K 31/70

25. ábra

A 40926 antibiotikum mannozil aglikonja

IR spektruma



26. ábra Nemzetközi osztályozás: C 07 K 9/00  
A 61 K 31/70  
A 40926 antibiotikum mannozil aglikonja  
 $^1\text{H}$ -NMR spektruma

