

19



Octroolraad  
Nederland

11 192621

12 C OCTROOI

21 Aanvraag om octrooi: 7903601

22 Ingediend: 08.05.79

51 Int.Cl.<sup>8</sup>  
C12P19/62, C07H17/08, A61K31/71

30 Voorrang:  
02.03.79 JP 0024788/79  
16.03.79 JP 0031316/79  
10.05.78 JP 0054373/78

43 Ter inzage gelegd:  
13.11.79 I.E. 79/22

44 Openbaargemaakt:  
01.07.97 I.E. 97/07

47 Dagtekening:  
04.11.97

45 Uitgegeven:  
05.01.98 I.E. 98/01

73 Octrooihouder(s):  
Asahi Kasei Kogyo Kabushiki Kaisha te Osaka,  
Japan (JP).

74 Gemachtigde:  
Ir. L.C. de Bruljn c.s. te 2517 KZ Den Haag.

54 Werkwijze voor de bereiding van nieuwe antibiotica, die behoren tot de macroliden, micro-organismen van de stam Micromonospora, die in staat zijn deze nieuwe antibiotica te vormen; en nieuwe antibiotica en farmaceutische preparaten.

**Werkwijze voor de bereiding van nieuwe antibiotica, die behoren tot de macroliden, micro-organismen van de stam Micromonospora, die in staat zijn deze nieuwe antibiotica te vormen; en nieuwe antibiotica en farmaceutische preparaten**

- 5 De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor de bereiding van antibiotica die behoren tot de macroliden, welke in hun molecuul een ring met 15 koolstofatomen en één zuurstofatoom bezitten, waaraan 6 desoxihexosederivaten zijn gebonden, door een micro-organisme, dat behoort tot de orde van de Actinomycetales aeroob te kweken in een waterig voedingsmedium dat een assimileerbare koolstofbron, stikstofbron en anorganische stoffen bevat en vervolgens de antibiotica uit het voedingsmedium te winnen.
- 10 Een in de aanhef beschreven werkwijze voor het bereiden van antibiotica met behulp van micro-organismen is bekend uit het Franse octrooischrift 1.467.002. Volgens de in dit octrooischrift beschreven werkwijze wordt het antibioticum chalcomycine bereid door een chalcomycine-producerend micro-organisme van de stam Streptomyces bikiniensis onder aerobe omstandigheden en op een voedingsmedium, dat een assimileerbare koolstof- en stikstofbronnen omvat, te kweken totdat de kweek een wezenlijk antibacteriele activiteit vertoont, waarna het gewenste product wordt geïsoleerd. Voor de structuur van het aldus verkregen chalcomycine wordt verwezen naar figuur 1 in *Experientia* XXL, u, blz. 372-373 (1965).
- 15 Ondanks het feit dat een groot aantal antibiotische verbindingen, alsmede werkwijzen voor het bereiden hiervan, bekend zijn, is er een voortdurende behoefte aan nieuwe antibiotica. De onderhavige uitvinding verschaft dergelijke nieuwe antibiotische stoffen. Deze nieuwe antibiotische stoffen worden volgens de
- 20 onderhavige uitvinding bereid door een micro-organisme uit de orde der Actinomycetales behorende tot het geslacht Micromonospora, dat wordt aangeduid als "Micromonospora A 11725" en dat is geïsoleerd uit de bodem van een aardappelland in Unazuki-cho, Shimoshikawa-gun, Toyama prefectuur, Japan, onder aerobe omstandigheden te kweken, en vervolgens de gewenste antibiotische stoffen te isoleren. Deze antibiotische stoffen, die op grond van hun eigenschappen worden geacht tot de basische macroliden te behoren, worden
- 25 aangeduid als resp. A 11725 I, II en III.
- De onderhavige uitvinding heeft derhalve betrekking op een in de aanhef beschreven werkwijze, die wordt gekenmerkt doordat men als micro-organisme een Micromonospora sp A 11725 toepast en de daarbij verkregen antibiotica A 11725 I, II en/of III, eventueel na scheiding in de afzonderlijke componenten, als zodanig of na omzetting met een farmaceutisch aanvaardbaar anorganisch of organisch zuur in de vorm
- 30 van een zout wint.
- De volgens de uitvinding verkregen antibiotica A 11725 I en II bevatten epoxidegroepen, die met een geschikt chemisch reagens, bij voorkeur chroom(II)chloride, in dubbele bindingen kunnen worden omgezet, waarbij de antibiotische verbindingen A 11725 Ia en IIa worden verkregen.
- Voorts heeft de uitvinding betrekking op micro-organismen van de stam Micromonospora A 11725, die bij
- 35 de bereiding van deze antibiotica worden toegepast. Ook heeft de uitvinding betrekking op de macrolide antibiotica A 11725 I, Ia, II, IIa en III, en op farmaceutische preparaten, die deze nieuwe stoffen bevatten.
- De uitvinding wordt onderstaand nader beschreven aan de hand van de tekening, waarin:
- 40 figuur 1 en 2 infrarood-absorptiespectra weergeven van de nieuwe antibiotische stoffen volgens de uitvinding, te weten A 11725 I, respectievelijk II,
- figuur 3 en figuur 4 ultraviolet-absorptiespectra weergeven van de antibiotische stoffen A 11725 I, respectievelijk II,
- figuur 5 en figuur 6 magnetische kernspinresonantiespectra weergeven van de antibiotische stoffen A
- 45 11725 I, respectievelijk II,
- figuur 7 het ultraviolet-absorptiespectrum weergeeft van de antibiotische stof A 11725 III,
- figuur 8 het infrarood-absorptiespectrum weergeeft van de antibiotische stof A 11725 III,
- figuur 9 het magnetische kernspinresonantiespectrum weergeeft van de antibiotische stof A 11725 III,
- figuur 10 het ultraviolet-absorptiespectrum weergeeft van de antibiotische stof A 11725 Ia,
- figuur 12 het magnetische kernspinresonantiespectrum weergeeft van de antibiotische stof A 11725 Ia,
- 50 figuur 13 het ultraviolet-absorptiespectrum weergeeft van de antibiotische stof A 11725 IIa,
- figuur 14 het infrarood-absorptiespectrum weergeeft van de antibiotische stof A 11725 IIa, en
- figuur 15 het magnetische kernspinresonantiespectrum weergeeft van de antibiotische stof A 11725 IIa.

De antibiotische stoffen A 11725 I, II, III, Ia en IIa, die volgens de uitvinding worden verkregen, blijken de

55 onderstaand in tabel A vermelde fysisch-chemische eigenschappen te bezitten.

Op grond van deze verschillende eigenschappen worden de verbindingen volgens de uitvinding geacht antibiotische stoffen te zijn, die behoren tot de groep van de basische macroliden. Daar bij deze groep geen

stoffen die geheel overeenkomen met een van deze verbindingen bekend zijn, wordt elk van deze verbindingen geacht een nieuwe verbinding te zijn.

Hoewel de structuurformules van deze nieuwe verbindingen nog niet nauwkeurig bekend zijn, is door vergelijking van hun eigenschappen met die van bekende macroziden toch iets over hun vermoedelijke structuur op te merken. Zo zijn al deze verbindingen stoffen van het macrolidetype met 16 atomen in de ring, aan welke ring saccharidegroepen van desosamine, en van 6-desoxi-2,3-di-O-methyl-hexose zijn gebonden (met uitzondering van de stof A 11725 III, waarbij aan de ring behalve desosamine, 6-desoxi-(2 of 3)-O-methyl-hexose gebonden is. In de moleculen van deze verbindingen is geen aldehydegroep aanwezig. Verder kan worden verondersteld, dat de antibiotica A 11725 I en II beantwoorden aan de partiële formule 1, waarin R<sub>1</sub> bij het antibioticum A 11725 I een waterstofatoom en bij het antibioticum A 11725 II een hydroxylgroep voorstelt. De antibiotica A 11725 III, Ia en IIa kunnen naar wordt verondersteld verder beantwoorden aan de partiële formule 2, waarin R<sub>2</sub> voor de antibiotica A 11725 III en Ia een waterstofatoom en voor het antibioticum A 11725 IIa een hydroxylgroep voorstelt.

15

TABEL A

	A 11725 I	A 11725 II	A 11725 III	A 11725 Ia	A 11725 IIa	
20 uiterlijk		wit poeder	wit poeder	wit poeder	witte kristallen	witte kristallen
Bruto-formule		C <sub>37</sub> H <sub>61</sub> NO <sub>12</sub>	C <sub>37</sub> H <sub>61</sub> NO <sub>13</sub>	C <sub>36</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>11</sub>	C <sub>37</sub> H <sub>61</sub> NO <sub>11</sub>	C <sub>37</sub> H <sub>61</sub> NO <sub>12</sub>
Elementair analyse, %						
gevonden: C		62,34	60,57	63,25	64,05	62,21
25 H		9,25	8,95	9,01	9,10	8,82
N		1,96	1,96	2,10	2,04	1,94
berekend: C		62,43	61,05	63,41	63,86	62,43
H		8,64	8,44	8,72	8,84	8,64
N		1,97	1,92	2,05	2,01	1,97
30 Molecuulgewicht		711	727	681	695	711
(gemeten uit massaspectrum)						
Smeltpunt (of ontledingspunt)		103-107°C	102-106°C	99-102°C	174-176°C	148-150°C
35 [α] <sub>D</sub> :		-40,0° (C=1, methanol)	-31,0° (C=1, methanol)	-2,3° (C=1,0 methanol)	+2,7° (C=1,0 methanol)	+18,7° (C=1,0 methanol)
Ultraviolet-absorptiespectrum		fig. 3	fig. 4	fig. 7	fig. 10	fig. 13
40		(25γ/ml, in methanol)	(25γ/ml, in methanol)	(28γ/ml, in methanol)	(23γ/ml, in methanol)	(20,42γ/ml, in methanol)
		λ <sub>max</sub> 217 mm (E <sup>1%</sup> <sub>1cm</sub> = 340)	λ <sub>max</sub> 217 mm (E <sup>1%</sup> <sub>1cm</sub> = 337)	λ <sub>max</sub> 216 mm (E <sup>1%</sup> <sub>1cm</sub> = 310)	λ <sub>max</sub> 215 mm (E <sup>1%</sup> <sub>1cm</sub> = 326,1)	λ <sub>max</sub> 215 mm (E <sup>1%</sup> <sub>1cm</sub> = 323,2)
45		λ <sub>max</sub> 240 mm (sh,180)	λ <sub>max</sub> 240 mm (sh,180)	λ <sub>max</sub> 283 mm (E <sup>1%</sup> <sub>1cm</sub> = 310)	λ <sub>max</sub> 283 mm (E <sup>1%</sup> <sub>1cm</sub> = 333,9)	λ <sub>max</sub> 280 mm (E <sup>1%</sup> <sub>1cm</sub> = 323,2)
50 Infrarood-absorptiespectrum (KBr-methode)		Fig. 1 (met absorptiebanden bij golflengten van ongeveer	Fig. 2 (met absorptiebanden bij golflengten van ongeveer	Fig. 8 (met absorptiebanden bij golflengten van ongeveer	Fig. 11 (met absorptiebanden bij golflengten van ongeveer	Fig. 14 (met absorptiebanden bij golflengten van ongeveer
55						

TABEL A (vervolg)

	A 11725 I	A 11725 II	A 11725 III	A 11725 Ia	A 11725 IIa
5		3440,2960	3460,2960	3600,2970	3600,2970
		2920,2875	2930,2880	2930,2880	2930,2880
		2845,2780	2830,2780	1710,1675	2830,2780
		1715,1685	1715,1690	1645,1590	1720,1710
10		1650,1645	1645,1620	1460,1380	1678,1645
		1620,1460	1455,1375	1350,1320	1625,1596
		1375,1355	1350,1325	1275,1230	1460,1380
		1325,1275	1270,1255	1170,1070	1350,1322
		1255,1230	1230,1165	1050, 980	1275,1258
15		1170,1110	1110,1075	960, 930	1230,1165
		1080,1045	1040, 980	835,	1105,1072
		980, 955	955, 930	750 $\text{cm}^{-1}$ )	1045, 980
		930, 885	885, 855		960, 930
		8,55			882, 858
20		830 $\text{cm}^{-1}$	830 $\text{cm}^{-1}$ )		830 $\text{cm}^{-1}$ )
					830, 740
					710 $\text{cm}^{-1}$ )
	Magnetische kernspin- resonantie ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz, TMS)	Fig.5	Fig.6	Fig.9	Fig.12
25	Dunne-laag- chromatografie met kieselgel (Merck no. 5714):				
	$\text{CHCl}_3$ : methanol (5:1)	0,48	0,40	0,40	—
30	$\text{CHCl}_3$ : methanol: 7%'s ammonia (40:12:20, onderste laag)	0,72	0,56	—	—
	methanol:	—	—	0,31	—
	benzeen: aceton (1:1)	—	—	0,05	—
35	n.butanol-azijn-zuur- water (3:1:1)	—	—	0,59	—
	Kleurreactie:				
	verkleuring van waterige kaliumper- manganaatoplossing	+	+	+	+
40	ninhydrine-reactie, Sakagushireactie, ferri- chloridereactie	—	—	—	—
	Zuur of basisch	basisch	basisch	basisch	basisch
45	karakter				

TABEL A (vervolg)

	A 11725 I	A 11725 II	A 11725 III	A 11725 Ia	A 11725 IIa	
5	Oplosbaarheid	oplosbaar in zelfde als zuur water en A 11725 I	zelfde als A 11725 I,	zelfde als A 11725 I, maar oplosbaar in hexaan	zelfde als A 11725 III	zelfde als A 11725 III
10		organische oplosmiddelen, zoals methanol, aceton, ethylacetaat en benzeen; en moeilijk oplosbaar in alkalisch water				
15						
20						

De antibiotische stoffen volgens de uitvinding blijken de antibacteriele of anti-mycoplasmale spectra te bezitten, die wordt vermeld in tabel B en die gemeten is met de agar-verdunningsmethode.

De volgens de uitvinding verschaften stoffen kunnen gebruikt worden in de vorm van farmaceutisch toelaatbare minerale zuren of met organische zuren, zoals wijnsteenzuur, citroenzuur en barnsteenzuur.

De antibiotische stoffen volgens de uitvinding kunnen oraal in de vorm van tabletten en poeders, maar ook door intraveneuze injectie worden toegediend. Een voldoende dosering kan ongeveer 400 tot 2000 mg per volwassene per dag bedragen om voldoende te zijn tegen infectieuze ademhalingsziekten, die veroorzaakt worden door gram-positieve micro-organismen, zoals *Staphylococcus*. Bij bepaling van de toxiciteit van de antibiotische stoffen volgens de uitvinding blijkt de LD<sub>50</sub> bij muizen 2000 mg of meer te bedragen bij orale toediening. De stoffen volgens de uitvinding kunnen eveneens worden gebruikt als antibiotische toeslagen in voeders en als antibiotische stoffen voor de therapie van dieren.

TABEL B

Proef-micro-organismen 10 <sup>8</sup> x 1	Minimale concentratie voor groeiremming, mcg/ml					
	A 11725 I	A 11725 II	A 11725 III	A 11725 Ia	A 11725 IIa	
40	1. <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538 P)	0,2	0,2	0,2	0,1	0,4
	2. " (MS 353)	0,2	0,2	0,2	0,1	0,4
	3. " (MS 353 C36)	≤0,05	0,1	0,2	≤0,05	0,2
	4. " (MS 353 AO)	>100	>100	>100	>50	>100
45	5. " (0116)	>100	>100	>100	>50	>100
	6. " (0119)	>100	>100	>100	>50	>100
	7. " (0126)				0,8	0,8
	8. " (0127)	>100	>100	>100	>50	>100
	9. <i>Staphylococcus</i>	0,1	0,1	0,1	≤0,05	0,2
50	<i>epidermidis</i> (s.p.-a1-1)					
	10. <i>Streptococcus pyogenes</i> (N.Y.5)	≤0,05	≤0,05	0,1	≤0,025	≤0,05
	11. " (1022)	>100	>100	>100	>50	>100
55	12. <i>Streptococcus faecalis</i> (1501)	>100	>100	>100	>50	>100

TABEL B (vervolg)

5	Proef-micro-organismen 10 <sup>8</sup> x 1	Minimale concentratie voor groeiremming, mcg/ml				
		A 11725 I	A 11725 II	A 11725 III	A 11725 Ia	A 11725 IIa
	13. <u>Streptococcus agalactiae</u> (1020)	12,5	6,3	25	25	25
10	14. <u>Sarcina lutea</u> (ATCC 9341)	≤0,05	≤0,05	≤0,05	≤0,025	≤0,05
	15. <u>Micrococcus flavus</u> (ATCC 10240)	≤0,05	0,2	≤0,05	0,1	0,1
	16. <u>Corynebacterium diphtheriae</u> (P.W.8)	0,4	0,4	3,1	1,6	3,1
15	17. <u>Bacillus subtilis</u> (ATCC 6633)	0,4	0,4	1,6	0,4	1,6
	18. <u>Escherichia coli</u> (NIHJ-JC2)	>100	>100	>100	>50	>100
	19. " (B)	100	25	>100	>50	>100
20	20. <u>Klebsiella pneumoniae</u> (ATCC 10031)	25	25	100	>50	50
	21. <u>Salmonella typhosa</u> (E901)	>100	>100	>100	>50	>100
	22. <u>Salmonella enteritidis</u> Gertner	>100	>100	>100	>50	>100
25	23. <u>Shigella flexneri</u> (type 3a)	100	50	>100	>50	>100
	24. <u>Shigella sonnei</u> (E 33)	>100	>100	>100	>50	>100
	25. <u>Proteus vulgaris</u> (OX19)	100	50	100	>50	>100
30	26. <u>Serratia marcescens</u>	>100	>100	>100	>50	>100
	27. <u>Pseudomonas aeruginosa</u> (IAM 1095)	>100	>100	>100	>50	>100
	28. <u>Mycoplasma gallisepticum</u>	0,006	0,03		0,03	0,03
35	29. <u>Mycoplasma synoviae</u>	0,03	0,8		0,8	0,8

De antibiotische stoffen volgens de uitvinding kunnen worden bereid door gebruik te maken van een micro-organisme dat behoort tot het geslacht Micromonospora die aangeduid wordt als "Micromonospora sp. A 11725", welke geïsoleerd is uit de bodem van een aardappelland in Unazuki-cho, Shimoshinkawagun, Toyama prefectuur, Japan (FERM-P No. 4488 en gedeponoerd en voor het publiek verkrijgbaar is bij het Institute of Fermentation Research, Agency of Industry and Technology, Japan; een depot-nummer in de Verenigde Staten van Amerika is NRRL 11452, gedeponoerd op 21 maart 1979).

Het volgens de uitvinding te gebruiken micro-organisme bezit de volgende eigenschappen:

45 I. Morfologische eigenschappen  
Het substraat-mycelium is langwerpig, golfvormig en enkelvoudig vertakt en bezit een diameter van 0,6 tot 0,8 µm; er wordt geen fragmentatie van het mycelium waargenomen. Er vormt zich één spore aan de punt van elke korte sporofoor, die uit het substraat-mycelium groeit. Deze spore is bolvormig tot ovaal met een afmeting van 1,0 tot 1,5 µm en bezit doorn-achtige uitsteeksels waardoor een schilverachtig uiterlijk ontstaat. Op agar-medium kan soms afhankelijk van de samenstelling daarvan een onvolledige groei van het luchtmycelium optreden, maar er kan zich ook een zwarte sporenlagen op het kolonie-oppervlak vormen.

55 II. Groei op verschillende media  
In tabel C worden de resultaten vermeld van waarnemingen die werden uitgevoerd na het kweken op verschillende media gedurende 20 dagen bij een temperatuur van 30°C. Bij de aanduiding van de kleuren wordt de kleurclassificatie gevolgd volgens de Color Harmony Manual, 4de uitgave, 1959, Container

Corporation of America.

TABEL C  
Groei op verschillende media

5	Medium	Groei	Kleur van substraat mycelium	Sporellaag	onvolledige groei van het lucht-mycelium	Oplosbaar pigment
10	saccharose-nitraat-agar	goed	cederrood (6 1e) tot steenrood (6ng)	geen	slecht: vleesroze (5ca), mat perzikgeel (5ec)	mat koraalrood (6gc) tot Redwoodrood (6ie)
	glucose-asparagine-agar	zeer gering	ongedekt geelbruin (4gc)	geen	geen	geen
15	(Waksman No. 2)*					
	glycerol-asparagine-agar	zeer gering	ongedekt geelbruin (4gc) tot biscuitbruin (4ec)	geen	geen	geen
20	zetmeel-anorgamische zouten-agar	matig tot goed	steenrood (5ng)	matig; lampzwart (p)	geen	geen
	tyrosine-agar	zeer gering	biscuitbruin (3ec) tot beige (3gc)	zeer gering lampzwart (p)	geen	geen
25	havermeel-agar	goed tot matig	steenrood (5ng) tot koperbruin (5pi)	goed; lampzwart (p)	geen	kopergeel-bruin (5ie), vormt zich rondom de kolonie
	gist-mout-agar	goed	licht roze-bruin (7 lg) tot rozebruin (7ni)	zeer gering lampzwart (p)	geen	cederrood (6 1e), vormt zich in geringe mate
30	glucose-gist-extract-agar (Waksman no. 29)*	matig	cacaobruin (5 lg) tot donker Redwoodrood (6 lg)	slecht tot zeer gering; lampzwart (p)	zeer gering; schelproze (5ba)	geen
35	glucose-nitraat-agar (Waksman no. 1)*	matig tot slecht	cederrood (6½ le) tot steenrood (6½ ng)	geen	geen	geen
	voedingsagar	zeer gering	kleurloos tot lichtgeelbruin (3gc)	zeer gering; lampzwart (p)	geen	geen
40	Emerson's agar (Waksman no. 28)*	goed, rimpelig	cederrood (6 le-6½ le)	geen	geen	geen
	Bennett's agar (Waksman no. 30)*	matig tot goed	lichtrozebruin (7 lg) tot rozebruin (7ni)	matig; lampzwart (p)	geen	lichtrozebruin (7 lg) tot rozebruin (7ni); vormt zich rondom de kolonie
45	Hickey-Tresner's agar (Waksman no. 32)*	goed	cacaobruin (5 lg)	geen	slecht; biscuit-bruin (4ec)	cederrood (6 lg) vormt zich rondom de kolonie
50	zetmeel-NZ-aminegistextract-agar (ATCC no. 172)**	goed	donkerwijnrood (8pi) tot mauve wijnrood (8ni)	goed; lampzwart (p)	geen	oud wijnrood (8ng)

TABEL C (vervolg)

	Medium	Groei	Kleur van substraat mycelium	Sporellaag	onvolledige groei van het lucht-mycelium	Oplosbaar pigment
5	glucose-NZ amine-agar (1% glucose, 1% amine type A, 1,5% agar)	matig tot slecht	cederrood (6 le) tot geelroestbruin (5 le)	geen	geen	geen
10	glucose-pepton-agar	matig	rozebruin (7ni)	matig tot slecht; lampzwart (p)	geen	oud wijnrood (7ng)
15	aardappelschijf (Waksman no. 40)*	geen of zeer geringe groei				
	aardappelschijf + CaCO <sub>3</sub>	goed, rimpelig	donker rozebruin (7pn)	matig, lampzwart (p)	geen	donker rozebruin (7pn) vormt zich in geringe mate
20	pepton-gist-ijzer-agar	zeer gering tot slecht	licht geelbruin (3gc)	zeer gering; lampzwart (p)	geen	geen

25 \*) S.A. Waksman "The Actinomycetes" vol. 2, 1961, blz. 327-334, Williams & Wilkins Co.

\*\*\*) The American Type Culture Collection, Catalogue of Strains 18de uitgave, 1968, blz. 142.

### III> Fysiologische eigenschappen

- 1) Assimileerbaarheid van koolstofbronnen: Assimileerbaar: D-arabinose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, saccharose, trehalose, zetmeel. Enigszins assimileerbaar: L-arabinose, D-cellobiose, D-ribose. Niet-assimileerbaar: D-galactose,  $\beta$ -lactose, D-melzitose,  $\alpha$ -melibiose, raffinose, L-rhamnose, L-sorbose, D-xylose, glycerol, salicine, dulcitol, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, cellulose. (Daar het onderhavige micro-organisme slechts slecht op een Pridham-Gottlieb-agar-medium, dat D-glucose bevat, kan groeien, wordt als het basaal medium een medium gebruikt, dat 0,5% gistextract en 1,5% agar bevat).
- 2) Groeitemperatuurtraject: 15-45°C.
- 3) Vervloeiing van gelatine: vervloeit in glucose-pepton-gelatine-medium
- 4) Hydrolyse van zetmeel: gehydrolyseerd op een medium van zetmeel, anorganische zouten en agar
- 5) Ondermelk: peptonisering en coagulatie
- 6) Vorming van melanoïde-pigment: vormt zich niet op tyrosine-agar en pepton-gist-ijzer-agar
- 7) Bestandheid tegen zout (volgens de methode beschreven in Inter. J. System. Bacteriol. 21, 240-247, 1971):

	NaCl-concentratie, %	Groei
45	0	goed
	1,5	matig tot goed
	3,0 of meer	geen groei

- 8) Ontleding van cellulose: geen ontleding
- 9) Vorming van nitriet (onder toepassing van het organische medium beschreven in Inter. J. System. Bacteriol., 21, 240-247, 1971): wordt niet gevormd.

Zoals hiervoor is vermeld bezit de stam A 11725 sporen, die elk afzonderlijk aan de punt van een sporofoor groeien, welke gevormd wordt uit een vertakt substraatmycelium, vormt deze stam geen overvloedig luchtmycelium en is de stam een mesofiel micro-organisme. Deze stam behoort daarom tot het geslacht Micromonospora.

Hierom wordt de stam A 11725 aangeduid als Micromonospora sp. A 11725.

De antibiotische stoffen A 11725 I tot III kunnen worden verkregen door de bovenvermelde stam



*Micromonospora* sp. A 11725 aerob te kweken in een medium, dat de voor het kweken van micro-organismen gebruikelijke bestanddelen bevat, en vervolgens de antibiotische stoffen, die zich in het kweekmedium hebben gevormd, af te scheiden door extractie. De antibiotische stoffen A 11725 Ia en IIa kunnen worden verkregen door chemische modificatie van de op deze wijze bereide antibiotische stoffen A 11725 I resp. II met behulp van een geschikt chemisch reagens.

Als cultuurmedium kan hetzij een vast hetzij een vloeibaar medium worden gebruikt. Voor de productie op grote schaal verdient een vloeibaar waterig medium de voorkeur. Als koolstofbronnen in het medium kunnen bijvoorbeeld glucose, zetmeel, glycerol, saccharose, melasse en dextrine worden gebruikt. Als stikstofbronnen zijn pepton, vleesextract, sojabonenmeel en gehydriseerd caseïne geschikt. Er kunnen echter ook katoenzaadresten, maisweekwater, nitraten en ammoniumzouten worden toegepast. Er kunnen ook andere anorganische stoffen worden gebruikt, die gewenste kationen, zoals natrium-, kalium-, magnesium-, calcium-, kobalt-, mangaan- en ijzerionen bevatten, en/of stoffen die gewenste anionen bevatten, zoals chloride-ionen, sulfaationen, fosfaationen en acetaationen. Bovendien kunnen voor het begunstigen van de groei van de micro-organismen gedroogde gist en gistextract worden toegepast. Voor het instellen van de pH van het medium kan calciumcarbonaat worden toegevoegd. Bovendien kan een geschikte hoeveelheid van een schuimremmend middel worden toegevoegd, zoals een siloxanhars en een dierlijke of plantaardige olie. Het medium, dat in het bijzonder geschikt is voor het uitvoeren van de werkwijze volgens de uitvinding, is een medium, dat glucose, dextrine, ontvet sojabonenmeel, calciumcarbonaat en kobaltchloride bevat.

Het kweken kan worden uitgevoerd onder omstandigheden, die gewoonlijk voor het bereiden van antibiotica worden toegepast. De temperatuur voor het kweken kan tussen 20 en 37°C liggen en bedraagt bij voorkeur 26 tot 30°C. De kweekperiode, die afhankelijk van de kweekomstandigheden kan wisselen, bedraagt in het algemeen 4 tot 5 dagen.

Hoewel elke algemeen bekende methode voor het kweken bij de uitvinding kan worden toegepast, vindt het kweken voor productie op grote schaal op geschikte wijze plaats onder roeren en beluchting in een fermentatievat. Volgens de meest geschikte methode voor het afscheiden en zuiveren van de antibiotische stoffen A 11725 I, II en III uit de cultuur worden eerst de cellen van het micro-organisme en andere vaste bestanddelen verwijderd door filtratie of centrifugeren, waarna het filtraat geëxtraheerd wordt met een organisch oplosmiddel. Als organische oplosmiddelen voor de extractie kunnen gechloroerde koolwaterstoffen, zoals chloroform, dichlooretheen of trichlooretheen, en esters van alifatische zuren, zoals ethylacetaat, butylacetaat of amylacetaat worden gebruikt. Er kunnen echter ook andere organische oplosmiddelen worden gebruikt, waarin de stoffen A 11725 I, II en III goed oplossen en die nauwelijks mengbaar met water zijn.

Het organische oplosmiddelextract, dat de stoffen A 11725 I, II en III bevat, kan onder verminderde druk worden ingedampt tot 1/100 tot 1/200 van het aanvankelijke volume. Het verkregen concentraat wordt dan met een zuur, zoals zoutzuur, zwavelzuur of azijnzuur op een pH van 1,0 tot 3,0 ingesteld, waarna door afscheiding van de waterige fase, instelling op een pH van 7,8 tot 9,0 met een alkalische oplossing, zoals een natriumhydroxide- of kaliumhydroxide-oplossing of ammonia, gevolgd door hernieuwde extractie met een organisch oplosmiddel de antibiotica van verontreinigingen worden gezuiverd. Door droogdampen van dit extract onder verminderde druk wordt een ruw product verkregen, dat de stoffen A 11725 I, II en III bevat. Deze stoffen worden bijvoorbeeld gescheiden door kolom-chromatografie onder toepassing van kiezelgel of door tegenstroomverdeling. Elke hierbij verkregen fractie wordt onderzocht door dunne-laag-chromatografie met kiezelgel om vast te stellen welke component daarin aanwezig is. De fracties, die zuiver A 11725 I, II respectievelijk III bevatten, worden verzameld en onder verminderde druk drooggedampt, waarbij de betreffende verbindingen in de vorm van witte poeders worden verkregen.

Volgens een typisch voorbeeld van de bereidingswijze van de stoffen A 11725 Ia of IIa wordt de stof A 11725 I resp. II, zoal deze volgens de bovenbeschreven methode is bereid, opgelost in een alifatisch zuur met een klein aantal koolstofatomen, zoals ijsazijn of propionzuur. Vervolgens wordt dan onder afkoeling chroom II chloride bij de oplossing gevoegd, waarna gedurende 3 tot 20 uur bij kamertemperatuur de omzetting plaats vindt. Het chroom II chloride kan in een hoeveelheid van 2 mol of meer per mol van de stof A 11725 I resp. II worden gebruikt. Het omzettingsproduct wordt dan in water of ijswater uitgegoten, waarna de verkregen oplossing op een pH van ongeveer 8,5 wordt gebracht met behulp van een base, zoals natriumcarbonaat, voordat het geëxtraheerd wordt met een oplosmiddel, zoals ethylacetaat of benzeen. Het extract wordt gewassen, gedroogd en onder verminderde druk drooggedampt, waarbij een ruw poeder wordt verkregen. Het ruwe poedervormige product wordt gezuiverd door chromatografie over kiezelgel onder toepassing van chloroform-methanol-28-procents ammonia (400:10:1) als elueermiddel, waarbij dan de stof A 11725 Ia, resp. IIa wordt verkregen. In de op deze wijze bereide stoffen A 11725 Ia en IIa zijn in het

molecuul dubbele bindingen gevormd door omzetting van de epoxigroepen in het molecuul van de stof A 11725 I, resp. II.

De uitvinding wordt nader beschreven in de volgende voorbeelden, die alleen ter toelichting dienen en geen beperking van de uitvinding inhouden.

5

#### Voorbeeld I

##### Bereiding van de antibiotische stoffen A 11725-I, A 11725-II en A 11725-III.

In een Erlenmeyer-kolf met een capaciteit van 500 ml werd 100 ml van een medium (pH 7,0) gebracht, dat 1% dextrine, 1% glucose, 0,5% gehydrolyseerde caseïne, 0,5% gistextract en 0,1% calciumcarbonaat  
 10 bevatte, welk milieu gesteriliseerd werd gedurende 20 minuten op een temperatuur van 120°C te verhitten, waarna het medium steriel in 10 Erlenmeyerkolven werd gebracht. Elk van de 10 Erlenmeyerkolven, die 10 ml van dit medium bevatten, werden geënt met behulp van een oogje van een platina entnaald met materiaal dat sporen en/of mycelium bevat van de stam Micromonospora sp. A 11725, die op een schuine agar was gekweekt, waarna gedurende 120 uur een schudcultuur werd uitgevoerd bij een temperatuur van  
 15 30°C. De op deze wijze verkregen entcultures werden overgebracht in een fermentatievat, dat 20 liter van het door verhitting op 120°C gesteriliseerde medium met dezelfde samenstelling bevatte, waarna gedurende 72 uur werd geïncubeerd bij een temperatuur van 30°C onder aseptische beluchting met 20 l/min., terwijl met een snelheid van 300 omwentelingen per minuut werd geroerd. Vervolgens werd 10 liter van de op deze wijze verkregen vloeistofcultuur overgebracht in een vat met een inhoud van 250 liter, dat 200 liter van  
 20 een door verhitting op 120°C gesteriliseerd medium (pH 7,2) bevatte, dat 5% dextrine, 0,5% glucose, 3% ontvet sojameel en 0,2% calciumcarbonaat bevatte, waarna gedurende 120 uur werd geïncubeerd bij een temperatuur van 30°C onder aseptische beluchting met 100 l/minuut en onder roeren met een snelheid van 250 omwentelingen per minuut, waarbij 190 liter cultuurvloeistof werd verkregen.

De op de bovenbeschreven wijze verkregen cultuurvloeistof (190 liter) werd gefiltreerd teneinde cellen  
 25 van het micro-organisme en andere vaste bestanddelen te verwijderen, waarbij 160 liter filtraat werd verkregen. Dit filtraat werd geëxtraheerd met dezelfde hoeveelheid ethylacetaat, waarbij 160 liter ethylacetaatoplossing werd verkregen, die de gewenste verbindingen bevatte. Deze oplossing werd onder verminderde druk ingedampt tot een volume van 50 liter, die daarna werd gemengd met 20 liter van een waterige zoutzuuroplossing met een pH van 2,5 om de gewenste verbindingen uit de ethylacetaat in de  
 30 waterige fase te doen overgaan. De waterige zoutzuuroplossing werd daarna met geconcentreerde ammonia op een pH van 8,5 ingesteld en daarna geëxtraheerd met 20 liter chloroform. De chloroformfase werd drooggedampt, waarbij 8,5 g ruw product werd verkregen.

Het op de bovenbeschreven wijze verkregen ruwe product (8,5 g) werd in 50 ml chloroform opgelost, waarna de verkregen oplossing aan een te voren met chloroform gevulde kiezelgelkolom (3 cm x 55 cm)  
 35 werd geabsorbeerd. De kolom werd vervolgens geëluëerd met chloroform-methanol-28-procents ammonia (20:1:0,1), waarbij fracties van 15 ml werden opgevangen. Elke fractie werd op de aanwezigheid van een gewenste verbinding onderzocht door bepaling van de activiteit tegen Bacillus subtilis. Daarbij werd een gewenste verbinding met behulp van dunne-laag-chromatografie gedetecteerd onder toepassing van de onderste fase van chloroform-methanol-7-procents ammonia (40:12:20) als ontwikkeloplosmiddel, alsmede  
 40 een anti-bacteriële activiteitsproef onder toepassing van Bacillus subtilis. Vervolgens werden de fracties, die een gewenste verbinding bevatten, verzameld.

De fracties No's 61 tot 78 bleken alleen de stof te bevatten, die hiervoor aangeduid werd als A 11725 I. Deze fracties werden drooggedampt, waarbij 1,2 g A 11725 I werd verkregen. De fracties No's 126 tot 160 bleken alleen de stof te bevatten, die hiervoor aangeduid werd als A 11725 II. Deze fracties werden  
 45 eveneens drooggedampt, waarbij 1,7 g A 11725 II werd verkregen. De fracties No's 241 tot 320 bleken alleen de stof te bevatten, die hiervoor aangeduid werd als A 11725 III. Ook deze fracties werden drooggedampt, waarbij 0,2 g A 11725 III werd verkregen.

#### Voorbeeld II

##### Bereiding van de antibiotische stof A 11725 Ia.

In 30 ml ijsazijn werd 1 g van de antibiotische stof A 11725 I opgelost, die op dezelfde wijze was bereid als beschreven in voorbeeld I, waarna onder afkoeling 1,0 g chroom II chloride bij de verkregen oplossing werd gevoegd. De omzetting werd gedurende 16 uur onder roeren bij kamertemperatuur uitgevoerd. Vervolgens werd het reactiemengsel in 700 ml ijswater uitgegoten. Nadat de oplossing met een waterige  
 55 natriumcarbonaatoplossing op een pH van 8,5 was ingesteld, werd deze driemaal met 400 ml ethylacetaat geëxtraheerd. De ethylacetaatfasen werden samengevoegd, met water gewassen en op natriumsulfaat gedroogd. Het gedroogde product werd daarna onder verminderde druk drooggedampt, waarbij ongeveer

800 mg van een ruwe vaste stof werd verkregen, die A 11725 Ia bevatte. De ruwe vaste stof werd daarna op een kiezelgelkolom (2,4 x 55 cm) gebracht en hieruit geëluëerd met chloroform-methanol-28-procents ammonia (400:10:1), waarbij fracties van 15 ml werden opgevangen. De fracties No's 130 tot 210 werden samengevoegd en onder verminderde druk doorgedampt, waarbij 605 mg gezuiverd A 11725 Ia werd verkregen.

#### Voorbeeld III

#### Bereiding van de antibiotische stof A 11725 IIa

Het voorschrift van voorbeeld II werd herhaald, waarbij de stof A 11725 II, die op dezelfde wijze als beschreven in voorbeeld I was bereid, in plaats van de stof A 11725 I werd gebruikt. Uit de kiezelgelkolom werden de fracties No's 150 tot 220 opgevangen, waaruit 612 mg gezuiverd A 11725 IIa werd verkregen.

#### Conclusies

1. Werkwijze voor de bereiding van antibiotica die behoren tot de macroliden, welke in hun molecuul een ring met 15 koolstofatomen en één zuurstofatoom bezitten, waaraan 6 desoxihexosederivaten zijn gebonden, door een micro-organisme, dat behoort tot de orde van Actinomycetales aeroob te kweken in een waterig voedingsmedium dat een assimileerbare koolstofbron, stikstofbron en anorganische stoffen bevat en vervolgens de antibiotica uit de voedingsmedium te winnen, met het kenmerk, dat men als micro-organisme een Micromonospora sp. A 11725 toepast en de daarbij verkregen antibiotica A 11725 I, II en/of III, eventueel na scheiding in de afzonderlijke componenten, als zodanig of na omzetting met een farmaceutisch aanvaardbaar anorganisch of organisch zuur in de vorm van een zout wint.
2. Werkwijze voor de bereiding van antibiotica die behoren tot de macroliden, welke in hun molecuul een ring met 15 koolstofatomen en één zuurstofatoom bezitten, waaraan 6 desoxihexosederivaten zijn gebonden, door een micro-organisme, dat behoort tot de orde van de Actinomycetales aeroob te kweken in een waterig voedingsmedium dat een assimileerbare koolstofbron, stikstofbron en anorganische stoffen bevat en vervolgens de antibiotica uit de voedingsmedium te winnen, met het kenmerk, dat men als micro-organisme een Micromonospora sp. A 11725 toepast en de daarbij verkregen antibiotica A 11725 I en/of II eventueel na scheiding in de afzonderlijke componenten, met een chemisch reagens, waarmee epoxigroepen in dubbele bindingen kunnen worden omgezet, laat reageren tot de antibiotica A 11725 Ia en IIa.
3. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat men als chemisch reagens chroom(II)chloride toepast.
4. Micro-organisme van de stam Micromonospora sp. A 11725, welke in staat zijn een of meer der antibiotica A 11725 I, II en III te vormen.
5. Farmaceutisch preparaat, gekenmerkt door de aanwezigheid van ten minste een der stoffen A 11725 I, II, III, Ia, IIa en de farmaceutisch aanvaardbare zouten van deze verbindingen.
6. Antibiotische stoffen A 11725 I, A 11725 Ia, A 11725 II, A 11725 IIa en A 11725 III.

---

Hierbij 15 bladen tekening

---

FIG. 1

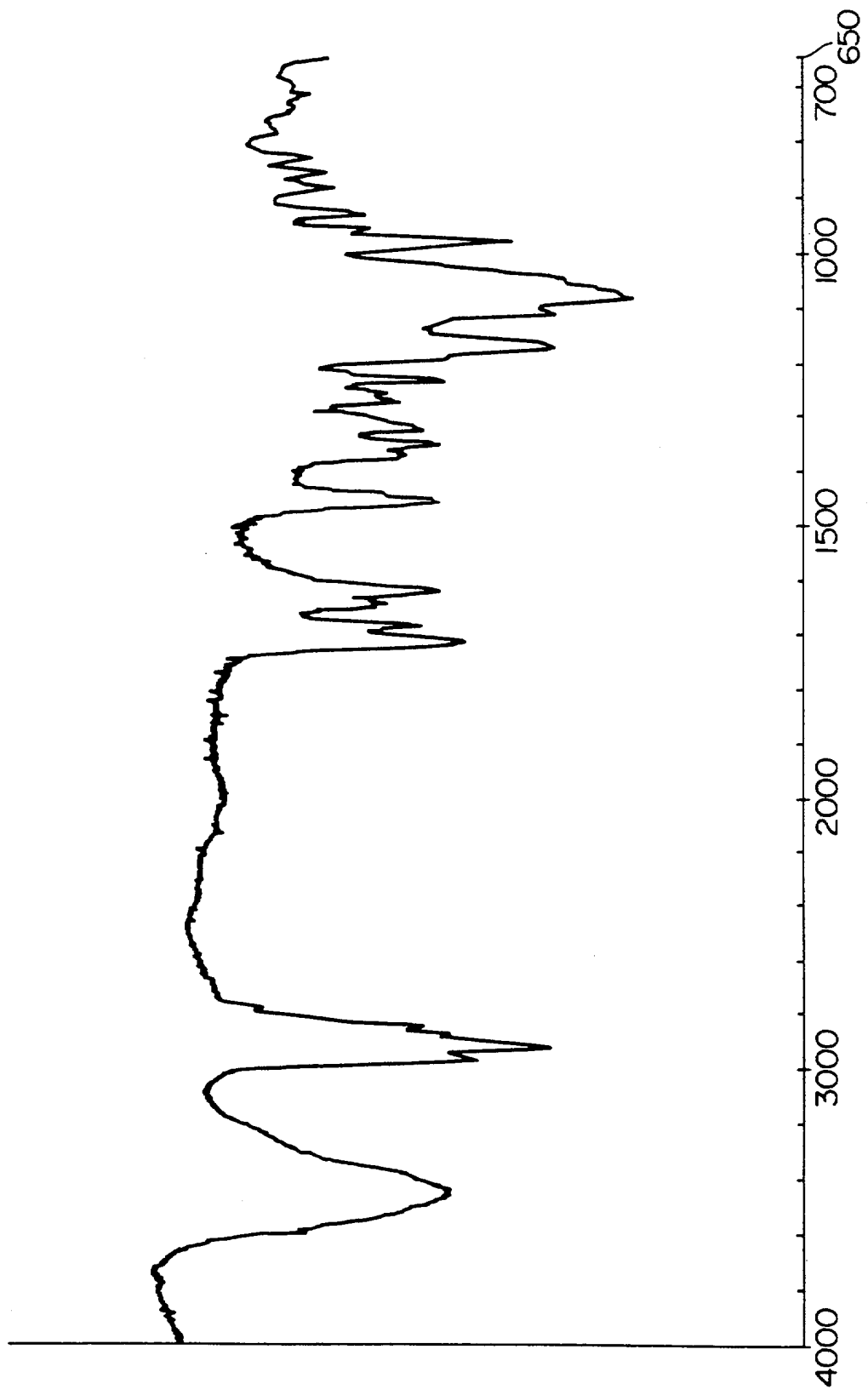


FIG. 2

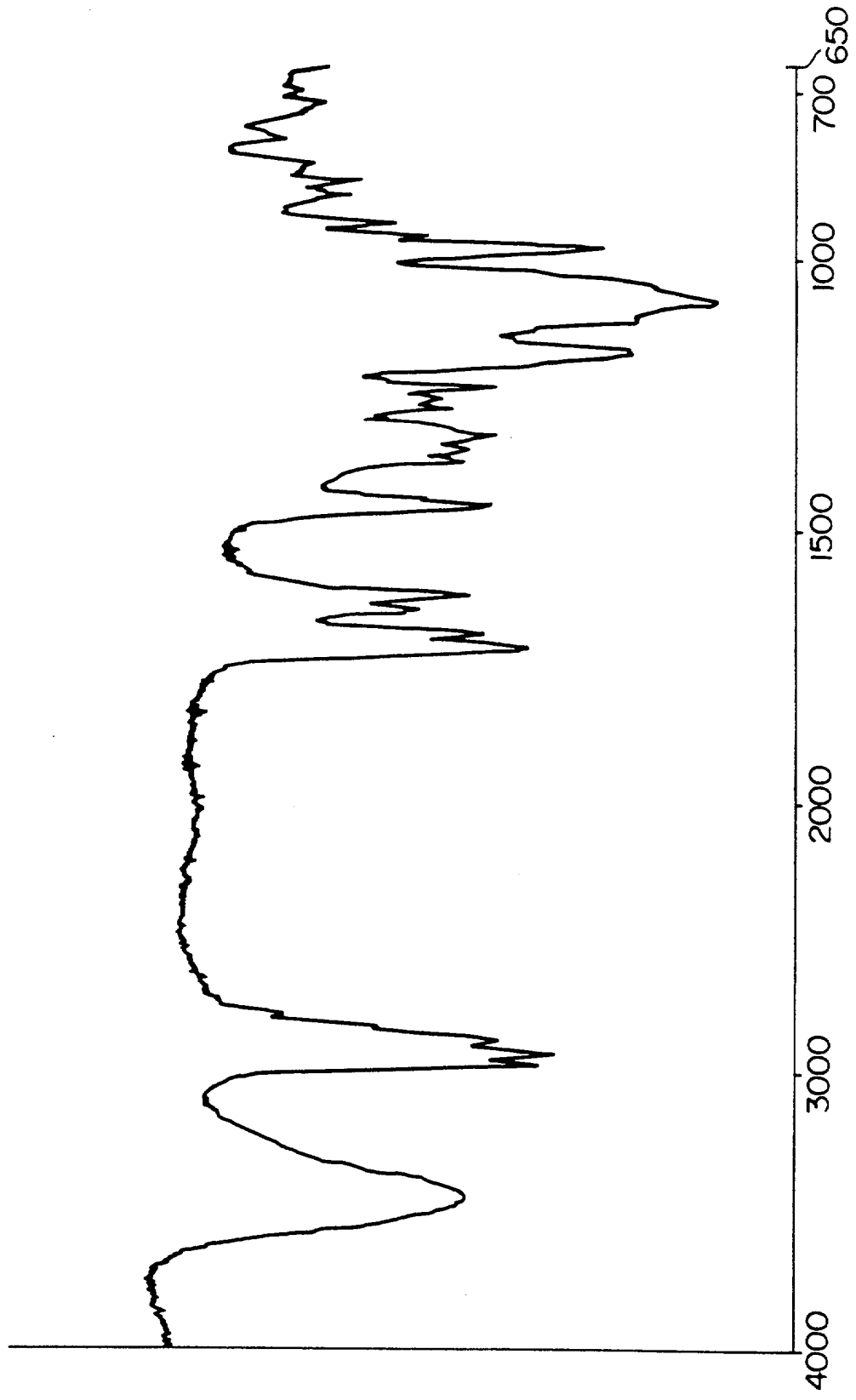


FIG. 3

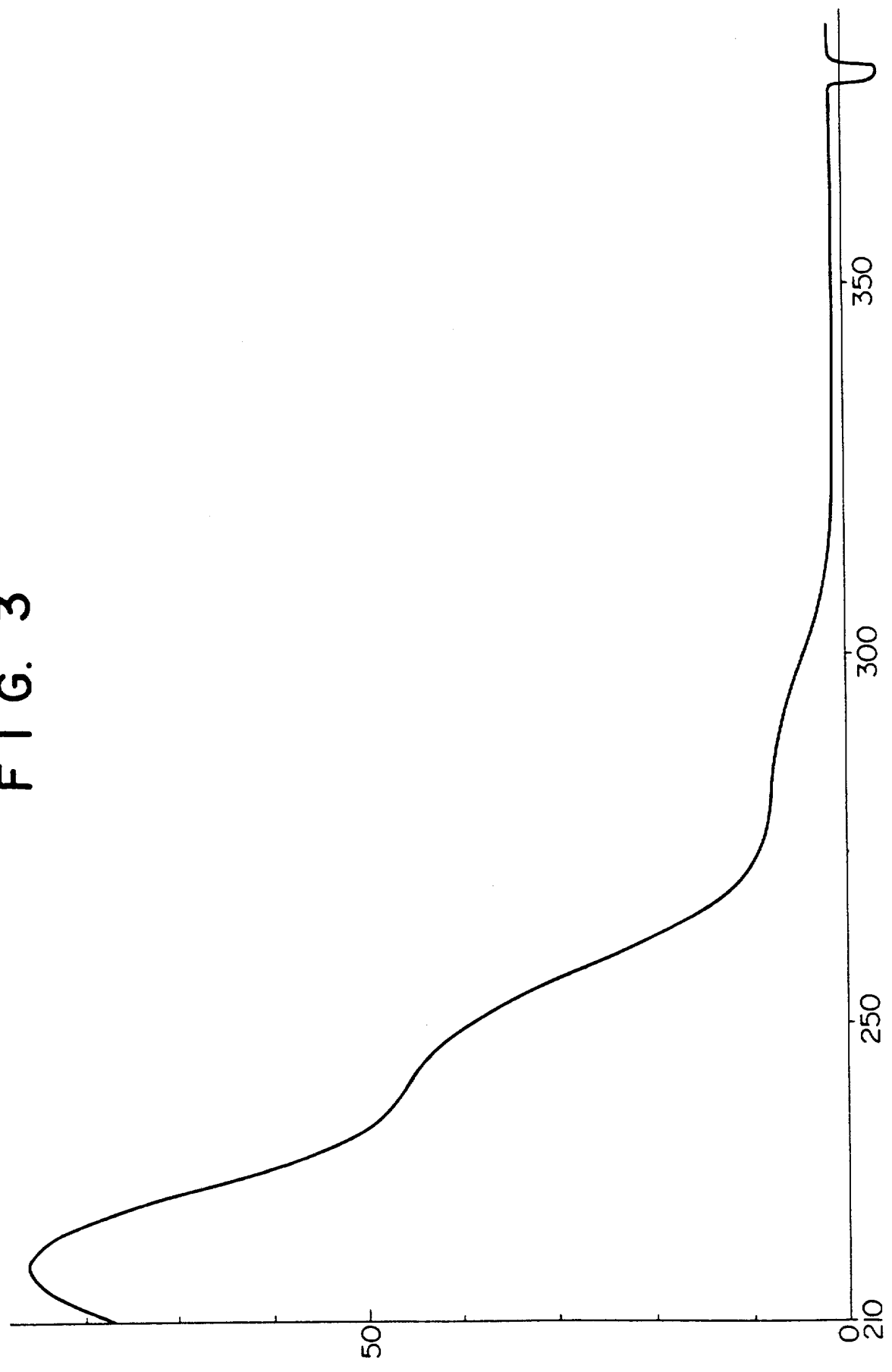


FIG. 4

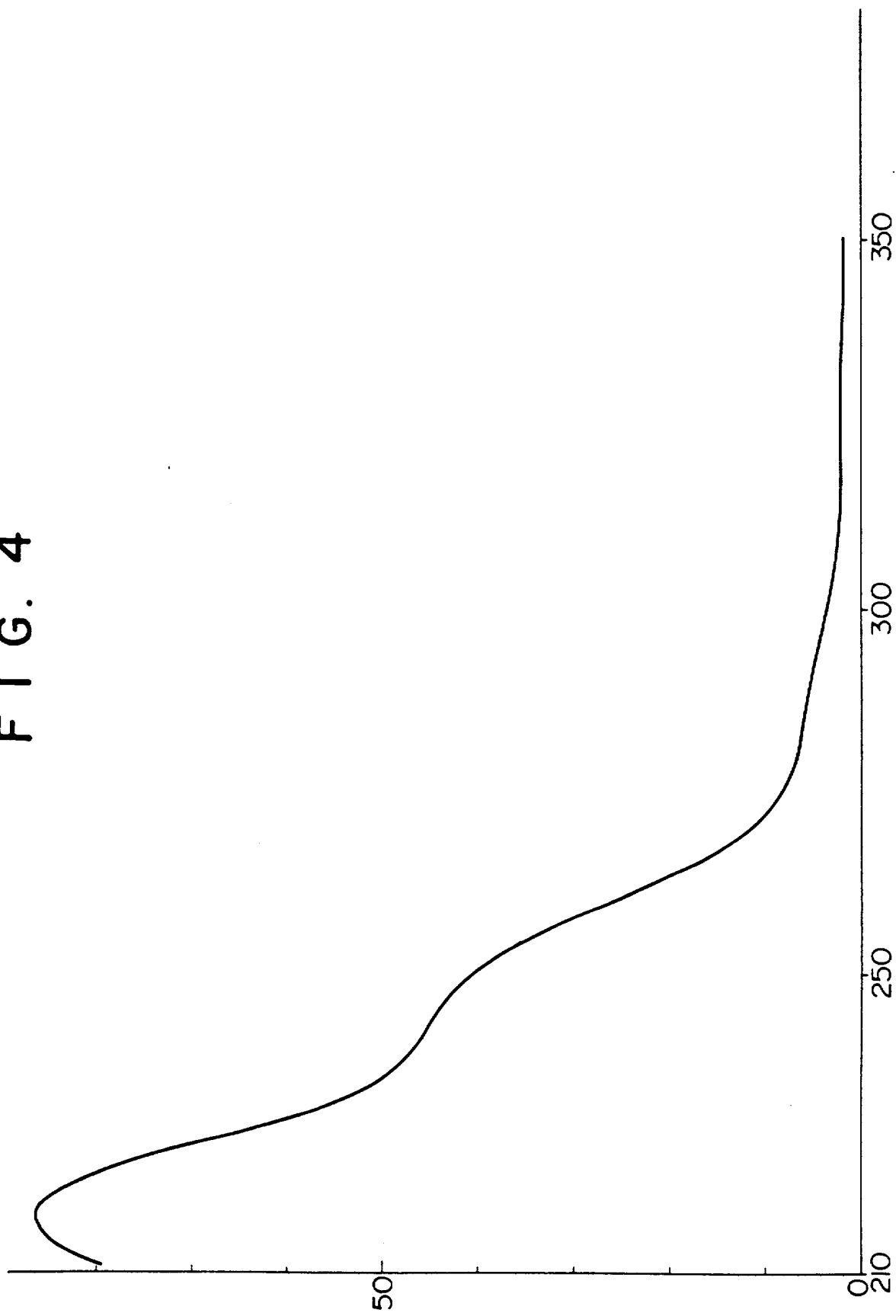


FIG. 5

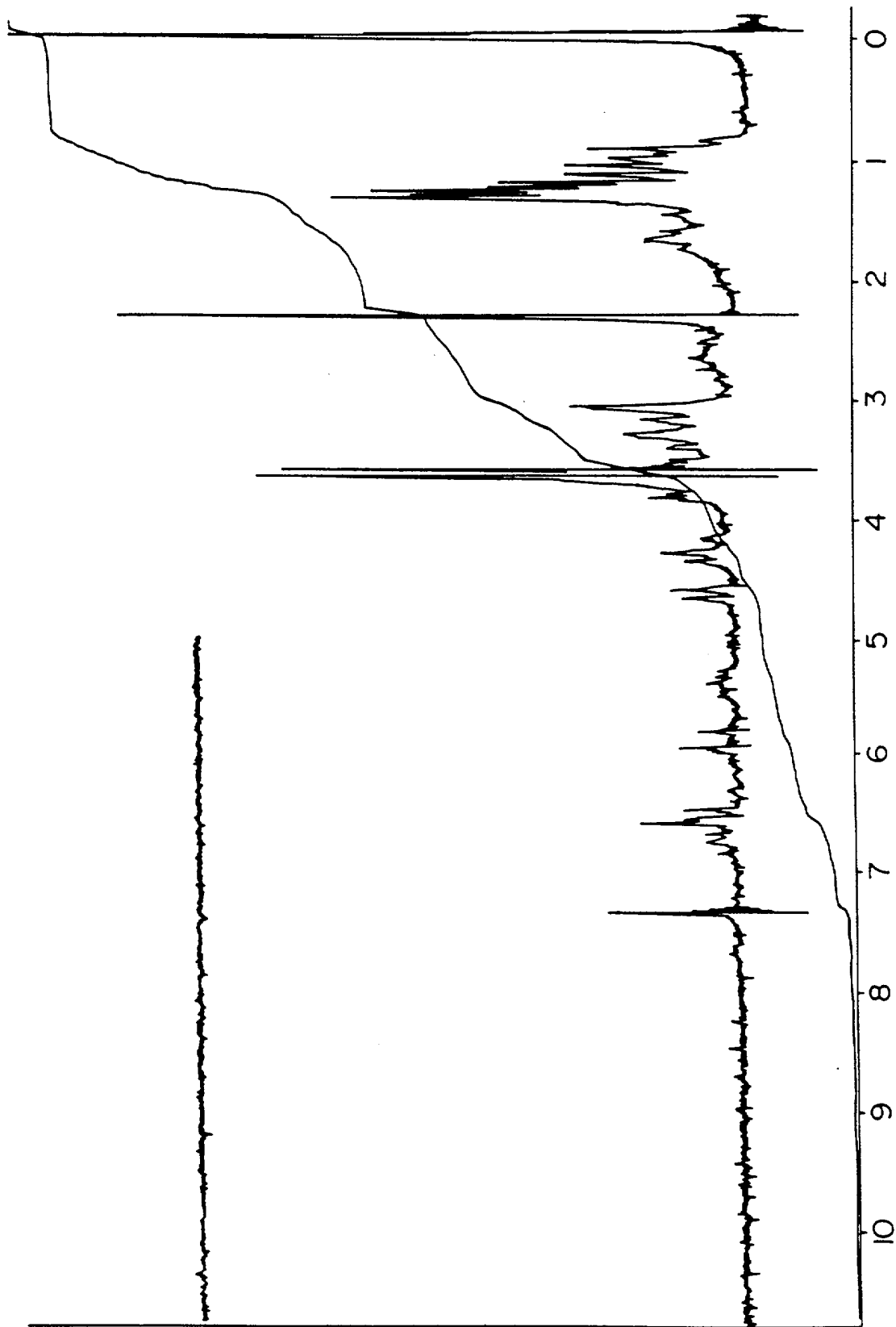




FIG. 6

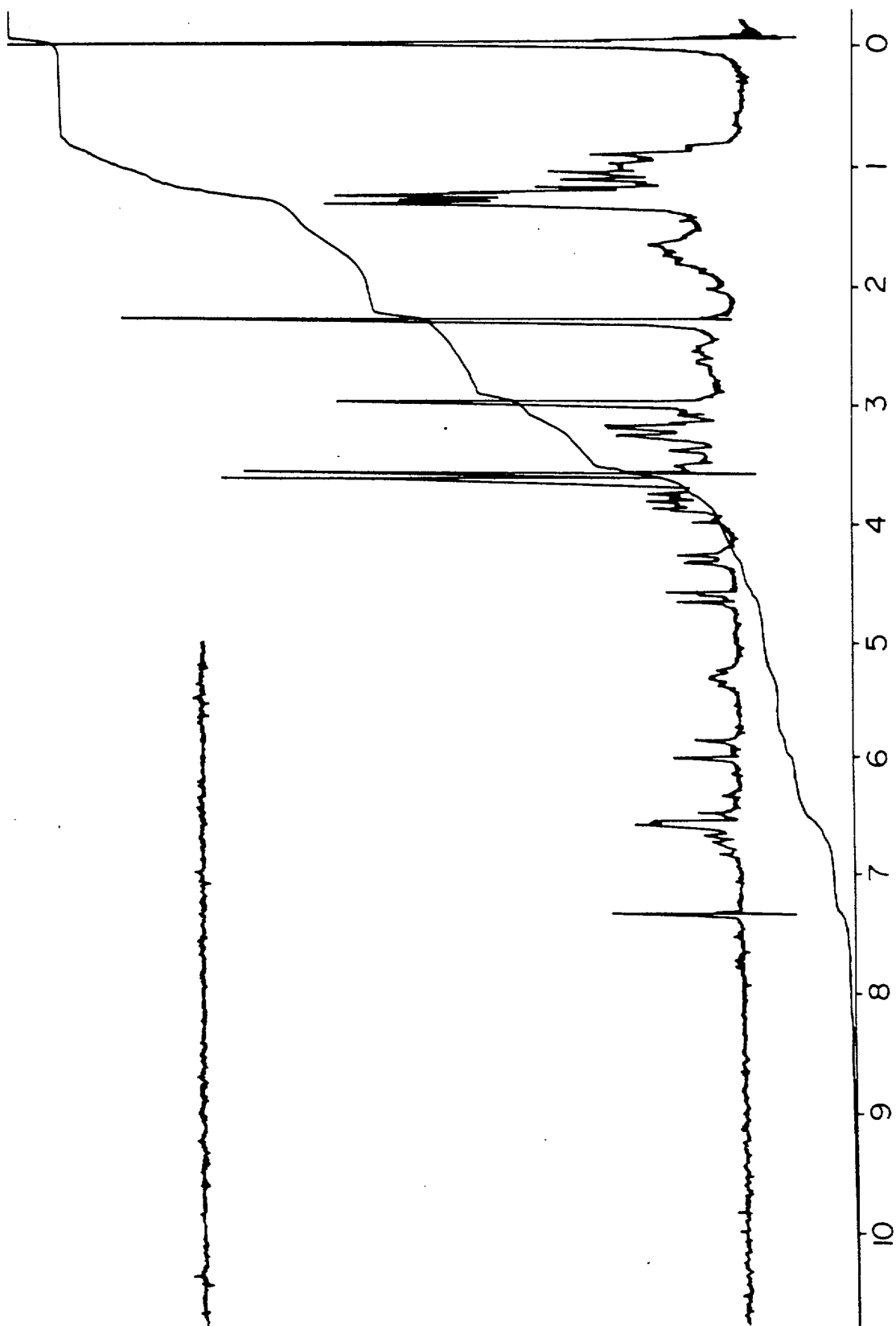


FIG. 7

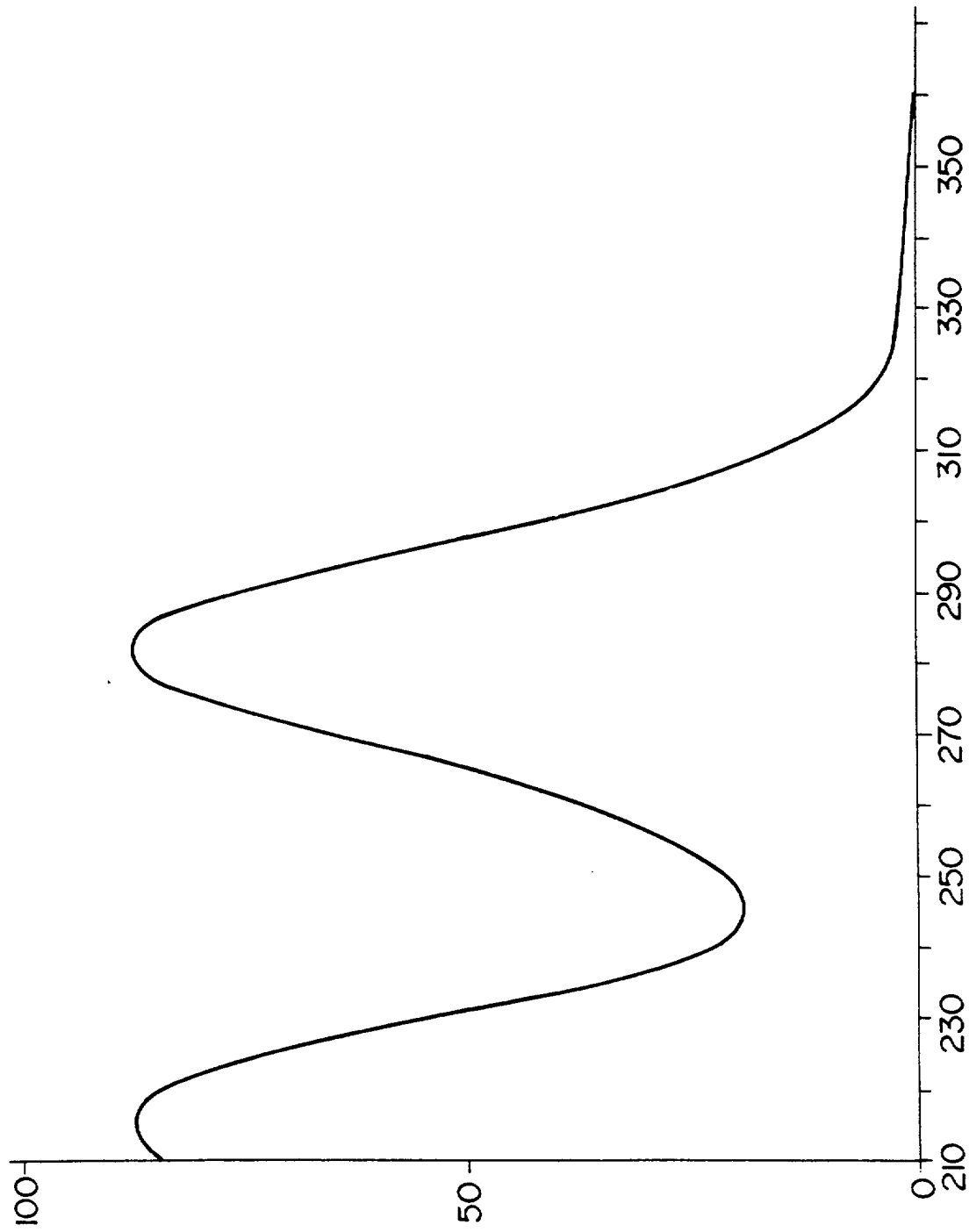


FIG. 8

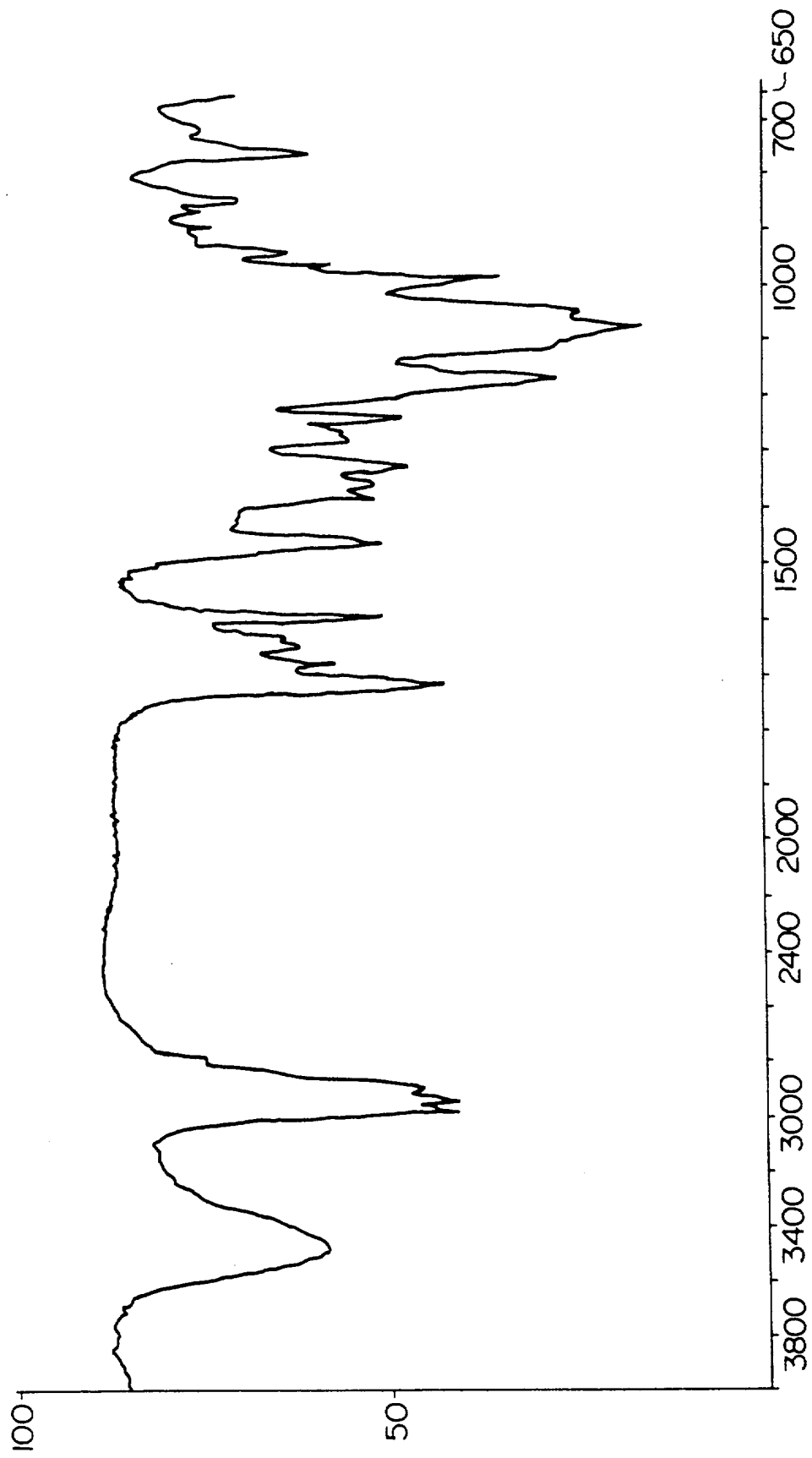


FIG. 9

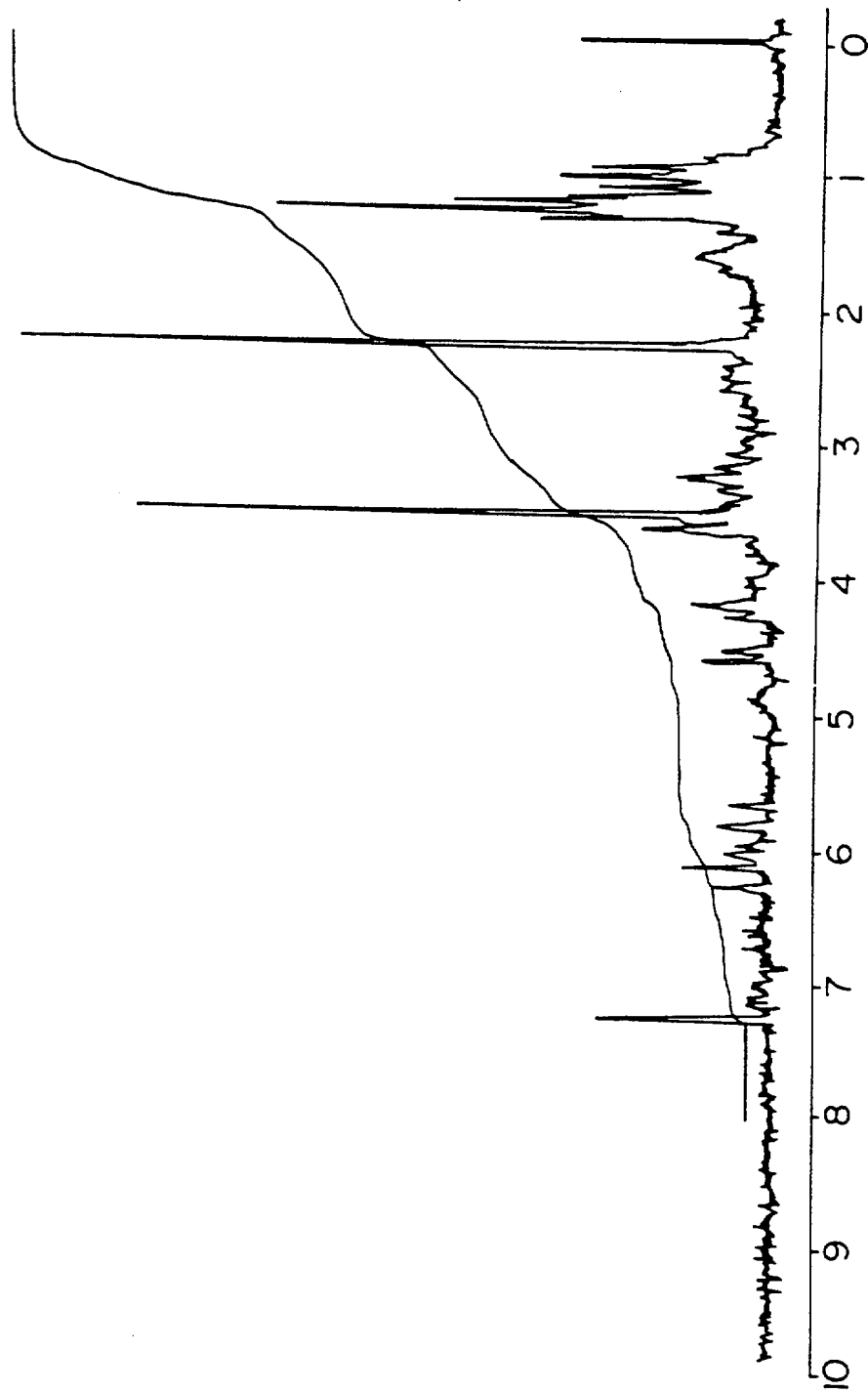


FIG. 10

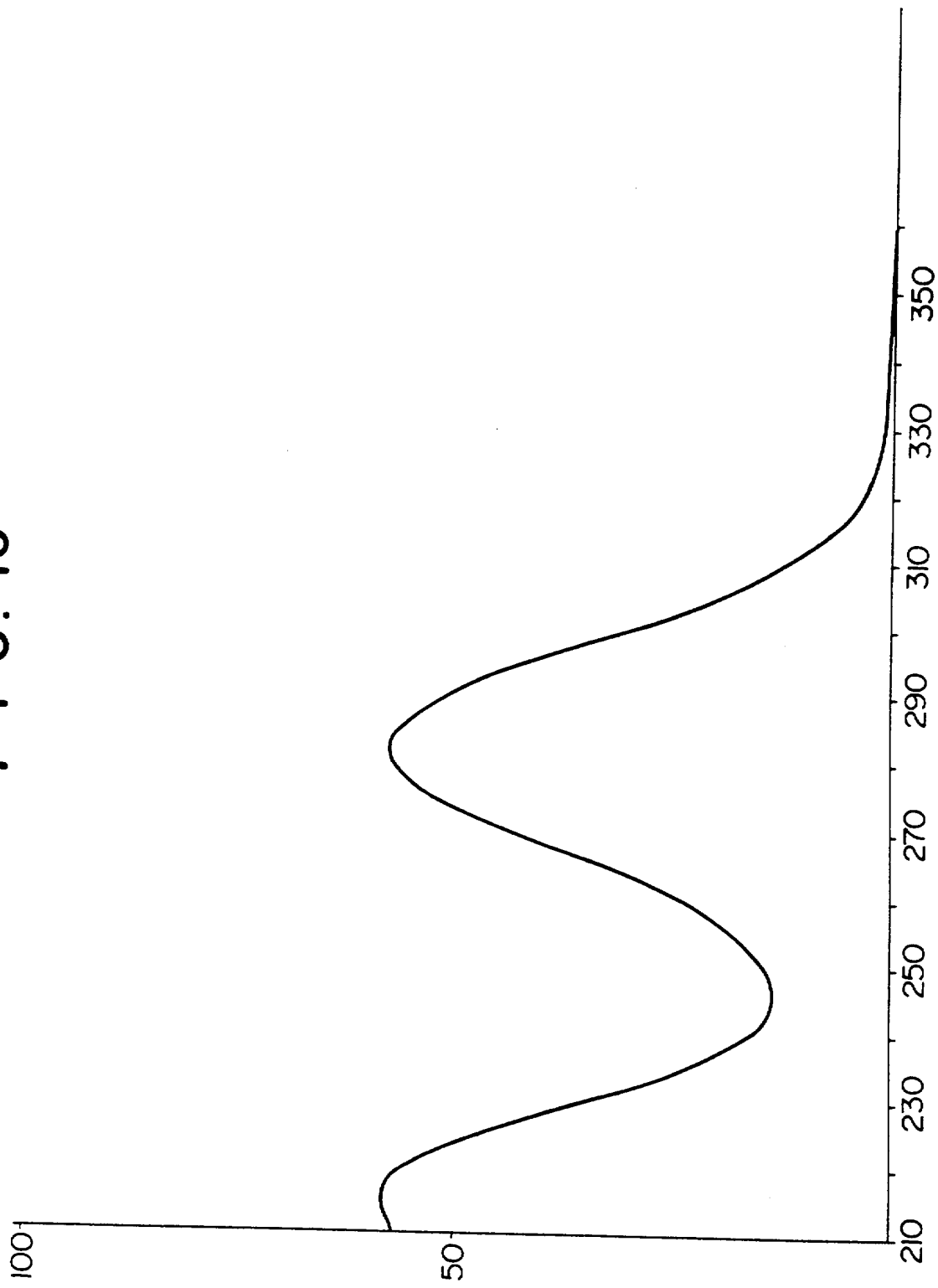


FIG. II

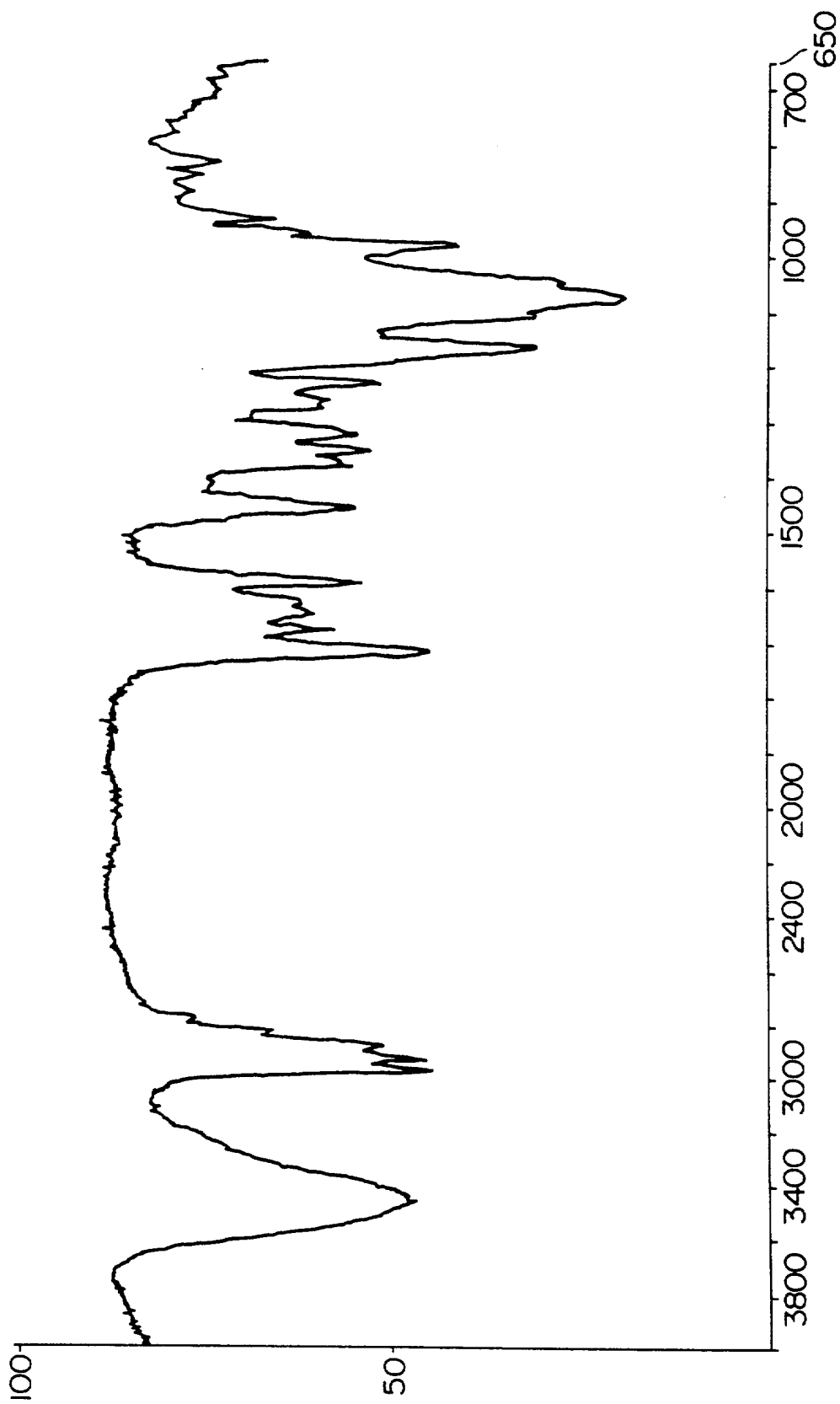


FIG. 12

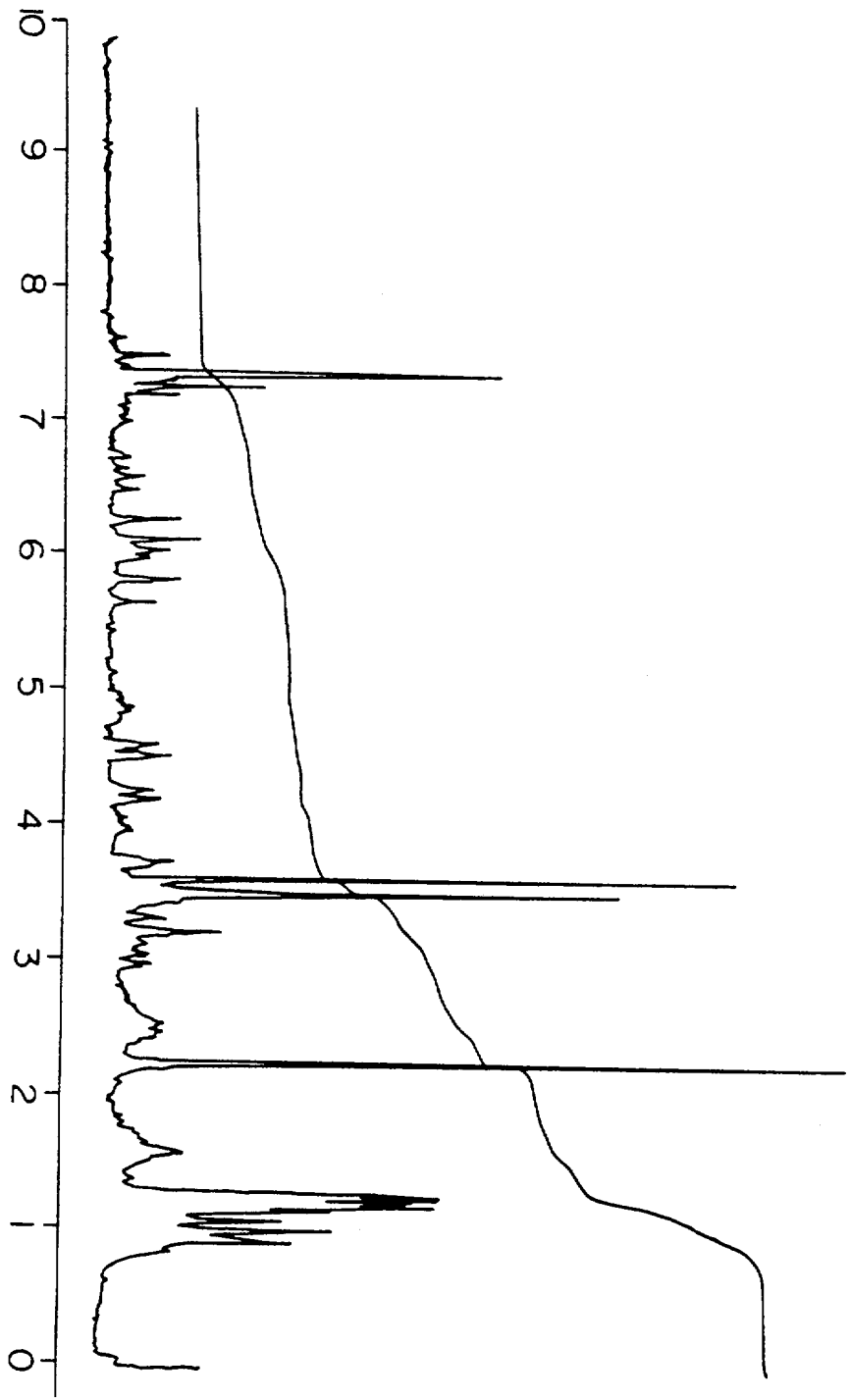


FIG. 13

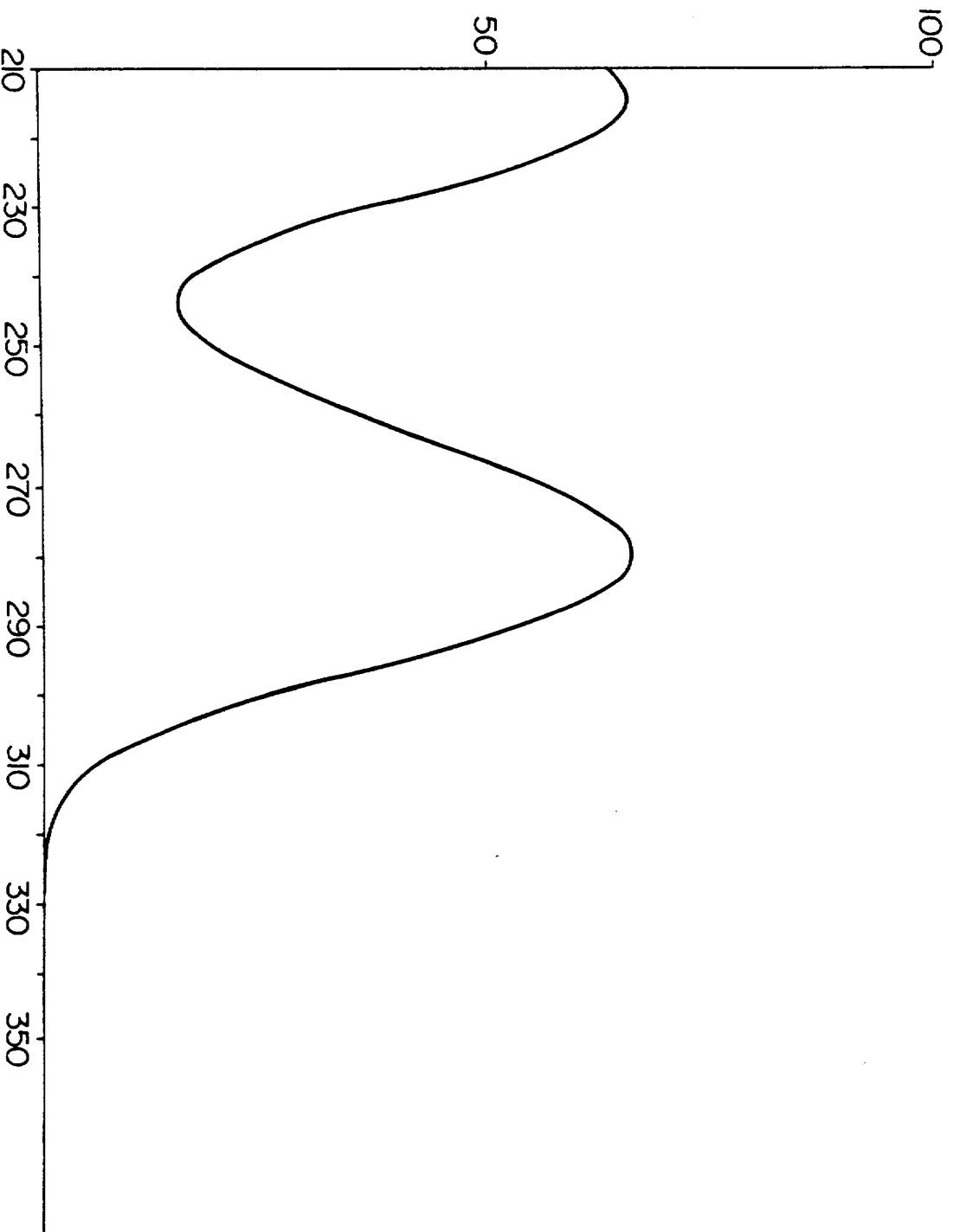




FIG. 14

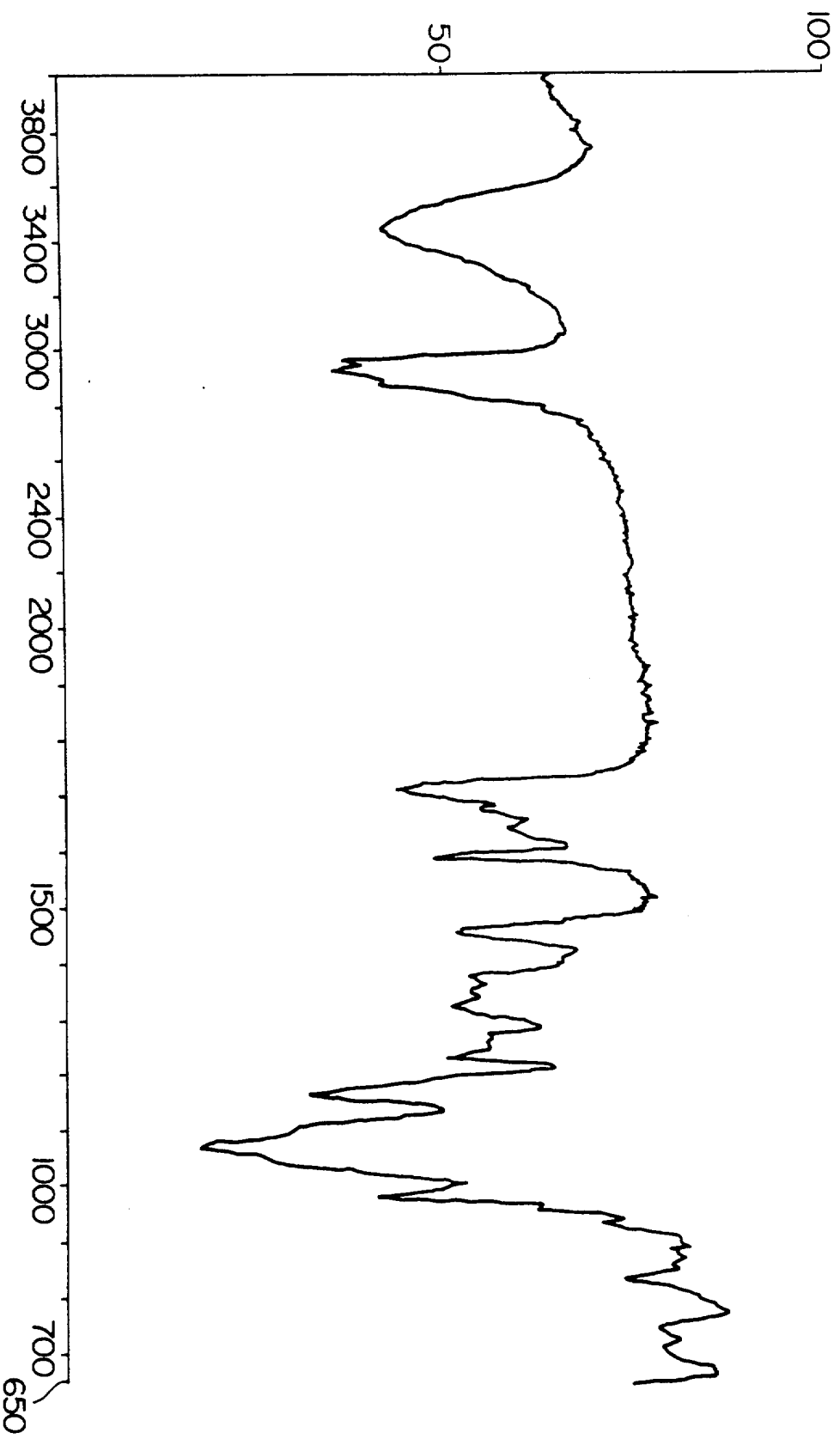


FIG. 15

