



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 87546

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 38/12

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) АНТИБІОТИК 107891, ЙОГО ФАКТОРИ А1 І А2, ФАРМАЦЕВТИЧНО ПРИЙНЯТНІ СОЛІ, КОМПОЗИЦІЯ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

1

2

(21) a200707837

(22) 19.01.2005

(24) 27.07.2009

(86) PCT/US2005/004843, 19.01.2005

(31) 11/035,296

(32) 12.01.2005

(33) US

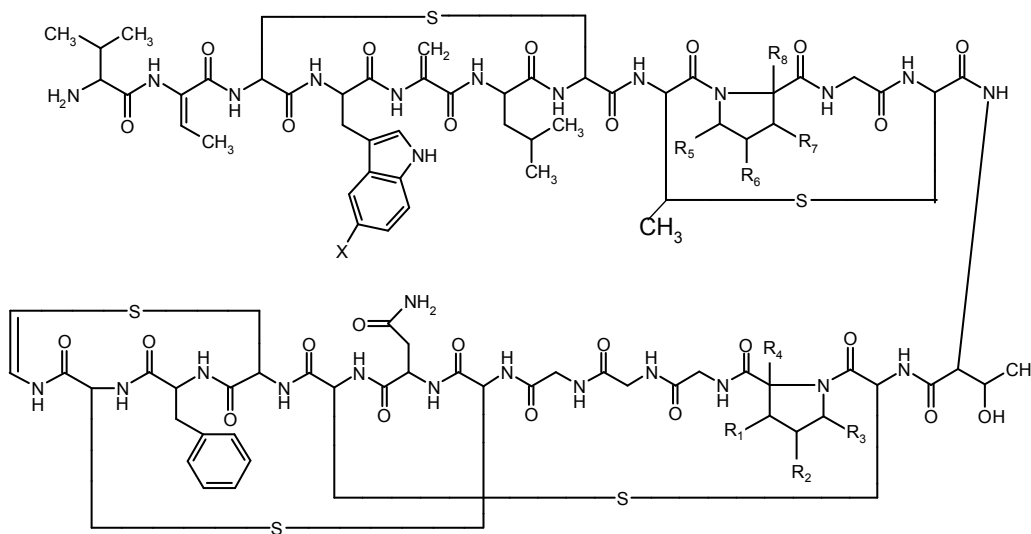
(46) 27.07.2009, Бюл.№ 14, 2009 р.

(72) ЛАЗЗАРІНІ АМЕРІГА, ІТ, ГАСТАЛДО ЛУЧАНО, ІТ, КАНДІАНІ ДЖАНПАОЛО, ІТ, ЧІЧІЛІАТО ІСМАЕЛА, ІТ, ЛОСІ ДАНІЕЛЕ, ІТ, МАРІНЕЛЛІ ФЛАВІА, ІТ, СЕЛВА ЕНРІКО, ІТ, ПАРЕНТІ ФРАНКО, ІТ

(73) НАЙКОНС С.КА.Р.Л., ІТ/ІТ

(56) US 6699839 В1

(57) 1. Сполука формули



де X вибирають з групи, що включає F, Cl, Br і I; і де R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ і R₈ незалежно вибирають з групи, що включає H, OH, алкіл і арил.

2. Сполука згідно з пунктом 1, де X є Cl, R₂ є OH, і R₁, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ і R₈ є H.

3. Сполука згідно з пунктом 1, де X є Cl, R₁ є OH, R₂ є OH, і R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ і R₈ є H.

4. Сполука згідно з пунктом 1, де R₄, R₅, R₆, R₇, і R₈ є H.

5. Сполука згідно з пунктом 4, де R₁ є H, R₂ є H, і R₃ є H.

6. Сполука згідно з пунктом 4, де R₁ є H, R₂ є H, і R₃ є OH.

7. Сполука згідно з пунктом 4, де R₁ є H, R₂ є OH, і R₃ є OH.

8. Сполука згідно з пунктом 4, де R₁ є OH, R₂ є OH, і R₃ є OH.

9. Сполука згідно з пунктом 4, де R₁ є OH, R₂ є H, і R₃ є H.

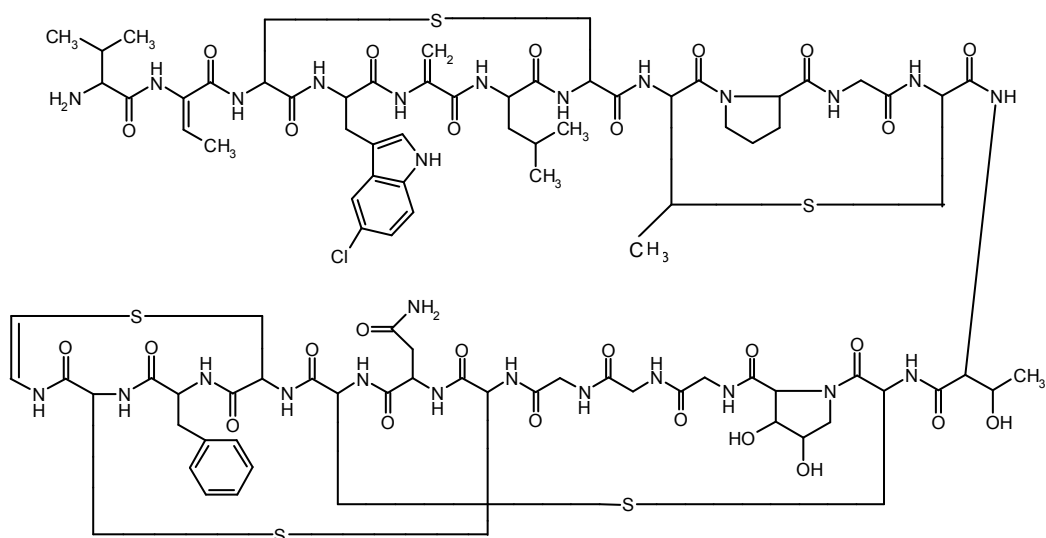
10. Сполука згідно з пунктом 4, де R₁ є OH, R₂ є H, і R₃ є OH.

11. Сполука формули

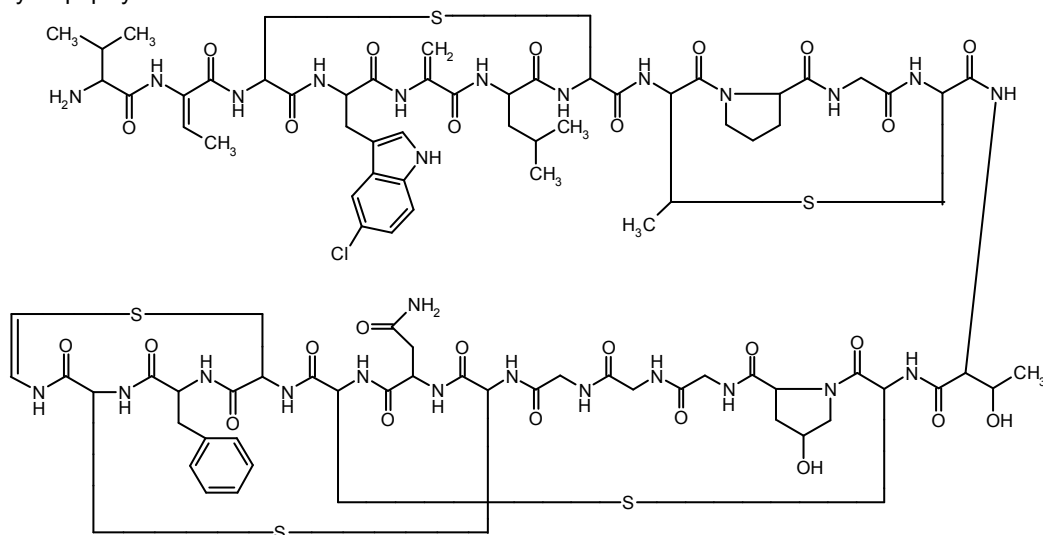
(13) C2

(11) 87546

(19) UA



12. Сполука формули:



13. Комплексний антибіотик 107891, що містить Фактор А1 і Фактор А2, є білим порошком, який має наступні характеристики:

(А) мас-спектр знятий з 0,2мг/мл розчину в метанол:вода 80/20 (об/об) з трифтороцтовою кислотою 0,1% на приладі Thermofinnigan LCQ deca, спорядженому електроспрей-джерелом, використовуючи калібрувальну суміш Thermofinnigan за наступних електроспрей-умов: напруга розпилення - 4,7кВ; капілярна температура - 220°C; капілярна напруга - 3В; вид введення 10 кл/хв, мав два двічі протонізовані іони з m/z 1124 і m/z 1116, що відповідають найнижчому ізотопному складу Фактора А1 і А2, відповідно;

(Б) інфрачервоний спектр, що знімали в KBr, використовуючи модель IFS 48 спектрофотометра Bruker FT-IR, має максимум абсорбції при (cm^{-1}): 3263; 2929; 1661; 1533; 1402; 1114; 1026;

(В) УФ спектр, що знімали в метанол:Н₂O 80:20 (об/об), використовуючи спектрофотометр Perkin-Elmer Lambda 16, має два плеча при 226 і 267 нм;

(Г) ¹H-ЯМР спектр, що знімали при 600МГц в суміші метанол-d₄:Н₂O (рН 4,3 HCl) 40:10 (об/об) при 40°C на спектрометрі Bruker AMX 600, використовуючи водопригнічену послідовність і як внутрішній стандарт залишковий сигнал метанол-d₄ при 3,31 м. ч., має наступні сигнали [δ = м. ч. мультиплетність; (віднесення)]: 0,93 д (CH₃), 0,98 д (CH₃), 1,07т (перекривається CH₃'и), 1,18т (перекривається CH₃'и), 1,26 с (CH₃), 1,30 т (перекривається CH₃'и), 1,62-1,74м (CH₂), 1,78 д (CH₃), 1,80 д (CH₃), 2,03м (CH₂), 2,24 м (CH), 2,36 м (CH₂), 2,72-3,8м (пептидні альфа СН'и), 3,8-5,2 м (пептидні альфа СН'и), 5,53-6,08с (CH₂), 5,62 д (CH подвійного зв'язка), 6,42м (CH), 6,92 д (CH подвійного зв'язка), 7,0-7,55м (ароматичні СН'и), 7,62-10,4 д і м (ароматичні і пептидні NH'и);

(Д) ¹³C-ЯМР спектр, що знімали в суміші метанол-d₄:Н₂O (рН 4,3 HCl) 40:10 (об/об) при 40°C на спектрометрі Bruker AMX 600, використовуючи як внутрішній стандарт залишковий сигнал метанол-d₄

при 49,15 м. ч., має наступні сигнали [δ = м. ч.; (віднесення)]:

13,6-23,2 (аліфатичні CH_3 'и), 26,16-73 (аліфатичні CH_2 'и і пептидні альфа CH' и), 105-136 (ароматичні CH' и і CH' и подвійних зв'язків і четвертинні вуглеці), 164,3-176,3 (пептидні карбоніли);

(Е) кислотний гідролізат в 6N HCl, (105°C, 24 г) має наступні амінокислоти, разом з іншими неідентифікованими піками, після модифікування 6-амінохіноліл-N-гідроксисукцинімідилкарбаматом: лантйонін, метиллантйонін, гліцин, пролін, валін, аспарагінова кислота (продукт гідролізу аспарагіну), фенілаланін і лейцин;

(Є) кислотний гідролізат в 4N метансульфонової кислоті, що містить 0,2% (в/о) 3-(2-аміноетил)індолу, як каталізатор (115°C, 16 г), містить 5-хлортриптофан; і

(Ж) детектується група, що іонізується основою, при кислото/основному титруванні 0,01 N гідроксидом калію в 2-метоксіетанолі (MCS): H_2O 12:3 (об/об), що містить молярний надлишок 0,01 N хлорводневої кислоти.

14. Фактор А1 антибіотика 107891 є білим порошком, що має наступні характеристики:

А) двічі протонований іон при m/z 1124, що відповідає найнижчому ізотопному складу в мас-спектрі знятому з 0,1мг/мл розчину в ацетонітрил:вода 50:50 (об/об) з оцтовою кислотою 0,5% на приладі Thermofinnigan LCQ deca, спорядженому електроспрей-джерелом, використовуючи калібрувальну суміш Thermofinnigan за наступних електроспрей умов: напруга розпилення - 4,7 кВ; капілярна температура - 250°C; капілярна напруга - 8В; вид введення 10 мкл/хв;

Б) точна маса антибіотика, що визначали, використовуючи спектрометр Bruker Daltonics APEX II, 4.7 Tesla, споряджений електроспрей-джерелом, відповідає молекулярній вазі $2246,71 \pm 0,06$, розрахованій моноізотопній масі з $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ при m/z 1124, 36124 (точність 30 м. ч.);

В) коли розчинити в CD_3CN і D_2O (1:1), ^1H ЯМР спектр має наступні групи сигналів (в м. ч.) при 600 МГц, використовуючи CD_3CN як внутрішній стандарт (1,94 м. ч.), [δ = м. ч. мультиплетність; (віднесення)]: 0,84 д (CH_3), 0,89 д (CH_3), 0,94 т (перекривається CH_3 'и), 1,1 д (CH_3), 1,13 д (CH_3), 1,15 т (перекривається CH_3 'и), 1,49м (CH_2), 1,69 д (CH_3), 1,75м (CH_2), 2,11м (CH), 2,26м (CH), 2,5м (CH_2), 2,68-3,8м (пептидні CH_β 'и), 3,8 - 5,0м (пептидні CH_α 'и), 5,45-6,17с (CH_2), 5,58 д (CH подвійного зв'язка), 6,36 м (CH), 6,86 д (CH подвійного зв'язка), 7,0-7,45 м (ароматичних CH' и);

Г) коли розчинити в $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (1:1), ^{13}C ЯМР спектр має наступні сигнали (в м. ч.) при 600 МГц, використовуючи CD_3CN як внутрішній стандарт (1,39 м. ч.), [δ = м. ч.; (віднесення)]: 13,6-23,03 (аліфатичні CH_3 'и), 25,69-77,9 (аліфатичні CH_2 'и і пептидні CH_α 'и), 105-137,3 (ароматичні CH' и і CH' и подвійних зв'язків і четвертинні вуглеці), 165,6-176,6 (пептидні карбоніли);

Д) інфрачервоний спектр, що знімали в KBr, використовуючи модель IFS 48 спектрофотометра Bruker FT-IR, має максимум абсорбції при (cm^{-1}): 3294; 2926; 1661; 1529; 1433; 1407; 1287; 1114; 1021;

Е) УФ спектр, що знімали в метанол: H_2O (у співвідношенні 80:20), використовуючи спектрофотометр Perkin-Elmer Lambda 16, має два плеча при 226 і 267 нм;

Є) кислотний гідролізат в 6N HCl, (105 °C, 24 г) має наступні амінокислоти, разом з іншими неідентифікованими піками, після модифікування 6-амінохіноліл-N-гідроксисукцинімідилкарбаматом: лантйонін, метиллантйонін, гліцин, пролін, валін, аспарагінова кислота (продукт гідролізу аспарагіну), фенілаланін і лейцин; і

Ж) кислотний гідролізат в 4N метансульфонової кислоті, що містить 0,2% (в/о) 3-(2-аміноетил)індолу, як каталізатор (115°C, 16г), містить 5-хлортриптофан.

15. Фактор А2 антибіотика 107891 є білим порошком, що має наступні характеристики:

А) двічі протонований іон при m/z 1116, що відповідає найнижчому ізотопному складу в мас-спектрі знятому з 0,1мг/мл розчину в ацетонітрил:вода 50:50 (об/об) з оцтовою кислотою 0,5% на приладі Thermofinnigan LCQ deca, спорядженому електроспрей-джерелом, використовуючи калібрувальну суміш Thermofinnigan за наступних електроспрей умов: напруга розпилення - 4,7кВ; капілярна температура - 250°C; капілярна напруга - 8В; вид введення 10 мкл/хв;

Б) точна маса антибіотика, що визначали, використовуючи спектрометр Bruker Daltonics APEX II, 4.7 Tesla, споряджений електроспрей-джерелом, відповідає молекулярній вазі $2230,71 \pm 0,06$, розрахованій моноізотопній масі з $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ при m/z 1116,36260 (точність 30 м. ч.);

В) коли розчинити в CD_3CN і D_2O (1:1), ^1H ЯМР спектр має наступні групи сигналів (в м. ч.) при 600 МГц, використовуючи CD_3CN як внутрішній стандарт (1,94 м. ч.), [δ = м. ч., мультиплетність; (віднесення)]: 0,84 д (CH_3), 0,88 д (CH_3), 0,94 в (CH_3), 1,06 д (CH_3), 1,14 д (CH_3), 1,48 м (CH_2), 1,65-1,75 м (CH_2), 1,67 в (CH_3), 2,15 м (CH), 2,25 м (CH), 2,5 м (CH_2), 2,77-3,8 м (пептидні CH_β 'и), 3,8-4,9 м (пептидні CH_α 'и), 5,45-6,14 с (CH_2), 5,59 д (CH подвійного зв'язка), 6,34 м (CH), 6,84 д (CH подвійного зв'язка), 7,0-7,42 м (ароматичних CH' и);

Г) коли розчинити в $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (1:1), ^{13}C ЯМР спектр має наступні сигнали (в м. ч.) при 600 МГц, використовуючи CD_3CN як внутрішній стандарт (1,39 м. ч.), [δ = м. ч.; (віднесення)]: 13,6-22,9 (аліфатичні CH_3 'и), 25,65-73 (аліфатичні CH_2 'и і пептидні CH_α 'и), 105-137,3 (ароматичні CH' и і CH' и подвійних зв'язків і четвертинні вуглеці), 165,7-176,1 (пептидні карбоніли);

Д) інфрачервоний спектр, що знімали в KBr, використовуючи модель IFS 48 спектрофотометра Bruker FT-IR, має максимум абсорбції при (cm^{-1}): 3296; 3060; 2928; 1661; 1529; 1433; 1407; 1288; 1116;

Е) УФ спектр, що знімали в метанол: H_2O (у співвідношенні 80:20), використовуючи спектрофотометр Perkin-Elmer Lambda 16, має два плеча при 226 і 267нм;

Є) кислотний гідролізат в 6N HCl, (105°C, 24 г) має наступні амінокислоти, разом з іншими неідентифікованими піками, після модифікування 6-амінохіноліл-N-гідроксисукцинімідилкарбаматом:

лантйонін, метиллантйонін, глйцйн, пролін, валін, аспарагїнова кїслота (продукт гїдролїзу аспарагїну), фенїлаланїн і лейцїн; і

Ж) кїслотний гїдролїзат в 4N метансульфонової кїслотї, що мїстить 0,2% (в/о) 3-(2-амїноетїл)їндолу, як каталїзатор (115°C, 16г), мїстить 5-хлортрїптофан.

16. Спосїб одержання антибїотика 107891 і його Факторів А1 і А2 і їх солей з кїслотами, в якому здїйснюють стадїї:

культйвування *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 або його варїанта або мутанта, що зберїгає здатнїсть продукувати згаданий антибїотик, за аеробних умов, у водному поживному середовищі, яке мїстить засвоюване джерело вуглецю, азоту і неорганїчних солей;

видїлення одержаного антибїотика з мїцелїю і/або фїльтрування ферментаційного бульйону; і очищення видїленого антибїотика 107891.

17. Спосїб згїдно з пунктом 16, де штам *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 або його варїант або мутант, що продукує антибїотик 107891, попередньо культйвують.

18. Спосїб згїдно з пунктом 16, де видїлення антибїотика 107891 проводять фїльтруванням ферментаційного бульйону і антибїотик видїляють з фїльтрованого ферментаційного бульйону згїдно з методикою, яку вибирають з групи, що включає екстрагування розчинником, що не змїшується з водою, осадження додаванням осаджувача або шляхом змїни рН розчину, абсорбційну хроматографїю, розподільну хроматографїю, розподільну хроматографїю з оберненою фазою, іонообмінну хроматографїю, молекулопоглинальну хроматографїю і комбїнацію двох або декїлькох згаданих методик.

19. Спосїб згїдно з пунктом 16, де видїлення антибїотика 107891 проводять шляхом видїлення мїцелїю з надосадової рїдини ферментаційного бульйону і мїцелїй, екстрагують розчинником, що змїшується з водою, в якому, пїсля видалення збїдненого мїцелїю, одержують розчин, що змїшується з водою, який мїстить неочищений антибїотик, який можна пїддати або окремо, або разом з фїльтрованим ферментаційним бульйоном видїленню антибїотика 107891 за допомогою методики, яку вибирають з групи, що включає екстрагування розчинником, осадження додаванням осаджувача або шляхом змїни рН розчину, абсорбційну хроматографїю, розподільну хроматографїю, розподільну хроматографїю з оберненою фазою, іонообмінну хроматографїю, молекулопоглинальну хроматографїю і комбїнацію двох або декїлькох згаданих методик.

20. Спосїб згїдно з пунктом 19, де концентрацію розчинника, що змїшується з водою, в екстрактї мїцелїю зменшують перед видїленням з нього антибїотика.

21. Спосїб згїдно з пунктом 18, де фїльтрований ферментаційний бульйон пїддають контактуванню з абсорбційною смолою і згадану смолою елюють полярним розчинником, що змїшується з водою,

або його сумїшшю з водою, одержуючи розчин, що мїстить неочищений антибїотик 107891.

22. Спосїб згїдно з пунктом 21, де абсорбційну смоло вибирають з групи, що включає полїстирольну, змїшану полїстиролдивїнілбензольну і полїамїдну смоло.

23. Спосїб згїдно з пунктом 19, де мїцелїй екстрагують С₁-С₃ спиртом і екстракт мїцелїю пїддають контактуванню з абсорбційною смолою і елюють її полярним розчинником, що змїшується з водою, або його сумїшшю з водою, одержуючи розчин, що мїстить неочищений антибїотик 107891.

24. Спосїб згїдно з пунктом 18, де розчини, що мїстять неочищений антибїотик 107891, об'єднують і пїддають подальшому очищенню згаданого антибїотика 107891.

25. Спосїб згїдно з пунктом 21, де розчин, що мїстить неочищений антибїотик 107891, концентрують і потїм лїофїлізують, одержуючи неочищений антибїотик 107891 як твердий продукт.

26. Спосїб згїдно з пунктом 21, де абсорбційні смоли, що мїстять абсорбований антибїотик, об'єднують і їх сумїш елюють полярним розчинником, що змїшується з водою, або його сумїшшю з водою.

27. Спосїб згїдно з пунктом 16, де антибїотик 107891 очищають за допомогою хроматографїї, переважно за допомогою препаративної ВЕРХ або хроматографїї середнього тиску.

28. Спосїб згїдно з пунктом 16, де Фактор А1 і Фактор А2 видїляють за допомогою препаративної ВЕРХ з очищеного антибїотика 107891.

29. Фармацевтична композиція, що мїстить антибїотик, який вибирають з антибїотика 107891, Фактора А1 антибїотика 107891, Фактора А2 антибїотика 107891 і сумїші згаданих Факторів в будь-якому співвїдношенні або його фармацевтично прийнятної солї з кїслотою.

30. Фармацевтична композиція згїдно з пунктом 29, що також мїстить фармацевтично прийнятний носїй.

31. Антибїотик 107891, його Фактор А1, його Фактор А2 або сумїш згаданих Факторів в будь-якому співвїдношенні або його фармацевтично прийнятна сїль з кїслотою, для застосування як медикаменту.

32. Застосування антибїотика 107891, його Фактора А1, його Фактора А2 або сумїші згаданих Факторів в будь-якому співвїдношенні або його фармацевтично прийнятної солї з кїслотою, для виготовлення медикаменту для лїкування або профїлактики бактерїальної інфекції.

33. Застосування антибїотика 107891, його Фактора А1, його Фактора А2 або сумїші згаданих Факторів в будь-якому співвїдношенні або його фармацевтично прийнятної солї з кїслотою, як промотору росту тварини.

34. Біологїчно чиста культура штаму *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 або його варїанта або мутанта, що зберїгає здатнїсть продукувати антибїотик 107891, коли культйвуються при зануренні за аеробних умов в присутності засвоюваного джерела вуглецю, азоту і неорганїчних солей.

Ця заявка є міжнародноподаною на основі заявки US з сер. № [номер патентного повіреного 892,280-195], що подана 12 січня 2005, яка є частковим продовженням заявки US з сер. № [номер патентного повіреного 892,280-499], що подана 11 січня 2005, яка є §371 національно поданою РСТ/ЕР2004/007658, 12 липня 2004, пріоритет якої заявлений в ЕР заявці №03016306,7, що подана 18 липня 2003, всі з яких спеціально включені сюди як посилання у всій своїй повноті.

Представлений винахід стосується антибіотики мікробного походження, довільно названого антибіотик 107891, який є комплексом, що включає Фактори А1 і А2, його фармацевтично прийнятних солей, його фармацевтичних композицій і його застосування як антибактеріального агента.

Іншим об'єктом представленого винаходу є спосіб одержання антибіотики 107891, який включає культивування *Microbispora* sp. 107891 (тут далі згадується як *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024) або його варіанту або мутанту, що зберігає здатність продукувати згаданий антибіотик, виділення антибіотики винаходу з міцелію і/або з ферментаційного бульйону, виділення чистої речовини хроматографічними засобами і розділення Факторів А1 і А2.

Антибіотик 107891 є новим антимікробним агентом з пептидною структурою, що містить лантіонін і метиллантіонін, як складові. Це є типовою характеристикою лантібіотиків і, зокрема, підгрупи, що в основному діє на біосинтез стінок клітин.

Лантібіотики є пептидами, які містять тіоетер амінокислоти лантіоніну також як і деякі інші модифіковані амінокислоти (H. G. Sahl and G. Bierbaum, (1998) "Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria", *Ann. Rev. Microbiol.* 52:41-79). Основні відомі лантібіотики мають антибактеріальну активність, хоча є повідомлення про активність по відношенню до різних фармакологічних цілей. Антибактеріальні лантібіотики можна грубо розділити на дві групи виходячи з їх структур: лантібіотики типу-А є типово подовженими амфіфільними пептидами, в той час як лантібіотики типу-В є компактними і глобулярними (O. McAuliffe, R. P. Ross and C. Hill, (2001): "Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action". *FEMC Microb. Rev.* 25: 285-308). Нізін є типовим представником лантібіотики типу А, в якому актагардин (гардиміцин) і мерсацидин належать до підкласу лантібіотики типу В. І нізинові, і мерсацидинові лантібіотики взаємодіють з мембрано-зв'язаними пептидоглікановими попередниками ліпиду II, хоча два класи відрізняються по дії, вони продукуються в процесі бактеріальної проліферації. Нізинові лантібіотики в основному вбивають бактерію шляхом порушення проникності мембрани (H. Brotz, M. Josten, I. Wiedemann, U. Schneider, F. Gotz, G. Bierbaum and H. G. Sahl, (1998): "Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics", *Mol. Microbiol.* 30:317-27), де мерсацидинові лантібіотики в основному вбивають бактеріальну клітину шляхом інгібування біосинтезу стінок клітини (H. Brotz, G.

Bierbaum, K. Leopold, P. E. Reynolds and H. G. Sahl, (1998): "The lantibiotics mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II", *Antimicrob Agents Chemother.* 42:154-60).

Два антибіотики, що продукуються штамом NRRL 30420 *Microbispora corallina*, ідентифіковані як MF-BA-1768 α_1 і MF-BA-1768 β_1 , відповідно, описуються в патенті US №6,551,591 B1. В описаному вище патенті розкриті фізико-хімічні дані (наприклад, мас-спектроскопічні дані, молекулярна вага, вміст амінокислот) і порівняння часу утримувань РХ-МС експериментальних аналізів чітко показала, що комплексний антибіотик 107891, також як і його компоненти Фактор А1 і Фактор А2 є хімічно відмінними від антибіотиків MF-BA 1768 α_1 і MF-BA-1768 β_1 .

ЕР 0592835A2 описує протипухлинні антибіотики BU-4803TA $_1$, A $_2$, B, C $_1$, C $_2$ і D. Антибіотики BU-4803TA $_1$, A $_2$ і B виділяють з ферментаційного бульйону *Microbispora* ATCC 55327 (AA 9966), в той час як антибіотики BU4803TC $_1$, C $_2$ і D є продуктами трансформації антибіотики BU 4803TA $_1$, A $_2$ і B, відповідно, коли ці продукти зберігаються в диметилсульфоксиді. Фізико-хімічні дані розкриті в ЕР 0592 835 А для приведених вище антибіотиків (наприклад, вигляд, абсорбція УФ, молекулярна вага, протипухлинна активність, чітко доказують, що вони є хімічними речовинами відмінними від комплексного антибіотики 107891 і його Факторів А1 і А2.

Штам і ферментування

Microbispora sp. 107891 виділили і депонували 27 лютого 2003 у American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd, Manassas Va., 20110-2209 U.S.A. у відповідності із Будапештським договором. Штаму було присвоєно інвентарний номер PTA-5024.

Одержання антибіотики 107891 проводять шляхом культивування штаму *Microbispora* sp. здатного його продукувати, тобто *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 або його варіанту або мутанту, що зберігає здатність продукувати згаданий антибіотик; виділення одержаного антибіотики з цільного культурального бульйону і/або з відокремленого міцелію і/або з фільтрованого ферментаційного бульйону, і очищення виділеного антибіотики хроматографічними засобами. В будь-якому випадку, переважно одержання антибіотики 107891 проводять в аеробних умовах у водному поживному середовищі, що містить легкозасвоювані джерела вуглецю, азоту і неорганічних солей. Може бути використана більшість поживних середовищ, що зазвичай використовуються у галузі ферментування, однак деякі середовища є переважними.

Переважним джерелом вуглецю є цукроза, фруктоза, глюкоза, ксилоза і їм подібні. Переважними джерелами азоту є соєве борошно, пептон, екстракт м'яса, екстракт дріжджів, триптон, амінокислоти, гідролізований казеїн і їм подібні. Серед неорганічних солей, які можуть бути включені в культуральне середовище, присутні звичайні тверді солі здатні забезпечувати іони натрію, калію, заліза, цинку, кобальту, магнію, кальцію, амонію,

хлориду, карбонату, сульфату, фосфату, нітрату і їм подібні іони.

Переважно, штам, що продукує антибіотик 107891 попередньо культивують у ферментаційній пробірці або в колбі для струшування, тоді культуру використовують для інокуляції в банковий ферментатор для одержання основних кількостей речовин. Середовищем, що використовується, для попереднього культивування може бути тим же самим як і те що використовується для об'ємних ферментацій, але також може бути використане і інше середовище. Штам, що продукує антибіотик 107891, може вирощуватись при температурах від 17°C до 37°C, оптимальними температурами є температура приблизно 28-30°C.

Під час ферментації, утворення антибіотика 107891 можна контролювати за допомогою біодослідження на сприйнятливих мікроорганізмах і/або використовуючи ВЕРХ аналізи Максимум продукування антибіотика 107891 зазвичай спостерігається після від 90 години до 200 години ферментування.

Антибіотик 107891 одержують культивуванням *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 або його варіанту або мутанту здатного продукувати антибіотик 107891, і знаходиться в культуральному бульйоні і/або в міцелії.

В цьому описі і пунктах формули термін "антибіотик 107891", якщо не вказано інше, означає комплексний антибіотик 107891, що включає Фактори A1 і A2.

Морфологічні характеристики *microbispora* sp. ATCC PTA-5024

Microbispora sp. ATCC PTA-5024 добре росте на різних стандартних твердих середовищах. Мікроскопічні вимірювання проводили використовуючи ріст культури на гумінова кислота-агар із слідами солі (склад в/л: гумінова кислота 0,5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,001, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,001, MOPS 2, агар 20) доповненому 1мл/л розчину вітамінів (гідрохлорид тимідину 25мг/л, пантотенат кальцію 250мг/л, нікотина кислота 250мг/л, біотин 0,5мг/л, рибофлавін 1,25г/л, ціанокобаламін 6,25мг/л, парамінобензойна кислота 25мг/л, фолієва кислота 500мг/л, гідрохлорид піридоксалу 500мг/л).

В рідкій культурі (V6 середовище, склад в г/л: декстроза 22, екстракт м'яса 5, екстракт дріжджів 5, казеїн 3, NaCl 1,5) не спостерігалась фрагментація міцелію після 6 днів росту при 28°C. Мікроскопічне дослідження на гумінова кислота-агар із слідами солі (після 21 днів інкубування при 28°C) показало ветвіління нефрагментованого субстрату міцелію і моноподіальне ветвіління аеріального міцелію; також спостерігалась наявність багатьох довгих прямих і незначно розгалужених аеральних гіфів. Характеристичні продольні пари спор ростуть короткими спорофорами, що латерально вникають з відгалужень або безпосередньо з основною авральною гіфою. Спори є кульоподібними і

нерухливими. Спорангій-подібні тіла або інші частинки структур не спостерігаються.

Культуральні характеристики *microbispora* sp. ATCC PTA-5024

Microbispora sp. ATCC PTA-5024 вирощували протягом шести днів в AF/MC рідкому середовищі (дивіться Приклад 1) при 28°C і 200об./хв., тоді переносили (5% інокулювання) до нового AF/MC рідкого середовища і вирощування продовжували ще 6 днів і потім інокулювали (7% інокулювання) в 100мл V6 рідке середовище (дивіться Приклад 1). Після вирощування 6 днів при 28°C і 200об./хв., збирали міцелій центрифугуванням і три рази промивали стерильним розчином саліну, потім розводили одержуючи придатний розчин для інокулювання Аліквотами суспензії штрихували перекресними штрихами різні середовища рекомендовані Shirling and Gottlieb (E. B. Shirling і D. Gottlieb, (1966): "Method for Characterization of *Streptomyces* species", Int. J. Syst. Bacteriol. 16: 313-340), і середовище рекомендоване S. A. Waksman (1961): "The Actinomycetes", The Williams and Wilkins Co., Baltimore. Vol.2: 328-334).

Придатність для використання різних карбодіратів як джерела вуглецю і енергії визначали використовуючи середовище ISP4 без крохмалю, доповнене 1мл/л розчину вітаміну описаного вище як основного середовища; кожне джерело вуглецю додавали в кінцевій концентрації 1% (в/о).

NaCl толерантність, рН інтервал росту також як і здатність до росту при різних температурах визначали на ISP2 середовищі. Всі середовища інкубували при 28°C протягом трьох тижнів; описи стосуються 21 дня якщо не вказано інше. Колір оцінювали при звичайному денному освітленні використовуючи Атлас кольорів Maerz and Paul (A. Maerz and M. R. Paul, 1950 - A Dictionary of Colour, 2nd edition. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York). Здатність відновлювати нітрати у нітрити оцінювали на вологому Нітратному середовищі за методикою описаною Williams et al. (S. T. Williams, M. Goodfellow, G. Alderson, E. M. H. Wellington, P. H. A. Sneath & M. J. Sackin, 1983 - Numerical classification of *Streptomyces* and related genera - J. Gen. Microbiol. 129, 1743-1813).

Ріст, появу колоній, субстрат і колір аеріальної міцелію і продукування пігменту для штаму *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 описано в Таблиці I. Вегетативний ріст присутній на більшій частині використовованого середовища, на відміну від аврального міцелію, де він присутній тільки в деяких його частинах. На будь-якому з використовуваних середовищ не спостерігається явне пігментування. Фізіологічні характеристики штаму приведені в Таблиці II. Ріст і продукування аеріального міцелію спостерігається при 17°C але не при 43°C. Продукування аеріального міцелію на ISP2 спостерігається при рН вище ніж 6, і в той час відсутнє в присутності 1% NaCl.

Придатність до застосування різних карбодіратів для росту показано в Таблиці III.

Таблиця I

Характеристики росту *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024

Середовище	Ріст та морфологія	Зміна коду кольору
ISP2 Агар з екстракту дріжджів - екстракту солоду	Рясний ріст, зморшувата поверхня; добре продукування рожевуватого (2A8) аврального міцелію. Незначне продукування оранжево/світло-коричневого розчинного пігменту.	5 E 12 оранжува-то/червоний
ISP3 Агар вівсяного борошна	Рясний ріст; добре продукування рожевуватого (2A8) аврального міцелію, особливо на рукавах перехресних штрихів. Незначне продукування оранжевуватого розчинного пігменту.	11 H10 оранжува-то/рожевий
ISP4 Неорганічні солі - крохмальний агар	добрий ріст; відсутність продукування аврального міцелію. Не продукуються розчинні ферменти. Гідролізується крохмаль	11 19 оранжевий
Glu/Asp Глюкоза - аспарагіновий агар	Дискретний ріст, незначний; продукування тонкого бежево/рожевуватого (9B4) аеріального міцелію на рукавах перехресних штрихів. Не продукуються розчинні ферменти.	12 K 12 оранжевува-то/світло-коричневий
ISP 6 Пептон - екстракт дріжджів - агар заліза	Обмежений ріст, з рожевуватими одиничними колоніями, що ростуть у висоту, згорнуті, із гладкою поверхнею; не продукується аеральний міцелій. Відсутнє потемніння середовища.	Не визначений
ISP7 Тирозиновий агар	Бідний ріст тонкого, оранжевувато/світло-коричневого субстрату міцелію; не продукується аеральний міцелій. Відсутнє потемніння середовища.	Не визначений
ISP3 + YE Вівсяне борошно/агар 1% екстракту дріжджів	Рясний ріст, зморшувата поверхня; дуже обмежене продукування тонкого, рожевуватого аврального міцелію. Не продукуються розчинні ферменти.	4 B 12 оранжува-то/червоний

(ISP4 і глюкоза-аспарагіновий агар доповнювали 1мл/л розчину вітамінів)

Таблиця II

Фізіологічні характеристики
Microbispora sp. ATCC PTA-5024

Тест	Реакція
Гідроліз крохмалю	Позитивна
Гідроліз казеїну	Негативна
Засвоєння малату кальцію	Негативна
Пептонізація індикаторного бактеріологічного середовища	Негативна
Коагуляція індикаторного бактеріологічного середовища	Негативна
Розжиження желатину	Негативна до слабо позитивної
Тирозинова реакція	Негативна
Відновлення нітрату	Позитивна
pH інтервал росту (14 днів)	Відсутній ріст при 4,2, добрий 5,5-8,8; не тестувався вище цього інтервалу. Аеральний міцелій відсутній при pH≤6,5
NaCl % толерантність	≤2; відсутність аврального міцелію при ≥1.
Інтервал температур росту	17°C-37°C. Присутній аеральний міцелій у всьому інтервалі; відсутній ріст при 43°C.

Таблиця III

Поглинання джерела вуглецю
Microbispora sp. ATCC PTA-5024

Джерело вуглецю	Ріст (14 днів)
Арабіноза	++
Целюлоза	-
Фруктоза	++
Інозит	+/-
Маніт	+++
Рафіноза	-
Рамоза	-
Цукроза	+++
Ксилоза	+++
Глюкоза	++
Гліцерин	++
Без цукру	-

+++ значний ріст; ++ добрий ріст; + посередній ріст; +/- обмежений ріст; - відсутність росту; аеральний міцелій завжди відсутній.

Хемотаксономічні характеристики *microbispora* sp. ATCC PTA-5024 *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 вирощували в GYM середовищі (глюкоза 4г/л; екстракт дріжджів 4г/л; екстракт солоду 10г/л) при 28°C на роторному шейкері і міцелій збирали, двічі промивали стерильною дистильованою водою і потім ліофілізували. Проводили аналіз амінокислот згідно із способом Станек і Роберте (J. L. Staneck and G. D. Roberts, (1974): "Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography", Appl. Microbiol. 28: 226-231). Менахінони і полярні ліпіди екстрагували за наступною методикою Міннікін та ін. (D. E. Minnikin, A. G. O'Donnell, M. Goodfellow., G. Alderson, M. Athalye, A. Schaal and J. H. Parlett, (1984): "An integrated procedure of isoprenoid quinones and polar lipids", J. Microbiol Meth. 2: 233-241). Аналізували полярні ліпіди використовуючи тонкошарову хроматографію (D. E. Minnikin, V. Patel, L. Alshamaony, and M. Goodfellow, (1977): "Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria", Int. J. Syst. Bacteriol. 27:104-117), менахінони за допомогою ВЕРХ (R. M. Kroppenstedt, (1982): "Separation of bacterial menaquinones by HPLC using reverse phase RP18 and a silver loaded ion exchanger as stationary phase", J. Liquid. Chromat. 5: 2359-2367; R. M. Kroppenstedt, (1985): "Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms", in: Chemical Methods in Bacterial Systematics. No20 SAB Technical Series pp.173-199, M. Goodfellow and D. E. Minnikin eds, Academic Press, London) і метилові естери жирних кислот за допомогою газорідинної хроматографії, відповідно (L. T. Miller, (1982): "A single derivatization method for bacterial fatty acid methyl esters including hydroxy acids", J. Clin. Microbiol. 16: 584-586; M. Sasser, (1990): "Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids", USFCC News Letters 20: 1-6). Присутність міколових кислот перевіряли за методом Міннікін та ін. (D. E. Minnikin, L. Alshamaony,

and M. Goodfellow, (1975): "Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia* and related taxa by thin layer chromatographic analysis of whole organism methanolizates", J. Gen. Microbiol. 88: 200-204).

Клітинні гідролізати штаму *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 містять мезо-діамінопімелінову кислоту як діамінокислоту пептидоглікану. Домінуючими менахінонами є МК-9(III, VIII-H₄), МК-9(H₂) і МК-9(H₀). Полярність ліпідної компоненти характеризується присутністю фосфатидилетаноламіну, метилфосфатидилетаноламіну, фосфатидилгліцерину, дифосфатидилгліцерину, фосфатидилінозиту, фосфатидилінозитманозидів і N-ацетилглюкозаміну, що містить фосфоліпід, тобто фосфоліпід типу IV згідно до Лешевальє та ін. (H. A. Lechevalier, C. De Brieve and M. P. Lechevalier, (1977): "Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition", Biochem. Syst. Ecol. 5: 246-260). Основними компонентами жирної кислоти є антеізо 15:0, ізо 16:0, n-16:0, антеізо 17:0, і 10-метил-гептадеканова (10-Me-17:0), тобто 3с згідно Кроппенстедта (R. M. Kroppenstedt, (1985): "Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms", in: Chemical Methods in Bacterial Systematics. No20 SAB Technical Series pp.173-199. M. Goodfellow and D. E. Minnikin eds, Academic Press, London). Міколова кислота не детектувалась.

Визначення 16S рДНК послідовності *microbispora* sp. ATCC PTA-5024

Часткову послідовність 16 рРНК гену (16S рДНК), тобто 1443 нуклеотиди, що відповідає 95% повній рРНК, штаму *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024, визначали за наступною опублікованою методикою (P. Mazza, P. Monciardini, L. Cavaletti, M. Sosio and S. Donadio, (2003): "Diversity of Actinoplanes and related genera isolated from an Italian soil", Microbial Ecol. 5:362-372). Вона розкрита в SEQ ID NO 1.

Цю послідовність порівнювали з послідовністю штаму *Microbispora corallina* NRRL 30420 (MF-BA-

1768), як повідомлялось в патенті US №6,551,591 B1. Дві послідовності співставляли і встановлювали відмінність в 31 з 1456 співставлених положень, що відповідало загальній розбіжності послідовності 2,13%. Будь-які два штами, що різняться менше ніж на 97,5% ідентичності послідовності зазвичай належить до різних видів (Stackebrandt, E. і Embley, M. T. (2000) "Diversity of Uncultured Microorganisms in the Environment". In: Nonculturable Microorganisms in the Environment, R. R. Colwell і D. J. Grimes (eds). ASM, Press, Washington D.C., pp.57-75). Тому 2% рівень розбіжності послідовності є доволі високим (Rossell-Mora, R., and Amann, R. (2001). "The Species Concept for Prokaryotes". FEMC Microbiol. Rev. 25: 39-67) і вказує на те, що *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 і *Microbispora coralline* NRRL 30420 (MF-BA-1768) є різними штамми.

Ідентичність штаму *microbispora* sp. ATCC PTA-5024

Штам, що продукує антибіотик 107891, відноситься до виду *Microbispora*, родини Streptosporangiaceae оскільки має наступні хемотаксономічні і морфологічні характеристики:

присутність мезо-діамінопімелінової кислоти в стінках клітини;

значні кількості МК-9(III, VIII-H₄) і фосфоліпіду типу IV згідно з Лешевальє та ін. (H. A. Lechevalier, C. De Brieve and M. P. Lechevalier, (1977): "Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition", Biochem. Syst. Ecol. 5: 246-260);

жирна кислота профілю 3с sensu Кроппенстедт (R. M. Kroppenstedt, (1992): "The genus Nocardopsis", in: The Prokaryotes, Vol.II, pp.1139-1156, A. Balows, H. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer eds; New York, Springer-Verlag);

відсутність міколових кислот;

утворення характеристичних продольних пар спор на кінцях коротких спорифорів, що латерально відгалужуються від аеріального гіфу. Нерухливі спори.

часткова послідовність 16 рПНК гену (16S рДНК), тобто 1443 нуклеотиди, що відповідає 95% повної рПНК, показаний в SEQ ID NO.1, що має >97% ідентичності 16S рДНК послідовності з описаних видів *Microbispora*.

Як і у випадку інших мікроорганізмів, характеристики штаму, що продукує антибіотик 107891, зазнають змін. Наприклад, штучні варіанти і мутанти штаму можна одержати шляхом обробки різними відомими мутагенами, такими як УФ випромінювання і хімікати, такі як азотиста кислота, N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин і багато інших. Всі природні і штучні варіанти і мутанти штаму *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 здатного продукувати антибіотик 107891 розглядаються як еквівалентні до нього для цілей цього винаходу і тому знаходяться в межах рамок винаходу.

Екстрагування і очищення антибіотика 107891

Як згадано вище, антибіотик 107891 майже однаково розподілений в міцелії і в фільтрованій фракції ферментаційного бульйону.

Віджятий бульйон можна одержати відокремленням міцелію від надосадкової рідини фермен-

таційного бульйону і міцелій можна екстрагувати розчинником, що змішується з водою, одержуючи розчин, що містить 107891 антибіотик, після виділення збідненого міцелію. Цей міцелійний екстракт можна потім обробити окремо або у поєднанні з надосадковою рідиною згідно з методиками описаними тут далі для фракції надосадкової рідини. Коли розчинник, що змішується з водою, може втручатися у виділення антибіотика з екстракту міцелію, розчинник, що змішується з водою, може видалятися перегонкою або може розводитися водою до концентрації, що не впливає.

Термін "розчинник, що змішується з водою," як використовується в цій заявці, має значення на даний момент відоме в цій галузі для цього терміну і стосується розчинників, що за використовуваних умов, змішуються з водою в достатньо широкому інтервалі концентрацій. Прикладами органічних розчинників, що змішуються з водою, які можуть бути використані при екстракції сполук винаходу є: нижчі спирти, наприклад (C₁-C₃) спирти, такі як метанол, етанол і пропанол; феніл (C₁-C₃) спирти, такі як бензиловий спирт; нижчі кетони, наприклад (C₃-C₄) кетони, такі як ацетон і етил метил кетон; циклічні етери, такі як діоксан і тетрагідрофуран; гліколи і їх продукти часткового етерифікування, такі як етиленгліколь, пропіленгліколь і монометилловий етер етиленгліколю, нижчі аміді, такі як диметилформамід і діетилформамід; оцтова кислота, диметилсульфоксид і ацетонітрил.

Виділення сполуки з надосадкової рідини ферментаційного бульйону продукуючих організмів проводять згідно з відомими методиками, що включають екстрагування розчинниками, осадження додаючи нерозчинники або зміна рН розчину, шляхом розподільчої хроматографії, розподільчої хроматографії з оберненою фазою, йонобмінної хроматографії, хроматографії молекулярного виключення і їм подібні або комбінацією двох або більше згаданих методик. Процедура виділення сполук винаходу з фільтрованого ферментаційного бульйону включає екстрагування антибіотика 107891 органічним розчинником, що незмішується з водою, з наступним осадженням з концентрованого екстракту, можливо з додаванням осаджуючого агента.

Також в цьому випадку, термін "розчинник, що не змішується з водою" як використовується в цій заявці, має значення на даний момент відоме в цій галузі для цього терміну і стосується розчинників, що за використовуваних умов, слабо змішуються або практично не змішуються з водою в достатньо широкому інтервалі концентрацій, придатний для плануемого застосування.

Прикладами органічних розчинників, що не змішуються з водою, які можуть бути використані при екстракції сполук винаходу з ферментаційного бульйону є:

спирти з, принаймні, чотирма атомами вуглецю, які можуть бути лінійними, розгалуженими або циклічними, такими як н-бутанол, 1-пентанол, 2-пентанол, 3-пентанол, 1-гексанол, 2-гексанол, 3-гексанол, 3,3-диметил-1-бутанол, 4-метил-1-пентанол, 3-метил-1-пентанол, 2,2-диметил-3-пентанол, 2,4-диметил-3-пентанол, 4,4-диметил-2-

пентанол, 5-метил-2-гексанол, 1-гептанол, 2-гептанол, 5-метил-1-гексанол, 2-етил-1-гексанол, 2-метил-3-гексанол, 1-октанол, 2-октанол, циклопентанол, 2-циклопентилетанол, 3-циклопентил-1-пропанол, циклогексанол, циклогептанол, циклооктанол, 2,3-диметил-циклогексанол, 4-етилциклогексанол, циклооктилметанол, 6-метил-5-гептен-2-ол, 1-нонанол, 2-нонанол, 1-деканол, 2-деканол і 3-деканол; кетони з принаймні п'ятьма атомами вуглецю, такі як метилізопропілкетон, метилізобутилкетон, метил-н-амілкетон, метилізоамілкетон і їх суміші.

Як відомо в цій галузі, продукт екстракції з фільтрованого ферментаційного бульйону можна покращити шляхом доведення рН до прийнятного значення і/або шляхом додавання певної органічної солі, що утворює іонну пару з антибіотиком, який є розчинним в екстракційному розчиннику.

Як відомо в цій галузі, розділення фаз можна покращити шляхом насичення водної фази сіллю.

Після екстракції, органічну фазу, що містить значні кількості води, відновлюють, і це можна без проблем здійснити шляхом азеотропної відгонки від неї води. Загалом, це потребує додавання розчинника здатного утворювати мінімальні азеотропні суміші з водою, з наступним додаванням осаджувача агента для осадження бажаного продукту, якщо необхідно. Типовими прикладами органічних розчинників здатних утворювати мінімальні азеотропні суміші з водою є: н-бутанол, бензол, толуол, бутиловий етер, тетрахлорид вуглецю, хлороформ, циклогексан, 2,5-диметилфуран, гексан і м-ксилен; переважним розчинником є н-бутанол.

Прикладами осаджувальних агентів є петролейний ефір, нижчі алкілові етери, такі як етиловий етер, пропіловий етер і бутиловий етер, і нижчі алкілові кетони, такі як ацетон.

Згідно з переважною методикою виділення антибіотика 107891, фільтрований ферментаційний бульйон може контактувати з адсорбційною матрицею з наступним елююванням полярним розчинником, що змішується з водою, або його сумішшю, концентруванням до маслянистого залишку при пониженому тиску і осадження осаджувальним агентом типу вже згаданого вище.

Прикладами адсорбційних матриць, що можуть бути легко використані при виділенні сполук винаходу, є полістирол або змішані полістирол-дівінілбензолні смоли (наприклад M112 або S112, Dow Chemical Co.; Amberlite® XAD2 або XAD4, Rohm & Haas; Diaion HP 20, Mitsubishi), акрилові смоли (наприклад XAD7 або XAD8, Rohm & Haas), поліаміди, такі як полікапролактами, найлони і поперечно зшиті полівінілпіролідони (наприклад Poliamide-CC 6, Poliamide-SC 6, Poliamide-CC 6.6, Poliamide-CC 6AC і Poliamide-SC 6AC, Macherey-Nagel & Co., Germany; Pa. 400, M. Woelm AG, Germany); і полівінілпіролідонні смоли PVP-CL, (Aldrich Chemie GmbH & Co., KG, Germany) і поперечно-зшиті мембрани з контрольованим розміром пор (наприклад Sephadex® LH-20, Pharmacia Fine Chemicals, AB). Переважно, використовуються полістиролові смоли, особливо переважно є смола Diaion HP 20.

У випадку полістиролових смол, полістирол-дівінілбензолних смол, поліамідних смол або акрилових смол, переважним елюентом є розчинник, що змішується з водою, або його водні суміші. Водні суміші можуть містити буфери із прийнятним значенням рН.

Також в цьому випадку, термін "розчинник, що змішується з водою", як використовується в цьому описі і пунктах формули винаходу, має значення на даний момент відоме в цій галузі для цього терміну, як описано вище.

Наступні методики виділення і очищення антибіотика можуть бути проведені на об'єднаних екстрактах з бульйону надосадкової рідини і з міцелію. Наприклад, коли частина антибіотика, що міститься у фільтрованому ферментаційному бульйоні або надосадковій рідині, виділяють шляхом абсорбування на абсорбційній смолі і частину антибіотика, що міститься в міцелії, екстрагують з нього використовуючи розчинник, що змішується з водою, з наступним адсорбуванням на абсорбційній смолі, елюювальні фракції з кожної з двох стадій абсорбції можна об'єднати, необов'язково після концентрування, і потім ще обробити як єдине ціле. Альтернативно, коли використовували дві порції абсорбційної смоли для окремих стадій розділення є такими ж самими і мають ті ж самі функціональні характеристики, вони можуть бути об'єднані разом і суміш можна піддати спільному елююванню, наприклад, розчинником, що змішується з водою, або його сумішшю з водою.

В будь-якому випадку, використовують будь-яку методику адаптовану для виділення неочищеного антибіотика 107891, з наступною стадією очищення суміші неочищених матеріалів одержаних після комбінування продуктів виділених з окремих стадій екстракції.

Очищення неочищеного антибіотика 107891 можна проводити за будь-якою методикою відомою в цій галузі методикою, але переважно проводять за допомогою хроматографічних засобів. Прикладами цих хроматографічних методик є такі, що описані стосовно стадії виділення і включають також хроматографію на стаціонарних фазах, таких як силікагель, оксид алюмінію, активований силікат магнію та їм подібні або хроматографію з оберненою фазою на силанізованому силікагелі, що має різні функціоналізовані похідні і елюють розчинниками, що змішуються з водою, або водною сумішшю розчинників, що змішуються з водою, видів згаданих вище.

Наприклад, препаративну ВЕРХ хроматографію можна проводити використовуючи RP-8 або RP-18 як стаціонарну фазу і суміш буфер $\text{HCOONH}_4:\text{CH}_3\text{CN}$ як елюювальну систему.

Активні фракції, що виділяють на стадії очищення, об'єднують разом, концентрують у вакуумі, осаджують додаючи осаджувальний агент згаданого вище виду і сушать або ліофілізують за один або декілька циклів. У випадку продукту, що містить залишкові кількості форміату амонію або інших буферувальних солей, їх можна видалити шляхом абсорбування антибіотика 107891 на екстракційні колонці з твердою фазою, наприклад, на смолі колонки з оберненою фазою, такою як SPE

Superclean LCP18 Supelco (Bellefonte Pa., USA) з наступним промиванням дистильованою водою і елююванням прийнятною сумішшю водного розчинника, наприклад, етанол:вода. Антибіотик потім виділяють шляхом видалення елюювальних розчинників.

Відповідно, одержують суху рецептуру очищеного комплексного антибіотика 107891 як білий порошок.

Як зазвичай в цій галузі, стадії одержання також як і виділення, і очищення можна контролювати за допомогою різних аналітичних методик включаючи дослідження проти сприйнятливих мікроорганізмів, а аналітичний контроль використовуючи ВЕРХ або ВЕРХ поєднану з мас-спектрометрією.

Переважну аналітичну ВЕРХ проводять на пристрої Waters (Waters Chromathography, Milford, Mass.) спорядженому колонкою Waters Symmetry-shield RP8, 5μ (250×4,6мм), що елюють потоком із швидкістю 1мл/хв і при температурі 50°C.

Елюювання проводять за багатоступневою програмою: Час=0 (30% фаза В); Час=8хв. (30% Фаза В); Час=28хв. (40% фази В). Фазою А був ацетонітрил: 100мм буфер форміату амонію (рН: 5,0) 5:95 (об/об) і Фазою В був ацетонітрил. УФ детектор був на 282нм.

Витік з колонки розділяли у співвідношенні 5:95 і основну частину (приб. 950μл/хв.) подавали на фотодіодну матрицю детектора. Частину що залишилась 50μл/хв.подавали до ECI інтерфейсу іонної пастки мас-спектрометра Finnigan LCQ (Thermoquest, Finnigan MAT, San Jos Calif.).

Мас-спектрометричний аналіз проводили за наступних умов:

Умови введення зразка:

Газ носій (N₂) 60псі,

Допоміжний газ (N₂) 5псі;

Капілярний нагрівач 250°C;

Параметри напруги вводу зразка:

Полярність і позитивна, і негативна;

Напруга іонного розпилення +/-5кВ;

Капілярна напруга +/-19В;

Умови сканування: максимальний час іону 200мс;

Час іону 5мс;

Повне мікросканування 3;

Сегмент протягом 30хв., сканування позитивні (150-2000 m/z) і негативні (150-2000 m/z).

За цих аналітичних ВЕРХ умов Фактори А1 і А2 антибіотика 107891 мають час утримування 13,2хв. і 13,9хв., відповідно. За цієї ж самої ВЕРХ системи Фактор А2 Рамопланіну (L. Gastaldo, R. Ciabatti, F. Assi, E. Restelli, J. K. Kettenrinr, L. F. Zerilli, G. Roman, M. Denaro and B. Cavalleri, (1992): "Isolation, structure determination and biological activity of A-16686 Factors A1, A'2 і A'3 glycolipodepsipeptide antibiotics", J. Ind. Microbiol. 11: 13-18) елюється з часом утримування 7,5хв.

Фактори А1 та А2 антибіотика 107891 можна виділити з очищеного зразка комплексного антибіотика 107891 за допомогою препаративної ВЕРХ.

Фактор А1 відокремлювали і очищали на колонці Symmetry Prep. C₁₈ з очищеним комплексним антибіотиком 107891 розчиненим в ДМСО: мур-

шина кислота 95:5 (об/об) використовуючи 25 хвилинне елюювання лінійним градієнтом від 30% до 45% фази В при швидкості потоку 3,5мл.

Фазою В був ацетонітрил. Фазою А був 25мм буфер форміату амонію рН4,5: ацетонітрил 95:5 (об/об). Елюювальні фракції, що містять чистий Фактор А1 антибіотика 107891 об'єднували і концентрували у вакуумі. Залишковий розчин ліофілізували одержуючи чистий Фактор А1 як білий порошок.

Фактор А2 відокремлювали і очищали ізократичним елююванням на колонці Symmetry Prep. C₁₈ з очищеним комплексним антибіотиком 107891 розчиненим в суміші оцтова кислота:ацетонітрил:100мм буфер форміату амонію (рН4) 50:120:80 (об/об). Ізократичне елюювання проводили із швидкістю потоку 7мл суміші 100мм буфер форміату амонію рН4:ацетонітрил у співвідношенні 82,5:17,5 (об/об). Елюювальні фракції, що містять чистий Фактор А2 антибіотика 107891 об'єднували і концентрували у вакуумі. Залишковий розчин ліофілізували одержуючи чистий Фактор А2 як білий порошок.

Оскільки антибіотик 107891 і його фактори А1 і А2, як показало кислото/основне титрування в 2-метоксиетанолі (MCS):H₂O 12:3 (об/об), містять основну групу, вони здатні утворювати солі з придатними кислотами згідно із звичайними методиками і вони також можуть існувати у вигляді вільноосновної форми.

Антибіотик 107891 і його фактори А1 і А2, коли одержуються у вільноосновній формі, можуть бути перетворені з використанням кислоти у відповідні солі, які включають нетоксичні фармацевтично прийнятні солі. Придатними солями є такі солі, що утворюються при стандартній реакції і з органічними, і неорганічними кислотами, такими як, наприклад, хлорводнева, бромводнева, сірчана, фосфорна, оцтова, трифтороцтова, трихлороцтова, бурштинова, лимонна, аскорбінова, молочна, малеїнова, фумарова, пальмітинова, хоїнова, памойнова, слизева, глутамова, камфорова, глутарова, гліколева, фталева, винна, лауринова, стеаринова, саліцилова, метансульфонова, бензолсульфонова, сорбінова, пікринова, бензойна, циннамова і їм подібні кислоти. Адитивні солі антибіотика 107891 і його факторів А1 і А2 з кислотами можна одержати згідно із звичайними методиками, що зазвичай використовуються. Як приклад, антибіотик 107891, або його Фактор А1, або його Фактор А2, у вільноосновній формі, розчиняють у мінімальній кількості придатного розчинника, типово нижчого спирту, або суміші нижчий спирт/вода, і до одержаного розчину поступово додають стехіометричну кількість придатно вибраної кислоти і одержану сіль осаджують додаючи нерозчинник. Адитивну сіль, яка утворилась, виділяють фільтруванням або упарюванням розчинників.

Альтернативно, ці солі можна одержати в, по суті, безводній формі шляхом ліофілізації; в цьому випадку сіль антибіотика 107891, або його Фактор А1, або його Фактор А2 з легкою кислотою розчиняють в придатній кількості нелеткої кислоти. Розчин потім фільтрують видаляючи будь-які нероз-

чинні речовини і ліофілізують за один або декілька циклів.

Певну адитивну сіль можна одержати з розчину іншої солі антибіотика 107891, або його Фактора A1, або його Фактора A2, коли бажана сіль осаджується при додаванні прийнятного аніону.

Перетворення несольових сполук винаходу у відповідні адитивні солі і зворотний процес, тобто перетворення адитивної солі сполуки винаходу у несольову форму знаходиться в межах знань середнього спеціаліста в цій галузі і охоплюється представленим винаходом.

Утворення солей антибіотика 107891 і його факторів A1 і A2 може бути корисним з декількох причин, включаючи розділення, очищення згаданого антибіотика 107891 і його факторів A1 і A2 і їх застосування як терапевтичних агентів або промоторів росту тварин. Для терапевтичних цілей, зазвичай використовують фармацевтично прийнятні солі.

Термін "фармацевтично прийнятні солі" означає тут нетоксичні солі, які можна використати в терапії теплокровних тварин.

Комплексний антибіотик 107891, його фактори A1 і A2 і суміш згаданих Факторів в будь-якій пропорції можна вводити, як такі або в суміші з фармацевтично прийнятними носіями і також можна вводити у поєднанні з іншими антимікробними агентами, такими як пеніциліни, цефалоспорины, аміноглікозиди і глікопептиди.

Спільна терапія, таким чином включає послідовне, одночасне і окреме введення активної сполуки, за умови, що терапевтична дія агенту введення першим не зникає повністю, коли вводиться наступний.

Сполуки винаходу або їх фармацевтично прийнятні адитивні солі можуть бути сформульовані у формі придатній для парентерального, перорального або місцевого введення. Для внутрішньовенного введення при лікуванні будь-якої інфекції викликаній мікроорганізмом чутливим до антибіотику, використовується парентеральна рецептура, наприклад, у воді з прийнятним солюбілізуювальним агентом, таким як поліпропіленгліколь або диметилацетамід, і поверхнево-активним агентом (наприклад, поліоксетиленсорбіту моноолеат або поліетоксильована касторова олія) або циклодекстринами або фосфоліпідами, на основі рецептур в стерильній воді для ін'єктування. Рецептури для ін'єктування також можна одержати з прийнятним циклодекстрином.

Комплексний антибіотик 107891, його фактори A1 і A2 і суміш згаданих Факторів в будь-якій пропорції також може бути використана в придатній фармацевтичній формі, такі як капсула, таблетка або водна суспензія для перорального введення або використовуючи звичайні креми або желе для місцевого застосування. Окрім їх застосування як медикаментів при лікуванні людей і в ветеринарії, сполуки винаходу також можуть бути використані як промотори росту тварин. З цією ціллю, сполуку винаходу вводять перорально в придатній їжі. Обережне концентрування використовують тоді, коли необхідно одержати активний агент в кількості,

що ефективно промотує ріст, коли споживаються нормальні кількості їжі.

Додавання активної сполуки винаходу до їжі тварин переважно проводять шляхом одержання прийнятної суміші їжі, що містить активну сполуку в ефективній кількості і включення суміші в повний раціон. Альтернативно, проміжний концентрат або харчові добавки, що містять активний інгредієнт можна примішати до їжі. Шляхи одержання і введення таких харчових сумішей і повного раціону описуються в книгах (таких як "Applied Animal Nutrition", W.H. Freedman і CO., S. Francisco, U.S.A., 1969 або "Livestock Feeds and Feeding" 0 і B books, Corvallis, Ore., U.S.A., 1977).

Фізико-хімічні характеристики антибіотика 107891

А) Мас-спектрометрія:

В МС експериментах на приладі Thermofinnigan LCQ deca спорядженого електро-спрейджером, використовуючи калібрувальну суміш Thermofinnigan, антибіотик 107891 дає два двічипротонованих іонів з $m/z=1124$ і з $m/z=1116$, що відповідають найнижчому ізотопному складу комплексу Факторів A1 і A2, відповідно. Електро-спрей умови були наступними: Напруга розпилення: 4,7кВ; Капілярна температура: 220°C; Капілярна напруга: 3В; Вид введення 10μл/хв. Спектр знімали з 0,2мг/мл розчину в метанол/вода 80/20 (об/об) з трифтороцтовою кислотою 0,1% і він показаний на Фіг.1А (повносканований низькороздільний спектр) і 1В (масштабний високороздільний спектр).

Б) Інфрачервоний спектр антибіотика 107891 знімали в KBr використовуючи спектрометр Bruker FT-IR моделі IFS 48, що проявляє максимум абсорбції при (см⁻¹): 3263; 2929; 1661; 1533; 1402; 1114; 1026. інфрачервоний спектр показаний на Фіг.2. Смуги поглинання при 1631, 1596 і 1346 відповідають залишковим кількостям форміату амонію.

В) УФ спектр антибіотика 107891, знімали в метанол/H₂O (у співвідношенні 80:20) використовуючи спектрометр Perkin-Elmer Lambda 16, що має два плеча при 226 і 267нм. УФ спектр показаний на Фіг.3.

Г) ¹H-ЯМР спектр знімали в суміші метанол-d₄:H₂O (pH4,3 HCl) 40:10 (об/об) при 40°C на спектрометрі Bruker AMX 600 використовуючи водо-пригнічену послідовність. Як внутрішній стандарт використовується залишковий сигнал метанол-d₄ при 3,31м.ч..

¹H-ЯМР спектр антибіотика 107891 показаний на Фіг.4.

¹H ЯМР спектр антибіотика 107891 розчинений в метанол-d₄:H₂O (0,01N HCl) 40:10 (об/об) має наступні групи сигналів (в м.ч.) при 600МГц використовуючи MeOH-d₄ як внутрішній стандарт (3,31м.ч.), [δ=м.ч., мультиплетність; (віднесення)]: 0,93 д (CH₃), 0,98 д (CH₃), 1,07 т (перекривається CH₃'ми), 1,18 т (перекривається CH₃'и), 1,26 с (CH₃), 1,30 т (перекривається CH₃'и), 1,62-1,74 м (CH₂), 1,78 д (CH₃), 1,80 д (CH₃), 2,03 м (CH₂), 2,24 м (CH), 2,36 м (CH₂), 2,72-3,8 м (пептидні альфа CH'и), 3,8-5,2 м (пептидні альфа CH'и), 5,53-6,08 с (CH₂), 5,62 д (CH подвійний зв'язок), 6,42 м (CH), 6,92 д (CH подвійний зв'язок), 7,0-7,55 м (аромати-

чні СН'и), 7,62-10,4 д і м (ароматичні і пептидні NH'и).

Д) ^{13}C -ЯМР спектр знімали в суміш метанол- d_4 H_2O (рН4,3 HCl) 40:10 (об/об) при 40°C на спектрометрі Bruker AMX 600 використовуючи як внутрішній стандарт залишковий сигнал метанол- d_4 при 49,15м.ч.. ^{13}C -ЯМР спектр bb розщепленого антибіотика 107891 показаного на Фіг.5.

^{13}C ЯМР спектр антибіотика 107891 розчиненого в метанол- d_4 . H_2O (0,01N HCl) 40:10 (об/об) має наступні групи сигналів (в м.ч.) при 600МГц використовуючи MeOH-d_4 як внутрішній стандарт (49,15м.ч.), [δ =м.ч.; (віднесення)]: 13,6-23,2 (аліфатичні CH_3 'и), 26,16-73 (аліфатичні CH_2 'и і пептидні альфа СН'и), 105-136 (ароматичні і подвійні зв'язки СН'и і четвертинні вуглеці), 164,3-176,3 (пептидні карбоніли).

Е) Комплексний антибіотик 107891 розчинений в 2-метоксиетанолі (MCS): H_2O 12:3 (об/об) містить молярний надлишок 0,01M хлорводневої кислоти. Розчин потім піддавали титруванню розчином 0,01N гідроксиду калію. Одержана крива титрування показала присутність однієї основної групи, що іонізується.

Амінокислотний склад композиції антибіотика 107891 і його факторів A1 і A2

А) Визначення "кислотостійкості" амінокислот в комплексному антибіотику 107891

Антибіотик 107891 піддавали повному кислотному гідролізу (HCl 6N, 105°C, 24г) і ідентифікували амінокислотні компоненти антибіотика стійкі до кислоти. Кислотонестабільні амінокислоти не детектуються при цьому підході. Гідролізат досліджували за допомогою HPPX-МС і GX-МС аналізу, після придатного модифікування, у порівнянні із сумішшю стандартних амінокислот модифікованих подібним чином. Для ВЕРХ аналізу гідролізовані зразки обробляли 6-амінохіноліл-N-гідроксисукцинімідилкарбамат (набором реагенту AccQ-Tag™ Fluor), для GX аналізу використовуючи суміш 3N HCl в безводному метанолі і трифтороцтовому ангідриді.

Кількісний ВЕРХ аналіз проводили на рідинно-хроматографічній системі з одночасним DAD і МС детектуванням. ВЕРХ спосіб мав наступні умови:

Колонка AccQ-Tag™ (Waters C_{18} NovoPak 4μм 3,9×150мм)

Температура колонки: 37°C

Потік: 1мл/хв.

Фаза А: ацетат амонію 140мм рН5 (оцтова кислота)

Фаза В: вода:ацетонітрил 60:40 (об/об)

Програма елювання

Час (хв)	0	5	30	35	40	41
% В	5	5	80	95	95	5

УФ детектування: 254nm

МС умови були наступними:

Спектрометр: Finnigan LCQ Deca споряджений стандартним джерелом електророзпилення.

Капілярна температура: 250°C.

Напруга джерела: 4,70кВ

Струм джерела: 80μА

Капілярна напруга: -15В

Кількісний GX аналіз проводили на газовому хроматографі спорядженому МС-EI детектуванням.

GX проводили за наступних умов:

Колонка: J & W Scientific DB-5, 30м×0,254мм

ВД×0,25μм FT

Газ носій: гелій

Спосіб ін'єктування: без розділення

Температура ін'єктора: 200°C.

Температура автоматичної лінії: 300°C.

Температурна програма: від 50°C до 100°C при 2,5°C/хв. (10хв.), від 100°C до 250°C при 10°C/хв. (15хв.), 15хв. при 250°C.

Об'єм ін'єктування: 1μл

МС умови були наступними:

Спектрометр: Finnigan TSQ700

Спосіб іонізації: електронний удар

Прикладена напруга:

Струм розжарювання: 400mA

Вторинно-електронний примножувач: 1400В

Електронна енергія: 70eV

Спосіб позитивного іону

Умови сканування:

Інтервал сканування: 40-650аом

Час сканування: 1сек

В РХ/МС і GX/МС хроматограми одержували на гідролізаті антибіотика 107891, наступні амінокислоти ідентифікували поряд з іншими неідентифікованими піками: лантронін, метиллантронін, гліцин, пролін, валін, аспарагінова кислота (ЯМР дослідження показали, що вона є продуктом трансформації аспарагіну, який утворює аспарагінову кислоту при гідролізі), фенілаланін і лейцин.

Фактори A1 і A2 антибіотика 107891 піддавали повному кислотному гідролізу за тих же самих умов (модифікування і HPPX-МС), що були показані для комплексу. GX-МС аналіз проводили на пристрої Thermo Finnigan Trace GX-МС спорядженому ін'єктором PTV.

GX проводили за наступних умов:

Колонка: Restek RTX-5MC, 15м×0,25мм

ВД×0,25μм FT

Газ носій: гелій

Температура обладнання: 250°C.

Температурна програма: 1,5хв. при 50°C, від 50°C до 100°C при 20°C/хв., 1хв. при 100°C, від 100°C до 135°C при 20°C/хв., 1хв. при 135°C, від 135°C до 250° при 20°C/хв., 1хв. при 250°C.

Об'єм ін'єктування: 1μл

Ін'єктор. без розділення, базова температура 50°C, температура переходу 280°C, швидкість переходу 14,5°C/хв.

МС умови були наступними:

Спосіб іонізації: електронний удар

Прикладена напруга:

Струм розжарювання: 129μА

Вторинно-електронний примножувач: 200В

Електронна енергія. 70eV

Спосіб позитивного іону

Умови сканування:

Інтервал сканування: 33-500аом

Час сканування: 0,6сек

В гідролізаті Фактора A1 антибіотика 107891, ВЕРХ/МС і GX/МС хроматограми показали присутність наступних амінокислот поряд з іншими не-

ідентифікованими піками: лантіонін, метиллантіонін, гліцин, пролін, валін, аспарагінова кислота (ЯМР дослідження показали, що вона є продуктом трансформації аспарагіну, який утворює аспарагінову кислоту при гідролізі), фенілаланін і лейцин.

Проведення описаної вище процедури на Факторі А2 показало присутність наступних амінокислот поряд з іншими неідентифікованими піками: лантіонін, метиллантіонін, гліцин, пролін, валін, аспарагінова кислота (ЯМР дослідження показали, що вона є продуктом трансформації аспарагіну, який утворює аспарагінову кислоту при гідролізі), фенілаланін і лейцин.

Б) Визначення 5-хлортриптофану в комплексному антибіотику 107891 і в його Факторі А1 і Факторі А2.

Повний гідроліз очищеного комплексу 107891 і його окремих Факторів А1 і А2 проводили згідно із способом описаним Simpson R J, Neuberger M R, Liu T Y, "Complete Aminoacid Analysis of Proteins from a Single Hydrolysate". Journal Biol. Chem (United States), Apr. 10, 1976, 251 (7), 1936-40.

Ця методика гідролізу попереджає деградацію амінокислот нестабільних до дії мінеральних кислот і таким чином дозволяє визначити ці амінокислоти, включаючи триптофан, в гідролізаті пептиду. Стандартний зразок 5-хлор-DL-триптофану одержували від Biosynt AG, Staad, Switzerland і його структуру підтверджували ЯМР аналізом; DL-триптофан одержували від Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Фактор А1 (1,5мг) суспендували в 0,6мл 4N метансульфонової кислоти, що містить 0,2% (ваг./об.) 3-(2-аміноетил)індолу, як каталізатор гідролізу. Гідроліз проводили при 115°C протягом 16 годин. Гідролізат нейтралізували 5N NaOH і розводили еквівалентною кількістю води. 100μл цього розчину аналізували за допомогою РХ-МС. Розділення проводили на колонці Symmetry C₁₈ (5μм) 4,6×250мм (Waters Co. Milford Mass., USA) спорядженій преколонкою Symmetry C₁₈ (5μм) 3,9×20мм. Елюювання проводили при швидкості потоку 1мл/хв. з 25хв. лінійним градієнтом від 0% до 50% фази В. Фазаю А був 25мм HCOONH₄ буфер рН4,5; CH₃CN 95:5 (об/об) і Фазаю В був CH₃CN. УФ детектування проводили при 280нм. ВЕРХ устаткування сполучали з іонною пасткою мас-спектрометра Finnigan LCQ (Thermoquest, Finnigan MAT, San Jos, Calif., USA). 50μл/хв. потоки з колонки відводили до електроспрей іонізації (ESI) мас-спектрометра LCQ. МС аналіз проводили за наступних умов: ввід зразка: газ носій (N₂) 60псі; капілярний нагрівач 210°C; полярність напруги вводу зразка: і позитивна, і негативна; іонна напруга розпилення +/-4,5кВ; капілярна напруга +/-21В; умови сканування: максимальний час іону 50мс; повний мікро: сканування 3.

Стандарти триптофану і 5-хлортриптофану елюювали з часом утримування 8,1 хвилин і 11,5 хвилин, що відповідає M+H⁺ із m/z 205 і 239, відповідно. В гідролізаті Фактора А1 антибіотика 107891 присутній пік на 11,5 хвилини із m/z 238,97, що вказує на присутність 5-хлор-триптофану.

Стандарт триптофану детектували використовуючи хроматографічну систему з межею детекту-

вання 0,3μг/мл. Це значення є нижчим, ніж значення, яке виявляється в присутності згаданої амінокислоти в зразку антибіотику, що тестується. Детектували відсутність триптофану вище згаданої межі в хроматограмі гідролізату Фактора А1 антибіотика 107891. Ідентичні результати були одержані з РХ-МС аналізу гідролізату Фактора А2 і гідролізату очищеного зразка комплексного антибіотика 107891.

Мас-спектрометрія фактора А1 і фактора А2 антибіотика 107891

Фактор А1 антибіотика 107891 дає двічі протонований іон з m/z=1124 і Фактор А2 з m/z 1116, що відповідає найнижчому ізотопному складу в МС експериментах на приладі Thermofinnigan LCQ деса спорядженому джерелом електророзпилення, використовуючи калібраційну суміш Thermofinnigan. Умови електророзпилення були наступними: Напруга розпилення: 4,7кВ; Капілярна температура: 250°C; Капілярна напруга: 8В; Вид введення 10μл/хв. Спектр знімали з 0,1мг/мл розчину в ацетонітрил:вода 50:50 (об/об) з оцтовою кислотою 0,5% і він показаний на Фіг.6А (повносканований низькороздільний спектр) і 6В (масштабний високороздільний спектр) і на Фіг.7А (повносканований низькороздільний спектр) і В (масштабний високороздільний спектр).

Точну масу Фактора А1 і Фактора А2 антибіотик визначали використовуючи спектрометр Bruker Daltonics APEX II, 4.7 Tesla споряджений джерелом електророзпилення. На базі цих даних, Фактор А1 має молекулярну вагу 2246,71 ±0,06, розраховану моноізотопну масу з [M+2H]²⁺ з m/z 1124,36124 (точність 30м.ч.), визначену за допомогою високороздільної ESI-МСФП. Фактор А2 має молекулярну вагу 2230,71±0,06, розраховану моноізотопну масу з [M+2H]²⁺ з m/z 1116,36260 (точність 30м.ч.), визначену за допомогою високороздільної ESI-МСФП.

Порівняння фактора А1 і фактора А2 антибіотика 107891 з антибіотиками MF-BA-1768_{α1} і MF-BA-1768_{β1}

А) Microbispora corallina NNRL 30420 (MF-BA-1768), описаний в патенті US №6,551,591 В1, одержували з NNRL колекції. В дослідницьких експериментах, штам M. corallina NNRL 30420 (MF-BA-1768) ферментували в колбі Ерленмейєра за умов описаних в патенті US №6,551,591 В1. Зібраний матеріал екстрагували розведеним метанолом. Після центрифугування міцелію, надосадкову рідину переносили на HP20 полістирольну абсорбційну смолу, елюювали сумішшю метанол:вода 70:30, яку упарювали до маленького об'єму і потім ліофілізували.

В хроматограмі присутні два піки 1091 і 1108 [M+2H]²⁺ сигналів, що відповідають [M+2H]²⁺ показаним в патенті US №6,551,581 В1 для MF-BA-1768_{β1} і MF-BA-1768_{α1}, відповідно. Згаданий вище екстракт збагачували Факторами А1 і А2 антибіотика 107891 і суміш аналізували за допомогою РХ-МС. Піки антибіотиків MF-BA-1768_{β1} і MF-BA-1768_{α1} і Факторів А1 і А2 антибіотику 107891 встановлювали по певному часу утримування і певним [M+2H]²⁺ МС фрагментам.

Б) В наступному експерименті, в 30л ферментаційному танку ферментували *Microbispora* sp штамму NRRL 30420 (MF-BA-1768) і збирали матеріали згідно з описом патенту US №6,551,591 B1. Після послідовних стадій очищення на полістиролової смоли HP20 і поліамідній смоли CC 6 0,1-0,3мм (Macherey-Nagel), одержували дві окремі речовини в чистій формі використовуючи препаративну ВЕРХ на часточках розміру μ 10 колонки C₁₈ Phenomenex (Torrance Calif., USA) Luna (250×12,2мм), яку елюювали із швидкістю потоку 27мл/хв. з наступною багатостадійною програмою:

Час=0хв. (32% фази В); Час=8хв. (32% фази В); Час=20хв. (36% фази В), Час=32хв. (90% Фаза В). Фазою А була мурашина кислота 0,05% (об/об) у воді, Фазою В був CH₃CN

Ці речовини показали антибактеріальну активність проти стафілококів і ентерококів, як показано в Таблиці IV. В РХ-МС експериментах дві речовини показали [M+2H]²⁺ сигнали двічі протонуваних іонів, що відповідають антибіотику MF-BA-1768_{α1} і MF-BA-1768_{β1}, як описано в патенті US №6,551,591 B1.

Таблиця IV

Штам	MIC (цг/мл)		107891 A1	107891 A2	107891 комплекс
	MF-BA-1768 _{α1}	MF-BA-1768 _{β1}			
1400 <i>Staphylococcus aureus</i> кл.ізол. Met r	0,13	0,5	0,13	0,13	0,13
568 <i>Enterococcus faecium</i> кл.ізол	4	16	1	2	2
569 <i>Enterococcus faecium</i> кл.ізол. Van A	4	8	1	2	2
559 <i>Enterococcus faecalis</i> кл.ізол.	4	8	1	2	1
560 <i>Enterococcus faecalis</i> кл.ізол. Van A	4	8	0,5	1	0,5

Експериментальні умови антимікробних тестів були такими ж самими, як ті що використовуються для тестів показаних в Таблиці VI, нижче.

РХ-МС аналізи виділених антибіотиків MF-BA-1768_{α1} і MF-BA-1768_{β1} проводили на колонці Symmetry C₁₈ (5μм 4,6×250мм (Waters Co. Milford Mass., USA) спорядженій преколонкою Symmetry C₁₈ (5μм) 3,9×20мм (обидві витримували у печі при температурі 50°C). Елюювання проводили при швидкості потоку 1мл/хв. з наступною багатостадійною програмою елюювання: Час=0хв. (30% Фази В); Час=8хв. (30% Фази В); Час=20хв. (45% Фази В); Час=24хв. (90% Фази В) і Час=28хв. (90% Фази В). Фазою А був 25мм HCOONH₄ буфер рН4,5:CH₃CN 95:5 (об/об) і фазою В був CH₃CN. ВЕРХ устаткування сполучали з іонною пасткою мас-спектрометра Finnigan LCQ (Thermoquest, Finnigan MAT, San Jose, Calif., USA). 100μл/хв. потоки з колонки відводили до елеткроспрей іонізації (ESI) мас-спектрометра LCQ. МС аналіз проводили за наступних умов: ввід зразка: потік газу носія (N₂) 25псі; потік допоміжного газу 5псі; капілярний нагрівач 210°C; полярність напруги вводу зразка: і позитивна, і негативна; іонна напруга розпилення +/-4,5кВ; капілярна напруга +/-12В; умови сканування: максимальний час іону 50мс; повний мікро: сканування 3.

Індивідуальні антибіотики MF-BA-1768_{α1} і MF-BA-1768_{β1} і Фактори А1 і А2 антибіотика 107891 аналізували індивідуально і в суміші. Результати зводили в наступну Таблицю V.

Таблиця V

	Час утримування (хв.)	[M+2H] ²⁺
MF-BA-1768 _{β1}	12,86	1091
Антибіотик 107891 А1	16,3	1124
Антибіотик 107891 А2	16,81	1116
MF-BA-1768 _{α1}	18,1	1108

В такий же самій хроматографічній системі Фактор А2 рамопланіну (L. Gastaldo, R. Ciabatti, F. Assi, E. Restelli, J. K. Kettenrinn, L. F. Zerilli, G. Roman, M. Denaro and B. Cavalleri, (1992): "Isolation, structure determination and biological activity of A-16686 Factors A1, A'2 і A'3 glycolipodepsipeptide antibiotics", J. Ind. Microbiol. 11: 13-18) елюювали з часом утримування 11,00хв.

ЯМР спектроскопія факторів А1 і факторів А2 антибіотика 107891

¹H-ЯМР спектр Фактора А1 і Фактора А2 антибіотика 107891 знімали в суміші CD₃CN:D₂O (1:1) при 298 К на спектрометрі Bruker AMX 600 використовуючи водопригнічену послідовність. Як внутрішній стандарт розглядали залишковий сигнал ацетонітрил-d₃ з 1,94м.ч..

А) ¹H-ЯМР спектр Фактора А1 антибіотика 107891 показаний на Фіг.8.

¹H ЯМР спектр Фактора А1 антибіотика 107891, розчиненого в CD₃CN:D₂O (1:1), має наступні групи сигналів (в м.ч.) при 600МГц використовуючи CD₃CN як внутрішній стандарт (1,94м.ч.), [δм.ч. ., мультиплетність; (віднесення)]: 0,84 д (CH₃), 0,89 д (CH₃), 0,94 т (перекривається CH₃'и), 1,1 д (CH₃), 1,13 д (CH₃), 1,15 т (перекривається CH₃'и), 1,49 м (CH₂), 1,69 д (CH₃), 1,75 м (CH₂), 2,11 м (CH), 2,26 м (CH), 2,5 м (CH₂), 2,68-3,8 м (пептидні CH_β'и), 3,8-5,0 м (пептидні CH_α'и), 5,45-6,17 с (CH₂), 5,58 д (CH подвійного зв'язку), 6,36 м (CH), 6,86 д (CH подвійного зв'язку), 7,0-7,45 м (ароматичні CH'и). Сигнал диметилсульфоксиду присутній при 2,58м.ч. і сигнал форміату також присутній при 8,33м.ч., як домішки.

Б) ¹H ЯМР спектр bb розщепленого Фактора А2 антибіотика 107891 показаний на Фіг.9.

¹H ЯМР спектр Фактора А2 антибіотика 107891, розчиненого в CD₃CN:D₂O (1:1), має наступні групи сигналів (в м.ч.) при 600МГц використовуючи CD₃CN як внутрішній стандарт (1,94м.ч.), [δм.ч. ., мультиплетність; (віднесення)]: 0,84 д

(CH₃), 0,88 д (CH₃), 0,94 д (CH₃), 1,06 д (CH₃), 1,14 д (CH₃), 148 м (CH₂), 1,65-1,75 м (CH₂), 1,67 д (CH₃), 2,15 м (CH), 2,25 м (CH), 2,5 м (CH₂), 2,77-3,8 м (пептидні CH_β'и), 3,8-4,9 м (пептидні CH_β'и), 5,45-6,14 с (CH₂), 5,59 д (CH подвійного зв'язку), 6,34 м (CH), 6,84 д (CH подвійного зв'язку), 7,0-7,42 м (ароматичні CH'и). Сигнал диметилсульфоксиду присутній при 2,58м.ч. і сигнал форміату також присутній при 8,32м.ч., як домішки.

¹³C-ЯМР спектр Фактора А1 і Фактора А2 антибіотика 107891 знімали в суміші CD₃CN:D₂O (1:1) при 298 К спектрометрі Bruker AMX 600 використовуючи як внутрішній стандарт залишковий сигнал ацетопонітрилу-d₃ при 1,39м.ч..

В) ¹³C-ЯМР спектр Фактора А1 антибіотика 107891 показаний на Фіг.10. ¹³C ЯМР спектр Фактора А1 антибіотика 107891, розчиненого в CD₃CN:D₂O (1:1), має наступні групи сигналів (в м.ч.) при 600МГц використовуючи CD₃CN як внутрішній стандарт (1,39м.ч.), [δ=м.ч.; (віднесення)]: 13,6-23,03 (аліфатичні CH₃'и), 25,69-77,9 (аліфатичні CH₂'и і пептидні CH_β'и), 105-137,3 (ароматичні і подвійні зв'язки CH'и і четвертинні вуглеці), 165,6-176,6 (пептидні карбоніли)

Г) ¹³C-ЯМР спектр бб розщепленого Фактора А2 антибіотика 107891 показаний на Фіг.11.

¹³C-ЯМР спектр Фактора А2 антибіотика 107891, розчиненого в CD₃CN:D₂O (1:1), має наступні групи сигналів (в м.ч.) при 600МГц використовуючи CD₃CN як внутрішній стандарт (1,39м.ч.), [δ=м.ч.; (віднесення)]: 13,6-22,9 (аліфатичні CH₃'и),

25,65-73 (аліфатичні CH₂'и і пептидні CH_β'и), 105-137,3 (ароматичні CH'и і CH'и подвійних зв'язків і четвертинні вуглеці), 165,7-176,1 (пептидні карбоніли).

УФ і ІЧ спектр фактора А1 і фактора А2 антибіотика 107891

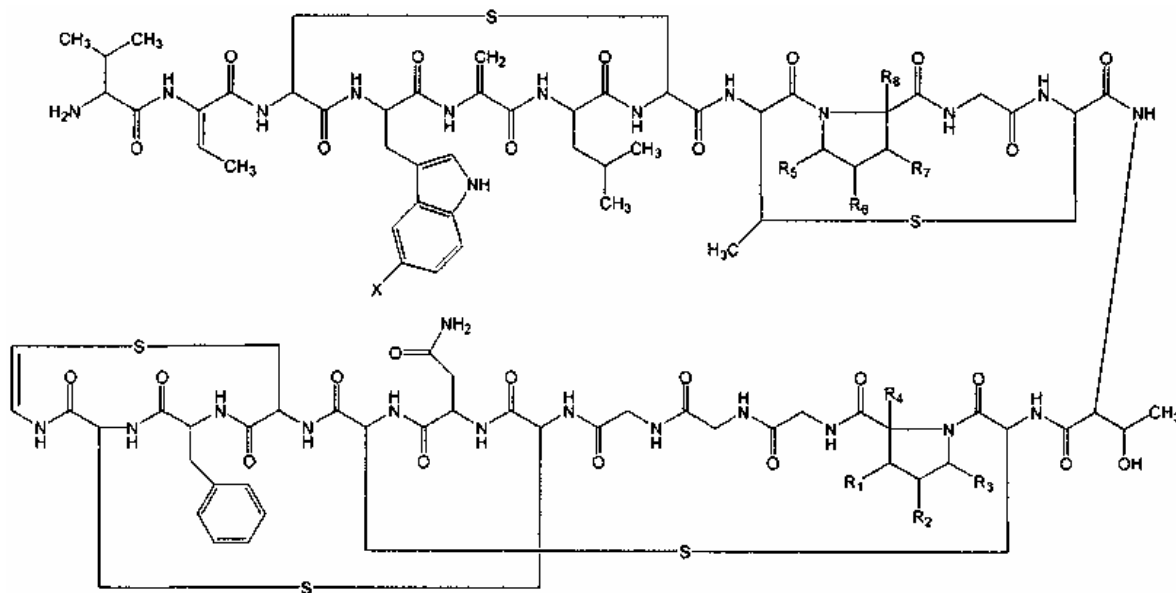
А) Інфрачервоний спектр Фактора А1 антибіотика 107891, що знімали в КВг використовуючи спектрофотометр Bruker FT-IR моделі IFS 48, має максимум абсорбції при (см⁻¹): 3294; 3059; 2926; 1661; 1529; 1433; 1407; 1287; 1114; 1021. Інфрачервоний спектр показаний на Фіг.12.

Б) УФ спектр Фактора А1 антибіотика 107891, що знімали в метанол:H₂O 80:20 (об/об) використовуючи спектрофотометр Perkin-Elmer Lambda 16, має два плеча при 226 і 267нм. УФ спектр показаний на Фіг.13.

В) Інфрачервоний спектр Фактора А2 антибіотика 107891, що знімали в КВг використовуючи спектрофотометр Bruker FT-IR моделі IFS 48, має максимум абсорбції при (см⁻¹): 3296; 3060; 2928; 1661; 1529; 1433; 1407; 1288; 1116. Інфрачервоний спектр показаний на Фіг.14.

Г) УФ спектр Фактора А2 антибіотика 107891, що знімали в метанол:H₂O 80:20 (об/об) використовуючи спектрофотометр Perkin-Elmer Lambda 16, має два плеча при 226 і 267нм. УФ спектр показаний на Фіг.15.

На основі фізико-хімічних даних приведених вище, для антибіотика 107891 була запропонована наступна структура



де X є галоген (F, Cl, Br, I) і де R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ і R₈ можуть незалежно бути H, OH, алкіл (розгалужений або нерозгалужений, заміщений або незаміщений) або арил (заміщений або незаміщений)

В альтернативному втіленні, R₁, R₂, R₃ і R₄ може бути H або OH. Тому, можливими комбінаціями R₁, R₂, R₃ і R₄ є наступні.

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
H	H	H	H
OH	H	H	H
H	OH	H	H
H	H	OH	H
H	H	H	OH
OH	OH	H	H
OH	H	OH	H
OH	H	H	OH
H	OH	OH	H

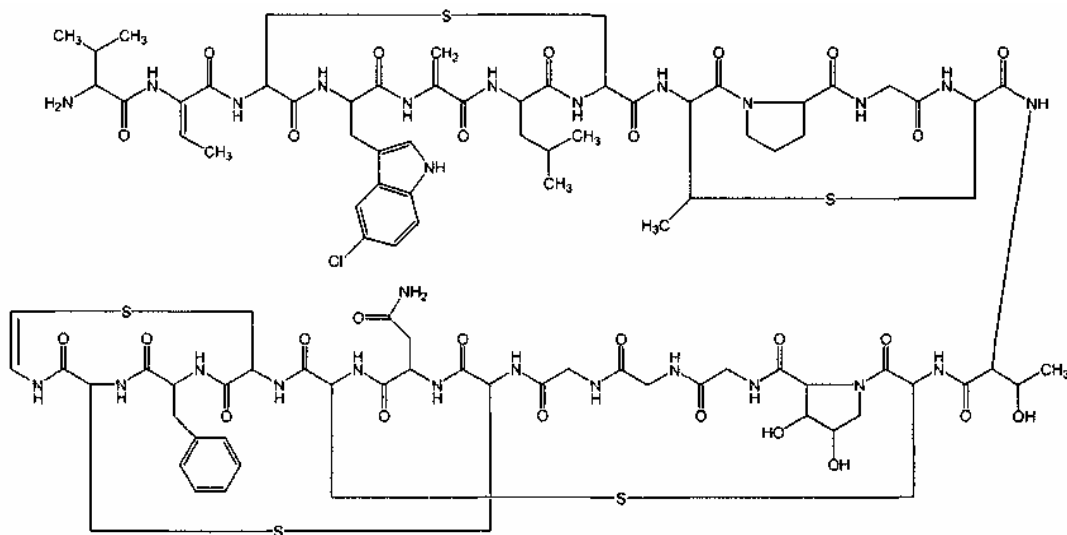
H	H	OH	OH
H	OH	H	OH
OH	OH	OH	H
OH	OH	H	OH
OH	H	OH	OH
H	OH	OH	OH
OH	OH	OH	OH

Аналогічно, R₆, R₆, R₇ і R₈ можуть бути H або OH. Тому, можливими комбінаціями R₅, R₆, R₇ і R₈ є наступні.

R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
H	H	H	H
OH	H	H	H
H	OH	H	H
H	H	OH	H
H	H	H	OH

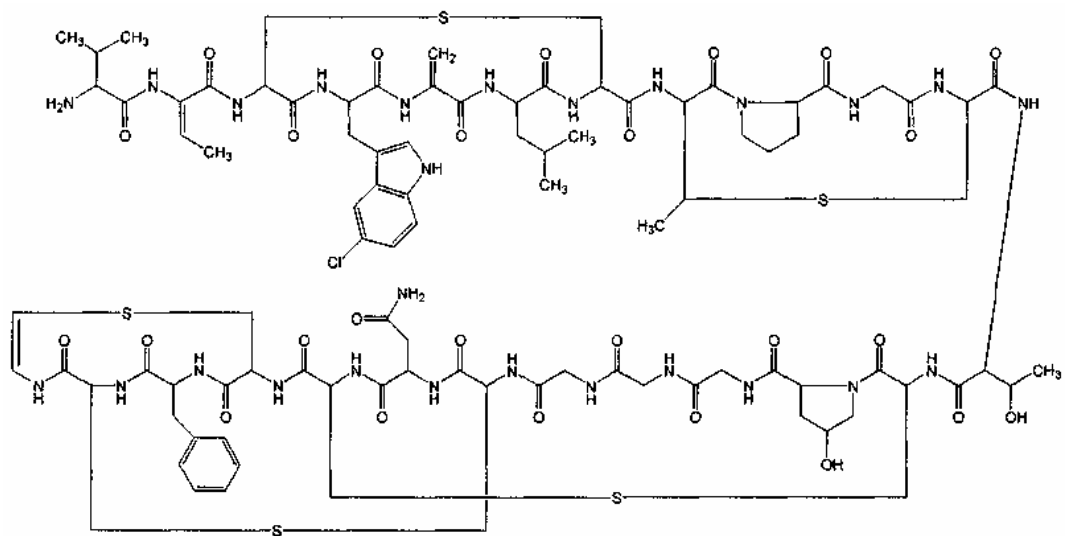
OH	OH	H	H
OH	H	OH	H
OH	H	H	OH
H	OH	OH	H
H	H	OH	OH
H	OH	H	OH
OH	OH	OH	H
OH	OH	H	OH
OH	H	OH	OH
H	OH	OH	OH
OH	OH	OH	OH

Однак, на фізико-хімічних даних приведених вище, для антибіотика Фактора A1 107891 була запропонована наступна структура, в якій X є Cl, R₁ є H, R₂ є OH, R₃ є H і R₄, R₅, R₆, R₇ і R₈ є H, які є переважним втіленням винаходу разом з її фармацевтично прийнятними солями:



Крім того, на фізико-хімічних даних приведених вище, для антибіотика Фактора A2 107891 була запропонована наступна структура, в якій X є

Cl, R₁ є OH, R₂ є OH, R₃ є H і R₄, R₅, R₆, R₇ і R₈ є H, які є переважним втіленням винаходу разом з її фармацевтично прийнятними солями:



In vitro біологічна активність антибіотика 107891

Антимікробну активність антибіотика 107891 визначали за допомогою мікромодуляції бульйону згідно з рекомендаціями Національного комітету з клінічних лабораторних стандартів (NCCLS, документ M7-A5).

Використовувані штами були клінічно виділено або одержано від Американської колекції типів культур (ATCC). Результати тестів показані в Таблиці VI і Таблиці VII.

Антибіотик 107891 розчиняли в ДМСО з одержанням 1000µг/мл готового розчину і потім розводили водою до одержання робочого розчину. Використовувані середовищем був катіондоповнений бульйон Мюллера Хінтона (CAMHB) для *Staphylococci*, *M. catarrhalis*, *Enterococci* і *L. monocytogenes*; бульйон Тодда Хевітта (THV) для *Streptococci*; GC середовище +1% Ізовіталекс +1% хаемін для *Neisseria* spp.; подова настоянка мозку +1% С доповнена для *H. influenzae*; бульйон *Lactobacillus* для *Lactobacilli*; Middlebrook 7H9 збагачений Middlebrook OADC для *M. smegmatis*; RPMI 1640 середовище для *C. albicans*. Бульйон Вілкінса Чалгрена +оксираза (1:25об./об.) для *Clostridia*; бульйон Бруцелла, що містить цистеїн (0,5г/л), для *Propionibacteria*. Інокула для бактерій складала 10^5 CFU/мл. *C. albicans* інокулювали 1×10^4 CFU/мл. Всі тести проводили в присутності 0,02% сироватки альбуміну теляти (CAT). Культури інкубували при 35°C на повітрі, за винятком штамів *Clostridia* і *Propionibacteria*, яким необхідна анаеробна атмосфера. Через 18-24 години проводили візуальну оцінку і визначали MIC. MIC означає найнижчу концентрацію антибіотика при якій не спостерігається ріст.

Таблиця VI

Протимікробна активність антибіотика 107891

Мікроорганізм		MIC (µг/мл) 107891
119	<i>Staph. aureus</i> Smith ATCC19636	≤0,13
4061	<i>Staph. aureus</i> LIM1	≤0,13
3798	<i>Staph. aureus</i> клін. ізолят VISA	2
1400	<i>Staph. aureus</i> клін. ізолят Met-R	≤0,13
613	<i>Staph. aureus</i> клін. ізолят Met-R	≤0,13
3797	<i>Staph. aureus</i> клін. ізолят VISA Me	2
4064	<i>Staph. aureus</i> LIM2 CHSA Met-R	0,5
1729	<i>Staph. haemolyticus</i> Met-R	8
1730	Met-S	2
147	<i>Staph. epidermidis</i> ATCC 12228	≤0,13
1139		4
44	<i>Strept. pneumoniae</i> Pen-S	≤0,13
2868	Peo-I	≤0,13
49	<i>Strept. pyogenes</i>	≤0,13
559	<i>Ent. faecalis</i> Van-S	1
560	<i>Ent. faecalis</i> Van-A	0,5
A533	<i>Ent. faecalis</i> Van-A	1
568	<i>Ent. faecium</i> Van-S	2
569	<i>Ent. faecium</i> Van-A	1

B518	<i>Ent. faecium</i> Van-A	2
A6345	<i>Ent. faecium</i> Van-A Lnz-R	4
3754	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	32
134	<i>Listeria garviae</i>	≤0,13
148	<i>Listeria delbruechii</i> ATCC47927	4
1450	<i>Listeria monocytogenes</i>	0,125
833	<i>Haemophilus influenzae</i>	32
920	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC19418	32
3924	<i>Moraxella catharralis</i> <i>Moraxella</i>	1
16	<i>catharralis</i> ATCC8176	0,25
1613	<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13090	0,5
997	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0,25
47	<i>Escherichia coli</i>	>128
145	<i>Candida albicans</i>	>128

Таблиця VII

Протимікробна активність антибіотика 107891 проти анаеробних бактерій

Мікроорганізм	MIC (µг/мл)
	Анти- біотик 107891
ATCC 27520 <i>Propionibacterium limphophilum</i>	0,015
ATCC 25564 <i>Propionibacterium granulosum</i>	0,03
ATCC 14157 <i>Propionibacterium proptonicus</i>	4
P9 <i>Propionibacterium acnes</i>	0,125
1329 <i>Propionibacterium acnes</i>	0,5
ATCC 25746 <i>Propionibacterium acnes</i>	0,015
ATCC 6919 <i>Propionibacterium acnes</i>	0,125
ATCC 6922 <i>Propionibacterium acnes</i>	≤0,0039
ATCC 1348 <i>Propionibacterium acnes</i>	0,25
4018 <i>Clostridium difficile</i>	≤0,125
4025 <i>Clostridium difficile</i>	≤0,125
4022 <i>Clostridium difficile</i>	≤0,125
4032 <i>Clostridium perfringens</i>	≤0,125
4043 <i>Clostridium butyricum</i>	≤0,125
4009 <i>Clostridium beiferinchii</i>	≤0,125
4052 <i>Clostridium septicum</i>	≤0,125
60601 <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	>128

Антибіотик 107891 проявляє добру антибактеріальну активність проти Грам-позитивних бактерій.

MIC інтервал проти *Staphylococcus* spp., включаючи метицилінстійкі штами (MRSA) і штами стійкі до глікопептидних інтермедіатів (GISA), становить =0,13-4µг/мл і проти нещодавно виділених *Enterococcus* spp., включаючи ванкомицинстійкий (VRE), становить 0,5-4µг/мл. Проти *Streptococcus* spp. MIC становить ≤0,13µг/мл.

Антибіотик 107891 також активний проти анаеробних Грам-позитивних штамів; MIC є ≤0,13µг/мл проти *Clostridia* і ≤0,004-4µг/мл проти *Propionibacteria*. Протимікробні активності були показані проти штамів *L. monocytogenes* (MIC 0,125µг/мл) і *Lactobacilli* (MIC інтервал ≤0,13-4µг/мл). Деякі Грам-негативні бактерії є чутливими до антибіотика 107891; MIC є 1-0,25µг/мл проти *M.*

catharralis, 0,5-0,25µг/мл проти *Neisseria* spp. і 32µг/мл проти *H. influenzae*.

Антибіотик 107891 не активний проти тестованих штамів *E. coli* і *C. albicans*.

В експериментах залежності смертності від часу антибіотик 107891 проявляє бактерицидну активність проти штаму *S. aureus* GISA і *E. faecalis* VanA; протягом 24 годин при MIC значенні бактерицидної концентрації в бульйоні Мюллера Хінтона.

S. aureus може викликати життя-загрожуючі інфекції і MRSA має особливе клінічне значення оскільки він стійкий до всіх пеніцилінів і цефалоспоринов а також багатьох інших антибіотиків; крім того, він легко поширюється від пацієнта до пацієнта викликаючи спалахи інфекції із значними наслідками для здоров'я (W. Witte, (1999): "Antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: epidemiological aspects", Journal of Antimicrobial Chemotherapy 44:1-9). Центри по контролю за захворюваністю (CDC) Національної системи спостереження за внутрішньолікарняними інфекціями (NNIS) повідомляють, що стійкість до метициліну серед *S. aureus* в госпіталях США збільшилась з 2,4% в 1975 до 29% в 1991, із вищим ступенем стійкості при інтенсивних заходах (L. Archibald, L. Philips, D. Monnet, J. E. Jr Me Gowan, F. Tenover, R. Gaynes, (1997): "Antimicrobial resistance in isolates from inpatients i outpatients in the United States increasing importance of the intensive care unit", Clinic Infect. Dis. 24: 211-5). Внутрішньолікарняні стафілококальні інфекції пов'язують із значною захворюваністю і смертністю, що подовжує час одужання і збільшує вартість госпіталізації. Основні штами MRSA є стійкими до деяких найбільш часто використовуваних протимікробних агентів, включаючи досить популярні макролідні, аміноглікозидні і β-лактамні антибіотики, включаючи нещодавно отримані цефалоспорино.

Ванкоміцинстійкі патогени, що зустрічаються в лікарнях, які відповідають за інфекції (такі як ендокардити, менінгіти і септицемія) викликають підвищену терапевтичну увагу (Y. Cetinkaya, P. Falk і C. G. Mayhall, (2000): "Vancomycin-resistant enterococci", Clin. Microbiol. Rev. 13: 686-707; L. B. Rice, (2001): "Emergence of vancomycin-resistant enterococci", Emerg. Infect. Dis. 7: 183-7).

S. pneumoniae і *M. catarrhalis* розглядають як важливі патогени для людей. Вони зазвичай викликають інфекції респіраторного тракту, особливо середній отит у дітей і інфекції нижньої частини респіраторного тракту в людей похилого віку. *M. catarrhalis* і *S. pneumoniae* донедавна розглядалися як звичайні патогени респіраторного тракту (M. C. Enright and H. McKenzie, (1997): "Moraxella (Branhamella) catarrhalis. Clinical and molecular aspect of a rediscovered pathogen", J. Med. Microbiol 46: 360-71).

Clostridia відповідає за різні захворювання газова гангрена і залежні інфекції ран, правець, ботулізм, антибіотик-викликана діарея (CDAD) і псевдомембранний коліт. Більшість з цих мікроорганізмів продукують екзотоксини, що відіграють важливу роль патогенезі захворювань. *C. difficile* є каузативним агентом, що відповідає за

25% випадків CDAD і фактично за всі випадки псевдомембранного коліту. В останні роки мали місце випадки повторного інфікування *C. difficile* у пацієнтів з ванкоміцин-стійкою ентерокальною інфекцією або колонізацією (J. G. Bartlett, (1992): "Antibiotic associated diarrhea", Clinic. Infect. Dis. 15: 573-581).

In vitro біологічна активність факторів A1 і A2 антибіотика 107891

В Таблиці VIII показана протимікробна активність окремих Факторів A1 і A2 антибіотика 107891 MIC визначали за методом розведення мікробульйону, як описано вище.

Таблиця VIII

Мікроорганізм		MIC (µг/мл)	
		Фактор A1	Фактор A2
819	Staph.aureus Met-S	≤0,03	≤0,03
1524	Staph.aureus Met-R	≤0,03	≤0,03
2235	Staph.aureus Met-R	0,06	0,06
3894	Staph.epidermidis Met-R	≤0,03	0,06
3881	Staph.epidermidis Met-R	0,06	≤0,03
602	Staph.haemolyticus Met-R	0,25	0,25
3919	Strept.pneumoniae Pen-R	≤0,0015	≤0,0015
3915	Strept.pneumoniae Pen-S	≤0,0015	≤0,0015
4323	Ent faecalis VanA	≤0,03	≤0,03
J1	Ent. faecal is VanA	1	1
4341	Ent. faecalis Van B	0,5	0,5
4397	Ent. faecalis VanB	1	1
4341	Ent. faecalis VanB	2	2
6349	Ent.faecium Van A LNZ-R	2	2
4	Entfaecium Van A	1	1
3	Ent.faecium Van A	0,5	0,5
D561	Ent.faecium Van A	2	2
A8	Ent.faecium Van A	0,5	0,5
4339	Ent.faecium VanD	0,25	0,25
4174	Ent.gallinarum	1	1
997	Neisseria gonorrhoeae	0,5	0,25
1613	Neisseria meningitidis	0,25	0,25
1016	Propionibactenum. acnes	≤0,03	0,06

In vivo біологічна активність антибіотика 107891

В експериментах використовували самиць ICR мишей (Harlan Italia SpA - S. Pietro al Natisone, Italy) вагою 23-25г з гострою летальною інфекцією в імунокомпетентних або нейтропенічних мишей. Нейтропенію викликали двома інтраперітонеальними введеннями циклофосфаміду, 200 і 100мг/кг, за чотири дні і один день, відповідно, перед інфікуванням мишей.

Інфекцію викликали інтраперітонеальним інюкулюванням імунокомпетентних мишей (8 тварин/доза/група лікування) бактеріальної суспензії або клітинного ізоляту метицилінстійкого стафілококу (*Staph. aureus* SA3817), або стандартного метицилінчутливого штаму (*Staph. aureus* Smith ATCC19636), або шляхом інюкулювання нейтропенічним мишам клінічного ізоляту глікопептидстійкого ентерококу (*Ent. faecalis* A533). Бактеріальний препарат (приб. 10⁶ клітин/мишу) одержували су-

спендуванням в 0,5мл 5% бактеріологічного муцину (Difco). Оброблених тварин умертвляли протягом 24-72г після інфікування. Лікування антибіотиком починали через 10-15хв. після введення бактеріального агента. Антибіотик 107891 вводили внутрішньовенно або підшкірно у вигляді різних водних рецептур. Розраховували 50% ефективну дозу (ED_{50}) і 95% межу достовірності за методом Спіармана-Карбера (D. J. Finney, (1952): "The Spearman-Kärber method", in: Statistical methods in biological assay, pp. 524-530, Charles Griffin & Co., Ltd., London) з відсотка тварин, що вижили на 7 день. Результати показані в наступній Таблиці IX.

Антибіотик 107891 є нетоксичним до максимально тестованої дози 200мг/кг.

Таблиця IX

ED_{50} антибіотика 107891
при гострих летальних інфекціях у мишей

Рецептура	Штам	Шлях	ED_{50} мг/кг	95% межа до- стовірності
A	MCSA	вв	2,1	1,7-2,7
		пш	2,1	1,7-2,7
A	VanA	вв	3,2	2,7-3,9
		пш	11,1	9,2-13,5
B	MRSA	пш	4,2	3,5-5,1
C	VanA	вв	3,7	2,8-4,9
		пш	12,7	10,7-15,0

Рецептури

A: 10% (об/об) ДМСО, 10% (в/об) Бета гідрокси-пропілциклодекстрин (Sigma), 80% (об/об) 5% (в/об) глюкози в H_2O

B: 10% (об/об) ДМСО, 40% (об/об) ПЕГ 400 в 0,1 М водного CH_3COOH

C: 50% (об/об) ПЕГ 400 в H_2O

Штами:

I. MCSA. Staph. aureus Smith 819 ATCC19636

II. MRSA: Staph. aureus 3817, клінічно виділений

III. VanA: Ent. faecalis A533, клінічно виділений, у нейтропенічних мишей

Фіг.1А (повносканований низькороздільний спектр) і 1Б (масштабний високороздільний спектр) представляють маспектри антибіотика 107891, що має двічіпротонований іон з m/z 1124 і m/z 1116.

Фіг.2 представляє спектр ІЧ абсорбції антибіотика 107891 диспергованого в KBr .

Фіг.3 представляє УФ спектр антибіотика 107891 розчиненого в метанол: H_2O .

Фіг.4 представляє 1H -ЯМР спектр знятий в суміші метанол- d_4 : H_2O (pH 4,3 HCl) 40:10 (об/об) при 40°C на спектрометрі Bruker AMX 600 використовуючи послідовність пригнічення води.

Фіг.5 представляє ^{13}C -ЯМР спектр знятий в суміші метанол- d_4 : H_2O (pH 4,3 HCl) 40:10 (об/об) при 40°C на спектрометрі Bruker AMX 600.

Фіг.6А (повносканований низькороздільний спектр) і 6Б (масштабний високороздільний спектр) представляють мас-спектри Фактор А1 антибіотика 107891, що має двічіпротоновані іони $[M+2H]^{2+}$ з m/z 1124

Фіг.7А (повносканований низькороздільний спектр) і 7Б (масштабний високороздільний спектр) представляють мас-спектри Фактор А2 антибіотика 107891, що має двічіпротоновані іони $[M+2H]^{2+}$ з m/z 1116.

Фіг.8 представляє 1H -ЯМР спектр Фактора А1 антибіотика 107891 знятий в суміші $CD_3CN:D_2O$ (1:1) при 298 К на спектрометрі Bruker AMX 600 використовуючи послідовність пригнічення води.

Фіг.9 представляє 1H -ЯМР спектр Фактора А2 антибіотика 107891 знятий в суміші $CD_3CN:D_2O$ (1:1) при 298 К на спектрометрі Bruker AMX 600 використовуючи послідовність пригнічення води.

Фіг.10 представляє ^{13}C -ЯМР спектр Фактора А1 антибіотика 107891 знятий в суміші $CD_3CN:D_2O$ (1:1) при 298 К на спектрометрі Bruker AMX 600.

Фіг.11 представляє ^{13}C -ЯМР спектр Фактора А2 антибіотика 107891 знятий в суміші $CD_3CN:D_2O$ (1:1) при 298 К на спектрометрі Bruker AMX 600.

Фіг.12 представляє спектр ІЧ абсорбції Фактора А1 антибіотика 107891 диспергованого в KBr .

Фіг.13 представляє УФ спектр антибіотика Фактора А1 107891 розчиненого в метанол: H_2O .

Фіг.14 представляє спектр ІЧ абсорбції Фактора А2 антибіотика 107891 диспергованого в KBr .

Фіг.15 представляє УФ спектр антибіотика Фактора А2 107891 розчиненого в метанол: H_2O .

Приклади

Приклад 1: Спосіб ферментування *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024

Штам *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 витримували на скошених агарах з вісяного борошна 2-3 тижні при 28°C. Мікробний вміст одного скосу зішкрібали 5мл стерильної води і інокулювали в 500мл колби Ерленмейєра, що містять 100мл заправного середовища (AF/MC), яке включає (г/л): декстроза 20, екстракт дріжджів 2, соєве борошно 8, NaCl 1 і карбонат кальцію 4. Середовище одержували у дистильованій воді і pH доводили до 7,3 і потім стерилізували при 121°C 20 хвилин. Інокулювальні колби вирощували при 28°C, на роторному збовтувачі при 200об./хв.. Через 4-6 днів, 5% цієї культури інокулювали в другий ряд колб, що містить те ж саме ферментаційне середовище. Через 72 годин інкубування, 200мл переносили в 4л біореактор, що містить 3л того ж самого вегетативного середовища.

Ферментування проводили при 30°C при перемішуванні 700об./хв. і аерації 0,5оох. Через 72 години, культуру (1,5л) переносили в 20л біореактор, що містить 15л того ж самого вегетативного середовища. Ферментування проводили протягом 48 годин при 30°C, при перемішуванні 500об./хв. і аерації 0,5оох і потім переносили до продукційного танку.

Продуктування антибіотика 107891 проводили в 300л біореакторі, що містить 200л продукційного середовища М8, який містить (г/л): крохмаль 20, глюкоза 10, екстракт дріжджів 2, гідролізований казеїн 4, екстракт м'яса 2 і карбонат кальцію 3. Середовище одержували в деіонізованій воді і pH доводили до 7,2 і потім стерилізували при 121°C 25хв. Після охолодження у ферментатор інокулювали приблизно 14л (7%) прекультури. Біореактор працював при 29°C, при перемішуванні 180об./хв. і

аерації 0,5оох з тиском в голові 0,36бар Біореактор розвантажували після 98 годин ферментування.

Продуктування антибіотика 107891 контролювали за допомогою ВЕРХ. Як описано раніше, після екстрагування цільного культурального бульйону тим же самим об'ємом метанолу. Екстрагування проводили при кімнатній температурі при перемішуванні протягом однієї години.

Приклад 2: Альтернативний спосіб ферментування *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024

Microbispora sp. ATCC PTA-5024 інокулювали в 500мл колби Ерленмейєра, що містять 100мл середовища для вирощування (G1), яке містить г/л: глюкоза 10, мальтоза 10, соєва олія 10, соєве борошно 8, екстракт дріжджів 2 і карбонат кальцію 4. Середовище одержували у деіонізованій воді і стерилізували при 120°C×20хв. без коригування рН. Інокульовані колби інкубували 120-168 години при 28°C, при перемішуванні 200об./хв. доки не спостерігався добрий ріст. Колби потім використовували для інокулювання (3%) 4л біореактора, що містить 3л затравного середовища AF/МС, яке одержували як описано в Прикладі 1. Після 120 годин ферментування при 30°C, перемішуванні 700об./хв. і аерації 0,5оох, 1,5л культури перенесли до 20л біореактора, що містить 15л того ж самого вегетативного середовища. Ферментування проводили 96 годин при 30°C, перемішуванні при 600об./хв. і аерації 0,5оох, і потім перенесли до продукційного танку.

Одержання антибіотика проводили в 300л біореакторі, що містить 200л продукційного середовища (V6), яке включає (г/л): декстроза 20, екстракт дріжджів 5, екстракт м'яса 5, гідролізований казеїн 3, пептон 5 і NaCl 1,5. Середовище одержували у деіонізованій воді з рН доведеним до 7,5 NaOH і стерилізували при 121°C 20хв.

В біореактор інокулювали 14л затравочної культури (7%) і проводили ферментування при 29°C, перемішуванні при 180об./хв., при аерації 100л стандартного повітря на хвилину (0,5оох). Утворення антибіотика 107891 контролювали за допомогою ВЕРХ як описано раніше. Продукт ферментування збирали після 160 годин.

Приклад 3: Виділення антибіотика 107891

Ферментаційний бульйон описаний в Прикладі 1 фільтрували використовуючи тангенціальну фільтрувальну систему (розмір пор мембрани 0,1μм, Koch Carbo-Cor, Koch Wilmington, USA) одержуючи 170л надосадкової рідини і 30л концентрованого міцелію. Комплексний антибіотик 107891 знаходився і у фільтраті (А) і у міцелії (Б).

(А) Фільтрований бульйон перемішували протягом ночі при кімнатній температурі в присутності полістиролової смоли Diaion HP-20 (4л). Смоли виділяли, промивали 10л метанол:вода 4:6 (об/об) і елюювали порціями спочатку 10л метанол:вода 9:1 (об/об) і потім 10л метанол:бутанол:вода: 9:1:1 (об/об). Об'єднані елюювані фракції, що містять антибіотик 107891 концентрували до малого об'єму на роторному випаровувачі і потім ліофілізували, одержуючи 32г неочищеного матеріалу. Цей неочищений матеріал розчиняли в н-бутанолі (1л) і потім екстрагували три рази послідовно 800мл

води. Органічний шар концентрували при пониженому тиску одержуючи масляний залишок, який розчиняли в метанолі. Після додавання петролейного ефіру, одержували в осаді 5г неочищеного антибіотика.

(Б) Після додавання 25л метанолу, ретентатну частину, що містить міцелій перемішували протягом 1 години і фільтрували одержуючи 45л екстракту міцелію. Цей розчин розводили водою (20л) і перемішували протягом ночі при кімнатній температурі з полістироловою смолою Diaion HP-20 (1л). Виїляли смоли, промивали її 2л метанол:вода 40:60 (об/об) і елюювали партіями послідовно 3л метанол:вода 85:15 (об/об) і потім 2л метанол:вода 90:10 (об/об). Елюювані фракції аналізували на присутність антибіотика 107891 використовуючи дифузію на агарі на *Staphylococcus aureus* і використовуючи аналітичну ВЕРХ, як описано раніше.

Елюювані фракції, що містять антибіотик 107891 об'єднували, концентрували при пониженому тиску і ліофілізували, одержуючи 8,1 грам неочищеного антибіотика 107891.

Приклад 4: Альтернативне виділення антибіотика 107891

рН зібраного з 200л ферментаційного танку бульйону описаного в прикладі 2 доводили до 6,8 і бульйон фільтрували використовуючи тангенціальне фільтрування (мембрану з розміром пор 0,1μм, Koch Carbo-Cor). Перміат (180л) перемішували порціями протягом ночі при кімнатній температурі 2л смоли Diaion HP20 (Mitsubishi Chemical) і смоли збирали.

Додавали метанол (25л) до частини ретентату в устаткування для тангенціального фільтрування (приблизно 20л), що містить концентрований міцелій. Цю суспензію перемішували протягом 1 години і потім фільтрували використовуючи мікрофільтрувальну систему для залишкового об'єму ретентату приблизно 20л. Додавали ще метанол (25л) і описаний вище процес повторювали загальною 5 разів. Об'єднані метанольні екстракти (приблизно 125л) розводили 160л демінералізованої води і перемішували порціями протягом ночі при кімнатній температурі з 3л смоли Diaion HP 20. Смоли збирали і об'єднували із смолою Diaion HP 20, що використовувалась для екстрагування бульйону перміату згідно із способом описаним вище. Об'єднану смоли промивали у хроматографічній колонці 20л вода:метанол 6:4 (об/об). Антибіотик 107891 елюювали 23л метанол:50мм буфер форміату амонію рН 3,5:н-бутанол 9:1:1 (об/об). Цей елюат концентрували у вакуумі до кінцевого об'єму 3л. Концентрований розчин завантажували з рН4,5 на колонку з 2,5л поліаміду СС 6 0,1-0,3мм (Macherey-Nagel) кондиціоновану вода:метанол 7:3 (об/об). Колонку промивали вода:метанол 7:3 (об/об) і потім 25мм буфером форміату амонію рН3,5: метанол 7:3 (об/об). Антибіотик елюювали вода:метанол 3:7 (об/об) і потім 1:9 (об/об). Елюювання завершували 25мм буфером форміату амонію рН2,8: метанол у співвідношенні 1:9 (об/об). Елюати, що містять антибіотик 107891, об'єднували і концентрували у вакуумі до кінцевого об'єму 1л. рН концентрованого розчину доводи-

ли з 4 до 5,7 використовуючи 7М гідроксид амонію і потім суміш центрифугували для збирання осаду. Цю тверду речовину суспендували у воді і ліофілізували, одержуючи 6,96г рецептури антибіотика 107891.

Приклад 5 Очищення антибіотика 107891

Неочищений антибіотик 107891 (3,6г), одержували як описано в Прикладі 3, очищали використовуючи хроматографію середнього тиску на 100г оберненої фази C8 (EC) розмір часточок 40-70µм, розмір пор 60Å, 1ST (International Sorbent Technology, Mid-Glamorgan, UK) використовуючи систему хроматографії середнього тиску Bchi B-680 (Bchi laboratories-technik AG, Flawil Switzerland), споряджений формувачем градієнту B-687, збирачем фракцій B-684, скляною колонкою B-685 70×460мм. Смола попередньо промивали сумішню фазу А: фаза В 8:2 (об/об) і потім елюювали 25мл/хв 60хв. з лінійним градієнтом від 20% до 60% фази В на 60хв.

Фазою А був ацетонітрил 20мм буфер форміату амонію (рН6,6) 10:90 (об/об); і фазою В був ацетонітрил: 20мм буфер форміату амонію (рН: 6,6) 90:10 (об/об).

Фракції, що містять антибіотик 107891 об'єднували, концентрували у вакуумі і двічі ліофілізували з водою, одержуючи 430 мг очищеного антибіотика 107891.

Приклад 6: Очищення антибіотика 107891 за допомогою препаративної ВЕРХ Антибіотик 107891 надалі очищали за допомогою препаративної ВЕРХ на Hibaг напаківаній лічросорб RP8 (розмір часточок 7µм колонка RT 250-25мм, Merck, використовуючи 25 хвилинне елюювання лінійним градієнтом від 30% до 45% фази В, із швидкістю потоку 30мл/хв. Фазою А був 25мм буфер форміату амонію рН 4,5:ацетонітрил 95:5 (об/об) і Фазою В був ацетонітрил.

Зразок антибіотика 107891 з прикладу 5 (300 мг) розчиняли в 1,5мл 350 ДМСО:мурашина кислота 95:5 (об/об) і 300µл піддавали хроматографічному аналізу. Антибіотик 107891 типово елюється на 15-16 хвилинах. Елюювальні фракції 5 хроматографічних прогонів, що містять антибіотик

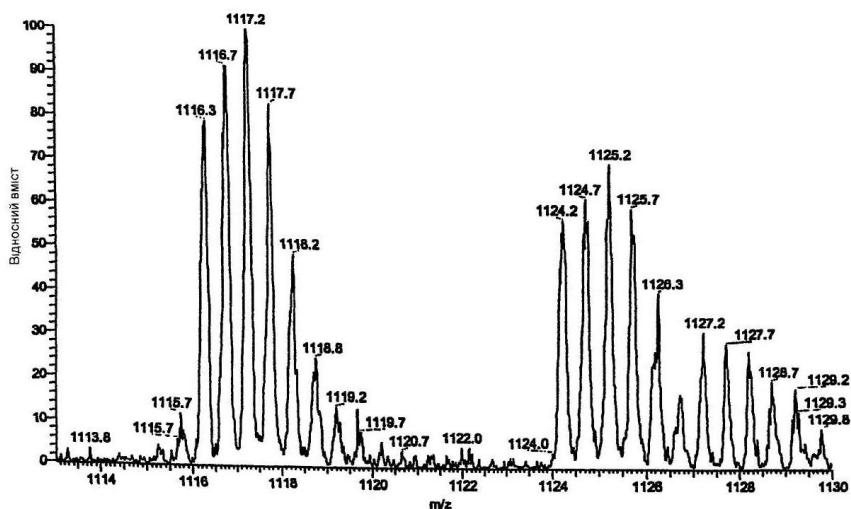
107891, об'єднували і концентрували у вакуумі. Залишковий розчин послідовно ліофілізували з води три рази, одержуючи 31мг антибіотика 107891 як білий порошок.

Приклад 7: Виділення і очищення окремих Факторів А1 і А2 антибіотика 107891

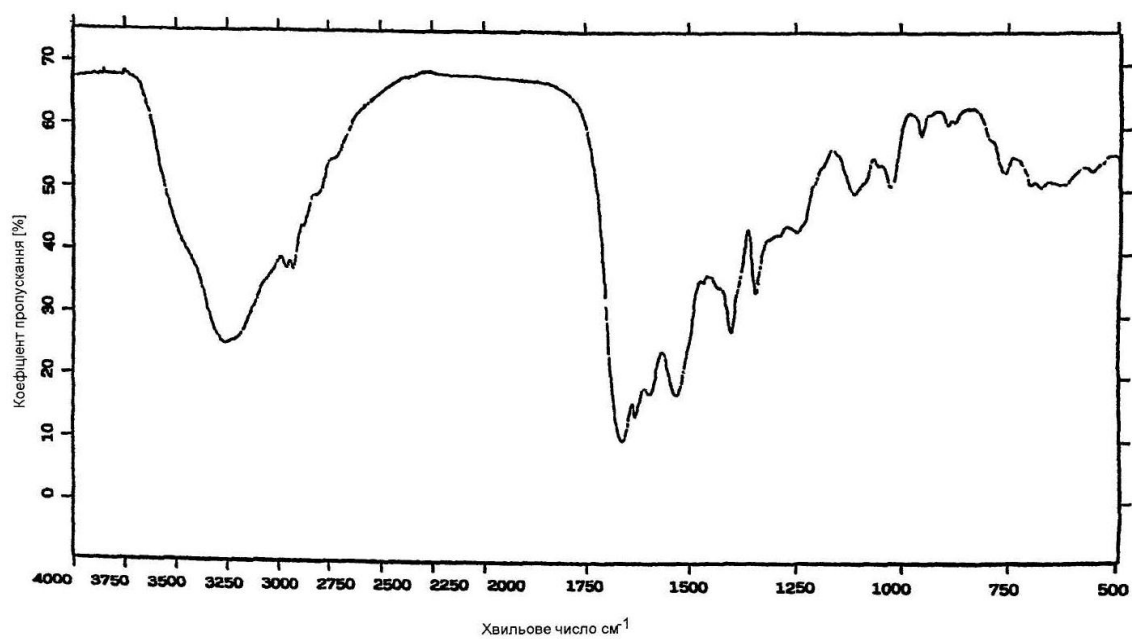
Фактори А1 і А2 відокремлювали і очищали від комплексного антибіотика 107891 Прикладу 5 за допомогою препаративної ВЕРХ на колонці Symmetry Prep C₁₈ (розмір часточок 7µм 7,8×300мм Waters (Mildfold USA) використовуючи дві різні програми елюювання.

А) Фактор А1 очищали 25 хвилинним елююванням лінійним градієнтом від 30% до 45% фази В, із швидкістю потоку 3,5мл. Фазою А був 25мм буфер форміату амонію рН4,5:ацетонітрил 95:5 (об/об) і Фазою В був ацетонітрил. Очищений комплексний антибіотик 107891 (15мг) розчиняли в 350µл ДМСО:мурашина кислота 95:5 (об/об) і піддавали хроматографуванню. Фактори А1 і А2 типово елюються на 11-13 хвилинах. Елюювані фракції потім аналізували за допомогою ВЕРХ за аналітичних умов описаних вище. Фракції 14 хроматографічних пропусків, що містять Фактор А1 антибіотика 107891, об'єднували і концентрували у вакуумі. Залишковий розчин ліофілізували з води послідовно три рази, одержуючи 15 мг чистого Фактора А1, як білий порошок.

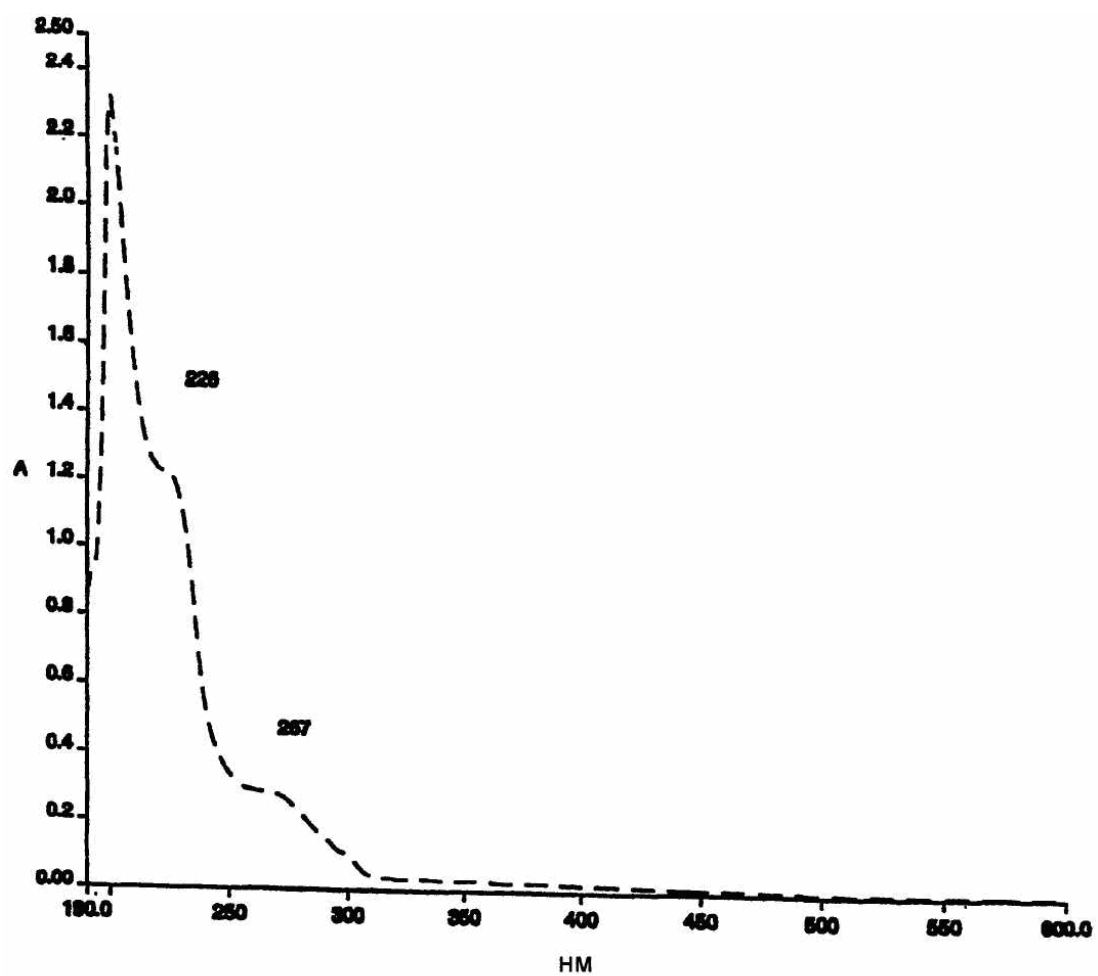
В) Фактор А2 очищали ізократичним елююванням із швидкістю потоку 7мл 100мм буфером форміату амонію рН4:ацетонітрил 82,5:17,5 (об/об). Очищений комплексний антибіотик 107891 (5мг) розчиняли в 250µл суміш оцтова кислота:ацетонітрил:100мм буфер форміату амонію рН4 50:120:80 (об/об) і піддавали хроматографуванню. Фактори А1 і А2 типово елюються на 9-10 хвилинах. Елюювані фракції потім аналізували за допомогою ВЕРХ за аналітичних умов описаних вище. Фракції 20 хроматографічних пропусків, що містять Фактор А2 антибіотика 107891, об'єднували і концентрували у вакуумі. Залишковий розчин ліофілізували з води послідовно два рази, одержуючи 15мг чистого Фактора А1, як білий порошок.



ФІГ. 1Б



ФІГ. 2



ФІГ. 3

47

87546

48

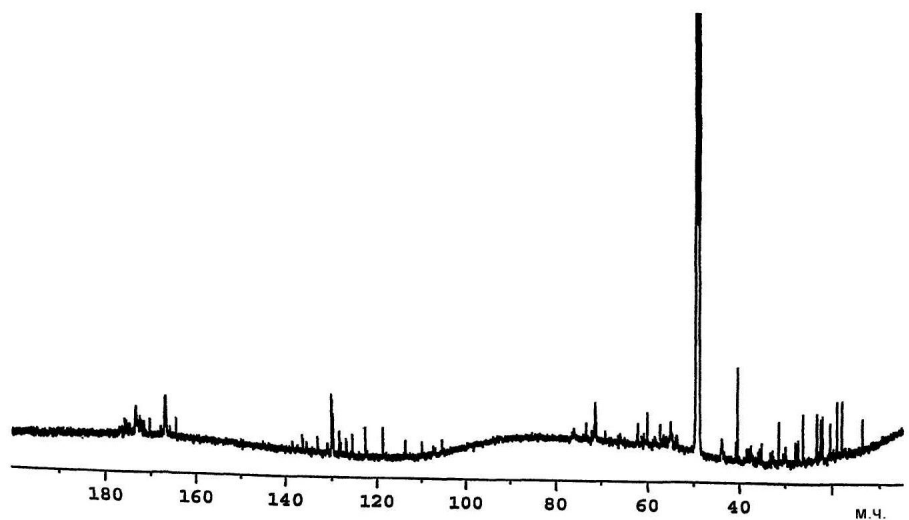
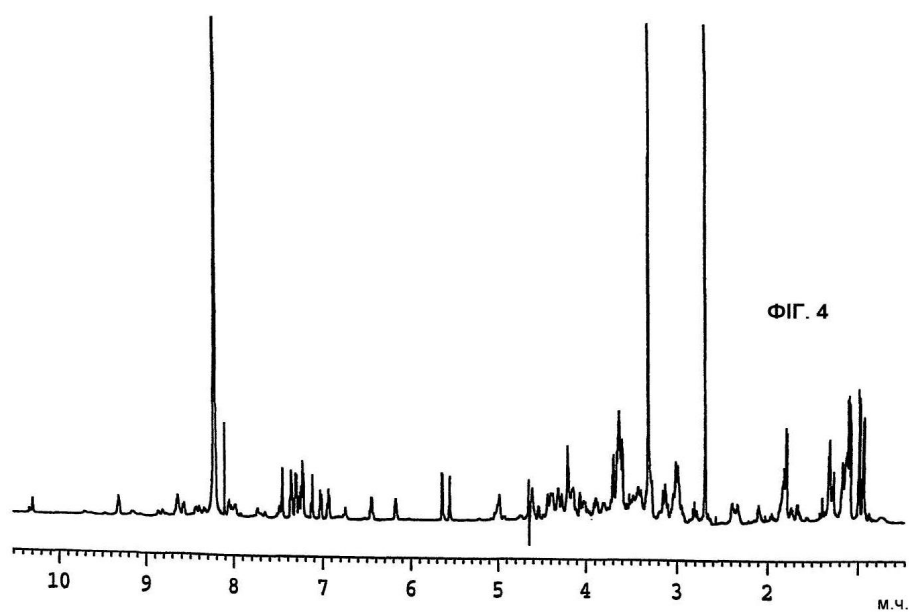


FIG. 5

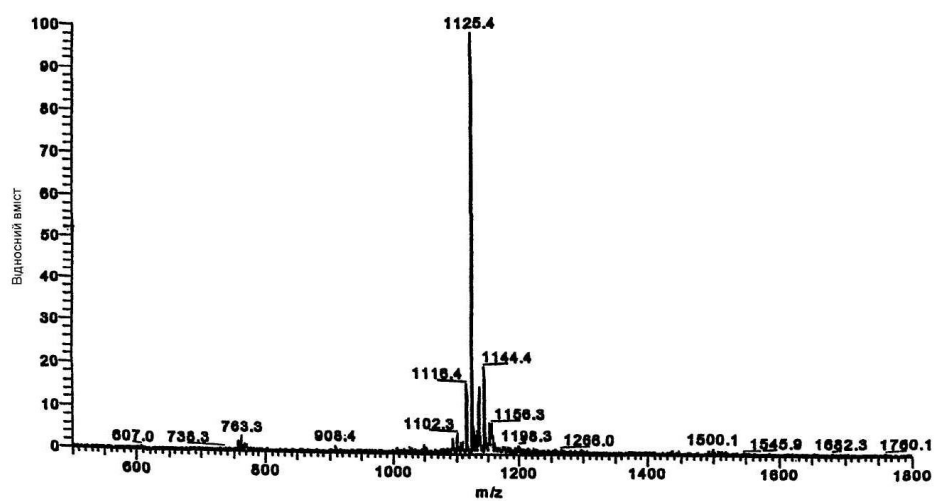
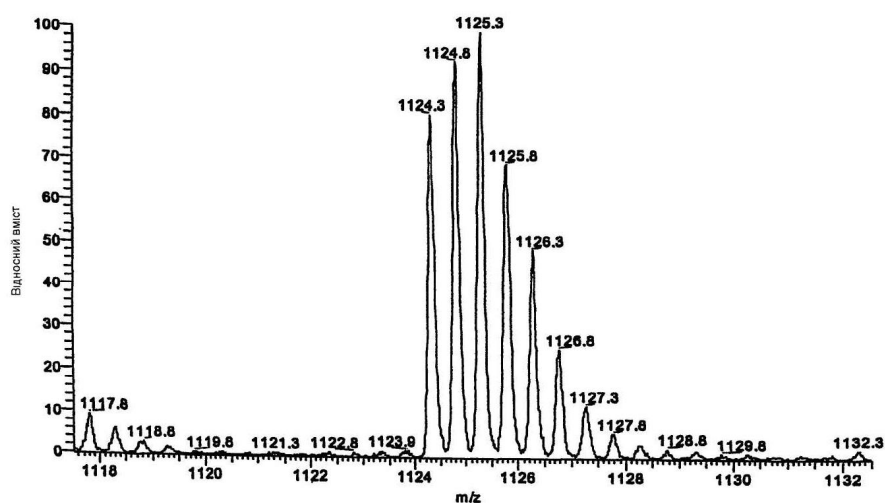
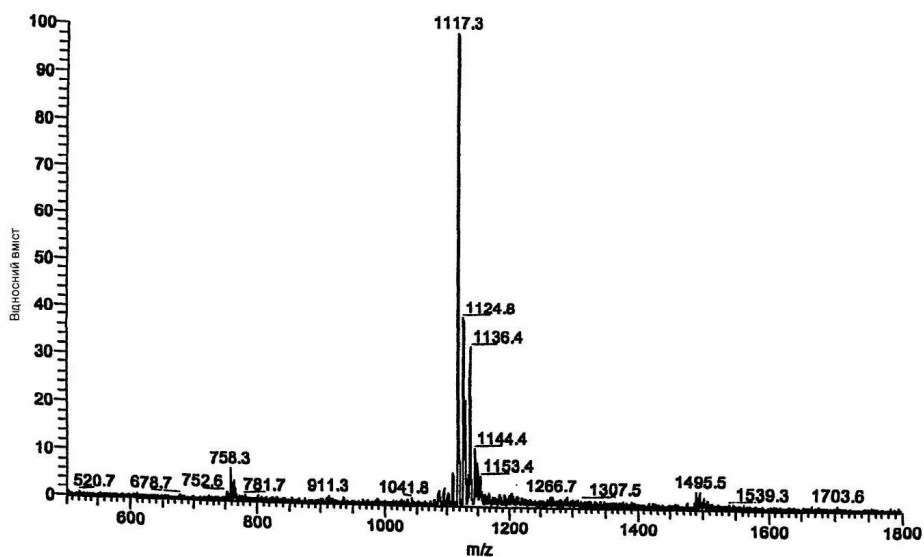


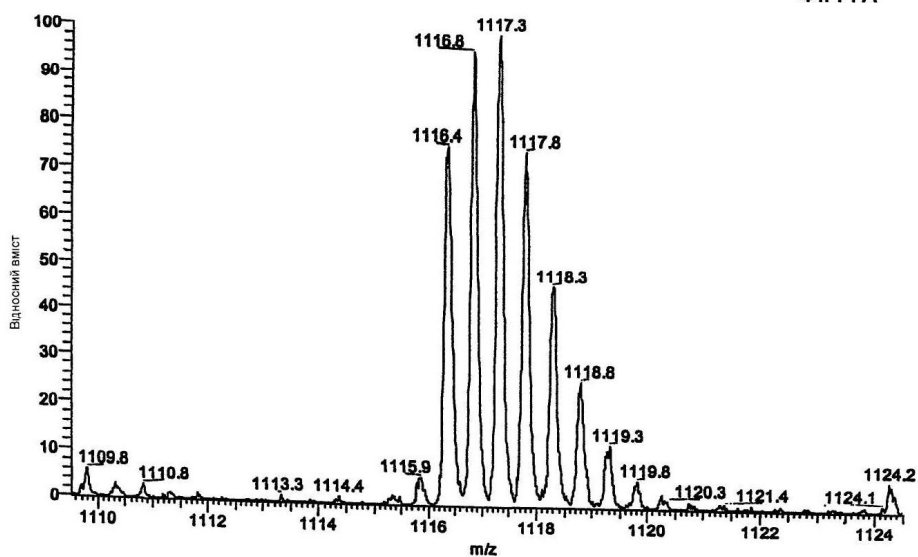
FIG. 6A



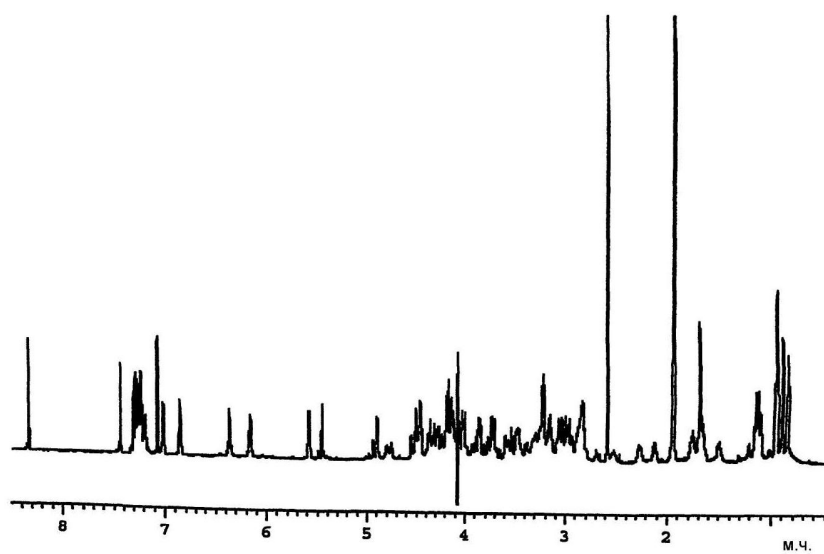
ФІГ. 6Б



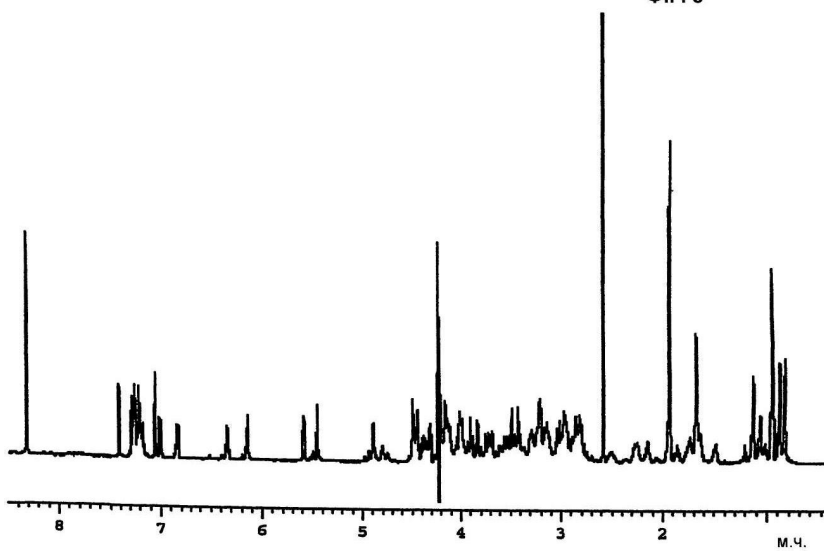
ФІГ. 7А



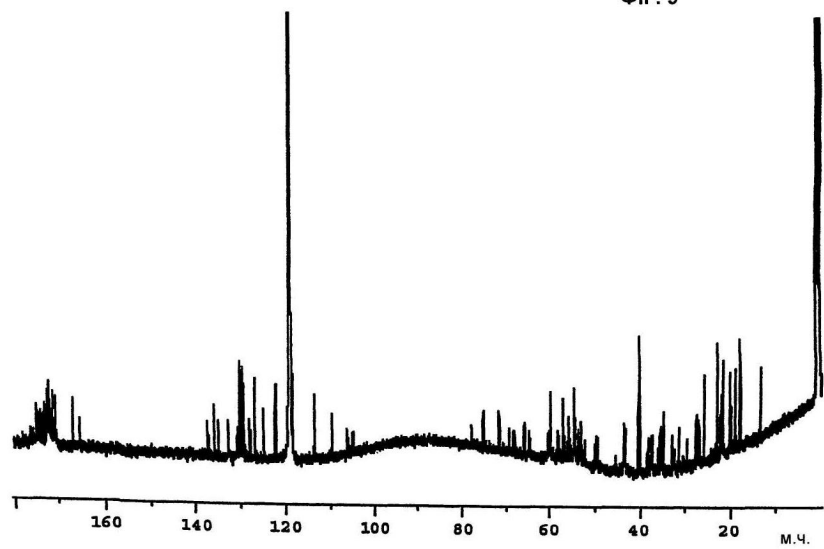
ФІГ. 7Б



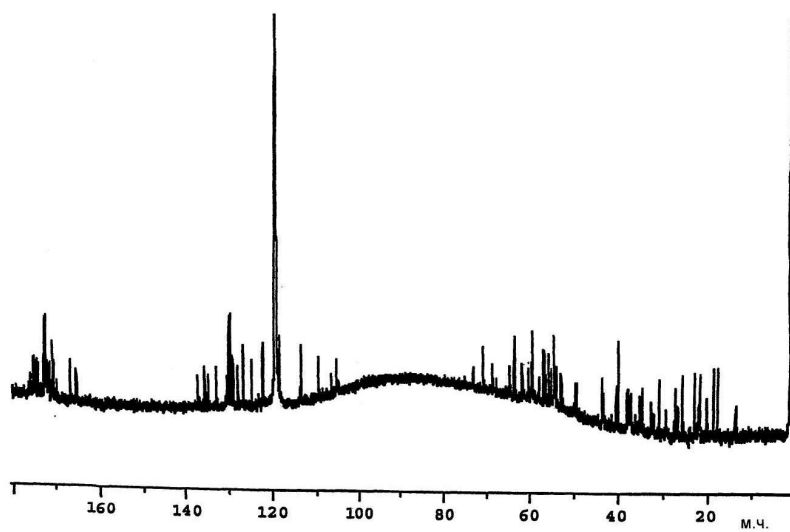
ФИГ. 8



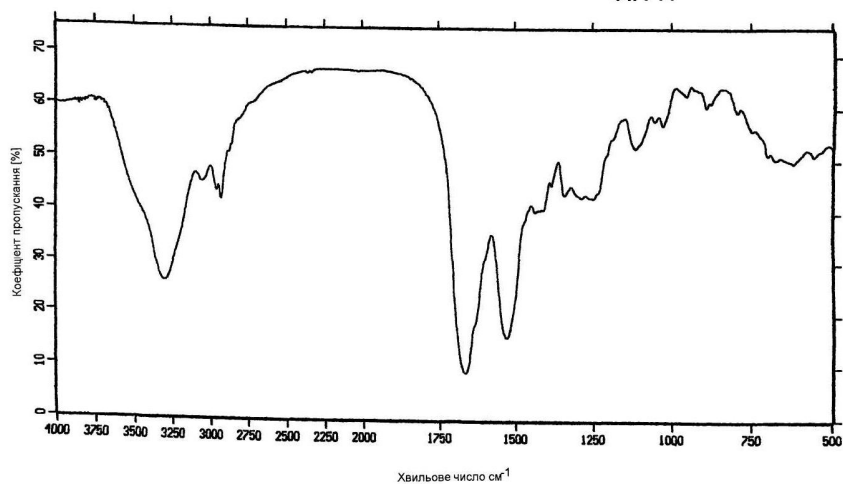
ФИГ. 9



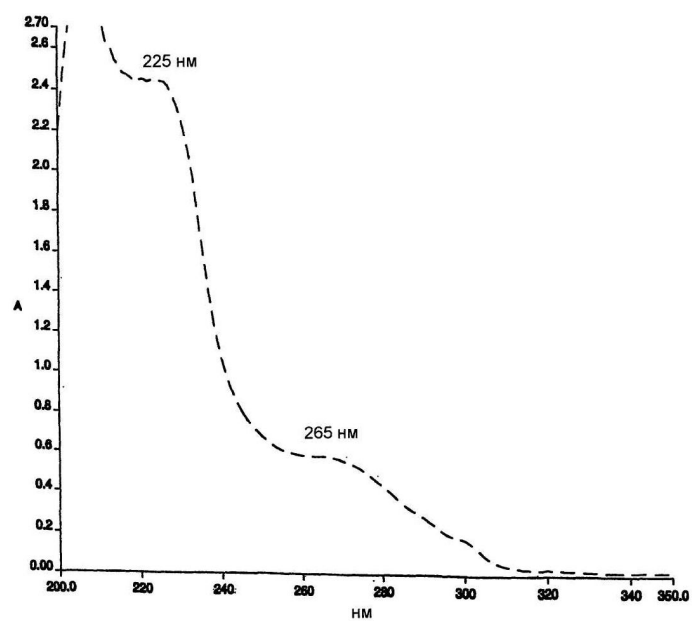
ФИГ. 10



ФІГ. 11



ФІГ. 12



ФІГ. 13

