

Antibiotikaproduktion

Fermentering og oprensning af specialantibiotika

Af Kenneth Johanson, kenneth-holst.johanson@alpharma.dk og Emil Poulsen, Alpharma ApS

Antibiotika er en fællesbetegnelse for stoffer, der virker ødelæggende på mikroorganismer. De laves naturligt i kulturer af mikroorganismer, hovedsageligt bakterier og skimmelsvampe, og kan forholdsvis nemt oprenses fra disse kulturer.

Alle mikroorganismer laver primære metabolitter. Det er stoffer, som bruges til vækst og stofskifteprocesser. De fleste antibiotika er sekundære metabolitter og er ikke relateret til mikroorganismens vækst. Det betyder, at de, i de fleste tilfælde, først produceres når mikroorganismens vækst stagnerer.

Der er forskellige teorier om, hvorfor produktionen af antibiotika induceres. En af dem går på, at mikroorganismen mangler et vigtigt næringsstof, f.eks. kulstofkilden. Når den registrerer denne mangel vil den tro, at der er andre organismer i nærheden, som prøver at stjæle dens føde. Herefter vil den straks begynde at forsvare sig mod denne trussel og lave antibiotika.

Virkningsmekanismer for antibiotika

Et antibiotikum skal kunne opfylde nogle meget vigtige betingelser for at kunne leve op til forbrugernes krav. Paul Ehrlich formulerede: »*Et effektivt antibiotikum skal være i stand til at dræbe eller begrænse væksten af patogene bakterier uden at forårsage alvorlige skader i værtsorganismen*«. I tillæg til dette princip om selektiv toksicitet, må antibiotikaet ikke påvirke den normale bakterieflora. Det skal også være nemt at

administrere og at få medikamentet frem til infektionsstedet. Den store fordel med antibiotika er, at de virker meget stærkere på mikroorganismer end på mennesker og dyr, og derfor kan bruges i mængder som er store nok til at udrydde de sygdomsfremkaldende mikroorganismer uden at skade patienterne. Men uskadelige er de ikke, og de kan have alvorlige bivirkninger såsom nyretoksicitet, Red man's syndrom (pseudohistaminreaktion) og ortotoxin (nedsat hørevne).

Antibiotika kan deles ind i 4-5 grupper alt efter deres forskellige virkningsmekanismer, figur 1, side 10.

- En stor gruppe antibiotika virker på bakteriernes cellevæg; enten ved at cellevægssyntesen blokeres eller at cellemembranen påvirkes og brydes i stykker.
- En stor gruppe antibiotika virker på bakteriernes cellevæg; enten ved at cellevægssyntesen blokeres eller at cellemembranen påvirkes og brydes i stykker.
- En anden stor gruppe antibiotika virker på bakteriernes apparat for proteinsyntese.
- Andre antibiotika påvirker cellens evne til at kopiere arvemateriale (DNA).
- Sidste gruppe virker som antagonist og interfererer med biosyntese og metabolisme i cellen, som er nødvendig for bakterievækst.

Nogle milepæle i antibiotikahistorien

År	
1674	Bakterier opdages
1867	Fenol tages i brug som desinficerende middel ved operationer
1882	Tuberkulosebakterien opdages af Koch
1909	Salvarsan introduceres som middel mod syfilis
1929	Penicillin opdages af A. Fleming
1930 +	Sulfapræparater bruges til behandling af infektioner
1943	Bacitracin opdages
1944	Streptomycin opdages af Waksman
1944 +	Penicillin bliver almindelig til brug på sygehuse
1954	Bacitracin produceres af Apothekernes Laboratorium
1983	A.L. køber Dumex og får vancomycin med i produktporteføljen
1986	Første påvisning af MRSA (methicillinresistente stafylokokker)

2 L. fermentorer der bruges til medie- og procesoptimering i R&D.



Fermentorerne i produktionshallen.





LIDT HISTORIE:

- 1903: Apothekernes Laboratorium AS bliver grundlagt af en gruppe af farmaceuter i Norge.
- 1946: A/S DUMEX bliver grundlagt af ØK i Danmark.
- 1954: Produktion af bacitracin
- 1958: Produktion af bacitracin zink.
- 1968: Produktion af polymyxin B sulfat.
- 1969: Produktion af colistin.
- 1975: A.L.Laboratories Inc. i USA bliver dannet af Apothekernes Laboratorium AS
- 1983: A/S DUMEX bliver et datterselskab af A.L. Laboratories Inc.
- 1985: Produktion af amphotericin B.
- 1987: Produktion af vancomycin hydrochloride.
- 1991: Gramicidin og tyrothricin kommer på markedet.
- 1993: A.L.Laboratories Inc. og Apothekernes Laboratorium AS. kombineres, og koncernen får hovedkvarter både i Fort Lee, New Jersey, og i Oslo.
- 1995: Koncernen skifter navn til Alpharma Inc.
- 1996: A/S DUMEX tager navneændring til Dumex-Alpharma A/S.
- 1997: Produktion af tobramycin.
- 1998: SKW Biotech Kft. i Ungarn købes.
- 2001: Dumex-Alpharma A/S skifter navn til Alpharma ApS.

polymyxin og colistin. Actinomyceten *Amycolatopsis orientalis*, en filamentøst (bakterierne vokser ikke som enkelte celler som *Bacillus* men derimod i kæder, der godt kan minde om svampevækst) voksende bakterie, der laver vancomycin, fermenteres i København og i Budapest. I Oslo fremstilles bacitracin af *Bacillus licheniformis*.

Alpharma har i tidens løb foretaget en række investeringer for at opretholde produktionsfaciliteterne på et højteknologisk stadi, så de lever op til de krav, der er defineret i »cGMP-guidelines for Active Pharmaceutical Ingredients« (cGMP = current Good Manufacturing Practice). Samtidig leves der op til de krav, der stilles fra US Food and Drug Administration (FDA).

Et af de emner, der er kraftig fokus på, er færdigvarens forureningsprofil. Der er et stadigt stigende krav om kendskab til, hvad bulkprodukterne indeholder af stoffer, der er relateret til aktivstoffet. Det betyder, at der garanteres en høj renhed af antibiotikumet og samtidig et kendskab til, hvad indholdet af de sidste procent består af. Derfor stilles der store krav til oprensingsprocesserne

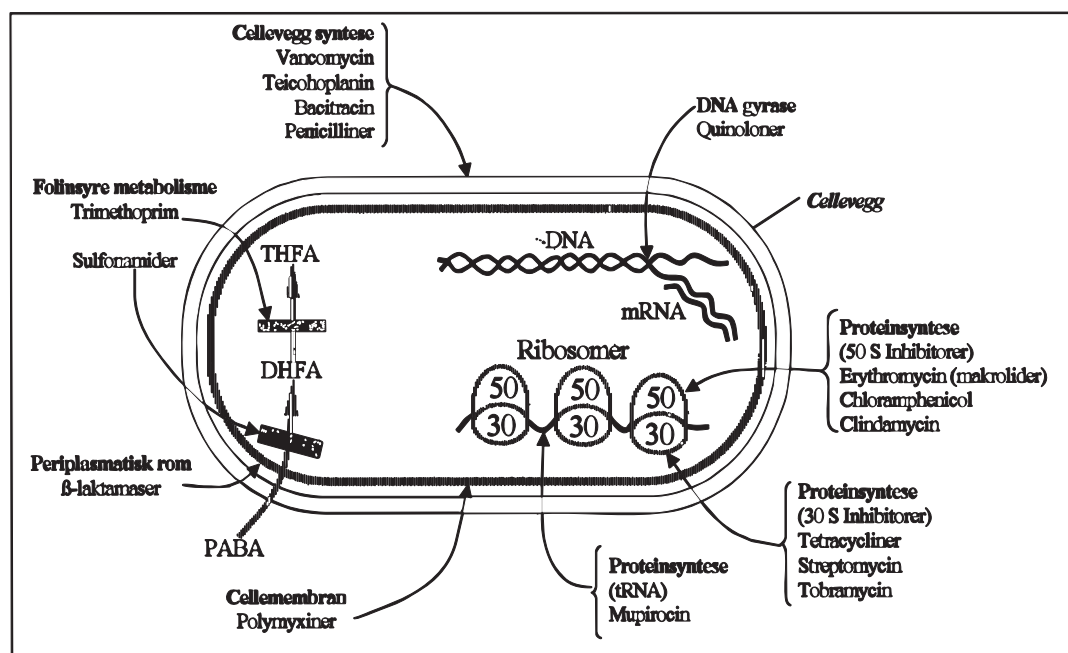
Forskning og udvikling

For at kunne følge med udviklingen, forny sig og forblive konkurrencedygtige er enhver virksomhed nødt til have en forsknings- og udviklingsafdeling (R&D). R&D i FCD er placeret i København og i Norge med et tæt samarbejde mellem de to enheder. R&D-gruppen i København er delt ind i fire afdelinger: Fermenterings Teknologi, Oprensnings Teknologi, Analyse Teknologi og Pilot.

I Fermenterings Teknologi arbejdes der med optimering af bakteriestammer og fermenteringsprocesser. Stammeudviklingen foretages på traditionel vis med mutagenisering med kemiske stoffer eller UV-lys og efterfølgende screening og selektion af interessante stammer.

Produktionen af antibiotika

På Alpharmas Fine Chemical Division (FCD) er antibiotika-produktionen baseret på at isolere antibiotika fra en ren og ensartet kultur af mikroorganismer. Denne kultur, også kaldet fermentatet, er forskellig for de forskellige antibiotika, der produceres. For at nævne nogle eksempler dyrkes i København bakterien *Bacillus polymyxa* til produktion af de to antibiotika



Figur 1. Forskellige virkningsmekanismer for antibiotika. De vigtigste måder et antibiotikum kan dræbe en bakteriecelle på, er ved at ødelægge enzymer i bakteriecellen, binde sig til ribosomer i cellen og dermed hindre proteinsyntese eller ødelægge cellevegg, så indholdet ryger ud.



Udviklingen af og ikke mindst optimeringen af fermenteringsprocesserne foregår ved afprøvning af forskellige røreværkstyper, forskellige belufts- og omrøringsparametre, afprøvning af pH-profiler og profiler for forbrug af opløst ilt i fermenteringsvæsken. Der ligger også en del arbejde i at optimere på de flydende substrater, som mikroorganismene vokser i. Det gælder om hele tiden at have den bedste mikroorganisme, i det bedste substrat og den bedste fermenteringsproces.

Oprensnings Teknologi beskæftiger sig med optimering af de forskellige oprensningstrin eller afprøvning af nye tiltag inden for det område. Primært for at få et renere produkt og et bedre udbytte. Der arbejdes hovedsagelig med vandige processer, og kun hvor dette ikke kan lade sig gøre, arbejdes der med opløsningsmidler. Hvis der bruges opløsningsmidler i oprensningsprocesserne, bruges disse i mindst mulig mængde og genindvindes og genbruges i det omfang, det kan lade sig gøre.

Analyse Teknologi beskæftiger sig med optimering af analysemetoder (primært HPLC, GC og LC-MS) til brug i QC/QA-regi. En anden arbejdsopgave er karakterisering af eventuelle urenheder eller komponenter relateret til hovedkomponenten, som man ikke har kunnet fjerne helt i oprensningsprocessen. Hovedkomponenten karakteriseres med ovennævnte

Funktion af de forskellige antibiotika

Polymyxin B:

Et polypeptid, der bruges som behandling mod infektioner, der er opstået som følge af sensitive Gram-positive bakterier.

Colistin (Polymyxin E):

Et polypeptid, der bruges som behandling mod overfladiske infektioner, der er opstået som følge af Gram-positive mekanismer.

Vancomycin:

Et glykopeptid, der er aktivt imod Gram-positive bakterier. Det bruges især mod Staphylococcus-infektioner, hvor andre antibiotika ikke er tilstrækkelige (hospitalet).

Bacitracin:

Et polypeptid, der bruges som behandling mod lokale infektioner forårsaget af Gram-positive bakterier.

Se virkningsmekanismer figur 1.

metoder suppleret med kemisk karakterisering (elementær analyse) og NMR til strukturforklaring.

Pilot Teknologi arbejder primært med oprensning af nye produkter, hvor markedet ønsker små mængder bulkvare til afprøvning og forskellige test i deres produkter.

Litteratur

G. Evensen, B. Reitstøen. (2000), »Introduksjon til ANTIBIOTIKA«, Informal, Alpha, 3; 12-18.



High-Throughput automatisering



MicroArray robotter og læsere



Pipetter og pH-metre



DNA-sekventering og -fragmentanalyse



Titerpladelæsere
- Polarisation
- Nephelometri



Titerpladelæsere
- Fluorescens
- Luminescens



Suprafusion



Automatisering af pipetteringsopgaver

www.ramcon.dk

Danmarks største udvalg af analyseudstyr

Find løsningen hos os. Vi samarbejder med en række af verdens førende producenter af analyseudstyr - bl.a. Beckman Coulter, BMG Labtechnologies og Socorex.

RAMCON A/S

Bregnerødvej 132, DK-3460 Birkerød
Tlf. 45 94 20 00 Fax 45 94 20 02 ramcon@ramcon.dk



Spektrofotometri



Partikel-karakterisering



Vandalanalyse
Toxicitetsmåling



Cellehøstere



Particle Image Analyzer



Overflademålere



High Content Screening



Ultracentrifuger



Automatisering af flere laboratorieprocesser



Bord-, high-speed centrifuger



High-speed centrifuger



HPLC



HPLC Data Management system



Bord-ultracentrifuger



Kapillarelektroforese