



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 13.03.73 (P. 161241)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 02.01.74

Opis patentowy opublikowano: 30.09.1977

MKP C12d 9/14

Int. Cl.² C12D 9/14

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: The Upjohn Company, Kalamazoo (Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób wytwarzania nowego antybiotyku AT-125

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowego antybiotyku AT-125, o wzorze 1, przez szczep *Streptomyces svaceus*, hodowany na wodnym podłożu. Antybiotyk AT-125, pochodna kwasu L-(α S, 5S)- α -amino-3-chloro-2-izoksazolinooctowego-5, jest związkiem amfoterycznym i istnieje w różnych postaciach jonowych, w zależności od wartości pH środowiska. Przy niskich wartościach pH antybiotyk AT-125 tworzy sole addycyjne z kwasami, przy wyższych wartościach pH występuje w postaci jonów obojnaczych, a przy jeszcze wyższych wartościach w pH w postaci soli z metalami. Antybiotyk AT-125, wytwarzany przez szczep promieniowców *Streptomyces svaceus* na podłożu wodnym, hamuje rozwój bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych, takich jak *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli*. Działa również przeciwko różnorodnym grzybom i drożdżom takim, jak: *Saccharomyces pastorianus*, *Penicillium oxalicum*, *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisiae*.

Antybiotyk AT-125, w różnych warunkach, hamuje wzrost lub zmniejsza ilość bakterii, grzybów, drożdży wymienionych wyżej, samodzielnie lub w połączeniu z innymi substancjami zwalczającymi drobnoustroje. Antybiotyk AT-125 można zastosować na przykład do zahamowania lub zmniejszenia zakażenia hodowli gąsienic jedwabników, spowodowanego drobnoustrojem *Bacillus subtilis*.

Budowa antybiotyku AT-125, określona wzorem przedstawionym na rysunku, stanowi jego postać

2

jonową i jon obojnaczy pozostaje w zgodzie z danymi analitycznymi i spektralnymi. Widmo NMR, nasyconego roztworu antybiotyku AT-125, wykonuje się na spektrometrze Varian-100. Widmo NMR przy 100 MHz nie jest widmem pierwszego rzędu, ale jasno wskazuje na obecność czterech nie zdolnych do wymiany, protonów. Protony metylenowe przy C₄ dają niekształcony 5 liniowy układ AB z najsilniejszym sygnałem przy 350 Hz i pozornym dubletem, występującym przy 359 Hz i 361 Hz.

Proton przy C₈ daje pozorny dublet trypletów przy 5,36 δ z odstępami liniowymi rzędu 3,5 Hz i 10 Hz.

Proton grupy metinowej aminokwasu daje ostry dublet przy 4,12 δ , J=3,5 Hz. Widmo IR wykonuje się w nujolu na spektrometrze Perkin Elmer 421. Główne pasma znajdują się przy 3030 (szerokie), 2730, 2620, 1620, 1590, 1495, 1425, 1325, 1307, 1293, 1275, 1145, 1127, 895, 870 cm⁻¹. Strukturę chemiczną krystalicznego antybiotyku AT-125 ustalono ściśle za pomocą dyfrakcji promieni X. Krystaliczny AT-125 jest kwasem L-(α S,5S)- α -amino-3-chloro-2-izoksazolino-octowym-5. Na podstawie badania twardymi promieniami X ustalono wzór cząsteczkowy AT-125 na C₈H₇ClN₂O₅, a ciężar cząsteczkowy na 178,6. Antybiotyk AT-125 rozpuszcza się w H₂O, nieznacznie rozpuszcza się w octanie etylu, eterze, benzenie, chloroformie. Własności antybiotyczne antybiotyku AT-125 określa się w następujący sposób. Bada się strefy zahamowań hodowli na standardo-

wych płytkach, stosuje się 13 mm krążki papierowe, stężenie antybiotyku AT-125 wynosi 1 mg/ml. Otrzymuje się następujące wyniki, przedstawione w tablicy 1a.

Tablica 1a

Drobnoustroj	Strefa zahamowań wokół krążków o średnicy 13 mm
<i>Bacillus subtilis</i> (agar syntetyczny)	78
<i>Bacillus subtilis</i> (agar odżywczy)	0
<i>Lactobacillus casei</i>	0
<i>Sarina lutea</i>	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0
<i>Mycobacterium avium</i>	0
<i>Escherichia coli</i> (agar odżywkowy)	0
<i>Escherichia coli</i> (agar syntetyczny)	36 mętna
<i>Salmonella schottmuelleri</i>	0
<i>Proteus vulgaris</i>	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	53
<i>Penicillium oxalicum</i>	32
<i>Candida albicans</i> (próba przy stężeniu 100 µg/ml)	20
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (próba przy stężeniu 100 µg/ml)	38

Sposobem według wynalazku antybiotyków AT-125 wytwarza się przy użyciu promieniowca *Streptomyces svaceus*. Subkulturę żywych drobnoustrojów zdeponowano w Northern Utilization and Research Division, Agricultura, Peoria, Illinois, U.S.A., pod numerem kolejnym kolekcji NRRL 5439. Wymieniony wyżej promieniowiec zbadała i opisała Alma Dietz z Upjohn Research Laboratory. *Streptomyces svaceus* (Dietz sp. n.) charakteryzują następujące właściwości: grzybnia powierzchniowa szara, melanina dodatnia, wzorzec barw według Ektachrome) Dietz, A. 1954. Ektachrome transparencies as aids in actinomycete classification. Ann. N. Y. Acad. Sc. 60:152—154) podaje się w tablicy 1. Hodowlę zalicza się do serii barw Gray (GY) i White (W) według Tresnera i Backusa (Tresner, H. D., i E. J. Backus 1962. System of color wheels for streptomyces taxonomy. Appl. Microbiol. 11:335—338).

Badania mikroskopowe wykazują: zarodniki owalne do prostokątnych, rzadko pokryte brodawkami lub krótkimi wyrostkami, wytwarzanymi na sporoforach, podobnych do kandelabrow; sporofory długie, proste, zagięte na końcach, można zaliczyć do grupy spiral (S) według klasyfikacji podanej przez Pridhama, i współpracowników (Pridham, T. G., C. W. Hesseltine i R. G. Benedict. 1958. A guide for the classification of *Streptomyces* according to selected groups. Placement of strains in morphological sections. Appl. Microbiol. 6:52—79). Powierzchnię zarodników można zaliczyć do typu brodawkowego według klasyfikacji podanej przez Dietz i Mathews (Dietz, A., i John Mathews, 1970. Classification of *Streptomyces* spore surfaces into five groups. Appl. Microbiol. 21:527—533).

W tablicy 3 podaje się charakterystykę hodowli i biochemii badanego szczepu. Wzrost szczepu na związkach węgla określa się na podstawie sposobu Pridhama i Gottlieba (Pridham, T. G. i D. Gottlieb. 1948. The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination. J. Bacteriol. 56:107—114) i Shirlinga oraz Gottlieba (Shirling, E. B. i D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Sys. Bacteriol. 16:313—340). W sposobie według Pridhama i Gottlieba, *S. svaceus* wykazuje znaczny wzrost na podłożu podstawowym takim, jak dulcitol, D-sorbitol, salicin i szczawian sodu, przy czym szczep wykazuje dobry wzrost na D-ksylozie, L-alabinozie, ramnozie, D-fruktozie, D-galaktozie, D-glukozie, D-mannoze, maltozie, sacharozie, laktozie, cellobiozie, rafinozie, dekstrynie, inulinie, rozpuszczalnej skrobi, glicerolu, D-mannitolu, inositolu, octanie sodu, cytrynianie sodu, bursztynianie sodu, słaby wzrost na fenolu, mrówczanie sodu, winianie sodu i nie wykazuje wzrostu na krezolu i salicylanie sodu.

W metodzie Shirlinga i Gottlieba szczep nie rozwija się na podłożu tylko podstawowym. Dobry wzrost wykazuje na podłożu podstawowym z glukozą. Szczep wykazuje wzrost podobny lub większy niż na podłożu podstawowym z glukozą, gdy do podłoża podstawowego dodaje się L-arabinozę, sacharozę, D-ksylozę, inositol, D-mannitol, D-fruktozę, ramnozę oraz rafinozę i podwójnie szybki, gdy zamiast glukozy dodaje się celulozę. Szczep rozwija się dobrze w temperaturze od 18° do 28° na agarze z sacharozą Benetta i Czapka, zaś w temperaturze od 18° do 37° na agarze maltozowo-tryptonowym. W temperaturze od 45° do 55° szczep nie rozwija się na wyżej wymienionych agarach. Antymetaboliczny antybiotyk AT-125 jest wytwarzany przez omawiany szczep, wyodrębniony z gleby.

Streptomyces svaceus wykazuje cechy charakterystyczne dla rodzaju *Streptomyces*. Szczep ten, wyizolowany z gleby, różni się zasadniczo od gatunków *Streptomyces* z kolekcji szczepów firmy Upjohna, a również od opisanych w literaturze. (np., Breed, Robert s., E. G. D. Murray, i Nathan R. Smith. 1957. Bergey's manual of determinative bacteriology, wydanie 7, the Williams i Wilkins Co., Baltimore, (2. Gauze, G. F. T. P. Preobrazenskaya, E. S. Kudrina N. O. Blinov, I. D. Ryabova i M. A. Ivshinikova 1957. Problems in the classification

of antagonistic actinomycetes. State Publishing House for Medical Literature, Moscow, angielskie wydanie tłumaczone przez Fritz Danga, D. Gottlieb (ed.) The American Institute of Biological Sciences, Washington, D. C.) 3. Hutter, R. 1967 Systematik der Streptomyces unter besondere Berücksichtigung der von ihnen gebildeten Antibiotica. S. Karger, Basel) 4. Krassilnikow N.A. 1949 Actinomycetes. In Guide to the identification of bacteria and Actinomycetes. Academy of Sciences U.S.S.R. Moscow. J. B. Routien, Chas. Pfizer and Co. Inc. 1957 przetłumaczył wydanie angielskie.) 5. Waksman, S. A. 1961. The actinomycetes, Vol. 2, Classification, identification and description of genera and species. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.) 6. Shirling, E. B. i D. Gottlieb. 1968 Cooperative descriptions of type cultures of Streptomyces. II. Species descriptions from first study. Int. J. Sys. Bacteriol. 18:69—189; Cooperative descriptions of type cultures of Streptomyces. III. (1968) Additional species descriptions from first and second studies. Int. J. Sys. Bacteriol. 18:279—392, Cooperative description of type cultures of Streptomyces. IV. (1969) Species descriptions from the second, third and fourth studies. Int. J. Sys. Bacteriol. 19:391—512).

Streptomyces sviveus wykazuje podobieństwo do *Streptomyces hawaiiensis* (Cron, M. Y., D. F. Whitehead, I. R. Hooper, B. Heinemann i J. Lein 9156. Bryamycin, a new antibiotic. Antibiotisc and Chemotherapy 6:63—67). Oba szczepy wykazują melaniczną dodatnią i w podobny sposób zużywają węgiel w syntetycznym podłożu Pridhama i Gottlieba. Otwarte, spiralne sporofory szczepu *Streptomyces hawaiiensis* są krótsze i mniej wyraźne od sporoforów nowego szczepu, długich i zagiętych na końcach. Spory, obserwowane przez elektronowy mikroskop transmisyjny, posiadają kształt okrągły do owalnego i powierzchnię pokrytą wyrostkami, w przypadku *S. hawaiiensis*, a w przypadku *S. sviveus* posiadają kształt owalny do prostokątnego i powierzchnię od z rzadka usianej brodawkami do pokrytej wyrostkami. Dokładną charakterystykę szczepu podaje się w tablicy 4. *Streptomyces sviveus* łatwo odróżnia się od opisanych gatunków *Streptomyces* z kolekcji szczepów firmy Upjohna i od szczepów opisanych w literaturze, dzięki jego charakterystycznemu zabarwieniu i szczegółom mikroskopowym.

Cechy szczepów, które przytacza się w tablicach podkreślają jeszcze wyraźniej odrębność *Streptomyces sviveus*. Drobnoustrój ten posiada unikalne właściwości wytwarzania antybiotyku AT-125. Proponuje się, żeby opisywany drobnoustrój uważano za nowy gatunek *Streptomyces*, nazywany *Streptomyces sviveus* (od *svive* albo *svive* (czeski), tzn. od świecy lub świecznika, ponieważ sporofory hodowli są podobne do kandelabra (Dietz sp. n. Typ gatunku zalicza się do typu odmiany *Streptomyces sviveus*, odmiana *sviveus*, zgodnie z Międzynarodowym Kodem (International Code of Nomenclature of Bacteria. 1966. Wydany przez Editorial Board of the Judicial Commission of Bacteria. Intern. J. System. Bacteriol. 16:459—490).

W tablicy 1b przedstawiono wzorce barw szczepu *Streptomyces sviveus* według Ektachromu.*)

Tablica 1b

Podłoże agarowe	Barwa grzybni powierzchniowej	Barwa grzybni podstawowej
Bennetta	lawendowo-szara	brązowa
Czapek z sacharozą	lawendowo-szara	czerwono-brązowa
Maltozowo-tryptonowe	lawendowo-szara	brązowa
pepton-iron	brak wzrostu powierzchniowego	brązowa
0,1% tyrozyny	jasno lawendowo-szara	czerwono-brązowa
krochmal kazeinowy	jasno lawendowo-szara	jasno-brązowa

*) Dietz, A., „Ektachrome Transparencies as Aids in Actinomycete Classification” Annals of the New York Academy of Sciences, 60:152—154, 1954.

Tablica 2

Barwy grzybni *Streptomyces sviveus*

Podłoże agarowe	Color Harmony Manual 3rd ed., 1948*)	ISCC-NBS Method of Designating Color and a Dictionary of Color Name Circular 553, 1955**)
Bennetta	S 3fe srebrno-szara	63 gm jasno brązowo-szara
	R 3ni goździkowo-brązowa	77 m umiarkowanie żółto-brązowa
		95 g umiarkowanie oliwkowo-brązowa
	P 3ig beżowo-brązowa	80 m szaro-żółto-brązowa
Czapek z sacharozą	S 3lc bursztynowa, szkockiego masła	71 m słabo pomarańczowa
	R 2ge przyćmiony żółto-brązowa, griega	94 m jasno oliwkowo-brązowa
	P 3ge beżowa, wielbłądzia	109 gm jasno szaro-żółta
		79 m jasno żółto-brązowa
Maltozowo-tryptonowe	S a biała	263 gm biała

c.d. tabl. 2

Podłoże agarowe	Color Harmony Manual 3rd ed., 1948*)	ISCC-NBS Method of Designating Color and a Dictionary of Color Name Circular 553, 1955**)
Maltozo- wo-tryp- tonowe	R 31g cynamo- nowo-brązo- wa	77 gm słabo żółto-brązowa
	P 31g wielbłą- dzia, koloru cukru klono- wego, żółto- brązowa	80 m szaro-żółto- brązowa 95 g słabo oliw- kowo-brązowa
Drożdzo- wo-słodo- we	S 3fe srebrno- szara	63 gm jasno brązowo-szara
	R 4nl czekola- dowa, ciem- no-brązowa	64 m brązowo- szara 81 g ciemno- szaro-żółto- brązowa
Owsiane (ISP-3)	P 3li bobrowa	80 m szaro-żółto- brązowa 95 g umiarkowa- nie oliwkowo- brązowa
	S 3fe srebrno- szara	63 gm jasno brą- zowo-szara
	R 2ig żółto-brą- zowy do 3ml szaro-bo- browego	110 g szaro-żółta 112 m jasno oliw- kowo-szara do ciemno oliwko- wo brązowej 266 m ciemno- szarej
	P 2ih ciemno przyćmiona	112 m jasno oliwkowo-szara 265 m średnio szara

c.d. tabl. 2

Podłoże agarowe	Color Harmony Manual 3rd ed., 1948*)	ISCC-NBS Method of Designating Color and a Dictionary of Color Name Circular 553, 1955**)
Nieorga- niczne- skrobiowe (ISP-4)	S 3fe srebrno- szara	63 gm jasno oliwkowo-szara
	R 3ge beżowa, wielbłądzia	79 m jasno szaro-żółto- brązowa
	P 3ge beżowa, wielbłądzia	79 m jasno szaro-żółto- brązowa 94 m jasno oliwkowo-brą- zowa
	S C jasno szara	264 gm jasno szara
Aspara- ginowe z glicerolem (ISP-5)	R 3ml bobro- wo-szara	96 g ciemno oliwkowo- brązowa
	P 3fe srebrno- szara	63 gm jasno brązowo-szara
S — grzybnia powierzchniowa		
R — grzybnia podstawowa		
P — pigment		
Wszystkie odczyty sporządzono na błyszczącej po- wierzchni.		
*) Jacobson, E., W. C. Granville, i C.E. Foss. 1948. Color Harmony Manual, 3rd Edition, Container Corporation of America, Chicago, Illinois.		
**) Kelly, K. L., i D. B. Judd. 1955. The ISCC-NBS Method of Designating Colors and a Dictionary of Color Names. U.S. Dept. Commerce Circ. 553.		

Tablica 3

Hodowlana i biochemiczna charakterystyka drobnoustroju *Streptomyces svaceus*

Podłoże	Grzybnia powietrzna	Grzybnia podstawowa	Inne właściwości
1	2	3	4
Podłoże agarowe			
Pepton-iron	lekko-szara	brązowa	Pigment brązowy (melanina dodatnia)
Jabłczan wapniowy	słabo szaro-biała	biała do kremowej	Jabłczan rozpuszczony wokół wzrostu
Asparaginowe z glukozą	słabo lawendowo- szara	oliwkowa	—

c.d. tabl. 3

1	2	3	4
Mleko z lakmusem	szarawa	żółto-brązowa brązowa	Pigment żółto- żółto-brązowo-brązowy Kazeina nie rozpuszcza się
Tyrozynowe	lekko szara	żółto-brązowa brązowa	Pigment brązowy Tyrozyna rozpuszcza się
Ksantynowe	lekko szaro-biała	kremowo-żółto- -brązowa	Pigment kremowo-żółto- brązowy Ksantyna rozpuszcza się
Skrobia odżywkowa	jasno szaro-biała	kremowo-żółta	Pigment żółty. Skrobia ulega hydrolizie
Drożdżowosłodowe (ekstrakt)	ciemno-szara	brązowa	Pigment żółto-brązowo- -brązowy
Pepton-iron drożdże (ekstrakt) (ISP-6)	—	brązowy	Pigment brązowy (melanina dodatnia)
Tyrozyna (ISP-7)	szara	brązowa	Pigment brązowy (melani- na dodatnia 50%) Brak pigmentu, (melanina ujemna) 50%
Podłoże żelatynowe			
Prasowane	blonka lekko biała, na powierzchni	—	Pigment żółty do oliwko- wego. Nie upływnia
Odżywkowe	—	—	Pigment oliwkowy żółto- -brązowy. Nie upływnia.
Bulion			
azotany syntetyczne	bezbarwna, blonka powierzchniowa	—	Pigment blado żółty. Zwarty wzrost denny. Azotany nie redukują się
azotany odżywkowe	bezbarwna blonka powierzchniowa	—	Pigment brązowy. Zwarty wzrost denny. Azotany nie redukują się do azotynów
Mleko z lakmusem	brązowe pierścienie na powierzchni	—	Lakmus redukuje się w 4 z 6 probówek. Peptonizacja nie zachodzi. pH=5,3

Tablica 4

Różnice pomiędzy *Streptomyces svaceus* i *Streptomyces hawaiiensis* ATCC 12236, UC 2504

	<i>Streptomyces svaceus</i>	<i>Streptomyces hawaiiensis</i> ATCC 12236, UC 2504
Barwa grzybni podstawowej*) Sporofory**)	White (W) do Gray (GY) Długie, proste i zagięte przy koń- cu (S) (Wiele podobnych do kan- delabrow)	White (W) do Yellow (Y) do do Red (R) Umiarkowanie krótkie rozcią- gnięte spirale (RA) do spiral (S)
Powierzchnia zarodników***)	Brodawki do wyrostków (Wy- rostki krótkie i rzadkie)	Wyrostki (Wyrostki krótkie do długich)
Żelatyna (W płytkach i pożywkowa)	Nie upływnia	Całkowicie upływnia
Mleko lakmusowe	pH=5,3	pH=6,1
Agar tyrozynowy (ISP-7)	50% melaniny dodatniej i 50% melaniny ujemnej	Melanina ujemna
Wytwarzanie antybiotyku	Wytwarza AT-125	Wytwarza bryamycynę

*) Tresner, H. D., i E. J. Backus. 1962. System of color wheels for streptomycete taxonomy. Appl. Microbiol. 11:335-338.

**) Pridham, T. G., W. C. Hesseltine, i R. G. Benedict. 1958. A guide for the classification of *Streptomyces* according to selected groups.

Placement of strains in morphological sections. Appl. Microbiol. 6:52-79.

***) Dietz, A., i John Mathews, 1970. Classification of *Streptomyces* spore surfaces into five groups. Appl. Microbiol. 21:527-533.

Uwaga: skrót UC w tablicy 4 oznacza kolekcję szczepów firmy Upjohn.

Nowy związek otrzymuje się sposobem według wynalazku przy użyciu opisanego powyżej drobnoustroju, na wodnym podłożu, w warunkach napowietrznej hodowli głębinowej. W celu otrzymania małych ilości związku można zastosować hodowlę powierzchniową lub w butli. Drobnoustroj wzrasta na podłożu, zawierającym źródło węgla, łatwo przyswajalne związki azotu oraz materiały proteinowe. Jako źródło węgla korzystnie stosuje się glukozę, cukier brunatny, sacharozę, glicerol, skrobię, skrobię zbożową, laktozę, dekstrynę, melasę i podobne. Jako źródła azotu korzystnie stosuje się wyciągi z ziarna zbożowego, drożdże, samorozpuszczalne drożdże browarnicze z suchą masą mleka, mączkę sojową, mączkę nasienia bawełny, mąkę zbożową, suchą masę mleka, trzuskowy wyciąg kazeiny, pozostałości gorzelnicze, roztwory zwierzęcych peptonów, skrawki mięsa i kości, itp.

Korzystnie stosuje się mieszaninę wyżej wymienionych substancji, stanowiących źródło węgla i azotu. Do podłoża fermentacyjnego nie dodaje się metali śladowych takich, jak cynk, mangan, magnez, kobalt, żelazo, jeżeli sporządzono je z nieoczyszczonych składników i wody wodociągowej. Związek, sposobem według wynalazku, wytwarza się w temperaturze, sprzyjającej wzrostowi drobnoustroju, w zakresie temperatur od 18° do 40°C, korzystnie w zakresie temperatur od 20° do 30°C. Ogólnie, optimum produkcji omawianego związku osiąga się w ciągu 2 do 10 dni. W czasie fermentacji podłoże wykazuje zazwyczaj odczyn słabo kwaśny ($\text{pH} = 5,5-7,0$). Końcowa wartość pH podłoża zależy, częściowo od obecności buforu (jeżeli takiego użyto), częściowo od wyjściowej wartości pH hodowli, którą przed wyjałowieniem doprowadza się korzystnie do około 7.

Jeżeli hodowlę prowadzi się w dużych naczyniach lub tankach, to korzystnie stosuje się do inokulacji postacię wegetatywną, a nie zarodnikową drobnoustrojów, co skraca czas wytwarzania nowego związku i zmniejsza zużycie surowców. Wegetatywne inokulum korzystnie otrzymuje się na podłożu bulionowym, za pomocą inokulacji tego podłoża drobnoustrojem, otrzymanym z gleby lub z hodowli na płytkach. Otrzymane w ten sposób młode, aktywne inokulum przenosi się aseptycznie do dużego naczynia lub tanku. Podłoże, na którym otrzymuje się wegetatywne inokulum może być takie samo, albo różne od tego, którego używa się przy wytwarzaniu omawianego związku, dopóki zapewnia ono korzystny rozwój drobnoustroju.

Antybiotyk AT-125 posiada charakter amfoteryczny, rozpuszcza się w wodzie i nieznacznie w metanolu. W celu izolacji i oczyszczenia antybiotyku AT-125 stosuje się wiele metod takich, jak: eluowanie korzystnym rozpuszczalnikiem, metody chromatografii kolumnowej i chromatografii podziałowej oraz krystalizacji z rozpuszczalników. Korzystny proces izolowania antybiotyku AT-125 polega na przesączeniu podłoża poprzez porowatą ziemię okrzemkową, na przykład FW-40 firmy Eagle Picher lub inne rodzaje ziemi okrzemkowej, dostępne w handlu pod następującymi nazwami: Super Cel (John Marvilles), Dicalite 4200 (Great Lakes), Miraflo 40 (Eagle Picher).

Czysty filtrat przeprowadza się przez kolumnę chromatograficzną, wypełnioną styrenem typu żywicy kwasu sulfonowego.

Korzystnie stosuje się Dowex-50 w postaci zredukowanej, dogodnie wysokousieciowany, na przykład Dowex-50 $\times$ 16, oraz odpowiednie żywice dostępne w handlu to: Amberlite IR-120, Nalcite HCR, Chempro C-20, Permutit Q oraz Zeokarb 225. Po przeprowadzeniu filtratu przez kolumnę antybiotyk wymywa się zasadą, korzystnie NH_4OH .

Fracje zawierające aktywny antybiotyk łączy się i zateża. Otrzymany, wodny koncentrat o pH obojętnym (6,2—7,8) korzystnie oczyszcza się przeprowadzając przez kolumnę wypełnioną słabą zasadą styrenową, typu żywicy poliamidowej lub żywicami: Amberlit IR 4B, nalcite WBR, DeAcidite E, Duolite A.2. Kolumnę przemywa się wodą, pozostawioną jonów, 50% wodnym roztworem metanolu i 90% wodnym roztworem metanolu, a następnie eluuje się 0,1 N kwasem octowym w 90% roztworze metanolu. Frakcje, zawierające aktywne substancje, łączy się i oddestylowuje z nich rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem. Metanol można zastąpić wodą. Pozostałość rozpuszcza się w dolnej warstwie mieszaniny rozpuszczalników, składającej się z n-butanolu, benzenu, metanolu i wody, pozbawionej jonów, w stosunku (2:1:1:1).

Otrzymany roztwór homogenizuje się z porowatą ziemią okrzemkową, na przykład Eagle Pichers FW 40, i z górną fazą mieszaniny rozpuszczalników, opisanych powyżej. Otrzymaną jednorodną zawiesinę umieszcza się na szczycie kolumny, wypełnionej porowatą ziemią okrzemkową, którą przygotowuje się w ten sposób, że początkowo miesza się ją z górną fazą opisaną powyżej mieszaniny rozpuszczalników, a następnie starannie z dolną fazą podanej mieszaniny. Tak przygotowaną masę wlewa się do kolumny i przemywa górną fazą mieszaniny rozpuszczalników, co powoduje dokładne ułożenie się wypełnienia. Aktywne eluaty z kolumny zbiera się, łączy i oddestylowuje rozpuszczalnik, suchą pozostałość krystalizuje się z dogodnego rozpuszczalnika, korzystnie z metanolu i otrzymuje się antybiotyk AT-125 w postaci krystalicznej. Do krystalizacji używa się również 95% etanol, uwodniony butanol i wodę.

Alternatywnie, antybiotyk AT-125 odzyskuje się z przesączu brzezki fermentacyjnej przez absorpcję na korzystnym wymienniku jonowym, na przykład na wymienniku Dowex 1 (OAc) przy wartościach $\text{pH}=9-10$ albo na IR 45 (OH^-) przy wartościach $\text{pH}=6-7$. Po przemyciu żywicą wody antybiotyk odzyskuje się, eluując kolumnę wodnym lub metanolem roztworem NH_4OH lub HOAc .

Ewentualnie odsączoną, czystą brzezkę fermentacyjną poddaje się absorpcji na węglu, a następnie antybiotyk eluuje się, korzystnie mieszaniną rozpuszczalników, na przykład uwodnionym acetonem.

Antybiotyk AT-125 sposobem według wynalazku izoluje się za pomocą chromatografii na żelu krzemionkowym, stosując do eluowania mieszaninę metanolu w chloroformie lub w CH_2Cl_2 , albo mieszaninę benzenu, albo toluenu z kwasem octowym i z 95% etanolem. Stężenie antybiotyku AT-125 w

różnych stadiach izolowania oznacza się za pomocą prób na płytkach, stosując hodowlę *Bacillus subtilis* na pożywce syntetycznej o podanym niżej składzie:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,7 g
KH_2PO_4	2,0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0 g
MgSO_4	0,1 g
Glukoza	2,0 g
Bacto Agar*)	15,0 g
Woda destylowana	1 litr
Roztwór soli nieorganicznych**)	1 ml

*) Bacto Agar firmy Difco Laboratories

**) Roztwór soli metali nierozpuszczalnych o następującym składzie:

$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	200 µg/ml
CoCl_2	100 µg/ml
CuSO_4	100 µg/ml
MnSO_4	2 mg/ml
CaCl_2	25 mg/ml
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5 mg/ml
ZnCl_2 *)	5 mg/ml

*) ZnCl_2 rozpuszcza się osobno, używając kropli 0,1 N HCL na 10 ml wody. Roztwór soli nieorganicznych ogrzewa się do chwili całkowitego rozpuszczenia składników, następnie przechowuje się w ciągu 24 godzin i przesącza sterylnie.

Tak otrzymane podłoże inokuluje się zawiesiną zarodników *B. subtilis* ($1,5 \times 10^{10}$ komórek/ml, zachowując stosunek 0,5 ml/litr. Próbkę brzeżki nakłada się na papierowe, chłonne krążki o średnicy 12,5 mm (w ilości 0,08 ml) krążek. Układ testowy inkubuje się przez noc w temperaturze 37°C, a następnie mierzy się strefy zahamowania. Aktywność próbki jest proporcjonalna do powierzchni strefy zahamowania, co jest zgodne z krzywymi standardowymi. Podłoże zaszczerpiętego drobnoustrojem *B. subtilis* używa się również do wykrywania AT-125 w następujący sposób: kawałki bibuły nasycą się górną warstwą mieszaniny rozpuszczalników o składzie: n-butanol, metanol, benzen, woda w stosunku (2:1:1:1). Następnie skrawki papieru suszy się w ciągu 20 minut, przetrzymuje na przezroczystych tackach, zawierających zaszczerpięte podłoże. Tacki te inkubuje się przez noc w temperaturze 37°C, a następnie obserwuje strefy zahamowania wzrostu drobnoustroju.

Antybiotyk AT-125 jako związek amfoteryczny, tworzy sole z kwasami, metalami alkalicznymi (również sole amonowe), z metalami ziem alkalicznych (również sole z magnezem i glinem) i z aminami. Sole z metalami przygotowuje się, rozpuszczając AT-125 w wodzie i dodając rozcieńczony roztwór zasady w zakresie pH=7—8. Jako sole z metalami stosuje się sole z jonami sodowymi, potasowymi lub wapniowymi. Sole z zasadami organicznymi takimi, jak: aminy pierwszo-, drugo-, trzecio-rzędowe oraz mono-, dwu- i poliaminy, otrzymuje się, stosując podane wyżej lub inne ogólnie stosowane sposoby. Sole amonowe otrzymuje się ogólnie zna-

nymi sposobami. Inne sole otrzymuje się z terapeutycznie czynnych zasad, przez co powiększa się działanie terapeutyczne nowego związku. Takimi zasadami są: teofilina, teobromina, kofeina lub ich pochodne zasady antyhistaminowe, które są zdolne do tworzenia soli ze słabymi kwasami, związki pirydynowe takie, jak: amid kwasu nikotynowego, hydrazyd kwasu izonikotynowego i podobne, fenyloalkiloaminy takie, jak: adrenalina, efedryna i inne oraz cholina i inne.

Sole adycyjne z kwasami otrzymuje się, zobojętniając antybiotyk AT-125 odpowiednim kwasem do wartości pH około 7, a korzystnie do wartości pH od około 2 do około 6. Używany do tego celu kwasami są: kwas chlorowodorowy, siarkowy, fosforowy, sulfamowy, bromowodorowy i inne. Sole zasadowe i kwasowe antybiotyku AT-125 stosuje się do tych samych celów biologicznych, co antybiotyk wyjściowy. AT-125 wykazuje aktywność przeciwko *Escherichia coli* i stosuje się go do ograniczenia lub zniszczenia śluzu, powstającego w młynach przy produkcji papieru. Antybiotyk AT-125 przedłuża życie hodowlom: *Trichomonas foetus*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis* oswobodzając je od zakażenia *Escherichia coli*. Antybiotyk AT-125 stosuje się jako czynnik przeciwwgrzybiczny do cholewek butów, jak opisano w patencie St. Zjedn. Ameryki o numerze 3130505. AT-125 wykazuje aktywność przeciwko *Bacillus subtilis* i może zmniejszyć lub zlikwidować zapach ryb lub skrzyń na ryby, wywołany przez ten antybiotyk; albo można go użyć do dezynfekcji pól i sprzętu w laboratoriach mykologicznych. Jest on również aktywny przeciwko L-1210 murine leukemia u myszy laboratoryjnych.

Podany niżej przykład ilustruje przedmiot wynalazku, nie ograniczając jego zakresu. O ile inaczej nie zaznaczono, procenty oznaczają procenty wagowe, a mieszaniny rozpuszczalników podano w stosunku objętościowym.

Przykład. Kolonię *Streptomyces svaceus* NRRL 5439, wyodrębnioną z gleby, inokuluje się w kolbie Erlenmeyera o pojemności 500 ml, zawierającej 100 ml sterylnego podłoża o następującym składzie:

Dextroza	25 g/ml
Pharamamedia*)	25 g/ml
Woda wodociągowa	do 1 litra

*) produkcji Traders Oil Mill Company, Forth Worth, Texas.

Wartość pH zakażonego podłoża, uprzednio wsterylizowanego, wynosi 7,2. Inokulum pozostawia się w ciągu dwóch dni, w temperaturze 28°C, na wytrząsarce rotacyjnej, typu Gump o 250 obrotach na minutę. Inokulum, przygotowane, jak opisano powyżej, używa się do inokulacji 500 ml kolby Erlenmeyera, zawierającej 100 ml sterylnego podłoża fermentacyjnego o następującym składzie:

Węglan wapnia	5 g/l
Chlorek sodu	2 g/l
Skrobia	10 g/l

Mannitol	10 g/l
Phytone*)	10 g/l
Kaysoy**)	10 g/l
Tłuszcz płynny	1 ml/100 ml
Woda wodociągowa	do 1 litra

*) wyciąg z mąki sojowej

**) dobrze zmielony ekstrakt tłuszczowy mąki sojowej.

Przed sterylizacją pH podłoża doprowadza się za pomocą 4N NaOH do wartości pH=7,2. Kolbę fermentacyjną inokuluje się stosując, na 100 ml podłoża fermentacyjnego, 5 ml inokulum. Kolby fermentacyjne pozostawia się w ciągu 2 do 3 dni, w temperaturze 32°C, na rotacyjnej wytrząsarce typu Gump, o 250 obrotach na minutę. Zasadniczo, maksymalne wytwarzanie antybiotyku AT-125 następuje w ciągu dwóch dni. Poniżej podano krzywą wytwarzania fermentacyjnego antybiotyku w wytrząsanej kolbie:

Czas w godzinach	Bu/ml dla AT-125
48	56
72	22
96	26
120	16

Jednostki aktywności biologicznej Bu określa się jako ilość antybiotyku potrzebną do otrzymania strefy zahamowania o średnicy 20 mm. Strefa zahamowania powstaje wokół krążka papierowego o średnicy około 13 mm, który nasycza się 0,08 ml badanego roztworu. Cechy płytki opisano powyżej.

Całą brzeczkę o objętości 250 l, otrzymaną podczas fermentacji, w sposób opisany powyżej, sączy się przez porowatą ziemię okrzemkową. Otrzymany czysty przesącz doprowadza się do wartości pH=7-8 i przeprowadza przez kolumnę chromatograficzną, wypełnioną 25 litrami świeżo zregenerowanego Dowex 50×16 (H⁺). Kolumnę przemywa się 50 litrami wody, pozbawionej jonów, a następnie eluuje 120 litrami 1N NH₄OH. Zbiera się frakcje 6 litrowe. Najbardziej aktywne frakcje (strefa zahamowania > 50 mm) oznacza się metodą krążków, zamoczonych w badanej frakcji, a następnie suszonych na powietrzu i metodą tacek, zawierających *Bacillus subtilis* (wzrost tego drobnoustroju na syntetycznym podłożu opisano powyżej). Frakcje aktywne łączy się i oddestylowuje rozpuszczalnik oraz nadmiar amoniaku pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany wodny koncentrat zawiera 2950 g, zaś aktywne eluaty 244 g. Ciała stałe w aktywnych eluatach są około 13 razy bardziej aktywne, niż ciała stałe w przesączu, otrzymanym z breczki (oznaczone metodą testu z *B. subtilis*).

Przygotowany, jak podano wyżej, aktywny eluat zatężony na Dowex-50, przesącza się przy pH o wartości od 7 do 7,5, przez kolumnę, wypełnioną 4 litrami Amberlitu IR-45 (OH⁻). Kolumnę przemywa się 8 litrami wody, pozbawionej jonów, 4 litrami 50% wodnego roztworu metanolu i 8 litrami 90% wodnego roztworu metanolu, a następnie kolumnę eluuje się 0,5 N kwasem octowym w 90% metanolu. Zbiera się frakcje 2 litrowe. Najbardziej aktywne

frakcje, oznaczone za pomocą testu na *B. subtilis*, łączy się oddestylowuje rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem i otrzymuje się 9,40 g suchej pozostałości o aktywności (oznaczenie wykonuje się przy użyciu testu na *B. subtilis*) 28 razy większej od aktywności eluatu, otrzymanego z Dowex-50.

Mieszaninę n-butanolu, benzenu, metanolu i wody, pozbawionej jonów, w stosunku (2:1:1:1) wytrząsa się, a następnie warstwy rozdziela się. Porowatą ziemię okrzemkową (2340 g) zawiesza się w górnej warstwie i wytrząsa starannie z porcją warstwy dolnej o objętości 900 ml. Powstałą zawiesinę wypełnia się warstwą mieszaniny, co powoduje dobre osadzenie się wypełnienia. Otrzymaną po oczyszczeniu sposobem opisanym powyżej na jonicie IR-45 substancję rozpuszcza się w 25 ml dolnej warstwy mieszaniny i homogenizuje z 75 g porowatej ziemi okrzemkowej oraz z 50 ml górnej warstwy mieszaniny. Otrzymaną, jednorodną masę nakłada się na szczyt wypełnionej kolumny i przemywa górną warstwą mieszaniny. Zbiera się 500 ml frakcje. Z frakcji, posiadających najwięcej substancji aktywnej (według testu na *B. subtilis*) oddestylowuje się rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem i otrzymuje 3,93 g pozostałości o aktywności wobec *B. subtilis* 2,9 razy większej, niż aktywność pozostałości, otrzymanej po oczyszczeniu na jonicie IR-45.

Sole antybiotyku AT-125 otrzymuje się sposobem opisanym powyżej. Sole te stosuje się do tych samych celów, co antybiotyk wyjściowy.

Zastrzeżenia patentowe

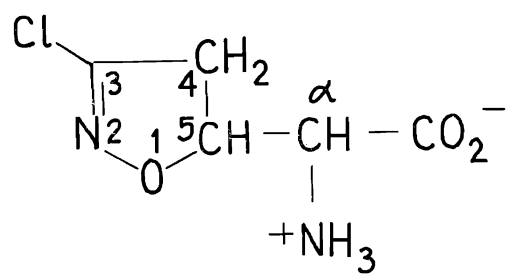
1. Sposób wytwarzania nowego antybiotyku AT-125, **znamienny tym**, że hodowlę drobnoustroju *Streptomyces svaceus* zdeponowanego pod numerem kolekcji NRRL 5439 prowadzi się na wodnym podłożu, zawierającym źródła przyswajalnego węglowodanu i przyswajalnego azotu, w warunkach tlenowych, dopóki wzrasta aktywność biologiczna w podłożu, spowodowana produkcją antybiotyku AT-125 i otrzymany antybiotyk wydziela się.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że podłoże fermentacyjne sączy się, przesącz adsorbuje się na wymienniaczu jonowym, antybiotyk AT-125 eluuje się z wymienniacza, a eluaty podaje się oczyszczaniu.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że jako wymienniacz jonowy stosuje się wysokousieciowany styren typu żywicy kwasu sulfonowego.

4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że stosuje się żywicę Dowex 50×16 w postaci zredukowanej.

5. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że antybiotyk AT-125 oczyszcza się metodą chromatografii na słabej zasadzie styrenowej typu żywicy poliamidowej, metodą chromatografii podziałowej oraz przez krystalizację.



Wzór