



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

195709
(11) (B2)

[51] Int. Cl.³
C 12 P 19/54

[22] Přihlášeno 06 07 75
[21] [PV 5472-75]

[32] [31] [33] Právo přednosti od 09 08 74
[496289] Spojené státy americké

[40] Zveřejněno 31 05 79

[45] Vydáno 15 05 83

[72]

Autor vynálezu

CELMER WALTER DANIEL, NEW LONDON, CULLEN WALTER PATRICK, EAST LYME, JEFFERSON MARK TILDEN, WATERFORD, ROUTIEN JOHN BRODERICK, LYME, SCIAVOLINO FRANK CHRISTIAN, EAST LYME a MOPPETT CHARLES EDWARD, MYSTIC (Sp. st. a.)

[73]

Majitel patentu

PFIZER INC., NEW YORK (Sp. st. a.)

[54] Způsob výroby nových antibiotik na bázi polycyklických etherů

1

Vynález se týká nových antibiotik na bázi polycyklických etherů s charakterem kyseliny, což je třída sloučenin biologicky charakterizovaných jejich účinkem na přenášení kationtů do mitochondrií. Tato skupina antibiotik zahrnuje:

monensin [J. Amer. Chem. Soc., 89, 5737, 1967],
nigericin [Biochem. Biophys. Res. Comm., 33, 29, 1968],
grisorixin [J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1421, 1970],
dianemycin [J. Antibiotics, 22, 161, 1969],
salinomycin [J. Antibiotics, 27, 814, 1974],
antibiotikum X-537A [J. Chem. Soc. Chem. Commun., 967, 1972],
antibiotikum X-206 [J. Chem. Soc. Chem. Commun., 927 1971],

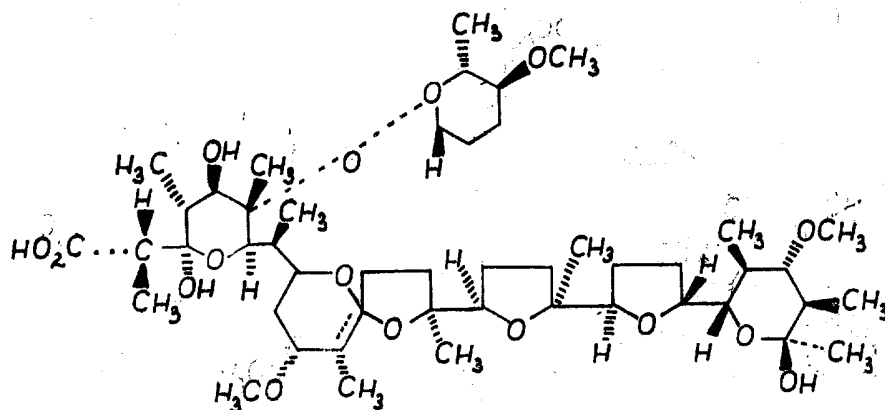
2

antibiotikum A204A [J. Amer. Chem. Soc., 95, 3399, 1973].

Antibiotika na bázi polycyklických etherů výše uvedené jsou aktivní proti gram-positivním bakteriím, houbám a prvokům. Vybíjejí výraznou aktivnost vůči kokciidům.

Patent US 3 839 557 popisuje způsob zlepšování využití krmiv přežvýkavci a monogastričnými zvířaty, živenými vláknitými hmotami rostlinného původu, kterým se podává monensin, dianemycin, nigericin nebo jiná antibiotika na bázi polycyklických etherů.

Vynález se týká nového antibiotika na bázi polycyklických etherů označovaného jako sloučenina 38 295 vzorce:



Uvedená antibiotická sloučenina se vyrábí tak, že se mikroorganismus *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 31050 kultivuje za teploty 28 až 36 °C ve vodném živném prostředí obsahujícím asimilovatelný zdroj uhlíku, dusíku a anorganických solí za submerzních aerobních podmínek a antibiotikum se izoluje buď oddělením z fermentační kapaliny extrakcí fermentační kapaliny organickým rozpouštědlem nemísitelným s vodou a chromatograficky koncentrovaného extraktu na sloupci silikagelu nebo odpařením fermentační kapaliny.

Mikroorganismus, jehož se používá k přípravě antibiotika podle vynálezu, byl izolován z půdního vzorku z Japonska. Pěstoval se v řadě živných půd používaných k identifikaci tohoto rodu a výsledek byl, že se dosáhlo v podstatě podobného popisu jaký platí pro *Streptomyces hygroscopicus*.

Kultura (Pfizer F. D. 23604) byla porovnávana v řadě charakterizujících význaků na různých živných půdách kulturou *Streptomyces hygroscopicus* 482,48, získanou z veřejné nizozemské sbírky kultur, Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS). Porovnání i rozhodování se prováděla na bázi popisu uvedeného druhu v *Applied Microbiology*, 4,243-250, 1956. Následují porovnání dvou kultur:

Morfologie řetězců spor.

Řetězce druhu Pfizer F. D. 23604 ve spirálách o 6 až 10 otáčkách nebo o menším počtu na různých živných půdách se podobaly popsáným řetězcům u *Streptomyces hygroscopicus* CBS, znázorněným na obr. 1 výše zmíněné práce.

Spory u druhu Pfizer F. D. 23604 se zkoumaly analýzou pod elektronovým mikroskopem a měly podobu přesně takovou jaká je u kmene CBS *Streptomyces hygroscopicus*, znázorněného v *Applied Microbiology*, 18, 695-696, kde jsou spory popisovány jako spory se zdrsňeným povrchem s mnohá důlky obklopovanými hrázi z materiálu stěn spor. Když se pro mikroskopické účely zbarvily, jevíly se obě kultury jako identické.

Barva kolonií.

Vzdušné mycelium se jevílo jako šedivé u řady živných půd, přesné odstínění se však u obou kultur je rozdílné. Kultura Pfizer 23604 na sacharóзовém agaru Czapek vykazovala růstové formy ztlustělé nepravidelně zvlněné, šedavě bílé, kdežto kultura kmene *S. hygroscopicus* CBS měla formu plochou, tenkou a šedou. Kultura Pfizer F. D. 23604 na agaru s ovesnou moukou po 4 týdnech inkubace vyvinula žluté vzdušné mycelium, které bylo napřed šedé. Kultura Pfizer F. D. 23604 na kvasničném výtažku a sladovém výtažku měla žluté růstové skvrny na šedém myceliu.

Na žádné z obou kultur na agaru pepton s železem se netvořil melanin.

Využití uhlíku.

Metoda Pridham a Gottlieb, *J. Bact.*, 56, 107 až 114, 1948).

Kmen Pfizer F. D. 23604 využíval glukosu, L-arabinosu, dextrin, D-fruktózu, D(+)-galaktosu, glycerin, inosit, inulin, laktosu, maltosu, D-mannit, rafinosu, rhamnosu, octan sodný, D-sorbit, sorbosu, škrob, sacharosu, trehalosu a D-xylosu. Dulcitu se nepoužívalo. Tyto výsledky souhlasí s výsledky uváděnými u kmenů *S. hygroscopicus* v *Applied Microbiology*, 15, 637-639, 1967 a u kmene *S. hygroscopicus* CBS uvedené v *Industrial Microbiology*, 10, 183-221 s výjimkou, že u kmene CBS se neutilovalo inositu.

Bylo dosaženo pozitivních výsledků, pokud jde o produkci sirovodíku, u obou kultur na peptonovém agaru s železem (šík-mý agar) s proužky octanu olovnatého.

U obou kultur, pokud jde o mléko, byly dosaženy stejné výsledky, nedocházelo ke koagulaci, úplná hydrolýza nebo přibližně úplná za 12 dní, zbarvení, rozpustný pigment.

Želatina

Kultury byly obdobné v růstu, zbarvení a mírném stupni ztekucení.

Speciální charakteristiky.

Kmen *S. hygroscopicus* CBS vyvinul během 3 týdnů na glukoso-asparaginovém agaru, ovesném agaru a agaru obsahujícím výtažek z droždí a ze sladu černé hygroscopické plochy, kdežto kmen Pfizer F. D. 23604 vykazoval černé skvrny jen na agaru s výtažkem droždí a sladu. Další inkubace po dobu 1 týdne a uskladnění na kulturách na Petriho miskách při 4 až 10 °C po dobu 4. týdne zvýšilo zčernání u kultur Pfizer F. D. 23604. Kmen Pfizer F. D. 23604 na ovesném agaru na sacharóзовém agaru Czapek a na agaru s výtažkem droždí a sladu vytvářel pach podobný jako je pach plané cibule nebo česneku s určitým zemitým zápachem, kdežto *S. hygroscopicus* CBS vyvíjel jen zemitý zápach a u tohoto kmene není nikde popsán zápach po plané cibuli. Kmen Pfizer F. D. 23604 *S. hygroscopicus* produkuje sloučeninu 38 295, jež je nové antibiotikum na bázi polycyklického etheru, kdežto *S. hygroscopicus* CBS toto antibiotikum neprodukuje a nebyly podány žádné zprávy o produkci tohoto antibiotika pokud jde o jiné kmeny *S. hygroscopicus*.

Kultura Pfizer F. D. 23604 byla uložena v americké sbírce typových kultur (The American Type Culture Collection, Rockville, Md.) a dostala označení v této sbírce jako ATCC 31050.

Kultivace *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 31050 se provádí s výhodou ve vodné živné půdě za teploty 28 až 36 °C v submerzní aerobní kultuře za míchání. Živná půda, která je použitelná pro tyto účely, zahrnuje zdroj asimilovatelného uhlíku, jako cukru, škrobu a glycerinu, dále obsahuje zdroj organického dusíku, jako je kasein nebo produkt enzymatického odbourávání kaseinu, sójovou mouku, bavlníkové pokrutiny, podzemnicovou mouku, pšeničný lepek, sójové pokrutiny, masovou a rybí moučku. S výhodnými výsledky lze také používat zdrojů podporujících růst jako rozpustné zrnité složky a výtažek z droždí, stejně jako soli, jako chlorid sodný, uhličitán vápenatý a stopové prvky jako železo, hořčík, zinek, kobalt a mangan. Jestliže během fermentace dochází k nadměrnému pění, lze používat protipěnicí přísady jako rostlinné oleje nebo silikony, jež se přidávají do fermentačního prostředí. Větrání živné půdy v nádržích pro submerzní růst se s výhodou provádí v míře přibližně půl až dva objemy čerstvého vzduchu na objem kapalné živné půdy za minutu. Míchání se může provádět pomocí míchadel běžných v kvasném průmyslu. Je třeba ovšem udržovat aseptické podmínky při přenášení organismu a během růstu.

Očkovací látka pro přípravu antibiotika se může získat používáním dílčích kultur. Růst organismu se může provádět očkováním buď do lahví nebo očkovací nádrží nebo alternativně lze očkovací nádrže očkovat kulturami z třepacích lahví. Kultura v tre-

pacích lahvích obecně dosáhne svého maxima za 3 až 5 dní, kdežto očkovací látka v submersních očkovacích nádržích se obvykle dosáhne za nejpriznivější období 2 až 3 dnů. Dosáhne se výrazné antibiotické aktivity v koncovém fermentačním stadiu přibližně za 3 až 5 dní. Míra množství antibiotika se pohybuje mezi 50 až 500 mg/litr.

Způsob výroby antibiotika se výhodně provádí tak, že se během fermentace provádí biologické testování kultury a to tak, že se použije citlivých kmenů *Staphylococcus aureus* nebo *Bacillus subtilis*. Používá se standardní talířové zkušební metody, kde se použije jako měřítko pro antibiotickou účinnost pásma inhibice, které obklopuje kotouč filtračního papíru nasáklý živnou půdou.

Pro analýzu antibiotika vyrobeného ve fermentační živné půdě a pro analýzu skladby surového i vyčištěného materiálu extrahovaného z fermentačních živných půd je užitečným nástrojem chromatografie v tenké vrstvě při níž se používá silikagelu. Chromatogram v tenké vrstvě po vyvíjení octanem ethylnatým se postříkuje 3% roztokem vanilinu v ethanolickeém roztoku kyseliny sírové (98,5:—1,5 %, obj./obj.) načež se zahřeje na 60 až 80 °C po několik minut. Antibiotikum se pozoruje jako zářivě růžovo červená skvrna s bílým pozadím.

Antibiotická sloučenina 38 295 se může oddělovat a získávat z vyčištěné fermentační živné půdy extrakcí organickým rozpouštědlem jako chloroformem, octanem ethylnatým nebo methylisobutylketonem. Hlavní podíl antibiotika je obsažen v odděleném myceliu a výhodně se extrahuje z něho tím, že se vytváří suspenze mycelia v rozpouštědle rozpustném ve vodě, jako je methanol.

Výhodný způsob oddělování a získávání antibiotické sloučeniny 38 295 je tento:

Úhrnná nefiltrovaná fermentační kapalina se dvakrát extrahuje za použití přibližně 1/5 až 1/2 objemového množství methylisobutylketonu. Extrakt v rozpouštědle se koncentruje na olejovitý odparek, který se pak suspenduje do směsi chloroformu a hexanu v poměru 1:1 a vnáší se na sloupec silikagelu (s výhodou se na silikagel 60 naskládá vrstva silikagel PF254, oba produkty firmy E. Merck, Darmstadt). Sloupec silikagelu se postupně vyvíjí hexanem, směsí chloroform:hexan (1:1) a chloroformem. Hlavní antibiotická frakce se eluuje octanem ethylnatým. Eluát se koncentruje ve vakuu, vyjme do acetonu a míchá se asi 30 až 60 minut s aktivovaným dřevěným uhlím (Darco G 60). Dřevěné uhlí se oddělí filtrací, roztok se koncentruje na malý objem ve vakuu, přidá se malé množství vody a pH se upraví hydroxidem sodným na 8,0 až 8,5. Krystalický materiál se oddělí filtrací, promyje vodou a vysuší.

Antibiotikum izolované v tomto stupni je směšová sodná a draselná sůl sloučeniny 38 295, vytvořená působením sodných i dra-

selných iontů, vyskytujících se ve fermentační kapalině a získaná z přidaného hydroxidu sodného. Chromatogramy v tenké vrstvě mohou ukázat přítomnost stopových množství alespoň dvou dalších vícepolárních antibiotik, která podobně jako sloučenina 38 295 vykazuje charakteristické růžovo-červené skvrny při postříkání vanilinem v ethanolickém roztoku kyseliny sírové.

Sloučenina 38295 se může získat jako čistá jednotka sloupcovou chromatografií na silikagelu PF₂₅₄ za použití hexanu. Směsné sodnodraselné soli se přidávají jako roztok v octanu ethylnatém nebo chloroformu a kolona se vyvíjí pod tlakem 5,5 kp/cm² za použití hexanu obsahujícího rostoucí podíly octanu ethylnatého. Pokrok v oddělování se sleduje chromatografií v tenké vrstvě. Vhodné frakce se kombinují, odpaří ve vakuu a antibiotikum vykřystaluje ve směsi acetonu a vody.

Volná kyselina sloučeniny 38295 se může získat ze směsné sodnodraselné soli úpravou pH v octanu ethylnatém nebo chloroformu na 4,5 zředěnou kyselinou fosforečnou. Organická vrstva se vysuší bezvodým síranem sodným, odpaří ve vakuu a odparek vykřystaluje ze směsi chloroformu a hexanu.

Sodná sůl sloučeniny 38295 se může získat

tak, že se roztok ethylacetátu nebo chloroformu volné kyseliny upraví na pH 8,5 1 N roztokem hydroxidu sodného. Látka vykřystaluje z acetonu a vody. Krystalická draselná sůl se obdobně získá za použití hydroxidu draselného místo hydroxidu sodného.

Krystalická sůl stříbra se může připravit přidáním vodného roztoku dusičnanu stříbrného do ethanolického roztoku směsné sodnodraselné soli sloučeniny 38295. Další snadno získatelné sloučeniny jsou soli sloučenin 38295 měďnaté, zinečnaté, amonné, vápenaté, hořečnaté a lithné. Vzhledem k finálnímu způsobu použití pro bránění a léčení kokcidie drůbeže lze celou fermentační kapalinu obsahující sloučeninu 38295 vysušit, s výhodou sušením vymrazováním, a přidávat do krmiva drůbeže v množství odpovídajícím požadované úrovni antibiotického působení.

Sloučenina 38295 se vyznačuje inhibičním účinkem proti růstu řady mikroorganismů, jak plyne z dále uvedené tabulky I. Zkušební organismy se očkují do řady zkušebních nádob obsahujících živnou půdu a rozdílné koncentrace sloučeniny 38295, aby se zjistila minimální koncentrace antibiotika v mcg/ml, která inhibují růst organismu během 24 hodin.

Tabulka I

Organismus	Sloučenina 38295 (směsná sodnodraselná sůl)	Sloučenina 38295 (volná kyselina)
<i>Staphylococcus aureus</i> 01A005	0,78	0,39
01A052	0,78	3,12
01A109	0,78	0,78
01A110	0,39	1,56
01A400	0,39	1,56
<i>Streptomyces faecalis</i>	0,20	1,56
<i>Streptomyces pyogenes</i>	<0,10	<0,10
<i>Neisseria sicca</i>	<0,10	<0,10
<i>Bacillus subtilis</i>	<0,10	<0,10
<i>Lactobacillus casei</i> var <i>casei</i>	1,56	—
<i>Lactobacillus cateniforme</i>	0,78	—
<i>Clostridium innocuum</i>	0,20	—
<i>Clostridium bifermentans</i>	0,78	—
<i>Treponema hyodysenteriae</i>	0,39	—

Sloučenina 38295 a její soli mají vynikající aktivnost proti kokcidioze u drůbeže. Když se přidávají do potravy kuřat v množství 15 až 250 ppm, jsou tyto sloučeniny účinné k potírání infekcí vyvolaných jak jednotlivými mikroorganismy *Eimeria tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima* a dalšími tak i proti infekcím smíšeným vyvolaným těmito mikroorganismy.

Údaje o účinnosti sloučeniny 38292 a jejích solí proti infekční kokcidioze u kuřat se získají dále uváděným způsobem. Skupiny 3 až 5denních kuřat druhu SPF bílé leg-hornky, (kohoutci) se krmí smíšenou dietou obsahující sloučeninu 38295 nebo některou

z jejích solí, která je jednotně z ní dispergována. Po krmení tímto způsobem asi 24 hodiny každé kuře je očkováno per os jednotlivými druhy *Eimeria*, které se zkouší. Další kuřata krmená krmivem bez antibiotika se obdobně infikují a slouží jako kontrolní zvířata infikovaná. Neinfikovaná a léčebnému postupu nepodrobená kuřata tvoří normální kontrolní zvířata. Výsledky ošetření se hodnotí po 5 dnech, v případě *Eimeria acervulina* a po 6 dnech u všech ostatních druhů *Eimeria*.

Tabulka II vyjadřuje výsledky získané za použití směsné sodnodraselné soli sloučeniny 38 295.

Tabulka II

Infikující organismus sp.	Dávka (ppm)	Průměrný stupeň infekce*		Stupeň poškození* (poměr)	
<i>Elmeria tenella</i>	250	0,0		0,0	
	125	0,0		0,0	
	60	0,7		0,21	
	30	1,7		0,54	
	15	2,7		0,86	
<i>Elmeria acervulina</i>	250	0,0		0,0	
	125	0,2		0,1	
	60	0,0		0,0	
	45	0,4		0,2	
	30	1,2		0,6	
	15	2,0		1,0	
<i>Elmeria necatrix</i>	250	0,0		0,0	
	125	0,2		0,13	
	60	0,2		0,13	
<i>Elmeria maxima</i>	250	0,0		0,0	
	125	0,0		0,0	
	60	0,4		0,25	
	45	0,6		0,33	
	30	0,8		0,44	
	15	1,8		0,66	
<i>Elmeria brunetti</i>	250	0,4		0,22	
	125	0,4		0,22	
	60	0,8		0,44	
	45	1,2		0,66	
	30	1,6		0,88	
	15	1,6		0,88	
infekce směsí mikroorganismů (Coccivac D, Sterwine Laboratories, Opelika, Alabama)	250	0,0	0,0**	0,0	0,0
	125	0,2	0,4	0,08	0,18
	60	0,2	0,0	0,08	0,0
	50	1,0	0,6	0,38	0,21
	40	1,2	1,0	0,46	0,35
	30	2,6	2,0	0,85	0,71

Poznámka:

* Pro měření antioctidiosní aktivity se používá jako hodnotícího měřítka stupnice míry poškození od 0 do 4 pro *E. tenella* (J. E. Lynch, Am. J. Vet. Res. 22,324—326, [1961]) a 0 až 3 pro další druhy (J. Johnson a W. H. Reid, Exp. Parasit., 28,30—36, 1970). Konstantní poměr je stanoven tím, že se dělí stupeň poškození u každé skupiny, která byla ošetřena, stupněm poškození infikovaných kontrolních zvířat.

** První číslo se vztahuje na poškození vnitřnosti a druhé číslo na poškození zraku.

Podobné výsledky se mohou dosáhnout za použití volné kyseliny, sodné soli, draselné soli nebo vysušeného fermentačního prostředí obsahujícího sloučeninu 38295 v dávkách potravin za požadované úrovně antibiotické účinnosti.

Vlastnosti sloučeniny 38295 podtrhující růst jsou vysvětlovány zkouškami prováděnými na chovaných domácích zvířatech.

Mladé jalovičky angussko-aberdeenského skotu se libovolně rozdělí do ohrad — 5 zvířat na ohradu — a dodává se jim pes os sloučenina 38295, například ve vodě k pití apod. Sloučenina se ovšem výhodně a snadno dodává z hlediska aktivity tak, že se vpracuje do krmivových přípravků v množství 11 až 33 ppm. Sloučenina 38295 může být v různých formách jako volná kyselina, sodná sůl, draselná sůl, směsné sodnodraselné soli nebo jako usušená fermentační kapalina produkovaná mikroorganismem *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 31050.

Krmivové směsi se sloučeninou 38295 nebo bez této přísady se podávají v libovolném množství zkušebními zvířatům. Krmivová směs obsahuje 12,5 % bílkovin, 75:25 koncentráty v objemovém krmivu pro hovězí dobytek v upravených dávkách obsahujících kukuřici, sójovou moučku, moučku z vojtěšky, fosforečnan vápenatý, melasu, vitaminy a stopové prvky. Sloučenina 38295 je obsažena v předběžné směsi spolu s mletou kukuřicí s minerály a vitaminy.

Základní dávka

(12,5 % bílkoviny — 75:25, koncentrát: dávka objemového krmiva pro hovězí dobytek)

složky:	procent:
mletá kukuřice	55,6
sójová mouka, 48 % bílkovin	6,3
mouka z vojtěšky, 17 % bílkovin	25,0
sušená melasa*	10,0
sójový olej	2,0
fosforečnan vápenatý (24 % vápníku, 18,5 % fosforu)	0,40
stopové minerální soli**	0,50
směs vitaminů a minerálů***	0,20

Poznámka:

* Třtinová melasa na nosiči tvořeném rozmělněnou kukuřičnou hmotou, nikoliv méně než 3 % surové bílkoviny, nikoliv více než 15 % vláknin, nikoliv méně 42 % inertního cukru, nejvýše 6 % vody.

** Poskytuje tuto míru stopových prvků v milióntinách: mangan 10, železo 6,25, měď 1,25, jod 0,025, kobalt 0,86, zinek 45.

*** Vytváří tyto úrovně vitaminů na 454 g

krmné dávky: vitamin A 1497 M.J.; vitamin D 200 M.J.; vitamin E 25 M.J.

Předběžná směs

Složky:	Množství (1816 g)
Vitamin A dodatekový (30,000 M.J./g)	100 g
vitamin D ₃ dodatekový (200,000 M.J./g)	2,00 g
vitaminový dodatek (0,27000 M.J./g)	182 g
kysličník zinečnatý (79,4 % zinku)	38,0 g
uhlíčitan kobaltnatý (45 % kobaltu)	1,70 g
sójová drť nebo jemně mletá kukuřice	1485 g
sloučenina 38295	40,0 g

454 g předběžné směsi na tunu úplné dávky vytváří výslednou úroveň množství sloučeniny 38295 činící 11 ppm.

Tabulka III vysvětluje výsledky pokusu trvajících 28 dní, který se získal u tří opakovaných skupin po 5 telatech v ohradě, přičemž přibližná počáteční hmotnost telat byla 115 kg u každého telete.

Tabulka III

[směsné soli sodnodraselné sloučeniny 38295]

Působení (ppm)	Průměrný denní přírůstek		Průměrná denní krmná dávka		Krmivo/přírůstek	
	kg	index	kg	index	poměr	index
kontrola	0,56	100,0	6,32	100,0	1,92	100,0
sloučenina 38295 (11)	0,64	110,6	5,68	95,1	1,65	117,0
sloučenina 38295 (33)	0,67	116,9	5,58	87,3	1,43	136,0

V podstatě stejné výsledky se mohou dosáhnout za použití volné kyseliny, sodné soli, draselné soli nebo sušené fermentační kapaliny se sloučeninou 38295.

Porovnatelných výsledků se může dosáhnout i u jiných přežvýkavců, jako ovcí nebo u monogastričních zvířat, jako koní, prasat a králíků.

Aktivní sloučenina 38295 se může podávat spolu s krmivem nebo nápojem pro zvířata nebo se může použít z předběžné směsi pro smíšení s krmivem nebo nápojem pro zvířata. Kapalným antibiotickým koncentrátem v premixu pro přidávání do vody k pití ke zvýšení krmivové účinnosti u zvířat se může připravit v požadovaných koncentracích rozpouštěním ve vhodném rozpouštědle jako je ethanol nebo propylenglykol sloučeniny 38295.

Kapalným premixovým koncentrátem

Kapalným antibiotickým premixovým koncen-

trát vhodný pro přidávání do pitné vody pro zvířata se může připravit v požadovaných koncentracích rozpouštěním v přiměřeném rozpouštědle jako ethanolu nebo propylenglykolu antibiotické látky 38295.

Příklad 1

Připraví se sterilní vodná živná půda o následujícím složení:

	g/l
glukosa	10,0
rozpuštěný škrob	20,0
výtažek z droždí	5,0
produkt enzymatického odbourávání kaseinu	5,0
masová moučka	5,0
uhlíčitan vápenatý	1,0

pH — 7,0

Buňky kmene *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 31050 se přenášejí do série lahví o 300 ml, z nichž každá obsahuje 50 ml uvedené sterilní živné půdy a protřepávají se na rotační třepačce 3 až 4 dni při 28 až 38 °C. 5 ml alikvótních podílů takto namnožené očkovací látky se přenesou asepticky do 300 mililitrů velkých lahví obsahujících každá 100 ml výše popsané sterilní živné půdy. Po protřepávání 3 až 4 dni při 28 až 30 °C se přenesou namnožená očkovací hmota do čtyřlitrových fermentačních nádob, z nichž každá obsahuje 2 litry následující sterilní živné půdy:

	g/l
glukosa	10,0
kukuřičný škrob	10,0
sójová mouka	10,0
rozpustné složky z obilí	5,0
chlorid sodný	5,0
uhličitan vápenatý	1,0

pH — 6,6

Fermentace se provádí 90 až 120 hodin při 28 až 36 °C za míchání při 1700 otáček/min. a za větrání tak, že se přivádí za minutu asi 1 objem vzduchu na 1 objem živné půdy. Velké fermentační nádoby obsahující od 300 l do 37 000 l živné půdy se může očkovat asi 2 % této namnožené očkovací látky. Fermentace se dokončí až když se antibiotická účinnost dosáhla nejméně 50 mg/litr (90 až 120 hodin).

100 litrů úplné nefiltrované fermentační kapaliny se 2X extrahuje 1/5 objemového množství methylišobutylketonu. Oddělený extrakt v rozpouštědle se koncentruje ve vakuu na olejovitý zbytek (769 g), který se disperguje na silikagelu tak, že se přidává do roztoku ve 2 litrech chloroformu na jeden kg silikagelu PF₂₅₄, načež se rozpouštědlo suspenduje do 2 l směsi chloroformu a hexanu (1:1) a nalije se na lože 300 g silikagelu, na které se umístí vrstva 300 g silikagelu PF₂₅₄. Silikagel se pak postupně promývá 5,6 l hexanu, 5,6 l chloroformu s hexanem (1:1) a 5,6 chloroformu. Antibiotikum se eluuje 3,8 l octanu ethylnatého. Octan ethylnatý se ve vakuu odpaří a odparek (38 g) se rozpustí ve 400 ml acetonu. Acetonový roztok se míchá za teploty místnosti přibližně 40 minut s přibližně 40 g aktivovaného dřevěného uhlí (Darco G 60). Po filtraci se provádí koncentrace přibližně na 200 ml a zředí se 100 ml vody. Sloučenina 38295 se odděluje jako směsná sodnodraselná sůl a pH se upraví na 8,5 přidáním 1 N roztoku hydroxidu sodného. Krystalická látka (13,8 g) se rozpustí v octanu ethylnatém a chromatografuje se na koloně silikagelu PF₂₅₄ za použití hexanu. Sloupec se vyvíjí při tlaku 5,6 kp/cm² hexanem za použití rostoucích množství octanu ethylnatého. Postup oddělování se sledu-

je chromatografií v tenké vrstvě. Vhodné frakce se kombinují, odpaří ve vakuu a čistá sloučenina krystaluje ze směsi acetonu a vody.

Čistá krystalická směsná sodnodraselná sůl sloučeniny 38295 má teplotu tání 200 °C a optickou otáčivost $[\alpha]_D^{25} = +36^\circ$ za koncentrace 1% v methanolu. Po vysušení ve vakuu přes noc při 70 °C kyslíčnickem fosforečným je výsledná analýza na uhlík 60,58 % a vodík 8,56 %.

Sloučenina je rozpustná v methanolu, ethanolu, acetonu, chloroformu, methylenchloridu, diethyletheru, octanu ethylnatém a methylišobutylketonu. Je částečně rozpustná v hexanu a nerozpustná ve vodě.

Směsná sodnodraselná sůl sloučeniny 38295 nemá žádné charakteristické absorpční čáry v ultrafialovém spektru.

Na obr. 1 je znázorněno infračervené spektrum směsné soli sodnodraselné. Sodnodraselná sůl vykazuje charakteristické absorpční čáry v infračervené oblasti u následujících vlnových délek vyjádřených v mikronech: 2,92, 3,40, 6,27, 6,85, 7,22, 8,40, 9,00, 9,15, 9,25, 9,48, 9,98, 10,45, 10,68 a 11,45.

Příklad 2

Opakuje se způsob podle příkladu 1 za použití vyčerené fermentační kapaliny místo úplné nefiltrované fermentační kapaliny.

Příklad 3

Mycelium oddělené od vyčerené fermentační kapaliny podle příkladu 2 se několikrát suspenduje v methanolu, methanolový extrakt se vakuově koncentruje a odparek se zpracuje jako v příkladu 1.

Příklad 4

Fermentační postup podle příkladu 1 se opakuje za použití fermentační živné půdy o tomto složení:

	g/l
glukosa	20,0
kukuřičný škrob	10,0
sójová muoka	10,0
rozpustné složky obilí	5,0
síran železitý	0,2
chlorid manganičitý	0,2
uhličitan vápenatý	1,0
chlorid sodný	5,0
methylester kyseliny olejové	2,0
sójový olej	2,0

pH 6,6—6,7

Na konci fermentačního cyklu se úhrn nefiltrované fermentační sušiny vysuší do sucha sušením rozprašováním.

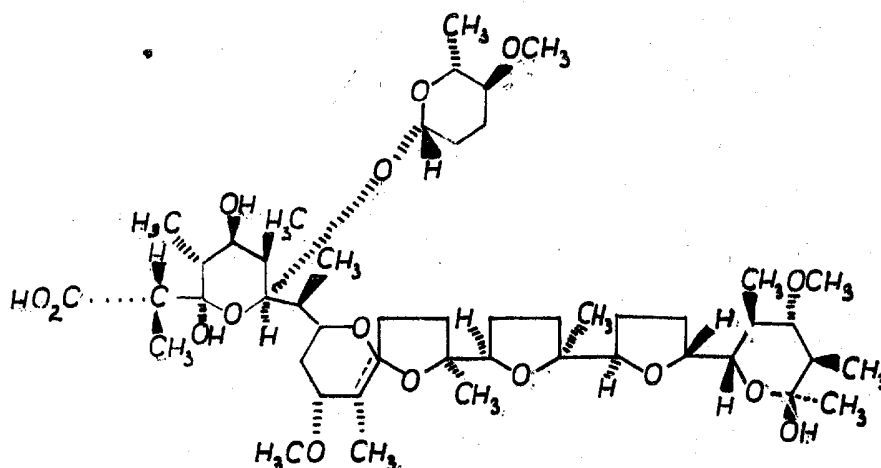
Příklad 5

Smíšená sodnodraselná sůl sloučeniny 38295 se rozpustí v octanu ethylnatém a pH se upraví zředěnou kyselinou fosforečnou na 4,5. Vrstva, kterou tvoří rozpouštědlo, se vysuší bezvodým síranem sodným, odpaří se ve vakuu a odparek krystaluje ze směsi chloroformu a hexanu a získá se krystalická sůl, která má teplotu tání 135 až 138 °C a optickou otáčivost $[\alpha]_D^{25} = +38^\circ$. Při 1% koncentraci v methanolu. Po vakuovém vysušení přes noc při 70 °C za použití kysličníku fosforečného obsahuje směs v průměru 61,65 hmot. % uhlíku, 8,94 hmot. % vodíku a

29,41 hmot. % kyslíku (diferenčně). Volná kyselina sloučeniny 38295 nemá žádné charakteristické kresby v ultrafialovém světle.

Infračervené spektrum volné kyseliny sloučeniny 38295 je na obr. 2. Sloučenina vykazuje charakteristickou absorpci v infračervené oblasti u následujících vlnových délek v mikronech: 2,92, 3,43, 5,47, 6,85, 7,25, 7,35, 8,28, 8,60, 8,80, 9,00, 9,15, 9,80, 10,10, 10,45, 10,68, 10,98 a 11,13.

Analýza krystalu stříbrné soli sloučeniny 38295 paprsky X vede ke zjištění strukturního vzorce



Příklad 6

Sodná sůl sloučeniny 38295 se získá přidáním 1 N roztoku hydroxidu sodného do roztoku volné kyseliny podle příkladu 5, vykazujícího pH 8,5 v octanu ethylnatém. Materiál vykrystalovaný ze směsi acetonu a vody má teplotu tání 197 až 198 °C a optickou otáčivost $[\alpha]_D^{25} = +38^\circ$ při 1% koncentraci v methanolu. Po vysušení ve vakuu přes noc při 70 °C kysličníkem fosforečným obsahuje podle analýzy sodná sůl 60,28 % uhlíku a 8,76 % vodíku.

Na obr. 3 je znázorněno infračervené spektrum sodné soli sloučeniny 38295. Sloučenina vykazuje charakteristickou absorpci v infračervené oblasti na těchto vlnových délkách v mikronech: 2,94, 3,40, 6,25, 6,85, 7,20, 7,45, 8,38, 9,00, 9,27, 9,48, 10,00, 10,45, 10,65, 10,90, 11,13 a 11,47.

Příklad 7

Draselná sůl sloučeniny 38295 se připraví jako v příkladu 6 za použití hydroxidu draselného místo hydroxidu sodného. Látka vykrystalovaná z acetonu a vody má teplotu tání 196 až 199 °C a optickou otáčivost $[\alpha]_D^{25} = +38^\circ$ při 1,02% koncentraci v me-

thanolu. Po vysušení ve vakuu přes noc při 60 °C kysličníkem fosforečným obsahuje sloučenina podle analýzy 60,58 % uhlíku a 8,70 % vodíku.

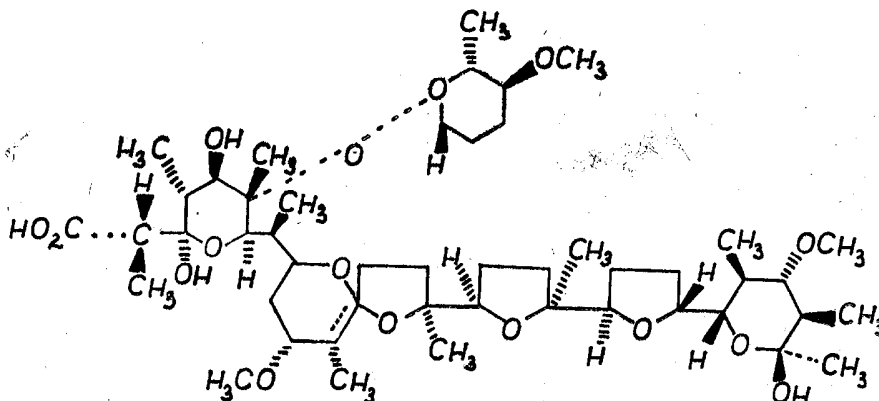
Na obr. 4 je připojeno infračervené spektrum draselné soli sloučeniny 38295. Sloučenina vykazuje charakteristickou absorpci v infračervené oblasti v těchto vlnových délkách v mikronech: 2,94, 3,42, 6,27, 6,84, 7,20, 8,75, 9,00, 9,14, 9,30, 9,45, 10,45, 10,92, 11,45 a 11,47.

Příklad 8

Stříbrná sůl sloučeniny 38295 se připraví přidáním vodného roztoku dusičnanu stříbrného do ethanolického roztoku směsové sodnodraselné soli podle příkladu 1. Pevná látka která se odděluje, vykrystaluje z methanolu. Má teplotu tání 198 až 200 °C a optickou otáčivost $[\alpha]_D^{25} = +27^\circ$ při 0,82% koncentraci v methanolu. Průměrné složení vzorku vysušeného ve vakuu přes noc při 70 °C kysličníkem fosforečným činí 55,95 % uhlíku a 7,89 % vodíku. Molekulová hmotnost krystalické soli stříbra a sloučeniny 38295 podle zjištění paprsky X je 1080 ± 4 atomové hmotnosti jednotky.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby nových antibiotik na bázi
polycyklických etherů vzorce

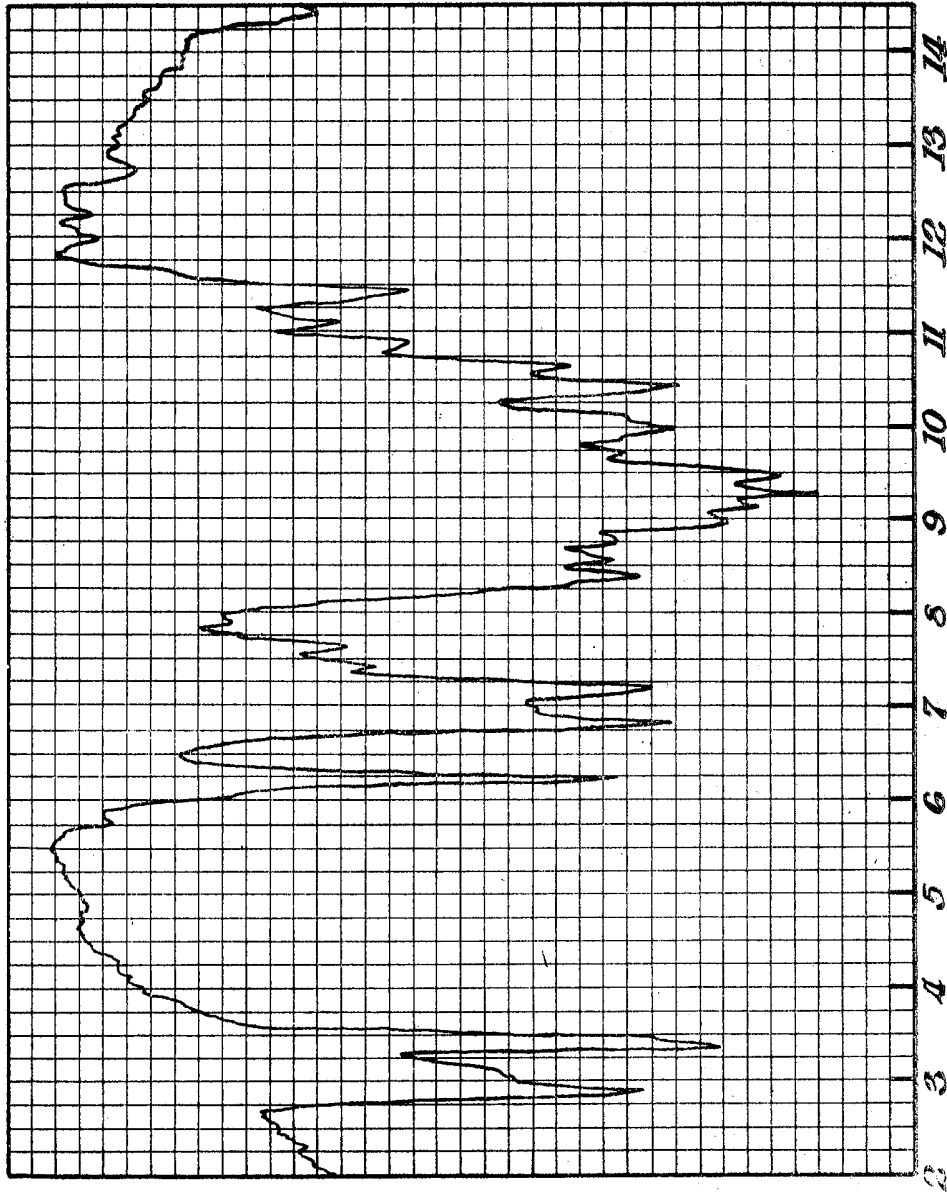


vyznačený tím, že se mikroorganismus *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 31050 kultivuje za teploty 28 až 36 °C ve vodném živném prostředí obsahujícím asimilovatelný zdroj uhlíku, dusíku a anorganických solí za submerzních aerobních podmínek a antibiotikum

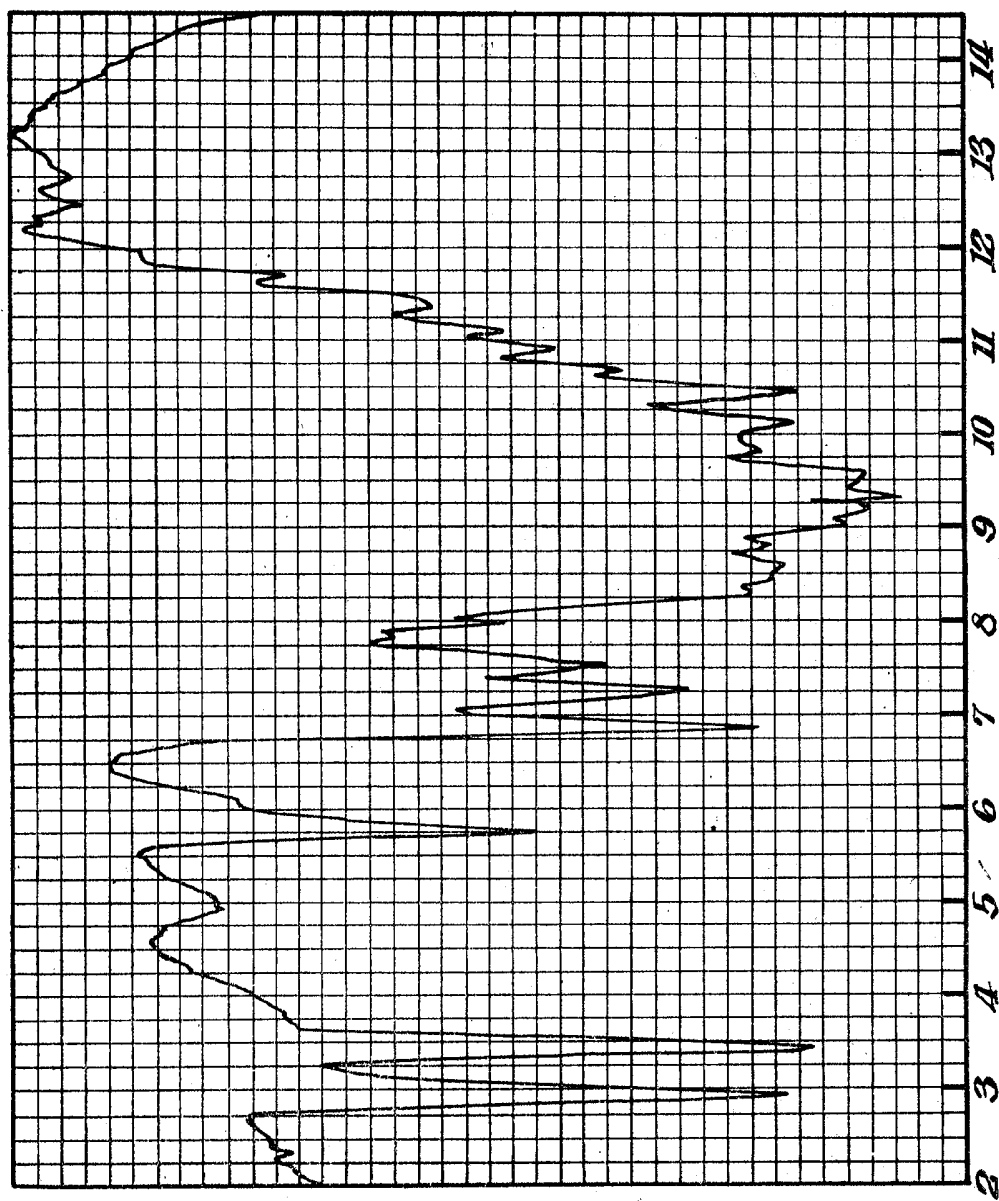
se izoluje buď oddělením z fermentační kapaliny extrakcí fermentační kapaliny organickým rozpouštědlem nemísitelným s vodou a chromatografií koncentrovaného extraktu na sloupci silikagelu, nebo odpařením fermentační kapaliny.

4 listy výkresů

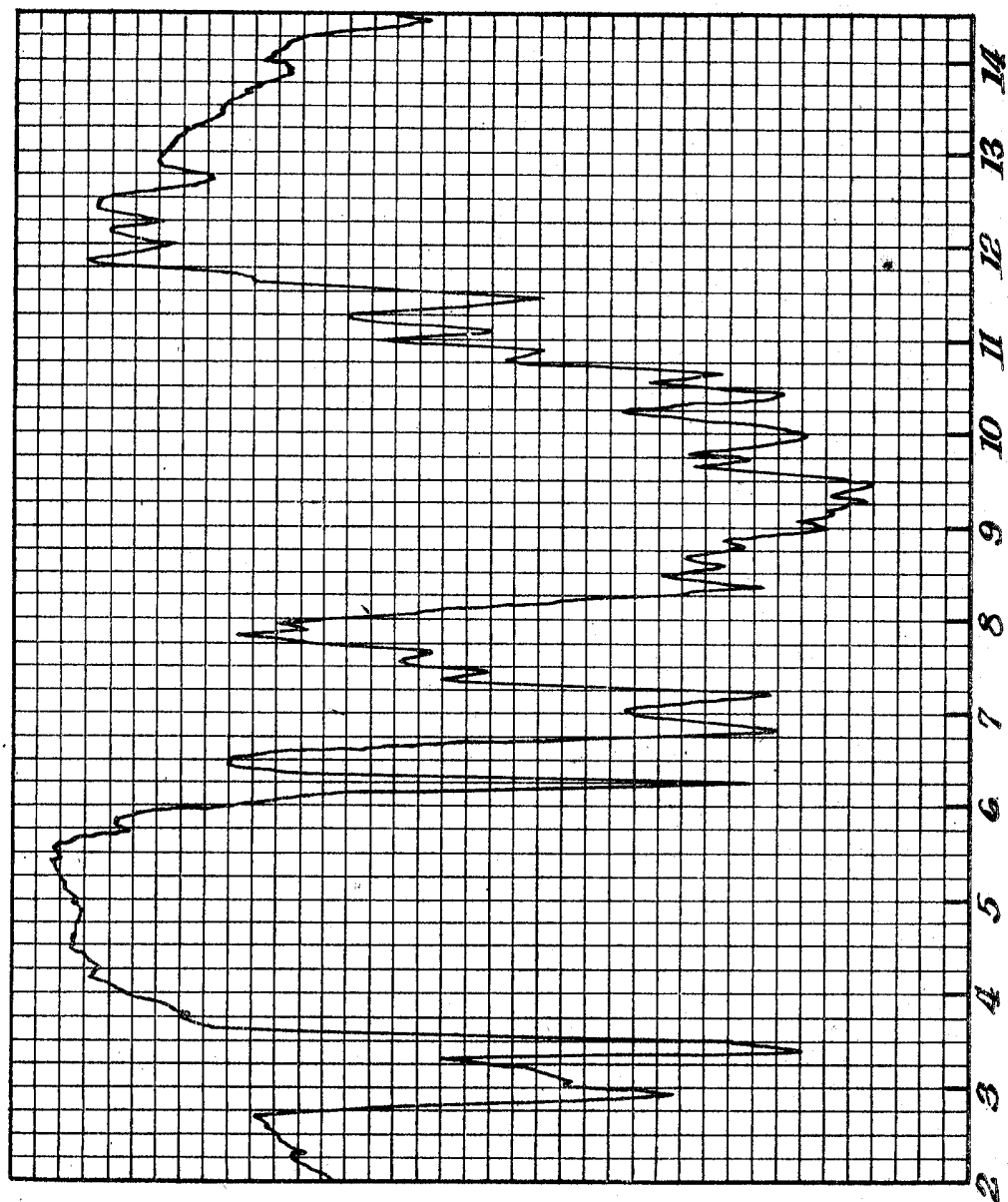
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4

