ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA
(19)

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

198108
(11) (B2)

(51) Int. Cl.[3]
C 07 D 501/20
A 61 K 31/43

(22) Přihlášeno 05 03 71
(21) (PV 1682-71)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 16 02 71
(115779)
Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 31 08 79

(45) Vydáno 15 02 83

(72)
Autor vynálezu
STAPLEY EDWARD OLLEY, METUCHEN (Sp. st. a.) a
MATA JUSTO MARTINEZ, MADRID (Španělsko)

(73)
Majitel patentu
MERCK & CO., INC., RAHWAY (Sp. st. a.)

(54) Způsob výroby nového antibiotika, kyseliny 7β-(D-5-amino--5-karboxyvaleramido)-3-karmamoyloxymethyl-7-methoxy--3-cefem-4-karboxylové

1

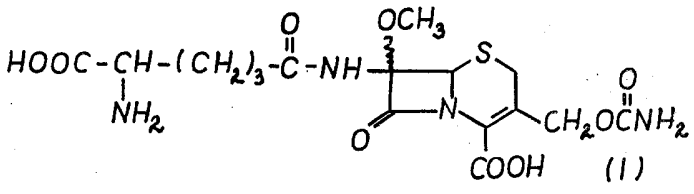
Vynález se týká způsobu výroby nového antibiotika, kyseliny 7β-(D-5-amino-5-karboxyvaleramido)-3-karbamoyloxymethyl--7-methoxy-3-cefem-4-karboxylové.

Vynález se tedy týká nového druhu antibiotik cefalosporinového typu, které nesou methoxyskupinu v poloze 7 jádra. Tato antibiotika jsou strukturálně příbuzná známým antibiotikům cefalosporinové řady, avšak na rozdíl od cefalosporinu C, ktrý obsahuje v poloze 7 skupinu D-5-karboxyvaleramido-

2

vou, obsahují také methoxyskupinu v poloze 7. Cefalosporin C je mimoto substituován v poloze 3 skupinou acetoxymethylovou, kdežto sloučeniny podle vynálezu obsahují v této poloze hydroxymethylovou skupinu.

Předmětem vynálezu je způsob výroby nového antibiotika, kyseliny 7β-(D-5-amino--5-karboxyvaleroamido)-3-karbamoyloxy-methyl-7-methoxy-3-cefem-4-karboxylové obecného vzorce I,



(I)

vyznačující se tím, že se pěstuje při teplotě 20 až 37 °C a při pH 6,0 až 8,0 ve vodném živném prostředí, které obsahuje 1 až 6 hmotnostních % uhlohydrátů a 0,2 až 6 hmotnostních % dostupného dusíku za aerobních podmínek Streptomyces lactamdurans NRRL 3802, načež se získané antibiotikum izoluje chromatograficky.

Antibiotikum je produkováno novým kmenem Actinomycet, jehož vzorek byl uložen ve sbírce kultur Merck a Co., Inc., Rahway, New Jersey pod číslem MA-2908, jakož i ve sbírce kultur Northern Utilization Research and Development of Agriculture at Peoria, Illinois pod číslem NRRL 3802. Mimo svou antibiotickou účinnost je produkt vzorce I také meziproduktem, vhodným k výrobě odpovídajících 3-hydroxyderivátů, 3-acyloxyderivátů a karbamoyloxyderivátů. Způsob výroby těchto sloučenin bude dále popsán.

Produkt o vzorci I bude dále nazýván antibiotikem 842A.

Antibiotikum 842A je charakterizováno zvýšenou účinností proti gramnegativním mikroorganismům. Produkt je účinný in vivo, přičemž jeho účinnost je obecně vyšší než účinnost cefalotinu. Vysokou účinnost má antibiotikum zejména proti Proteus morganii, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Proteus mirabilis, Proteus morganii, Salmonella schottmuelleri, Klebsiela pneumoniae AC, Klebsiella penumoniae B a Paracolobactrum arizoniae.

Antibiotikum 842A je výhodnou sloučeninou podle vynálezu. Mimo obvykle velmi vysokou účinnost proti gramnegativním mikroorganismům a zvýšenou odolnost proti cefalosporinázám je toto antibiotikum výhodné i pro svou nízkou toxicitu a snadnost dosažení vysokých hladin antibiotika v krevním oběhu. V průběhu 6 hodin po podání je přibližně 100 % antibiotika vyloučeno močí. Toto antibiotikum je odolnější vůči enzymům než cefalosporin C, rezistence vůči antibiotiku vzniká velmi pomalu a antibiotikum má i baktericidní účinky. Při perorálním podání je účinné zejména Paracolobactrum arizoniae 3270, Proteus vulgaris 1810 a Salmonella schottmuelleri 3010. V případě podkožního podání je dvakrát až desetkrát účinnější než cefalotin při stejném použití.

Antibiotikum 842A a mikroorganismus, který je schopný toto antibiotikum produkovat

Mikroorganismus, který produkuje antibiotikum 842A, je dříve neznámý kmen Actinomycet. Původně byl kmen izolován z půdy na šikmém agaru a byl dále pěstován v prostředí následujícího složení:

Prostředí B:

extrakt z kvasinek	10,0 g
glukóza	10,0 g
fosfátový pufr	2,0 ml
$MgSO_4 . 7 H_2O$	0,05 g
destilovaná voda pH 6,5	1000,0 ml

fosfátový pufr:

KH_2PO_4	91,0 g
Na_2HPO_4	95,0 g
destilovaná voda	1000,0 ml

Po několika dnech růstu nedošlo ke sporulaci. Mikroorganismus produkoval antibiotikum, které bylo odlišné od jiných známých antibiotik, jak bylo prokázáno biologickými i chemickými zkouškami. Srovnání výsledků těchto zkoušek bylo antibiotikum prokázáno jako nové a označeno 842A.

Taxonomie mikroorganismu produkujícího antibiotikum 842A

Mikroorganismus, který produkuje antibiotikum 842A (kultura MA-2908), je novým druhem Actinomycet. K jeho určení bylo užito způsobu, který byl popsán v „Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 7. vydání, a v „The Actinomycetes", sv. 2, „Classification, Identification and Description of Genera and Species", S. A. Waksman (1961). Tímto způsobem bylo zjištěno, že kultura patří do rodu Streptomyces a její vlastnosti jsou podobné vlastnostem známého druhu Streptomyces fradise. Biochemicky je tento kmen zcela ve shodě se svrchu uvedeným mikroorganismem, morfologicky se však od něho liší, například béžově zbarveným myceliem, kdežto Streptomyces fradiae vytváří mycelium růžové. Oba kmeny se rovněž liší tvorbou pigmentu na různých živných prostředích a rozdílem ve sporulaci. Na základě těchto rozdílů byla kultura prohlášena za nový druh a nazvána Streptomyces lactamdurans. V tabulce III jsou uvedeny biochemické vlastnosti druhu Streptomyces lactamdurans ve srovnání se známým Streptomyces fradiae. Veškeré údaje v tabulce III byly získány po třítýdenní inkubaci při teplotě 28 °C, není-li jinak uvedeno.

pH prostředí, které bylo v tomto případě užito, bylo přibližně neutrální v rozmezí pH 6,7 až 7,2. Fyziologické testy byly prováděny na konci sedmého a na konci jedenadvacátého dne.

TABULKA III

842A — biochemické srovnání

Test	Streptomyces lactamdurans	Streptomyces fradiae
mycelium na vzduchu	přímé, poněkud větvené	přímé, větvená vlákna
konidie	žádné	tyčinkovité
rozpustný pigment	žádný	žádné
optimální teplota	28 °C	25 °C
invertáza	negativní	negativní
redukce dusičnanů	negativní	negativní
zkapalnění želatiny	pozitivní	pozitivní
využití celulózy	negativní	negativní
lakmusové mléko	alkalická peptonizace	alkalická peptonizace

Morfologie kmene produkujícího antibiotikum 842A

V případě, že kmen byl pěstován na svrchu uvedených prostředích, nebyla pozorována tvorba sporoforů ani po 8 týdnech. Byla však pozorována tvorba dlouhých vláken, která byla segmentována na zlomky různých rozměrů, od 0,9 do 1,7 mikronů.

Mycelium je málo větvené, na vzduchu má přibližně stejný rozměr jako vegetativní mycelium, uniformní je zvláště šířka, která se pohybuje okolo hodnoty 0,9 μ. Mycelium je lehké, má poprášený vzhled a dá se snadno odloučit. Je grampozitivní, v některých případech zanořené do agarové plotny. Byla pozorována fregmentace na tyčinky v případě, že kultura byla pěstována v třepacích lahvích. Mycelium z lahví, které třepány nebyly, vytvářely krátké, poměrně silné segmenty, které však nebyly početné a jejichž význam není znám.

Agar s rajským protlakem a ovesnou moukou:
Kultura zvrásněná, suchého vzhledu, plochá, na zadní straně oranžová.
Mycelium na vzduchu poměrně chudé, béžové.
Nevytváří se žádný rozpustný pigment.

Czapek-Doxův agar:
Kultura plochá, béžové barvy.
Mycelium na vzduchu poprášeného vzhledu, béžovobílé.
Rozpustný pigment se netvoří.

Agar s glycerolem a asparaginem:
Kultura plochá, na zadní straně zlatožlutá až oranžová.
Mycelium na vzduchu poprášeného vzhledu, béžové se slabě broskvovým nádechem.
Rozpustný pigment je zlatohnědý.

Agar s vaječným albuminem:
Kultura plochá, béžová až žlutá.
Mycelium na vzduchu poprášeného vzhledu, béžové.
Rozpustný pigment se nevytváří.

Agar s maleinanem vápenatým:
Kuultura plochá, na zadní straně žlutá s oranžovými okraji.
Mycelium na vzduchu poprášeného vzhledu, bílé až béžové s broskvovými okraji.
Rozpustný pigment se nevytváří.

Živný agar s tyrosinem:
Kultura plochá, oranžová,
Mycelium na vzduchu béžovobílé.
Rozpustný pigment se netvoří.
Krystalky tyrosinu jsou rozkládány.

Agar s melasou a extraktem z kvasinek:
Kultura plochá, na zadní straně oranžová.
Mycelium na vzduchu poprášeného vzhledu, béžovobílé.
Rozpustný pigment se netvoří.

Živný agar:
Kultura plochá, zlatožlutá.
Mycelium na vzduchu poprášeného vzhledu, béžové barvy.
Rozpustný pigment se netvoří.

Lakmusové mléko:
Vytváří se prstenec, který značí velmi chudý vegetativní růst, bez mycelia na vzduchu.
Peptonizace se uskutečňuje při alkalické reakci.
pH 7,3 až 7,4 (u kontrol pH 6,7).

Odstředěné mléko:
Vytváří se prstenec, znamenající slabý růst, barvy šedé až oranžové.
Mycelium na vzduchu se netvoří.
Tvoří se světle šedý rozpustný pigment.
K peptonizaci dochází při alkalické reakci.
pH 7,2 (pH kontrol 6,6).

Agar s odstředěným mlékem:
Kultura plochá, oranžová.
Mycelium na vzduchu slabě vyvinuté, béžové až slabě korálově růžové.
Rozpustný pigment slabě šedorůžový.
Kasein je hydrolyzován.

Želatinové bloky:
Kultura béžová až oranžová.
Rozpustný pigment se netvoří.
Dochází k úplnému zkapalnění.

Živný agar s želatinou:
Kultura plochá, oranžová.
Mycelium chudé, poprášeného vzhledu, béžové.
Rozpustný pigment se netvoří.
Dochází k úplném zkapalnění želatiny.

Živný agar se škrobem:
Kultura plochá, oranžová.
Mycelium chudé, poprášeného vzhledu, béžové barvy.
Rozpustný škrob je slabě hydrolyzován.

Syntetický agar se škrobem:
Kultura plochá, na zadní straně béžová, s oranžovými okraji.
Mycelium na vzduchu poprášeného vzhledu, broskvové barvy.
Rozpustný pigment se netvoří.
Dochází k mírné hydrolýze škrobu.

Loefflerův agar s krevním sérem:
Kultura béžová až oranžová.
Mycelium na vzduchu se netvoří.
Rozpustný pigment se netvoří.
Nedochází ke zkapalnění.

Agar s peptonem, železem a extraktem z kvasnic:
Kultura béžová.
Mycelium chudé, bělavé.
Rozpustný pigment se netvoří.

Mikroaerofilní růst:

K této zkoušce bylo užito dextrózových čepů s extraktem z kvasnic, přičemž hloubka čepu byla 40 mm. Byl pozorován dobrý růst na povrchu čepu a podél horní čtvrtiny rozhraní.

Zkouška na růst při různých teplotách:

Ke zkoušce bylo užito šikmého agaru s

dextrózou a extraktem z kvasnic. Kultura rostla dobře při 28 °C, slabě při 37 °C, vůbec nerostla při 50 °C.

Agar s dextrózou a extraktem z kvasnic:
Kultura plochá, zlatožlutá.
Mycelium na vzduchu poprášeného vzhledu, béžové až slabě fialové.
Rozpustný pigment se netvoří.
Bramborový blok:
Kultura plochá, béžové až oranžové barvy, suchého vzhledu.
Mycelium chudé, béžové.
Rozpustný pigment se netvoří.

Redukce dusičnanů na dusitany byla negativní. Veškerá odečítání prováděna po třítýdenní inkubaci při teplotě 28 °C, není-li jinak uvedeno. Fyziologické testy byly prováděny 7. a 21. den.

Morfologické rozdíly mezi Streptomyces lactamdurans a Streptomyces fradiae jsou uvedeny v tabulce IV. Pozorování byla prováděna na prostředích uvedených v této tabulce po týdnu pěstování, po 3 týdnech a 8 týdnech. Mycelium na vzduchu vytvářené kmenem Streptomyces lactamdurans je krátké a přímé, se slabým větvením. Je téměř stejného rozměru jako vegetativní mycelium, má šířku 0,9 μ. Je světlé, poprášeného vzhledu a dá se snadno seškrábat. Vegetativní mycelium je grampozitivní, lne k živnému prostředí, do některých živných prostředí se zanořuje. Lze pozorovat fragmentaci do tyčinek, je-li kultura pěstována v třepacích lahvích. Vegetativní mycelium z těchto lahví při pěstování 4 až 6 dní při 28 °C vytvářelo krátké, silné segmenty, které však nebyly příliš četné. Všechna odečítání v tabulce IV byla prováděna po 3 týdnech inkubace. pH prostředí bylo vždy přibližně neutrální, 6,8 až 7,2. Barvy užité v pokuse jsou v souhlase s návrhem publikace „Color Harmony Manual", 4. vydání, 1958, Container Corporation of America.

Využití uhlohydrátů

Kultura Streptomyces lactamdurans MA-2908 byla zkoumána i na svou schopnost využít různé uhlohydráty při pěstování na základním syntetickém prostředí (T. G. Pridham and D. Gottlieb, 1948), které obsahovalo 1 % uhlohydrátu, a to při teplotě 28 °C 3 týdny. V tabulce V je uvedeno využití těchto uhlohydrátových zdrojů uvedenou kulturou.

V tabulce V znamená:
+ dobrý růst
± slabý růst
— žádný růst na uvedeném uhlohydrátu

TABULKA IV

842A: Morfologické srovnání Streptomyces lactamdurans a Streptomyces fradiae

Prostředí	Streptomyces lactamdurans	Streptomyces fradiae
Czapek-Doxův agar	Kultura plochá, béžová. Mycelium poprášeného vzhledu, béžovobílé. Žádný rozpustný pigment.	Kultura bezbarvá. Mycelium světle fialové.
Agar živný	Kultura plochá, béžová až zlatožlutá. Mycelium poprášeného vzhledu, béžové. Žádný rozpustný pigment.	Kultura oranžově žlutá.
Agar s glycerolem a asparaginem	Kultura plochá, zadní strana zlatožlutá až oranžová. Mycelium poprášeného vzhledu, béžové s nádechem broskvovým. Rozpustný pigment světle hnědý.	Kultura jasně žlutočervená.
Agar s dextrózou a extraktem z kvasnic	Kultura plochá, zlatožlutá. Mycelium poprášeného vzhledu, béžové až růžové. Žádný rozpustný pigment.	Kultura jasně žlutočervená.
Syntetický agar se škrobem	Kultura plochá, okraje zadní strany oranžové. Mycelium poprášeného vzhledu s bílými okraji. Žádný rozpustný pigment. Mírná hydrolýza škrobu	Kultura bezbarvá. Mycelium světle fialové.

Prostředí	Streptomyces lactamdurans	Streptomyces fradiae
Bramborový blok	Kultura plochá, béžová až oranžová. Mycelium chudé, béžové. Žádný rozpustný pigment.	Kultura oranžová.
Želatinový blok	Kultura béžová až oranžová po celém bloku. Žádný rozpustný pigment. Úplné zkapalnění želatiny.	Kultura béžová až hnědá.
Lakmusové mléko	Kultura ocelově šedá, prstenec. Žádné mycelium na vzduchu. Peptonizace: alkalická reakce pH 7,3—7,4 (kontrola měla pH 6,7).	Kultura béžová.

TABULKA V

Uhlohydráty	Kultura MA-2908	Uhlohydráty	Kultura MA-2908
Glukóza	+	Rhamnóza	—
Arabinóza	+	Celulóza	—
Maltóza	+	Fruktóza	±
Raffinóza	+	Inositol	—
Sacharóza	—	Acetát	±
Xylóza	+	Citrát	±
Mannitol	+	Parafin	—
Laktóza	—	Glycerol	±
Mannóza	—		

Charakteristik uvedených v tabulkách III, IV a V bylo užito k zařazení kultury Streptomyces lactamdurans MA-2908 pomocí klíče uvedeného v „Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 7. vydání, str. 694 až 829 (1957), a v „The Actinomyces", sv. 2, str. 61 až 292 (1961). Srovnáním těchto charakteristik s charakteristikami známých druhů ukázalo, že kultura je biochemicky podobná Streptomyces fradiae. Mezi oběma kulturami jsou však podstatné morfologické rozdíly, například ve zbarvení mycelia Streptomyces fradiae, které má na vzduchu barvu obdobnou fialové barvě mořských škeblí, kdežto kultura Streptomyces lactamdurans má barvu béžovou. Vegetativní kultury tohoto mikroorganismu vykazují rozdíly ve tvorbě pigmentu na různých prostředích, přičemž nebyla zjištěna žádná sporulace. Na základě těchto rozdílů a na základě charakteristik popsaných v tabulkách byl mikroorganismus produkující antibiotikum 842-A, kulturu MA-2908, zařazen jako nový druh, Streptomyces lactamdurans.

Tento popis mikroorganismu, který je schopen produkce antibiotika 842A, uvádíme jenom pro lepší znázornění typu kmene, kterého je možno použít. Je však zřejmé, že vynález nemůže být omezen na použití organismu, který splňuje tyto zvláštní podmínky. Do vynálezu je nutno zahrnout i použití jakéhokoliv jiného organismu, jakož i kmenů získaných mutací pomocí libovolného činidla schopného mutace vyvolat.

Výroba antibiotika 842A fermentací

Antibiotikum 842A lze vyrobit aerobní fermentací ve vhodném živném prostředí za řízených podmínek pomocí mikroorganismu Streptomyces lactamdurans. K produkci antibiotika je možno obecně užít velkého množství živných prostředí, která obsahují zdroje uhlíku a dusíku. Příkladem těchto prostředí mohou být prostředí, uvedená v souvislosti s produkcí antibiotika 810A. Přesné množství uhlohydrátu a zdrojů dusíku závisí na ostatních složkách živného prostředí, obecně však je mnžoství uhlohydrátů v rozmezí 1 až 6 váhových % prostředí a obsah asymilovatelných zdrojů dusíku 0,2 až 6 váhových % prostředí. Dále uvádíme několik prostředí, která jsou zvláště vhodná k výrobě antibiotika 842A. Jde pouze o typická prostředí, způsob výroby nemá být na tato prostředí omezen.

Prostředí IX:

extrakt z kvasinek	10,0 g
lihovarnické výpalky	20,0 g
dextróza	10,0 g
destilovaná voda	1000,0 ml
pH 7,0	

Prostředí X:

sójová mouka	30,0 g
lihovarnické výpalky	7,5 g
cerelóza	20,0 g
NaCl	2,5 g

$CaCO_3$	10,0 g
destilovaná voda	1000,0 ml
pH 7,0	

Prostředí XI:

extrakt z kvasinek	10,0 g
lihovarnické výpalky	20,0 g
destilovaná voda	1000,0 ml
pH 7,0	

Fermentace se provádí při teplotě 20 až 37 °C, optimálních výsledků lze dosáhnout při teplotách 24 až 32 °C. Živné prostředí má mít pH 6,0 až 8,0.

V malém měřítku se produkce antibiotika 842A provádí tak, že se naočkuje vhodné živné prostředí kulturou schopnou produkovat antibiotikum, načež se nechá fermentace probíhat při stálé teplotě 28 °C za stálého třepání několik dní. Na konci inkubace se mycelium odstraní a supernatant se zkouší na koncentraci antibiotika.

Fermentace se provádí ve sterilizovaných nádobách v jednom až čtyřech stupních. Živné prostředí pro očkovací kulturu může být voleno například z prostředí 9 až 11. Láhev, v níž se mikroorganismus pěstuje, se umístí na třepacím zařízení při konstantní teplotě 28 °C na 1 až 3 dny, výsledná kultura se pak užije k naočkování druhého stupně očkovací kultury. Užije-li se mezistupňů při výrobě očkovací kultury, provádí se pěstování v mezistupních za týchž podmínek jako pěstování v prvním stupni. Obsah lahví se na konci inkubace odstřeďuje k odstranění mycela. Supernatant se pak koncentruje a čistí, čímž se získá antibiotikum 842A v čistém stavu.

Ve větším měřítku se s výhodou fermentace provádí v nádržích, které jsou opatřeny míchadlem a provzdušňovacím zařízením. Živné prostředí se mísí přímo v nádrži a v ní se také sterilizuje při teplotách až 120 °C. Po chlazení se sterilizované prostředí očkuje produkční kulturou a fermentace se nechá probíhat několik dní, například 2 až 4 dny, za stálého míchání a/nebo provzdušňování živného prostředí při stálé teplotě přibližně 28 °C. Změnami v množství očkovacího materiálu a změnami ve složení živného prostředí je možno upravit podmínky při pěstování tak, aby bylo dosaženo vysokých výtěžků a vysoké účinnosti antibiotika.

Stanovení účinnosti antibiotika s použitím Vibrio percolans

Testy byly prováděny na plotnách při použití filtračního papíru v discích průměru 1,2 cm. Plotny byly připraveny ze živného agaru s 2,0 g extraktu z kvasnic na litr agaru, na jednu plotnu bylo užito 10 ml této směsi. Zkoumaný organismus byl pěstován v bujónu přes noc, načež byly buňky mikroorganismu ředěny roztokem kuchyňské soli na suspenzi o 40% propustnosti pro světlo při vlnové délce 660 nm. Tato suspenze byla přidána v množství 20 ml/ml do živného prostředí před odléváním ploten.

Plotny byly uchovávány při 4 °C do použití, maximálně 5 dní. Po aplikaci papírových disků sycených roztokem antibiotika byly plotny inkubovány při 28 °C 8 až 24 hodiny. Pak byly odečítány zóny inhibice v mm průměru. Tato čísla byla pak užita ke stanovení relativní účinnosti, popřípadě ke stanovení účinnosti v μg/ml, byly-li výsledky srovnány s čištěným standardem. Provádí-li se tyto zkoušky kvantitativně, lze zjistit 1 až 2 μg antibiotika na ml.

Bakteriální inaktivace antibiotika 842A: Odolnost antibiotika 842A k inaktivaci bakteriemi byla stanovena in vitro ve srovnání s odolností cephalosporinu C, cephalosporidinu a cephalotinu. Pokusy ukázaly, že antibiotikum 842A je proti účinku mikroorganismů odolnější než ostatní svrchu uvedená antibiotika.

K degradaci bylo užito dvou mikroorganismů, které úplně inaktivují cephalosporin C, a to Alcaligenes faecolis (BM-9) a Alcaligenes viscosus (MB-12).

a) Příprava bakteriálních buněk

Buňky Alcaligenes faecolis (MB-9) a Alcaligenes viscosus (MB-12) byly připraveny takto:

Obsah L-zkumavky byl smíšen s několika mililitry živného prostředí s obsahem 0,2 % extraktu z kvasnic. Tato suspenze byla nanesena kličkou na povrch šikmého živného agaru, který byl pak inkubován 18 hodin při 37 °C. Všechny zkumavky šikmého agaru byly pak skladovány při 5 °C do použití, nejvýše však týden. Kultura s povrchu jedné ze zkumavek byla pak vždy asepticky přenesena kličkou do 50 ml bujónu s 0,2 % extraktu z kvasnic, bujón byl pak umístěn na třepacím zařízení a inkubován 18 hodin při 28 °C. Pak byla kultura 10 minut odstřeďována při 4000 otáčkách za minutu. Supernatant byl slit a buňky byly dvakrát promyty sterilním fosfátovým pufrem o koncentraci 0,1 M a pH 7,5 (pufr obsahuje 6,8 g kyselého fosforečnanu draselného a 7,1 g středního fosforečnanu sodného na 1 litr destilované vody). Promyté buňky byly pak znovu uvedeny v suspenzi v koncentraci 4 mg/ml roztoku antibiotika v 0,1 N fosforečnanového pufru. Testovaná směs byla pak inkubována bez třepání na vodní lázni při 37 °C 4 hodiny, načež bylo prostředí odstředěno 10 minut při 2000 otáčkách za minutu a čirý supernatant byl slit do sterilních zkumavek a okamžitě zmrazen v suchém ledu až do použití, nejvýše však 3 hodiny. Kontroly byly inkubovány stejným způsobem, až na nepřítomnost buněk.

b) Inaktivace antibiotika 842A

Supernatanty byly zkoumány na svou an-

tibakteriální účinnost následujícím způsobem:

Papírové kotouče průměru 0,65 cm byly nasyceny supernatantem a umístěny na povrch ploten z živného agaru s 0,2 % extraktu z kvasnic, do nichž byl předem přimíšen příslušný mikroorganismus. Plotny, obsahující B. subtilis (MB-964), byly vyrobeny následujícím způsobem: 5 ml suspenze promytých spor v 0,9% roztoku NaCl bylo přidáno ke 150 ml živného agaru s 2 % extraktu z kvasnic při 45 °C, 5 ml této směsi bylo pak užito k odlití ploten, z nichž každá měla rozměr 15 × 100 mm. Plotny byly uloženy při teplotě 5 °C do použití, nejvýše však 3 dny. Pak byly plotny inkubovány přes noc při 25 °C před měřením zóny inhibice okolo disků.

Bezbuněčné roztoky antibiotika byly ředěny v poměrech 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16 a 1 : 32, čímž byla získána standardní křivka. Různé roztoky antibiotik byly pak zkoumány po inkubaci za přítomnosti promytých bakteriálních buněk. Všechny zkoušky byly prováděny třikrát.

c) Výsledky

Procenta inaktivace byla propočítávána tak, že byl nejprve vypočítán průměr tří inhibičních zón ze tří souběžných zkoušek, načež bylo stanoveno množství antibiotika, které zbylo v testovacím roztoku ve srovnání se standardní křivkou. Tato hodnota byla odečtena od výchozí koncentrace 4 mg/ml a zbytek byl dělen výchozí koncentrací a násoben stem, čímž bylo získáno procento inaktivace. V tabulce XVI je uvedena inaktivace Cephalosporinu C a antibiotika 842A za svrchu uvedených podmínek.

TABULKA XVI

Procento inaktivace po inkubaci s promytými bakteriálními buňkami Desky s obsahem B. subtilis (MB-964)

Degradující organismus	Čtyřhodinová inkubace	
	Cephalosporin C	Antibiotikum 842A
Alcaligenes faecalis MB-9	99+	0
A. viscosus MB-12	99+	54,4

Schopnost antibiotika 842A a Cephalosporinu C odolávat degradačnímu účinku různých mikroorganismů byla zkoumána ještě na následujících kulturách: Escherichia coli 236, Proteus morganii 251, Proteus morganii 356 a Proteus mirabilis 241. Tyto mikroorganismy jsou gramnegativní a odolné proti Cephalosporinu C. Při provádění těchto zkoušek byl vždy smíšen mikroorganismus s některým z antibiotik a po 4 hodinách byla stanovena zbytková účinnost antibiotika. Zkoušky byly prováděny stejným způsobem jako při použití Alcaligenes faecalis MB-9 a A. viscosus MB-12. V následující tabulce je uvedeno procento inhibice Cephalosporinu C a antibiotika 842A při použití B. subtilis (MB-964) svrchu uvedenou metodou.

TABULKA XVII

Kultura	Cephalosporin C	Antibiotikum 842A
Escherichia coli 236	> 99	38
Proteus morganii 251	> 99	80
Proteus morganii 356	> 99	69
Proteus mirabilis 24L	72	5

Z těchto údajů je zřejmé, že antibiotikum 842A je daleko odolnější než Cephalosporin C k inaktivaci mikroorganismy A. faecalis, A. viscosus, Escherichia coli 236, Proteus morganii 251, Proteus morganii 236 a Proteus mirabilis 241.

Antibiotikum 842A, které se získá svrchu uvedeným fermentačním způsobem, je amfoterní sloučeninou s izoelektrickým bodem při pH 3,5. Nad pH 9,0 je nestálé, je však poměrně stálé při pH 1,5.

Protože antibiotikum 842A a jeho soli účinně inhibují růst různých druhů Salmonella, je možno jich užít k desinfekci v různých případech v domácnostech i průmyslu. Antibiotika i soli jsou účinné i proti Salmonella schottmuelleri a S. gallinarum, antibiotikum 842A je pak účinné zejména proti Salmonella schottmuelleri 3010, S. gallinarum a S. typhosa.

Antibiotikum 842A:

Antibiotikum 842A lze čistit adsorpcí na iontoměniči, například na pryskyřici obsahující kvartérní amoniový iont nebo kyselinu sulfonovou. Absorbované antibiotikum se vymývá vodnými roztoky nebo směsí vody a alkoholu, které obsahují vhodnu sůl, například chlorid amonný, chlorid sodný apod. Vhodnými iontoměničovými pryskyřicemi, kterých je možno použít, jsou například polystyrenové pryskyřice obsahující kyselinu sulfonovou (45 % nebo 53 % vody) nebo

polystyrenové trimethylbenzylamoniové pryskyřice (43 % vody), známé pod názvy Dowex 50 a Dowex 1. Je-li to žádoucí, je možno takto získaný eluát dále čistit novou chromatografií a elucí. Eluáty se pak slijí a koncentrují, čímž se získá čištěné antibiotikum 842R.

Přípravky:

Antibiotikum 842A je možno užít samostatně nebo ve směsi jako účinnou složku celé řady farmaceutických přípravků. Antibiotikum a jeho soli je možno použít ve formě kapslí nebo tablet, v prášku nebo v roztocích, suspenzích nebo elixírech. Lze jej aplikovat perorálně, nitrožilně nebo nitrosvalově. Zároveň je možno antibiotikum užít spolu s vhodným nosičem, například manitolem, sacharózou, glukózou nebo se sterilními kapalinami, jako s vodou, fyziologickým roztokem, glykoly a oleji, spolu se živočišnými nebo rostlinnými, popřípadě se syntetickými oleji apod. Mimo nosič mohou přípravky obsahovat ještě další složky, například stabilizační prostředky, pojidla, antioxidancie, konzervační prostředky, mazací prostředky, prostředky pro úpravu viskozity, vonné látky apod. Mimoto může přípravek obsahovat ještě další účinnou složku, aby bylo dosaženo širšího spektra antibakteriální účinnosti přípravků.

Dávkování závisí do velké míry na váze pacienta. Přednost se dává parenterálnímu podání u generalizovaných infekcí a perorálním podáním u infekcí střevních. Obvykle se pohybuje denní dávka v rozmezí 15 až 175 mg aktivní složky na kg živé váhy, tato dávka je pak rozdělena na několik jednotlivých dávek během dne. Denní dávka antibiotika 842A je v rozmezí 40 až 80 mg účinné složky na kg váhy.

Přípravky mohou být podávány v různých formách jednotlivých dávek, například v kapalných nebo pevných perorálně požitelných dávkách. Tyto jednotlivé předem připravené dávky obsahují obvykle 15 až 700 mg účinné složky, s výhodou 80 až 320 mg. Při parenterálním podání má být podávána obvykle čistá látka ve sterilním vodném roztoku nebo může být přípravek dodáván jako ve vodě rozpustný prášek, ručený k injekcím.

Užije-li se 100 mg antibiotika 842A a 40 miligramů laktózy, získá se kapsle o váze 145 mg, která je vhodná k perorálnímu podání.

Tablety s obsahem kyseliny 7β-(D-5-amino-5-karboxyvaleramido)-3-(karbamoyloxymethyl)-7-methoxy-3-cefem-4-karboxylové:

	na 1 kapsli
kyselina 7β-(D-5-amino-5-karboxyvaleramido)-3-(karbamoyloxymethyl)-7-methoxy-3-cefem-4-karboxylová	125 mg
kukuřičný škrob	6 mg
střední fosforečnan vápenatý	192 mg
laktóza	190 mg

Aktivní složka se smísí se středním fosforečnanem vápenatým, laktózou a polovinou kukuřičného škrobu. Směs se pak granuluje s 15 % pasty z kukuřičného škrobu (6 mg) a protlačí se hrubým sítem. Granulát se usuší při teplotě 45 °C, načež se protlačí sítem č. 16. Pak se přidá zbytek kukuřičného škrobu a stearan hořečnatý a směs se lisuje v tablety o průměru přibližně 1,2 centimetru a o váze 800 mg.

Užije-li se v injekčním přípravku 500 mg kyseliny 7β-(D-5-amino-5-karboxyvaleramido)-3-(karbamoyloxymethyl)-7-methoxy-3-cefem-4-karboxylové ve 2 ml vody, určené k injekcím, získá se přípravek vhodný pro parenterální podání.

Vynález bude osvětlen následujícími příklady.

Příklad 1

Antibiotikum 842A

Stupeň A: Způsob výroby antibiotika v třepacích lahvích

Lyofilizovaný obsah zkumavky Streptomyces lactamdurans, kultura MA-2908, byl asepticky otevřen a pak užit k naočkování Erlenmeyerových baněk o obsahu 250 ml, z nichž každá obsahovala 50 ml živného prostředí V, a to tak, že zkumavka byla rozlomena za sterilních podmínek a obsah vsypán do baňky. Živné prostředí V mělo toto složení:

Prostředí V:

autolyzát kvasinek		10,0 g
glukóza		10,0 g
fosfátový pufr +		2,0 ml
$MgSO_4 . 7H_2O$		0,05 g
destilovaná voda	do	1000,0 ml
pH 6,5		
+ fosfátový pufr		
KH_2PO_4		91,0 g
Na_2HPO_4		95,0 g
destilovaná voda	do	1000,0 ml

Baňka byla třepána při teplotě 28 °C a při 220 otáčkách za minutu na rotační třepačce s výkyvem 5 cm 3 dny. Podíly o velikosti 5 ml byly pak přeneseny sterilními pipetami do 4 dalších baněk téhož rozměru s obsahem téhož živného prostředí, tyto baňky pak byly inkubovány stejným způsobem. Obsah těchto baněk byl pak asepticky slit do jedné baňky a užit k naočkování 11 Erlenmeyerových baněk o obsahu 2 litrů, z nichž každá obsahovala 350 ml prostředí IX, a to 2 až 3 % očkovacího materiálu s použitím sterilních pipet. Živné prostředí IX mělo toto složení:

Prostředí IX:

hydrolyzát kvasinek		10,0 g
lihovarnické výpalky		20,0 g
dextróza		10,0 g
destilovaná voda	do	1000,0 ml
pH 7,0		

Produkční baňky byly pak třepány při teplotě 28 °C na rotační třepačce s výkyvem 5 cm při 145 otáčkách za minutu 4 dny. Na konci této doby byl obsah 10 baněk slit a směs byla odstředěna k odstranění mycelia.

Přítomnost antibiotika 842A, tj. přítomnost kyseliny 7β-(D-5-amino-5-karboxyvaleramido)-3-(karbamoyloxymethyl)-7-methoxy-3-cephem-4-karboxylové v živném prostředí byla prokázána diskovou metodou s disky o průměru 1,2 cm, sycenými živným prostředím a umístěnými na agarové plotny s obsahem 10 ml živného agaru s 0,2 % extraktu z kvasnic a s bakteriálním očkovacím materiálem. Zóny inhibice byly měřeny po dvanáctihodinové inkubaci při teplotě 28 °C, vzorky živného prostředí, získaného čtyřdenním pěstováním produkčního kmene, měly inhibiční zónu o průměru 31,5 mm na deskách obsahujících Vibrio percolans (MB-1272).

Stupeň B: Adsorpce na aniontoměničovou pryskyřici

Zfiltrované živné prostředí v množství 2900 ml bylo kyselinou solnou upraveno na pH 7,0, načež bylo naneseno na vrstvu obsahující 100 ml silně zásadité aniontoměničové pryskyřice se styrendivinylbenzenovou základní sítí Dowex 1 × 2 v chloridovém cyklu při rychlosti průtoku 10 ml za minutu. Byly zachycovány frakce o velikosti 500 mililitrů. Sloupec pryskyřice byl promýván vodou, načež byl vymýván 3% roztokem chloridu amonného v 90% roztoku methanolu ve vodě. Byly shromažďovány frakce veliké 100 ml.

Na všech těchto frakcích byl prováděn biologický test při použití diskové metody na kmeni Vibrio percolans MB-1272. Bylo dosaženo těchto výsledků:

Zfiltrované prostředí		Promývací voda		Frakce eluátu	
ředění	rozměr zóny	frakce	rozměr zóny	frakce	rozměr zóny
neředěno	26,5 mm	1	0	1	25
1:2	24	2	16	2	29
1:4	20	3	23	3	29
		4	25	4	26,5
		5	27	5	22
		6	27	6	18
				7	15
				8—10	0

Tyto zkoušky ukazují, že přibližně 60 % účinnosti bylo v promývací vodě a pouze 18 % v eluátu. Mimoto je zřejmé, že kapacita pryskyřice stačí pouze na dvě frakce, tzn. na desetinásobek objemu sloupce živného prostředí. Frakce eluátu 1 až 4 byly slity a koncentrovány, frakce získané promýváním 3 až 6 byly rovněž slity, čímž bylo získáno 1960 ml roztoku. 1860 ml tohoto roztoku bylo upraveno na pH 7,2 až 8,0 zředěným roztokem hydroxidu sodného, načež byl roztok nanesen na vrstvu silně zásadité aniontoměničové pryskyřice se styrendivinylbenzenovou základní sítí v množství 100 mililitrů (Dowex 1 × 2 v chloridovém cyklu), rychlostí 14 ml za minutu. Protékající prostředí bylo zachycováno ve 4 stejně velikých frakcích a testy, prováděné na těchto frakcích ukázaly, že toto prostředí obsahuje ještě 5 % celkové účinnosti. Sloupec byl pak promyt vodou a vymýván 5% vodným roztokem chloridu sodného. Eluát byl pak shromažďován ve frakcích o objemu 50 ml a zkoumán na biologickou účinnost. Tyto testy ukázaly, že 90 % účinnosti je přítomno ve frakcích 3 až 16, které pak byly slity.

Stupeň C: Absorpce na kationtoměničovou pryskyřici

50 ml koncentrátu připraveného ve stupni B bylo zředěno na 500 ml, pH bylo upraveno na 2,0 z původní hodnoty 8,8 zředěnou kyselinou solnou, načež byl materiál adsorbován na 25 ml silně kyselé pryskyřice sulfonátového typu se styrendivinylbenzenovou základní sítí (Dowex 50 × 2 ve vodíkovém cyklu) při průtoku 2,5 ml za minutu. Sloupec byl promyt 25 ml vody, načež byl vymýván 2% roztokem pyridinu tak dlouho, až pH eluátu bylo rovno 7,0. Celkově bylo spotřebováno 54 ml 2% roztoku pyridinu. Při zkoumání živného prostředí, které prošlo sloupcem, a eluátu bylo zjištěno, že 90 % účinnosti je obsaženo v eluátu, kdežto 9 % účinnosti v živném prostředí, které prošlo vrstvou iontoměniče. Eluát obsahoval pyridiniovou sůl antibiotika 842A.

Antibiotikum 842A je amfotermní s izoelektrickým bodem při pH 3,5. Produkt je nestálý při pH vyšším než 7, ale stálý při pH 1,5. Eluát byl upraven na pH 8,0 zředěným roztokem hydroxidu sodného, načež byl koncentrován ve vakuu k odstranění py-

ridinu. Takto získaný produkt byl identifikován jako monosodná sůl antibiotika 842A. Molekulová váha 468 je založena na empirickém vzorci.

Analýza pro $C_{16}H_{21}N_4SO_9Na$:

vypočteno:
C 41,0 %, H 4,5 %, N 12,0 %, S 6,8 %
O 30,8 %, Na 4,9 %;

nalezeno:
C 39,31 %, H 4,76 %, N 11,16 %, S 6,46 %,
O 34,12 %, Na 4,19 %.

Při testech provedených in vitro inhibovalo antibiotikum 842A růst těchto gramnegativních bakterií; Escherichia coli, Proteus vulgaris, Alcaligenes faecalis, Brucella bronchiseptica, Salmonella gallinarum, Vibrio percolans a Xanthomonas vesicatoria.

Produkt rovněž inhibuje růst grampozitivních bakterií, a to kmenů Staphylococcus aureus, Sarcina lutea a Bacillus substilis.

In vivo má antibiotikum 842A při podkožních injekcích účinnost, která je uvedena v následující tabulce. Po podkožním podání a po skončení pokusného období, které trvalo obvykle 7 dní po podání, bylo stanoveno množství antibiotika, které je schopno chránit 50 % myší proti infekci uvedeným kmenem; byla tedy stanovena ED_{50}.

Infekční mikroorganismus:	ED_{50} podkožní cestou ve dvou dávkách
Proteus vulgaris	51 μg
Proteus mirabilis	276 μg
Proteus morganii 3202*	276 μg
Salmonella schottmuelleri	103 μg
Klebsiella pneumoniae AD	125 μg
Klebsiella pneumoniae B	125 μg
Paracolobactrum arizoniae	125 μg
Escherichia coli	200 μg
Aerobacter aerogenes	49 μg
Pasteurella multocida	57 μg
Salmonella typhosa	34 μg
Diplococcus pneumoniae E400	566 μg

*) V případě tohoto mikroorganismu neposkytovala antibiotika Cephaloridin a Cephalotin ochranu ani v dávce 4000 mg, podané nadvakrát.

Mimo tyto pokusy byl ještě in vivo proveden pokus na myších svrchu uvedeným způsobem, při němž bylo užito kmene Proteus morganii 356, izolovaného z klinických případů, který byl odolný proti Cephalosporinům a schopný rozkládat Cephalosporin C. Při tomto pokuse byly hodnoty ED_{50} tyto:

Infekční mikroorganismus:	Antibiotikum:	ED_{50} při podkožním podání ve dvou dávkách — průměr ze dvou zkoušek
Proteus morganii 356	842A	273 μg
Proteus morganii 356	Cephalotin	20 000 μg
Proteus morganii 356	Cephaloridin	9 270 μg

Příklad 2

Antibiotikum 842A

Výroba očkovacího materiálu v lahvích:

Očkovací materiál byl připraven způsobem podle příkladu 1. Obsah dvou lahví, pěstovaných v druhém stupni, byl slit a užit k naočkování 62 Erlenmeyerových baněk o obsahu 250 ml, z nichž každá obsahovala 50 ml živného prostředí X. K naočkování každé z baněk bylo užito 1 ml materiálu. Prostředí X mělo toto složení:

Prostředí X:

Sójová mouka	30,0 g
lihovarnické výpalky	7,5 g
cerelóza	20,0 g
NaCl	2,5 g
$CaCO_3$ (po úpravě pH na 7,0)	10,0 g
destilovaná voda do	1000,0 g

Láhve byly třepány při teplotě 28 °C na rotační třepačce při 220 otáčkách za minutu s výkyvem 5 cm 5 dní. Na konci této doby byl obsah 60 baněk slit a odstředěn, čímž bylo odděleno mycelium od živného prostředí.

Přítomnost antibiotika 842A byla stanovena způsobem popsaným v příkladu 1. Bylo užito agarových ploten a disků o průměru 1,2 cm. Po čtyřdenní inkubaci byla získána inhibiční zóna 33 mm proti Vibrio percolans (MB-1272).

Příklad 3

Antibiotikum 842A

Fermentace

Stupeň 1:

Lyofilizovaný obsah zkumavky Streptomyces lactamdurans, kultura MA-2908, byl užit k naočkování 50 ml sterilního prostředí V v Erlenmeyerově baňce o obsahu 200 ml.

Prostředí V:

autolyzát kvasinek		10,0 g
glukóza		10,0 g
fosfátový pufr		2 ml
$MgSO_4 . 7H_2O$		0,05 g
destilovaná voda	do	1000,0 ml

pH — bylo upraveno na 6,5 užitím NaOH

* fosfátový pufr:

KH_2PO_4	91,0 g
Na_2HPO_4	95,0 g
destilovaná voda	1000,0 ml

Inokulovaná láhev byla umístěna na rotační třepačce s výkyvem 5 cm a inkubována při 220 otáčkách za minutu 72 hodin při teplotě 28 °C.

Stupeň 2:

10,0 ml očkovacího materiálu tohoto původu bylo pak užito k naočkování dvoulitrové Erlenmeyerovy baňky, obsahující 50 ml svrchu popsaného sterilizovaného prostředí V. Naočkovaná baňka byla pak umístěna na rotační třepačce a inkubována při 220 otáčkách za minutu 48 hodin při teplotě 28 °C.

Stupeň 3:

Obsah této baňky byl pak užit k naočkování fermentoru z nerezové oceli o obsahu 50 galonů, který obsahoval 160 litrů prostředí V. Prostředí pak bylo inkubováno při 28 °C 48 hodin za stálého míchání při provzdušňování 3 cfm. V průběhu fermentace bylo postupně přidáváno vždy malé množství Polyglykolu 2000 k zamezení pěnění.

Stupeň 4:

43 litrů výsledného očkovacího materiálu ze stupně 3 bylo pak užito k naočkování fermentoru o obsahu 200 galonů, který obsahoval 467 litrů sterilního prostředí XI, následujícího složení.

Prostředí XI:

Amber Yeast 300		10,0 g
lihovarnické výpalky		20,0 g
destilovaná voda	do	1000,0 ml

pH 7,0

Fermentace probíhala při teplotě 28 °C za stálého míchání a při provzdušňování 10 cfm 72 hodin. V průběhu fermentace bylo v malých množstvích přidáváno protipěnivé činidlo polyglykol 2000. Po skončení fermentace byla stanovena účinnost na agarových plotnách s použitím disků. Živné prostředí bylo pak zfiltrováno vrstvou infuzoriové hlinky při pH 7,8 a takto získaný produkt byl způsobem podle příkladu 1 identifikován jako antibiotikum 842A. Při pokusech na agarových plotnách při zředění 1:10 byla získána inhibiční zóna 21,5 mm pro Vibrio percolans MB-1272.

Příklad 4

Čištění; monosodná sůl kyseliny 7β-(D-5--amino-5-karboxyvaleramido)-3-(karbamoyloxymethyl)-7-methoxy-3-cephem-4--karboxylové

Adsorpce na aktivní uhlí:

4 dávky živného prostředí získaného způsobem podle příkladu 1 byly adsorbovány každá na 100 ml silně zásadité aniontoměničové pryskyřice se styrendivinylbenzenovou základní sítí (Dowex 1 × 2 v chloridovém cyklu), načež bylo antibiotikum vymýváno 1% vodným roztokem chloridu sodného. Eluát byl shromažďován ve frakcích o velikosti 50 ml a zkoumán na obsah antibiotika. Frakce byly shromažďovány ze všech čtyř dávek, jejich pH bylo upraveno na hodnotu 5,0 zředěnou kyselinou solnou, načež byly frakce slity, čímž bylo získáno celkem 4300 ml roztoku. 4200 ml tohoto roztoku bylo mícháno se 42 g aktivního uhlí (Darco G-60) 1/2 hodiny. Aktivní uhlí bylo shromážděno filtrací a promyto vodou. Filtrát a promývací voda byly prosté účinnosti. Filtrační koláč byl pak dvakrát vymýván, pokaždé jedním litrem 60% vodného roztoku acetonu, přičemž byla směs vždy 1/2 hodiny míchána a zfiltrována. Eluáty byly koncentrovány ve vakuu na obsah 108 ml a 100 ml. Pokusy ukázaly, že v prvním eluátu bylo obsaženo 76 % celkové účinnosti, tzn. že tento eluát byl 18× účinnější než výchozí materiál, v druhém eluátu bylo obsaženo 17 % celkové účinnosti, tento eluát byl tedy 14× účinnější než výchozí materiál. Oba koncentráty byly slity a dále koncentrovány na obsah 61 ml, pH tohoto roztoku bylo upraveno z původní hodnoty 4,0 na hodnotu 5,0 zředěným vodným roztokem hydroxidu sodného. Tento koncentrát obsahoval 40 mg sušiny na 1 ml a při jeho užití byla získána inhibiční zóna o průměru 25 mm proti kmenu MB-1272 při zředění 1:100, tzn. 400 μg/ml. Produkt byl identifikován jako monosodná sůl kyseliny 7β-(D-5-amino-5-karboxyvaleramido)-3--(karbamoyloxymethyl)-7-methoxy-3--cephem-4-karboxylové.

Příklad 5

Čištění; monosodná sůl kyseliny 7β-(D-5--amino-5-karboxyvaleramido)-3-(karbamoyloxymethyl)-7-methoxy-3-cephem-4-karboxylové

Adsorpce na gel:

22 ml eluátu získaného způsobem podle příkladu 1 ve stupni B bylo upraveno na

pH 7,0 zředěným hydroxidem sodným a podrobeno chromatografii na sloupci, který obsahoval 388 ml přípravku BioGel P-2. Sloupec byl vymýván vodou a eluát byl po průchodu diferenciálním refraktometrem shromažďován po frakcích velikosti 5 ml automatickým způsobem, načež byl zkoumán na svou biologickou účinnost. Biologická účinnost byla nejvyšší ve frakcích 47 až 63, kdežto chlorid sodný byl obsažen ve frakcích 62 až 73. Frakce 50 až 60 byly slity, znovu chromatografovány a pak koncentrovány do sucha, čímž bylo získáno 10,8 gramu látky, která byla identifikována jako monosodná sůl kyseliny 7β-(D-5-amino-5-karboxyvaleramido)-3-(karbamoyloxymethyl)-7-methoxy-3-cephem-4-karboxylové. Při testu s Vibrio percolans byla získána inhibiční zóna o průměru 25 mm při koncentraci 8 μg/ml.

Příklad 6

Kyselina 7β-(D-5-amino-5-karboxyvaleramido)-3-(karbamoyloxymethyl)-7-methoxy-3-cephem-4-karboxylová

Modifikovaný způsob fermentace

Stupeň A: Šikmý agar

Lyofilizovaný obsah zkumavky Streptomyces lactamdurans, kultura MA-2908, byl asepticky užit k naočkování prostředí o následujícím složení:

Prostředí XII:

melasa	1 %
pivovarské kvasnice	1 %
agar o pH 7,0	2,5 %
voda na žádaný objem	

Z tohoto materiálu se vytvoří šikmý agar, který se inkubuje 7 dní při teplotě 28 °C. Skladuje-li se pak šikmý agar ve zkumavkách v chladnu, je stálý po dobu delší než 13 týdnů.

Stupeň B: Produkce očkovacího materiálu ve 2 stupních

První stupeň: Jako první stupeň se užije očkovací materiál přímo sejmutý ze živného agaru, vyrobeného postupem podle stupně A. Tento materiál se přenese do 40 ml 1% roztoku extraktu z kvasnic o pH 7,0, který se pak vnese do Erlenmeyerovy baňky o obsahu 250 ml. Tyto baňky se pak uloží na rotační třepačku s výkyvem 5 cm a inkubují se při teplotě 28 °C a při 220 otáčkách za minutu 2 až 3 dny.

Druhý stupeň: 2,5% očkovací materiál z prvního stupně se uvede do baňky, která obsahuje 2% autolyzát kvasinek o pH 7,0. V tomto stupni se inkubace provádí nejvýše 48 hodin.

Stupeň C: Produkční prostředí

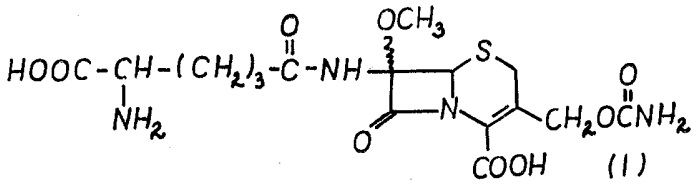
Produkční prostředí obsahuje 30 g lihovarnických výpalků, 7,5 g sušených kvasnic a 0,25 % protipěnivého činidla na 1 litr destilované vody. Pomocí malého množství koncentrovaného hydroxidu sodného se pH prostředí upraví na hodnotu 7,0, načež se prostředí rozdělí do Erlenmeyerových baněk a sterilizuje se v autoklávu 15 až 20 minut při teplotě 121 °C. Po zchlazení se prostředí naočkuje 2,5 % očkovacího materiálu ze stupně B. Inkubační doba se pohybuje v rozmezí 50 až 100 hodin, s výhodou 72 hodin. Obsah prostředí v jednotlivé baňce se může pohybovat mezi 30 až 50 ml, s výhodou činí 40 ml. Množství očkovacího materiálu je v rozmezí 1 až 5 %, s výhodou 2,5 %.

Stupeň D: Testy

Po skončení fermentace se buněčný materiál odstraní odstředěním a živné prostředí se upraví fosforečnanovým pufrem na pH 7,0. Pak se stanoví standardním biologickým způsobem koncentrace kyseliny 7β-(D-5-amino-5-karboxyvaleramido)-3-(karbamoyloxymethyl)-7-methoxy-3-cephem-4-karboxylové. Užitým organismem je Vibrio percolans (ATCC 8461). Disky filtračního papíru se nasytí živným prostředím a umístí na povrch agarových ploten, které byly očkovány uvedeným mikroorganismem. Na tyto plotny jsou rovněž uloženy disky sycené standardním roztokem antibiotika 842A, jehož koncentrace je známá. Plotny se inkubují přes noc při 28 °C, načež se změří průměry inhibičních zón. Koncentrace antibiotika 842A se stanoví interpolací podle standardní křivky, nanesené podle výsledků se známými koncentracemi antibiotik. Tímto způsobem bylo zjištěno, že Streptomyces lactamdurans MB-2908 produkoval 78,6 μg/ml antibiotika 842A při modifikovaném fermentačním způsobu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby nového antibiotika kyseliny 7β-(D-5-amino-5-karboxyvaleramido)-3-karbamoyloxymethyl-7-methoxy-3-cefem-4-karboxylové obecného vzorce I,



(I)

vyznačující se tím, že se pěstuje při teplotě 20 až 37 °C a při pH 6,0 až 8,0 ve vodném živném prostředí, které obsahuje 1 až 6 hmotnostních % uhlohydrátů a 0,2 až 6 hmotnostních % dostupného dusíku za aerobních podmínek Streptomyces lactamdurans NRRL 3802, načež se získané antibiotikum izoluje chromatograficky.

Severografia, n. p., závod 7, Most