

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY 122365

Patent dodatkowy
do patentu nr _____

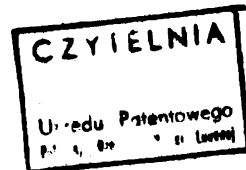
Zgłoszono: 17.11.78 (P. 211 027)

Pierwszeństwo: 18.11.77 Japonia

Zgłoszenie ogłoszono: 02.07.79

Opis patentowy opublikowano: 30.04.1984

Int. Cl.³ C12P 1/06



Twórcy wynalazku: Eiji Higashide, Kazunori Hatano, Mitsuko Asai

Uprawniony z patentu: TAKEDA Chemical Industries Limited, Osaka
(Japonia)

Sposób wytwarzania antybiotyku C-15003 P-4

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania antybiotyku C-15003 P-4.

Antybiotyk C-15003 P-4 (dalej oznaczany skrótem „P-4”) jest nowym związkiem, otrzymywanym w hodowli mikroorganizmu rodzaju *Nocardia*, wyodrębnionego ze źródeł naturalnych.

Powyższy mikroorganizm hodowany w pożywkach konwencjonalnych wytwarza równocześnie kilka składników antybiotyku C-15003. Wydzielenie każdego ze składników z brzojki fermentacyjnej wymaga stosowania bardzo skomplikowanej operacji, co nieuchronnie prowadzi do małej wydajności pożądanego składnika.

Na podstawie przeprowadzonych szerokich badań nad wybiórczym wyodrębnianiem składnika P-4 stwierdzono, że składnik ten można wytwarzać z dużą wydajnością, w stosunku do sumy składników antybiotyku C-15003, jeżeli stosuje się pożywkę hodowlaną o specjalnym składzie.

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania antybiotyku C-15003 P-4, w którym hodowlę mikroorganizmu rodzaju *Nocardia*, zdolnego do wytwarzania antybiotyku C-15003 P-4 (dalej czasami zwanego szczepem wytwarzającym antybiotyk C-15003 P-4) prowadzi się w pożywkę zawierającej leucynę lub jej pochodne lub sole, dzięki czemu uzyskuje się wybiórczo wytwarzanie antybiotyku C-15003 P-4, który wyodrębia się z brzojki fermentacyjnej.

Termin „antybiotyk C-15003” lub „C-15003” ozna-

2

cza, związki o wzorze 1, w którym R oznacza rodnik $-\text{COCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ lub rodnik o wzorze 2 lub 3 jako mieszaninę dwóch lub trzech tych związków lub pojedynczy związek z tej grupy.

Związek o wzorze 1, w którym R oznacza rodnik $-\text{COCH}_2\text{CH}_3$ nazywa się antybiotykiem C-15003 lub „P-2”, związek o wzorze 1, w którym R oznacza rodnik $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ antybiotykiem C-15003 P-3’ lub „P-3”, związek o wzorze 1, w którym R oznacza rodnik o wzorze 2 — „antybiotykiem C-15003 P-3” lub „P-3”, a związek o wzorze 1, w którym R oznacza rodnik o wzorze 3 — antybiotykiem C-15003 P-4 lub „P-4”.

Jako przykład szczepu wytwarzającego antybiotyk C-15003 P-3 można wymienić szczep *actinomycete* nr C-15003 (dalej czasami nazywany skrótem „szczepem C-15003”), który został wyodrębniony z gleby i innych materiałów w skriningowych poszukiwaniach mikroorganizmów wytwarzających antybiotyki.

Mikrobiologiczną charakterystykę szczepu nr C-15003 badano sposobami analogicznymi do zaproponowanych przez Schirlinga i Gottlieba (*International Journal of Systematic Bacteriology* 16, 313—340 (1966)). Wyniki obserwacji prowadzonych w 28°C w ciągu 21 dni są następujące:

1) Charakterystyka morfologiczna

Grzybnia wegetatywna rozprzestrzenia się dobrze i rozwija w odgałęzienia, zarówno na agarze

jak i w pożywce ciekłej. Wiele spośród strzępek jest średnicy 0,8 do 1,2 μm , a w pewnych przypadkach mogą się one dzielić na fragmenty przypominające bakterie pałeczkowe lub strzępki rozgałęzione o małej długości. Szczep dobrze wzrasta na różnych pożywkach taksonomicznych. Grzybnia powietrzna nakłada się na grzybnię wegetatywną, choć często formuje twory podobne do koremmi (50—200×200—1000 μm), na których następuje dalszy wzrost powietrzny. Liczne spośród grzybni powietrznych są kręte, od czasu do czasu napotyka się konfiguracje proste lub w postaci luźnych spirali.

Mikroskopowe badania starszych hodowli wykazują, że tylko w nielicznych przypadkach komórki koremiopodobne występują w łańcuchach, natomiast zawiesiny komórkowe otrzymane z powierzchni takich hodowli w badaniach mikroskopowych wykazują obecność wielu tworów przypominających artrospory, o kształcie elipsy (0,8—1,2 μm × 1,0—2,0 μ) lub wydłużonej elipsy (0,8—1,2 μm × 4,8—6,8 μm). Obserwacje pod mikroskopem elektronowym wykazują, że twory te mają gładkie powierzchnie.

2) Składniki komórek

Szczep hodowano na trzęsawce w zmodyfikowanej pożywce ISP nr 1, w 28°C, w ciągu 66—90 godzin, a po zakończeniu hodowli komórki zbierano i płukano. Sposobami B. Beckera i innych (Applied Microbiology 12, 421 (1964) i M.P. Lechevaliera (Journal of Laboratory and Clinical Medicine 17, 934 (1968)) powyższe całe komórki badano na kwas dwuaminopimelinowy i skład cukrów. Stwierdzono, że kwas dwuaminopimelinowy występuje w postaci mezo, a spośród cukrów występuje galaktoza i arabinoza.

3) Charakterystyka na pożywkach taksonomicznych

Szczep wykazuje stosunkowo dobry wzrost na różnych pożywkach. Grzybnia wegetatywna jest bezbarwna lub barwy jasnożółtej w początkowej fazie hodowli, a w dalszych fazach barwy jasnożółtawobrazowej do żółtawobrazowej. Szczep wytwarza, w różnych pożywkach taksonomicznych, rozpuszczalne pigmenty żółte do żółtawobrazowych. Grzybnia powietrzna jest proszkowata i zwykle daje umiarkowany wzrost. Charakterystyka szczepu w różnych pożywkach taksonomicznych jest przedstawiona w tabeli 1.

Tabela 1

Charakterystyka hodowlana szczepu nr C-15003
w pożywkach taksonomicznych

(A) Agar sacharozowo-azotanowy	30	(G) Agar z jabłczanem wapnia
Wzrost (G): umiarkowany, barwy jasnożółtej — melonowej (3 ia)* do bursztynowobrazowej (3 lc)*; formują się twory koremiopodobne		G: umiarkowany, barwy jasnej kości słoniowej (2 ca)* do jasnopszenicznej (2 ea). * formują się twory koremiopodobne
Grzybnia powietrzna (AM): skąpa, barwy białej		AM: umiarkowana, barwy białej do jasnej kości słoniowej (2 ca)*
Rozpuszczalny pigment (SP): brak lub jasnożółtawobrazowy	35	SP: brak
(B) Agar glicerynowo-azotanowy		(H) Agar z ekstraktem drożdżowym i słodowym
G: umiarkowany, barwy jasnej kości słoniowej (2 ca)*; formują się twory koremiopodobne		G: umiarkowany, barwy bursztynowej (3 lc)* do jasnożółtej (3 la)*; formują się twory koremiopodobne
AM: umiarkowana, barwy białej	40	AM: umiarkowana, barwy białej do jasnej kości słoniowej (2 ca)*
SP: brak		SP: brak
(C) Agar glukozowo-asparaginowy		(I) Agar z mąką owsianą
G: umiarkowany, barwy nogietku (3 pa)* do jasnożółtej (2 pa)*	45	G: umiarkowany, barwy jasnej kości słoniowej (2 ca)* do żółcieni kolonialnej (2 ga)*; formują się twory koremiopodobne
AM: skąpa, barwy białej		AM: skąpa, barwy białej do jasnożółtej
SP: jasnożółty (2 pa)*		SP: brak
(D) Agar glicerynowo-asparaginowy		(J) Agar z peptonem, ekstraktem drożdżowym i żelazem
G: umiarkowany, barwy jasnej kości słoniowej (2ca)*; formują się twory koremiopodobne	50	G: umiarkowany, barwy żółcieni kolonialnej (2 ga)*
AM: skąpa, barwy białej		AM: brak
SP: brak		SP: żółcień kolonialna (2 ga)*
(E) Agar skrobiowy		(K) Agar tyrozynowy
G: umiarkowany, barwy jasnej kości słoniowej (2 ca)* do jasnopszenicznej (2 ea); * formują się twory koremiopodobne	55	G: umiarkowany, barwy jasnej kości słoniowej (2 ca)* do jasnej żółcieni melonowej (2 ea)*; formują się twory koremiopodobne
AM: obfita, barwy jasnej kości słoniowej (2 ca)*		AM: umiarkowana, barwy białej do jasnej kości słoniowej (2 ca)*
SP: brak		SP: wielbłądzi (3 ie)*
(F) Agar odżywczy	60	
G: umiarkowany, barwy jasnej kości słoniowej (2 ca)* do jasnopszenicznej (2ea); * formują się twory koremiopodobne		
AM: obfita, barwy jasnej kości słoniowej (2 ca)*		
SP: brak	65	

* Kod barw według Color Harmony Manual, wydanie czwarte Container Corporation of America, 1958)

4) Charakterystyka fizjologiczna

Charakterystykę fizjologiczną szczepu przedstawiono w tabeli 2. Zakres temperatury dla wzrostu: 12—38°C. Zakres temperatury, w którym występuje dobry wzrost powietrzny na agarze (ISP nr 2) wynosi 20 do 35°C.

Tabela 2

Charakterystyka fizjologiczna szczepu nr C-15003
zakres temperatury dla wzrostu: 12 do 38°C
zakres temperatury dla wzrostu powietrznego: 20 do 35°C

upłynnianie żelatyny: dodatnie
hydroliza skrobi: dodatnia
redukcja azotanów: dodatnia
peptonizacja mleka: dodatnia
koagulacja mleka: ujemna
rozkład kazeiny: dodatni
produkcja pigmentów melanoidowych:
ujemna (agar z peptonem, ekstraktem drożdżowym i żelaza),
dodatnia (agar tyrozynowy)
rozkład tyrozyny: dodatni
rozkład ksantyny: ujemny
rozkład hipoksantyny: ujemny
tolerancja na lizozym: dodatnia
tolerancja na chlorek sodu: 2%

5) Utylizacja źródeł węgla

Utylizację źródeł węgla badano stosując pożywkę opisaną przez Pridhama i Gottlieba (*Journal of Bacteriology* 56, 107 (1948)) i pożywkę podstawową o tym samym składzie +0,1% ekstraktu drożdżowego. Otrzymane spektrum przedstawiono w tabeli 3.

Barwienie grzybni wegetatywnej według Grama: dodatnie.

Powyższą charakterystykę szczepu nr C-15003 porównano z opisami przedstawionymi w monografiach S.A. Waksman: „*The Actinomycetes*” Vol. 2 (The Williams and Wilkins Co., 1961); R.E. Buchanan i N.E. Gibbons: „*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*”, wydanie 8, 1974; i w innej literaturze.

Przyjęto, że szczep należy do grupy III rodzaju *Nocardia*; ponieważ wśród znanych nie znaleziono szczepu o wyżej przedstawionej charakterystyce, wyciągnięto wniosek, że C-15003 jest mikroorganizmem nowego gatunku.

Szczep nr C-15003 złożono w Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology (FERM), Japonia, z numerem decyzyjnym FERM-P nr 3992; w The Institute for Fermentation, Osaka (IFO), Japonia, pod numerem IFO 13726; oraz w The American Type Culture Collection (ATCC), Maryland, USA pod numerem ATCC-31281.

Leucyna stosowana w wynalazku jako dodatek może być wprowadzana w postaci pochodnych. Przykładami takich pochodnych są estry, jak estry alkilowe o 1 lub 2 atomach węgla w rodniku estrowym (np. ester metylowy lub etylowy), amidy lub alkiloamidy, mające w rodniku alkilowym 1 lub 2 atomy węgla (np. N-metyloamid lub N-etyloamid) leucyny, jej ketokwasy (np. kwas α -ketokapronowy) lub sole powyższych związków (np. chlorowodorek). Pożądana jest postać L leucyny. Stosować można również mieszaniny wolnej postaci leucyny z jej pochodnymi lub mieszaniny jej pochodnych.

Powyższe dodatki dodaje się do pożywki w ilości

Tabela 3

Utylizacja źródeł węgla przez szczep nr C-15003

Źródło węgla	Wzrost		Źródło węgla	Wzrost	
D-ksyloza	+	+++	trehaloza	+	+++
L-arabinoza	+	+	rafinoza	±	±
D-glukoza	++	++	melibioza	+	+
D-galaktoza	+	+	i-inozytol	-	-
D-fruktoza	+++	++	D-sorbit	-	-
L-ramnoza	+	+	D-mannit	++	++
D-mannoza	+++	++	gliceryna	-	±
sacharoza	++	++	skrobia rozpuszczalna	+	+
laktoza	-	-	kontrola (bez dodatku)	-	-
maltoza	±	+			

* pożywka podstawowa z 0,1% dodatkiem ekstraktu drożdżowego

Skala ocen: +++: bujny wzrost

++: dobry wzrost

+: wzrost

±: słaby wzrost

-: brak wzrostu

6) Dalsza charakterystyka

Komórki zbierano sposobem opisanym w punkcie 2), a DNA preparowano sposobem analogicznym do opisanego przez J. Marmura i innych (*Journal of Molecular Biology* 3, 208, 1961). Znaleziona zawartość G-C (guaniny-cytozyny) w DNA wyniosła około 71% molowych.

0,01 do 1,0, korzystnie 0,1 do 0,5% wagowych w objętości, w jakimkolwiek etapie hodowli *Nocardia* sp. nr C-15003, korzystnie w jej etapie początkowym.

Jako pożywkę do hodowli szczepu wytwarzającego antybiotyk C-15003 P-4 można stosować jakąkolwiek pożywkę płynną lub stałą, zawierającą

składniki odżywcze, które szczep może zużytkowywać. W produkcji na dużą skalę stosuje się zwykle pożywki płynne. Pożywka może zawierać substancje dodatkowe stosowane w sposobie według wynalazku, źródła węgla i azotu, fermentowane i przyswajalne przez szczep nr C-15003, substancje nieorganiczne, pożywki śladowe itp. Jako przykładowe źródła węgla można wymienić glukozę, laktozę, sacharozę, maltozę, dekstrynę, skrobię, glicerynę, mannit, sorbit itp., tłuszcze i oleje (np. olej sojowy, olej smalcowy, olej kurzy) itp.

Źródłem azotu może być np. ekstrakt mięsny, ekstrakt drożdżowy, drożdże suszone, mąka sojowa, namok kukurydziany, pepton, mąka z nasienia bawełny, melasa, mocznik, sole amonowe (np. siarczan amonu, chlorek amonu, azotan amonu itp.), azotany (np. azotan sodu, azotan potasu).

Pożywka może również zawierać sole sodu, potasu, wapnia, magnezu, żelaza, manganu, cynku, kobaltu, niklu itp., sole kwasu fosforowego, kwasu borowego itp., witaminy (np. B₁, B₂, kwas nikotynowy, B₁₂, C, E itp.), kwasy nukleinowe (np. purynę, pirymidynę i ich pochodne) oraz inne substancje.

wartości pH 6,5—7,5. Czas prowadzenia hodowli również zmienia się w zależności od wyżej wymienionych czynników. Zaleca się prowadzenie hodowli do uzyskania maksymalnej aktywności P-4. W hodowli na trzęsawce lub aerobowej podpowierzchniowej w pożywce ciekłej wymagany czas wynosi zwykle od około 48 do 240 godzin.

Poniższe jest konkretnym przykładem wytwarzania P-4.

Szczepem nr C-15003 inokulowano pożywkę hodowlaną (I) zawierającą 3% rozpuszczalnej skrobi, 0,2% chlorku amonu, 0,05% siarczanu magnezu, 1,09% dwuwodorofosforanu potasu, 2,09% wodorofosforanu potasu, 0,001% siarczanu żelazawego i substancje dodatkowe lub pożywkę hodowlaną (II) zawierającą 5% dekstryny, 3% namoku kukurydzianego, 0,1% peptonu, 0,5% węglanu wapnia i substancje dodatkowe. Hodowlę prowadzono w ciągu 144 godzin na trzęsawce obrotowej (200 obrotów na minutę) lub w fermentorze, w 28°C.

W tabelach 4 i 5 przedstawiono wyniki uzyskane przy stosowaniu pożywek (I) i (II).

Aktywność C-15003 oznaczano metodą krążków bibuły, stosując *Talaromyces avellaneus* IFO 7721

Tabela 4

Substancja dodana	Ilość (%)	Czas dodania (godzina) *	Udział składnika (% wagowych sumy)			Aktywność sumaryczna (µg/ml)
			P-2	P-3	P-4	
nie dodano	—	—	10	65	25	10
L-leucyna	0,1	0	5	28	67	13,5
L-leucyna	0,3	0	8	13	79	11,5
L-leucyna	0,1	72	5	30	65	10

* Czas zero oznacza, że substancja dodatkowa została wprowadzona do pożywki jako jeden z jej składników.

Tabela 5

Substancja dodana	Ilość (%)	Czas dodania (godzina) *	Udział składnika (% wagowych sumy)			Aktywność sumaryczna (µg/ml)
			P-2	P-3	P-4	
nie dodano	—	—	15	60	25	18
L-leucyna	0,3	0	7	21	72	20
L-leucyna	0,5	0	5	11	84	15

* Czas zero ma to samo znaczenie co w przypadku tabeli 4.

Do korygowania pH środowiska można stosować kwas nieorganiczny i/lub amoniak lub wodorotlenki metali alkalicznych. Jeżeli to jest pożądane, można również dodawać oleje i tłuszcze, środki powierzchniowo czynne i środki przeciwpienne.

Hodowlę można prowadzić stacjonarnie, na trzęsawce, aerobowo, podpowierzchniowo i w innych warunkach. W skali wielkoprodukcyjnej korzystna jest oczywiście hodowla aerobowa, podpowierzchniowa. Warunki hodowli zależą oczywiście od warunków fermentacji i składu pożywki, użytego szczepu, sposobu prowadzenia hodowli i innych czynników.

Zwykle korzystnie jest prowadzić inkubację w 20 do 35°C przy początkowej wartości pH około 5,5—8,5, zwłaszcza w 23 do 30°C przy początkowej

jako organizm testowy. W oznaczeniach stosowano pożywkę zawierającą 3,5 g wodorofosforanu sodu, 0,5 g dwuwodorofosforanu potasu, 5 g ekstraktu drożdżowego (Difco, USA), 10g glukozy, 15 g agaru i 1000 ml destylowanej wody (pH 7,0). Oznaczeń nagromadzonego w brzeczce P-2, P-3 i P-4 dokonywano jak następuje:

Brzeczke fermentacyjną ekstrahowano octanem etylu w objętości równej objętości brzeczki. Warstwę rozpuszczalnika odparowano, a pozostałość wysuszono. Wysuszony materiał rozpuszczono w octanie etylu w objętości równej 1/100 objętości wyjściowej brzeczki. Produkty rozwinęto na płycie do chromatografii cienkowarstwowej, powleczonej żelem krzemionkowym (silical-gel 60F₂₅₄, Merck, RFN), stosując jako układ rozwijający octan ety-

lu nasycony wodą. Ilość antybiotyku i stosunek składników oznaczono za pomocą aparatu Shimadzu model CS-910 (Japonia), na podstawie scałkowanych gęstości każdej z plam na chromatogramie, mierzonych przy 254 mm. Stosunek składników wyrażono w procentach wagowych P-2, P-3 i P-4 w odniesieniu do sumy składników.

Jak przedstawiono w tabelach 4 i 5, w obecności specyficznych dodatków szczep nr C-15003 produkuje P-4 w ilości 65 do 84% w odniesieniu do sumy składników, natomiast w nieobecności tych składników produkcja P-4 wynosi 25% lub mniej. Tak więc w pierwszym przypadku odzysk P-4 z brzeczki fermentacyjnej jest pełniejszy niż w przypadku drugim.

P-4 wytworzony w brzeczce fermentacyjnej jest substancją lipofilną o charakterze obojętnym i może być wyodrębniany z brzeczki i oczyszczany sposobami zwykle stosowanymi do odzyskiwania tego typu metabolitów. P-4 łatwo jest ekstrahowany z przesączonej brzeczki do nie mieszającego się z wodą rozpuszczalnika organicznego, jak estry kwasów tłuszczowych, np. octan etylu lub octan amylu; alkohole, np. butanol; chlorowcowane węglowodory, np. dwuchlorometan lub chloroform; lub ketony; np. keton metyloizobutylowy. Ekstrakcję P-4 z przesącza przeprowadza się przy pH zbliżonym do obojętnego, korzystnie octanem etylu przy pH 7. Ekstrakt przemywa się wodą i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem. Do zatężonego ekstraktu dodaje się rozpuszczalnika niepolarnego, jak eter naftowy lub heksan, co powoduje wytrącenie aktywnych związków.

Jeżeli to jest pożądane, surowy produkt poddaje się konwencjonalnej obróbce oczyszczającej. Jako rutynowy zabieg oczyszczający, odpowiednia jest chromatografia adsorpcyjna na konwencjonalnym adsorbencie, jak żel krzemionkowy, aktywny tlenek glinu, makroporowata niejonowa żywica itp.

W chromatografii na żelu krzemionkowym zawarty w surowym produkcie P-4 rozwija się np. eterem naftowym i heksanem, a eluuje dodaniem rozpuszczalnika polarnego, jak octan etylu, aceton, etanol lub metanol lub chlorowcowanego węglowodoru, jak dwuchlorometan lub chloroform, zawierającego rozpuszczalnik polarny, jak alkohol, np. metanol lub etanol, keton, np. aceton lub keton metyloetylowy lub podobne. W ten sposób P-4 eluuje się, wydziela i odzyskuje.

W przypadku zastosowania do oczyszczania P-4 makroporowatej żywicy adsorpcyjnej, elucji P-4 z kolumny dokonuje się mieszaniną wody z niższym alkoholem, niższym ketonem lub estrem. Niższym alkoholem może być przykładowo metanol, efanol, propanol lub butanol, a niższym ketonem aceton lub keton metyloetylowy. Estrem może być przykładowo octan etylu, octan butylu itp. W postępowaniu typowym, surowy produkt rozpuszcza się w 60% wodnym metanolu i absorbuje na kolumnie z adsorbentem Diaion HP-10 (Mitsubishi Chemical Industries, Ltd., Japonia). Kolumnę przemywa się 70% wodnym metanolem i eluuje P-4 za pomocą 90% wodnego metanolu.

W wyżej opisanym sposobie, frakcje zawierające P-4 łączy się i odparowuje pod zmniejszonym ciś-

nieniem. Do surowego produktu dodaje się 5 do 8 objętości octanu etylu i pozostawia mieszaninę w spoczynku, co prowadzi do wykrystalizowania P-4.

W sposobie według wynalazku udział P-4 w sumie produktów C-15003 wynosi 65% lub więcej, a P-4 jest łatwo odzyskiwalny z brzeczki fermentacyjnej. Dzięki temu sposób według wynalazku jest bardzo korzystny w wytwarzaniu P-4 na skalę przemysłową.

W tabeli 6 przedstawiono właściwości fizykochemiczne P-4 otrzymanego w przykładzie IV.

Tabela 6

Antybiotyk C-15003 P-4 ($C_{33}H_{45}ClN_2O_9 = 649,196$)

Temperatura topnienia ($^{\circ}C$)	177—180
Skrećalność właściwa (α) $\frac{22^{\circ}}{D}$	$-142^{\circ} \pm 10^{\circ}$ ($c = 0,522$, $CHCl_3$)
Analiza elementarna znaleziono (%)	C 60,65 H 7,05 N 4,25 Cl 5,23
obliczono (%)	C 61,05 H 6,99 N 4,32 Cl 5,46
Widmo w nadfiolecie (w metanolu nm (ϵ))	233 (29900), 240 (przebiegicie, 28240), 252 (27590), 280 (5712), 288 (5680)
Widmo absorpcji w podczerwieni (cm^{-1}), KBr	1740, 1730, 1670, 1580, 1445, 1385, 1340, 1255, 1180, 1150, 1100, 1080, 1038
Widmo magnetycznego rezonansu jądrowego (ppm) 100 MHz w $CDCl_3$	1,03 (d) (6H)
Widmo masowe (m/e)	587, 485, 470, 450
Rozpuszczalność	nierozpuszczalny w eterze naftowym, heksanie, wodzie słabo rozpuszczalny w benzenie, eterze rozpuszczalny w chloroformie, octanie etylu, acetonie, etanolu, metanolu, pirydynie, czterowodorofuranie, dwumetylosulfotlenku
Reakcje barwne	Dragendorfa: dodatnia Beilsteina: dodatnia

Przyjmuje się, że P-3, P-3' i P-4 są związkami nowymi, natomiast P-2 jest identyczny z propionianem maytansinolu, co zostało wykazane w odniesieniu Kupchana i innych (Journal of the American Chemical Society 97, 5294 (1975) na podstawie analizy elementarnej, skrećalności właściwej, absorpcji w nadfiolecie i w podczerwieni, spektrografii masowej itp.

Czynność biologiczna P-4 przedstawia się następująco:

A) Czynność wobec mikroorganizmów

Stężenie hamujące wzrost niżej podanych mikroorganizmów oznaczono metodą krążków bibuły, stosując jako pożywkę agar tryptikazowo-sojowy (BBL). Krążki bibuły (Toyo Seisakusho, typu cienkiego, średnicy 8 mm) zaimpregnowano 0,002 ml roztworu P-4 o stężeniu 300 µg/ml i umieszczono na płytach aagrowych inokulowanych odpowiednimi mikroorganizmami. P-4 nie wykazał czynności w stosunku do następujących bakterii: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* i *Mycobacterium avium*.

Natomiast wzrost grzyba *Talaromyces avellaneus* jest inhibitowany przez P-4 na płycie z agarem o składzie: 3,5 g wodorofosforanu dwusodowego, 0,5 g dwuwodorofosforanu monopotasowego, 5 g ekstraktu drożdżowego (Difco), 10 g glukozy, 15 g agaru i 1000 ml wody destylowanej, pH 7,0. Minimalne stężenie hamujące P-4 wynosi 1,0 do 1,5 µg/ml. Ponadto, *Tetrahymena pyriformis* W jako organizm testowy był hodowany na pożywce testowej o składzie 20 g proteozo-peptonu (Difco), 1 g ekstraktu drożdżowego, 2 g glukozy, 1000 ml wody destylowanej i 10 ml buforu fosforanowego, w 28°C, w ciągu 44 do 48 godzin, a czynność hamowania wzrostu tego pierwotniaka przez P-4 była oznaczona metodą rozcieńczeń seryjnych. Hamowanie wzrostu wystąpiło przy 0,5 µg/ml.

P-4 wykazał czynność wobec następujących mikroorganizmów: *Fusicladium levieri*, *Helminthosporium sigmoideum* var. *irregulare*, *Pyricularia oryzae*, *Cochlioborus miyabeanus*, *Sclerotinia acretiorum*, *Pellicularia sasakii*, *Trichophyton rubrum*, *Rhodotorula rubra* i *Cryptococcus neoformans*.

B) Czynność przeciwnowotworowa

Zbadano czynność terapeutyczną P-4 (dawkowanego dootrzewnowo w ciągu 9 kolejnych dni) wobec białaczki P388 u myszy (1×10^6 komórek/zwierzę, mysz, transplantacja dootrzewnowa). Czynność przeciwnowotworowa P-4 w dawce 0,00625 mg/kg/doba wyraziła się przedłużeniem życia o 180%.

C) Toksyczność

We wstępnej próbie toksyczności ostrej, przeprowadzonej u myszy i która obejmowała dootrzewnową iniekcję P-4, antybiotyk wykazał wartość LD₅₀ powyżej 0,313 mg/kg.

Jak wyżej wspomniano, P-4 wykazuje silną czynność hamowania wobec grzybów i pierwotniaków i dlatego jest cennym czynnikiem przeciwrzybowym i przeciwpierwotniakowym. Ponadto, ponieważ P-4 wykazuje czynność przedłużania życia ssaków z nowotworami (np. myszy), oczekuje się, że związek ten będzie użyteczny jako lek przeciwnowotworowy.

P-4 jako czynnik przeciwrzybowy i przeciwpierwotniakowy może być z korzyścią stosowany do szacowania ekologii bakteryjnej w glebie, osadzie czynnym, zwierzęcym płynie ustrojowym i podobnych. Tak więc w przypadku, gdy z próbek gleby mają być wyodrębnione wartościowe bakte-

rie lub gdy ma być oszacowana czynność bakterii w oddzieleniu od czynności grzybów i pierwotniaków, w związku z operacją i analizą układu z osadem czynnym w obróbce ścieków, antybiotyk może być stosowany do uzyskania wybiornego wzrostu flory bakteryjnej, uniemożliwiając równoczesny wzrost w próbce grzybów i pierwotniaków.

W typowym przypadku, próbkę dodaje się do ciekłej lub stałej pożywki, do której następnie dodaje się P-4 w 1% wodnym metanolu, w ilości 0,1 ml roztworu o stężeniu 1 0do 100 µg/ml na 1 ml pożywki.

P-4 może być również stosowany jako czynnik przeciwbakteryjny w zwalczaniu chorób roślin spowodowanych wyżej podanymi mikroorganizmami. W typowym stosowaniu, P-4 używa się w postaci roztworu w 1% wodnym metanolu, zawierającego antybiotyk w stężeniu 0,5—5 µg/ml. Przykładowo, P-4 można stosować do zwalczania schorzeń roślin ryżowych, jak porażenie, plamy liści spowodowane przez *Helminthosporium* i rdza pochewki.

Wynalazek jest ilustrowany poniższymi przykładami, w których opisie „części” oznaczają części wagowe, jeżeli nie zaznaczono inaczej, a stosunek między „częściami” a „częściami objętościowymi” dotyczy stosunku między „gramami” a „mililitrami”, a natomiast „‰” dotyczy „wagi/objętości”, jeżeli nie zaznaczono inaczej.

Przykład I. 40 części objętościowych pożywki posiewowej (1,0‰ glukozy, 2,0‰ Bactotryptonu i 1,2‰ ekstraktu drożdżowego Bacto, pH 7,0) wlewa się do kolby Erlenmayera o objętości 200 części objętościowych.

Po sterylizacji, pożywkę szczepi się *Nocardia* sp. nr C-15003 (IFO 13726). Zaszczepioną pożywkę inkubuje się w temperaturze 28°C na wstrząsarce obrotowej (200 obrotów na minutę), uzyskując hodowlę posiewową. Komórki w hodowli przemywa się trzykrotnie sterylizowaną wodą destylowaną i przemyte komórki ponownie zawiesza w sterylizowanej wodzie destylowanej, w objętości równej początkowej objętości brzezki. Jedną część objętościową powyższej zawiesiny szczepi się 40 objętości podstawowej pożywki hodowlanej, zawierającej 3% skrobi rozpuszczalnej, 0,2% chlorku amonu, 0,05% siarczanu magnezu, 1,09% dwuwodorofosforanu potasu, 2,09% wodorofosforanu potasu, 0,001% siarczanu żelazawego i 0,3% L-leucyny. Fermentację prowadzi się w 28°C w ciągu 8 dni, na trząsawce obrotowej (200 obrotów na minutę).

Antybiotyk C-15003 powstaje w ilości sumarycznej 12 µg/ml, a udział składnika P-4 w sumie wynosi 80% wagowych.

Przykład II. 500 części objętościowych hodowli posiewowej jak przedstawiona w przykładzie I wprowadza się do 2000 części objętościowych naczynia Sakaguchi i prowadzi hodowlę w 28°C w ciągu 48 godzin, na trząsawce posuwisto-zwrotnej (110 suwów na minutę), uzyskując inokulum. Inokulum przenosi się do 100×10^8 części objętościowych pożywki zawierającej 2,0% glukozy, 3,0% skrobi rozpuszczalnej, 1% namoku kukurydzianego, 1% mąki sojowej, 0,5% polipeptonu (Daigo Nutritive Chemicals, Ltd., Japonia), 0,3% chlorku sodu i 0,5% węglanu wapnia, zawartej w fermentorze

ze stali nierdzewnej o objętości 200×10^3 części.

Hodowlę prowadzi się w 28°C w ciągu 48 godzin, przy napowietrzaniu 100×10^3 części objętościowych na minutę i mieszaniu z szybkością 200 obrotów na minutę. Brzeczki hodowlaną (10×10^3 części objętościowych) przenosi się do 100×10^3 części objętościowych pożywki fermentacyjnej (5% dekstryny, 3% namoku kukurydzianego, 0,1% peptonu, 0,5% L-leucyny i 0,5% węglanu wapnia, waga w objętości, pH 7,0) w 200×10^3 częściach objętościowych fermentora ze stali nierdzewnej. Hodowlę prowadzi się w ciągu 4 dni w 28°C , przy napowietrzaniu 100×10^3 części objętościowych na minutę, mieszanie z szybkością 150 obrotów na minutę.

Antybiotyk C-15003 powstaje w ilości sumarycznej $12 \mu\text{g/ml}$, a udział składnika P-4 w sumie wynosi około 85% wagowych.

Przykład III. Do 95×10^3 części objętościowych brzeczki otrzymanej w przykładzie II dodaje się 50×10^3 części objętościowych acetonu. Mieszaninę miesza się w ciągu 30 minut, po czym dodaje 2×10^3 części sorbentu Hyflo Super-Cel (Johnes and Manville Products, Ltd.) i całość dokładnie miesza. Mieszaninę przesącza się na filtrze ciśnieniowym, otrzymując 135×10^3 części objętościowych przesącza.

Do przesącza dodaje się 50×10^3 części objętościowych wody i 90×10^3 części objętościowych octanu etylu, mieszaninę miesza i dwukrotnie ekstrahuje. Otrzymane ekstrakty w octanie etylu łączy się, przemywa dwiema porcjami po 80×10^3 części objętościowych wody zadaje 1×10^3 częściami bezwodnego siarczanu sodu, suszy i zateża do 200 części objętościowych. Do koncentratu dodaje się eteru naftowego, a wytrącony osad odsącza, otrzymując 35 części surowego produktu.

Do tak otrzymanego surowego produktu dodaje się 50 części objętościowych octanu etylu i całość miesza. Odsącza się części nierozpuszczalne, a do przesącza dodaje 10 części żelu krzemionkowego (Merck, RFN, 0,05—0,2 mm). Po wymieszaniu całości, pod zmniejszonym ciśnieniem oddestylowuje się octan etylu.

Pozostałość nanosi się na kolumnę z żelem krzemionkowym (500 części objętościowych). Antybiotyk eluuje się kolejno 500 częściami objętościowymi n-heksanu, 500 częściami objętościowymi mieszaniny n-heksanu octan etylu (3:1), 2000 części objętościowych mieszaniny n-heksan-octan etylu (1:1) i 2000 części objętościowych octanu etylu nasyconego wodą, zbierając wycieki frakcjami objętości po 50 części objętościowych.

Jedną część objętościową każdej frakcji odparowuje się do sucha, dodaje do pozostałości 0,1 części objętościowej octanu etylu, a mieszaninę nanosi na płytę szklaną powleczoną żelem krzemionkowym (Merck, RFN, 60F₂₅₄, 0,25 mm, 20×20), w odległości 2,5 cm od dolnej krawędzi. Chromatogram rozwija się w octanie etylu wysyconym wodą, do wysokości około 17 cm. Po rozwinięciu przeprowadza się detekcję w nadfiolecie ($2537 \cdot 10^{-10}$ m. Frakcje aktywne o Rf 0,49 zbiera się i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem do około 2 części objętościowych.

Do koncentratu dodaje się 20 części objętościowych eteru naftowego, otrzymując 9,1 części surowych kryształów. Surowe kryształy rozpuszcza się w 20 częściach objętościowych ciepłego octanu etylu. Po oziębieniu odzyskuje się 0,92 części P-4. Czystość otrzymanych kryształów wynosi 94% wagowych, a temperatura topnienia $178-180^\circ\text{C}$.

Przykład IV. W 400 częściach objętościowych 50% metanolu rozpuszcza się 20 części surowego produktu otrzymanego w przykładzie III. 1000 części objętościowych sorbentu Diaion HP-10 (Mitsubishi Chemical Industries Ltd., Japonia) wprowadza się do kolumny (średnica 2,5 cm) w 3000 objętościowych części 50% wodnego metanolu. Rozwinięcie i elucję P-4, po przepuszczeniu przez kolumnę wyżej sporządzonego roztworu, przeprowadza się stosując 1000 części objętościowych 60% metanolu, 7500 części objętościowych 60% metanolu-wody i 7500 części objętościowych metanolu-wody, w podanej kolejności.

Wycieki zbiera się frakcjami po 75×10^3 części objętościowych, a każdą frakcję analizuje chromatografią cienkowarstwową na żelu krzemionkowym, w sposób opisany w przykładzie III.

Frakcje aktywne nr 182-190 łączy się i zateża. Do koncentratu dodaje się 500 części objętościowych wody i 1000 części objętościowych octanu etylu. Mieszaninę wstrząsa się w rozdzielaczu, oddziela warstwę wodną, a warstwę octanu etylu dwukrotnie przemywa 300 częściami objętościowymi wody, suszy nad bezwodnym siarczanem sodu, zateża i pozostawia w spoczynku.

Wytrącone kryształy P-4 odsącza się i suszy (0,950 części P-4). Czystość otrzymanych kryształów P-4 wynosi 92% wagowe, a temperatura topnienia 177 do 179°C .

Przykład V. 40 części objętościowych pożywki posiewowej (1% glukozy, 2,0% Bactotryptonu, i 1,2% ekstraktu drożdżowego Bacto, pH 7,0) wlewa się do kolby Erlenmayera o pojemności 200 części objętościowych.

Po sterylizacji pożywkę szczepi się Nocardia sp. nr C-15003 (IFO 13726). Zaszczepioną pożywkę inkubuje się w temperaturze 28°C na wstrząsarce obrotowej (200 obrotów na minutę), uzyskując hodowlę posiewową. Komórki w hodowli przemywa się trzykrotnie sterylizowaną wodą destylowaną i przemyte komórki ponownie zawieszają w sterylizowanej wodzie destylowanej w objętości równej początkowej objętości brzeczki. Jedną częścią objętościową tej zawiesiny szczepi się 40 objętości podstawowej pożywki hodowlanej, składającej się z 3% skrobii rozpuszczalnej, 0,2% chlorku amonowego, 0,05% siarczanu magnezu, 1,09% dwuwodorofosforanu potasu, 2,09% wodorofosforanu potasu, 0,001% siarczanu żelazawego i 0,3% estru metylowego leucyny. Fermentację prowadzi się w ciągu 8 dni na wstrząsarce obrotowej (200 obrotów na minutę) w temperaturze 28°C .

Całkowita ilość wytworzonego antybiotyku C-15003 wynosi $12 \mu\text{g/ml}$, a udział składnika P-4 w tej ilości wynosi 80% (wagowych).

Przykład VI. 40 części objętościowych pożywki posiewowej (1% glukozy, 2% Bactotryptonu i 1,2% ekstraktu drożdżowego Bacto, pH 7,0) wle-

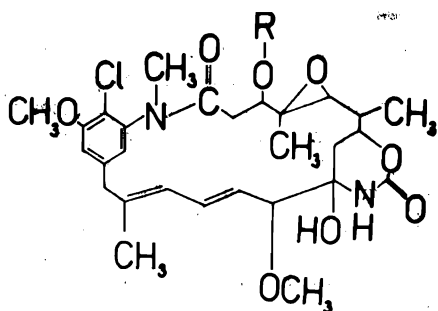
wa się do kolby Erlenmeyera o pojemności 200 części objętościowych.

Po sterylizacji pożywkę szczepi się *Nocardia* sp. nr C-15003 (IFO 13726). Zaszczepioną pożywkę inkubuje się w temperaturze 28°C na wstrząsarce obrotowej (200 obrotów/minutę), uzyskując hodowlę posiewową. Komórki w hodowli przemywa się trzykrotnie sterylizowaną wodą destylowaną i przemyte komórki zawieszają w sterylizowanej wodzie destylowanej w objętości równej początkowej objętości brzezki. Jedną częścią objętościową tej zawiesiny szczepi się 40 objętości podstawowej pożywki hodowlanej, składającej się z 3% skrobi rozpuszczalnej, 0,2% chlorku amonowego, 0,05% siarczanu magnezu, 1,09% dwuwodorofosforanu potasu, 2,09% wodorofosforanu potasu, 0,001% siarczanu żelazawego i 0,3% N-metyloamidu leucyny. Fermentację prowadzi się w ciągu 8 dni na wstrząsarce obrotowej (200 obrotów na minutę) w temperaturze 28°C.

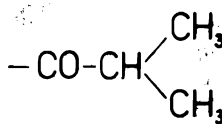
Całkowita ilość wytworzonego antybiotyku C-15003 wynosi 12 µg/ml a udział składnika P-4 w tej ilości wynosi 80% (wagowych).

Przykład VII. 40 części objętościowych pożywki posiewowej (1% glukozy, 2% Bactotryptonu i 1,2% ekstraktu drożdżowego Bacto, pH 7,0) wlewa się do kolby Erlenmeyera o pojemności 200 części objętościowych.

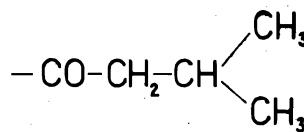
Po sterylizacji pożywkę szczepi się *Nocardia* sp. nr C-15003 (IFO 13726). Zaszczepioną pożywkę inkubuje się w temperaturze 28°C na wstrząsarce obrotowej (200 obrotów/minutę), uzyskując hodowlę posiewową. Komórki w hodowli przemywa się trzykrotnie sterylizowaną wodą destylowaną i przemyte komórki zawieszają ponownie w sterylizowanej wodzie destylowanej w objętości równej początkowej objętości brzezki. Jedną częścią objętościową tej zawiesiny szczepi się 40 objętości podstawowej pożywki hodowlanej, składającej się z 3% skrobi rozpuszczalnej, 0,2% chlorku amonowego, 0,05% siarczanu magnezu, 1,09% dwuwodorofosforanu potasu, 2,09% wodorofosforanu potasu, 0,001% siarczanu żelazawego i 0,3% α-ketoizokaproianu leucyny. Fermentację prowadzi się w cią-



WZÓR 1



WZÓR 2



WZÓR 3

gu 8 dni na wstrząsarce obrotowej (200 obrotów na minutę) w temperaturze 28°C.

Całkowita ilość wytworzonego antybiotyku C-15003 wynosi 12 µg/ml, a udział składnika P-4 w tej ilości wynosi 80% (wagowych).

Przykład VIII. 40 części objętościowych pożywki posiewowej 1% glukozy, 2% Bactotryptonu i 1,2% ekstraktu drożdżowego Bacto, pH 7,0) wlewa się do kolby Erlenmeyera o pojemności 200 części objętościowych.

Po sterylizacji pożywkę szczepi się *Nocardia* sp. nr C-15003 (IFO 13726). Zaszczepioną pożywkę inkubuje się w temperaturze 28°C na wstrząsarce obrotowej (200 obrotów/minutę), uzyskując hodowlę posiewową. Komórki w hodowli przemywa się trzykrotnie sterylizowaną wodą destylowaną i przemyte komórki zawieszają ponownie w sterylizowanej wodzie destylowanej w objętości równej początkowej objętości brzezki. Jedną częścią objętościową tej zawiesiny szczepi się 40 objętości podstawowej pożywki hodowlanej, składającej się z 3% skrobi rozpuszczalnej, 0,2% chlorku amonowego, 0,05% siarczanu magnezu, 1,09% dwuwodorofosforanu potasu, 2,09% wodorofosforanu potasu, 0,001% siarczanu żelazawego i 0,3% chlorowodoru leucyny. Fermentację prowadzi się w ciągu 8 dni na wstrząsarce obrotowej (200 obrotów/minutę) w temperaturze 28°C.

Całkowita ilość wytworzonego antybiotyku C-15003 wynosi 12 µg/ml, a udział składnika P-4 w tej ilości wynosi 80% (wagowych).

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania nowego antybiotyku C-15003 P-4 o wzorze 1, w którym R oznacza grupę o wzorze 3, **znamienny tym**, że prowadzi się hodowlę mikroorganizmu *Nocardia* sp. nr C-15003 (IFO, 13726), zdolnego do wytwarzania antybiotyku C-15003 P-4, w pożywce zawierającej przyswajalne źródła węgla i azotu, a ponadto zawierającej jako substancję dodatkową leucynę i/lub jej pochodne w ilości 0,01—1,0% wagowo/objętościowych.