



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

204030
(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 1/06

(22) Přihlášeno 19 06 78

(21) (PV 4018-78)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 20 06 77
(807867) Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 30 06 80

(45) Vydáno 15 12 83

(72)

Autor vynálezu

HERTZ MARTIN ROY, PEARL RIVER a MARTIN JOHN HENRY
EDWARD JAMES, NEW CITY (Sp. st. a.)

(73)

Majitel patentu

AMERICAN CYANAMID COMPANY, WAYNE (Sp. st. a.)

(54) Způsob výroby nového antibiotika BL 580 ZETA

1

Vynález se týká způsobu výroby nového antibiotika označeného BL 680 ZETA. Účinnost nového antibiotika jako antikokcidiálního činidla a jeho chemické a fyzikální vlastnosti je odlišují od dříve popsanych antibiotik.

Nové antibiotikum vyráběné podle vynálezu je organickou kyselinou a je tedy schopné vytvářet soli s ionty alkalických kovů. Tudíž soli vzniklé smícháním volné kyseliny antibiotika se stechiometrickými množstvími iontů alkalických kovů, účelně v neutrálním rozpouštědle, se tvoří s ionty, například sodíku, draslíku, amonia a příbuznými kationty. Soli alkalických kovů a antibiotika BL850 ZETA všeobecně jsou krystalické pevné látky poměrně nerozpustné ve vodě, avšak rozpustné ve většině obvyklých organických rozpouštědel, například v methanolu, ethylacetátu, acetonu, chloroformu, heptanu, etheru a benzenu.

Způsob výroby nového antibiotika, označeného BL850 ZETA, spočívá podle vynálezu v tom, že se kultivuje *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 11108 ve vodném živném prostředí o hodnotě pH v rozsahu od 6 do 8, obsahujícím asimilovatelné zdroje uhlohydrátů, dusíku a anorganických solí za submerních aerobních podmínek při teplotě 25 až 32 °C, s výhodou po dobu 48 až 96 ho-

2

din, načež se antibiotikum izoluje z vyfermentovaného živného média.

Nové antibiotikum, které bylo označeno BL580 ZETA, vzniká za kontrolovaných podmínek během kultivace nové mutanty kmene *Streptococcus hygroscopicus*, která se získává z izolátu přirozeně selektované jediné kolonie *S. hygroscopicus* NRRL 5647 působením N-methyl-N'-nitro-N''-nitrosoguanidinu. Živá kultura kmene nové mutanty byla uložena v Culture Collection Laboratory, Northern Regional Research Center, United States Department of Agriculture, Peoria, Illinois a byla přidána ke stálé sbírce pod přírůstkovým číslem NRRL 11108.

Kultivační, fyziologické a morfologické znaky NRRL 11108 jsou v podstatě stejné jako u NRRL 5647 (jak bylo určeno Dr. H. Tresnerem, Lederle Laboratories Division, American Cyanamid Company, Pearl River, New York), s tím rozdílem, že NRRL 11108 na většině médií sporuluje málo nebo nesporuluje vůbec. Obecný popis NRRL 5647 je uveřejněn v americkém patentním spisu č. 3 812 249.

Rozumí se, že při produkci BL580 ZETA není vynález omezen na jednotlivý mikroorganismus nebo mikroorganismy plně odpovídající růstu a mikroskopickým charakteristikám NRRL 11108. Ve skutečnosti je žá-

doucí a záměrné zahrnout použití mutant produkovaných různým způsobem z NRRL 11108, například ozářením X-paprsky, ultrafialovým ozářením, dusíkatým yperitem, vystavením účinku fágů apod.

Antibiotikum BL580 ZETA je aktivním antikokcidálním činidlem, jak bylo zjištěno následujícími testy in vivo, při kterých bylo použito následující diety pro kuřata:

Premix s vitamíny a aminokyselinami	0,5 %
Stopové minerály	0,1 %
Chlorid sodný	0,3 %
Fosforečnan vápenatý	1,2 %
Mletý vápenec	0,5 %
Stabilizovaný tuk	4,0 %
Dehydratovaná vojtěška (17 % bílkovin)	2,0 %
Kukuřičná lepková mouka (41 % bílkovin)	5,0 %
Menhaden rybí moučka (60 % bílkovin)	5,0 %
Sójová neodtučněná mouka (44 % bílkovin)	30,0 %
Mletá žlutá kukuřice, jemná do	100 %

Premix obsahující vitamíny a aminokyseliny ve výše uvedené dietě pro kuřata byl připraven z následující směsí. Kvantitativní údaje se týkají jednotek v kilogramu diety pro kuřata.

Butylhydroxytoluen	125	mg
dl-Methionin	500	mg
Vitamín A	3300	mj
Vitamín D ₃	1100	mj

Riboflavin	4,4	mg
Vitamín E	2,2	mj
Niacin	27,5	mg
Kyselina pantothenová	8,8	mg
Cholinchlorid	500	mg
Kyselina listová	1,43	mg
Menadion bisulfát sodný	1,1	mg
Vitamín B ₁₂	11	μg
Mletá žlutá kukuřice, jemná do	5	g

Směsné inokulum 5000 sporulovaných oocyst *Eimeria acervulina* a dostatečný počet oocyst *Eimeria tenella* k vyvolání 85 až 100% mortality neošetřených kontrol bylo podáno skupinám sedmidenních kuřat přímou inokulací do volete všech kuřat. Kuřata měla volný přístup k dietě a vodě během celého zkušebního období. Dva dny po naočkování bylo podáváno různým skupinám testovaných kuřat medikované krmivo, skládající se z diety pro kuřata a různých množství antibiotika BL580 ZETA. Deset dní po naočkování bylo testování ukončeno. Kuřata byla zvážena, pitvána a bylo hodnoceno poškození jejich zažívacího ústrojí. Výsledky tohoto testu jsou patrné z níže uvedené tabulky I. Tyto výsledky ukazují, že bylo dosaženo 80 % přežití infikovaných kuřat, když bylo infikovaným kuřatům v dietě podáno 60 ppm BL580 ZETA. Tyto výsledky rovněž ukazují signifikantní potlačení lézí vyvolaných *Eimeria tenella* a *Eimeria acervulina*, když bylo infikovaným kuřatům v dietě podáno 30 nebo 60 ppm BL580 ZETA.

TABULKA I

Koncentrace BL580 ZETA v dietě, ppm	Výchozí počet kuřat	Procento kuřat se zmenšenými lézemi		
		Procento přežití	<i>Eimeria tenella</i>	<i>Eimeria acervulina</i>
0	40	15	0	0
60	10	80	80	90
30	10	50	10	50

Kultivace mikroorganismu *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 11108 lze provádět v širokém výběru tekutých živných prostředí. Prostředí, která jsou použitelná pro produkci antibiotika BL580 ZETA, obsahují asimilovatelný zdroj uhlíku, například škrob, cukr, melasu, glycerol atd., asimilovatelný zdroj dusíku, například bílkoviny, hydrolyzáty bílkovin, polypeptidy, aminokyseliny, kukuřičný výluh atd., a anorganické anionty a kationty, například draslík, sodík, vápník, síran, fosforečnan, chlorid atd. Stopové prvky, například bor, molybden, měď atd., jsou dodávány jako nečistoty jiných složek média.

Vzdušnění tanků a nádob se provádí proháněním sterilního vzduchu prostředím nebo na povrch fermentačního prostředí. Další míchání v tancích se provádí rotačním

míchadlem. Protipěnidlo, například jedno procento oktadekanolu v sádlovém oleji, může být přidáno v případě potřeby.

Inokulum v třepačce ze *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 11108 se připravuje naočkováním dávek sterilního tekutého média v 500 ml baňkách se škrabanými nebo smytými sporami ze šikmého agaru kultury. Obvykle se používá následujícího média:

Sójová mouka	1,0 %
Glukóza	2,0 %
Kukuřičný výluh	0,5 %
Uhličitan vápenatý	0,3 %
Voda do	100 %

Baňky se inkubují při teplotě od 25 do 29 °C, s výhodou 28 °C, a intenzivně třepou na rotační třepačce po dobu 48 až 96 ho-

din. Dvě 100 ml dávky tohoto inokula se použijí k naočkování stejného sterilního prostředí ve 20litrové nádobě. Toto inokulum je inkubováno za míchání a vzdušnění sterilním vzduchem po dobu 36 až 64 hodin při teplotě 25 až 29 °C, s výhodou při teplotě 28 °C. Toto inokulum se použije k naočkování 300 litrů téhož sterilního média ve fermentačním tanku. Toto inokulum se inkubuje za míchání a vzdušnění sterilním vzduchem po dobu 36 až 64 hodin při teplotě 25 až 29 °C, s výhodou při teplotě 28 °C. Toto inokulum se použije k naočkování 4000litrového fermentačního tanku obsahujícího 3000 litrů sterilního média, například následujícího složení:

Kukuřičný výluh	0,5 %
Sójová mouka	1,0 %
Kukuřičný škrob	4,0 %
Uhličitan vápenatý	0,1 %
Voda do	100 %

Toto prostředí je fermentováno po dobu 100 až 200 hodin při teplotě od 27 do 32 °C za míchání rotačním míchadlem a vzdušněním v množství 0,4 až 0,8 litru vzduchu na litr média za minutu. Obvykle se přidává protipěnidlo, například Hodag^R FD82, v poměru asi 16 l/4545 litrů prostředí.

Po skončení fermentace se vyfermentovaná půda, obsahující antibiotikum BL 580 ZETA, spojí asi s polovičním objemem octanu ethylnatého a míchá se po dobu 2 až 3 hodin. Přidá se přibližně 8 % křemelinu a směs se filtruje deskovým a rámovým filtrem. Koláč na filtru se promyje ethylacetátem. Ethylacetátové extrakty se spojí a koncentrují v destilačním přístroji na sirup. Sirup se smíchá s dvojnásobkem svého objemu n-heptanu a skladuje při teplotě 4 °C přes noc. Supernatant se oddělí dekantací a zahustí na gumovitý koncentrát, který se rozmíchá s 10 litry methanolu a chladí po několik hodin suchým ledem. Směs se zfiltruje přes fritu pokrytou křemelinou a promyje studeným methanolem. Methanolvý roztok se zkoncentruje ve vakuu na sirupovitý odparek.

Připraví se chromatografická kolona s aktivním uhlím v poměru asi 1 litr uhlí na 50 gramů násady. Vysušený odparek se rozpustí v methylenchloridu v poměru 40 g/l a nalije na kolonu. Methylenchloridový eluát se shromažďuje jako jedna frakce a zkoncentruje na sirup. Odparek se smíchá s methanolem a uloží v chladírně se suchým ledem, aby se teplota snížila na -10 °C na dobu 15 minut. Ztuhlý olej se po 15 minutách odfiltruje a produkt rozpustný v methanolu se koncentruje ve vakuu za vzniku oleje. Tento olej se rozpustí v minimálním množství methylenchloridu, přidá se silikagel a zkoncentruje se, až není přítomno žádné rozpouštědlo, a nanese se na sloupec suchého silikagelu. Kolona se vyvíjí směsí

ethylacetátu s benzenem v poměru 1 : 1. Kolona se potom nechá vykapat do sucha. Část sloupce s R_f 0,10 až 0,45 se vyřízne a rozmíchá ve směsi ethylacetátu s methylenchloridem a methanolem (2 : 2 : 1 objemově). Tato směs se zfiltruje, promyje další směsí rozpouštědel a zkoncentruje ve vakuu do sucha.

Smícháním n-heptanu s methanolem, ethylacetátem a vodou (3000 : 1500 : 20 : 40 objemově) se připraví dvoufázový systém. S dolní fází tohoto systému se smíchá Calatom^R (Eagle-Picher Industries, Cincinnati, Ohio), druh křemelinu, v poměru asi 2000 g/1650 ml dolní fáze a naplní se po částech do kolony (vnitřní průměr 7,5 cm). Náplň se aplikuje ve formě směsi křemelinu, dolní fáze a lyofilizovaného produktu. Naplněná kolona se vyvíjí horní fází a shromažďují se frakce. Aktivita se deteguje pomocí chromatografie na tenké vrstvě u vybraných frakcí za použití desek se silikagelem a směsí chloroformu s ethylacetátem (1 : 1) jako vývojký a zuhelnatí se kyselinou sírovou k detegování. Frakce 123 až 186 (konec) se spojí, zkoncentrují a poskytnou antibiotikum BL580 ZETA.

Vynález bude popsán podrobněji ve spojení s následujícími specifickými příklady provedení.

Příklad 1

Příprava inokula

Typické médium používané k růstu primárního inokula se připravuje podle následujícího předpisu:

Sójová mouka	1,0 g
Glukóza	2,0 g
Kukuřičný výluh	0,5 %
Uhličitan vápenatý	0,3 %
Voda do	100 ml

Smyté nebo seškrábané spory ze šikmého agaru *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 11108 se použijí k naočkování dvou 500 ml baněk, přičemž každá obsahuje 100 ml výše uvedeného média, které bylo sterilizováno. Baňky se umístí na rotační třepačku a intenzívně třepou po dobu 72 hodin při teplotě 28 °C. Získané inokulum se přenese do 22 litrové skleněné nádoby, obsahující 12 litrů stejného sterilního média. Toto sekundární inokulum se vzdušní sterilním vzduchem, zatímco růst probíhá po dobu 48 hodin při teplotě 28 °C. Získané sekundární inokulum se přenese do 440litrového tanku, obsahujícího 300 litrů stejného sterilního média. Toto terciární inokulum se vzdušní sterilním vzduchem v množství jeného média. Toto terciární inokulum se den litr vzduchu/litrmédia/minuta a míchá rotačním míchadlem s 173 ot/min. Růst pokračuje po dobu 48 hodin při teplotě 28 °C. Hodnota pH v této době je 6,9 až 7,0.

Příklad 2

Fermentace

Fermentační médium se připravuje podle následujícího předpisu:

Kukuřičný výluh	0,5 g
Sójová mouka	1,0 g
Kukuřičný škrob	4,0 g
Uhličitan vápenatý	0,1 g
Voda do	100 ml

3000litrová násada fermentačního média výše uvedeného složení ve 4000 litrovém tanku se sterilizuje při 120 °C po dobu 60 minut. Hodnota pH média po sterilizaci je 6,4 až 6,5. Toto médium se inokuluje 300 litry terciárního inokula, připraveného tak, jak je popsáno v příkladu 1. Fermentace se provádí při teplotě 28 až 29 °C za použití 11 litrů Hodag[®] FD82 jako protipěnidla. Vzdušnění se realizuje 0,6 litru sterilního vzduchu na litr půdy za minutu. Půda se míchá rotačním míchadlem se 150 ot/min. Na konci 138 hodiny fermentace se půda zpracuje.

Příklad 3

Izolace a čištění

2600 litrový podíl vyfermentované půdy, připravené tak, jak je popsáno v příkladu 2, s hodnotou pH 7,3, se smíchá s 1300 litry ethylacetátu a míchá se po dobu 0,5 hodiny. Přidá se 8 % (hmotnostně) křemeliny. Směs se filtruje po částech za míchání dvojicí rámových tlakových filtrů. Vodně-ethylacetátové filtráty se spojí, získá se 3300 litrů, které se nechají oddělit, přičemž se získá 1100 litrů ethylacetátového extraktu. Když se všechny podíly směsi půdy s ethylacetátem a křemelinou zfiltrují filtrem, přepážka filtru se promyje ethylacetátem. Ethylacetátové promývací roztoky se spojí a oddělí, přičemž poskytnou 600 litrů ethylacetátových promývacích roztoků. 1100 litrů ethylacetátového extraktu a 600 litrů promývacího ethylacetátového roztoku se spojí a koncentruje v destilačním přístroji objemu 1760 litrů asi na 100 litrů. Těchto 100 litrů se koncentruje dále ve 220 litrovém destilačním přístroji na 20 litrů. Těchto 20 litrů se koncentruje dále ve skleněné destilační aparatuře na sirup.

Sirup se skladuje při 4 °C po dobu 48 hodin a potom se smíchá s dvojnásobkem svého objemu n-heptanu. Směs se ponechá stát při teplotě 4 °C přes noc. Supernatant se oddělí dekantací a koncentruje se na gumovitý odparek. Ke gumovitému odparku se přidá 10 litrů methanolu a směs se chladí pomocí suchého ledu po několik hodin. Směs se filtruje přes fritu obsahující vrstvu křemeliny promytou studeným methanolem. Spojené filtráty a promývací roztoky se koncentrují ve vakuu na sirup a poskytnou 1124 g odparku. Tento odparek se roz-

pustí v methylenchloridu v množství 33 g/l. Připraví se chromatografická kolona naplněná 27 litry granulovaného uhlí (20 až 40 ok). Roztok odparku v methylenchloridu se nechá protékat touto kolonou průtokovou rychlostí 400 ml/min. Methylenchloridový eluát se shromažďuje jako jediná frakce a koncentruje na sirup. Odparek se důkladně smísí s methanolem. Teplota směsi se sníží na -10 °C, v chladírně pomocí suchého ledu, a po dobu 15 minut se udržuje při teplotě -10 °C. Ztuhlý olej se odstraní filtrací a methanolický filtrát se koncentruje ve vakuu na sirup, čímž se získá 363,8 g oleje.

Suchá plněná chromatografická kolona se připraví naplněním 4 kg silikagelu do kolony z plastické hmoty obvodu 30,5 cm. Dávka 200 g výše uvedeného oleje se rozpustí v minimálním množství methylenchloridu. Přidá se 300 g silikagelu, důkladně smíchá a směs se zkoncentruje ve vakuu do sucha. Suchá směs se naplní do kolony a na horní část sloupce se umístí trochu mořského písku, aby se zabránilo poruchám sloupce během eluování. Kolona z plastické hmoty se umístí do skleněného pouzdra, aby získala oporu. Sloupec se eluuje 9,4 litry směsi ethylacetátu s benzenem v objemovém poměru 1:1. Sbírají se frakce a kolona se nechá vytéci do sucha. Část sloupce s R_f 0,10 až 0,45 se odstraní a suspenduje ve směsi ethylacetátu s methylenchloridem a methanolem v poměru 2:2:1. Směs se zfiltruje a promyje stejnou směsí rozpouštědel a koncentruje ve vakuu k suchu, přičemž se získá 22 g odparku.

Smícháním n-heptanu s metanolem, ethylacetátem a vodou (3000:1500:20:40 objemově) se připraví dvoufázový systém. 2000 g křemeliny promyté kyselinou se smíchá s 1650 ml spodní fáze tohoto rozpouštědlového systému a plní po částech do skleněné kolony (vnitřního průměru 7,5 cm). Dvacet dva gramy odparku se rozpustí ve spodní fázi, zfiltruje se a filtrát se smíchá s křemelinou a naplní do kolony. Naplněná kolona se vyvíjí horní fází rozpouštědlového systému a pomocí sběrače frakcí se odebírají vzorky. Žádaná látka se zjistí sledováním vzorků frakcí pomocí chromatografie na tenké vrstvě. Frakce 123 až 186 (konec) se spojí, koncentrují ve vakuu na odparek, ten se rozpustí v terc. butylalkoholu a lyofilizuje, přičemž se získá 4,2 g produktu BL580 ZETA.

Příklad 4

Příprava sodné soli BL580 ZETA

900 mg BL580 ZETA se rozpustí ve směsi 30 ml diethyletheru s 70 ml nízkovroucího petroletheru. Tento roztok se míchá se stejným objemem vody. Směs se upraví za míchání na hodnotu pH 2,0 1 N kyselinou chlorovodíkovou. Vodná fáze se odstraní.

Přidá se čerstvá voda. Dvoufázový systém se míchá a hodnota pH se upraví na 10,0 za použití 0,1 N hydroxidu sodného. Vzniklá emulze se odstředí. Horní fáze se koncentruje ve vakuu za vzniku bezbarvého odparku. Tento odparek se rozpustí v 15 ml diethyletheru a 30 ml nízkovroucího petrol-etheru. Roztok se nechá odpařovat v mrazárně při teplotě 4 °C po dobu 18 hodin, přičemž se objem sníží asi na 50 %. Nerozpustný materiál se oddělí filtrací a promyje petroletherem, čímž se získá bezbarvá pevná látka. Filtrát se odpaří a zpracuje jako vpředu, přičemž poskytne druhý podíl. Tento druhý filtrát se odpaří a zpracuje jako vpředu, přičemž poskytne třetí podíl. První a třetí podíl se spojí, přičemž poskytnou 445 mg sodné soli BL580 ZETA.

Sodná sůl BL580 ZETA má teplotu tání 162 °C, specifickou otáčivost $[\alpha]_D^{20} = -3 \pm \pm 2^\circ$ ($c = 0,94$ v methanolu), a elementární analýzu (procenta): C 60,97, H 8,69, Na 2,70. Sodná sůl BL580 ZETA má charakteristickou absorpci v infračervené oblasti spektra při následujících vlnových délkách: 2,93, 3,43, 6,12, 7,27, 8,63, 9,07, 9,57, 10,05 a 10,45 μm . Standardní infračervené absorpční spektrum sodné soli BL580 ZETA je znázorněno na obr. 1 připojených výkresů. Standardní ^{13}C spektrum nukleární magnetické rezonance sodné soli BL850 ZETA

je znázorněno na obr. 2 připojených výkresů. Standardní protonové spektrum magnetické rezonance sodné soli BL580 ZETA je znázorněno na obr. 3 připojených výkresů.

Příklad 5

Příprava volné kyseliny BL580 ZETA

125 mg sodné soli BL580 ZETA se rozpustí ve 100 ml diethyletheru. Přidá se 100 ml vody a pH se upraví za míchání přidáním 1 N kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 2,0. Etherová vrstva se oddělí a promyje čerstvou vodou. Promytý ether se koncentruje ve vakuu. Odparek se rozpustí v terc.butylalkoholu a po lyofilizaci poskytne 106 mg volné kyseliny BL580 ZETA.

Volná kyselina BL580 ZETA má teplotu tání 105 až 107 °C, specifickou otáčivost $[\alpha]_D^{20} = +7 \pm 2^\circ$ ($c = 0,9$ v methanolu) a elementární analýzu (procenta): C 63,99, H 9,43. Volná kyselina BL580 ZETA má charakteristickou absorpci v infračervené oblasti spektra při následujících vlnových délkách: 2,87, 3,40, 3,80, 5,87, 8,62, 9,02, 9,45, 9,57, 10,04 a 10,43 μm . Standardní infračervené spektrum volné kyseliny BL580 ZETA je znázorněno na obr. 4 připojených výkresů.

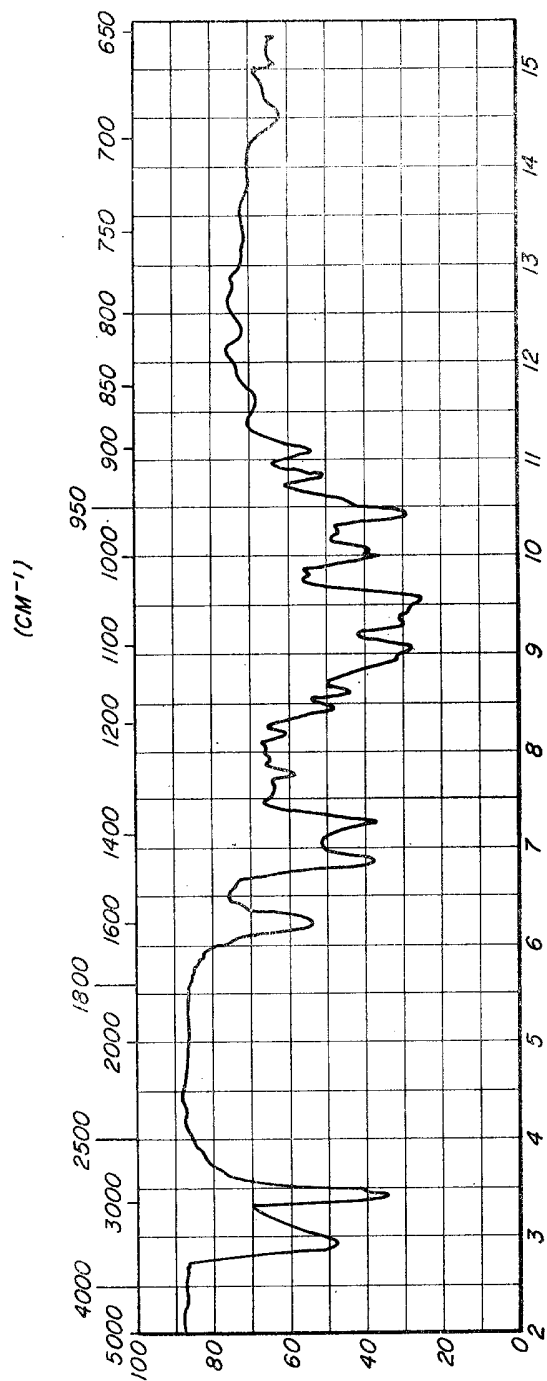
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby nového antibiotika BL 580 ZETA, vyznačující se tím, že se kultivuje *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 11108 ve vodném živném prostředí o hodnotě pH v rozsahu od 6 do 8, obsahujícím asimilovatelné zdroje uhlohydrátu, dusíku a anorga-

nických solí za submerzních aerobních podmínek při teplotě 25 až 32 °C, s výhodou po dobu 48 až 96 hodin, načež se antibiotikum izoluje z vyfermentovaného živného média.

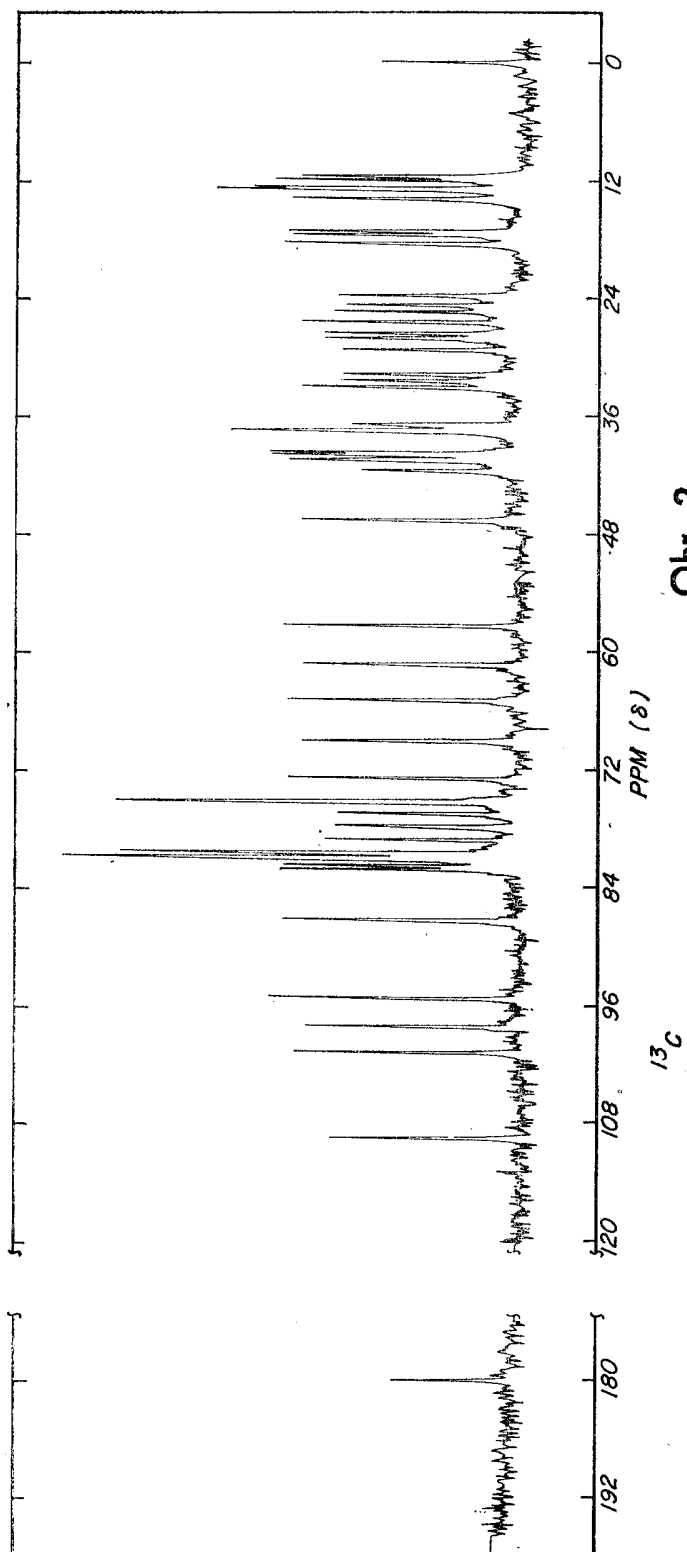
4 listy výkresů

204030



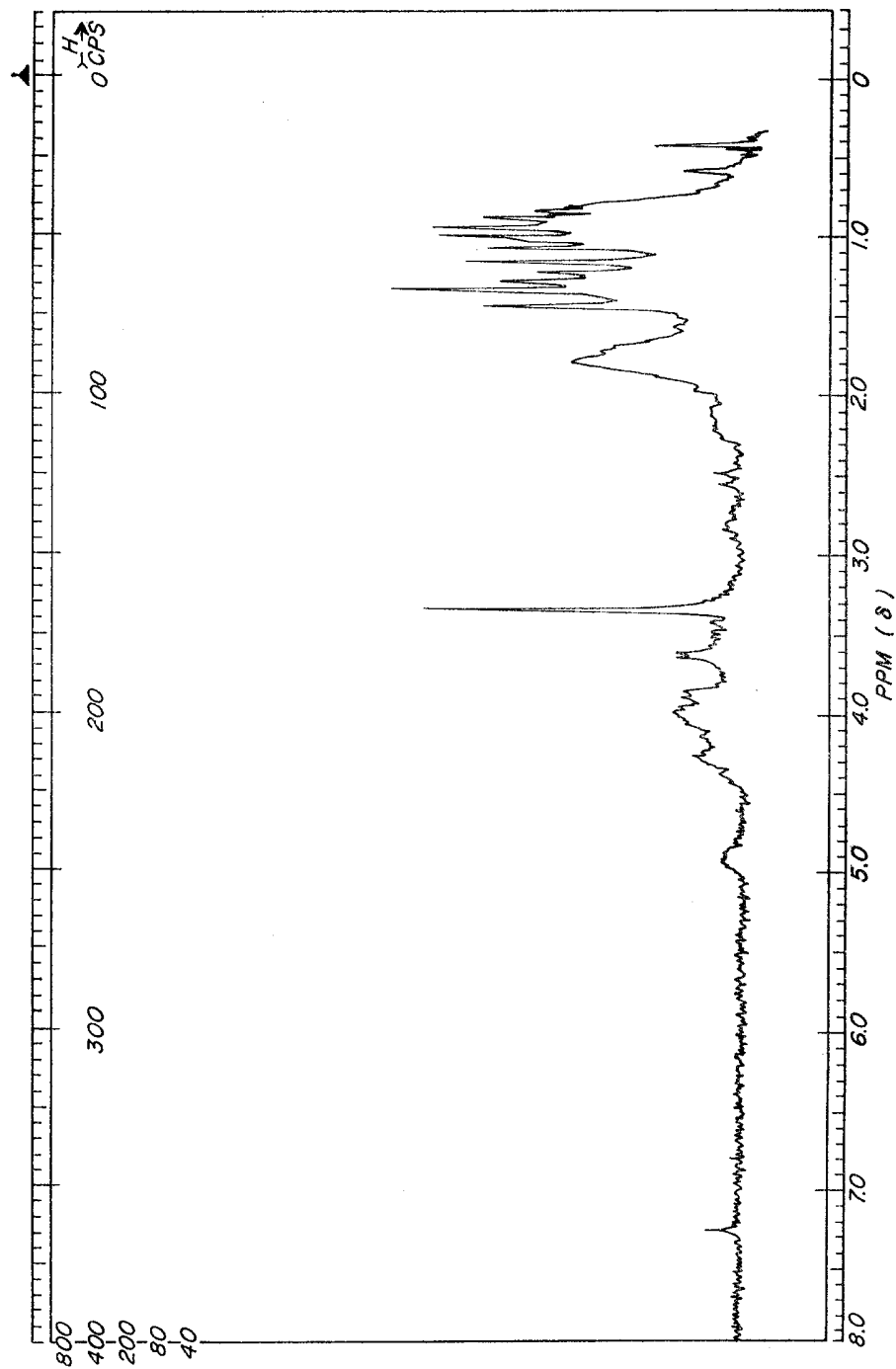
Obr. 1

204030

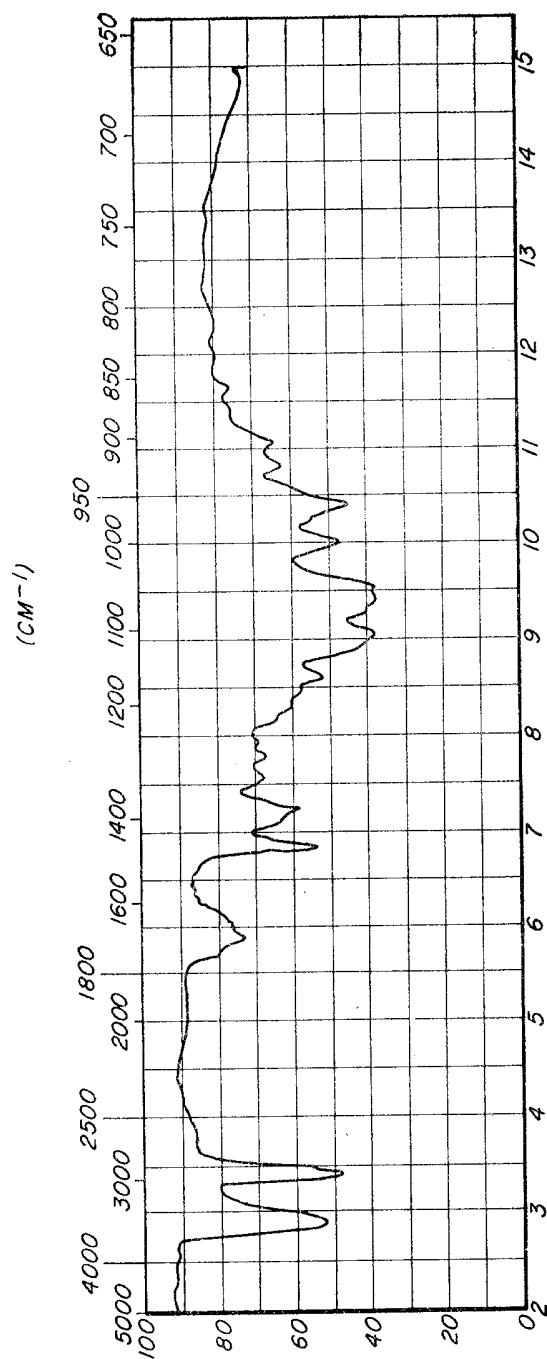


Obr. 2

204030



Obr. 3



Obr. 4