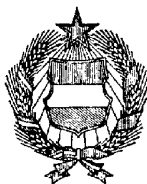


(19) HU
MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

Bejelentés napja: (22) 1980. XII. 23.

(21) 3107/80

Elsőbbsége: (33) 1979. (32) XII. 28. (31) (173819/1979),
Japán

Közzététel napja: (41) 1983. (42) III. 28.

Megjelent: (45) 1986. VIII. 31.

(11)
182267

Nemzetközi osztályozás:

(51) NSZO₃
C 12 P 17/18



Feltalálók: (72)

Hatano Kazunori vegyész, Hyogo,
Nakamichi Masanari vegyész, Hyogo,
Akiyama Shun-ichi vegyész, Kanagawa, Japán

Szabadalmaz: (73)

Takeda Chemical Industries
Ltd., Osaka, Japán

(54) Eljárás C-15003 P-3 antibiotikum előállítására

1

A találmány tárgya új eljárás a C-15003 P-3 jelű antibiotikum előállítására iparilag előnyös módszerrel.

A C-15003 P-3 jelű antibiotikumot (a továbbiakban P-3-nak rövidítjük) a *Nocardia* fajhoz tartozó, természetes forrásokból, például talajminta és hasonlókban izolált mikroorganizmus tenyésztésével nyerjük.

A vegyület és előállítása a 4.162.940. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban található részletesen leírva. Az ismert eljárás során a C-15003 antibiotikum mellett, vele egyidőben néhány más komponens is keletkezik. Nagyon bonyolult eljárás szükséges az egyes komponensek elválasztásához a fermentléből, és ez az eljárás nem előnyös a kívánt vegyület előállítása szempontjából.

Ennek a hátránynak a leküzdése céljából a feltalálók kiterjedt vizsgálatokat végeztek, különösen a P-3 külön kinyerésére, és úgy találták, hogy ha a *Nocardia* fajhoz tartozó mikroorganizmus tenyésztésére szolgáló táptalajba izobutil-alkoholt vagy izobutir-aldehidet adnak, ezzel a kívánt célt érik el. A jelen szabadalmi leírás a fenti felismerésen alapul.

A találmány eljárás a C-15003 P-3 antibiotikum előállítására, melyre jellemző, hogy a *Nocardia* fajhoz tartozó és a C-15003 antibiotikum előállítására képes mikroorganizmust izobutil-alkoholt, izobutir-aldehidet, az alkohol zsírsav-észterét vagy ezek keverékét tartalmazó táptalajban tenyésztjük, majd a C-15003 P-3 antibiotikumot a fermentléből kinyerjük.

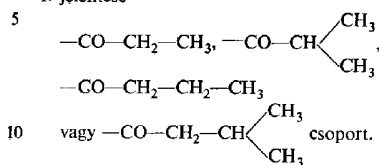
A jelen szabadalmi leírás szövegében a „C-15003 antibiotikum” vagy a „C-15003” kifejezés általánosan az (I)

2

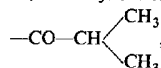
általános képletű négy vegyületet vagy közülük kettő vagy több vegyület keverékét jelenti.

Az (I) általános képletben

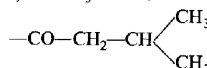
R jelentése



15 Az (I) általános képletre hivatkozva, azt a vegyületet, ahol R jelentése $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, „C-15003 P-2 antibiotikum”-ként, vagy rövidebben, mint „P-2”-t említjük; azt a vegyületet, ahol R jelentése



20 mint „C-15003 P3- antibiotikum”-ot, vagy rövidebben mint „P-3”-at említjük; azt a vegyületet, ahol R jelentése $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, mint „C-15003 P-3’ antibiotikum”-ot, vagy rövidebben mint „P-3’”-at említjük; azt a vegyületet, ahol R jelentése



25 mint „C-15003 P-4 antibiotikum”-ot, vagy rövidebben mint „P-4”-et említjük.

30 A jelen szabadalmi leírásban használható mikroorganizmusra példaként megemlíthetünk egy C-15003 számú

Actinomyces törzset (*Nocardia* sp. No. C-15003; „C-15003 sz. törzs”-ként rövidítve), melyet talajból vagy egyéb forrásból izoláltak.

A szabadalmi leírásban szereplő C-15003 sz. törzset letétbe helyezték a Fermentációs Kutató Intézetnél, Ipari Tudomány és Technológia Ügynökség (FERM), Japánban a 3992 FERM-P szám alatt 1977. március 23-án; a Fermentációs Intézetnél Osakában (IFO), Japánban a 13726 IFO szám alatt 1977. március 22-én és az Amerikai Nemzeti Törzsgyűjteményben (ATCC), Marylandban az Amerikai Egyesült Államokban az ATCC 31281 szám alatt 1977. március 31-én. A C-15003 számú *Nocardia* sp. (ATCC 31281) az Amerikai Nemzeti Törzsgyűjtemény Törzsei Katalógusának I. kötetében szerepel leírva a 14. kiadásban (1980).

A C-15003 számú törzs mikrobiológiai tulajdonságainak leírását a 4.162.940. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás tartalmazza. A C-15003 számú törzs mikrobiológiai tulajdonságainak vizsgálatát a Schirling és Gottlieb által leírt eljárások analógiájára végeztük (International Journal of Systematic Bacteriology, 16, 313, 1966). 28 °C-on 21 napig végzett tenyésztés során a következőket figyeltük meg:

1. Morfológiai jellemzők:

A vegetatív micélium jól nő, elágazó mind agar felületén, mind folyadék táptalajban. A hifa-fonalak zöme 0,8–1,2 µm átmérőjű és néhány esetben töredezik; ekkor baktérium-pálcákra vagy rövid, elágazó hifa-fonalakra hasonlít. A törzs jól nő a különböző táptalajokon, a légmicélium ránó a vegetatív micéliumra, habár gyakran képez coremia-szerű testeket (50–200 × 200 × 1000 µm), melyeken további légmicélium-növekedés folyik. A légmicéliumok zöme kacsaringós, egyenes, vagy néhány esetben találhatunk enyhén spirális formát is. Az idős tenyészetek mikroszkópos vizsgálata során kiderült, hogy csak néhány esetben találhatók spóratartó-szerű sejtek a láncokban, míg az ilyen idős tenyészetek felületéről nyert sejt-szuspenziók a mikroszkópos vizsgálatok szerint sok hosszúkas ellipszis (0,8–1,2 µm × 4,8–6,3 µm) és ellipszis (0,8–1,2 × 1,0–2,0 µm) formájú testeket tartalmaznak, melyek arthospórákra hasonlítanak.

Az elektron-mikroszkópos vizsgálatok szerint ezeknek a testeknek sima a felületük.

2. A sejtek alkotóelemei:

A törzset rázott lombikban tenyésztettük módosított ISP 1. sz. táptalajban 28 °C-on, 66–90 órán keresztül, ezután a sejteket összegyűjtöttük és mostuk. Becker és munkatársai (Applied Microbiology, 12, 421, 1964), valamint M. P. Lechevalier (Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 71, 934, 1968) módszerével az összes sejtet vizsgáltuk diamino-pimelinsavra és cukor-összetételre. Az előbbi mezo formában találtuk, míg galaktóznak és arabinóznak megfelelő foltokat detektáltunk a cukorvizsgálat során.

3. A táptalajokon megfigyelhető jellemzők:

A törzs viszonylag jól nőtt a különböző táptalajokon, a vegetatív micélium a tenyésztés korai fázisában színtelen vagy halványsárga, a későbbi fázisokban világos-

sárga, sárgásbarnától sárgáig, és sárgásbarna. A törzs a különböző táptalajokon sárga és sárga-sárgásbarna színű pigmentet termel. A légmicélium porszerű, és általában közepesen nő, színe fehér-sárga vagy sárga-sárgásbarna. A törzs különböző táptalajokon megfigyelhető jellemzőit az 1. táblázatban láthatjuk.

1. táblázat

A C-15003 számú törzs tenyésztési jellemzői különböző táptalajokon

- | | |
|----|--|
| 15 | A) Szacharóz-nitrát-agar:
Növekedés (N): közepes, Brite dinnyesárga (3 ia)*
színtől sárgásbarnáig (3 ic)*, coremia-szerű testeket képez.
Légmicélium (LM): gyér, kevés.
Oldható szénanyag (OP): nincs, vagy halvány sárgásbarna. |
| 20 | B) Glicerín-nitrát-agar:
N: közepes, fényes elefántcsontszínű (2 ca)*, coremia-szerű testeket képez.
LM: közepes, fehér.
OP: nincs. |
| 25 | C) Glükóz-aszparagin-agar:
N: közepes, Brite mocsári gólyahir (sárga) (3 pa)*-
tól Brite sárgáig (2 pa)*.
LM: gyér, fehér.
OP: Brite sárga (2 pa)*. |
| 30 | D) Glicerín-aszparagin-agar:
N: közepes, fényes elefántcsontszínű (2 ca)*, coremia-szerű testeket képez.
LM: gyér, fehér.
OP: nincs. |
| 35 | E) Keményítő-agar:
N: közepes, fényes elefántcsontszíntől (2 ca)*, fényes búzasárgáig (2 ea)*, coremia-szerű testeket képez.
LM: bőséges, fényes elefántcsontszínű (2 ca)*.
OP: nincs. |
| 40 | F) Tápagar:
N: közepes, fényes elefántcsont-színtől (2 ca)* kolo-
niálsárgáig (2 ga)*, coremia-szerű testeket képez.
LM: gyér, fehér.
OP: nincs. |
| 45 | G) Kalcium-malát-agar:
N: közepes, fényes elefántcsontszíntől (2 ca)*-tól fé-
nyes búzasárgáig (2 ea)*, coremia-szerű testeket ké-
pez.
LM: közepes, fehértől fényes elefántcsontszíning
(2 ca)*.
OP: nincs. |
| 50 | H) Élesztőkivonat-malátakivonat-agar:
N: közepes, borostyánsárgától (3 lc)* Brite sárgáig
(3 la)*, coremia-szerű testeket képez.
LM: közepes, fehértől fényes elefántcsontszíning
(2 ca)*.
OP: nincs. |
| 55 | I) Zabliszt-agar:
N: közepes, fényes elefántcsontszíntől (2 ca)* ko-
loniálsárgáig (2 ga)* coremia-szerű testeket képez.
LM: gyér, fehértől világossárgáig.
OP: nincs. |
| 60 | |
| 65 | |

J) Pepton-élesztőkivonat-vas-agar:
N: közepes, kolonialsárga (2 ga)*.
LM: nincs.
OP: kolonialsárga (2 ga)*.

K) Tirozin-agar:
N: közepes, fényes elefántcsontszíntől (2 ca)* fényes dinnyesárgáig (3 ea)*, coremia-szerű testeket képez.
LM: közepes, fehértől fényes elefántcsont-színig (2 ca)*.
OP: teveszínű (3 ie)*.

* A színek kódjai megfelelnek a Color Harmony Manual 4. kiadásában találhatóaknak (Container Corporation of America, 1958).

4. Élettani jellemzők:

A törzs fiziológiai jellemzőit a 2. táblázatban mutatjuk be. 12 °C és 38 °C hőfok-tartományban növekszik. Az a hőfok-tartomány, ahol agaron bőségesen növeszt légmicéliumot (ISP 2. sz. táptalajon), 20 és 30 °C között van.

2. táblázat

Növekedési hőfok-tartomány	12-től 38 °C-ig
Légmicélium növekedés hőfok-tartománya	20-tól 35 °C-ig
Zselatin-elfolyósítás	pozitív
Keményítő-hidrolízis	pozitív
Nitrát-redukció	pozitív
Tej-alvasztás	pozitív
Tej-kicsapás	negatív
Kazein-lebontás	pozitív
Melanoid-színanyag-képzés	negatív (pepton élesztőkivonat vas-agar)
Tirozin-lebontás	pozitív (tirozin-agar)
Xantin-lebontás	negatív
Hypoxantin-lebontás	negatív
Lizozim-tűrés	pozitív
Nátrium-klorid-tűrés	2%

5. Szénforrás-hasznosítási spektrum:

A különböző szénforrások hasznosításának vizsgálatát a Pridham és Gottlieb (Journal of Bacteriology, 56., 107, 1948.) által leírt táptalajon végeztük, valamint az ugyanolyan összetételű alaptáptalajt 0,1% élesztőkivonattal kiegészített táptalajon. A kapott eredmények a 3. táblázatban találhatók.

3. táblázat
A C-15003 törzs szénforrás-hasznosítása

Szénforrás	Növekedés
D-xilóz	+
L-arabinóz	++
D-glükóz	++
D-galaktóz	+

3. táblázat folytatása

Szénforrás	Növekedés
5 D-fruktóz	+++
L-ramnóz	+
D-mannóz	+++
Szacharóz	++
10 Laktóz	—
Maltóz	±
Trehalóz	+
Raffinóz	±
Melibióz	+
15 i-inozit	—
D-szorbit	—
D-mannit	++
Glicerín	—
Oldható keményítő	+
20 Kontroll	—

* 0,1% élesztőkivonattal kiegészített alaptáptalaj.

Jelmagyarázat:

25	+++ kiváló növekedés
	+ + jó növekedés
	+ van növekedés
	± gyenge növekedés
	— nincs növekedés

6. Egyéb jellemzők:

A sejteket a 2. pontban leírt eljárás szerint gyűjtöttük össze, a DNS-t a Mürmur és munkatársai által leírthoz (Journal of Molecular Biology, 3., 208, 1961.) analóg módon nyertük ki. A DNS G-C (guanin-citozin) tartalmát körülbelül 71 mól%-nak találtuk.

A vegetatív micélium Gram-módszerrel festve Gram-pozitívnak bizonyult.

40 A C-15003 törzs fent összefoglalt jellemzőit összehasonlítottuk S. A. Waksman „The Actinomycetes” 2. kötetében (The Williams and Wilkins Co., 1961.), valamint R. E. Buchanan és N. E. Gibbons (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. kiadás, 1974.) és egyéb szakirodalomban található leírásokkal.

45 A törzsről azt hittük, hogy a Nocardia nemzetség III. csoportjához tartozik; de, mivel nem találtunk az eddig leírt törzsek között egy olyant sem, amelynek jellemzői megegyeztek az eddig leírtakkal, ez arra a következtetésre vezetett bennünket, hogy ez a törzs a mikroorganizmusok új fajtát képviseli.

50 A Nocardia fajhoz tartozó mikroorganizmusok, mint általában a mikroorganizmusok, változékonyak, és mesterségesen mutánsok állíthatók elő belőlük. Például a röntgen-besugárzással, ultraibolya-besugárzással vagy kémiai mutagénekkel (például nitrozoguanidin, etilénimin) kaphatók egy törzs variánsai. A C-15003 antibiotikum termelésére képes variánsok és mutánsok bármelyikét felhasználhatjuk a jelen találmány céljaira.

60 Az izobutil-alkoholt, zsírsav-észterét és/vagy az izobutir-aldehidet egyszerre és külön-külön is beadagolhatjuk a táptalajba. A fenti anyagok mennyisége a táptalaj mennyiségének általában legalább 0,005 térfogat-százaléka akár egy komponens adagolunk, akár a három komponens együtt, feltéve, hogy a hozzáadott

zsírsav-észter mennyiségét izobutil-alkoholban adjuk meg. Előnyösen körülbelül 0,01–0,5 térfogat-százalék izobutil-alkoholt, annak zsírsav-észterét és/vagy izobutil-aldehidet adunk a táptalajba a táptalaj térfogatára számítva. Az adagolt anyagok mennyiségét azonban mindaddig növelhetjük, amíg az anyag(ok) nem gátolják a használt mikroorganizmus növekedését, vagy nem csökkentik a kívánt antibiotikum termelését.

Az izobutil-alkoholt, annak zsírsav-észterét és/vagy az izobutil-aldehidet hozzáadjuk a táptalajhoz, mielőtt a sterilizált táptalajt beoltanánk a C-15003 termelő törzssel, vagy a C-15003 törzsnek a táptalajba oltása során a C-15003 termelése közben. Az izobutil-alkohol zsírsav-észterekre példaként megemlíthetjük az 1–4 szénatomot tartalmazó zsírsavak észtereit (pl. formiát, acetát, propionát, butirát, izobutirát) az izobutil-alkohollal.

Az ilyen C-15003 antibiotikumot termelő törzs tenyésztésére bármilyen szilárd vagy folyékony táptalaj alkalmas, ha a törzs által hasznosítható tápanyagokat tartalmaz. A magas termelőképesség eléréséhez előnyösen folyadék táptalajt használunk. A táptalaj tartalmazhatja a jelen találmány szerinti adalékanyagokat, a C-15003 antibiotikumot termelő törzs által beépített és felhasznált szén- és nitrogén-forrásokat, szerves anyagokat, nyomnyi mennyiségben szükséges tápanyagokat stb. Az említett szénforrásokra példaként megemlíthetjük a glükózt, laktózt, szacharózt, melaszt, maltózt, dextrint, keményítőt, glicerint, mannitot, szorbitot stb., zsírokat és olajokat (például szójaolaj, disznózsír, csirkezsír stb.) és így tovább. A nitrogén-forrás lehet például húskivonat, élesztőkivonat, szárított élesztő, szójaliszt, kukoricaliszt, pepton, gyapotmag-liszt, karbamid, ammóniumsók (például ammónium-szulfát, ammónium-klorid, ammónium-nitrát, ammónium-acetát stb.). A táptalaj tartalmazhat továbbá nátrium-, kálium-, kalcium-, magnézium-sókat, a vas, mangán, cink, kobalt, nikkel fém-sóit, valamint a foszforsav és bórsav stb. sóit. Továbbá a táptalaj szükség esetén tartalmazhat vitaminokat, nukleinsavakat és így tovább. A táptalaj pH-jának beállítása céljából savakat és/vagy lúgokat adagolhatunk. A habzás csökkentésére megfelelő mennyiségű olajat, zsírt vagy felületaktív anyagot adhatunk a táptalajba.

A tenyésztést végezhetjük álló, rázott, süllőztetett, levegőztetett vagy más tenyésztési körülmények között. A magas termelési szint eléréséhez természetesen előnyösen süllőztetett levegőztetett tenyésztési körülményeket használunk. Mivel a tenyésztési állapota természetesen függ a táptalaj-összetételtől, a használt törzstől, a tenyésztési módszertől és más faktoroktól, a tenyésztést normál körülmények között előnyösen 5,5 és 8,0 kezdő pH-érték mellett végezzük, előnyösen a 6,5–7,5 pH-tartományban, 15 és 35 °C közötti hőmérséklet-tartományban, előnyösen 20 és 30 °C között. A tenyésztést a P-3 antibiotikum maximális koncentrációjának eléréseig végezzük. A tenyésztési idő a tenyésztési módszertől, hőmérséklettől, táptalaj-összetételtől függően változik, általában 48 és 240 óra között mozog.

Az ily módon speciálisan előállított P-3 kinyerésére és tisztítására az ilyen mikrobiális eredetű termékek (metabolitok) elválasztására és tisztítására rendszerint ismert eljárást használunk. Mivel a kívánt termék zsírdékony semleges anyag, a terméket könnyen extrahálhatjuk a tenyészléből vagy szűrletből vízzel nem ele-

gyedő, szerves oldószerrel, mint zsírsav-észterekkel (pl. etil-acetát, amil-acetát); alkoholokkal (pl. butanol); halogénezett szénhidrogénekkel (pl. kloroform), és ketonokkal (pl. metil-izobutil-keton). Az extrakciót semleges pH-n végezzük, előnyösen pH=7-en etil-acetáttal. Az extraktumot vízzel mossuk, és csökkentett nyomáson bepároljuk. Ezután apoláros oldószert adunk a betöményített oldathoz (pl. petroléter, hexán), és az aktív vegyületeket tartalmazó nyersteget csapadék formájában elválasztjuk. A nyersteget ezután a szokásos tisztítási eljárásoknak vetjük alá. Megszokott, rutin tisztítási eljárás gyanánt az adszorpciós kromatográfiát használhatjuk, és erre a célra a következő általános adszorbensek, mint például szilikagél, aktivált alumínium-oxid, makroporózus-nemionos adszorbens gyanúta stb. használhatók. A nyerstegetben lévő P-3-at petroléterrel vagy hexánnal vihetjük fel a szilikagél kromatográfiás oszlopra, és poláros oldószerrel, mint például etil-acetát, acetont, etanol, vagy metanol, vagy halogénezett szénhidrogénnel, mint például diklór-metán, vagy poláros oldószerként alkoholt (pl. metanol, etanol) tartalmazó kloroformmal, ketonnal (pl. acetont, metil-etil-ketont), vagy hasonlókkal oldjuk le. Ily módon a P-3-at leoldjuk, elválasztjuk és kinyerjük.

Ha makroporózus-nemionos adszorbens-gyantát használunk a P-3 tisztítására az oszlopról, víz és alacsony szénatomszámú alkohol, keton vagy észter keverékével oldjuk le a P-3-at. Az alacsony szénatomszámú alkohol lehet például metanol, etanol, propanol vagy butanol stb., az alacsony szénatomszámú keton lehet például acetont vagy metil-etil-ketont stb. Az észter lehet például etil-acetát. Egy tipikus eljárás során a nyersteget 60% metanol-víz elegyben oldjuk és Diaion—HP—10 (Mitsubishi Chemical Industries, Ltd., Japan) oszlopon adszorbeáljuk. Az oszlopot 70%-os metanol-víz eleggyel mossuk és P-3-at 90%-os metanol-víz eleggyel eluáljuk.

A fenti eljárás során nyert P-3 tartalmú frakciókat összegyűjtjük és csökkentett nyomáson besűrítjük. A száraz termékhez 5–8 térfogat etil-acetátot adunk, a keveréket állni hagyjuk, amiután a P-3 kikristályosodik.

A C-15003 antibiotikum fizikai-kémiai tulajdonságait, amelyek a 4.162.940. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban is szerepelnek, az alábbi 4. táblázatban mutatjuk be.

4. táblázat

	C-15 003 P-3 antibiotikum	C ₃₂ H ₄₃ ClN ₂ O ₉ = = 635,169
50	Olvaspont (°C)	190–192°
	Fajlagos forgatás [α] _D ²⁵	–136 ± 10° (C=0,375 CHCl ₃)
55	Elemanalízis talált érték (%)	C 60,06 H 7,04 N 4,33 Cl 5,37
	Elemanalízis számított érték (%)	C 60,51 H 6,82 N 4,41 Cl 5,58
60	Ultraibolya elnyelési spektrum nm (E) (metanolban)	233 (30 250), 240 (sh 28450), 252 (27640), 280 (5750), 288 (5700)

4. táblázat folytatása

C-15 003 P-3 antibiotikum	C ₁₂ H ₁₃ ClN ₂ O ₉ = = 635,169
Infravörös elnyelési spektrum (cm ⁻¹) KBr	1740, 1730, 1670, 1580, 1445, 1385, 1340, 1255, 1180, 1150, 1100, 1080
Mágneses magrezonan- cia spektrum (ppm) 100 MHz CDCl ₃ -ban	1,27 (duplett) (3H), 1,28 (duplett) (3H)
Tömegspektrum (m/e) Oldhatóság	573, 485, 470, 450 Oldhatatlan petroléterben, n-hexánban, vízben; korlátozottan oldódik ben- zolban, éterben; oldódik kloroformban, etil-acetátban, aceton- ban, etanolban, meta- nolban, piridinben, tetra- hidrofuránban, dimetil- szulfoxidban.
Színreakciók	Dragendorff: pozitív, Beilstein: pozitív.

A jelen szabadalmi leírás szerinti eljárásban a P-3 aránya a C-15003-ban igen magas. Mivel a jelen eljárás olyan előnyös tulajdonságokkal rendelkezik, hogy a kívánt termék termelése szintje magas, a kívánt termék kinyerése és tisztítása egyszerű, és a nyersanyag olcsó és folyadék halmazállapotú, valamint jelen eljárás nem okoz olyan hibákat, mint az izo-vajsav rossz szaga, valamint a készülék tönkremenetele. A jelen találmánynak megvan az az előnye is, hogy az izobutil-alkohol és az izobutil-aldehid toxicitása alacsony a C-15003 antibiotikumot termelő törzsről. Ennélfogva a jelen eljárás előnyös a P-3 antibiotikum előállítására ipari úton.

A C-15003 P-3 antibiotikum biológiai aktivitását és használatát a 4.162.940. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás tartalmazza. Azaz a P-3 aktivitása a következő:

A) Antimikrobiális aktivitás:

Trypticase Soy Agar (Baltimore Biological Laboratories, USA terméke) használva vizsgáló táptalajként, az alábbiakban leírt mikroorganizmusokkal szembeni gátló koncentrációt a papírkorong módszerrel határoztuk meg. Mindegyik papírkorongot (Toyo Seisakusho, vékony típusú, 8 mm átmérőjű) 0,02 ml 300 µg/ml koncentrációjú C-15003 P-3 oldattal itatjuk át, és az alábbiakban ismertett mikroorganizmusokkal beoltott agarlemezekre helyezzük. A C-15003 P-3 antibiotikumnak nincs hatása a következő baktériumok ellen:

Escherichia coli, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* és *Mycobacterium avium*.

Másrészt azonban a *Talaromyces avellanus* nevű gomba növekedését a C-15003 P-3 antibiotikum gátolja a következő összetételű agarlemezen: 3,5 g dinátrium-hidrogén-foszfát, 0,5 g kálium-dihidrogén-foszfát, 5 g élesztő kivonat (Difco), 10 g glükóz, 15 g agar, 1000 ml

desztillált vízben (pH=7,0). A C-15003 P-3 minimális gátló koncentrációja 3 µg/ml.

Továbbá a *Tetrahymena pyriformis* W vizsgáló organizmust a következő összetételű vizsgáló táptalajon tenyészítjük: 20 g Proteose-Peptone (Difco), 1 g élesztő kivonat, 2 g glükóz, 1000 ml desztillált vízben és 10 ml foszfát-puffer pH=7,0 (1M); a következő körülmények között: 28 °C, 44–48 óra tenyésztési idő; a C-15003 P-3 növekedésgátló hatását az egysejtű ellen sorozat-
10 hígítási módszerrel határozzuk meg. A növekedésgátlás 1 µg/ml-nél jelentkezik.

B) Daganatgátló hatás:

A C-15003 P-3 terápiás hatását (9 egymást követő nap adagolva intraperitoneálisan) egerekben, P388 leukémia sejtekre (1 × 10⁶ sejt) állat, egér, intraperitoneális beültetés) vizsgáljuk. A C-15003 P-3 antibiotikum daganatellenes hatása 200%-os élettartam-meghosszabbító hatású 0,006 25 mg/kg/nap dózisszinten.

C) Toxicitás:

Az előzetes akut toxicitási vizsgálatok során egeret alkalmazva vizsgálándó állatként, a C-15003 P-3 antibiotikumot intraperitoneálisan injektálva, az anyag LD₁₀₀ értéke 0,625 mg/kg, az LD₅₀ érték 0,313 mg/kg.

Mint azt az előzőekben említettük, a C-15003 P-3 antibiotikumnak erős gátló hatása van gombák és egysejtűek ellen, ezért értékes gomba- és egysejtű-ellenes anyag. Továbbá, mivel a C-15003 P-3 antibiotikum daganatos emlőszöveteknél (például egér) élettartam-hosszabbító hatású, az is elvárható, hogy a vegyület értékes daganatellenes szer lesz.

A P-3 antibiotikumot, gombaellenes és egysejtű-ellenes szer lévén, előnyösen használhatjuk reagensként bakteriális ökológiai meghatározásoknál talajban, aktiv iszapban, állati testfolyadékban és hasonlóban. Így, ha értékes baktériumokat akarunk izolálni talajmintákból, vagy, ha szennyvízkezelésre használt aktiv iszap-rendszer működésével és analízisével kapcsolatban azt akarjuk, hogy a baktériumok a gombáktól és egysejtűektől függetlenül fejtsék ki hatásukat, akkor a találmány szerinti antibiotikumot használhatjuk a baktérium-flóra szelektív növekedésének elősegítésére anélkül, hogy a mintában jelenlévő gombák és egysejtűek növekedését megengednénk. Egy tipikus példa szerint a mintát folyadék vagy szilárd táptalajhoz adjuk, majd a P-3 antibiotikum 1% metanol-vizes oldatban lévő 10 vagy 100 µg/ml koncentrációjú oldatát adjuk a táptalajba, melyet azután inkubálunk.

A mintát az a 4.162.940. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban szerepel, a P-3 antibiotikumnak gombaellenes hatása van. A gombaellenes hatást az 5. táblázatban mutatjuk be. Amint az az 5. táblázatból látható, a P-3 antibiotikum növényi betegségeket okozó mikroorganizmusok növekedését is gátolja. A papírkorongokat 0,02 ml 1000 µg/ml koncentrációjú P-3 oldattal impregnáljuk, majd az 5. táblázat szerinti mikroorganizmusokkal megfelelően beoltott lemezekre helyezzük.

5. táblázat

Teszt-organizmus	Anti-mikrobiális spektrum			
	IFO szám	Táptalaj	Idő (óra)	Gátlási zóna átmérője (mm)
<i>Alternaria kikuchiana</i>	7515	PSA*	48	38
<i>Fusicladium levieri</i>	6477	PSA*	90	68
<i>Helminthosporium sigmaeum</i> var. <i>irregulare</i>	5273	PSA*	48	55
<i>Pyricularia oryzae</i>	—	PSA*	48	53
<i>Elsinoe fawcetti</i>	8417	PSA*	90	55
<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cucumeric</i>	—	PSA*	48	20
<i>Guignardia loricata</i>	7888	PSA*	48	12
<i>Cochlioborus miyabenus</i>	5277	PSA*	48	60
<i>Diaporthe citri</i>	9170	PSA*	48	55
<i>Gibberella zeae</i>	8850	PSA*	48	37
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	9395	PSA*	90	65
<i>Venturia pirina</i>	6189	PSA*	48	50
<i>Pellicularia sasakii</i>	9253	PSA*	48	50
<i>Pythium aphanidermatum</i>	7030	PSA*	48	58
<i>Botrytis cinerea</i>	—	PSA*	48	48
<i>Aspergillus niger</i>	4066	PSA*	48	0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	4626	PSA*	48	35
<i>Rhizopus nigricans</i>	6188	PSA*	48	25
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0209	PSA*	48	0
<i>Rhodotorula rubra</i>	0907	PSA*	48	28
<i>Trichophyton rubrum</i>	5467	GB**	48	38
<i>Mentagrophytes</i>	7522	GB**	48	38
<i>Candida albicans</i>	0583	GB**	48	0
<i>Candida utilis</i>	0619	GB**	48	0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0410	GB**	48	43

PSA* = Burgonya szacharóz agartáptalaj

BG** = Glükóz táptalaj

A P-3 antibiotikumot használhatjuk gombaeellenes szerként az 5. táblázatban említett mikroorganizmusok által okozott növényi megbetegedések ellen. Jellemző használata során a P-3 antibiotikumot 1% metanolos-vizes oldatban 0,5–5 µg/ml koncentrációban alkalmazzuk. A P-3 antibiotikumot lehet például használni szárhothadás, a *Helminthosporium* levél-pötty és a rizs hüvely-foltosodás ellenőrzésére.

A következő példákban a találmány szerinti eljárást részletesen illusztráljuk. A % vegyes-százalékot jelent, az eltérést jelezzük.

1. példa

200 ml térfogatú Erlenmeyer-lombikba 40 ml inokulum-táptalajt öntünk, melynek összetétele: 1% glükóz, 2% Bacto Trypton (Difco Laboratories, USA) és 1,2% Bacto élesztő kivonat (Difco Laboratories, USA), pH=7,0. Sterilizés után a C-15003 számú *Nocardia* fajt oltjuk a táptalajba. Oltóanyag előállítására a lombikot 48 órán keresztül 28 °C-on körkörös rázógépen (200 min⁻¹) inkubáljuk.

Az inokulum-tenyészetet háromszor mossuk steril desztillált vízzel, majd a mosott sejteket újra szuszpendáljuk az eredeti térfogatra, steril desztillált vízben.

A fenti sejtuszpenzióból egy millilitert beoltunk 40 ml fő tenyésztáptalajba [3% oldható keményítő, 0,2% ammónium-klorid, 0,05% magnézium-szulfát, 1,09% kálium-dihidrogén-foszfát, 2,09% dikálium-hidrogén-foszfát, 0,001% vas(II)-szulfát] és a tenyésztést 28 °C-on 48 órán át végezzük a körkörös rázón.

Az említett tenyésztés után annyi izobutil-aldehidet adunk a tenyészetbe, hogy a táptalajon az izobutil-aldehid koncentrációja 0,05 térfogat% legyen, és a tenyésztést 6 napig folytatjuk.

A tenyésztés befejezése után azt tapasztaltuk, hogy a C-15003 antibiotikum teljes mennyisége 27 mg/l volt, és a P-3 komponens aránya 95 súly% volt; másrészt, ha nem adtunk izobutil-alkoholt vagy izobutil-aldehidet a tenyészetbe, a P-3 komponens aránya csak 65 súly% volt. (A C-15003 antibiotikum mennyisége 10 mg/l volt.)

Az összes C-15003 antibiotikum mennyiségét és a megfelelő adalékanyagokat a következő módszer szerint határoztuk meg.

Az antibiotikum összmennyiségét agar-diffúziós módszerrel határoztuk meg teszt-organizmusként *Philobasidium uniguttulatum* IFO 0699 gombát használva, és literenként 15 g Trypticase-peptont (Baltimore Biologicals, USA), 5 g fiton-peptont (Baltimore Biologicals, USA), 10 g nátrium-kloridot, 10 g glükózt, 15 g agart tartalmazó táptalajt használva (pH=7,3, desztillált víz).

A termelt antibiotikum mennyiségét a vizsgált oldat által okozott gátlási zóna átmérőjét a standard oldat gátlási zónájának átmérőjéhez viszonyítva számítottuk ki.

A termelt P-3 mennyiségét és arányát a következő módszerrel számítottuk ki:

Az antibiotikumot tartalmazó folyadék mintához ugyanolyan térfogatú etil-acetátot adunk, majd az oldatot extraháljuk. Az etil-acetátos fázist bepároljuk és szárítjuk, a kapott maradékot az eredeti térfogat 1/100 részének megfelelő etil-acetátban oldjuk, így kapjuk a vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálathoz használható mintát.

Az így kapott mintát üveglapra felvitt 60 F₂₅₄ típusú szilikagélre vittük fel (E. Merck), a vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálathoz, és vízzel telített etil-acetátot használtunk futtatószerként.

A P-3 mennyiségét és arányát a 254 nm-en mért abszorpciós sáv intenzitását és kiterjedését mérve határoztuk meg, Shimadzu kettős-hullámhosszú vékonyréteg-kiértékelőt használva (CS-910 Modell).

2. példa

Az 1. példában említett inokulum-táptalajból 500 millilitert 2000 milliliteres Sakaguchi lombikba öntünk, és sterilizünk. Az inokulum előállítására a táptalajt beoltjuk a C-15003 számú *Nocardia* fajjal, és 28 °C-on 48 órán át rázógépen tenyésztjük.

200 literes saválló fermentorba 100 következő összetételű inokulum-táptalajt öntünk: 2,0% glükóz, 3,0% oldható keményítő, 1,0% kukoricalekvár, 1,0% nyers szójaliszt, 0,5% Polypepton (Daigo Nutritive Chemicals, Japan), 0,3% nátrium-klorid, 0,5% kalcium-karbonát, pH=7,0; a táptalajt 121 °C-on 20 percig sterilizáljuk. Hűtés után 500 ml fent említett oltóanyaggal beoltjuk,

a tenyésztést 48 órán át végezzük, 28 °C-on 100/perc levegőztetés, 200 min⁻¹ fordulatszámú kevertetés mellett.

A fentiek szerint kapott oltóanyagot 100 liter termelő-táptalajba oltjuk (5% dextrin, 3% kukoricafehérje, 0,1% pepton, 0,5% kalciumkarbonát, pH=7,0), 200 literes saválló fermentorban, és a tenyésztést először 48 óráig végezzük 28 °C-on, 1/1 levegőztetés és 150 min⁻¹ kevertetés mellett.

48 órás tenyésztés után annyi izobutil-alkoholt adunk a tenyészetbe, hogy az izobutil-alkohol koncentrációja 0,1 térfogat% legyen a táptalajban, és a tenyésztést még 48 óráig folytatjuk.

A C-15003 összmenyisége 20 mg/l, a P-3 aránya 96 súly%-a a teljes C-15003-nak. Ugyanilyen körülmények között, de izobutil-alkohol adagolása nélkül a C-15003 mennyisége 12 mg/l, és a P-3 aránya 65 súly%.

3. példa

40 ml következő összetételű táptalajt: 3% oldható keményítő, 0,2% ammónium-klorid, 0,05% magnézium-szulfát, 0,05% kálium-klorid, 1,09% kálium-dihidrogén-foszfát, 2,09% dikálium-hidrogén-foszfát és 0,001% vas(II)-szulfát, beoltunk 1 ml, az 1. példában leírt oltóanyaggal, és izobutil-alkoholt és/vagy izobutir-aldehidet adunk hozzá a 6. táblázatban összefoglalt körülmények között. A 28 °C-on 8 napig végzett tenyésztés eredményeit a 6. táblázatban láthatjuk.

6. táblázat

Adagolt anyag és koncentrációja	Adagolás időpontja	Termelt összmenyiség (μg/ml)	A P-3 aránya (s%)
izobutil-alkohol 0,05%	0	27	91
izobutil-alkohol 0,05%	48	29	95
izobutil-alkohol 1,00%	72	7	97
izobutil-aldehid 0,07%	0	24	92
izobutil-aldehid 0,07%	48	23	90
izobutil-aldehid 1,00%	72	4	96
izobutil-alkohol 0,04%			
izobutil-aldehid 0,04%	48	28	94
nincs adagolás	—	10	58

4. példa

A 3. példában leírt módon izobutil-alkoholt vagy izobutil-aldehidet adunk a táptalajba tenyésztés előtt. A 7. táblázatban látható eredményeket kaptuk.

7. táblázat

Adagolt anyag	Koncentráció (térf.%)	A termék összmenyisége (μg/ml)	P-3 aránya (%)
izobutil-alkohol	0,01	24	74
izobutil-alkohol	0,02	27	79
izobutil-alkohol	0,05	27	92
izobutil-alkohol	0,1	8	92
izobutil-alkohol	0,2	2	95
izobutil-aldehid	0,01	18	75
izobutil-aldehid	0,02	21	79
izobutil-aldehid	0,05	28	87
izobutil-aldehid	0,1	20	95
izobutil-aldehid	0,2	5	97
Nincs adagolás	—	9	58

5. példa

40 milliliter következő összetételű: 3% oldható keményítő, 0,1% Proflo (Traders Oil Co., USA), 0,2% ammónium-klorid, 0,05% magnézium-szulfát, 1,09% kálium-dihidrogén-foszfát, 2,09% dikálium-hidrogén-foszfát, 0,001% vas(II)-szulfát, és 0,05% izobutil-alkohol; termelő-táptalajt 2 ml, az 1. példa szerint készült oltóanyaggal beoltunk, és a tenyésztést 28 °C-on 8 napig végezzük.

Tenyésztés után a C-15003 antibiotikum összmenyisége 38 mg/l, és a P-3 aránya körülbelül 95 súlyszázalék.

6. példa

A 2. példában kapott 95 liter tenyészléhez 50 liter acetont adunk, a keveréket 30 percig kevertetjük, majd 2 kg Hyflo Super Cel-t (Johnes and Manville Products, USA) adunk a keverékhez. Alapos keverés után a keveréket nyomás alatt szűrjük, így 120 liter szűrletet kapunk. A szűrlethez 50 liter vizet adunk, majd 90 liter etil-acetátot, és a keveréket extraháljuk. Ezt az eljárást kétszer megismételjük. Az etil-acetátos fázisokat összegyűjtjük, mossuk kétszer 30 liter vízzel, 1 kg vízmentes nátrium-szulfát hozzáadásával szárítjuk, és csökkentett nyomáson 200 milliliterre bepároljuk. A sűrítmenyhez petrolétert adunk, és a kapott csapadékot szűrővel kinyerjük (58 g). Ezt a nyers terméket 50 milliméter etil-acetáttal kevertetjük, és az oldhatatlan részeket kiszűrjük. A szűrletet 10 g szilikagéllel (E. Merck, NSZK, 0,05–2 mm) összekeverjük, és az etil-acetátot csökkentett nyomáson eltávolítjuk. A maradékot 500 milliliteres szilikagél oszlop tetejére visszük. Az eluálást lépésenként hajjuk végre 500 ml n-hexánnal, 500 ml n-hexán és etil-acetát 3 : 1 arányú elegyével, 500 ml n-hexán és etil-acetát 1 : 1 arányú elegyével és 2 liter vízzel telített etil-acetáttal. Az eluátumot 50 milliliteres frakciókban gyűjtjük, és az aktív frakciókat a következőképpen határoztuk meg: minden frakcióból egy millilitert szárazra párolunk, és 0,1 ml etil-acetátot hozzáadva kapunk egy oldatot. Ezt az oldatot csöppentjük fel 2,5 centiméterre egy szilikagél-üveglemez (E. Merck, NSZK, 60 F₂₅₄, 0,25 mm, 20×20) alsó végétől, és vízzel telített etil-acetátos rendszerrel futtatjuk körülbelül 17 cm-ig. Futtatás után a P-3-at ultrabolya fény alatt (2537 Å) azonosítjuk (R_f érték körülbelül 0,42).

Az aktív frakciókat összegyűjtjük és csökkentett nyomáson kb. 20 milliliterre pároljuk be. Ehhez a sűrítmenyhez adunk 200 ml petrolétert, és így kapunk 15 g nyers kristályos anyagot. Az így nyert nyers, kristályos anyagot melegítés közben 20 ml etil-acetátban oldjuk, az oldatot lehűtjük, melyből így kiválnak a kristályok. Szűrés után 1,4 g tiszta, kristályos anyagot kapunk, a P-3-ból, olvadáspontja 189–190 °C (97 súly% tisztaságú), és az elemanalízis talált értékei: C: 60,10%; H: 7,00%; N: 4,30%; Cl: 5,43%.

7. példa

A 3. példában leírt módon izobutil-propionátot, izobutil-butirátot vagy izobutil-izobutirátot adagolunk 42 órás tenyésztés után, és a tenyésztést folytatjuk. A kapott eredmények a 8. táblázatban láthatók.

8. táblázat

Adagolt anyag	Koncentráció (térf.%)	Termelt összmeny- nyiség (µg/ml)	P-3 aránya (%)
izobutil-propionát	0,02	32,8	91
izobutil-butirát	0,05	22,0	85
izobutil-izobutirát	0,05	26,5	86

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás a C-15003 P-3 antibiotikum előállítására a *Nocardia* sp. C-15003 mikroorganizmusnak táptalajban való tenyésztésével, azzal jellemezve, hogy a táptalajba

izobutir-aldehidet, izobutil-alkoholt, ennek zsírsav-észtereit vagy ezek keverékét adjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogantatosítási módja, azzal jellemezve, hogy izobutil-alkoholt adagolunk a táptalajba.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogantatosítási módja, azzal jellemezve, hogy izobutir-aldehidet adagolunk a táptalajba.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogantatosítási módja, azzal jellemezve, hogy izobutil-alkohol és izobutil-aldehid keverékét adagoljuk a táptalajba.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogantatosítási módja, azzal jellemezve, hogy izobutil-alkohol-zsírsav-észterét adagoljuk a táptalajba.

1 lap képlettel



