



Patent dodatkowy  
do patentu nr \_\_\_\_\_

Zgłoszono: 05.01.72 (P. 152756)

Pierwszeństwo: 07.01.71 Szwajcaria

Zgłoszenie ogłoszono: 20.04.73

Opis patentowy opublikowano: 31.01.1977

MKP C12d 9/04

Int.Cl.<sup>2</sup> C12D 9/04

CZYTELNIA

Urząd Patentowy  
Publ. Inter. (Lond.)

Twórca wynalazku: \_\_\_\_\_

Uprawniony z patentu: Sandoz AG, Bazylea (Szwajcaria)

### Sposób wytwarzania nowego antybiotyku SL 21429

2

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowego antybiotyku, oznaczonego poniżej symbolem SL 21429.

Według wynalazku nowy antybiotyk wytwarza się w ten sposób, że hoduje się w pożywce szczep grzyba gatunku *Chaetomium globosum* Kunze ex Fries i antybiotyk wydziela się z brzezki pofermentacyjnej w znany sposób, np. przez ekstrakcję lub adsorpcję i oczyszcza.

Stosowany w sposobie według wynalazku nowy szczep *Chaetomium globosum* Kunze ex Fries wyizolowano z próbki gleby w miejscowości Küssnacht w Szwajcarii i jego próbkę zdeponowano w United States Department of Agriculture (Northern Utilization Research and Development Division), Peoria, Ill, St. Zjedn, Am. pod numerem NRRL 3877.

Nowy szczep grzyba gatunku *Chaetomium globosum* Kunze ex Fries rozwija się w pożywce wyciąg słodowy — wyciąg drożdżowy — agar w temperaturze 12—37°C, korzystnie 27° i tworzy w tej pożywce białą do jasnoszarej grzybnie powietrzną i jasną grzybnie substratową. Po kilku dniach inkubacji tworzy się ciemne, przeważnie oliwkowo-brązowe otoczenie. Odwrotna strona kolonii oraz podłoże zabarwia się brązowym pigmentem.

W kulturze czystej, np. na agarze słodowym grzyb tworzy łatwo owocniki w temperaturze 12—30°C i przy wyższych temperaturach w ciągu 8—10 dni. Są one zależnie od warunków hodowli koloru zielonego do oliwkowozielonego i w końcu często

1

ciemnobrązowego. Owocniki są kuliste i mają średnicę 200—300  $\mu$ . Na szczycie mają okrągławe otworki. Peridie ich składa się z meandrycznie zrosniętych, brązowych komórek. Jest ono dość grubościennie. Z najbardziej zewnętrznej warstwy wyrastają wokół otworu liczne, po bokach nieco mniej liczne brązowo-zielone włoski. Przy podstawie mają one grubość do 4,5  $\mu$ , stopniowo zwężają się do 3  $\mu$  i są wyraźnie faliste. Powierzchnia ich jest pokryta licznymi kolcami i występują przegrody w całej długości. Z wewnętrznej osnowy otoczni wyrastają trzonkowe zarodnie workowe w postaci maczugowatej, o wymiarach 50—70×12—15  $\mu$ . Są one otoczone delikatną ścianką i przed dojrzewaniem uwalniają po 8 zarodników workowych. Zarodniki workowe są jednokomórkowe, mniej lub bardziej o kształcie cytryny z nieco zastrzonymi końcami o przekroju niedokładnie kulistym, lecz eliptycznym. Początkowo są bezbarwne, później czerwone i ostatecznie ciemnobrązowe. Z jednej strony zaopatrzone są w widoczny wyraźny otwór zarodnikowy i mają długość 9—12  $\mu$ , przeważnie 10—11  $\mu$  i szerokość 6—9  $\mu$ , przeważnie 7,5—8,5  $\mu$ .

25 Szczep NRRL 3877 *Chaetomium globosum* Kunze ex Fries odpowiada pod względem morfologicznym i fizjologicznym opisanemu przez: L. M. Ames w „A Monograph of the Chaetomiaceae” The United States Army Research and Development Series, nr 30 2, 1961, pp 26—27. Różni się on od tego wyraźnym

zielonym zabarwieniem owocników powodowanym barwą włosków.

Nowy szczep NRRL 3877 można hodować na różnych pożywkach, zawierających zwykle substancje odżywcze dla grzybów. Grzyb wykorzystuje 5 substancje odżywcze zwykle wykorzystywane przez mikroorganizmy, rozwijające się saprofitycznie na źródłach węgla, np. glikozę, sacharozę, skrobię, laktozę, dekstrynę itp., jako źródła węgla i jako 10 źródło azotu organiczne i nieorganiczne związki, zawierające azot, np. pepton lub wyciągi drożdżowe lub mięsne, siarczan amonu, azotan amonu i aminokwasy, oraz zwykle sole mineralne i pierwiastki śladowe.

Nowy antybiotyk SL 21429 można wytworzyć w sposób polegający na tym, że posiewa się ciekłą 15 pożywkę zawieszoną zarodników nowego szczepu *Chaetomium globosum* i inkubuje się przez 6–12 dni, korzystnie 10 dni w temperaturze 12–37°C, korzystnie 27°C przy wartości pH=5,7–6,0. Hodowlę można prowadzić w warunkach aerobowych jako hodowlę powierzchniową lub głębinową z wstrząsaniem, lub w fermentatorach z gazowaniem 20 powietrzem lub tlenem przy jednoczesnym mieszaniu. Po wytworzeniu się maksymalnej ilości antybiotyku brzeczkę sączy się i antybiotyk izoluje z przesączu kultury lub grzybni w zwykły sposób przez ekstrakcję i/lub adsorpcję.

Nowy antybiotyk można wydzielić z surowego ekstraktu na drodze chromatograficznej, przez kry- 30 stalizację lub za pomocą rozdzielania przeciwwądrowego.

Najbardziej korzystny sposób polega na ekstrakcji przesączu chlorkiem etylenu lub również innym 35 rozpuszczalnikiem organicznym, np. benzenem, chloroformem, octanem butylu, chlorkiem metylenu, butanolem lub octanem etylu. Następnie usuwa się rozpuszczalnik z wyciągów np. przez destylację, a pozostałość, w celu wydzielenia antybiotyku, oczyszcza się chromatograficznie na środkach 40 adsorbujących takich, jak tlenki glinu, żel krzemionkowy, krzemian magnezu itp., rozdzielanie w przeciwwądrowie i/lub krystalizację.

Nowy antybiotyk SL 21429 ma cenne właściwości farmakologiczne i można go zatem stosować jako 45 lek.

Nowy antybiotyk SL 21429 ma działanie hamujące obrzęk, co stwierdzono w próbach na zwierzętach (obrzęk łap u szczurów, powodowany bradykininą). Stosowane dawki zależą oczywiście od 50 sposobu podawania i leczonego obiektu. Na ogół uzyskano u zwierząt doświadczalnych zadowalające wyniki przy dawce 0,1–10 mg/kg.

W miarę potrzeby dawki te można podzielić na 2–3 części lub też podawać w postaci o przedłużonym 55 działaniu.

Ponadto nowy antybiotyk SL 21429 ma działanie zapobiegające owrzodzeniu, jak wykazały to wyniki z wrzodem wywołanym u szczurów fenylobutazonem oraz metodą Shaya. Stosowane dawki 60 mogą oczywiście wahać się w zależności od sposobu podawania i leczonego obiektu. Na ogół uzyskano u zwierząt doświadczalnych zadowalające wyniki przy dawce 0,1–10 mg/kg. W miarę potrzeby dawkę tę można podzielić na 2–3 części lub podawać 65

w postaci o przedłużonym działaniu. Oprócz tego nowy antybiotyk SL 21429 ma działanie immunosupresyjne na odporność komórkową. W teście Target cell destruction [Immunology 18, 501 /1970/] 4 nowy antybiotyk po podaniu in vitro hamuje rozkład komórek Targeta za pomocą uczulonych komórek śledziony. Przy dawce, wynoszącej 1 mg/litr, następuje 100%owe zahamowanie procesu. Dla 5 większych zwierząt ssących dawka dzienna nowego antybiotyku SL 21429 wynosi około 10–100 mg. Przy podawaniu per os dawki cząstkowe zawierają 10 około 4–50 mg antybiotyku oraz stałe lub ciekłe nośniki.

Antybiotyk SL 21429, wytworzony sposobem według wynalazku, można stosować jako lek sam, 15 zarówno w postaci krystalicznej lub bezpostaciowej, lub jako surowy koncentrat lub w postaci preparatu do podawania doustnego, dojelitowego lub pozajelitowego.

W niżej podanym przykładzie, który objaśnia 20 sposób według wynalazku i nie ogranicza jego zakresu, temperaturę podano w stopniach Celsjusza.

Przykład. Do fermentatora wprowadza się 25 10 litrów pożywki, zawierającej na 1 litr 50,0 g maltozy, 10,0 g mąki fasolowej, 1,0 g peptonu, 0,5 g ekstraktu drożdżowego, 0,5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0,1 g  $\text{NaCl}$ , 0,05 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 g  $\text{ZnCl}_2$ , 0,01 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,005 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,005 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  i wodę odmineralizowaną, posiewa się ją zawieszoną zarodników szczepu NRRL 3877 i inkubuje się przy 30 wartości pH=5,7 i napowietrzaniu (1,0 litr powietrza/minutę/1 litr pożywki) i mieszając (300 obrotów/minutę) przez 10 dni w temperaturze 27°. Brzeczkę sączy się, przy czym otrzymuje około 9 litrów przesączu hodowli i około 1 kg grzybni.

Przesącz hodowli ekstrahuje się trzykrotnie 9 litrami chlorku etylenu. Następnie fazy organiczne przemywa się dwukrotnie wodą porcjami po 4 litry, osusza się siarczanem sodu i odparowuje do sucha. Po odtłuszczeniu za pomocą eteru naftowego surowy wyciąg chromatografuje się na żelu 40 krzemionkowym Merck 0,05–0,2 mm i nowy antybiotyk SL 21429 eluuje się mieszaniną chloroform-metanol (98:2) i w celu oczyszczenia przekrystalizowuje się z eteru, octanu etylu i dwukrotnie z chloroformu.

Dodatkowo czysty antybiotyk SL 21429 można 45 uzyskać z grzybni, którą traktuje się trzykrotnie 1 litrem 90% metanolu w homogenizatorze Ultraturrax. Tak traktowaną grzybnię odsącza się, oddestylowuje się metanol z przesączu i wodny roztwór 55 ekstrahuje się trzykrotnie 0,5 litra chlorku etylenu. Wyciągi w chlorku etylenu przemywa się 0,3 litra wody, osusza się siarczanem sodu i odparowuje do sucha. Tak otrzymany surowy wyciąg odtłuszcza się tak, jak i przesącz hodowli, i następnie chromatografuje się, przy czym otrzymuje się 60 nowy antybiotyk SL 21429.

Zawiesinę zarodników, stosowaną do posiewu, 65 otrzymuje się w sposób niżej podany. Pożywkę, zawierającą na 1 litr 20 g cerelezy, 2 g peptonu, 2 g ekstraktu słodowego, 2 g ekstraktu drożdżowego, 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15 g agaru-

5

-agaru i odmineralizowaną wodę zaszczenia się szczepem NRRL 3877 i inkubuje się przez 12 dni w temperaturze 27°C. Gęstą warstwę grzybni, rozwiniętą na tej pożywce, dysperguje się w roztworze fizjologicznym soli kuchennej.

Nowy antybiotyk SL 21429 ma następującą charakterystykę: żółte kryształy topiące się w temperaturze 172–182°C z utworzeniem nowych kryształów o temperaturze topnienia 238°C (rozkład). Skręcalność właściwa ( $\alpha$ )<sub>D</sub><sup>20</sup> = -376° (c=0,78 w pirydynie)

Analiza elementarna: C=73,1%, H=6,8%, N=5,3%, O=15,1%.

Widmo w ultrafiolecie: maksimum przy 221 nm (log  $\epsilon'$ =1,96), 274 nm (log  $\epsilon'$ =1,16), 280 nm (log

6

$\epsilon'$ =1,16), 290 nm (log  $\epsilon'$ =1,09) (w metanolu) (figura 1).

Widmo w podczerwieni: między innymi pasma przy 3450, 2920, 1695, 1620 cm<sup>-1</sup> (w KBr) (figura 2).

5 Widmo magnetycznego rezonansu jądrowego (w sulfotlenku dwumetylowym) (figura 3).

#### Zastrzeżenie patentowe

10 Sposób wytwarzania nowego antybiotyku SL 21429, znamienny tym, że hoduje się w pożywce nowy szczep NRRL 3877, gatunku grzyba *Chaetomium globosum* Kunze ex Fries i następnie w znany sposób wydziela się z pożywki nowy antybiotyk  
15 SL 21429 i oczyszcza.

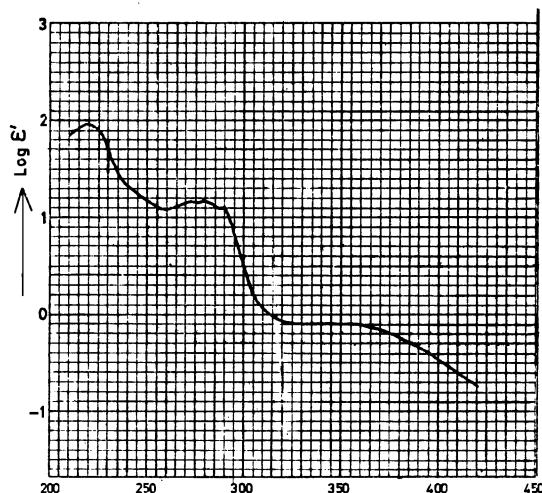


Fig. 1

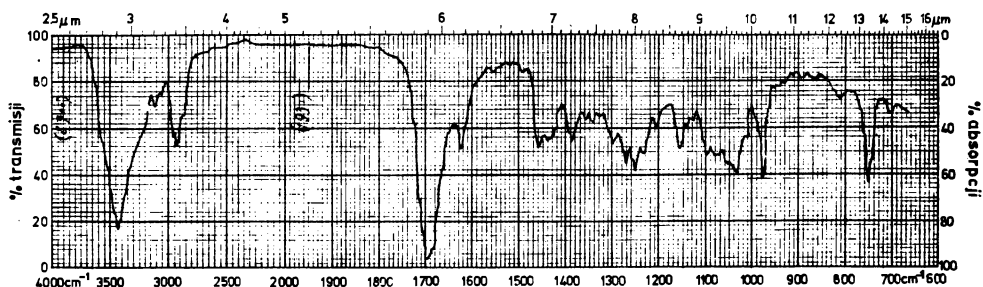


Fig. 2

84 578

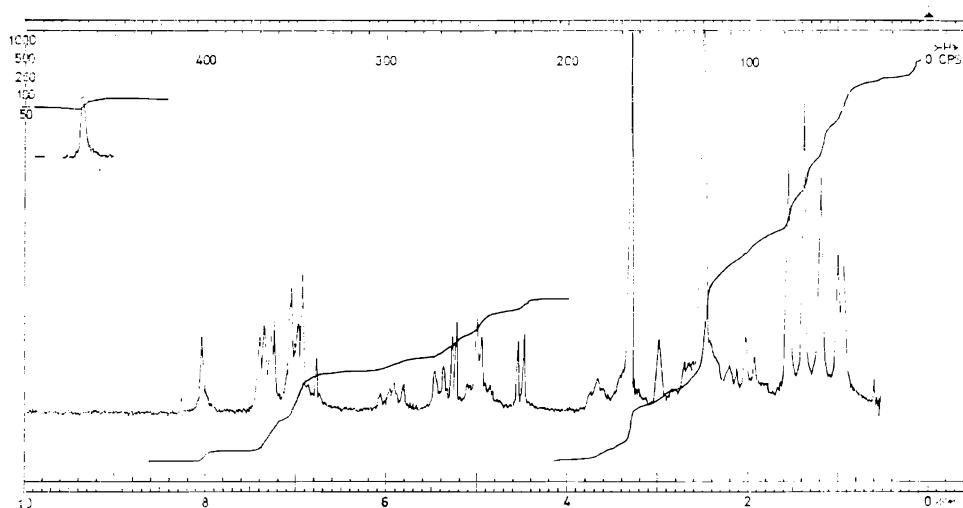


Fig. 3