

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

80 342

Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 14.08.1968 (P. 128 635)

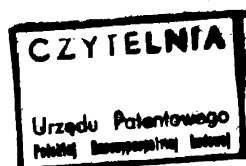
Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 26.02.1973

Opis patentowy opublikowano 15.12.1975

Kl. 30h,7

MKP C12d 9/14



Twórcy wynalazku: Shohei Kawaji, Toyoaki Kawasaki, Masao Murase,
Shunzo Fukatsu, Masahiro Abe, Yoshihisa Koaze,
Tatsuo Ito, Mamoru Suzuki, Masahiro Ueda, Hamao
Umezawa

Uprawniony z patentu: Meiji Seika Kaisha, Ltd., Tokio (Japonia)

Sposób wytwarzania 2'-amino-2'-dezoksykanamycyny

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 2'-amino-2'-dezoksykanamycyny na drodze hodowli w warunkach aerobowych szczepu 0-4-1 mikroorganizmu *Streptomyces kanamyceticus* zarejestrowanego jako ATCC 21252, w środowisku zawierającym pożywkę węglowodanową i azotową.

2'-amino-2'-dezoksykanamycyna jest antybiotykiem skutecznie hamującym rozwój bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i odpornych na działanie kwasów, np. bakterii takich jak *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* i *Mycobacterium*, jak również chorobotwórczych bakterii odpornych na działanie innych antybiotyków i syntetycznych środków leczniczych. Antybiotyk ten ma bardzo małą toksyczność w stosunku do organów słuchu i w organizmach ludzkich i zwierzęcych działa skutecznie przy zakażeniach bakteriami Gram-dodatnimi, Gram-ujemnymi lub odpornymi na kwasy. Antybiotyk ten ma sumaryczny wzór $C_{18}H_{37}N_5O_{10} \cdot H_2O$, a budowę tego związku przedstawia wzór podany na rysunku.

Z brytyjskich opisów patentowych nr 817 385 i nr 925 790 wiadomo, że jeżeli mikroorganizm *Streptomyces kanamyceticus* hoduje się w warunkach aerobowych, wówczas razem z kanamycyną A wytwarza się niekiedy kanamycyna B, to jest 2'-amino-2'-dezoksykanamycyna oraz kanamycyna C. Jednakże dotychczas znane sposoby hodowli i oczyszczania nie umożliwiają wytwarzania i oczyszczania 2'-amino-2'-dezoksykanamycyny

2

w takich ilościach, które umożliwiałyby stosowanie tego antybiotyku w praktyce.

Wynalazek umożliwia wytwarzanie 2'-amino-2'-dezoksykanamycyny z wysoką wydajnością. Sposób według wynalazku polega na tym, że szczep 0-4-1 mikroorganizmu, *Streptomyces kanamyceticus*, zarejestrowanego jako ATCC 21252, poddaje się hodowli w warunkach aerobowych w środowisku, zawierającym pożywkę węglowodanową i azotową, a cechą tego sposobu jest to, że hodowlę prowadzi się w środowisku zawierającym dodatkowo aminoglikozę lub związki typu glikozydów takie, jak paromamina, dezoksystreptamino-0-kanosaminid, neamina lub antybiotyk NK-1003 albo antybiotyk NK-1001. Gdy w brzeczce hodowlanej osiągnie się dostatecznie wysokie stężenie 2'-amino-2'-dezoksykanamycyny, proces fermentacji przerywa się i z brzeczki wyosabia produkt i oczyszcza go.

Jako związki aminoglikozowe w procesie prowadzonym sposobem według wynalazku stosuje się np. D-glikozaminę, 3-amino-3-dezoksy-D-glikozę, 6-amino-6-dezoksy-D-glikozę lub 2,6-dwudezoksy-2,6-dwuamino-D-glikozę. Pozostałe związki, które w procesie według wynalazku można stosować jako dodatkowe składniki pożywki, są związkami typu glikozydów, a mianowicie paromamina jest 4-(2-D-glikozaminylo)- α -dezoksystreptaminą, neamina jest 4-(2,6-dwudezoksy-2,6-dwuaminoglikozylo)- α -dezoksystreptaminą, anty-

biotyki NK-1003 jest to 5-0-(6-amino-6-dezoksy- α -D-glikozylo)-dezoksyestreptamina, zaś antybiotyk NK-1001 stanowi α -D-glikozyd antybiotyku NK-1003. Antybiotyki NK-1001 i NK-1003 są opisane w Asian Medical Journal, tom II, nr 2, str. 74—75, luty 1968.

Wspomniane wyżej dodatki dodaje się do środowiska hodowlanego przed lub po rozpoczęciu procesu hodowli Streptomyces, przy czym dodaje się je znanymi sposobami. Stosunek ilościowy tych dodatków do całości środowiska hodowlanego nie ma decydującego znaczenia dla przebiegu procesu, ale korzystnie wynosi on 0,05—1,0%, zwłaszcza 0,1—0,5% wagowych. Stwierdzono, że zawartość wytworzonej w środowisku hodowlanym 2'-amino-2'-dezoksykanamycyny osiąga w tych warunkach maksimum po upływie 3—7 dni od rozpoczęcia procesu fermentacji.

Hodowlę prowadzi się w sposób znany, stosowany przy hodowaniu actinomyces, przy użyciu środowiska zawierającego pożywkę odpowiednią dla tych mikroorganizmów. Środowisko to może zawierać jako źródło węgla np. skrobię, sacharozę, maltozę, glikozę, glicerynę itp., a jako źródło azotu — mąkę sojową, rozpuszczalne białka roślinne, wyciąg namokowy z kukurydzy, pepton, wyciąg mięsny, azotany lub sole amonowe. Środowisko to może też zawierać inne sole nieorganiczne, np. chlorek sodowy, siarczan magnezowy, a także substancje sprzyjające rozwojowi Streptomyces kanamyceticus.

Do wytwarzania 2'-amino-2'-dezoksykanamycyny można też stosować środowiska stałe, ale w celu wytwarzania dużych ilości tego antybiotyku korzystniej jest prowadzić proces w środowisku ciekłym w warunkach aerobowych, metodą wglębną. Można też prowadzić hodowlę metodą wstrząsania lub mieszania w środowisku ciekłym. Temperatura hodowli wynosi zwykle 25—35°C, korzystnie około 28°C.

Nagromadzoną w środowisku hodowlanym 2'-amino-2'-dezoksykanamycynę wyosabia się dowolną, znaną metodą, stosując żywiczne wymiennicze jonowe, ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi lub strącanie za pomocą substancji stosowanych przy oczyszczaniu znanych, rozpuszczalnych w wodzie antybiotyków zasadowych. Na skalę techniczną najkorzystniej jest stosować metodę adsorpcji i eluowania przy użyciu wymiennicza jonowego, korzystnie żywicznego wymiennicza typu karboksylowego, albo ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym, zawierającym odpowiedni nośnik, na przykład kwas p-toluenosulfonowy lub kwas laurynowy. Można na przykład odsącać ciała stałe takie, jak grzybnia i przesącz, zawierający 2'-amino-2'-dezoksykanamycynę adsorbować za pomocą Amberlite IRC-50, będącego żywicznym wymienniczem kationowym, zawierającym głównie kopolimer kwasu metaksyłowego z dwuwinylobenzenem. Można też eluować wodnym roztworem amoniaku, zbierać i stężyć czynne frakcje, a następnie poddawać je chromatograficznemu rozdzielaniu za pomocą Dowex 1×2, będącego silnie zasadowym żywicznym wymienniczem anionowym, składającym się głównie z kopolime-

ru styrenu z dwuwinylobenzenem i zawierającym czwartorzędowe grupy anionowe. Czynne frakcje łączy się, stęży i poddaje dalej oddzieleniu chromatograficznemu przez adsorbowanie za pomocą Amberlite CG-50 i stopniowe eluowanie wodnym roztworem amoniaku. Można otrzymać pojedynczą frakcję, zawierającą aktywny związek, to jest 2'-amino-2'-dezoksykanamycynę. Frakcję tę odparowuje się ze stanu zamrożenia i otrzymany proszek przekrystalizowuje z rozcieńczonego wodą dwumetyloformamidu, otrzymując krystaliczną 2'-amino-2'-dezoksykanamycynę.

Sposobem według wynalazku 2'-amino-2'-dezoksykanamycynę wyosabia się z brzezki pochodzącej z brzezki, ewentualnie po jej przesączeniu, adsorbując się 2'-amino-2'-dezoksykanamycynę razem z kanamycyną A za pomocą żywicznego wymiennicza kationowego, eluuje wymiennicz wodnym roztworem amoniaku, zbiera frakcje aktywne i traktuje je żywicznym wymienniczem anionowym, eluuje za pomocą wodnego roztworu amoniaku, zbiera oddzielnie frakcję, zawierającą 2'-amino-2'-dezoksykanamycynę, i frakcję, zawierającą kanamycynę A, odparowuje ze stanu zamrożenia frakcję, zawierającą 2'-amino-2'-dezoksykanamycynę i otrzymany produkt w postaci proszku rozpuszcza się w wodzie, oczyszcza roztwór chromatograficznie na kolumnie z żywicznego wymiennicza kationowego, eluując wodnym roztworem amoniaku, przy czym początkowe frakcje, zawierające śladowe domieszki kanamycyny A, odrzuca się, a z pozostałych wyosabia czystą 2'-amino-2'-dezoksykanamycynę.

Wariant tego sposobu polega na tym, że brzezki pochodzącą przesącza się, przesącz alkalizuje wodorotlenkiem metalu alkalicznego do wartości pH=10, ekstrahuje n-butanolem zawierającym aldehyd benzoowy, wyciąg miesza z wodą, zakwasza kwasem siarkowym do wartości pH=2 i miesza, oddziela fazę wodną i chromatografuje ją na kolumnie z żywicznego wymiennicza anionowego, eluując wodnym roztworem amoniaku, przy czym zbiera się oddzielnie frakcje zawierające 2'-amino-2'-dezoksykanamycynę i frakcje zawierające kanamycynę A, odparowuje ze stanu zamrożenia frakcje zawierające 2'-amino-2'-dezoksykanamycynę i otrzymany produkt w postaci proszku rozpuszcza w wodzie, oczyszcza roztwór chromatograficznie na kolumnie z żywicznego wymiennicza kationowego, eluując kolumnę wodnym roztworem amoniaku, przy czym początkowe frakcje zawierające śladowe domieszki kanamycyny A odrzuca się, a z pozostałych wyosabia czystą 2'-amino-2'-dezoksykanamycynę.

Otrzymana 2'-amino-2'-dezoksykanamycyna stanowi bezbarwne kryształy iglaste o temperaturze topnienia 183—186°C, o odczynie zasadowym, rozpuszczalna w wodzie, w rozcieńczonym wodą metanolu, etanolu, acetonie, ale nierozpuszczalna w bezwodnym metanolu, etanolu, octanie etylu, octanie butylu, eterze etylowym, chloroformie i benzenie. Daje ona dodatnią reakcję z ninhydriną, a także z odczynnikami Elson-Morgana i Molischa, ale nie daje reakcji z odczynnikami Sakaguchi,

Tollensa, Fehlinga, Millona i Benedicta. Wodny roztwór tego antybiotyku o stężeniu 1% wykazuje skręcalność właściwą $[\alpha]_D^{21^\circ\text{C}}$ wynoszącą $+118^\circ$. Pochodna N-acetylowa, otrzymana przez acetylowanie 2'-amino-2'-dezoksykanamycyny bezwodnikiem octowym w metanolu ma wzór sumaryczny $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_{10} \cdot 5(\text{CH}_3\text{CO}) \cdot \text{H}_2\text{O}$ topnieje w temperaturze $290-300^\circ\text{C}$ z objawami rozkładu i wykazuje skręcalność właściwą $[\alpha]_D^{21^\circ\text{C}}$ wynoszącą $+118^\circ$.

Bakteriobójcze właściwości 2'-amino-2'-dezoksykanamycyny są dość stałe w podwyższonej temperaturze i gdy roztwór tego antybiotyku w 6n kwasie solnym ogrzewa się w temperaturze 100°C w ciągu 40 minut, to roztwór ten wykazuje następnie 60–80% pierwotnej aktywności względem *Bacillus subtilis*. Roztwór ten nanosi się w postaci plamy na arkusz papieru filtracyjnego firmy Toyo nr 50 i następnie rozwija rozpuszczalnikami stanowiącym mieszaninę butanolu — kwasu octowego i wody (4:2:1). To badanie chromatograficzne wykazuje, że są dwie plamy dające dodatnią reakcję na ninhydrynę i jedna z tych plam daje również dodatnią reakcję na azotan srebra w amoniaku.

2'-amino-2'-dezoksykanamycyna wykazuje silne działanie bakteriobójcze w odniesieniu do bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i odpornych na kwasy, a także w odniesieniu do szczepów odpornych na działanie kanamycyny A, innych znanych antybiotyków i środków leczniczych. Toksyczność 2'-amino-2'-dezoksykanamycyny jest bardzo mała, gdyż LD_{50} w odniesieniu do myszy przy podawaniu dożylnym wynosi tylko 190 mg/Kg.

Właściwości bakteriobójcze 2'-amino-2'-dezoksykanamycyny w stosunku do różnych organizmów są podane w tablicy 1.

Tablica 1

Badany mikroorganizm	Minimalne stężenie w mikrogramach na 1 ml powodujące całkowite zahamowanie
<i>Aerobacter aerogenes</i> IAM 1102	0,15
<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,031
<i>Bacillus agri</i>	0,078
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0,039
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	0,078
<i>Diplococcus pneumoniae</i> Type 3110	0,31
<i>Escherichia coli</i> IAM 1253	1,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 607	0,31
<i>Lactobacillus arabinosus</i> ATCC 8014	1,56
<i>Lactobacillus fermenti</i> ATCC 9338	0,15
<i>Staphylococcus albus</i> PCI 1200A	0,039
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	0,31
<i>Staphylococcus aureus</i> Tetrashima	0,015

Tablica 1 (ciąg dalszy)

Badany mikroorganizm	Minimalne stężenie w mikrogramach na 1 ml powodujące całkowite zahamowanie
<i>Mycobacterium phlei</i> No. 56	0,62
<i>Mycobacterium phlei</i> Sekiguchi	0,31
<i>Mycobacterium</i> 607	0,78
<i>Proteus vulgaris</i>	7,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IAM 1007	0,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Takasaki	0,78
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Masakuro	0,39
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0,62
<i>Salmonella paratyphi</i> B	0,62
<i>Salmonella paratyphi</i> C	1,25
<i>Sarcina lutea</i> PCI 1001	0,31
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IAM 4626	500
<i>Shigella flexneri</i> EW 10 2a	0,039
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 8043	15,6
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P (odporny na streptomycynę)	2,5
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P (odporny na erytromycynę)	0,31
<i>Escherichia coli</i> K-12 CS-2	0,31
<i>Escherichia coli</i> K-12 CS-2 (odporny na antybiotyki)	1,56

Na rysunku fig. 1 przedstawia wykres absorpcji roztworu wodnego 2'-amino-2'-dezoksykanamycyny o stężeniu 1 mg/ml w zależności od długości fal światła pozafioletowego, fig. 2 — krzywą absorpcji roztworu 2'-amino-2'-dezoksykanamycyny w nujolu w zależności od długości fal światła podczerwonego, fig. 3 — wykres absorpcji roztworu wodnego antybiotyku NK-1001 o stężeniu 1 mg/ml w zależności od długości fali światła pozafioletowego, fig. 4 — krzywą absorpcji roztworu antybiotyku NK-1001 w nujolu w zależności od długości fali światła podczerwonego, fig. 5 — wykres absorpcji roztworu wodnego antybiotyku NK-1003 o stężeniu 1 mg/ml w zależności od długości fali światła pozafioletowego i fig. 6 — krzywą absorpcji roztworu antybiotyku NK-1003 w nujolu w zależności od długości fali światła podczerwonego.

Na fig. 1 i 2 uwidoczniło się, że 2'-amino-2'-dezoksykanamycyna nie wykazuje absorpcji w świetle pozafioletowym przy długości fali 220–340 milimikronów, ale wykazuje charakterystyczne pasma absorpcyjne przy następujących długościach fali w cm^{-1} : 3600, 3000, 1650, 1600, 1570, 1140, 1110, 1095, 1090, 1060, 1035, 960, 900, 895, 880, 845, 815, 790, 780, 765 i 725.

Kultura zwykłego szczepu 0-4-1 *Streptomyces kanamyceticus*, stosowana według zasadniczego

sposobu według wynalazku, została złożona w A.T.C.C. Washington, D.C. Stany Zjedn. Ameryki pod numerem 21252. Szczep 0-4-1 *Streptomyces kanamyceticus* stosowany w procesie prowadzonym sposobem według wynalazku ma następującą charakterystykę morfologiczną. Grzybnia podstawowa ma szerokość około 1 mikrona i jest rozgałęziona, zaś grzybnia powietrzna rozwinięta z grzybni zasuszonej tworzy rozgałęzienia, które jednak nie są stosunkowo drobne i zazwyczaj nie tworzy skrętów ani okółek. Zarodniki tworzą się na końcach powietrznej grzybni i zwykle mają kształt owalny lub walcowaty, a ich szerokość wynosi 1,0—1,5 mikrona. Powierzchnia zarodników jest gładka. W tablicy 2 podano warunki rozwoju szczepu *Streptomyces kanamyceticus* 0-4-1 w różnych pożywkach, w temperaturze 28°C, po upływie 14 dni hodowli.

Tablica 2

Pożywka	Obserwacje	S. kanamyceticus 0-4-1
Sacharoza Czapka, agar	Porost	Dobry, zabarwienie słabożółte
	Grzybnia powietrzna	Brak
	Pigment rozpuszczalny	Zabarwienie żółte
Gliceryna Czapka, agar	Porost	Dobry, zabarwienie żółtawoszare
	Grzybnia powietrzna	Brak
	Pigment rozpuszczalny Strona odwrotna	Słabe zabarwienie szarawożółte
Glikoza, asparagina, agar (Krainski)	Porost	Silne zabarwienie jasnożółte
	Grzybnia powietrzna	Słabe zabarwienie żółte
	Pigment rozpuszczalny	Brak
Glikoza, asparagina, agar (Uszyński)	Porost	Silne zabarwienie żółte
	Grzybnia powietrzna	Brak
	Pigment rozpuszczalny	Brak
Jabłczan wapnia, agar	Porost	Biały do bardzo słabo żółtego —
	Grzybnia powietrzna	Brak
	Pigment rozpuszczalny Strona odwrotna	Zabarwienie żółtawe Barwa biała

Tablica 2 (ciąg dalszy)

Pożywka	Obserwacje	S. kanamyceticus 0-4-1
Gliceryna, jabłczan wapnia, agar	Porost	Dobry, zabarwienie żółte
	Grzybnia powietrzna	Brak
	Pigment rozpuszczalny	Brak
Bulion, agar	Porost	Bezbarwny do szarżółtego
	Grzybnia powietrzna	Brak
	Pigment rozpuszczalny	Brak
Glikoza, bulion, agar	Porost	Drobno pomarszczony, biały do żółtawego
	Grzybnia powietrzna	Brak
	Pigment rozpuszczalny	Brak
Skrobia, siarczan amonu, agar	Porost	Żółtawy do żółtego
	Grzybnia powietrzna	Brak
	Pigment rozpuszczalny Strona odwrotna	Brak Żółtawa
Płat ziemniaka	Porost	Powierzchnia pomarszczona, ziarnista, barwa żółtawa do brązowej
	Grzybnia powietrzna	Nikłe zabarwienie białe
	Pigment rozpuszczalny	Brak
Płat marchwi	Porost	Pomarszczony, słabszy niż na ziemniaku, ziarnisty
	Grzybnia powietrzna	Nikłe zabarwienie białe
	Pigment rozpuszczalny	Brak
Surowica krwi Loeffler'a	Porost	Barwa szara do kremowej
	Grzybnia powietrzna	Brak
	Pigment rozpuszczalny Porost w temperaturze 37°C	Brak Podobny do proszku w temperaturze 28°C

Tablica 2 (ciąg dalszy)

Pożywka	Obserwacje	S. kanamycetius 0-4-1
Jajo	Porost	Pomarszczony, barwa żółta
	Grzybnia powietrzna Pigment rozpuszczalny	Brak
Mleko odtłuszczone	Porost	Pierścieniowy
	Grzybnia powietrzna Pigment rozpuszczalny	—

W tablicy 3 podano fizjologiczne działanie szczepu 0-4-1 *Streptomyces kanamyceticus*, zaobserwowane przy hodowli w temperaturze 28°C po upływie 14 dni.

Tablica 3

Działanie fizjologiczne	S. kanamycetius 0-4-1
Redukcja azotanu	Tak
Hydroliza skrobi	Tak
Wytwarzanie siarkowodoru	Nie
Wytwarzanie tyrozynazy	Nie
Uplynnianie żelatyny (w ciągu 14 dni w temperaturze 15°C)	Tak
Rozpuszczanie surowicy krwi Loeffler'a (w temperaturze 28°C i 37°C) w ciągu 14 dni	Nie zaobserwowano
Mleko odtłuszczone	Nie powoduje koagulacji, powolna peptonizacja

W tablicy 4 podano zdolność wykorzystywania różnych źródeł węgla przez szczep *S. kanamyceticus* 0-4-1.

Tablica 4

Źródło węgla	Stopień wykorzystania
Sacharoza	+++
Ksyloza	++
Laktoza	±
Octan sodowy	++
Cytrynian sodowy	+++
Bursztynian sodowy	+
Sorbit	±
Dulcyt	+++

Wspomniane wyżej nowe antybiotyki NK-1001 i NK-1003, które mogą być stosowane zgodnie z wynalazkiem jako dodatki przy wytwarzaniu 2'-amino-2'-dezoksykanamycyny, wytwarza się ho-

dując szczep *Streptomyces kanamyceticus* w środowisku zawierającym specjalny dodatek.

Antybiotyk NK-1001 zwalcza skutecznie bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne, na przykład *Bacillus subtilis*, *Lacto-bacillus fermenti* i *Shigella dysenteriae*. Jest to substancja zasadowa, rozpuszczalna w wodzie, w wodnym roztworze metanolu lub etanolu, ale nierozpuszczalna w bezwodnym metanolu i etanolu, w octanie etylu, octanie butylu i benzenie. Daje ona dodatnią reakcję z ninhydryną, odczynnikami Elson-Morgena i Molischa, ale nie daje reakcji z odczynnikami Sakaguchi, Tollensa, Fehlinga, Millona i Benedicta. Zawiera ona węgiel, wodór, tlen i azot, ale nie zawiera siarki, chlorowców i popiołu. Jej empiryczny wzór jest $C_{18}H_{35}N_3O_{12} \cdot H_2O$. Substancja ta tworzy bezbarwne kryształy iglaste, rozkładające się w temperaturze 238–242°C, jej 1% roztwór wodny ma skręcalność właściwą $[\alpha]_D^{21} = -132^\circ$, nie absorbuje światła pozajądowego o długości fali 220–340 milimikronów, jak to uwidoczniło na fig. 3, natomiast wykazuje charakterystyczne pasma absorpcyjne w świetle podczerwonym, jak to uwidoczniło na fig. 4. Na skutek hydrolizy antybiotyku NK-1001 przez ogrzewanie go w roztworze w 6n kwasu solnego w temperaturze 100°C w ciągu 40 minut, traci on właściwości antybakteryjne. Otrzymany po hydrolizie roztwór nakłada się w postaci plam na arkusz 40 cm × 2 cm bibuły filtracyjnej i rozwija ku dołowi za pomocą mieszaniny butanolu z pirydyną, kwasem octowym i wodą (6:4:1:3). Otrzymany chromatogram wykazuje powstanie 3 plam, mianowicie jednej plamy dającej dodatnią reakcję z ninhydryną i amoniakalnym roztworem azotanu srebra, drugiej dającej dodatnią reakcję tylko z ninhydryną i trzeciej, która daje dodatnią reakcję z amoniakalnym roztworem azotanu srebra. W porównaniu ze znanymi próbkami okazuje się, że te trzy plamy odpowiadają dezoksystreptaminie, 6-amino-6-dezoksy- α -glikozie i d-glikozie. W związku z tym oraz biorąc pod uwagę oznaczony ciężar cząsteczkowy antybiotyku NK-1001, stwierdza się, że antybiotyk ten składa się z jednej cząsteczki dezoksystreptaminy, jednej cząsteczki 6-amino-6-dezoksy-d-glikozy i jednej cząsteczki d-glikozy. Antybiotyk ten jest zasadniczo nietoksyczny i jego LD_{50} przy dożylnym podawaniu myszom wynosi 3050 mg/kg.

Antybiotyk NK-1001 wytwarza się hodując szczep 0-4-1 *Streptomyces kanamyceticus* w warunkach aerobowych, w środowisku zawierającym pożywkę węglowodanową i azotową, jak również pewną ilość streptydyny. Po nagromadzeniu się antybiotyku w hodowli wyosabnia się go. Proces fermentacji w celu wytworzenia antybiotyku NK-1001 prowadzi się podobnie do procesu opisanego wyżej w odniesieniu do wytwarzania 2'-amino-2'-dezoksykanamycyny, przy czym można stosować również podobne źródła węgla i azotu. Tak na przykład można stosować hodowlę wstrząsową i hodowlę zbiornikową. Temperatura hodowli wynosi 25–35°C, korzystnie około 28°C. Ilość streptydyny dodawana do środowiska nie ma decydującego znaczenia i wynosi korzystnie 0,05–1,0%, zwłaszcza 0,1–0,5% w stosunku wagowym do ilo-

ści środowiska. Streptydynę można dodawać przy rozpoczęciu hodowli lub podczas procesu. Wyosabnianie i oczyszczanie antybiotyku NK-1001 prowadzi się podobnie, jak wyosabnianie 2'-amino-2'-dezoksykanamycyny.

Antybiotyk NK-1003 ma również właściwości antybakteryjne w odniesieniu do bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i bakterii odpornych na działanie kwasów, na przykład *Bacillus subtilis*, *Lectobacillus fermenti*, *Shigella dysenteriae* itp. Jest to substancja zasadowa, rozpuszczalna w wodzie i w wodnym roztworze metanolu lub etanolu, ale nierozpuszczalna w bezwodnym metanolu, bezwodnym etanolu, octanie etylu, octanie butylu i benzenie. Daje ona dodatnią reakcję z ninhydryną, odczynnikami Elson-Margana i Molischa, ale nie daje reakcji z odczynnikami Sahaguchi, Tollensa, Fehlinga, Millona i Benedicta. Zawiera ona węgiel, wodór, tlen i azot, a nie zawiera siarki, chlorowców i popiołu. Jej empiryczny wzór jest: $C_{12}H_{25}N_3O_7$. Stanowi ona bezbarwne igły krystaliczne, rozkładające się w temperaturze 202–205°C. Wodny roztwór 1% tego antybiotyku wykazuje skręcalność właściwą $[\alpha]_D^{21^\circ C} = +95^\circ$. W świetle pozafioletowym o długości fali 220–340 milimikronów nie wykazuje absorpcji, jak to uwi-
doczniono na fig. 5, natomiast wykazuje charakterystyczne pasma absorpcyjne w podczerwieni, jak to uwidacznia fig. 6.

Poddając antybiotyk NK-1003 hydrolizie przez ogrzewanie w roztworze w 6n kwasie solnym w temperaturze 100°C w ciągu 40 minut pozbawia się go właściwości antybakteryjnych. Roztwór otrzymany w wyniku hydrolizy nanosi się w postaci plamy na arkusz bibuły filtracyjnej 40 cm × 2 cm i następnie rozwija mieszaniną butanolu, pirydyny, kwasu octowego i wody (6:4:1:3). Otrzymany chromatogram wykazuje 2 plamy, przy czym obie dają dodatnią reakcję z ninhydryną, a jedna z nich daje także dodatnią reakcję z amoniakalnym roztworem azotanu srebra. Porównując ze znanymi próbkami stwierdza się, że te dwie plamy odpowiadają dezoksyestreptaminie i 6-d-glikozaminie. Biorąc to pod uwagę, jak również uwzględniając określony ciężar cząsteczkowy, stwierdza się, że antybiotyk NK-1003 jest związkiem złożonym z jednej cząsteczki dezoksyestreptaminy i jednej cząsteczki 6-d-glikozaminy. Antybiotyk ten jest zasadniczo nietoksyczny i jego LD_{50} przy podawaniu myszom dożylnie wynosi 1550 mg/kg.

Antybiotyk NK-1003 wytwarza się hodując szczep *Streptomyces kanamyceticus* w środowisku zawierającym węglowodany i pożywkę azotową oraz pewną ilość antybiotyku NK-1001. Hodowę prowadzi się w warunkach aerobowych i po nagromadzeniu się antybiotyku w hodowli wyosabnia się go. Proces fermentacji prowadzi się w sposób podobny do opisanego w odniesieniu do wytwarzania 2'-amino-2'-dezoksykanamycyny, przy czym można stosować też podobne źródła węgla i azotu. Korzystnie jest stosować hodowlę aerobową węglną, przy czym temperatura wynosi 25–30°C, korzystnie około 28°C. Ilość dodawanego antybiotyku NK-1001 nie ma decydującego zna-

czenia i wynosi 0,05–1,0%, korzystnie 0,1–0,5% w stosunku wagowym do ilości środowiska. Antybiotyk NK-1001 można dodawać na początku procesu lub w czasie jego trwania. Wytworzony antybiotyk NK-1003 wyosabnia się i oczyszcza w sposób podobny do opisanego w odniesieniu do 2'-amino-2'-dezoksykanamycyny.

Właściwości antybiotyków NK-1001 i NK-1003 podano w tablicy 5.

Tablica 5

Badany mikroorganizm	Najniższe zabójcze stężenie w mikrogramach/litr	
	NK-1001	NK-1003
<i>Aerobacter aerogenes</i> IAM 1102	31,2	15,6
<i>Alcaligenes faecalis</i>	—	3,9
<i>Bacillus agri</i>	7,8	2,0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	6,25	3,125
<i>Candida albicans</i>	powyżej 500	powyżej 500
<i>Diplococcus pneumoniae</i> Type 311D	500	250
<i>Escherichia coli</i> IAM 1253	125	125
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 607	31,2	31,2
<i>Lactobacillus fermenti</i> ATCC 9338	3,9	3,9
<i>Staphylococcus albus</i> PCI 1200A	15,6	7,8
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	62,5	62,5
<i>Staphylococcus aureus</i> Terashina	6,25	3,125
<i>Mycobacterium phlei</i> KS	15,6	25
<i>Mycobacterium</i> 607	62,5	50
<i>Salmonella peratyphi</i> A	62,5	62,5
<i>Sarcina lutea</i> PCI 1001	500	250
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IAM 4626	powyżej 500	powyżej 500
<i>Shigella flexneri</i> EW 10 2a	6,25	3,125
<i>Streptococcus haemolyticus</i> D-90	500	500

Przykład I. 15 litrów ciekłego środowiska hodowlanego zawierającego 3,0% skrobi, 2,0% maltozy, 2,5% mączki sojowej, 1,2% azotanu sodowego i 0,5% chlorku sodowego zaszczenia się typowym szczepem 0-4-1 *Streptomyces kanamyceticus* ATCC 21252 i poddaje hodowli w temperaturze 28°C, napowietrzając i mieszając. Po upływie 22 godzin do środowiska dodaje się 50 g 3-aminoglikozy i kontynuuje proces. Po upływie 150 godzin zawartość 2'-amino-2'-dezoksykanamycyny osiąga maksimum. Wówczas ciekłą kulturę przesącza się i do przesącza dodaje 4 litry Amberlitu IRC-50 (typ amonowy). Zaadsorbowane antybiotyki eluuje

się z żywicy za pomocą 0,5n roztworu wodnego amoniaku i czynne frakcje zbiera się i zagęszcza na syrop. Syrop ten rozpuszcza się w 500 ml wody i odbarwia roztwór dodając 6 g węgla aktywowanego. Po odsączeniu węgla przesącz eluuje się chromatograficznie za pomocą Dowex 1×2 (typ wodorotlenowy). Frakcje zawierające 2'-amino-2'-deзокsykanamycynę eluuje się najpierw, przed oddzieleniem kanamycyny A. Frakcje o dużym stężeniu 2'-amino-2'-deзокsykanamycyny stężeją się i wymraża do sucha, otrzymując 2,2 g surowej 2'-amino-2'-deзокsykanamycyny w postaci proszku. Proszek ten rozpuszcza się w 50 ml wody i roztwór traktuje preparatem Amberlite CG-50 (typ amonowy). Żywicę eluuje się chromatograficznie 0,1n—0,5n wodnego roztworu amoniaku, przy czym najpierw eluuje się małą ilość kanamycyny A, która znajduje się w tym roztworze. Następnie eluuje się oddzielnie 2'-amino-2'-deзокsykanamycynę w jednej frakcji, którą wymraża się na suchy proszek. Po przekrystalizowaniu tego proszku otrzymuje się 1,1 g 2'-amino-2'-deзокsykanamycyny w postaci bezbarwnych kryształków w kształcie igieł. Analiza elementarna produktu wykazuje, że zawiera on 42,62% C, 7,52% H i 12,30% N. Ciężar cząsteczkowy produktu wynosi 435.

Przykład II. 15 litrów ciekłego środowiska opisanego w przykładzie I zaszczepia się tym samym szczepem *Streptomyces kanamyceticus* i poddaje hodowli w temperaturze 28°C, napowietrzając i mieszając. Po upływie 22 godzin dodaje się 50 g 6-aminoglikozy i kontynuuje hodowlę. Najwyższe stężenie 2'-amino-2'-deзокsykanamycyny uzyskuje się po upływie 145 godzin. Postępując dalej w sposób opisany w przykładzie I otrzymuje się 1,0 g krystalicznej 2'-amino-2'-deзокsykanamycyny.

Przykład III. 15 litrów pożywki zawierającej 3,0% skrobi, 2,5% mączki sojowej, 1,2% azotanu sodowego i 0,35% chlorku sodowego zaszczepia się tym samym szczepem jakiego stosuje się w przykładzie I i poddaje hodowli przy napowietrzaniu i mieszaniu w temperaturze 28°C. Po upływie 20 godzin dodaje się 30 g antybiotyku NK-1001 i kontynuuje proces. Najwyższe stężenie 2'-amino-2'-deзокsykanamycyny osiąga się po upływie 140 godzin. Postępując dalej w sposób opisany w przykładzie I otrzymuje się 2:5 g krystalicznej 2'-amino-2'-deзокsykanamycyny.

Przykład IV. 15 litrów ciekłej pożywki o składzie podanym w przykładzie III zaszczepia się tym samym szczepem *Streptomyces kanamyceticus*, jaki użyto w przykładzie I i poddaje hodowli w temperaturze 28°C, napowietrzając i mieszając. Po upływie 20 godzin dodaje się 30 g antybiotyku NK-1003 i prowadzi proces dalej, otrzymując najwyższe stężenie 2'-amino-2'-deзокsykanamycyny po upływie 140 godzin. Postępując dalej w sposób podany w przykładzie I otrzymuje się 1,5 g krystalicznej 2'-amino-2'-deзокsykanamycyny.

Przykład V. 15 litrów ciekłej pożywki o składzie podanym w przykładzie III zaszczepia się tym samym szczepem, jaki stosuje się w przykładzie I i poddaje hodowli w temperaturze 28°C na-

powietrzając i mieszając. Po upływie 20 godzin dodaje się 45 g neaminy i proces prowadzi dalej, uzyskując najwyższe stężenie 2'-amino-2'-deзокsykanamycyny po upływie 140 godzin. Postępując dalej w sposób opisany w przykładzie I, otrzymuje się 1,2 g krystalicznej 2'-amino-2'-deзокsykanamycyny.

Przykład VI. 15 litrów ciekłej pożywki, zawierającej 3,0% skrobi, 2,5% mączki sojowej, 1,2% azotanu sodowego i 0,35% chlorku sodowego, sterylizuje się, chłodzi i miesza z wysterylizowanym i ochłodzonym roztworem 30 g antybiotyku NK-1001 w wodzie. Otrzymaną mieszaninę zaszczepia się tym samym szczepem *Streptomyces kanamyceticus*, jaki stosuje się w przykładzie I i następnie poddaje procesowi hodowli w temperaturze 28°C, napowietrzając i mieszając. Najwyższe stężenie 2'-amino-2'-deзокsykanamycyny osiąga się po upływie 140 godzin. Postępując dalej w sposób opisany w przykładzie I, otrzymuje się 2,2 g krystalicznej 2'-amino-2'-deзокsykanamycyny.

Przykład VII. Prowadzi się hodowlę *Streptomyces kanamyceticus* w obecności antybiotyku NK-1001, w sposób opisany w przykładzie III. Otrzymaną ciecz odsącza się i do przesączu o objętości 14 litrów dodaje się wodorotlenku sodowego aż do uzyskania pH=10. Przesącz ten ekstrahuje się następnie 1/4 objętości n-butanolu, zawierającego 2 g aldehydu benzoowego na 1 g rozpuszczalnych w wodzie antybiotyków, zawartych w przesączu. Wyciąg butanolowy miesza się z 1/10 objętości wody i do otrzymanej mieszaniny dodaje się tyle kwasu siarkowego, aby uzyskać pH=2,0. Po wymieszaniu zasadowe antybiotyki przechodzą do fazy wodnej. Fazę tę odbarwia się węglem aktywowanym i chromatografuje za pomocą Dowex 1×2 (typ OH) i za pomocą Amberlitu CG-50 (typ amonowy), jak opisano w przykładzie I. Otrzymany surowy produkt w postaci proszku przekrystalizowuje się z wody, i dwumetyloformamidu, otrzymując 1,1 g 2'-amino-2'-deзокsykanamycyny w postaci bezbarwnych igieł.

Przykład VIII — próba porównawcza. Prowadza się szereg prób w celu wykazania, jak nieoczekiwany, a korzystny wpływ na proces wytwarzania 2'-amino-2'-deзокsykanamycyny wywiera zgodnie z wynalazkiem dodawanie aminoglikoz i ich związków dezoksystreptaminowych, w porównaniu z przebiegiem procesu bez tych dodatków.

W próbach tych szczep 0-4-1 *Streptomyces kanamyceticus* hoduje się w temperaturze 28°C w ciągu 150 godzin, w sposób podany w przykładzie I, stosując podobne urządzenie fermentacyjne i pożywki o tym samym składzie. Po upływie różnych okresów czasu od rozpoczęcia hodowli, do środowiska dodaje się różne ilości różnych aminoglikoz i ich związków streptaminowych, jak to uwidoczono w tablicy 6. Po upływie 150 godzin brzeczki traktuje się w sposób opisany w przykładzie I, w celu uzyskania możliwie największych ilości 2'-amino-2'-deзокsykanamycyny i kanamycyny A. Ilości te oraz inne dane dotyczące prób podano w tablicy 6.

Tablica 6

Numer próby	Dodatek	Ilość dodatku w gramach	Czas dodawania mierzony od chwili rozpoczęcia procesu w godzinach	Zawartość 2'-amino-2'-dezo-ksykanamycyny w mikrogramach na 1 ml	Wydajność 2'-amino-2'-dezo-ksykanamycyny w gramach	Zawartość kanamycyny A w mikrogramach na 1 ml	Wydajność kanamycyny A w gramach
1	Bez dodatku	—	—	26	0,12	2790	26,8
2	3-aminoglikoza	50	22	240	1,10	1480	12,7
3	6-aminoglikoza	50	22	225	1,00	1730	15,2
4	Antybiotyki NK-1001	30	20	575	2,50	1240	11,2
5	Antybiotyki NK-1001	30	0	480	2,20	1450	13,6
6	Antybiotyki NK-1003	30	20	345	1,50	1700	16,0
7	Neamina	45	20	260	1,20	1390	12,8

Wyniki te dowodzą, że dodawanie aminoglikoz lub ich związków z dezoksystreptaminą sposobem według wynalazku zwiększa wyraźnie wydajność procesu wytwarzania 2'-amino-2'-dezo-ksykanamycyny.

W przykładach IX i X opisano sposób wytwarzania antybiotyków NK-1001 i NK-1003, stosowanych w procesie według wynalazku jako dodatek do środowiska hodowlanego.

Przykład IX. 15 litrów cieplego środowiska zawierającego 2,0% skrobi, 3,0% maltozy, 3,0% mączki sojowej, 1,0% azotanu sodowego i 0,5% chlorku sodowego zaszczenia się typowym szczepem 0-4-1 *Streptomyces kanamyceticus* i poddaje się hodowli w temperaturze 28°C, napowietrzając i mieszając. Po upływie 80 godzin dodaje się 30 g streptydyny i prowadzi dalej proces w ciągu następnych 80 godzin, uzyskując najwyższe stężenie antybiotyku NK-1001 pod koniec tego okresu. Ciekłą brzeczkę odsącza się, otrzymując 14 litrów przesączu, który traktuje się 4 litrami Amberlitu IRC-50 (typ amonowy) w celu zaadsorbowania antybiotyków. Żywicę tę eluuje się następnie 0,5n wodnym roztworem amoniaku i aktywne frakcje eluatu łączy się i stęży, a następnie rozpuszcza w 100 ml wody i miesza z 1 g węgla aktywowanego w ciągu 30 minut. Po przesączeniu odbarwiony przesącz traktuje się 2 litrami Amberlitu CG-50 (typu amonowego) i żywicę tę eluuje 0,3n roztworem wodnym amoniaku. Pojedynczą frakcję antybiotyku NK-1001 oddziela się przed wydzielaniem kanamycyny A, stęży i wymraża do sucha, otrzymując 28,5 g antybiotyku NK-1001 w postaci białego proszku. Proszek ten rozpuszcza się w 12 ml wody i traktuje stopniowo 50 ml metanolu, powodując wydzielanie się kryształów. Po odsączeniu i wysuszeniu otrzymuje się 17,4 g antybiotyku NK-1001 w postaci białych igieł. Analiza elementarna tego produktu wykazuje: 44,27% C, 7,09% H i 8,95% N, bez siarki, chlorowców i popiołu. Ciężar cząsteczkowy tego związku, oznaczony metodą prężności pary wynosi 492.

Przykład X. 15 litrów cieplej pożywki, zawierającej 2,0% skrobi, 3,0% maltozy, 3,0% mączki sojowej, 1,0% azotanu sodowego i 0,5% chlorku sodowego zaszczenia się typowym szczepem 0-4-1

- 5 *Streptomyces kanamyceticus* i prowadzi hodowlę w temperaturze 28°C, napowietrzając i mieszając. Po upływie 20 godzin dodaje się 25 g antybiotyku NK-1001, otrzymanego w sposób opisany w przykładzie IX i proces prowadzi dalej, napowietrzając i mieszając. Największe stężenie antybiotyku NK-1003 osiąga się po upływie 6 dni. Brzeczkę przesącza się wówczas, otrzymując 14 litrów przesączu, który traktuje się 4 litrami Amberlitu IRC (typ amonowy), w celu zaadsorbowania antybiotyków.
- 15 Następnie eluuje się żywicę 0,5n roztworem wodnym amoniaku, łączy aktywne frakcje eluatu i stęży, a następnie rozpuszcza w 100 ml wody i miesza z 1 g węgla aktywowanego. Po odsączeniu od węgla, odbarwiony roztwór traktuje się 2 litrami Amberlitu CG-50 (typ amonowy) i zaadsorbowane na tej żywicy, po przemyciu wodą, eluuje się 0,3n roztworem wodnym amoniaku, oddzielając najpierw frakcję kanamycyny A i następnie pojedynczą frakcję antybiotyku NK-1003.
- 25 Frakcję tę stęży się i wymraża do sucha, otrzymując 11,3 g surowego antybiotyku NK-1003 w postaci proszku. Po przekrystalizowaniu tego proszku z mieszaniny wody z metanolem i wysuszeniu otrzymuje się 7,5 g antybiotyku NK-1003 w postaci białych igieł. Analiza elementarna tego produktu wykazuje, że zawiera on 44,42% C, 7,81% H i 13,11% N, a jego ciężar cząsteczkowy, oznaczony metodą prężności pary, wynosi 305 (1 cząsteczka metanolu pozostaje po krystalizacji związana z produktem).
- 35

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 2'-amino-2'-dezo-ksykanamycyny na drodze hodowli w warunkach aerobowych szczepu 0-4-1 mikroorganizmu *Streptomyces kanamyceticus* ATCC 21252, w środowisku zawierającym pożywkę węglowodanową i azotową, przy czym z brzeczeki otrzymanej w wyniku
- 40

hodowli wyosabnia się 2'-amino-2'-dezoksykanamycynę na drodze odparowania frakcji zawierających ten związek ze stanu zamrożenia i chromatograficznego oczyszczenia otrzymanego produktu, **znamienny tym**, że hodowlę prowadzi się w środowisku zawierającym dodatkowo aminoglikozę, lub związki typu glikozydów takie, jak paromina, dezoksystreptamino-0-kanosaminid, neamina, antybiotyk NK-1003, to jest S-0-(6-amino-6-dezoksy- α -D-glikozylo)-dezoksystreptamina lub antybiotyk NK-1001, to jest α -D-glikozyd antybiotyku NK-1003.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako aminoglikozę stosuje się 3-aminoglikozę lub 6-aminoglikozę.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że z brzezki otrzymanej w wyniku hodowli, ewentualnie po przesączeniu, adsorbuje się 2'-amino-2'-dezoksykanamycynę razem z kanamycyną A za pomocą żywicznego wymiennicza kationowego, eluuje żywiczny wymiennicz wodnym roztworem amoniaku, zbiera frakcje aktywne i traktuje je żywicznym wymienniczem anionowym, eluuje wymiennicz chromatograficznie za pomocą wodnego roztworu amoniaku, zbiera oddzielnie frakcje zawierające 2'-amino-2'-dezoksykanamycynę i frakcje zawierające kanamycynę A, odparowuje ze stanu zamrożenia frakcje zawierające 2'-amino-2'-dezoksykanamycynę i otrzymany produkt w postaci

proszku rozpuszcza w wodzie, oczyszcza roztwór chromatograficznie na kolumnie z żywicznego wymiennicza kationowego, eluuje kolumnę wodnym roztworem amoniaku, przy czym początkowe frakcje, zawierające śladowe domieszki kanamycyny A, odrzuca się, a z pozostałych wyosabnia czystą 2'-amino-2'-dezoksykanamycynę.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że brzezke otrzymaną w wyniku hodowli przesącza się, przesącz alkalizuje za pomocą wodorotlenku metalu alkalicznego do wartości pH=10, ekstrahuje n-butanolem zawierającym aldehyd benzoesowy, wyciąg miesza z wodą, zakwasza kwasem siarkowym do wartości pH=2 i miesza, oddziela fazę wodną i chromatografuje ją na kolumnie z żywicznego wymiennicza anionowego, eluuje kolumnę wodnym roztworem amoniaku, przy czym zbiera się oddzielnie frakcje zawierające 2'-amino-2'-dezoksykanamycynę i frakcje zawierające kanamycynę A, odparowuje ze stanu zamrożenia frakcje zawierające 2'-amino-2'-dezoksykanamycynę i otrzymany produkt w postaci proszku rozpuszcza w wodzie, oczyszcza roztwór chromatograficznie na kolumnie z żywicznego wymiennicza kationowego, eluuje kolumnę wodnym roztworem amoniaku, przy czym początkowe frakcje, zawierające śladowe domieszki kanamycyny A, odrzuca się, a z pozostałych wyosabnia czystą 2'-amino-2'-dezoksykanamycynę.

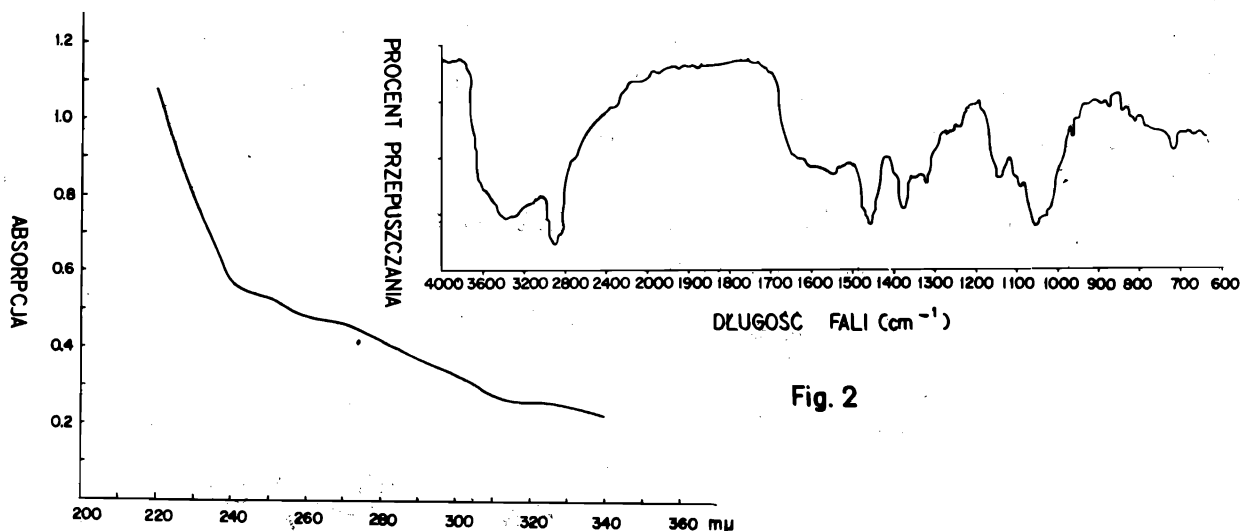


Fig. 2

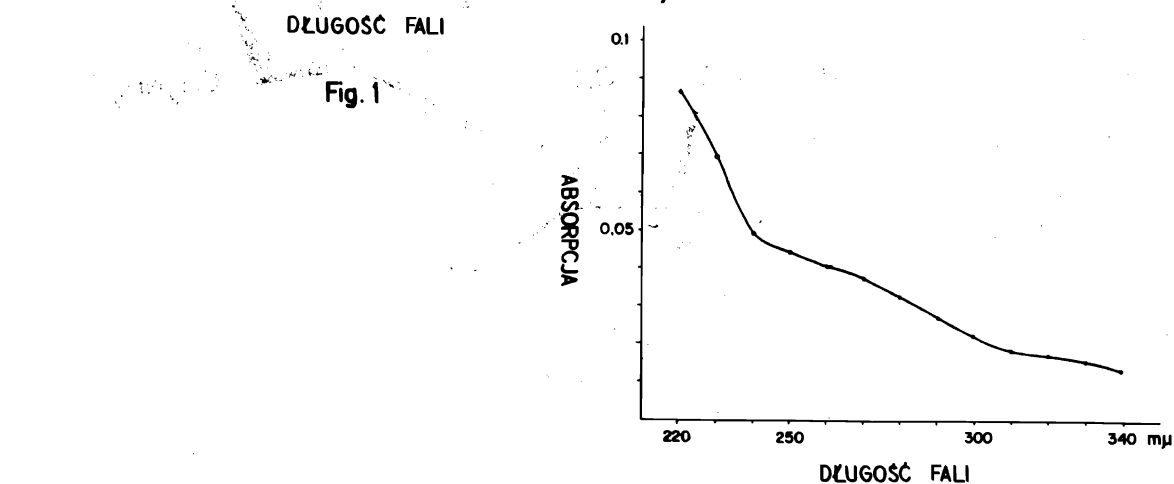


Fig. 3

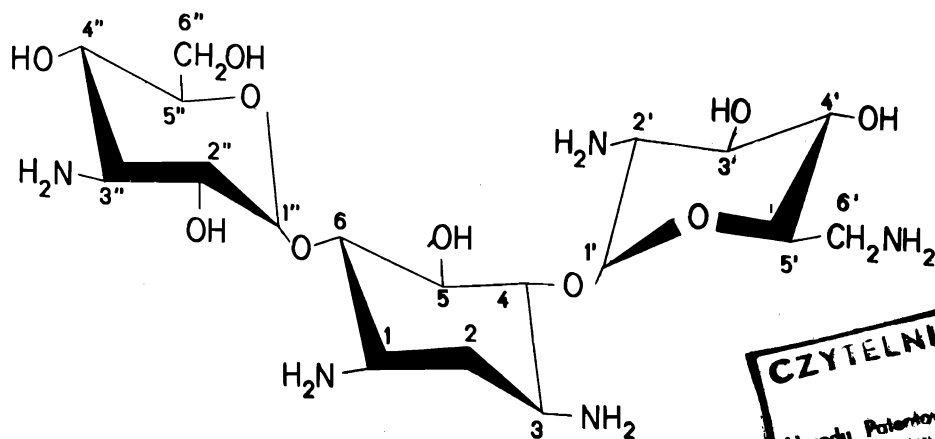


Fig. 7

CZYTELNIA
Urzędu Patentowego
Główny Biuro (1-4, 1000)