

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

133 485

Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 82 04 20 (P. 236043)

Pierwszeństwo: 81 04 20 Stany Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 82 11 08

Opis patentowy opublikowano: 1987 01 10

Int. Cl.³

C12P 19/30

C07H 21/02

//A61K 31/71

Twórcy wynalazku: Alexander Demetrios Argoudelis, David Womack
Stroman

Uprawniony z patentu: THE UPJOHN COMPANY, Kalamazoo, Michi-
gań (Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób wytwarzania nowych 3-(5'-rybonukleotydów) związków typu klindamycyny

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych 3-(5'-rybonukleotydów) związków typu klindamycyny, w których rodnik kwasu propylohi-growego został zastąpiony rodnikiem innego cy-klicznego aminokwasu, o wzorze ogólnym 1, w któ-rym R_1 oznacza atom wodoru, rodnik alkilowy ewentualnie podstawiony, mający w części alkilo-wej 1—8 atomów węgla łącznie, również jego po-stacie izomeryczne R_3 oznacza atom wodoru lub grupę CH_3 , $-C_2H_5$ lub $-CH_2CH_2OH$, n oznacza liczbę całkowitą 1—4 włącznie, Y oznacza 7(S) chlor lub 7(R) chlor, ewentualnie w postaci ich farma-ceutycznie dopuszczalnych soli.

Określenie grupa alkilowa oznacza grupę alki-łową o łańcuchu prostym lub rozgałęzionym.

Charakterystykę i wytwarzanie klindamycyny o wzorze 9, przedstawiono w opisach patentowych Stanów Zjednoczonych Ameryki nr nr 3 086 912 i 3 496 163. Antybiotyk ten jest szeroko stosowany w leczeniu ludzi i zwierząt. W wielu krajach udzielono na ten antybiotyk i na różne jego po-chodne szereg patentów.

3-nukleotydy klindamycyny opisano w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3 671 647. Związki te zawierają jednostkę kwasu propylohi-growego. W próbach wobec S.aureus pro-wadzonych in vivo powyższe 3-nukleotydy mają aktywność równą około 1/10 aktywności związku macierzystego.

2

Sposobem według wynalazku otrzymuje się nowe związki — 3-rybonukleotydy takich pochodnych klindamycyny, w których jednostka kwasu propylohi-growego została zastąpiona rodnikiem innego cyklicznego aminokwasu. Nieoczekiwanie okazało się, że nukleotydy te wykazują czynność przeciw-bakteryjną in vivo tak wysoką, jak związki ma-cierzyste.

5 Z powodu tych właściwości, związki których wy-twarzanie stanowi przedmiot wynalazku, są uwa-żane za kandydujące do stosowania w lecznictwie. Są one użyteczne również w profilaktyce i leczeniu pacjentów zakażonych pierwotniakami.

15 Związki typu klindamycyny, które można prze-prowadzić w 3-rybonukleotydy sposobem według wynalazku mogą być przedstawione wzorem 10.

20 W związkach tych grupę wodorotlenową w po-łożeniu 3 jednostki linkozamidyny zastąpiono nukleo-tydem z grupy obejmującej kwas adenylowy, guanylowy, cytydylowy lub urydylowy. We wzo-rze 10 R_1 może być podstawiony w każdym po-łożeniu pierścienia pirydyny nie podstawionym przez R_2 i ma wyżej podane znaczenie, a R_2 , który może występować jednokrotnie w dowolnym po-łożeniu pierścienia pirydynowego nie zajętego przez R_1 , oznacza grupę $-C(O)X$, w której X oznacza grupę aminową związku z grupy obejmującej na przykład 7(S)-chlorometylo-1-tio- α -linkozaminid lub 30 7(R)-chlorometylo-1-tio- α -linkozaminid.

Sposobem według wynalazku omawiane 3-(5'-rybonukleotydy) o wzorze ogólnym 1, w którym R_1 , R_2 , n i Y mają podane znaczenie wytwarzają się metodą transformacji mikrobiologicznej, przez hodowlę *Streptomyces rochei*, NRRL 3533, w wodnej pożywce zawierającej jako substancje odżywcze źródło węgla w postaci przyswajalnego węglowodanu oraz źródło azotu w postaci przyswajalnego związku azotu lub substancji białkowej, w obecności związku o wzorze 1 i wyodrębnia z pożywki żądany 3-(5'-rybonukleotyd).

Jako źródło węgla w pożywce stosuje się węglowodany takie jak glukoza, cukier nierafinowany, sacharoza, gliceryna, skrobia, skrobia kukurydziana, laktoza, dekstryna, melasa itp.

Jako źródło przyswajalnego azotu lub substancji białkowych stosuje się namok kukurydziany, drożdże, autolizowane drożdże piwne wzbogacone mlekiem w proszku, mączkę sojową, mączkę z ziarna bawełny, mączkę kukurydzianą, mleko w proszku, roztwory peptonowe zwierzęce, odpady mięsne i kostne itp.

W przypadku wytwarzania 3-(5'-rybonukleotydów) związków przedstawionych wzorem 2 lub 3 hodowlę *Streptomyces rochei* NRRL 3533 prowadzi się w wodnej pożywce, w obecności związku o wzorze 2 lub 3 odpowiednio, po czym wyodrębnia się z pożywki żądany 3-(5'-rybonukleotyd). W taki sam sposób otrzymuje się 3-(5'-rybonukleotydy) związku o wzorze 4, w którym R oznacza atom wodoru, oznaczonego numerem kodowym U-57930.

3-(5'-rybonukleotydy) otrzymane przez transformację związku oznaczonego numerem kodowym U-57930 przedstawia wzór 4, w którym R oznacza kolejno rodnik 5'-cytydylowy (wzór 5), rodnik 5'-aderylowy (wzór 6), rodnik 5'-urydylowy (wzór 7) lub rodnik 5'-guanylowy (wzór 8).

Związki macierzyste o wzorze 10 można otrzymywać sposobami opisanymi w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 4 278 789.

Ponieważ wytwarzane sposobem według wynalazku związki są substancjami amfoterycznymi można je przeprowadzić w sole z kwasami lub zasadami. Przykładami nieorganicznych kwasów, jakie można stosować do sporządzenia soli są kwas solny, siarkowy, fosforowy i podobne.

Przykładami nieorganicznych zasad są zasada sodowa, potasowa, wapniowa, litowa i podobne. Sole związków można stosować do takich samych celów jak związki macierzyste.

Wytwarzane sposobem według wynalazku nukleotydy można badać i charakteryzować następującymi sposobami: Oznaczanie 3-(5'-rybonukleotydów).

Ponieważ omawiane 3-rybonukleotydy nie przejawiają czynności przeciwbakteryjnej in vitro, ich powstawanie z czynnych przeciwbakteryjnie związków macierzystych łatwo można kontrolować przez pomiar utraty czynności antybiotycznej. Do oznaczenia ilości przeciwbakteryjnie czynnego związku macierzystego w przesączu z hodowli lub w mieszaninie reakcyjnej stosuje się standardową próbę z *Sarcina lutea* ATCC 9341.

W celu stwierdzenia obecności 3-rybonukleotydów w cieczy fermentacyjnej, ekstrakcie lub materiale oczyszczonym, w pierwszej kolejności się wiąże fosfordwuestrowe, za pomocą surowej fosfatazy alkalicznej lub fosfordwuesterazy z jadu węża, niżej opisanymi sposobami. Związek przeciwbakteryjnie czynny w hydrolizacie oznacza się w próbie standardowej.

Hydrolizy enzymatyczne.

Fosfataza alkaliczna: Roztwory podstawowe (0,5 mg/ml, 0,54 jednostek/mg) fosfatazy alkalicznej z jelit gołębia, EC 3.1.3.1 (Sigma) sporządza się w buforze chlorowodoru Tris tj. tris-(hydroksymetylo)-aminometanu, 0,01 m, pH 8,0. Traktowane próbki rozcieńcza się w stosunku 1:2 zbuforowanym enzymem i inkubuje w temperaturze 28°C w ciągu 18 godzin.

Fosfordwuesteraza jadu węża: Sporządza się roztwory podstawowe (100 mg/ml, 0,026 jednostek/mg) oczyszczonej fosfordwuesterazy jadu węża w destylowanej wodzie. Mieszaniny inkubacyjne zawierają 0,2 ml roztworu (1 mg/ml) traktowanej próbki w wodzie, 0,6 ml 0,01 m buforu chlorowodoru Tris, pH 9,0, 0,1 ml 0,3 m $MgCl_2$ i 0,1 ml roztworu podstawowego enzymu. Inkubację prowadzi się w temperaturze 37°C w ciągu 18 godzin.

Fosfordwuesteraza śledziona: Sporządza się roztwory podstawowe fosfordwuesterazy śledziona EC 3.1.4.18 (Sigma) w wodzie destylowanej (1 mg/ml, 19,6 jednostek/mg). Mieszaniny inkubacyjne zawierają 0,4 ml (0,5 mg/ml) próbki do traktowania w wodzie, 0,5 ml 0,02 m roztworu buforowego Tris, pH 7,0 i 0,1 ml roztworu podstawowego enzymu. Inkubację prowadzi się w temperaturze 37°C w ciągu 18 godzin.

Chromatografia cienkowarstwowa preparatów i hydrolizatów enzymatycznych. Produkcję i oczyszczanie 3-rybonukleotydów kontroluje się w próbie z *S. lutea* (patrz wyżej) oraz chromatografią cienkowarstwową (TLC) na żelu krzemionkowym G, stosując jako układ rozwijający keton metyletylowy-aceton-wodę (186:52:20, objętościowo) lub octan etylu-aceton-woda). Bioaktywne związki macierzyste wykrywa się bioautograficznie na agarze posianym *S. lutea*.

Produkty enzymatycznej lub chemicznej hydrolizy 3-nukleotydów rozdziela się w następujących układach TLC:

A: płytka z żelem krzemionkowym GF (Analtech Inc.); woda jako układ rozwijający.

B: płytki z żelem krzemionkowym GF; alkohol n-propylowy-stężony wodorotlenek amonu-woda (55:10:35, objętościowo).

C: NM-Polygram Cellulose 300 (Brinkman Instruments Inc.); butanol-1-woda-kwas mrówkowy (77:13:10, objętościowo).

Materiały absorbujące w nadfiolecie (UV) wykrywa się za pomocą lampy emitującej w krótkofalowym zakresie UV. Biologicznie nieczynne i nie absorbujące w UV materiały wykrywa się przez spryskiwanie odczynnikami nadmanganian-nadjodan. Bioaktywne materiały nukleotydowe wykrywa się bioautograficznie na agarze posianym *S. lutea*.

Sposoby fermentacji i oczyszczania są przedstawione w przykładach. Stosując postępowanie z tych przykładów można otrzymać 3-rybonukleotydy związków o wzorze 10.

Ponieważ związki wytwarzane sposobem według wynalazku są aktywne wobec różnych mikroorganizmów Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, można je stosować w różnych środowiskach do inhibowania rozwoju takich bakterii. Przykładowo, można je stosować jako środki dezynfekujące do inhibowania *S. aureus* na mytych i przechowywanych naczyniach do sporządzania produktów żywnościowych zakażonych tą bakterią.

Można je również stosować jako środki dezynfekujące do różnych narzędzi dentystycznych i lekarskich zakażonych *S. aureus*. Ponadto, wytwarzane sposobem według wynalazku związki mogą być stosowane jako bakteriostatyczne kąpiele płuczące w praniu odzieży i do impregnacji papieru i tkanin. Są one również użyteczne w powstrzymywaniu wzrostu wrażliwych organizmów w oznaczeniach na płytkach i w innych środowiskach mikrobiologicznych.

Omawiane związki są użyteczne w leczeniu schorzeń wywołanych mikroorganizmami rodzaju *Mycoplasma*. Najbardziej znanymi z nich są PPLO (organizmy podobne do pleuropneumonia), takie jak *M. hominis*, *M. salivarium*, *M. mycoides*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinae*, *M. gallisepticum*, *M. arthritis* i inne gatunki u człowieka i zwierząt, w tym zwierząt domowych, jak owce, psy, bydło, świnię i drób (np. kurczęta, indyki, kaczki i gęsi) i zwierząt laboratoryjnych (np. szczury i myszy).

3-(5-rybonukleotydy) związku o wzorze 4, w którym R oznacza grupy o wzorach 5-8 można stosować w leczeniu zakażeń nerek i innych organów gdy obecne są postacie L bakterii gram-ujemnych i gram-dodatnich, np. postacie L bakterii *P. mirabilis*.

Ponadto związki wytwarzane sposobem według wynalazku mogą być stosowane w profilaktyce i leczeniu pacjentów zakażonych pierwotniakami.

Przykładowo, gdy pierwotniakiem jest pasożyt malaryczny, obiektem leczonym może być zwierzę, np. mysz zakażona *Plasmodium berghei*; ptaki, np. kaczki zakażone *P. lophurae* lub kurczęta zakażone *P. gallinaceum*, oraz ssaki, jak naczelnie, np. małpy zakażone *P. cynomolgi* i ludzie zakażeni *P. falciparum*, *P. vivax* i *P. malariae*.

Podawaniem związków wytworzonych sposobem według wynalazku można leczyć ssaki, nosicieli pasożytniczych pierwotniaków klasy Sporozoa rzędu Coccidia (mikropasożyt wywołujący chorobę kokcydiozę).

Przykładowo, takiemu leczeniu można poddawać bydło zakażone *Eimeria zurnii*, *E. bovis*, *E. ellipsoidalis*, owce i kozy, z *E. parva*, *E. faursi*, świnię z *E. deblickei*, *E. scabra* i *Isospora suis*, psy i koty z *Isospora bigemina*, *I. felis*, *E. canis*, *E. felina*, drób z *E. tenella*, króliki z *E. stiedae*, *W. perforans*; oraz norki z *E. mustalae*.

Innymi pierwotnikami, jakie można zwalczać przy użyciu związków wytwarzanych sposobem według wynalazku są pasożyty wewnątrzkomórkowe, np. gatunki *Plasmodia*, *Toxoplasma* i *Leishma-*

nia; pierwotniaki trawiące czerwone komórki krwi (RBC) leczonych pacjentów, np. *Entamoeba histolytica* i pewne *Trypanosoma*; oraz robaki pasożytnicze trawiące RBC w procesach chorobowych, np. *Schistosomes*.

Związki wytwarzane sposobem według wynalazku stosowane jako czynniki przeciwbakteryjne sporządza się w postaci kompozycji, w postaci odpowiedniej do podawania ludziom i zwierzętom, takiej jak tabletki, kapsułki, pigułki, proszki, granulki, sterylne roztwory lub zawiesiny pozajelitowe lub roztwory, zawiesiny i emulsje doustne olej-woda, zawierające odpowiednie ilości związku czynnego w postaci wolnej zasady lub jej farmakologicznie dopuszczalnej soli.

Do podawania doustnego można stosować postacie stałe lub płynne. W celu sporządzenia kompozycji stałych, takich jak tabletki, podstawowy składnik czynny miesza się z konwencjonalnymi substancjami pomocniczymi, jak talk, stearynian magnezu, fosforan dwuwapniowy, glinokrzemian magnezu, siarczan wapnia, skrobia, laktoza, guma arabska, metyloceluloza i funkcjonalnie podobne materiały stanowiące farmaceutyczne rozpuszczalniki lub nośniki.

Tabletki można laminować lub inaczej formować, otrzymując lek o przedłużonym lub opóźnionym działaniu lub o określonej kolejności działania substancji czynnych. Przykładowo, tabletki może zawierać składnik wewnętrzny i zewnętrzny, ten drugi w postaci powłoki na pierwszym. Oba składniki można rozdzielić warstwą zwaną jelitową, której zadaniem jest przeciwdziałanie dezintegracji w żołądku i umożliwienie przejścia składnika wewnętrznego w stanie nienaruszonym do dwunastnicy, lub opóźnienie wydzielania substancji czynnej. Na takie warstwy lub powłoki jelitowe można stosować różnorodne materiały, w tym polimeryczne kwasy lub mieszaniny polimerycznych kwasów z materiałami takimi jak szelak, alkohol cetylowy, octanofalan celulozy, kopolimer styrenu i kwasu maleinowego i podobne.

Alternatywnie, układ dwuskładnikowy można stosować do wytwarzania tabletek zawierających dwa lub więcej składników czynnych, których nie można mieszać ze sobą. W taki sam sposób jak tabletki sporządza się opłatki, które różnią się jedynie kształtem i zawartością sacharozy lub innych substancji słodzących i smakowo-zapachowych.

W najprostszym wykonaniu, kapsułki, podobnie jak tabletki, sporządza się przez zmieszanie związku czynnego z obojętnym nośnikiem farmaceutycznym i rozsypanie mieszaniny do kapsulek z twardej żelatyny o odpowiedniej wielkości.

W innym wykonaniu, kapsułki sporządza się przez napełnienie kapsulek z twardej żelatyny powleczonymi polimerycznym kwasem kuleczkami zawierającymi związek czynny. Kapsułki z miękkiej żelatyny sporządza się przez maszynowe kapsułkowanie zawiesiny związku czynnego w odpowiednim oleju roślinnym, ciekłej wazelinie lub innym obojętnym oleju.

Można również sporządzać leki w postaci płynnej do podawania doustnego, jak syropy, eliksiry i zawiesiny. Rozpuszczalne w wodzie postacie związku

można rozpuścić w wodnym nośniku, łącznie z cukrem, aromatycznymi czynnikami zapachowymi i środkami konserwującymi, z wytworzeniem syropu. Eliksir sporządza się stosując nośnik alkoholowy (etanol) z odpowiednimi czynnikami słodzącymi, jak sacharoza i aromatyczne środki zapachowe.

Zawiesiny można sporządzać z nierozpuszczalnych postaci związku i nośnika oraz czynnika zawieszającego, jak guma arabska, tragakant, metyloceluloza i podobne.

Maście do stosowania miejscowego można sporządzać przez rozprowadzenie związku czynnego w odpowiedniej bazie maści, takiej jak wazelina, lanolina, glikole polietylenowe, ich mieszaniny i podobne. Korzystnie, związek miało rozdrabnia się w młynie koloidalnym, w pierw w ciekłej wazelinie, a następnie w bazie maści. Kremy i płyny do stosowania miejscowego sporządza się przez rozprowadzenie związku w fazie olejowej i następną zemulgowanie fazy olejowej w wodzie.

Do stosowania pozajelitowego sporządza się płynne postacie leku ze związku czynnego i sterylnego nośnika, korzystnie wody. Związek czynny można, zależnie od jego postaci i stężenia, zawieszać lub rozpuszczać w nośniku. Przy sporządzaniu roztworów, rozpuszczalną w wodzie postać związku można rozpuścić w wodzie do iniekcji i wysterylizować przez sączenie, a następnie rozlać do odpowiednich fiolek lub ampulek i zamknąć je.

Korzystnie, w nośniku można rozpuścić substancje pomocnicze, jak środki znieczulające o działaniu miejscowym, środki konserwujące i czynniki buforujące. Dla zwiększenia trwałości, kompozycje można po rozlanu do ampulek zamrozić i pod zmniejszonym ciśnieniem usunąć wodę. Suchy liofilizowany proszek zamyka się następnie w fiolce, a do fiolki dołącza wodę do iniekcji, w której rozpuszcza się preparat przed użyciem.

W zasadniczo taki sam sposób sporządza się zawiesiny pazajelitowe, z tym, że zamiast rozpuścić, związek zawieszają się w nośniku, a sterylizacji nie można dokonać przez sączenie. Można sterylizować związek przez wystawienie go na działanie tlenu etylenu, przed zawieszeniem w sterylnym nośniku. Dla uzyskania czynności przedłużonej, sporządza się zawiesinę domięśniową ze związku w postaci nierozpuszczalnej, jak eter trójmetrylosililowy lub sól kwasu pamowego. Korzystnie jest dodać do kompozycji środki powierzchniowo czynny lub zwilżający, ułatwiający równomierne rozprowadzenie związku.

Do leczenia systemowego sporządza się dawki jednostkowe, które zawierają 10, 25, 50, 100, 250 lub 500 mg związku czynnego, a do leczenia pozajelitowego kompozycje o stężeniach 15—65% objętościowo.

Poniższy przykład ilustruje wytwarzanie 3-(5'-rybonukleotydu) związku oznaczonego symbolem U-57930, to jest wytwarzanie związku o wzorze 4, w którym R oznacza grupę o wzorze 5, 6, 7 lub 8. Rybonukleotydy te stanowią pochodne kwasu adenylowego, cytydylowego, guanylowego lub urylowego. W taki sam sposób sporządza się 3-(5'-rybo-

nukleotydy) związku oznaczonego symbolem U-60970, tj. amidu kwasu 4-cis-n-butylo-L-pipekolowego i 7-Cl metyloliolinkozyamidyny, wytwarzanego sposobem według opisu patentowego Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 4 278 789, którego 3-(5'-rybonukleotydy wykazują takie same działanie jak rybonukleotydy związku oznaczonego symbolem U-57930.

Jeśli nie zaznaczono inaczej % w poniższym przykładzie oznaczają % wagowe a proporcje mieszanin rozpuszczalników wyrażone są objętościowo.

Przykład A. Fermentacja.

Streptomyces rochei, NRRL 3533 hodowano w pożywce zawierającej 10 g/litr glukozy, 4 g/litr peptonu Difco, 4 g/litr ekstraktu z drożdży Difco, 0,5 g/litr $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2,0 g/litr KH_2PO_4 , 4 g/litr H_2HPO_4 , przez 3 dni w temperaturze 28°C, na wstrząsarce obrotowej. Grzybnię z tej hodowli stosowano do inokulacji pożywki fermentacyjnej zawierającej te same składniki.

Fermentację prowadzono przez 48 godzin w temperaturze 28°C na wstrząsarce obrotowej. Po zakończeniu 48 godzinnej inkubacji dodano U-57930 do końcowego stężenia 50 mg/litr i kontynuowano fermentację w temperaturze 32°C. Po upływie 12 godzin dodano dalsze ilości U-57930, do sumarycznego stężenia 150 mg/litr.

Po dalszych 12 godzinach zwiększono stężenie U-57930 do 250 mg/litr. Po ostatnim dodaniu U-57930 kontynuowano fermentację w temperaturze 32°C w ciągu 24 godzin. Po upływie tego czasu zebrano przesącz z hodowli, stwierdzając, że zawierają one nie więcej niż 1 mg U-57930 w litrze. Pozostałe 249 mg/litr uległo przemianom w materiał biologicznie nieaktywny.

S. rochei NRRL 3533 jest znanym mikroorganizmem ogólnie dostępnym w zbiorach NRRL, pod adresem Northern Utilization and Research Division, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Ill., USA.

B. Izolowanie i oczyszczanie.

Izolowanie 3-rybonukleotydów U-57930 z brzezki fermentacyjnej.

Adsorpcja na Amberlite XAD-2: Brzezki fermentacyjną (około 12 litrów) zawierającą 3 g nie wykazującego aktywności U-57930 przesączono przy pH 7,7, stosując pomocniczy materiał filtracyjny. Placok grzybni przemyto 1,2 litra wody i odrzucono. Klarowny przesącz i popłuczyny połączone, doprowadzono do pH 6,0 i przepuszczono przez kolumnę z 600 ml Amberlite XAD-2 (Rohm Haas Co., Philadelphia, PA) z szybkością przepływu 40 ml/minutę. Wyciek z kolumny zbadano na aktywność biologiczną przed i po traktowaniu fosfatą alkaliczną i odrzucono.

Kolumnę przemyto 2 litrami wody. Popłuczyny wodne, które były również biologicznie nieaktywne przed i po traktowaniu fosfatą alkaliczną, odrzucono. Następnie kolumnę eluowano metanolem -- wodą (70:30 obj./obj). Odbierano frakcje 20 ml, z szybkością 20 ml/minutę. Oznaczenia czynności biologicznej przed (-E) i po (+E) traktowaniu fosfatą alkaliczną dały następujące wyniki:

Fracja No.	Strefa (S. lutea)	
	-E	+E
5	0	0
10	0	0
11	0	0
13	0	36
20	33	55
25	32	54
40	31	50
45	29	48
50	26	39
55	23	38
60	21	37
65	19	27
70	17	26
75	17	26
80	16	26
85	16	26
90	16	26
95	16	26
100	16	26
110	16	21
120	15	21
130	15	21
140	15	21
150	15	21
160	15	21
170	15	21
180	15	21
190	15	21
200	15	21

Fracje 12—80 połączono, odparowano do roztworu wodnego i liofilizowano, otrzymując 12,22 g preparatu ADA-34.1.

W innej serii prób, 6 litrów brzezki fermentacyjnej zawierającej 2 g nie wykazującego aktywności U-57930 traktowano tak jak opisano powyżej. Metanolowe eluaty z kolumny z Amberlite XAD-2 przechowywano jako ADA-1438. Tego roztworu nie odparowano do sucha, natomiast oczyszczano chromatograficznie na żywicy Dowex-1, jak opisano poniżej.

Chromatografia na Dowex-1. Kolumnę przygotowano z 300 ml Dowex-1 (X-4) w postaci octanowej. Przez kolumnę przepuszczono metanolowy roztwór ADA-1438 o pH 8,2. Wyciek odbierano z szybkością 2,5 ml/minuta we frakcjach objętości 20 ml. (Fracja 1—60). Kolumnę przemyto 1,5 litra wody (10 ml/minutę, frakcje 66—108). Następnie eluowano kolumnę 5% kwasem octowym (z szybkością

10 ml/minutę; frakcje 109—310). Frakcje łączono w następujące zbiory:

5	zbiór 1	frakcja 1—80	1000 ml (ADA-1A)
	2	frakcje 81—110	600 ml (ADA-2A)
	3	frakcje 111—130	450 ml (ADA-3A)
	4	frakcje 131—150	450 ml (ADA-4A)
	5	frakcje 151—190	900 ml (ADA-5A)
	6	frakcje 191—230	900 ml (ADA-6A)
10	7	frakcje 231—270	900 ml (ADA-7A)
	8	frakcje 271—310	900 ml (ADA-8A).

Oznaczenia przed (-E) i po (+E) traktowaniu fosfatazą alkaliczną dały następujące wyniki:

	Strefa (S. lutea)		
	-E	+E	
15	zbiór 1	31	52
	2	36	49
20	3	34	45
	4	18	40
	5	25	30
25	6	27	29
	7	27	29
	8	29	31

30 Zbiory 1 i 2 połączono, odparowano do roztworu wodnego i liofilizowano, otrzymując 1,48 g preparatu ADA-2.1.

35 Zbiory 3 i 4 również połączono i traktowano podobnie, otrzymując 2,5 g preparatu ADA-2.2.

Po potraktowaniu fosfatazą alkaliczną z preparatów ADA-2.1 i ADA-2.2 otrzymano U-57930.

40 Preparaty ADA-34.1, ADA-2.1 i ADA-2.2 połączono i oczyszczono niżej opisanym sposobem dwukrotnego rozdziału przeciwprądowego.

45 Dwukrotny rozdział przeciwprądowy: 16,20 g materiału otrzymanego przez połączenie preparatów ADA-34.1, -2.1 i -2.2, rozpuszczono w 25 ml każdej z faz układu rozpuszczalników składającego się z jednakowych objętości butanolu-1 i wody (1:1). Roztwory dodano do centralnych probówek wykonanego całkowicie ze szkła aparatu do podwójnego rozdziału przeciwprądowego (100 probówek, 25 ml/faza).

50 Rozdział oznaczano, po 150 przeniesieniach, na aktywność biologiczną przed (-E) i po (+E) traktowaniu fosfatazą alkaliczną. Wyniki były następujące:

Dolny kolektor	Strefa (S. lutea — wrażliwa)		
	-E	+E	
55	1	2	3
	5	29	31
60	10	31	33
	15	30	33
	20	27	33
65	25	22	33

1	2	3	
30	17	34	
35	0	34	
40	0	33,5	
45	0	33	
50	0	34	
55	0	34	
60	0	35	
65	0	36	
70	0	38	
75	0	39	
80	0	40	
85	0	41	
90	0	42	
95	0	43	
100	0	43,5	
Dolna maszyna	Strefa (S. lutea — wrażliwa)		
	-E	+E	
50	0	45	
45	śląd	46	
40	15	47	
35	17	47,5	
30	17	47	
25	18	47	
20	17,5	48	
15	17	48	
10	16	48	
5	15	50	
0	śląd	50	
Górna maszyna	śląd	49	
	10	śląd	48,5
	15	śląd	48
	20	śląd	48,5
	25	śląd	49
	30	30	50
	35	śląd	51
	40	15	52
	45	16	53
	0	21	54
Górny kolektor	Strefa (S. lutea — wrażliwa)		
	-E	+E	
100	17,5	54	
95	17	53,5	
90	19	53,5	

	1	2	3
	85	20	53,5
5	80	21	53,5
	75	22	53,5
	70	24	53,5
10	65	26	53,5
	60	28	53,5
	55	30	52,5
	50	32,5	52
15	45	33	52
	40	35	52
	35	36	52
20	30	39	49
	25	41	47
	20	43	48
	15	43	46
25	10	43	43
	5	35	35

Sporządzono niżej podane zbiory. Każdy zbiór odparowano do wodnego roztworu i liofilizowano, otrzymując odpowiednie preparaty.

Zbiór I: dolny kolektor 1—50;

Zbiór II: dolny kolektor 51—100; dolna maszyna 50—30;

Zbiór III: dolna maszyna 29—0; górna maszyna 1—50; górny kolektor 100—30.

Otrzymano następujące preparaty:

Ze zbioru I preparat ADA-47.1 w ilości 9,78 g

Ze zbioru II preparat ADA-47.2 w ilości 0,30 g

Ze zbioru III preparat ADA-47.3 w ilości 5,29 g.

Preparaty ADA-47.2 i -47.3 połączono i oczyszczano chromatograficznie na nośniku DEAE-Sephadex: 300 g DEAE-Sephadex (A-25) mieszano przez 1 godzinę z wodą i przez 2 godziny z 0,5 n wodnym roztworem wodorotlenku sodu. Jonit przemysłowo wodą aż uzyskano pH około 7,5. Materiał ten następnie mieszano w ciągu 2 godzin z 0,5 n wodnym kwasem octowym, przemyto wodą do odczynu obojętnego, wiano do kolumny i upakowano pod naciskiem około 0,9 kg stałej wysokości.

Kolumnę przemyto 4 litrami wody, 8 litrami 0,1% wodnego roztworu tris-(hydroksymetylo) aminometanu (THAM) i 3 litrami buforu 0,03 m buforu octanowego THAM o pH 8,0 (sporządzonego przez rozpuszczenie 3,64 g THAM w 800 ml wody, doprowadzenie za pomocą lodowatego kwasu octowego do pH 8,0 i uzupełnienie objętości do 1 litra).

Materiał wyjściowy, preparaty ADA-47.2 i ADA-47.3 w ilości około 5,50 g rozpuszczono w 20 ml 0,03 m buforu octanowego THAM o pH 8,0 i podano na górę kolumny. Kolumnę eluowano następnie od góry 0,3 m buforem octanowym THAM o pH 8,0. Zbierano frakcje 1—190 (20 ml). W tym punkcie rozpoczęto eluację kolumny od dołu ku górze. Zbierano frakcje A, B, C, D i E (po litrze

objętości). Oznaczenia aktywności biologicznej przed (-E) i po (+E) traktowaniu fosfatazą alkaliczną dały następujące wyniki:

Fracja No. —	Strefa (S. lutea — wrażliwa)	
	-E	+E
3	0	0
6	0	0
9	0	0
12	0	0
15	0	0
18	0	0
21	0	0
24	0	0
27	0	0
30	0	0
33	0	0
36	38	39
39	43,5	44
42	36	36
45	23,5	23
48	15	16
51	0	0
54	0	0
57	0	0
60	0	0
63	0	0
66	0	0
69	15	16
72	17	20
75	21	26
78	23	27
81	23	30
84	23	29
87	22	24
90	21	23
93	21	24
96	22	26
99	21	35
102	22	44
105	23	51
108	22,5	54
111	22,5	52,5
114	22	52
117	22	54,5
120	20,5	56
123	20	56

Sporządzono następujące zbiory:

Zbiór I frakcje 34—38, 280 ml (ADA-69B)
 Zbiór II frakcje 75—90, 330 ml (ADA-69C)
 Zbiór III frakcje 101—111, 180 ml (ADA-69D)
 Zbiór IV frakcje 114—150, 580 ml (ADA-69E)
 Zbiór V frakcje 151—164, 100 ml (ADA-69F)

Zbiór VI frakcje 165—186, 125 ml (ADA-69G)

Zbiór VII frakcja C, litr (ADA-69A).

Zbiór I (ADA-69B) zawierał niezmienny U-57930 i został odrzucony.

5 Zbiór II (ADA-69C) zawierał nieznaną materię, z którego po potraktowaniu fosfatazą alkaliczną otrzymano U-57930. UV: λ_{\max} 275 nm.

10 Zbiór III (ADA-69D) zawierał cytydylan U-57930 i poddano go niżej opisanej obróbce UV: λ_{\max} 270 nm.

Zbiór IV (ADA-69E) zawierał adenylan U-57930; poddano go niżej opisanej obróbce. UV: λ_{\max} 260 nm.

15 Zbiór V (ADA-69F) zawierał mieszaninę adenylanu U-57930, urydylanu U-57930 i guanylanu U-57930. Roztwór poddano niżej opisanej obróbce.

Zbiór VI (ADA-69G) zawierał guanylan U-57930; poddano go niżej opisanej obróbce. UV: λ_{\max} 254, przegięcie przy 275.

20 Zbiór VII (ADA-69A) zawierał mieszaninę guanylanu U-57930 i urydylanu U-57930. Roztwór ten traktowano w sposób opisany poniżej.

25 Izolowanie zasadniczo czystego cytydylanu U-57930, adenylanu U-57930 i guanylanu U-57930 ze zbiorów odpowiednio III, IV i VI oraz usuwanie buforu octanowego THAM za pomocą chromatografii na Amberlite VAD-2 prowadzono następująco:

30 Zbiory III, IV, i VI otrzymane jak wyżej opisano przepuszczono przez kolumny zawierające Amberlite XAD-2. Wycieki odrzucono. Kolumny przemyto wodą i eluowano mieszaniną metanolu i wody (70:30). Frakcje analizowano w UV i oznaczano aktywność biologiczną przed i po traktowaniu fosfatazą alkaliczną. Odpowiednie frakcje połączono, odparowano do roztworu wodnego i liofilizowano. Dane dotyczące ilości Amberlite XAD-2 użytego dla każdego ze zbiorów, ilość wody płuczonej, ilości metanolowego eluatu i ilości uzyskanego materiału zestawiono w poniższej tabeli.

Zbiór	Użyty Amberlite XAD-2 (ml)	Woda płuczna (ml)	Eluat metanolowy (ml)	Wydzielony materiał (mg)
III	50	200	300	150
IV	200	800	600	3150
VI	50	200	300	470

55 Materiał uzyskany ze zbioru III przechowywano jako ADA-73.1; ze zbioru IV jako ADA-74.1; ze zbioru VI jako ADA-75.1.

60 Usuwanie buforu octanu THAM ze zbioru V (ADA-69F) i ze zbioru VII (ADA-69A) za pomocą chromatografii na Amberlite XAD-2: Kolumnę przygotowano z 300 ml Amberlite XAD-2. Przez kolumnę przepuszczono zbiory V i VII zawierające mieszaninę adenylanu U-57930, urydylanu U-57930 i guanylanu U-57930. Wycisk odrzucono. Kolumnę przemyto 600 ml wody.

65 Wycisk odrzucono. Kolumnę przemyto mieszaniną metanolu i wody (70:30). Frakcje dające ma-

teriał biologicznie czynny po traktowaniu fosfatazą alkaliczną połączono (300 ml), odparowano do roztworu wodnego i liofilizowano, otrzymując 670 mg preparatu ADA-71.1. Preparat ADA-71.1 poddano niżej opisanej obróbce.

Oddziaływanie urydylanu U-57930 od adenylanu U-57930 i guanylanu U-57930 za pomocą chromatografii na nośniku DEAE-Sephadex przeprowadzono następująco:

600 ml DEAE-Sephadex w postaci octanowej sporządzonego jak wyżej opisano, przemyto 0,03 m buforem octanowym THAM o pH 8,0 i upakowano w szklanej kolumnie (średnica wewnętrzna 4,5 cm, wysokość 40 cm), pod ciśnieniem hydrostatycznym.

Preparat ADA-71.1 rozpuszczono w 10 ml 0,03 buforu octanowego THAM o pH 8,0 wprowadzono na kolumnę od góry. Kolumnę eluowano kolejno:

1) 0,03 m buforem octanowym THAM o pH 8,0 (frakcje 1—79),

2) 0,12 m buforem octanowym THAM o pH 8,0 (frakcje 80—395),

3) 0,25 m buforem octanowym THAM o pH 8,0 (frakcje 396—750).

Zbierano frakcje objętości po 20 ml i analizowano w UV oraz oznaczając aktywność biologiczną przed i po traktowaniu fosfatazą alkaliczną. Frakcje 51—60 zawierały adenylan U-57930; frakcje 62—73 (ADA-94.B) zawierały urydylan U-57930; frakcje 75—110 zawierały guanylan U-57930.

Izolowanie zasadniczo czystego urydylanu U-57930. Usuwanie buforu octanowego THAM za pomocą chromatografii na Amberlite XAD-2.

Kolumnę przygotowano z 50 ml Amberlite XAD-2. Zbiór ADA-94B zawierający urydylan U-57930 przeprowadzono przez kolumnę z szybkością 2 ml/minuta. Wyciek odrzucono. Kolumnę przemyto 200 ml wody. Popłuczyny odrzucono. Kolumnę eluowano mieszaniną metanolu i wody (70:30) obj./obj. Frakcje zawierające (w UV) urydylan U-57930 połączono (200 ml), zateżono do roztworu wodnego i liofilizowano, otrzymując 60 mg ADA-95.1.

Charakterystyka 3-/5'-cytydylanu U-57930.

Widmo w podczerwieni. Pasma absorpcji (Nujol i KBr)

Pasmo	Nateżenie	Typ	Pasmo	Nateżenie	Typ
3417,3	24	przebiegięcie	1249,0	33	przebiegięcie
3341,1	19	szerokie	1214,3	21	średnie
3211,8	19	szerokie	1146,8	42	przebiegięcie
3108,6	25	szerokie	1089,9	15	szerokie
2951,4	2	szerokie M	1070,6	12	średnie
2926,3	1	szerokie M	1056,1	14	przebiegięcie
2854,9	2	szerokie M	992,4	39	średnie
2729,6	48	szerokie M	972,2	39	średnie
2693,9	51	przebiegięcie	955,8	49	przebiegięcie
2535,7	65	przebiegięcie	930,7	51	średnie
1649,3	8	średnie	889,2	36	średnie
1610,7	26	średnie	860,3	52	średnie
1575,0	35	średnie	849,7	53	średnie
1528,7	31	średnie	804,4	46	przebiegięcie
1489,2	23	średnie	788,9	40	średnie
1462,2	9	średnie M	721,4	44	średnie M
1404,3	41	szerokie	705,0	47	szerokie
1377,3	18	średnie M	654,9	45	przebiegięcie
1368,6	31	przebiegięcie M	632,7	38	średnie
1286,6	34	średnie			

Pasmo: częstotliwość w liczbie falowej (cm⁻¹)

Nateżenie: w % transmitancji (%T)

M: możliwa interferencja z oleju mineralnego

2. Widmo absorpcji w UV [λ_{\max} (Å)]
W wodzie przy:
pH 2,0 279 nm (6,5)
pH 7,0 270 nm (9,9)
pH 11,0 271 (9,6)
3. Skład pierwiastkowy dla wzoru sumarycznego
 $C_{26}H_{43}N_5O_{12}SClP$. Ciężar cząsteczkowy: 715
Obliczono %: C 43,64 H 6,01 N 9,79 O 26,88
S 4,47 Cl 4,89 P 4,33

4. Skręcalność optyczna
($-\alpha_D^{25} + 107^\circ/C$, 0,854, woda)

5. Rozpuszczalność.

Wysoco rozpuszczalny w wodzie, metanolu i etanolu. Słabo rozpuszczalny w acetonie i innych ketonach, octanie etylu i innych estrach, chloroformie, chlorku metylenu. Nierozpuszczalny w nasyconych rozpuszczalnikach węglowodorowych.

6. Czynność przeciwbakteryjna.

3-(5'-cytydylan)U-57930 nie jest aktywny in vitro. Jednakże traktowanie fosfatą alkaliczną lub fosfodwuesterazą I daje U-57930, który jest wysoce

aktywny wobec różnych organizmów G^+ , zarówno in vitro jak i in vivo.

7. Temperatura topnienia: 205—207°C (z rozkładem)
Charakterystyka 3-(5'-adenylanu) U-57930.

25 najsilniejszych pików

%T	częstotliwość	%T	częstotliwość
1	2	3	4
2	2924,3	22	1684,0
3	2954,2	24	1377,2
4	2854,8	24	1245,0
6	2868,3	28	1600,0
10	1069,5	31	1576,0
13	1089,8	31	635,5
13	1055,0	32	889,1

1. Widmo w podczerwieni. Pasma absorpcji (Nujol i KBr)

Pasmo	Natężenie	Typ	Pasmo	Natężenie	Typ
3335,3	16	sz szerokie	1245,1	24	przebieganie
3267,8	17	sz szerokie	1213,3	17	średnie
3210,8	17	sz szerokie	1175,7	43	przebieganie
2954,3	3	sz szerokie M	1146,8	40	przebieganie
2924,4	2	sz szerokie M	1089,9	13	średnie
2868,4	6	przebieganie M	1069,6	10	średnie
2854,9	4	średnie M	1055,1	13	przebieganie
2727,6	46	sz szerokie M	991,5	35	średnie
2520,2	61	sz szerokie	972,2	36	średnie
1684,0	22	przebieganie	957,7	45	przebieganie
1641,6	14	średnie	930,7	48	średnie
1600,1	28	średnie	889,2	32	średnie
1576,0	31	średnie	861,3	47	średnie
1550,9	43	przebieganie	848,7	49	średnie
1509,4	53	przebieganie	818,8	45	średnie
1463,1	15	średnie M	798,6	40	średnie
1420,7	35	średnie	722,4	36	średnie m
1377,3	24	średnie M	708,9	40	przebieganie
1367,6	35	przebieganie M	647,1	33	przebieganie
1332,0	36	średnie	635,6	31	średnie
1299,2	34	średnie			

Pasmo: częstotliwość w liczbie falowej (cm^{-1})

Natężenie: w % transmitancji (%T)

M: możliwa interferencja z oleju mineralnego

1	2	3	4
14	1641,5	33	647,0
15	1463,0	34	1299,1
16	3335,2	35	1420,6
17	3267,7	35	1367,5
17	3210,7	35	991,5
17	1213,2		

Preparat: zawiesina w oleju mineralnym

Max %T: 85 przy 1864,4

%T przy 3800 (cm⁻¹): 81

Gęstość (cm⁻¹/pt): 0,964

25 najsilniejszych pików

5	%T	częstotliwość	%T	częstotliwość
	1	2	3	4
	5	1069,5	23	1576,0
	7	3375,7	24	889,1
10	7	1643,5	25	522,6
	8	1090,7	25	503,3
	8	1050,2	26	648,0
	10	3223,3	26	636,5
15	12	1215,1	26	571,8

Pasmo	Natę- żenie	T y p	Pasmo	Natę- żenie	T y p
3375,8	7	szerokie	1090,8	8	średnie
3223,4	10	szerokie	1069,6	5	średnie
3124,0	17	przegięcie	1050,3	8	przegięcie
2963,0	22	średnie	990,5	27	średnie
2929,2	22	szerokie	972,2	29	średnie
2878,1	31	średnie	956,8	38	przegięcie
2863,6	33	przegięcie	929,8	42	średnie
2756,6	45	szerokie	889,2	24	średnie
2521,2	60	szerokie	861,3	38	średnie
2188,5	75	szerokie	851,6	40	przegięcie
1678,2	16	przegięcie	818,8	36	średnie
1645,5	7	średnie	807,3	36	szerokie
1602,0	20	średnie	798,6	30	średnie
1576,0	23	średnie	768,7	41	szerokie
1553,8	35	przegięcie	721,4	30	średnie
1511,4	49	przegięcie	706,9	31	szerokie
1475,7	27	średnie	648,1	26	średnie
1421,7	29	średnie	636,5	26	średnie
1384,0	32	średnie	584,5	28	przegięcie
1322,0	31	średnie	571,9	26	średnie
1301,1	28	średnie	533,3	27	przegięcie
1246,1	19	przegięcie	522,7	25	średnie
1215,2	12	średnie	503,4	25	średnie
1176,7	36	przegięcie			

Pasmo: częstotliwość w liczbie falowej (cm⁻¹)

Natężenie: w % transmitancji (%T)

1	2	3	4
15	1678,1	27	1475,6
17	3124,0	27	990,5
19	1246,0	27	533,2
20	1602,0	28	1301,0
22	2963,0	28	584,5
22			

Preparat: pastylka KBr
 Max %T: 95 przy 405,0
 %T przy 4000 (cm⁻¹): 77
 Gęstość (cm⁻¹/pt): 0,964

2. Widmo absorpcji w UV [λ_{\max} (a)]

w wodzie przy:

pH 2,0 258 nm (16,0)

pH 7,0 261 nm (16,5)

pH 11,0 261 nm (16,0)

3. Skład pierwiastkowy dla wzoru sumarycznego

C₂₇H₄₃N₇O₁₀·SCIP.

Ciężar cząsteczkowy: 723.

obliczono: C 44,81 H 5,94 N 13,55 O 22,13

S 4,42 Cl 4,84 P 4,28

znaleziono: N 12,87 S 5,39 Cl 4,76 P 3,83

4. Skręcalność optyczna

[α]_D²⁵ + 94° (0,887, woda)

5. Rozpuszczalność

Wysoco rozpuszczalny w wodzie, metanolu i etanolu. Słabo rozpuszczalny w acetonie i innych ketonach, octanie etylu i innych estrach, chloroformie i chlorku metylenu. nierozpuszczalny w nasyconych rozpuszczalnikach węglowodorowych.

6. Czynność przeciwbakteryjna.

3-(5'-adenylan) U-57930 nie jest aktywny in vitro. Jednakże działanie fosfatazą alkaliczną lub fosfodwuesterazą I daje U-57930, który jest wysoco aktywny wobec różnych organizmów G⁺, zarówno in vitro jak i in vivo. Stwierdzono, że 3-(5'-adenylan) U-57930 jest aktywny in vivo (podskórnie, mysz), CD₅₀ = 0,62 (0,48—0,79) mg/kg wobec S.pyogonas.

7. Temperatura topnienia: 203,5—205° (z rozkładem).

Charakterystyka 3(5'-urydylanu) U-57930.

1. Widmo w podczerwieni. Pasma absorpcji (Nujol i KBr).

Pasmo	Natężenie	Typ	Pasmo	Natężenie	Typ
3330,4	19	szerokie	1332,9	44	szerokie
3224,4	21	szerokie	1296,3	40	przebieganie
2952,4	1	szerokie M	1251,9	28	szerokie
2924,4	0	szerokie M	1215,2	19	średnie
2867,5	4	przebieganie	1089,9	13	średnie
2854,0	3	średnie M	1071,5	9	średnie
2733,4	49	przebieganie M	1056,1	13	przebieganie
2695,8	53	przebieganie	991,5	39	średnie
2532,8	67	przebieganie	973,2	39	średnie
1757,3	73	przebieganie	957,7	48	przebieganie
1685,9	8	średnie	931,7	49	średnie
1647,4	21	przebieganie	890,2	34	średnie
1602,0	41	średnie	858,4	50	średnie
1574,1	42	średnie	813,0	43	średnie
1555,7	43	szerokie	798,6	47	średnie
1462,2	12	średnie M	767,7	50	średnie
1425,5	37	przebieganie	721,4	42	średnie M
1378,3	22	średnie M	634,6	35	średnie
1367,6	37	przebieganie M			

Pasmo: częstotliwość w liczbie falowej (cm⁻¹)

Natężenie: w % transmitancji (%T)

Ta lista pików nie jest wydana

M: możliwa interferencja z olejem mineralnym

25 najsilniejszych pików

%T	częstotliwość	%T	częstotliwość
0	2924,3	22	1378,2
1	2952,3	28	1251,8
3	2854,0	34	890,1
4	2867,5	35	634,5
8	1685,8	37	1425,5
9	1071,5	37	1367,5
12	1462,1	39	991,5
13	1089,8	39	973,1
13	1056,0	40	1296,2
19	3330,3	41	1602,0
19	1215,1	42	1574,0
21	3224,3	42	721,3
21	1647,3		

Preparat: zawiesina w oleju mineralnym
 Max %T: 86 przy 3764,5
 %T przy 3800 (cm⁻¹): 85
 Gęstość (cm⁻¹/pt): 0,964

25 najsilniejszych pików

	%T	częstotliwość	%T	częstotliwość
5	6	1685,0	32	1384,0
	7	1070,5	34	567,0
	10	1090,7	35	1605,8
	10	1055,0	35	1423,5
10	12	3387,3	35	992,3
	17	1647,3	35	523,6
	17	1214,2	36	2879,0
	24	1255,7	36	973,1
	25	3114,3	37	1576,0
15	26	2962,0	37	634,5
	26	2931,0	38	2863,5
	31	1463,0	38	1297,1
	31	889,1		

20 Preparat: pastylka KBr
 Max %T: 101 przy 405,0
 %T przy 4000 (cm⁻¹): 76
 Gęstość (cm⁻¹/pt): 0,964

Pasmo	Nateżenie	Typ	Pasmo	Nateżenie	Typ
3387,4	12	szerokie	1055,1	10	przegięcie
3114,4	25	przegięcie	992,4	35	średnie
2962,0	26	średnie	973,2	36	średnie
2931,1	26	szerokie	956,8	45	przegięcie
2879,1	36	średnie	929,8	48	średnie
2863,6	38	przegięcie	889,2	31	średnie
2833,7	43	przegięcie	859,3	46	średnie
2509,6	64	szerokie	813,0	40	średnie
1685,0	6	szerokie	811,1	40	przegięcie
1646,4	17	przegięcie	798,6	43	średnie
1605,9	35	przegięcie	782,2	48	szerokie
1576,0	37	średnie	768,7	48	średnie
1556,7	39	szerokie	707,9	43	średnie
1463,1	31	średnie	669,3	43	przegięcie
1423,6	35	średnie	649,1	40	przegięcie
1384,0	32	średnie	634,6	37	średnie
1331,0	43	średnie	585,4	38	przegięcie
1297,2	38	przegięcie	567,1	34	średnie
1255,8	24	średnie	523,7	35	średnie
1214,3	17	średnie	447,5	39	średnie
1090,8	10	średnie			
1070,6	7	średnie			

Pasmo: częstotliwość w liczbie falowej (cm⁻¹)
 Nateżenie: w % transmitancji (%T)

2. Widmo absorpcji w UV [λ_{\max} (a)]

W wodzie przy:

pH 2,0 261 nm (11,5)

pH 7,0 262 nm (10,7)

pH 11,0 262 nm (11,5)

3. Skład pierwiastkowy dla wzoru sumarycznego

 $C_{26}H_{42}N_4O_{13}SClP$. Ciężar cząsteczkowy: 716.

Obliczono: O 43,57 H 5,86 N 7,82 O 29,05

S 4,46 Cl 4,89 P 4,33

4. Skręcalność optyczna

 $[\alpha]_D^{25} + 105^\circ$ (o, 0,94, woda)

5. Rozpuszczalność.

Wysoce rozpuszczalny w wodzie, metanolu i etanolu. Słabo rozpuszczalny w acetonie i innych ketonach, octanie etylu i innych estrach, chloroformie i chlorku metylenu. nierozpuszczalny w nasyconych rozpuszczalnikach węglowodorowych.

6. Czynność przeciwbakteryjna.

3-(5'-urydylan) U-57930 nie jest aktywny in vitro. Jednakże działanie fosfatazą alkaliczną lub fosfodwuesterazą I daje U-57930, który jest wysoce aktywny wobec różnych organizmów G^+ , zarówno in vitro jak i in vivo.

7. Temperatura topnienia: 202—203° (z rozkładem).

Charakterystyka 3-(5'-quanylanu) U-57930.

1. Widmo w podczerwieni. Pasma absorpcji (Nujol i KBr)

Pasmo	Natężenie	Typ	Pasmo	Natężenie	Typ
3335,3	16	szerokie	1250,0	36	przebiegięcie
3227,2	19	szerokie	1213,3	21	średnie
2953,3	2	średnie M	1173,8	39	średnie
2925,3	1	szerokie M	1149,7	41	średnie
2868,4	6	przebiegięcie M	1087,9	14	przebiegięcie
2855,9	4	średnie M	1071,5	9	średnie
2737,3	51	szerokie M	991,5	42	średnie
2521,2	73	szerokie	962,2	42	średnie
1684,0	6	średnie	956,8	52	przebiegięcie
1635,8	11	średnie	929,8	51	średnie
1598,2	21	średnie	890,2	36	średnie
1572,1	26	średnie	860,3	51	średnie
1534,5	34	średnie	800,5	46	średnie
1462,2	18	średnie M	783,1	42	ostre
1414,9	44	średnie	720,4	43	średnie M
1377,3	24	średnie M	707,9	45	szerokie
1365,7	31	średnie	681,9	40	średnie
1312,7	44	średnie	635,6	34	średnie

Pasmo: częstotliwości w liczbie falowej (cm^{-1})

Natężenie: w % transmitancji (%T)

M: możliwa interferencja z oleju mineralnego

25 najsilniejszych pików

%T	częstotliwość	%T	częstotliwość
1	2925,2	24	1377,2
2	2953,2	26	1572,0
4	2855,8	31	1365,8
6	2868,3	34	1534,5
6	1684,0	34	635,5
9	1071,5	36	1250,0
11	1635,7	36	890,1
14	1087,8	39	1173,7
16	3335,2	40	681,8
18	1462,1	41	1149,6
19	3227,1	42	991,5
21	1598,1	42	972,1
21	1213,2		

Preparat: zawiesina w oleju mineralnym

Max %T: 97 przy 3762,6

%T przy 3800 (cm⁻¹): 97Gęstość (cm⁻¹/pt): 0,964

25 najsilniejszych pików

	%T	częstotliwość	%T	częstotliwość
5	4	1683,0	29	1384,0
	6	1634,7	29	1250,8
	6	1070,5	30	1359,8
	9	3380,5	30	502,5
10	9	1088,8	31	2878,0
	13	3234,0	31	1174,6
	14	1598,1	31	635,5
	16	1213,2	31	523,6
	19	1571,1	32	783,0
15	21	2929,1	32	571,8
	22	2963,0	33	2862,6
	26	1534,5	33	1147,6
	28	889,1		

20 Preparat: pastylka KBr

Max %T: 97 przy 405,0

%T przy 4000 (cm⁻¹): 77Gęstość (cm⁻¹/pt): 0,964

Pasmo	Nateżenie	Typ	Pasmo	Nateżenie	Typ
3380,6	9	szerokie	1174,7	31	średnie
3234,0	13	szerokie	1147,7	33	szerokie
2963,0	22	średnie	1088,9	9	szerokie
2929,2	21	szerokie	1070,6	6	średnie
2878,1	31	średnie	991,5	33	średnie
2862,7	33	przegięcie	972,2	34	średnie
2744,0	44	szerokie	956,8	43	przegięcie
2522,2	61	szerokie	929,8	44	średnie
1683,0	4	szerokie	889,2	28	średnie
1634,8	6	średnie	860,3	41	średnie
1598,2	14	średnie	800,5	36	średnie
1571,2	19	średnie	783,1	32	średnie
1534,5	26	średnie	715,6	38	przegięcie
1482,4	38	średnie	705,0	38	przegięcie
1461,2	36	średnie	679,9	33	średnie
1448,7	36	szerokie	635,6	31	średnie
1413,9	34	średnie	584,5	34	przegięcie
1384,0	29	średnie	571,9	32	średnie
1359,9	30	średnie	523,7	31	średnie
1312,7	37	średnie	502,5	30	średnie
1250,9	29	przegięcie	447,5	34	średnie
1213,3	16	średnie			

Pasmo: częstotliwość w liczbie falowej (cm⁻¹)

Nateżenie: w % transmitancji (%T)

2. Widmo absorpcji w UV [λ_{\max} (a)]
w wodzie przy:
pH 2,0 256 nm (13,4), 280 nm (8,4) przegięcie
pH 7,0 254 nm (14,5), 273 nm (9,7) przegięcie
pH 11,0 259 nm (12,6), 266 nm (12,4) przegięcie

3. Skład pierwiastkowy dla wzoru sumarycznego:
 $C_{27}H_{43}N_7O_{11}SClP$. Ciężar cząsteczkowy 739.

Obliczono: C 43,84 H 5,81 N 13,26 O 23,27
S 4,33 Cl 4,73 P 4,19

Znaleziono: N 13,31 S 4,86 Cl 4,49 P 3,25

4. Skręcalność optyczna

$[\alpha]_D^{25} + 97^\circ$ (o, 0,855, woda)

5. Rozpuszczalność.

Wysoce rozpuszczalny w wodzie, metanolu i etanolu. Słabo rozpuszczalny w acetonie i innych ketonach, octanie etylu i innych estrach, chloroformie i chlorku metylenu. nierozpuszczalny w nasyconych rozpuszczalnikach węglowodorowych.

6. Czynność przeciwbakteryjna.

3-(5'-guanylan) U-57930 nie jest aktywny in vitro. Jednakże działanie fosfotazą alkaliczną lub fosfodwuesterazą I daje U-57930, który jest wysoce aktywny wobec różnych organizmów C^+ , zarówno in vitro jak i in vivo.

7. Temperatura topnienia 219—220°C (z rozkładem).

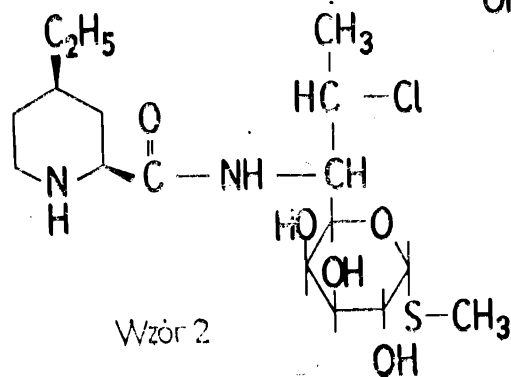
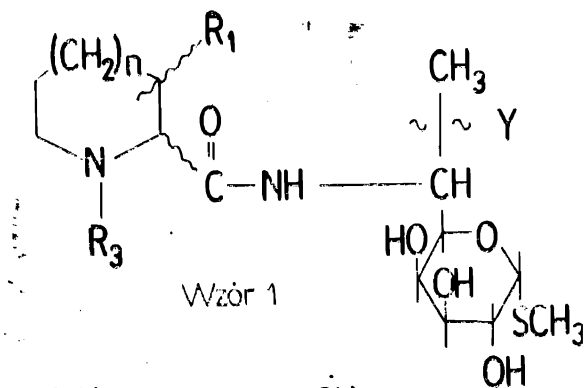
Zastrzeżenia patentowe

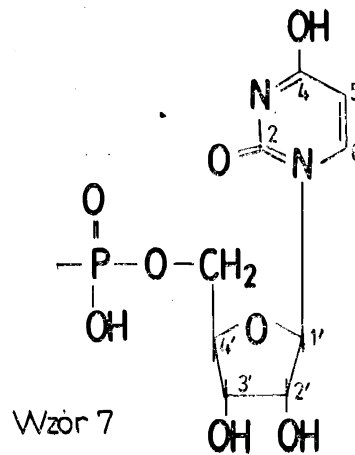
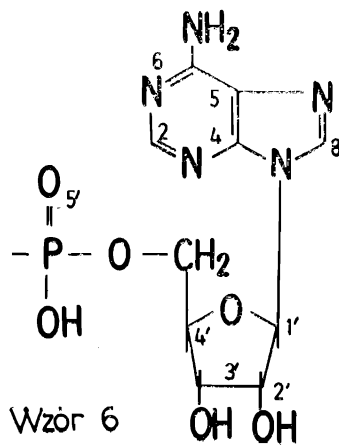
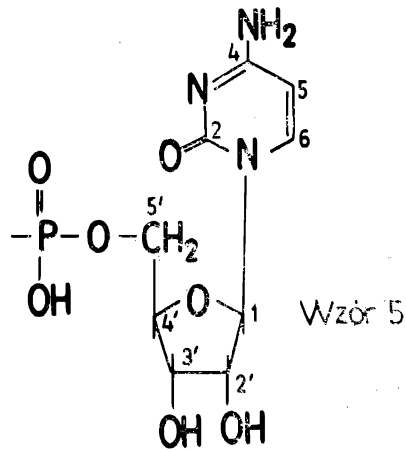
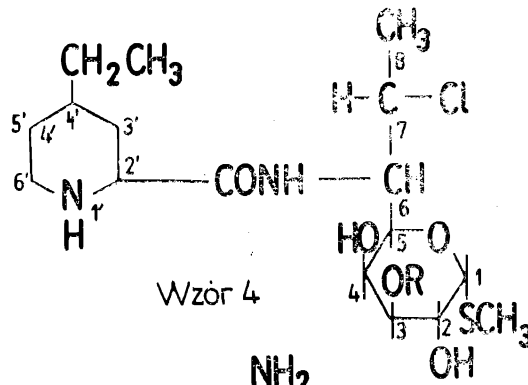
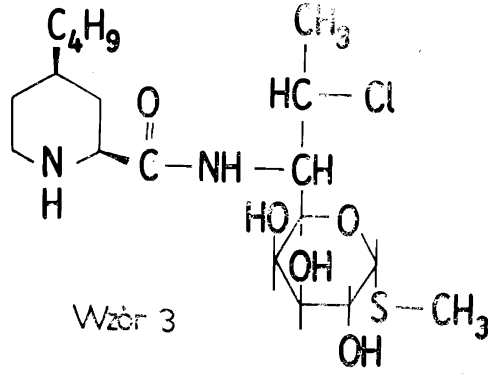
1. Sposób wytwarzania nowych 3-(5'-rybonukleotydów) związków typu klindamycyny o wzorze ogólnym 1, w którym R_1 oznacza atom wodoru lub rodnik alkilowy o 1—8 atomach węgla, ewentualnie podstawiony, R_3 oznacza atom wodoru lub

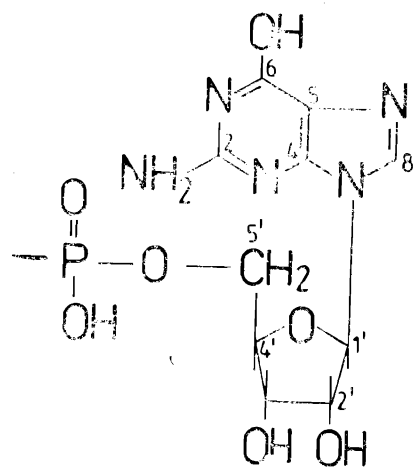
grupę alkilową o 1—2 atomach węgla ewentualnie podstawioną grupą hydroksylową, n oznacza liczbę całkowitą 1—4 zaś Y oznacza 7(S)-chlor lub 7(R)-chlor, w postaci ich izomerów, ewentualnie w postaci farmaceutycznie dopuszczalnych soli, **znamienny tym**, że prowadzi się hodowlę Streptomyces rochei, NRRL 3533, w wodnej pożywce zawierającej jako substancje odżywcze źródło węgla w postaci przyswajalnego węglowodanu oraz źródło azotu w postaci przyswajalnego związku azotu lub substancji białkowej, przy czym hodowlę prowadzi się w obecności związku o wzorze 1 i wyodrębnia się z pożywki hodowlanej zawierającej mieszaninę rybonukleotydów żądany 3-(5'-rybonukleotyd), który ewentualnie przeprowadza się w sól.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku wytwarzania 3-(5'-rybonukleotydów) związku o wzorze 2 prowadzi się hodowlę Streptomyces rochei, NRRL 3533, w wodnej pożywce zawierającej jako substancje odżywcze źródło węgla w postaci przyswajalnego węglowodanu oraz źródło azotu w postaci przyswajalnego związku azotu lub substancji białkowej w obecności związku o wzorze 2 i wyodrębnia z pożywki hodowlanej żądany 3-(5'-rybonukleotyd).

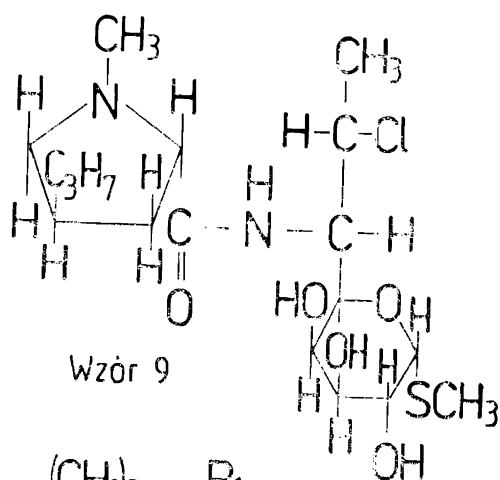
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku wytwarzania 3-(5'-rybonukleotydów) związku o wzorze 3 prowadzi się hodowlę Streptomyces rochei, NRRL 3533, w wodnej pożywce zawierającej jako substancje odżywcze źródło węgla w postaci przyswajalnego węglowodanu oraz źródło azotu w postaci przyswajalnego związku azotu lub substancji białkowej, w obecności związku o wzorze 3 i wyodrębnia z pożywki hodowlanej żądany 3-(5'-rybonukleotyd).



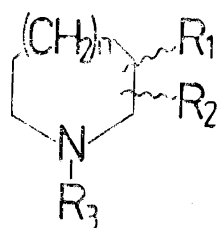




Wzór 8



Wzór 9



Wzór 10