



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

56644

Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 14.VI.1963 (P 101 882)

Pierwszeństwo: 29.X.1962 Stany
Zjednoczone
Ameryki

Opublikowano: 30.I.1969

Kl. 30 h, 6

MKP C 12 d 9/18

CZYTELNIA

UKD: Urzędu Patentowego

Współtwórcy wynalazku: Jerry Robert Daniel Mc Cormick, Nowell Oscar Sjolander, Sylvia Jennie Johnsen, Jules Reichental

Właściciel patentu: American Cyanamid Company Township of Wayne, New Jersey (Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób biologicznego przekształcania pochodnych naftacenu w związku o działaniu antybiotyków typu tetracykliny

1

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania antybiotyków typu tetracykliny.

Sposób według wynalazku polega na biologicznym przekształcaniu pochodnych naftacenu o wzorze ogólnym 2, w którym R_4 oznacza wodór lub grupę dwumetyloaminową, R_5 oznacza wodór, grupę hydroksylową, niższą alkilową lub niższą alkoksylową, R_6 oznacza wodór lub niższy alkil, R_7 oznacza wodór, halogen lub grupę hydroksylową, R_8 i R_9 oznaczają wodór w związku o działaniu antybiotyków typu tetracykliny o wzorze ogólnym 1, w którym R'_5 jest identyczne jak R_5 i R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 mają takie same znaczenie jak we wzorze 2, przez poddanie fermentacji tlenowej w wodnym środowisku odżywczym pochodnej naftacenu za pomocą fermentującego szczepu *Streptomyces*, zdolnego do biologicznego zużytkowania takich pochodnych naftacenu. Fermentację kontynuuje się do momentu przekształcenia pochodnej naftacenu w odpowiednią tetracyklinę.

W czasie fermentacji do pozycji 6 i 12a pierścienia wyjściowej pochodnej naftacenu zostają wprowadzone grupy hydroksylowe, przy czym w przypadku jeżeli pozycja 4 pierścienia naftacenu jest niepodstawiona, zostaje wprowadzona równocześnie do tej pozycji grupa dwumetyloaminowa. W przypadku jeżeli pozycje 7 i/lub 5 pierścienia wyjściowej pochodnej naftacenu są niepodstawione, stosuje się ewentualnie taki szczep *Streptomyces*, który wprowadza do pierścienia wyjściowej pochod-

2

nej naftacenu oprócz wyżej wymienionych grup, grupę 7 halogenową i/lub 5 hydroksylową. Reakcje biologicznego przekształcania, zachodzące w czasie fermentacji przedstawia schemat I.

5 Dla wygody 1, 3, 10, 11, 12-pięciohydroksynaftaceno-2-karbonamid nazwano „pretetramidem”. Tak więc podstawione 1, 3, 10, 11, 12-pięciohydroksynaftaceno-2-karbonamidy, będące substancjami wyjściowymi w procesie według wynalazku, nazwać można dogodnie pochodnymi pretetramidu. Np. 6-metylo-1, 3, 10, 11, 12-pięciohydroksynaftaceno-2-karbonamid jest odpowiednio 6-metylopretetramidem, dalej 7-chloro-1, 3, 10, 11, 12-pięciohydroksynaftaceno-2-karbonamid jest 7-chloropretetramidem i 4-dwumetyloamino-1, 3, 10, 11, 12-pięciohydroksynaftaceno-2-karbonamid nazywa się dogodnie 4-dwumetyloaminopretetramidem.

20 Wytwarzanie pretetramidów, stosowanych jako substancje wyjściowe w procesie według wynalazku, opisano w opisie patentowym nr 55957. Sposób ten polega na kondensacji odpowiednio podstawionego bezwodnika ftalowego z odpowiednio podstawionym 1,3-dwuhydroksynaftalenem i zredukowaniu powstałego jako produkt pośredni 6-hydroksynaftaceno-5, 12-chinonu lub naftaceno-6, 11-chinonu, albo na kondensacji odpowiednio podstawionego naftalenu z odpowiednio podstawionym bezwodnikiem 3,5-dwuhydroksyftalowym oraz redukcji powstałego jako produkt pośredni 6-hydroksynaftaceno-5, 12-chinonu.

Stwierdzono, że można dokonać biologicznego przekształcenia pretetramidów w antybiotyki typu tetracykliny. W sposobie według wynalazku następuje biologiczne uwodnienie pretetramidów w pozycjach 5a, 6 i 4a, 12a, czyli połączenie dwóch moli wody, jednego w pozycji 5a, 6, a drugiego w pozycji 4a, 12a. Przekształcenia tego dokonuje się przez dodanie podstawionego pretetramidu lub samego pretetramidu do środowiska fermentacyjnego, zaszczerpionego szczepem gatunku w rodzaju *Streptomyces*, zdolnym do wytworzenia jednego z antybiotyków typu tetracykliny. Równocześnie mogą zachodzić pewne inne biologiczne przekształcenia przy uwodnieniu pretetramidów w pozycjach 5a, 6 i 4a, 12a. Na przykład, jeżeli R_4 w powyższym schemacie reakcji oznacza wodór, to jakikolwiek szczep z rodzaju *Streptomyces* wprowadzi grupę dwumetyloaminową w położeniu 4 pretetramidu. Jeżeli R_4 oznacza grupę dwumetyloaminową, to podstawnik ten pozostaje w położeniu 4 bez względu na przekształcenia biologiczne dokonujące się w pozostałej części cząsteczki pretetramidu. Jeżeli R_5 w powyższym schemacie oznacza wodór, to przy zastosowaniu hydroksylującego w położeniu 5 gatunku z rodzaju *Streptomyces*, wprowadza się grupę hydroksylową w pozycji 5. Jeżeli R_5 oznacza niższy alkil lub wodór, to przy zastosowaniu niehydroksylującego w położeniu 5 gatunku z rodzaju *Streptomyces* — R_5 oznaczać będzie odpowiednio niższy alkil lub wodór. Jeżeli R_7 w powyższym schemacie oznacza podstawnik inny niż wodór, to podstawnik ten pozostaje w pozycji 7 bez względu na przekształcenia biologiczne, jakie dokonują się w pozostałej części cząsteczki pretetramidu. Jeżeli R_7 oznacza wodór, to przy zastosowaniu niehalogenującego szczepu *Streptomyces* — R_7 w produkcie oznacza również wodór. Jeżeli R_7 w cząsteczce pretetramidu oznacza wodór, to przy zastosowaniu halogenującego w położeniu 7 szczepu z rodzaju *Streptomyces* — R_7 w produkcie oznacza chlor lub brom w zależności od warunków fermentacji.

Poniżej podano szczepy *Streptomyces aureofaciens*, które wprowadzają chlor lub brom w pozycji 7 cząsteczki pretetramidu jak również powodują podwójne uwodnienie w pozycjach 5a, 6 i 4a, 12a oraz wprowadzanie grupy dwumetyloaminowej, o ile R_4 oznacza wodór:

<i>Streptomyces aureofaciens</i>	ATCC 10762a
"	"
"	ATCC 10762b
"	"
"	ATCC 10762g
"	"
"	ATCC 10762i
"	"
"	ATCC 11989
"	"
"	ATCC 12416b
"	"
"	ATCC 12416c
"	"
"	ATCC 12416d
"	"
"	ATCC 12551
"	"
"	ATCC 12552
"	"
"	ATCC 12553
"	"
"	ATCC 12554
"	"
"	ATCC 13189
"	"
"	ATCC 13899
"	"
"	ATCC 13900
"	"
"	NRRL B-1286
"	"
"	NRRL B-1287
"	"
"	NRRL B-1288

<i>streptomyces aureofaciens</i>	NRRL 2209
"	"
"	NRRL B-2406
"	"
"	NRRL B-2407
"	"
"	NRRL 3013

5 Przedstawicielem niehalogenującego szczepu rodzaju *Streptomyces*, czyli szczepu, który nie wprowadza chlorowca w pozycji 7 pretetramidu, lecz powoduje podwójne uwodnienie w pozycjach 5a, 6 i 4a, 12a oraz wprowadzenie grupy dwumetyloaminowej, o ile R_4 oznacza wodór, jest *Streptomyces aureofaciens* NRRL 3014.

10 Przedstawicielem niehalogenujących szczepów z rodzaju *Streptomyces*, które wprowadzają grupę hydroksylową w pozycji 5 cząsteczki pretetramidu poza powodowaniem podwójnego uwodnienia w pozycjach 5a, 6 i 4a, 12a oraz wprowadzeniem grupy 4-dwumetyloaminowej przy R_4 oznaczającym wodór są *Streptomyces rimosus* NRRL 2234, *Streptomyces platensis* NRRL 2364 i *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 3015.

20 Organizmami, które nadają się do stosowania w sposobie według wynalazku, są wszystkie organizmy z gatunku rodzaju *Streptomyces* wytwarzające antybiotyki typu tetracykliny. Korzystne jest jednak stosowanie tych gatunków z rodzaju *Streptomyces*, które nie wytwarzają antybiotyków typu tetracykliny, o ile w środowisku fermentacyjnym nie jest obecna pretetramidowa pochodna naftacenu, w której grupa hydroksylowa podstawiona jest w pozycjach 1, 3, 10, 11 i 12 pierścienia, a grupa karbonamidowa w pozycji 2 pierścienia.

30 Jeżeli zastosuje się gatunki z rodzaju *Streptomyces*, które wytwarzają antybiotyki typu tetracykliny bez obecności pretetramidów, antybiotyki te powstaną z fermentujących czynników odżywczych jak również z pretetramidów, co w pewnych przypadkach spowoduje konieczność oddzielenia różnych typów takich antybiotyków. W niektórych przypadkach może być pożądane dodanie pewnego szczególnego pretetramidu do fermentujących szczepów gatunku *Streptomyces* wytwarzających antybiotyki typu tetracykliny, w celu zwiększenia produkcji pewnego szczególnego antybiotyku tego typu.

45 Przedstawicielami pretetramidów, które można biologicznie przekształcić sposobem według niniejszego wynalazku za pomocą niehalogenującego szczepu z rodzaju *Streptomyces* są np. (1) pretetramid, (2) 4-dwumetyloaminopretetramid i (3) 6-metylo-4-dwumetyloaminopretetramid, z których otrzymuje się odpowiednio (1) 6-demetylotetracyklinę, (2) 6-demetylotetracyklinę i (3) tetracyklinę.

55 Przedstawicielami pretetramidów, które można biologicznie przekształcić sposobem według wynalazku za pomocą halogenującego w położeniu 7 szczepu z rodzaju *Streptomyces* są np. (1) pretetramid, (2) 6-metylopretetramid, (3) 4-dwumetyloaminopretetramid i (4) 6-metylo-4-dwumetyloaminopretetramid, z których otrzymuje się odpowiednio (1) 7-chloro-6-demetylotetracyklinę, (2) 7-chlorotetracyklinę (3) 7-chloro-6-demetylotetracyklinę i (4) 7-chlorotetracyklinę.

65 Przedstawicielami pretetramidów, które można biologicznie przekształcić sposobem według wynalazku za pomocą hydroksylującego w położeniu 5

szczepu z rodzaju *Streptomyces* jest 6-metylopretetramid, z którego otrzymuje się 5-hydroksytetracyklinę.

Pochodną naftacenu o wzorze ogólnym 4, w którym R_4 oznacza wodór lub grupę dwumetyloaminową a R_6 oznacza wodór lub niższy alkil poddaje się tlenowej fermentacji w środowisku wodnym za pomocą szczepu *Streptomyces* z gatunku wytwarzającego tetracyklinę, lecz niehalogenującego w położeniu 7 tej pochodnej i otrzymuje się tetracyklinę o wzorze 3, w którym R_6 ma wyżej podane znaczenie.

Pochodną naftacenu o wzorze ogólnym 4, w którym R_4 i R_6 mają wyżej podane znaczenia poddaje się tlenowej fermentacji w środowisku wodnym za pomocą hydroksylującego w położeniu 5 szczepu *Streptomyces* z gatunku wytwarzającego tetracyklinę przy czym otrzymuje się tetracyklinę o wzorze 5, w którym R_6 ma wyżej podane znaczenie. Jeżeli natomiast ten sam związek wyjściowy poddaje się fermentacji za pomocą szczepu *Streptomyces* z gatunku wytwarzającego tetracyklinę i halogenującego w położeniu 7 tę pochodną, otrzymuje się tetracyklinę o wzorze 6, w którym R_6 ma wyżej podane znaczenie a R_7 oznacza halogen.

Pochodna naftacenu 1, 3, 10, 11, 12-pięciohydroksynaftaceno-2-karbonamid poddana tlenowej fermentacji w środowisku wodnym za pomocą szczepu *Streptomyces* z gatunku wytwarzającego tetracyklinę, lecz niehalogenującego w położeniu 7 tej pochodnej, ulega przemianie w 6-demetylotetracyklinę.

Ten sam produkt wyjściowy poddany tlenowej fermentacji w środowisku wodnym za pomocą szczepu *Streptomyces* z gatunku wytwarzającego tetracyklinę i halogenującego w położeniu 7 tę pochodną daje jako produkt końcowy 7-chloro-6-demetylotetracyklinę.

Pretetramidy służą w tym sposobie jako substraty w reakcji biologicznego przekształcania za pomocą mikroorganizmów w antybiotyki typu tetracykliny.

Warunki fermentacji w celu biologicznego przekształcania pretetramidów w antybiotyki typu tetracykliny są w zasadzie te same, jakie podano w opisach patentowych St. Zjedn. Am. nr 2482055, nr. 2734018 i nr. 2878289, które zresztą są identyczne z warunkami stosowanymi dotychczas w znanych sposobach wytwarzania różnych antybiotyków typu tetracykliny drogą fermentacji. Oznacza to, że środowisko fermentacyjne zawiera zwykle stosowane odżywki i substancje mineralne. Stosować można różne odżywki, zawierające przyswajalny węgiel, takie jak polisacharydy lub skrobie oraz polialkohole, takie jak gliceryna. Przyswajalnym źródłem azotu są proteiny, hydrolizaty proteinowe, mocznik, namok kukurydziany, ekstrakty mięsne, pepton, oleje roślinne, mączka rybna i inne znane substancje odżywcze. Aniony i kationy wprowadza się w postaci ich znanych nietoksycznych soli. Pierwiastki śladowe takie jak mangan, kobalt, cynk, miedź itd. wprowadza się z wyżej wymienionymi solami lub z wodą wodociągową jako zanieczyszczenia śladowe, albo też stosując roztwory celowo wzbogacone w te pierwiastki.

Inne warunki fermentacji, takie, jak stężenie jonów wodorowych, temperatura, szybkość napowietrzania, przygotowanie szczepu, sterylizacja, zaszczepianie itd. są znane i podobne do tych, jakie stosuje się w produkcji innych antybiotyków typu tetracykliny według wyżej wymienionych amerykańskich opisów patentowych.

Jedynie przy zastosowaniu halogenującego w położeniu 7 szczepu rodzaju *Streptomyces* oraz pretetramidu, w którym R_7 oznacza wodór, należy stosować środowisko fermentacyjne, zawierające co najmniej 10 części na milion, a korzystnie 1000—1500 części na milion jonów chlorkowych, w przypadku wprowadzenia podstawnika 7-chlorowego, albo podobną ilość jonów bromkowych, w przypadku wprowadzenia podstawnika 7-bromowego.

Po przeprowadzeniu fermentacji w odpowiednim okresie czasu, np. 12—96 godzin i zakończeniu przekształcania związku pretetramidowego w pożądaną tetracyklinę, wydziela się związek typu tetracykliny z zacieru fermentacyjnego w jakikolwiek ze znanych sposobów.

Wyjściowe pretetramidy dodaje się do środowisk odżywczych w dowolnym stężeniu, korzystnie w stężeniu do 10 g/litr. Stosuje się również wyższe stężenia, co prowadzi jednak do pewnego obniżenia wydajności. Sposób dodawania jest dowolny, pod warunkiem, aby umożliwiał współdziałanie pretetramidu ze środowiskiem biologicznym. Korzystne jest dodawanie pretetramidu w roztworze takich rozpuszczalników, jak dwumetyloformamid, dwumetyloacetamid, dwumetylosulfotlenek, czterometylenosulfotlenek i N-metylopirolidon, przy czym najkorzystniejszym rozpuszczalnikiem jest dwumetylosulfotlenek, a zwłaszcza roztwór octanu magnezowego w dwumetylosulfotlenku. Roztwory pretetramidów łatwo ulegają utlenieniu, wskutek czego należy je chronić przed dostępem powietrza.

Wynalazek wyjaśniają bliżej nie ograniczając jego zakresu, poniższe przykłady:

Przykład I. Biologiczne przekształcenie pretetramidu (1,3,10,11,12-pięciohydroksynaftaceno-2-karbonamid) w 6-demetylotetracyklinę przy zastosowaniu *Streptomyces aureofaciens* NRRL 3014.

Zarodniki niehalogenujących *S. aureofaciens* NRRL 3016 wymywa się z agaru sterylną wodą destylowaną i uzyskuje zawiesinę $60-80 \times 10^6$ zarodników/ml. Zawiesinę tę w ilości 0,33 ml używa się do zaszczepienia znajdujących się 20 cm długiej probówce 8 ml substancji przygotowanej według następującej receptury:

sacharoza	30 g
siarczan amonowy	2 g
węglan wapniowy	7 g
namok kukurydziany	20 g
woda wodociągowa do 1000 ml	

Przed zaszczepieniem roztwór ten sterylizuje się w ciągu 20 minut w autoklawie pod ciśnieniem 1,05 atm. Następnie zaszczepioną probówkę poddaje się inkubacji w ciągu 24 godzin, w temperaturze 28°C we wstrząsarce posuwisto-zwrotnej, o cyklu 116 ruchów na minutę i otrzymuje zaszczep *S. aureofaciens*.

Następnie przygotowuje się środowisko o następującym składzie:

(NH ₄) ₂ SO ₄	6,7 g
CaCO ₃	9,0 g
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	5,0 g
NH ₄ Cl	2,0 g
MnSO ₄ (techn. 70 %)	0,10 g
namok kukurydziany	25,0 g
skrobia	52,5 g
mączka kukurydziana	14,5 g
woda wodociągowa do	1000 ml

Po sterylizowaniu przez 20 minut w autoklawie, pod ciśnieniem 1,05 atm., 25 ml tego środowiska zaszczenia się w kolbie stożkowej 1 ml porcjami *S. aureofaciens*.

Fermentację prowadzi się w ciągu 24 godzin w temperaturze 25°C na wstrząsarce obrotowej o 180 obrotach/min. Następnie każdą porcję zacieru przenosi się do oddzielnej kolby zawierającej roztwór 10 mg pretetramidu w 1 ml dwumetylosulfotlenku, po czym kontynuuje się fermentację na wstrząsarce obrotowej przez dalsze 96 godzin, w temperaturze 25°C. Analiza zacieru wykazuje wtedy obecność 15 mg 6-demetylotetracykliny w 1 ml. Badanie zawartości kolby kontrolnej, którą przygotowuje się w identyczny sposób, lecz bez dodatku pretetramidu, nie wykazuje obecności pretetramidu.

Przykład II. Biologiczne przekształcenie pretetramidu (1, 3, 10, 11, 12-pięciohydroksynaftaceno-2-karbonamidu) w 7-chloro-6-demetylotetracyklinę z zastosowaniem *Streptomyces aureofaciens* NRRL 3013.

Postępuje się jak w przykładzie I, stosując jednak następującą odmianę: częściowo sfermentowany zacier halogenujących *S. aureofaciens* NRRL 3013 przenosi się do oddzielnych kolb zawierających roztwór 11,4 g pretetramidu w mieszaninie 10 mg octanu magnezowego i 1 ml dwumetylosulfotlenku. Fermentację kontynuuje się na wstrząsarce obrotowej w ciągu dalszych 96 godzin, w temperaturze 28°C. Analiza zacieru wykazuje wtedy obecność 85 mg 7-chloro-6-demetylotetracykliny w 1 ml. Badanie zawartości kolby kontrolnej, przygotowanej w identyczny sposób, lecz bez dodania pretetramidu, nie wykazuje obecności 7-chloro-6-demetylotetracykliny.

Przykład III. Biologiczne przekształcenie 6-metylopretetramidu w 7-chlorotetracyklinę z zastosowaniem *Streptomyces aureofaciens* NRRL 3013.

Zarodniki *S. aureofaciens* NRRL 3013 wymywa się z agaru wodą destylowaną i uzyskuje zawiesinę zawierającą 60–80 × 10⁶ zarodników/ml. 0,33 ml tej zawiesiny używa się do zaszczepienia, zawartych w próbówce o długości 20 cm, 8 ml zaszczepu *S. aureofaciens* wytworzonego jak w przykładzie I. Środowisko fermentacyjne wytwarza się takie jak w przykładzie I. Po jego wysterylizowaniu, 25 ml porcji tego środowiska zaszczenia się 1 ml dawkami *S. aureofaciens*, stosując do tego celu stożkowe kolby o pojemności 250 ml. Fermentację prowadzi się w ciągu 24 godzin w temperaturze 25°C, na wstrząsarce obrotowej o 180 obrotach/min.

Następnie każdą porcję zacieru przenosi się do oddzielnej kolby zawierającej roztwór 10 mg 6-me-

tylopretetramidu w 1 ml dwumetylosulfotlenku, zalkalizowanego wodorotlenkiem amonowym. Fermentację kontynuuje się na wstrząsarce obrotowej w ciągu dalszych 96 godzin, w temperaturze 25°C.

5 Biologiczna analiza zacieru wykazuje wtedy aktywność antybakteryjną odpowiadającą 180 mg 7-chlorotetracykliny w 1 ml. Obecność tego produktu potwierdza buforowana chromatografia bibułowa na roztworze butanolu i fosforanu o wartości pH = 3. **10** Badanie zawartości kolby kontrolnej bez dodatku pretetramidu, przy zastosowaniu tego samego sposobu postępowania i z dodaniem sulfotlenku, nie wykazuje obecności 7-chlorotetracykliny.

15 **Przykład IV.** Biologiczne przekształcenie 6-metylopretetramidu w 7-chlorotetracyklinę z zastosowaniem *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762a.

Postępuje się jak w przykładzie III, z następującą odmianą: Zamiast zarodników *S. aureofaciens* NRRL 3013 stosuje się szczep ATCC 10762a. Częściowo sfermentowany zacier przenosi się do oddzielnych kolb zawierających roztwór 11 mg 6-metylopretetramidu w mieszaninie 10 mg octanu magnezowego i 1 ml dwumetylosulfotlenku, po czym fermentację kontynuuje się na wstrząsarce obrotowej w ciągu dalszych 96 godzin, w temperaturze 28°C. **20** Analiza zacieru wykazuje wtedy obecność 265 mg 7-chlorotetracykliny w 1 ml. **25** Badanie zawartości kolby kontrolnej, przy zastosowaniu tego samego sposobu postępowania, lecz bez dodania 6-metylopretetramidu, nie wykazuje obecności 7-chlorotetracykliny. **30**

Przykład V. Biologiczne przekształcenie 6-metylopretetramidu w tetracyklinę z zastosowaniem *Streptomyces aureofaciens* NRRL 3014.

35 Postępuje się jak w przykładzie IV z następującą odmianą: Stosuje się zarodnik niehalogenujących *S. aureofaciens* NRRL 3014 zamiast ATCC 10762a. Częściowo sfermentowany zacier przenosi się do oddzielnych kolb zawierających roztwór 11 mg 6-metylopretetramidu w mieszaninie 10 mg octanu magnezowego i 1 ml dwumetylosulfotlenku, po czym fermentację kontynuuje się na wstrząsarce obrotowej w ciągu dalszych 96 godzin, w temperaturze 28°C. **40**

45 Analiza zacieru wykazuje, że obecna jest w nim tetracyklina w ilości 108 mg/ml. Badanie zawartości kolby kontrolnej, przy zastosowaniu tego samego postępowania lecz bez dodania 6-metylopretetramidu, nie wykazuje obecności tetracykliny.

50 **Przykład VI.** Biologiczne przekształcenie 6-metylopretetramidu w oksytetracyklinę z zastosowaniem *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 3015.

Postępuje się jak w przykładzie III z następującą odmianą: Stosuje się zarodnik *S. hygroscopicus* NRRL 3015 zamiast *S. aureofaciens* NRRL 3013. Częściowo sfermentowany zacier przenosi się do kolb zawierających roztwór 10 mg 6-metylopretetramidu w mieszaninie 10 mg octanu magnezowego i 1 ml dwumetylosulfotlenku, po czym fermentację kontynuuje się na wstrząsarce obrotowej w ciągu dalszych 96 godzin, w temperaturze 34°C. **55**

60 Analiza zacieru wykazuje wtedy większą ilość oksytetracykliny niż w kolbie kontrolnej, której zawartość uzyskano w ten sam sposób lecz bez zastosowania 6-metylopretetramidu. **65**

Przykład VII. Biologiczne przekształcenie 6-metylopretetramidu w oksytetracyklinę z zastosowaniem *Streptomyces rimosus* NRRL 2234.

Postępuje się jak w przykładzie VI z tą różnicą, że stosuje się zarodniki *S. rimosus* NRRL 2234 zamiast *S. hygroscopicus* NRRL 3015. Końcowa analiza zacieru wykazuje większą ilość oksytetracykliny niż w kolbie kontrolnej, której zawartość uzyskuje się w ten sam sposób, lecz bez zastosowania 6-metylopretetramidu.

Przykład VIII. Biologiczne przekształcenie 4-dwumetyloamino-6-metylopretetramidu w tetracyklinę z zastosowaniem *Streptomyces aureofaciens* NRRL 3014.

Zarodniki halogenujących *S. aureofaciens* NRRL 3014 wymywa się z agaru wodą destylowaną i uzyskuje zawiesinę zawierającą $60-80 \times 10^6$ zarodników/ml. 0,33 ml porcję tej zawiesiny używa się do zaszczepienia w 25 cm próbówce 8 ml środowiska zaszczepowego, przygotowanego i inkubowanego w sposób opisany w przykładzie I, otrzymując w ten sposób zaszczep kultury *S. aureofaciens*. Po sterylizacji środowiska fermentacyjnego 25 ml porcję tego środka zaszczepia się 1 ml dawkami *S. aureofaciens* w 250 ml kolbach stożkowych. Fermentację prowadzi się w ciągu 24 godzin w temperaturze 25°C, na wstrząsarce obrotowej o 180 obrotach/min. Następnie każdą porcję zacieru przenosi się do oddzielnej kolby zawierającej roztwór 10 mg 4-dwumetyloamino-6-metylopretetramidu w 1 ml dwumetylosulfotlenku, po czym fermentację kontynuuje się na wstrząsarce obrotowej w ciągu dalszych 96 godzin, w temperaturze 25°C.

Biologiczna analiza zacieru wykazuje wtedy obecność 25 mg tetracykliny/ml. Badanie zawartości kolby kontrolnej, przy zastosowaniu tego samego postępowania, lecz bez użycia 4-dwumetyloamino-6-metylopretetramidu, nie wykazuje obecności tetracykliny.

Przykład IX. Biologiczne przekształcenie 4-dwumetyloamino-6-metylopretetramidu w 7-chlorotetracyklinę z zastosowaniem *Streptomyces aureofaciens* NRRL 3013.

Postępuje się jak w przykładzie III z następującą odmianą: częściowo sfermentowany zacier przenosi się do oddzielnych kolb zawierających roztwór 10,6 mg 4-dwumetyloamino-6-metylopretetramidu w mieszaninie 10 mg octanu magnezowego i 1 ml dwumetylosulfotlenku, po czym fermentację kontynuuje się na wstrząsarce obrotowej w ciągu dalszych 96 godzin, w temperaturze 28°C.

Analiza zacieru wykazuje wtedy obecność 58 mg 7-chlorotetracykliny/ml. Badanie zawartości kolby kontrolnej, przy stosowaniu tego samego postępowania, lecz bez dodania 4-dwumetyloamino-6-metylopretetramidu, nie wykazuje obecności 7-chlorotetracykliny.

Przykład X. Biologiczne przekształcenie 7-chloro-4-dwumetyloaminopretetramidu w 7-chloro-6-demetylotetracyklinę z zastosowaniem *Streptomyces aureofaciens* NRRL 3013.

Zarodniki *S. aureofaciens* NRRL 3013 wymywa się z agaru wodą destylowaną i uzyskuje zawiesinę zawierającą $60-80 \times 10^6$ zarodników na 1 ml. 0,33 ml zawiesiny używa się do zaszczepienia w 20 cm

próbówce 8 ml środowiska zaszczepowego, przygotowanego jak w przykładzie I, otrzymując po inkubacji zaszczep kultury *S. aureofaciens*. Medium fermentacyjne przygotowuje się podobnie jak w przykładzie I. Po sterylizacji tego środowiska, jego 25 ml porcję zaszczepia się w 250 ml kolbach stożkowych 1 ml dawkami zaszczepu *S. aureofaciens*. Fermentację prowadzi się w temperaturze 25°C na wstrząsarce obrotowej o 180 obrotach/min. Następnie każdą porcję zacieru przenosi się do oddzielnej kolby zawierającej 10 mg 7-chloro-4-dwumetyloaminopretetramidu w 1 ml dwumetylosulfotlenku, po czym fermentację kontynuuje się w ciągu dalszych 96 godzin na wstrząsarce obrotowej, w temperaturze 25°C.

Biologiczna analiza zacieru wykazuje wtedy obecność 28 mg 7-chloro-6-demetylotetracykliny w 1 ml. Badanie zawartości kolby kontrolnej, przy zastosowaniu identycznego sposobu postępowania, lecz bez zastosowania 7-chloro-4-dwumetyloaminopretetramidu, nie wykazało obecności 7-chloro-6-demetylotetracykliny.

Przykład XI. Biologiczne przekształcenie 7-chloro-4-dwumetyloaminopretetramidu w 7-chloro-6-demetylotetracyklinę z zastosowaniem *Streptomyces aureofaciens* NRRL 3014.

Postępuje się jak w przykładzie X z następującą różnicą: stosuje się zarodniki halogenujących *S. aureofaciens* 3014 zamiast NRRL 3013. Częściowo sfermentowany zacier przenosi się do kolb zawierających roztwór 10 mg 7-chloro-4-dwumetyloaminopretetramidu w mieszaninie 10 mg octanu magnezowego i 1 ml dwumetylosulfotlenku, po czym fermentację kontynuuje się na wstrząsarce obrotowej, w temperaturze 28°C, w ciągu dalszych 96 godzin.

Analiza zacieru wykazuje wtedy obecność 31 mg 7-chloro-6-demetylotetracykliny w 1 ml. Badanie zawartości kolby kontrolnej, przy zastosowaniu identycznego postępowania, lecz bez użycia 7-chloro-4-dwumetyloaminopretetramidu, nie wykazuje obecności 7-chloro-6-demetylotetracykliny.

Przykład XII. Biologiczne przekształcenie 7-chloro-4-dwumetyloaminopretetramidu w 7-chloro-6-demetylotetracyklinę z zastosowaniem *Streptomyces aureofaciens* NRRL B-2407.

Postępuje się jak w przykładzie X z następującą różnicą: stosuje się zarodniki *S. aureofaciens* NRRL B-2407 zamiast NRRL 3013. Częściowo sfermentowany zacier przenosi się do odpowiednich kolb zawierających roztwór 10,1 mg 7-chloro-4-dwumetyloaminopretetramidu w mieszaninie 10 mg octanu magnezowego i 1 ml dwumetylosulfotlenku, po czym fermentację kontynuuje się na wstrząsarce obrotowej w ciągu dalszych 96 godzin, w temperaturze 28°C. Analiza zacieru wykazuje wtedy aktywność antybiotyczną odpowiadającą 99 mg 7-chlorotetracykliny w 1 ml. Analiza chromatograficzna na bibule wykazuje obecność w zacierze 7-chloro-6-demetylotetracykliny. Badanie zawartości kolby kontrolnej, przy zastosowaniu identycznego postępowania, lecz bez użycia 7-chloro-4-dwumetyloaminopretetramidu, nie wykazuje obecności 7-chloro-6-demetylotetracykliny.

Przykład XIII. Biologiczne przekształcenie

7-chloro-4-dwumetyloamino- 6-metylopretetramidu w 7-chlorotetracyklinę z zastosowaniem *Streptomyces aureofaciens* NRRL 3013.

Zarodniki *S. aureofaciens* NRRL 3013 wymywa się z agaru sterylną wodą destylowaną i uzyskuje zawiesinę zawierającą $60-80 \times 10^6$ zarodników/ml. 0,33 ml tej zawiesiny używa się do zaszczepienia w 250 cm długiej probówce 8 ml roztworu, jaki przygotowuje się według następującej receptury:

sacharoza	30 g
siarczan amonowy	2 g
węglan wapniowy	7 g
namok kukurydziany	20 k
woda wodociągowa do	1000 ml

Przed zaszczepienie roztwór ten sterylizuje się w ciągu 20 minut w autoklawie pod ciśnieniem 1,05 atm. Zaszczepioną zawartość próbki poddaje się inkubacji w ciągu 24 godzin w temperaturze 28°C na wstrząsarce posuwisto-zwrotnej o 116 obrotach/min. i otrzymuje się zaszczep *S. aureofaciens*. Poza tym przygotowuje się środowisko fermentacyjne o składzie:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6,7 g
CaCO_3	9,0 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	5,0 mg
NH_4Cl	2,0 g
MnSO_4 (techn. 70%)	0,10 g
namok kukurydziany	25,0 g
skrobia	52,5 g
mączka kukurydziana	14,5 g
woda wodociągowa do	1000 ml

Po wyjałowieniu w ciągu 20 minut w autoklawie, pod ciśnieniem 1,05 atm, 25 ml porcje tego środowiska fermentacyjnego zaszczepia się 1 ml dawkami *S. aureofaciens*, stosując do tego celu kolby stożkowe. Fermentację prowadzi się w ciągu 24 godzin w temperaturze 25°C na wstrząsarce obrotowej o 180 obrotach/min. Następnie każdą porcję zacieru przenosi się do oddzielnej kolby zawierającej roztwór 9,5 mg 7-chloro-4-dwumetyloamino-6-metylopretetramidu w mieszaninie 10 mg octanu magnezu i 1 ml dwumetylosulfotlenku, po czym fermentację kontynuuje się na wstrząsarce obrotowej w temperaturze 28°C, w ciągu dalszych 96 godzin. Analiza zacieru wykazuje wtedy obecność 20 mg 7-chlorotetracykliny w 1 ml. Badanie zawartości kolby kontrolnej, przy zachowaniu tego samego sposobu postępowania, lecz bez użycia 7-chloro-4-dwumetyloamino-6-metylopretetramidu, nie wykazuje obecności 7-chlorotetracykliny.

Przykład XIV. Biologiczne przekształcenie 7-hidroksypretetramidu w 7-hidroksy-6-demetylotetracyklinę z zastosowaniem *Streptomyces aureofaciens* NRRL 3013.

Postępuje się jak w przykładzie XIII z następującą odmianą: częściowo sfermentowany zacier przenosi się do oddzielnych kolb zawierających roztwór 3,95 mg 7-hidroksypretetramidu w mieszaninie 10 mg octanu magnezowego i 1 ml dwumetylosulfotlenku, po czym fermentację kontynuuje się w ciągu dalszych 96 godzin na wstrząsarce obrotowej, w temperaturze 28°C. Analiza zacieru wykazuje wtedy aktywność antybiotyczną odpowiadającą 2,8 mg 7-chlorotetracykliny.

Badanie zawartości kolby kontrolnej, przy za-

chowaniu tego samego sposobu postępowania, lecz bez użycia 7-hidroksypretetramidu, nie wykazuje działania antybiotykowego.

Przykład XV. Przekształcanie 4-dwumetyloaminopretetramidu w 6-demetylotetracyklinę z zastosowaniem *Streptomyces aureofaciens* ATCC (F-198-1).

Prowadzi się następującą fermentację: zarodniki halogenujących szczepu *S. aureofaciens* ATCC (F-198-1) wymywa się z agaru wyjałowioną wodą destylowaną na zawiesinę zawierającą $60-80 \times 10^6$ zarodników/ml. 0,33 ml tej zawiesiny używa się do zaszczepienia w 250 mm probówce 8 ml roztworu, jaki przygotowano według następującej receptury:

sacharoza	30 g
siarczan amonowy	2 g
węglan wapniowy	7 g
namok kukurydziany	20 g
woda wodociągowa do	1000 ml

Przed zaszczepieniem roztwór ten sterylizuje się w ciągu 20 minut w autoklawie pod ciśnieniem 1,05 atm. Zaszczepioną zawartość próbki poddaje się inkubacji w ciągu 24 godzin, w temperaturze 28°C i otrzymuje zaszczep *S. aureofaciens*.

Równocześnie sporządza się środowisko fermentacyjne o składzie:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6,7 g
CaCO_3	9,0 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	5,0 mg
NH_4Cl	2,0 g
MnSO_4 (techn. 70%)	0,10 g
namok kukurydziany	25,0 g
skrobia	52,5 g
mączka kukurydziana	14,5 g
woda wodociągowa do	1000 ml

Po sterylizacji w ciągu 20 minut w autoklawie, pod ciśnieniem 1,05 atm., 25 ml dawki tego środowiska zaszczepia się 1 ml porcjami *S. aureofaciens*, stosując do tego celu kolby stożkowe. Fermentację prowadzi się w ciągu 24 godzin w temperaturze 28°C na wstrząsarce obrotowej. Następnie każdą porcję zacieru przenosi się do oddzielnej kolby zawierającej roztwór 10 mg 4-dwumetyloaminopretetramidu w mieszaninie 10 mg octanu magnezowego i 1 ml dwumetylosulfotlenku, po czym fermentację kontynuuje się w ciągu dalszych 96 godzin na wstrząsarce obrotowej, w temperaturze 28°C. Analiza wykazuje wtedy obecność 6-demetylotetracykliny w zacierze. Badanie zawartości kolby kontrolnej, przy czym zachowano ten sam sposób postępowania, lecz bez użycia 4-dwumetyloaminopretetramidu, nie wykazuje obecności 6-demetylotetracykliny.

Przykład XVI. Przekształcanie 6-metylo-4-dwumetyloaminopretetramidu w tetracyklinę z zastosowaniem *Streptomyces aureofaciens* ATCC (F-198-1).

Fermentację prowadzi się jak w przykładzie XV z następującymi różnicami: częściowo sfermentowany zacier przenosi się do kolb zawierających roztwór 10 mg 6-metylo-4-dwumetyloaminopretetramidu w mieszaninie 10 mg octanu magnezowego i 1 ml dwumetylosulfotlenku, po czym fermentację kontynuuje się jak w przykładzie XV. Analiza zacieru wykazuje obecność tetracykliny.

Badanie zawartości kolby kontrolnej, przy zachowaniu tego samego sposobu postępowania, lecz bez użycia 6-metylo- 4-dwumetyloaminopretetramidu, nie wykazuje obecności tetracykliny.

Zastrzeżenia patentowe

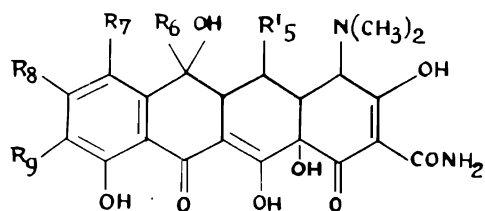
1. Sposób biologicznego przekształcania pochodnych naftacenu w związki o działaniu antybiotyków typu tetracykliny o wzorze ogólnym 1, w którym R'_5 oznacza wodór, grupę hydroksylową, niższą alkilową lub niższą alkoksylową, R_6 oznacza wodór lub niższy alkil, R_7 oznacza wodór, halogen lub grupę hydroksylową, R_8 i R_9 oznaczają wodór, **znamienny tym**, że pochodną naftacenu o wzorze 2, w którym R_4 oznacza wodór lub grupę dwumetyloaminową, R_5 oznacza wodór, grupę hydroksylową, niższą alkilową lub niższą alkoksylową, R_6 , R_7 , R_8 i R_9 mają wyżej podane znaczenie, poddaje się fermentacji tlenowej w wodnym środowisku odżywczym, przy czym fermentację kontynuuje się do momentu przekształcenia pochodnej naftacenu w odpowiednią tetracyklinę o wzorze 1, za pomocą szczepu gatunku wytwarzającego tetracykliny, z rodzaju *Streptomyces*, zdolnego do biologicznego zużycowania takiej pochodnej naftacenu, takiego jak na przykład *Streptomyces aureofaciens*: NRRL 3014 *Streptomyces rimosus* NRRL 2234, *Streptomyces platensis* NRRL 2364, *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 3015, przez co do pozycji 6 i 12a pierścienia pochodnej naftacenu zostają wprowadzone grupy hydroksylowe, przy czym w przypadku, jeżeli pozycja 4 pierścienia jest niepodstawiona, zostaje wprowadzona równocześnie do tej pozycji grupa dwumetyloamina oraz w przypadku jeżeli pozycja 7 i/lub 5 pierścienia pochodnej naftacenu są niepodstawione, stosuje się ewentualnie szczep *Streptomyces*, taki jak NRRL B-1287, NRRL 3013, ATCC 10762a, ATCC 11989, ATCC 12416b, który wprowadza do pierścienia oprócz wyżej wymienionych grup równocześnie grupę 7-halogenową i/lub 5-hydroksylową.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że

pochodną naftacenu o wzorze ogólnym 4, w którym R_4 i R_6 mają znaczenie jak w zastrz. 1, poddaje się tlenowej fermentacji w środowisku wodnym za pomocą szczepu *Streptomyces* z gatunku wytwarzającego tetracykliny, lecz niehalogenującego w położeniu 7 tej pochodnej, przy czym jako produkt końcowy otrzymuje się tetracyklinę o wzorze 3, w którym R_6 ma wyżej podane znaczenie.

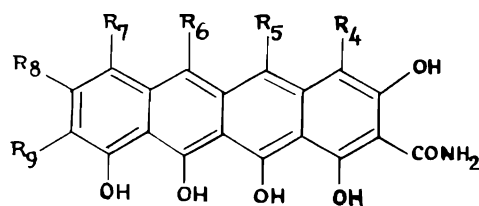
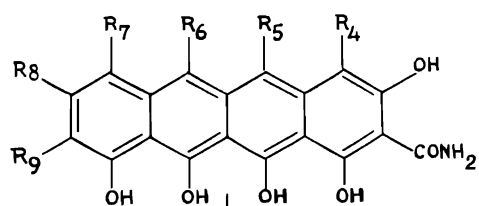
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że pochodną naftacenu o wzorze ogólnym 4, w którym R_4 i R_6 mają znaczenie jak w zastrz. 1, poddaje się tlenowej fermentacji w środowisku wodnym za pomocą hydroksylującego w położeniu 5 szczepu *Streptomyces* z gatunku wytwarzającego tetracykliny, przy czym jako produkt końcowy otrzymuje się tetracyklinę o wzorze 5, w którym R_6 ma wyżej podane znaczenie.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że pochodną naftacenu o wzorze ogólnym 4, w którym R_4 i R_6 mają znaczenie jak w zastrz. 1, poddaje się tlenowej fermentacji w środowisku wodnym za pomocą szczepu *Streptomyces* z gatunku wytwarzającego tetracykliny i halogenującego w położeniu 7 tą pochodną, przy czym jako produkt końcowy otrzymuje się tetracyklinę o wzorze 6, w którym R_6 ma wyżej podane znaczenie, a R_7 oznacza halogen.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że 1, 3, 10, 11, 12-pięciohydroksynaftaceno-2-karbonamid, poddaje się tlenowej fermentacji w środowisku wodnym za pomocą szczepu *Streptomyces* z gatunku wytwarzającego tetracykliny, lecz niehalogenującego w położeniu 7 tej pochodnej, przy czym jako produkt końcowy otrzymuje się 6-demetylotetracyklinę.
6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że 1, 3, 10, 11, 12-pięciohydroksynaftaceno-2-karbonamid poddaje się tlenowej fermentacji w środowisku wodnym za pomocą szczepu *Streptomyces* z gatunku wytwarzającego tetracykliny i halogenującego w położeniu 7 tę pochodną, przy czym jako produkt końcowy otrzymuje się 7-chloro-6-demetylotetracyklinę.



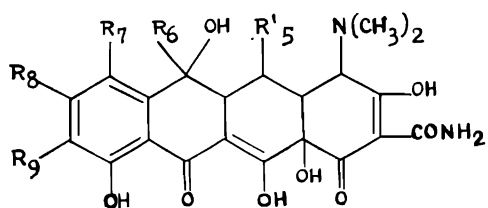
Dokonano dwóch poprawek



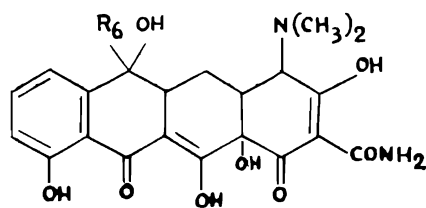
WZÓR 1



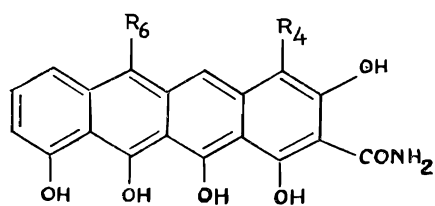
WZÓR 2



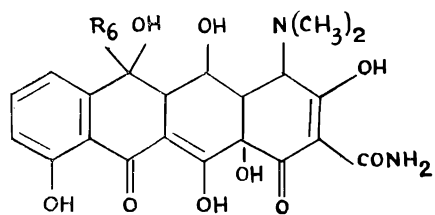
Schemat I



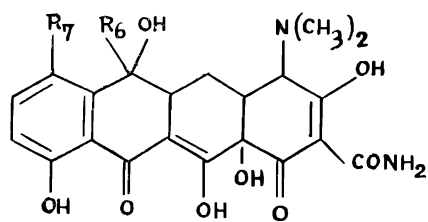
WZÓR 3



WZÓR 4



WZÓR 5



WZÓR 6