

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

66 009

Patent dodatkowy
do patentu _____

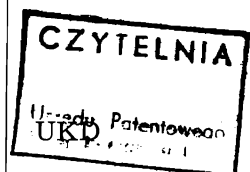
Kl. 30h,6

Zgłoszono: 29.I.1966 (P 112 697)

Pierwszeństwo: 06.X.1965 Stany
Zjednoczone
Ameryki

MKP C12d 9/14

Opublikowano: 30.X.1972



Współtwórcy wynalazku: Edward Meyers, Richard Donovick, Frank Lee
Weisenborn, Felix Edward Pansy

Właściciel patentu: E. R. Squibb and Sons, Inc., Nowy Jork
(Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób wytwarzania nowego antybiotyku prazynomycyny

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowego antybiotyku prazynomycyny, stanowiącego mieszaninę prazynomycyn A, B, C, D i E, jak również sposób rozdzielania tej mieszaniny na poszczególne składniki.

Prazynomycyna, jak również poszczególne jej składniki, wykazują w szerokim zakresie aktywność w stosunku do bakterii Gram — dodatnich i *Mycobacterium tuberculosis* oraz ograniczoną aktywność w stosunku do bakterii Gram — ujemnych.

Sposobem według wynalazku prazynomycynę wytwarza się metodą fermentacji, na drodze hodowli w określonych warunkach pewnych mikroorganizmów. *Streptomyces*, a mianowicie *Streptomyces prasinus* ATCC 15825, *Streptomyces hirsutus* ATCC 19091 i *Streptomyces prasino-pilosus* ATCC 19092.

Streptomyces prasinus ATCC 15825 został wyosobniony z próbek ziemi pochodzących z Colorado Springs, Stany Zjedn. Am. Wyosabnia się go i oznacza przez wymieszanie próbki ziemi w sterylnej wodzie destylowanej i następnie umieszcza w środowisku agarowym, zawierającym następujące składniki:

agar	15 g
sacharoza	10 g
kwask cytrynowy	1,2 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,4 g
KCl	0,08 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,418 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,036 g

2

FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,023 g
ZnCl ₃ · 6H ₂ O	0,021 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,004 g
woda destylowana	do 1000 ml

5

Środowisko doprowadza się do wartości pH = 7,0 i wyjąławia w autoklawie w temperaturze 121°C w ciągu 30 minut. Po 7—10 dniach inkubacji w temperaturze 25°C kolonie *Streptomyces prasinus* wyosabnia się z rozpostartej ziemi. Te wydzielone kolonie rozwijają się następnie w środowisku zawierającym:

ekstrakt wołowy	1,5 g
ekstrakt z drożdży	3,0 g
pepton	6,0 g
dekstroza	1,0 g
woda destylowana	do 1000 ml

15

Środowisko wprowadza się do autoklawu o temperaturze 121°C na okres 15 minut. W środowisku zawierającym jako źródło azotu siarczan amonowy, mikroorganizm ten może wykorzystywać jako źródło węgla takie substancje jak glukoza, mannit, inozyt, ksyloza, arabinoza i fruktoza. Rozwoju nie podtrzymuje natomiast sorbit, ramnoza i laktoza. Mikroorganizm ten jest proteolityczny na mleku i żelatynie, hydrolizuje skrobię, jest negatywny w stosunku do siarkowodoru i nie redukuje azotanu.

Poniżej podano opis kolonii mikroorganizmu inkubowanego w różnych środowiskach:

30

Pasta pomidorowa — mąka owsiana agar, grzybnia napowietrzna jest niepełnie zielona. Dolna strona grzybni ma kolor zielony bylicy M + P₁₆E₅;

Drożdże — ekstrakt słodowy agar, grzybnia napowietrzna jest niepełnie zielona, a dolna strona grzybni jest kremowo-żółta. Pigmenty rozpuszczalne nie powstają;

Syntetyczny agar z soli i skrobi, grzybnia napowietrzna jest koloru zielonej trawy, przy dojrzewaniu staje się ciemnoszarawo-zielona, a dolna strona grzybni jest czerwono-żółta. Pigmenty rozpuszczalne nie tworzą się.

Ogólne cechy charakterystyczne tego mikroorganizmu są: zielone zabarwienie sporów, sporofory haczykowate lub prymitywne spirale i niechromogenne w środowisku proteinowym. Te charakterystyczne cechy zaszeregowują organizm do grupy V viridus Waksmana.

Streptomyces hirsutus ATCC 19091 hodowany w różnych środowiskach ma niżej podane cechy.

Agar syntetyczny — bezbarwny puch, grzybnia powietrzna jest początkowo nieznaczna, barwy mlecznobiałej, a następnie zielenieje nabierając barwy porów.

Pożywka syntetyczna — osad i płatki o barwie białoszarej, na powierzchni roztworu pożywki rozwija się punktowo, tworząc powietrzną grzybnę barwy białoszarej.

Dekstroza z agarem — rozwija się punktowo, jest bezbarwny i nie tworzy powietrznej grzybni.

Dekstroza z agarem asparaginowym — rozwój punktowy, jest bezbarwny i nie tworzy powietrznej grzybni.

Ogólna charakterystyka tego mikroorganizmu: spory z sztywnymi odnogami o długości do 0,6 mikrona, wąskie u podstawy, grzybnia powietrzna ciemnozielona, łańcuchy sposobów tworzą krótkie, otwarte, jednakowe spirale o 3 zwojach, przeważnie rozgałęzione, nie tworzy melaminy.

Streptomyces prasino-pilosus ATCC 19092 hodowany w różnych środowiskach ma niżej podane cechy.

Agar syntetyczny — puch o barwie ceglastej lub czerwono-brązowej, podstawa różowa, grzybnia powietrzna aksamitna, barwy zielonawej, zbliżonej do barwy porów, z plamami.

Pożywka syntetyczna — osad, płatki różowe, podstawa różowa, błony z grzybną powietrzną barwy porów.

Dekstroza z agarem — rozwój mierny, puch barwy ceglastej.

Dekstroza z agarem asparaginowym — puch barwy ceglastej, grzybnia powietrzna aksamitna, barwy białej do zielonawej jak pory.

Ogólna charakterystyka mikroorganizmu: spory z giętkimi, kruchymi, bardzo cienkimi włóknami o długości do 2 mikronów, grzybnia powietrzna ciemnozielona, łańcuchy sporów tworzą krótkie, otwarte, jednolite spirale o 1—3 zwojach, nie tworzy melaminy.

Omówione wyżej mikroorganizmy są opisane szczegółowo na przykład w dziele L. Ettlinger, R. Corbaz i R. Hutter, *Zur Systematik der Actinomycetin*, *Arkiv für Mikrobiologie*, tom 31, str. 326—358.

W celu otrzymania prazynomycyny sposobem według wynalazku, szczep *Streptomyces prasinus* ATCC 15825, *Streptomyces hirsutus* ATCC 19091 lub *Streptomyces prasino-pilosus* 19092 poddaje się hodowli w wodnym środowisku odżywczym, w warunkach aerobowych i utworzony antybiotyk wyosabia w postaci mieszaniny na drodze ekstrakcji brzezki pofermentacyjnej i ewentualnie rozdziela na składniki, mianowicie prazynomycynę A, B, C, D i E, korzystnie przez ekstrakcję w przeciuprądzie lub za pomocą chromatografii bibułowej, albo mieszaninę prazynomycyny lub składniki tej mieszaniny ewentualnie poddaje się w znany sposób reakcji z zasadą, wytwarzając sole prazynomycyny lub jej składników z metalami alkalicznymi lub z metalami ziem alkalicznych.

Hodowlę tę prowadzi się korzystnie w temperaturze 25°C, podpowierzchniowo, w środowisku wodnym zawierającym przyswajalne węglowodany i źródło azotu. Fermentację prowadzi się w ciągu około 168 godzin. Po zakończeniu fermentacji prazynomycynę ekstrahuje się metanolem z grzybni lub korzystnie z całej mieszaniny pofermentacyjnej. W tym celu mieszaninę zakwasza się za pomocą kwasu solnego do wartości pH około 1,5—3,0, odsąca i osad ekstrahuje metanolem. Wyciąg metanolowy zobojętnia się do wartości pH 7 i stęża pod zmniejszonym ciśnieniem, po czym otrzymaną wodną zawiesinę zakwasza się kwasem mineralnym do wartości pH 1,5 i ekstrahuje chloroformem lub butanolem. Organiczny wyciąg suszy się bezwodnym siarczanem sodowym i stęża do małej objętości, po czym rozcieńcza acetonem w ilości 3—10 objętości, wytrącając surowy antybiotyk.

Surową prazynomycynę można następnie oczyścić tworząc z niej zawiesinę w wodzie destylowanej i doprowadzając wartość pH zawiesiny do około 8,5 przez dodanie wodorotlenku sodowego. Zasadowy wodny roztwór ekstrahuje się n-butanolem w celu usunięcia substancji obojętnych, fazę wodną zakwasza kwasem solnym do wartości pH 1,5 i ekstrahuje n-butanolem. Ekstrakt butanolowy zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując bezpostaciowy produkt o barwie ciemnobrązowej.

Szczególnie korzystny sposób oczyszczania surowej prazynomycyny polega na tym, że miesza się ją z dziesięciokrotną ilością destylowanej wody i otrzymaną zawiesinę alkalizuje wodorotlenkiem sodowym do wartości pH około 8,5. Zasadowy roztwór wodny przemycza się n-butanolem w celu usunięcia substancji obojętnych, fazę wodną zakwasza się do wartości pH = 5 i ponownie przemycza n-butanolem. Fazę wodną zakwasza się następnie do wartości pH 1,5—2,0 i ekstrahuje n-butanolem. Ekstrakt butanolowy zobojętnia się wodorotlenkiem sodowym i mieszaninę odparowuje do sucha. Otrzymaną sól przeprowadza się w wolny kwas, poddając wodny roztwór soli sodowej reakcji z żywicą jonitową o charakterze silnego anionitu.

Rozdzielanie otrzymanej prazynomycyny na poszczególne składniki, to jest prazynomycynę A, B, C, D i E, przeprowadza się w przeciuprądzie w atmosferze azotu lub metodą chromatografii bibułowej.

Sole prazynomycyny wytwarza się przez reakcję prazynomycyny lub poszczególnych prazynomycyn A, B, C, D i E z zasadą. W tym celu można stosować dowolne zasady, na przykład wodorotlenki metali alkalicznych, takie jak wodorotlenek sodowy lub potasowy, wodorotlenki metali ziem alkalicznych, takie jak wodorotlenek barowy, a także zasady organiczne, na przykład aminy pierwszorzędowe, drugorzędowe i trzeciorzędowe, takie jak dwuetyloamina lub N-etylomorfolina.

W tablicy 1 podano wyniki analizy elementarnej prazynomycyn A, B i C jako bezwodnych, wolnych kwasów i ich równoważniki zobojętniania, otrzymane przez miareczkowanie tych kwasów wodorotlenkiem sodowym w wodzie.

Tablica 1

Związek	Znaleziono, %					Równoważnik zobojętniania
	C	H	N	P	N-OAC	
Prazynomycyna A	48,52	6,51	4,42	2,43	6,52	460
Prazynomycyna B	50,72	6,70	4,76	2,30	6,33	430
Prazynomycyna C	51,36	7,53	4,34	2,28	6,31	646

Inne właściwości fizyczne prazynomycyn podano w tablicy 2. Widma w podczerwieni odnoszą się do soli sodowej wskazanej prazynomycyny, a oznaczenie wykonano na pastylkach z KBr.

Tablica 2

Związek	H ₂ O [α] _D wolny kwas	ultrafiolet	mμ (E ¹ %)	R _f		Współczynnik rozdziału c)	Widmo w podczerwieni
		0,1 n HCl	0,1n KOH	Ia)	IIb)		
Prazynomycyna A	+ 0,8°	246 (6,0)	256 (8,2)	0,23	0,25	0,17	fig. 2
Prazynomycyna B	+ 2,8°	246 (42)	257 (90)	0,28	0,25	0,24	fig. 3
Prazynomycyna C	+ 4,4°	244 (7,2)	257 (9,4)	0,36	0,39	0,39	fig. 4
Prazynomycyna D				0,38	0,39	0,43	
Prazynomycyna E				0,45	0,62	0,85	

a) n-butanol, pirydyna, woda (4:1:4 objętościowo),

b) n-propanol, n-butanol, 0,2 m N-etylomorfolina (2:3:4 objętościowo),

c) n-propanol, n-butanol, 0,1 m N-etylomorfolina (2:3:6 objętościowo).

Rozdział prowadzi się w przeciwnie w atmosferze azotu.

Niżej podane przykłady wyjaśniają dokładniej sposób według wynalazku.

Przykład I. Skośnie ustawione próbki z agarrem, pastą pomidorową i mąką owsianą zaszczepia się *Streptomyces prasinus* ATCC 15825 i hoduje w ciągu 7—10 dni, po czym otrzymaną hodowlą zaszczepia w stożkowej kolbie 100 ml wodnego środowiska o następującym składzie:

mąka sojowa	15 g
odwodnione tłuczone ziemniaki	15 g
glukoza	50 g
CoCl ₂ · 2H ₂ O	10 ml 0,05% roztworu
CaCO ₃	10 g
agar	2,5 g
woda destylowana	1 litr

Wyniki działania prazynomycyn na różne mikroorganizmy in vitro, oznaczone metodą podwójnego rozcieńczania, podano w tablicy 3.

Tablica 3

Badany mikroorganizm	M.I.C. (μg/ml) Prazynomycyna		
	A	B	C
Staphylococcus aureus 209 P	0,24	0,32	0,12
*) Staphylococcus aureus SC3184	0,24	0,32	0,24
**) Staphylococcus aureus SC2406	0,47	0,47	0,24
Bacillus cereus	0,07	0,03	0,02
Bacillus megaterium	0,19	0,19	0,04
Streptococcus pyogenes C203	0,42	0,28	0,14
Streptococcus sp. SC3966	0,004	0,003	0,003
Micrococcus lysodeikticus	0,17	0,17	0,08
Pseudomonas aeruginosa	> 50	> 50	> 50
Saccharomyces cerevisiae	> 100	> 100	> 100
Candida albicans	> 100	> 100	> 100
Aspergillus niger	> 100	> 100	> 100

*) Odporny na penicylinę, streptomycynę, tetracyklinę, 5-hydroksytetracyklinę, 7-chlorotetracyklinę, erytromycynę, oleandomycynę.

**) Odporny na penicylinę, streptomycynę, neomycynę, metylomycynę.

Środowisko to wyjaławia się w ciągu 20 minut w temperaturze 121°C i pod ciśnieniem pary 1,1 atm. Kolby z zaszczepionym środowiskiem inkubuje się w temperaturze 25°C w ciągu 72—96 godzin na wytrząsarce obrotowej.

10% zawartości kolby z zaszczepionym środowiskiem hodowlanym przenosi się do 500 ml kolb stożkowych zawierających po 100 ml środowiska o następującym składzie:

mąka sojowa	60 g
glukoza	50 g
CaCO ₃	10 g
woda destylowana	1 litr

Kolby z środowiskiem fermentacyjnym inkubuje się i wstrząsa tak jak poprzednie kolby z środowiskiem zaszczipionym. Po upływie 3, 5 i 7 dni pobiera się próbki, odwirowuje grzybnie i ekstrahuje metanolem o objętości równej objętości oddzielonego przesączu i w wyciągu oznacza zawartość biologicznie aktywnej substancji w stosunku do *Staphylococcus aureus* 209P dyfuzyjną metodą agarową. Wyniki podano w tablicy 4.

Tablica 4

Czas trwania fermentacji (godziny)	Aktywność biologiczna jednostki dyfuzyjne/ml
72	16,8
120	26,2
168	42,5

Przykład II. Szczep *Streptomyces prasinus* ATCC 15825 zabezpieczony przez liofilizację w mleku hoduje się w ciągu 96 godzin w temperaturze 25°C na wstrząsarce obrotowej w kolbie o pojemności 500 ml, zawierającej 125 ml pożywki o składzie:

mąka sojowa	15 g
odwodnione tłuczone ziemniaki	15 g
glukoza	50 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 ml 0,05% roztworu
CaCO_3	10 g
agar	2,5 g
woda destylowana	1 litr

125 ml otrzymanej hodowli dodaje się do 1000 ml pożywki o składzie różniącym się od wyżej podanego składu tylko tym, że nie zawiera agaru i w kolbie o pojemności 4000 ml inkubuje w ciągu 48 godzin w temperaturze 25°C w obrotowej wstrząsarce. 1000 ml otrzymanego produktu inkubuje się następnie w ciągu 72 godzin w 227 litrach środowiska o następującym składzie:

mąka sojowa	15 g
preparat zawierający skrobię pszeniczną, ryżową, ziemniaczaną i kukurydzianą	15 g
glikoza	55 g
CaCO_3	10 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,005 g
woda destylowana	1 litr

W czasie inkubacji doprowadza się powietrze w ilości 472 ml/sekundę i wstrząsa w ciągu 12 godzin, po czym doprowadza się powietrze w ilości 1416 ml/sekundę i dalej miesza. 34 litry otrzymanego produktu dodaje się do 568 litrów środowiska zawierającego w 1 litrze 50 g mąki sojowej, 55 g glikozy, 10 g CaCO_3 i 0,5 g środka przeciwpianowego i inkubuje w ciągu 168 godzin stosując napowietrzanie i wstrząsanie. Otrzymaną mieszaninę zakwasza się kwasem solnym do wartości pH 1,5–3,0, dodaje 6 kg pomocniczego materiału filtracyjnego i odsacza substancje nierozpuszczalne.

10 kg otrzymanego osadu ekstrahuje się w ciągu 1 godziny 15 litrami metanolu, odsacza i osad po-

nownie ekstrahuje 15 litrami metanolu. Połączone wyciągi doprowadza się do wartości pH 6–7 za pomocą wodorotlenku sodowego i roztwór zagęszcza pod zmniejszonym ciśnieniem w celu usunięcia metanolu, otrzymując około 1 litra wodnej zawiesiny. Zawiesinę tę zakwasza się kwasem solnym do wartości pH 1,5 i ekstrahuje 3 razy chloroformem, stosując każdorazowo 0,25 litra chloroformu. Po każdej ekstrakcji oznacza się wartość pH i w razie potrzeby ponownie zakwasza do wartości pH 1,5. Połączone ekstrakty chloroformowe zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem do konsystencji gęstego syropu. Do otrzymanego syropu dodaje się 4 litry acetonu, wytrząsa w ciągu 1 godziny i przesacza. Osad suszy się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze pokojowej. Z 555 g gęstego syropu otrzymuje się 61,1 g bezpostaciowej substancji stałej o barwie żółtawo-brunatnej, nierozpuszczalnej w acetonie. Aktywność produktu wynosi 725 jednostek na mg.

60 g tego produktu rozciera się na drobny proszek w moździerzu, po czym tworzy z niego zawiesinę w 3,2 litrach wody (pH 3,4) i miesza z 25 ml 2,5 n roztworu wodorotlenku sodowego, alkalinizując do wartości pH 8,6. Ślady nierozpuszczalnych substancji pomija się i zasadowy wodny roztwór ekstrahuje 3 porcjami po 800 ml n-butanolu. Powstałą fazę wodną o barwie ciemnoczerwonej zakwasza się do wartości pH 2 przez dodanie 82 ml kwasu solnego i ekstrahuje 3 porcjami po 800 ml n-butanolu. Połączone ekstrakty butanolowe zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując 29,0 g bezpostaciowego kwaśnego produktu o barwie ciemnobrazowej i aktywności 2 200 jednostek na mg.

Dalsze oczyszczanie produktu można przeprowadzić przez rozdział frakcji kwaśnej w przeciwpądzie w układzie chloroform — metanol — woda (5:4:2). Frakcję aktywną rozdziela się następnie ponownie układem rozpuszczalników n-butanol-octan etylu-woda (2:1:3). Frakcje zawierające substancję czynną łączy się, odparowuje do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszcza w metanolu i przez dodanie octanu etylu wytrąca bezbarwny produkt. Otrzymuje się prazynomycynę o aktywności 2 655 jednostek na mg, o temperaturze topnienia 164–165°C (z rozkładem), posiadającą widmo w podczerwieni przedstawione na fig. 1. Produkt ten wystawiony na działanie powietrza łatwo się uwadnia, pobierając wodę, w ilości 7,2% wagowych. Wodę tę traci przy suszeniu w temperaturze 80°C pod ciśnieniem 0,1 mm.

Analiza uwodnionego produktu: C — 46,18%, H — 7,17%, N — 4,05%, P — 2,37%, O — 40,23% (z różnic). Równoważnik zobojętniania przy miareczkowaniu wodorotlenkiem sodowym = 697. Produkt daje negatywne wyniki w próbach z ninhydriną lub azotanem srebra, lecz daje niebieskie zabarwienie po potraktowaniu 2% podchlorynem III-rzęd. butylu, rozpuszczonym w cykloheksanie i następnie roztworem jodku potasowego i skrobi.

W wyniku hydrolizy za pomocą silnego kwasu z produktu powstaje wolny kwas fosforowy i substancje dające reakcję z ninhydriną, a między innymi D-glikozoaminę i 6-dezoksy-D-glikozoaminę.

10 g proszku nierozpuszczalnego w acetonie, otrzymanego wyżej opisanym sposobem, rozciera się dokładnie w moździerzu i miesza z 100 ml wody (pH 3,4), a następnie mieszając dodaje do zawiesiny 4,3 ml 2,5 n roztworu wodorotlenku sodowego, doprowadzając do wartości pH 9. Pozostałe ślady substancji nierozpuszczalnej pomija się i zasadowy roztwór wodny ekstrahuje 3 porcjami po 75 ml n-butanolu. Fazę wodną o ciemnoczerwonym zabarwieniu zakwasza się do wartości pH 5 za pomocą 6 n HCl (0,35 ml) i przemywa 2 porcjami po 75 ml n-butanolu. Wodną fazę zakwasza się do wartości pH 1,5–2,0 za pomocą 6 n HCl (0,6 ml) i ekstrahuje 2 porcjami po 75 ml n-butanolu. Połączone ekstrakty butanolewe z ostatniej ekstrakcji zobojętnia się do wartości pH 7 za pomocą NaOH i mieszaninę zagęszcza pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując 2 gramy bezpostaciowej soli sodowej prazynomycyny o aktywności 3440 jednostek na mg.

W celu wytworzenia wolnego kwasu, 1 gram soli sodowej rozpuszcza się w 25 ml destylowanej wody i poddaje działaniu żywicy jonitowej o charakterze silnego anionitu, aż do uzyskania wartości pH roztworu około 2,5. Żywicę odsąca się, a wolny kwas wyosabia z wodnego przesączu przez liofilizację, otrzymując 0,7 g proszku o barwie jasnobrązowej. Aktywność produktu wynosi 3200 jednostek na mg.

Przykład III. W celu otrzymania soli barowej prazynomycyny wytwarza się wodną zawiesinę prazynomycyny o stężeniu 30 mg/ml, dodaje wodnego roztworu wodorotlenku barowego aż do otrzymania wartości pH 8 i miesza do całkowitego rozpuszczenia antybiotyku. Następnie dodaje się 5 objętości etanolu, odsąca wytrąconą sól barową i przemywa ją etanolem. Sól wystawiona na działanie powietrza uwadnia się, przyjmując wodę w ilości 9,7% wagowych. Wodę tę traci przy suszeniu w temperaturze 80° pod ciśnieniem 0,1 mm.

Analiza uwodnionej soli: C — 40,93%, H — 6,25%, Ba — 9,22%, P — 1,79%. Równoważnik zobojętnienia przy miareczkowaniu kwasem nadchlorowym = 647.

Postępując w analogiczny sposób lecz stosując zamiast wodorotlenku barowego równoważne ilości wodorotlenku sodowego lub potasowego, otrzymuje się odpowiednio sól sodową i potasową.

Przykład IV. W kolbie o pojemności 500 ml 125 ml środowiska o składzie:

mąka sojowa	15 g
odwodnione tłuczone ziemniaki	15 g
glikoza	50 g
CoCl ₂ · 2H ₂ O	10 ml 5% roztworu
CaCO ₃	10 g
agar	2,5 g
destylowana woda	1 litr,

zaszczepia się kulturą *Streptomyces hirsutus* ATCC 19091, zabezpieczoną w liofilizowanym mleku i poddaje hodowli w temperaturze 25°C w obrotowej wstrząsarce w ciągu 96 godzin. 125 ml otrzymanej hodowli dodaje się do 1000 ml środowiska o składzie różniącym się od składu wyżej podanego tylko tym, że nie zawiera agaru i w kolbie o pojemności 4000 ml poddaje hodowli w temperaturze 25°C w ciągu 48 godzin we wstrząsarce o ruchu posuwisto-

-zwrotnym. 1 000 ml otrzymanej mieszaniny dodaje się do 227 litrów środowiska o składzie:

mąka sojowa	15 g
preparat skrobi pszenicznej, ryżowej,	
5 ziemniaczanej i kukurydzianej	15 g
glikoza	55 g
CaCO ₃	10 g
CoCl ₂ · 2H ₂ O	0,005 g
destylowana woda	1 litr

10 i poddaje hodowli w ciągu 72 godzin, doprowadzając powietrze w ilości 472 ml/sekundę i mieszając w ciągu 12 godzin, a następnie doprowadzając powietrze w ilości 1 416 ml/sekundę i mieszając. 34 litry otrzymanej mieszaniny dodaje się do 568 litrów środowiska zawierającego w 1 litrze 60 g mąki sojowej, 55 g glikozy, 10 g CaCO₃ i 0,5 g i środka przeciw pienieniu i mieszając i napowietrzając poddaje hodowli w ciągu 168 godzin. Do brzeczeki pofermentacyjnej dodaje się 6 g kwasu solnego, w celu zakwaszenia do wartości pH 1,5–3,0 i następnie filtruje z dodatkiem pomocniczego środka filtracyjnego.

10 kg otrzymanego osadu ekstrahuje się dwukrotnie metanolem i połączone, przesączone wyciągi zobojętnia wodorotlenkiem sodowym do wartości pH 6–7, a następnie odparowuje metanol pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałą wodną zawiesinę zakwasza się kwasem solnym do wartości pH 1,5 i trzykrotnie ekstrahuje 0,25 objętości chloroformu. Połączone wyciągi stęża się pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymany gęsty syrop miesza z 4 litrami acetonu i wytrząsa w ciągu 1 godziny, po czym odsąca i osad suszy w temperaturze pokojowej pod zmniejszonym ciśnieniem.

60 g otrzymanego produktu nierozpuszczalnego w acetonie miele się, miesza z 3,2 litrami wody (wartość pH 3,4) i mieszając alkaliczuje za pomocą 25 ml 2,5 n wodorotlenku sodowego do wartości pH 8,6. Otrzymany zasadowy roztwór ekstrahuje się 3 porcjami po 800 ml n-butanolu i fazę wodną o barwie ciemnoczerwonej zakwasza do wartości pH 2 za pomocą 82 ml 5% kwasu solnego, a następnie ekstrahuje 3 porcjami po 800 ml n-butanolu. Połączone wyciągi stęża się pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując bezpostaciowy, kwaśny produkt o barwie ciemnobrązowej.

Dalsze oczyszczanie produktu prowadzi się ekstrahując w przeciwprądzie układem chloroform-metanol-woda (5:4:2), po czym frakcje zawierające substancję czynną ekstrahuje się układem n-butanol-octan etylowy-woda (2:1:3). Frakcje zawierające substancję czynną łączy się, odparowuje do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszcza w metanolu i wytrąca prazynomycynę przez dodanie octanu etylowego. Otrzymuje się prazynomycynę w postaci bezbarwnego ciała stałego, identycznego z produktem otrzymanym w sposób opisany w przykładzie II.

Przykład V. Postępując w sposób analogiczny do opisanego w przykładzie IV, lecz stosując zamiast szczepu *Streptomyces hirsutus* ATCC 19091 liofilizowaną w mleku kulturę *Streptomyces prasino-pilosus* ATCC 19092, otrzymuje się prazynomycynę o właściwościach identycznych z właściwoś-

ciami produktu otrzymanego w sposób opisany w przykładach II i IV.

Przykład VI. W celu rozdzielania mieszaniny prazynomycyny na poszczególne prazynomycyny A, B, C, D i E, prazynomycynę otrzymaną w sposób opisany w przykładzie V poddaje się przeciwprądowej ekstrakcji, stosując układ rozpuszczalników n-propanol-n-butanol-0,25 n roztwór N-etylomorfoliny (2:3:6). 4,4 g prazynomycyny rozpuszcza się w 200 ml dolnej fazy i alkalizuje N-etylomorfoliną do wartości pH 9, po czym w atmosferze azotu przepuszcza 1500 razy przez aparat do przeciwprądowej ekstrakcji. Frakcje zawierające poszczególne prazynomycyny łączy się odpowiednio i odparowuje z nich rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymane sole N-etylenomorfoliny rozpuszcza się w wodzie i traktuje żywicznym wymienniczym jonowym uwalniając kwasy. Po odsączeniu żywicy przesącz odparowuje się do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszcza w metanolu i wytrąca kwasy za pomocą octanu etylowego, otrzymując 600 mg prazynomycyny A, 506 mg prazynomycyny B i 412 mg prazynomycyny C.

Nie wyosobnioną prazynomycynę D i prazynomycynę E rozdziela się metodą chromatografii bibułowej i wykrywa metodą biochemiczną. W tym celu 0,1 µg produktu otrzymanego w sposób opisany w przykładzie V umieszcza się w postaci plamy na bibule filtracyjnej o długości 50 cm, dwukrotnie przemylej kwasem i zanurza bibulę w acetonowym roztworze dolnej fazy podanego wyżej układu rozpuszczalników (2:1). Bibulę suszy się w temperaturze pokojowej w ciągu 2—3 minut w celu usunięcia acetonu, po czym rozwija górną fazą układu rozpuszczalników: n-butanol-pirydyna-woda (4:1:4) w ciągu 16 godzin w temperaturze pokojowej. Rozpuszczalniki usuwa się w powietrzu i bibulę bioautografuje na agarze zaszczipionym za pomocą *Staphylococcus aureus* 209P.

Prazynomycyna A ma wartość $R_f = 0,23$, prazynomycyna B ma $R_f = 0,28$, prazynomycyna C ma $R_f = 0,36$, prazynomycyna D ma $R_f = 0,38$, a wartość R_f prazynomycyny E wynosi 0,45.

Przykład VII. W celu otrzymania soli poszczególnych prazynomycyn, wolne kwasy otrzymane w sposób opisany w przykładzie VI miesza się z wodą i do zawiesiny dodaje 0,5 n wodny roztwór wodorotlenku sodowego aż do otrzymania wartości pH 8. Po wymieszaniu dodaje się do roztworu soli etanol w stosunku objętościowym 5:1, wytrącając sól sodową. Sól tę odsącza się, przemyleta etanolem i suszy.

Przykład VIII. W celu oznaczenia skuteczności prazynomycyny przeciwko mikroorganizmom, przeprowadza się próby metodą podwójnego rozcieńczania, stosując do badań prazynomycynę w postaci wolnego kwasu, otrzymanego w sposób opisany w przykładzie II.

Wyniki podano w tablicy 5.

Tablica 5

Badany mikroorganizm	M.I.C. µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	0,09
<i>Streptococcus pyogenes</i> C203	0,24
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,25
<i>Salmonella schottmuelleri</i> No. 3850	≥ 50,0
<i>Salmonella typhimurium</i> No. 3821	≥ 50,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 3840	≥ 50,0
<i>Proteus vulgaris</i> No. 3855	25,0
<i>Proteus mirabilis</i> No. 3873	18,7
<i>Candida albicans</i> No. 1539	≥ 50,0
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> var B.C.G.	1,0

Przykład IX. Myszom wstrzykuje się do otrzewnej dawki 1000 LD₅₀ organizmu *Streptococcus pyogenes* C203 i w 5 godzin po zakażeniu podaje się podskórnie mieszaninę antybiotyków. Wyniki podano w tablicy 6. W rubryce 3 tej tablicy podano stosunek liczby myszy pozostałych przy życiu do liczby myszy poddanych badaniu.

Tablica 6

Lek badany	Mg/Kg	S/T
Penicylina C	2	2/10
	1	3/10
	0,5	1/10
Prazynomycyna	10	10/10
	5	6/10
	2,5	8/10
	1,25	4/10
Bez antybiotyku	—	0/10

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania nowego antybiotyku prazynomycyny, będącego mieszaniną prazynomycyn A, B, C, D i E, **znamienny tym**, że szczep *Streptomyces prasinus* ATCC 15825, *Streptomyces hirsutus* ATCC 19091 lub *Streptomyces prasino-pilosus* ATCC 19092 poddaje się hodowli w wodnym środowisku odżywczym w warunkach aerobowych, po czym utworzony antybiotyk wyosabia się w postaci mieszaniny na drodze ekstrakcji brzezki pofermentacyjnej i oczyszcza w znany sposób i ewentualnie rozdziela na prazynomycynę A, B, C, D i E, korzystnie przez ekstrakcję w przeciwprądzie lub za pomocą chromatografii bibułowej, albo mieszaninę prazynomycyny lub poszczególne jej składniki ewentualnie poddaje w znany sposób reakcji z zasadą, wytwarzając sole prazynomycyny lub jej składników z metalami alkalicznymi lub z metalami ziem alkalicznych.

FIG. 1

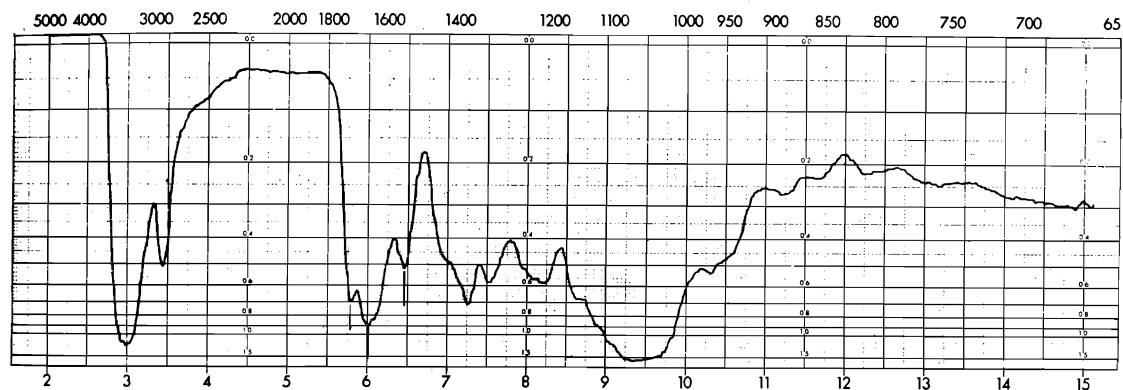


FIG. 2

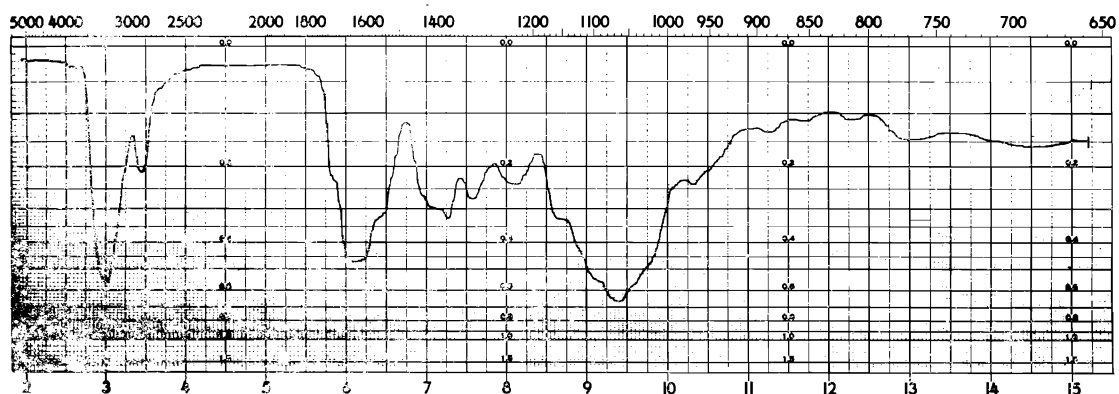


FIG. 3

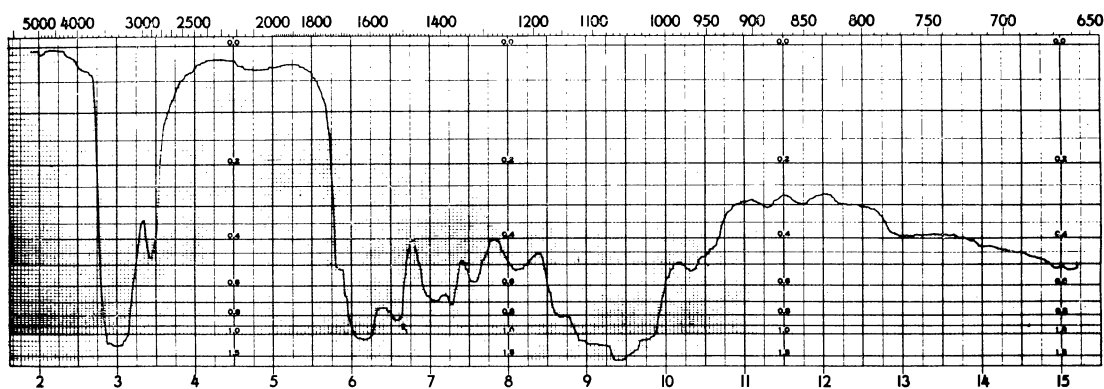


FIG. 4

