

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

66 256

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 06.IX.1968 (P 128 938)

Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 20.XI.1972

Kl. 30h,6

MKP C12d 9/04

CZYTELNIA

Urząd Patentowy
PRL

Twórca wynalazku: Marian Tyc

Właściciel patentu: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego, Warszawa
(Polska)

Sposób otrzymywania nowego antybiotyku inomycyny

1

Wynalazek dotyczy wytwarzania nowego antybiotyku, nazwanego inomycyną, na drodze biologicznej.

Inomycyna jest wytwarzana przez nowy szczep *Streptomyces griseus* var. inomycini wyisobniony z próbki gleby. Antybiotyk wykazuje silne działanie wobec nowotworów przeszczepialnych, hamuje wzrost niektórych grzybów i pierwotniaków, nie działa na bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne.

Inomycyna w postaci krystalicznej jest bez czuwalnego zapachu, jest dobrze rozpuszczalna w metanolu, acetonie, chloroformie, benzenie, butanolu, octanie amylu, słabiej rozpuszczalna w eterze etylowym i praktycznie nierozpuszczalna w eterze naftowym. Rozpuszczalność w wodzie wynosi 18 mg w 1 ml.

Widmo absorpcyjne w podczerwieni zawiesiny inomycyny w nujolu wykazuje maksima przy następujących długościach fal: 3460, 3190, 2910, 1710, 1690, 1670, 1475, 1385, 1262, 1145, 1105, 1058, 1015, 990, 945, 925 cm^{-1} (ryc. 1). Pasma pochłaniania w podczerwieni, jakie stwierdzono dla inomycyny, są charakterystyczne dla antybiotyków grupy cykloheksimidu.

Skład pierwiastkowy inomycyny jest następujący: C 63,19%, 63,17%; H 8,52%, 8,68%; N 8,93%, 9,07%. Ciężar cząsteczkowy obliczony metodą Rasta wynosi 340. Na podstawie danych analitycznych proponuje się dla inomycyny następujący wzór sumaryczny: $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{O}_4\text{N}_2$. Zawartość tlenu obliczono z różnicy. Zestawienie odpowiednich wartości dla

2

proponowanego wzoru przedstawia się następująco:

	C	H	N	Ciężar czą- stecz- kowy
5 wartości doświadczalne	%	%	%	
	63,19	8,52	8,93	340
	63,17	8,68	9,07	
wartości teoretyczne:	63,13	8,42	8,66	323,4

10 Wodne roztwory antybiotyku w zakresie pH 3,0 — 7,0 nie tracą swojej aktywności w temperaturze pokojowej przez co najmniej 5 dni. W środowisku alkalicznym antybiotyk ulega unieczynnieniu.

15 Brzeczki fermentacyjne szczepu *Streptomyces griseus* var. inomycini oraz wodne i metanolowe roztwory krystalicznej inomycyny, poddane chromatografii bibulowej w kilku rozpuszczalnikach organicznych, wykazują dwie strefy zahamowania wzrostu drobnoustroju testowego *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. Jedna strefa występuje w punkcie startu, a druga wykazuje wysokie wartości R_f ($\approx 0,9$). Roztwory chloroformowe, acetonowe i butanolowe inomycyny, chromatografowane w tych samych warunkach, wykazują tylko jedną strefę zahamowania ($R_f \approx 0,9$).

20 Czynne substancje (wędrująca i pozostająca w punkcie startu) po elucji z pasków bibuły zachowują się identycznie i ich obrazy chromatograficzne są podobne do tych, jakie wytwarza substancja wyjściowa. Wyniki badań chromatogra-

ficznych wskazują na to, że inomycyna jest związkiem chemicznie jednorodnym, który w roztworze wodnym i metanolowym ulega pewnym zmianom (prawdopodobnie powstają solwaty), co wyraża się przez dwie strefy zahamowania w niektórych układach rozwijających.

Spektrum antybiotyczne inomycyny przedstawiono w tablicy 1, z której wynika, że antybiotyk nie działa na bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne. Spośród kilku badanych szczepów z rodzaju *Saccharomyces* wszystkie okazały się wrażliwe na stężenie antybiotyku od 0,2 — 0,4 mcg/ml. Wysoką wrażliwość wykazywały również szczepy *Candida kruzei*, *C. xylenoides* i *Rhodotorula rubra*. Antybiotyk nie wywierał hamującego działania na szczepy *Candida albicans* nawet w stężeniu wynoszącym 200 mcg/ml. Dla szczepów *Aspergillus niger* i *Penicillium nigricans* hamujące stężenie antybiotyku wynosiło 50 mcg/ml. Dodatkowe badania wykazały, że inomycyna hamuje również wzrost niektórych grzybów fitopatogennych oraz pierwotniaków.

Aktywność onkostatyczną inomycyny wykazano na trzech nowotworach przeszczepialnych: mięsaku 180, mięsaku 37 i raku wysiękowym Ehrlicha. U myszy z rakiem wysiękowym Ehrlicha antybiotyk zmniejszał ilość płynu wysiękowego w okresie między 5 — 12 dniem doświadczenia. Przy dawce dobowej antybiotyku 80 mg/kg rozwój mięsaka 37 był hamowany w 84,7%, a mięsaka 180 w 56,2% w porównaniu z grupą kontrolną. Działaniu onkostatycznemu towarzyszył ubytek ciężaru ciała myszy.

Widmo absorpcyjne w podczerwieni, właściwości biologiczne i niektóre właściwości chemiczne wskazują na podobieństwo inomycyny do antybiotyków grupy cykloheksimidu (cykloheksimid, antybiotyk E-73, aktyfenol, inakton, fermicydyna, naramycyna B, niromycyny, protomycyna, streptowitacyjny i streptymidon). Analiza porównawcza daje podstawę do stwierdzenia, że inomycyna nie jest identyczna z jakimkolwiek opisanym antybiotykiem grupy cykloheksimidu. Wykazano, że w skład cząsteczki inomycyny wchodzi dwa atomy azotu, podczas gdy dotąd opisane antybiotyki grupy cykloheksimidu zawierają po jednym atomie azotu w cząsteczce. Ponadto występują indywidualne różnice między inomycyną i poszczególnymi antybiotykami grupy cykloheksimidu.

Szczep *Streptomyces griseus* var. *inomycini*, wytwarzający inomycynę, wyizolowano z próbki

gleby pobranej w okolicy miasta Łodzi. Pod względem cech morfologicznych i hodowlanych szczep ten wykazuje duże podobieństwo do gatunku *Streptomyces griseus* Waksman i Henrici, lecz istotnie się różni od tego gatunku właściwościami fizjologicznymi i biochemicznymi. W brzeczkach fermentacyjnych i hodowlach agarowych szczepu *Streptomyces griseus* var. *inomycini* nie stwierdzono obecności streptomycyny. Porównawcze zestawienie właściwości szczepu *Streptomyces griseus* var. *inomycini* i wzorcowego szczepu *Streptomyces griseus* 3463 podają tabele 2, 3 i 4.

Na podstawie wyników badań taksonomicznych szczep wytwarzający inomycynę oceniono jako nową odmianę gatunku *Streptomyces griseus*, której proponuje się nazwę *Streptomyces griseus* var. *inomycini*.

Tablica 1
Spektrum antybiotyczne inomycyny

Drobnoustrój	Najmniejsze stężenie hamujące wzrost mcg/ml
<i>Bacillus subtilis</i>	<200
<i>Corynebacterium diptheriae</i>	<200
<i>Escherichia coli</i>	<200
<i>Micrococcus pyogenes</i> var 209 P	<200
<i>Mycobacterium</i> 607	<200
<i>Proteus vulgaris</i> OX 19	<200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<200
<i>Salmonella typhi</i>	<200
<i>Sarcina lutea</i>	<200
<i>Shigella sonnei</i>	<200
<i>Candida albicans</i> 102	<200
<i>Candida albicans</i> 1476	<200
<i>Candida kruzei</i> 46	0,8
<i>Candida kruzei</i> 208	0,8
<i>Candida pseudotropica</i>	<200
<i>Candida pelliculosa</i>	100
<i>Candida xylenoides</i>	1,5
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	0,2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,3
<i>Saccharomyces formosensis</i>	0,4
<i>Rhodotorula rubra</i>	0,6
<i>Aspergillus niger</i>	50
<i>Penicillium chrysogenum</i> Q 176	100
<i>Penicillium nigricans</i>	50

Tablica 2

Cechy morfologiczne i hodowlane szczepów *Streptomyces griseus* var. *inomycini* i *Streptomyces griseus* 3463

Podłoże	Cecha hodowli	<i>Streptomyces griseus</i> var. <i>inomycini</i>	<i>Streptomyces griseus</i> 3463
1	2	3	4
Agar drożdżowo-sodowy	wzrost	+++	+++
	grzybnia podstawowa	żółto-brązowa	żółto-brązowa

1	2	3	4
	pigment rozpuszczalny	brak	±
	grzybnia powietrzna	Barwa: żółto-szara lub blado-żółta Sporofory: proste (R) i faliste (F) Zarodniki występują w łańcuskach zawierających więcej niż 10 zarodników. Zarodniki mają kształt cylindryczny	blado-żółta proste (R) i faliste (F) Zarodniki występują w łańcuskach zawierających więcej niż 10 zarodników.
Agar owsiany	wzrost	+++	+++
	grzybnia podstawowa	żółto-brązowa	żółto-brązowa
	pigment rozpuszczalny	brak	brak
	grzybnia powietrzna	Barwa: szaro-biała	szaro-biała
Agar skrobiowy z solami nieorganicznymi	wzrost	+++	+++
	grzybnia podstawowa	żółto-brązowa + zielona	żółto-brązowa
	pigment rozpuszczalny	brak	brak
	grzybnia powietrzna	Barwa: żółtawo-szara Sporofory: proste (R) i faliste (F)	blado-żółta proste (R) i faliste (F)
Agar asparaginowy z glicerolem	wzrost	+++	+++
	grzybnia podstawowa	żółto-brązowa	żółto-brązowa
	pigment rozpuszczalny	brak	brak
	grzybnia powietrzna	Barwa: blado-żółta Sporofory: proste (R) i faliste (F)	blado-żółta proste (R) i faliste (F)
Agar peptonowy (wg Küstera)	wytwarzanie pigmentu typu melaniny	nie wytwarza	nie wytwarza
Agar z bursztynianem wapnia	pigment	żółty pigment rozpuszczalny	żółty pigment rozpuszczalny

Tablica 3

cd. tablicy 3

Zdolność przyswajania różnych źródeł węgla przez szczepy *Streptomyces griseus* var. *inomycini* i *Streptomyces griseus* 3463

Źródło węgla	<i>Streptomyces griseus</i> var. <i>inomycini</i>	<i>Streptomyces griseus</i> 3463
Agar bez dodatku źródła węgla (kontrola)	—	—

55

60

65

Glukoza	++	++
DL-arabinoza	++	—
Fruktoza	++	++
Inozytol	—	—
Ksyloza	++	++
Mannitol	++	++
Rafinoza	±	—
Ramnoza	++	—

Objaśnienie:
znak + oznacza intensywność wzrostu
znak — oznacza brak wzrostu

Tabela 4

Wzajemny antagonizm szczepów oznaczony metodą „słupków agarowych”.

Hodowla agarowa szczepów	Słupki agarowe szczepów	
	Streptomyces griseus var. inomycini	Streptomyces griseus 3463
Streptomyces griseus 3463	16—22	0
Streptomyces griseus var. inomycini	0	13—16

Objaśnienie: liczby oznaczają średnice stref zahamowania wzrostu w mm.

Sposób według wynalazku polega na prowadzeniu procesu biosyntezy metodą fermentacji głębinowej przy użyciu szczepu *Streptomyces griseus* varietas *inomycini* na pożywkach zawierających przyswajalne źródła węgla i źródła azotu pochodzenia roślinnego i zwierzęcego oraz sole mineralne w ciągu 60 — 90 godz., a otrzymany antybiotyk izoluje z płynu fermentacyjnego.

Z płynów pofermentacyjnych antybiotyków izoluje się przez adsorbcję na węglu aktywowanym, elucję acetonem, ekstrakcję chloroformem z zagęszczonych roztworów wodnych i krystalizację z rozpuszczalników organicznych nie mieszających się z wodą.

Pożywki płynne służące do produkcji antybiotyku zawierają przyswajalne źródła azotu i źródła węgla pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego oraz sole mineralne. Pożywki szczepi się inoculum konidialnym lub wegetatywnym. Inoculum konidialne stanowią zarodniki 5 — 10 dniowej hodowli agarowej. Jako inoculum wegetatywne używa się 40 — 45 godz. hodowli głębinowej. Fermentację przeprowadza się metodą głębinową w temperaturze poniżej 32°C przy jednoczesnym mieszaniu i napowietrzaniu w aparaturze powszechnie stosowanej w przemyśle fermentacyjnym.

Szczep wytwarzający inomycynę rozmnaża się na podłożach agarowych (np. agarze ziemniaczanym). Zaszczepione agary skośne inkubuje się w temperaturze 27—29°C w ciągu 5 — 10 dni i następnie przechowuje się w chłodni w 2—4°C. Zarodniki szczepu można przechowywać w postaci zliofilizowanej. Hodowle na podłożu agarowym są wyjściowym materiałem szczepiennym do fermentacji od skali laboratoryjnej do skali przemysłowej.

Schemat postępowania przy produkcji antybiotyku można przedstawić następująco:

Sporulacyjna hodowla szczepu na podłożu agarowym

Hodowla posiewowa na pożywce płynnej w naczyniu szklanym

Hodowla posiewowa na pożywce płynnej w fermentorze

Hodowla produkcyjna na pożywce płynnej w fermentorze

Czas potrzebny do otrzymania maksymalnej wydajności w hodowli głębinowej wynosi od 60 — 90 godzin zależnie od warunków fermentacji. Okres najintensywniejszego wytwarzania antybiotyku występuje między 24 — 70 godz. fermentacji.

Substancję antybiotyczną występującą w hodowli szczepu *Streptomyces griseus* var. *inomycini* można izolować różnymi sposobami. Grzybnie oddziela się od płynu fermentacyjnego przez wirowanie lub sączenie. Z płynu fermentacyjnego antybiotyk adsorbuje się na węglu aktywowanym w pH = 2—5. Z węgla aktywowanego antybiotyk eluuje się acetonem lub metanolem. Otrzymane eluaty zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40—50° celem odparowania rozpuszczalnika organicznego. Pozostałość wodną ekstrahuje się dwukrotnie chloroformem. Połączone wyciągi chloroformowe wprowadza się na kolumnę z tlenkiem glinowym.

Z kolumny eluuje się antybiotyk mieszaniną chloroformu i acetonu. Eluat zawierający aktywną substancję zagęszcza się w próżni aż do suchej pozostałości, którą rozpuszcza się w małej ilości mieszaniny złożonej z benzenu i eteru. Krystalizację antybiotyku przeprowadza się w temperaturze 2—4° z mieszaniny: benzen, eter etylowy i eter naftowy.

Przykład I. Fermentacja w kolbach na trzęsawce. Do kolb o pojemności 750 ml zawierających po 100 ml pożywki (nr 1 lub nr 2) o składzie niżej podanym przenosi się zarodniki szczepu *Streptomyces griseus* var. *inomycini* zebrane oczkiem z 8-dniowej hodowli agarowej. Zaszczepione kolby umieszcza się na trzęsawce obrotowej lub wahadłowej w temperaturze 27—29°C. Maksymalną wydajność antybiotyczną (≈ 200 mcg/ml) osiąga się w 72—96 godz. fermentacji.

Skład pożywki nr 1

1. płatków owsianych 3%
 2. Glukozy 2%
 3. CaCO₃ 0,3%
 4. NaCl 0,3%
 5. wody wodociągowej ad 100 ml
- pH = 6,7 — 6,9 po sterylizacji

Skład pożywki nr 2

1. mąki rybnej 2%
 2. glukozy 2%
 3. CaCO₃ 0,2%
 4. NaCl 0,3%
 5. wody wodociągowej ad 100 ml
- pH = 6,7 — 6,9 po sterylizacji

Obydwie pożywki sterylizuje się w 117°C w ciągu 25 min.

Oznaczenia inoptyczny przeprowadza się metodą płytkowo-cylindrową, wobec wrażliwego szczepu testowego (np. *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763).

Przykład II. Fermentacja dwustadiowa w kolbach na trzęsawce. Stadium I. Postępuje się jak w przykładzie I, lecz hodowlę w kolbach prowadzi się przez 42 godziny. Hodowlę tę używa się jako inoculum do stadium II.

Stadium II. Do kolb zawierających pożywkę płynną (patrz przykład I) dodaje się 42 godz. hodowli wegetatywnej w ilości 1 — 3% w stosunku do objętości pożywki. Fermentację głębinową prowadzi się na trzęsawce w temperaturze 27 — 29°C w ciągu 70—90 godz.

Przykład III. Fermentacja w fermentorze. Materiałem szczepiennym jest 42—45 godz. hodowla głębinowa przygotowana w sposób podany w przykładzie II (stadium I).

W fermentorze o pojemności np. 150 litrów przygotowuje się 90 litrów pożywki (jak wyżej), zawierającej dodatkowo 0,2% oleju roślinnego lub zwierzęcego. Pożywkę sterylizuje się w 118°C w ciągu 1 godziny. Wyjałowioną pożywkę szczepi się 42 godz. hodowlą wegetatywną w ilości 0,5—2% w stosunku do objętości pożywki. Fermentację prowadzi się w temp. 26—28°C, aż do wytworzenia maksymalnej wydajności (60—90 godz.), przy napełnianiu od 0,4—0,9 objętości powietrza na objętość pożywki na 1 minutę i stałym mieszaniu wynoszącym 220 obrotów/min. W czasie fermentacji stężenie jonów wodorowych wykazuje tylko nieznaczne wahania utrzymując się w granicach pH = 6,5—6,9.

Po zakończeniu fermentacji grzybnę oddziela się od płynu przez wirowanie lub sączenie na prasie filtracyjnej. Płyn pofermentacyjny zakwasza się 10 n HCl do pH = 3 i dodaje się węgla aktywowanego w ilości 0,4% w stosunku do objętości płynu. Płyn po adsorpcji nie wykazuje aktywności antybiotycznej. Węgiel aktywowany z zawartością antybiotyku zbiera się na sączku Büchnera. Z węgla antybiotyk eluuje się dwukrotnie 90% aceto-

nem (90 cz. acetonu i 10 cz. wody). Obydwa eluaty acetonowe łączy się i zagęszcza pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40—50° aż do całkowitego odparowania rozpuszczalnika.

Otrzymany koncentrat wodny ekstrahuje się dwukrotnie chloroformem (na 1 obj. koncentratu 0,5 obj. chloroformu). Połączone wyciągi chloroformowe wprowadza się na kolumnę z tlenkiem glinowym (Do kolumny o wymiarach 1,5 × 30 cm zawierającej 40 g tlenku glinu wprowadza się 150 ml wyciągu chloroformowego). Roztwór przepuszcza się z szybkością 2,5 ml na minutę. Cała zawartość antybiotyku adsorbuje się na kolumnie. Z tlenku glinu antybiotyk eluuje się chloroformem i acetonem zmieszany w stosunku 10:1, stosując tę samą szybkość przepływu.

Eluat zawierający aktywną substancję zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem aż do suchej pozostałości, którą rozpuszcza się w małej ilości mieszaniny złożonej z benzenu i eteru etylowego. Antybiotyk krystalizuje w temperaturze 2—4° z mieszaniny: benzen, eter etylowy i eter naftowy. Rekrystalizację można przeprowadzić z eteru etylowego w temperaturze 2°C.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowego antybiotyku, inoptyczny, **znamienny tym**, że proces biosyntezy prowadzi się metodą fermentacji głębinowej przy użyciu szczepu *Streptomyces griseus* var. inoptyczni na pożywkach zawierających przyswajalne źródła azotu i węgla pochodzenia roślinnego i zwierzęcego oraz sole mineralne, w ciągu 60—90 godz., a otrzymany antybiotyk izoluje się z płynu fermentacyjnego.

2. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że antybiotyk izoluje się z płynów pofermentacyjnych przez adsorpcję na węglu aktywowanym, elucję acetonem, ekstrakcję chloroformem z zagęszczonych roztworów wodnych i krystalizację z rozpuszczalników organicznych, nie mieszających się z wodą.

