

C 12 d 9/22



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 43644

Kl 6 b, 16/03

Instytut Antybiotyków

Warszawa, Polska

Sposób otrzymywania nowego antybiotyku, onkostatyny C

Patent trwa od dnia 23 listopada 1959 r.

Wynalazek dotyczy sposobu otrzymywania i wydzielania nowego antybiotyku, onkostatyny C, na drodze biosyntezy za pomocą nowego, nie opisanego dotychczas szczepu *Streptomyces species* INA 39/58.

Onkostatyna C należy do grupy aktynomycyn C, co stwierdzono na podstawie chromatografii bibułowej oraz składu aminokwasów.

Nowy szczep *Streptomyces species* INA 39/58, wytwarzający onkostatynę C, różni się znacznie od dotychczas znanego producenta aktynomycyny C — *Streptomyces chrysomallus*.

Na podłożu Pridhama zawierającym: skrobi — 1,0%, K_2HPO_4 — 0,1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,1%, $NaCl$ — 0,1%, $(NH_4)_2SO_4$ — 0,2%, $CaCO_3$ — 0,2%, agaru — 2,0%, szczep *Streptomyces species* INA 39/58 wytwarza sporofory faliste i zarodniki lekko owalne, grzybnię podstawową bezbarwną, grzybnię powietrzną kremową i wydziela jasno-żółty pigment rozpuszczalny w podłożu.

Na podłożu peptonowym, zawierającym: tryptonu — 0,1%, wyciągu drożdżowego — 0,1%,

$NaCl$ — 0,85%, agaru — 1,7%, szczep *Streptomyces species* INA 39/58 nie wytwarza pigmentu typu melaniny.

Na podłożu Kraińskiego, zawierającym: glukozy — 1,0%, NH_4NO_3 — 0,05%, K_2HPO_4 — 0,05%, agaru — 2,0% i wodę wodociągową, szczep *Streptomyces species* INA 39/58 wytwarza grzybnię podstawową bezbarwną, grzybni powietrznej brak.

Na podłożu Lindenbeina, zawierającym: glicerolu — 2,0%, glikokolu — 0,25%, $NaCl$ — 0,1%, K_2HPO_4 — 0,1%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01%, $CaCO_3$ — 0,0005%, agaru — 2,0%, szczep *Streptomyces species* INA 39/58 wytwarza grzybnię podstawową bezbarwną, grzybnię powietrzną różową i wydziela żółty pigment, rozpuszczalny w podłożu.

Na podłożu zawierającym: płatków owsianych — 2,0%, agaru — 2,0%, szczep *Streptomyces species* INA 39/58 wytwarza grzybnię podstawową bezbarwną, grzybnię powietrzną jasno-kremową i wydziela w małych ilościach żółty pigment, rozpuszczalny w podłożu.

Na podłożu syntetycznym, zawierającym: glukozy — 0,5%, KNO_3 — 0,1%, K_2HPO_4 — 0,05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,02%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,0001%, agaru — 2,5%, szczep *Streptomyces species* INA 39/58 wytwarza grzybnię podstawową bezbarwną, grzybnię powietrzną jasno-żółtą i wydziela jasno-żółty pigment rozpuszczalny w podłożu.

Na podłożu syntetycznym z dodatkiem peptonu w ilości 0,5%, szczep *Streptomyces species* INA 39/58 wytwarza grzybnię podstawową bezbarwną, grzybnię powietrzną kremową i wydziela żółty pigment, rozpuszczalny w podłożu.

Na podłożu tryptonowym, zawierającym: tryptonu — 1,0%, glukozy — 1,0%, agaru — 2,0%, szczep *Streptomyces species* INA 39/58 wytwarza grzybnię podstawową kremową, grzybnię powietrzną jasno-kremową i wydziela żółty pigment rozpuszczalny w podłożu.

Na ziemniaku szczep *Streptomyces species* INA 39/58 wytwarza grzybnię podstawową żółto-brązową, grzybnię powietrzną jasno-żółtą.

Na podłożu ziemniaczanym z glukozą, zawierającym: glukozy — 1,0%, agaru — 2,5% i wyciąg ziemniaczany, szczep *Streptomyces species* INA 39/58 wytwarza grzybnię podstawową żółtą, grzybnię powietrzną jasno-żółtą i wydziela żółty pigment rozpuszczalny w podłożu.

Na agarze zwykłym, zawierającym: $NaCl$ — 0,5%, peptonu — 1,0%, agaru — 2,0% i wyciąg wołowy rozcieńczony wodą w stosunku 3:1, szczep *Streptomyces species* INA 39/58 wytwarza grzybnię podstawową żółtą, nie wytwarza zarodników i wydziela żółty pigment rozpuszczalny w podłożu.

Na bulionie zwykłym, zawierającym: peptonu — 1,0%, $NaCl$ — 0,5% i wyciąg wołowy rozcieńczony wodą w stosunku 3:1, szczep *Streptomyces species* INA 39/58 wytwarza bezbarwną grzybnię podstawową, nie wytwarza zarodników i nie wydziela pigmentu.

Poniżej podano właściwości biologiczne szczepu *Streptomyces species* INA 39/58 w porównaniu z odpowiednimi właściwościami macierzy-

stego szczepu *Streptomyces chrysomallus*. Szczep *Streptomyces species* INA 39/58, wytwarzający onkostatynę C, został uzyskany na drodze selekcji naturalnej ze szczepu *Streptomyces chrysomallus*.

Charakterystyka szczepów na podłożu asparaginowym, zawierającym: asparaginy — 0,1%, KH_2PO_4 — 0,025%, wyciągu wołowego — 0,2%, glukozy — 1,0%, agaru — 2,0%.

Szczep	<i>Streptomyces chrysomallus</i>	<i>Streptomyces sp.</i> INA 39/58
Zarodnikowanie	dobrze	dobrze
grzybnia powietrzna	kremowa	żółta
grzybnia podstawowa	bezbarwna	żółta
pigment rozpuszczalny	żółty (skąpy)	żółty (skąpy)

Charakterystyka szczepów na podłożu azotanowym, zawierającym: KNO_3 — 0,1%, wyciąg wołowy — 0,3%, pepton — 0,5%, agar — 1,2%.

Szczep	<i>Streptomyces chrysomallus</i>	<i>Streptomyces sp.</i> INA 39/58
Zarodnikowanie	słabe	brak
grzybnia powietrzna	biała	brak
grzybnia podstawowa	jasno-żółta	kremowa
pigment rozpuszczalny	żółto-żółty	żółty

Charakterystyka szczepów na podłożu Czapek-Doxa: $NaNO_3$ — 0,2%, K_2HPO_4 — 0,1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,05%, KCl — 0,05%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,001%, sacharozy — 3,0%, agaru — 2,0%.

Szczep	<i>Streptomyces chrysomallus</i>	<i>Streptomyces sp.</i> INA 39/58
Zarodnikowanie	dobrze	dobrze
grzybnia powietrzna	biała	bezbarwna
grzybnia podstawowa	bezbarwna	brak
pigment rozpuszczalny	żółto-zielony	biała

Charakterystyka szczepów na podłożu dekstrynowym: dekstryny — 1,0%, peptonu — 0,5%, $NaNO_3$ — 0,3%, KH_2PO_4 — 0,1%, KCl — 0,05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,001%, wyciągu drożdżowego — 0,04%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,001%, agaru — 3,0%.

Szczep	Streptomyces chrysomallus	Streptomyces sp. INA 39/58
Zarodnikowanie	dobrze	słabo
grzybnia powietrzna	jasno-żółta	biała
grzybnia podstawowa	bezbarna	bezbarna
pigment rozpuszczalny	żółty (skąpy)	żółty

Charakterystyka szczepu na bullionie Emersona: wyciągu wołowego — 0,4%, peptonu — 0,4%, NaCl — 0,25%, wyciągu drożdżowego — 0,1%, glukozy — 1,0%.

Szczep	Streptomyces chrysomallus	Streptomyces sp. INA 39/58
Zarodnikowanie	dobrze	dobrze
grzybnia powietrzna	kremowa	biała
grzybnia podstawowa	bezbarna	bezbarna
pigment rozpuszczalny	złoto-żółty	jasno-żółty

Charakterystyka szczepu na podłożu Sabouraud, zawierającym: glukozy — 2,0%, peptonu — 1,0%, agaru — 2,0%.

Szczep	Streptomyces chrysomallus	Streptomyces sp. INA 39/58
Zarodnikowanie	brak	dobrze
grzybnia powietrzna	brak	kremowa
grzybnia podstawowa	żółta	pomarańczowa
pigment rozpuszczalny	jasno-żółty	żółty

Szczep *Streptomyces species* INA 39/58 nie upłynnia żelatyny, alkalizuje i peptonizuje mleko, z jednoczesnym wydzielaniem żółtego pigmentu. rozpuszczalnego w podłożu, wydziela siarkowodor na podłożu ciekłym z tryptonem, a na agarze z krwią wykazuje działanie hemolizujące. Szczep *Streptomyces sp.* INA 39/59 silnie redukuje azotany do azotynów w odróżnieniu od szczepu *Streptomyces chrysomallus*, którego zdolności redukujące są znacznie słabsze.

Tabela I przedstawia zdolność wykorzystywania różnych źródeł węgla w agarze syntetycznym Pridhama i Gottlieba, zawierającym: $(NH_4)_2SO_4$ — 0,264%, KH_2PO_4 — 0,238%, K_2HPO_4 — 0,565%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,1%, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ — 0,00064%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,00011%, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ — 0,00079%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,00015%, źródło węgla — 1,0%, agar — 1,5%, przez szczep *Streptomyces chrysomallus* i przez szczep *Streptomyces sp.* INA 39/58.

Tabela I.

Źródło węgla	Streptomyces chrysomallus	Streptomyces sp. INA 39/58
dulcyt	—	—
l (—) ramnoza	++	++
d (—) fruktoza	+++	+++
d (+) galaktoza	+++	++
glukoza	+++	+++
d (+) mannoza	+++	+++
laktoza	+	+
maltoza	—	++
sacharoza	+	+
trehaloza	++	—
d (—) rafinoza	—	—
skrobí	+++	+++
glicerol	+++	+++
inozytol	—	—
d (—) mannit	+++	+++
bursztynian sodu	+++	+++
octan sodu	++	—

Podłożem sporulacyjnym dla szczepu *Streptomyces species* INA 39/58 jest podłoże Lindenbeina o składzie uprzednio podanym. Hodowlę na skośnych agarach inkubuje się 8—10 dni w temperaturze 25—35°C, a następnie przechowuje w chłodni w temperaturze 4°C. Ponad to szczep *Streptomyces species* INA 39/58 można przechowywać w postaci zarodników w piasku oraz w postaci zarodników zliofilizowanych.

Sposób według wynalazku polega na tym, że prowadzi się fermentację głębinową za pomocą szczepu *Streptomyces species* INA 39/58 na odpowiedniej pożywce, w temperaturze poniżej 30°C i w warunkach optymalnych dla wytworzenia w brzeczce maksymalnej ilości onkostatyny C. Z brzeczki zawierającej antybiotyki, oddziela się grzybnie na przykład przez odwirowanie lub sączenie i ekstrahuje ją dwukrotnie acetonem w ilości 1 część objętościową acetonu na 1 część objętościową grzybni. Połączone wyciągi acetonowe odparowuje się w próżni w temperaturze nie przekraczającej 30—35°C aż do całkowitego usunięcia acetonu. Pozostałość wodną ekstrahuje się dwukrotnie benzenem, biorąc każdorazowo $1/10$ — $1/5$ części objętościowej benzenu na 1 część objętościową fazy wodnej. Antybiotyki zawarty w przesączu brzeczki ekstrahuje się 1—2 krotnie benzenem w stosunku $1/20$ — $1/6$ części objętościowej benzenu na 1

część objętościową przesączu, po uprzednim zobojętnieniu tej mieszaniny.

Połączone wyciągi benzenowe grzybni i przesączu brzeczki zlewa się razem, zagęszcza w próżni i wprowadza na kolumnę z tlenkiem glinowym. Na kolumnie tworzy się pierścień barwy pomarańczowo-czerwonej, który w zależności od ilości onkostatyny C w wyciągu benzenowym jest szerszy lub węższy. Po przepuszczeniu całej objętości wyciągu benzenowego, antybiotyk eluuje się z kolumny acetonem do całkowitego usunięcia go z kolumny. Acetonowe eluaty zagęszcza się w próżni do suchej pozostałości i rekrytalizuje z wrzącego roztworu octanu etylowego lub innych estrów, w których onkostatyna C jest dobrze rozpuszczalna.

Przykład I. Jednostadiowa fermentacja w kolbach na trzęsawce. Kolbę o pojemności 750 ml, zawierającą 100 ml pożywki o składzie: mąka sojowa — 2,0%, glukoza — 2,0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,2%, NaCl — 0,2%, K_2HPO_4 — 0,05%, CaCO_3 — 0,4%, pH — 7,0, wyjaławia się, po czym zaszczepia zawiesinę zarodników w 0,85%-owym roztworze chlorku sodowego i poddaje fermentacji na trzęsawce w temperaturze 25–30°C przez 120–150 godzin. Zawartość onkostatyny C w brzeczce wynosi około 150 j/ml.

Przykład II. Trzystadiowa fermentacja w fermentorach. Stadium I przeprowadza się w kolbach, jak w przykładzie I, lecz fermentacja trwa 48–72 godziny.

Stadium II prowadzi się w fermentorze o pojemności np. 100 litrów. 70 litrów podłoża fermentacyjnego o składzie jak wyżej, zawierającego dodatkowo olej sojowy w ilości 0,7 litra, wyjaławia się w temperaturze 115°C przy 0,8 atm. w ciągu 1 godziny. Wyjałowioną pożywkę szczepi się 0,7 litra 48–72 godzinnym inoculum (stadium I) i poddaje się 36–48-o godzinnej fermentacji w temperaturze 25–30°C przy napowietrzaniu od 0,4–1 objętości powietrza na objętość pożywki na minutę.

Stadium III prowadzi się w fermentorze o pojemności np. 1500 litrów, w podłożu podanym wyżej (stadium II) i przy utrzymaniu takich samych parametrów, lecz przy napowietrzaniu 200–600 litrów powietrza na minutę, przez o-

kres średnio 96 godzin. Koniec fermentacji następuje przy pH 7,0–8,2. Zawartość onkostatyny C w brzeczce wynosi wtedy około 120 j/ml brzeczki.

Oznaczenia onkostatyny C w brzeczce przeprowadza się metodą biologiczną, płytkowo-cylindrową, wobec szczepu wzorcowego *Bacillus subtilis* 6633.

Z brzeczki oddziela się grzybnę np. przez odwirowanie na wirówce koszarowej lub nuczach próżniowych o dużej powierzchni sączącej, po czym grzybnę umieszcza się w reaktorze o pojemności 150 litrów na 60 litrów grzybni, zadaje się 60 litrami acetonu i ekstrahuje mieszając do całkowitego wyciągnięcia onkostatyny C z grzybni. W przypadkach niecałkowitej ekstrakcji antybiotyku proces ekstrakcji powtarza się po raz drugi. Oddzielony od grzybni przesącz brzeczki umieszcza się w reaktorach o pojemności około 1000 litrów na 700 litrów przesączu, dodaje się od 35–105 litrów benzenu, mieszaninę wodno-benzenową zobojętnia się i miesza od 1–1,5 godzin. Następnie mieszaninę zostawia się do odstania na 12–20 godzin, wodną fazę dolną odrzuca się, a emulsję powstającą na granicy faz wiruje się w wirówce Sharplesa lub innej odpowiedniej wirówce szybkoobrotowej, po uprzednim wymieszaniu z dodatkiem Na_2SO_4 , NaCl lub innej soli. Połączone wyciągi benzenowe z grzybni i przesączu brzeczki, po uprzednim zagęszczeniu w próżni, chromatografuje się na kolumnie z tlenkiem glinowym. Zadsorbowaną na tlenku glinowym onkostatynę C eluuje się acetonem, stosując takie objętości acetonu, które pozwalają na całkowite wymycie antybiotyku z kolumny. Eluaty acetonowe zagęszcza się w próżni w temperaturze nie przekraczającej 30–35°C aż do uzyskania suchej pozostałości i rekrytalizuje się z wrzącego roztworu octanu etylowego lub innych rozpuszczalników organicznych, w których onkostatyna C jest dobrze rozpuszczalna na gorąco i mało rozpuszczalna na zimno. Kryształiczny osad zostawia się na 5–7 dni w temperaturze 4–10°C, sączy się, przemywa lodowatą wodą i suszy w temperaturze pokojowej w próżni. Wydajność czystego antybiotyku wynosi 60%.

Spectrum antybiotyczne onkostatyny C przedstawia tabela II.

Tabela II.

Szczepy wzorcowe	Najmniejsze stężenie onkostatyny C hamujące wzrost szczepu wzorcowego w mcg/ml
<i>Micrococcus pyogenes</i> var. aureus 209-P	0,6
<i>Micrococcus pyogenes</i> var. albus	0,15
<i>Bacillus subtilis</i> 6633	0,01
<i>Bacillus cereus</i> 8096	0,05
<i>Bacillus circulans</i> 8144	0,07
<i>Bacillus brevis</i> 10068	0,6
<i>Escherchia coli</i> 308	160,0
<i>Proteus vulgaris</i> OX ₁₉	40,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80,0
<i>Mycobacterium phlei</i>	0,6
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	0,6
<i>Mycobacterium</i> 607	0,6
<i>Candida albicans</i> 102	80,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40,0
<i>Penicillium chrysogenum</i> Q-176	160,0
<i>Aspergillus niger</i>	80,0

Duża toksyczność onkostatyny C, wyrażona jako LD₅₀ dla myszy, wynosi po wstrzyknięciu dożylnym około 1 mg na kg wagi.

Onkostatynę C można stosować w leczeniu ziarnicy złośliwej, w przypadkach przerzutów niektórych postaci raka do płuc, raka oskrzeli, w przypadkach leukopenii, anemii, pancytopenii oraz przy wprowadzaniu antybiotyku do rakowatych wysięków.

Onkostatynę C można stosować również w skojarzeniu z leczeniem promieniami Roentgena, iperytem azotowym oraz innymi lekami przeciwnowotworowymi.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania nowego antybiotyku, onkostatyny C, znamieny tym, że proces biosyntezy prowadzi się metodą fermentacji głębinowej za pomocą szczepu *Streptomyces species* INA 39/58, otrzymanego na drodze selekcji naturalnej ze szczepu *Streptomyces chrysomallus*, w temperaturze poniżej 30°C, w pożywce zawierającej przyswajalny węgiel, azot i sole mineralne, do czasu wytworzenia przez ten szczep w brzeczce antybiotyku, który następnie izoluje się metodą ekstrakcji, adsorpcji i eluacji.
2. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że z brzeczki oddziela się grzybnię, na przykład przez odsączanie lub odwirowywanie, ekstrahuje antybiotyk z przesączu w środowisku obojętnym benzenem lub innymi rozpuszczalnikami nie mieszającymi się z wodą, a antybiotyk wytworzony w grzybni ekstrahuje kilkakrotnie acetonem lub innymi odpowiednimi rozpuszczalnikami, po czym uzyskany wyciąg zagęszcza się i reekstrahuje do benzenu, a następnie łączy się obydwie wyciągi i poddaje adsorpcji na kolumnie wypełnionej tlenkiem glinu, z której antybiotyk eluuje się acetonem, eluaty odparowuje w próżni w temperaturze 25—35°C, a uzyskaną suchą pozostałość rekrystalizuje z gorącego octanu etylowego lub innego, odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego, po czym otrzymany osad po odsączeniu, przemycia lodowatą wodą i suszy w temperaturze pokojowej.

Instytut Antybiotyków

Zastępca: mgr inż. Jerzy Hanke
rzecznik patentowy