



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 12.03.71 (P.146840)

Pierwszeństwo: 30.06.1970 Stany Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 05.05.1973

Opis patentowy opublikowano: 31.10.1977

MKP C12d 9/14

Int. Cl.² C12D 9/14



Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Merck and Co., Inc. Rahway, New Jersey
(Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób wytwarzania nowego antybiotyku 810 A

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowego antybiotyku 810 A, będącego mieszaniną kwasów o ogólnym wzorze 1, w którym R oznacza grupę wodorotlenową lub sulfoksyłową — OSO_3H .

Związki o ogólnym wzorze 1 mają budowę podobną do związków szeregu cefalosporyn. Cefalosporyna C ma podstawnik D-5-amino-5-karboksywaleramidowy w pozycji 7 pierścienia cefemowego, natomiast związki o wzorze 1 oprócz tego podstawnika w pozycji 7 mają także podstawnik metoksyłowy. W pozycji 3 pierścienia cefalosporyna C jest podstawiona grupa acetoksymetylową, natomiast związki o wzorze 1 mają w tej pozycji grupę α -metoksy-p-sulfoksycynamoilową albo α -metoksy-p-hydroksycynamoilową. Wytwarzane sposobem według wynalazku związki o ogólnym wzorze 1 mają podstawnik 5-amino-5-karboksywaleramidowy w konfiguracji β w stosunku do pierścienia cefemowego.

Sposobem według wynalazku antybiotyk 810 A otrzymuje się na drodze aerobowej hodowli w kontrolowanych warunkach wodnych pożywek zaszczerpionych nowym mikroorganizmem z gatunku *Streptomyces griseus*, którego kultury są zdeponowane w Northern Utilization Research and Development Branch of the U.S. Department of Agriculture Peoria, Illinois, Stany Zjedn. Amer., pod numerami NRRL 3851, NRRL 3951, NRRL 3953 i NRRL 3952.

Jedną z głównych trudności, napotykaną w terapii antymikrobowej, jest skłonność do degradacji

2

enzymatycznej, wykazywana przez większość znanych antybiotyków. Na przykład, penicylina G jest skuteczna w zwalczaniu wielu mikroorganizmów Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, lecz w obecności penicyliny rozkłada się produkt, który w stosunku do większości organizmów chorobotwórczych nie wykazuje właściwości antybiotycznych. Cefalosporyna C jest wprawdzie odporna na działanie penicyliny i jest aktywna w stosunku do bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, ale aktywność ta nie jest duża. Poza tym istnieją enzymy inne niż penicylina, zwane cefalosporynazami, które dezaktywują cefalosporynę.

Antybiotyk 810 A jest odporny nie tylko na penicylinazę, ale i na cefalosporynazę i równocześnie jest aktywny w stosunku do bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Przejawia on aktywność in vivo w stosunku do mikroorganizmów Gram-ujemnych takich, jak *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella pullorum*, *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* oraz w stosunku do mikroorganizmów Gram-dodatnich takich, jak *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* i *Diplococcus pneumoniae*.

Śród związków, wchodzących w skład antybiotyku 810 A, szczególnie cenne właściwości ma kwas 7 β -(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α -metoksy-p-sulfoksycynamoiloksymetylo)-7-metoksy-3-cefemokarboksyłowy-4 o wzorze 2. Związek ten jest związkiem o wzorze 1, w którym R oznacza

grupę sulfoksylogów. Cenne właściwości mają również sole tego związku. Związek o wzorze 2 jest bardziej odporny na rozkładowe działanie cefalosporynaz, a doświadczenia wykonane na myszach wykazały, że jego toksyczność jest bardzo mała. Wprowadzony doustnie chroni przed infekcjami *Proteus vulgaris*, zaś podawany podskórnie jest skuteczny przy zwalczaniu infekcji bakteriami Gram-ujemnymi i Gram-dodatnimi.

Mikroorganizm, wytwarzający antybiotyk 810 A, został wyodrębniony z gleby jako pojedyncza kolonia. Kolonię tę przeniesiono na płytę z pożywką o następującym składzie:

Pożywka A	
ekstrakt drożdżowy	10 g
dekstroza	10 g
agar	20 g
woda destylowana	1000 ml

Po kilku dniach wzrostu mikroorganizm wytwarzał antybiotyk 810 A. Antybiotyk reprodukowano następnie w kolbach, umieszczonych na wytrząsarce, a na podstawie porównawczych badań biologicznych i chemicznych, przeprowadzonych z tym antybiotykiem i z innymi, znanymi, stwierdzono, że 810 A jest antybiotykiem nowym.

Taksonomia i morfologia antybiotyku 810 A.

Mikroorganizm, wytwarzający antybiotyk 810 A, zidentyfikowano jako *Streptomyces griseus*, a kultury jego są zdeponowane pod numerami NRRL 3851, NRRL 3951, NRRL 3953 i NRRL 3952. Taksonomia, którą posłużono się w identyfikacji jest opisana w „Bergey's Manual of Determinative Bacteriology”, wydanie VII oraz w książce S. A. Waksmana „The Actinomycetes” Vol. 2 (1961).

Opis, wytwarzanie melaniny i przyswajanie węgla przypominają *Streptomyces griseus* — według danych „International Journal of Systemic Bacteriology”, wydanie VII (1957), ponieważ grupa *Streptomyces griseus* została podzielona w r. 1959, dwa lata po wydrukowaniu tego wydania. Jednakowoż zarówno w dziele Waksmana, jak i w „International Journal of Systemic Bacteriology”, *Streptomyces griseus* jest zdefiniowany jako „wytwarzający grzyźną szczep *Streptomyces griseus*” lub jako „wytwarzający grzyźną lub substancje grzyźno-podobne”.

Streptomyces griseus, NRRL 3851 jest szczepem różniącym się od klasycznego opisu w dziełach Bergey'a i Waksmana tym, że ma powietrzną grzyźnię o zabarwieniu głównie żółtym, a na niektórych pożywkach zielonawo-żółtym oraz nieco innym przyswajaniem węgla. Na stronach 111—133 „The Actinomycetes” Waksman opisuje tę rodzinę *Streptomyces griseus* jako obejmującą wiele pokrewnych gatunków i szczepów, charakteryzujących się wzrostem substratu bezbarwnego lub o zabarwieniu oliwkowym, grzyźni powietrznej o barwie żółtawej o odcieniu zielonawym lub zielonawo-szarej, melaniną ujemną, sporoforami prostymi lub zgiętymi, produkowanymi w kępach, zarodnikami owalnymi. W poniższych tablicach scharakteryzowano kultury szczepów, wytwarzających antybiotyk 810 A oraz kultury szczepów *Streptomyces griseus* i *Streptomyces griseinus*.

W tablicach 1 i 1a porównano szczep NRRL 3851 z opisany przez Bergey'a i Waksmana szczepem *Streptomyces griseus* oraz z opisany przez Waksmana szczepem *Streptomyces griseinus*.

Tablica 1
Porównawcza charakterystyka szczepu NRRL 3851

NRRL 3851	<i>Streptomyces griseus</i> (Bergey ¹)	<i>Streptomyces griseus</i> (Waksman ²)	<i>Streptomyces griseinus</i> (Waksman ²)
Sporofory w postaci monopodialnie rozgałęzionych wiązek, łańcuchy zarodników proste, do lekko falistych. Zarodniki kuliste do owalnych, średnica 0,9 μ do 0,9 $\times$ 1,2 μ w łańcuchach po około 10—15 jednostek. Strzępki grzyźni wegetatywnej szerokości 0,9 μ (agar z gliceryną i asparaginą — 970 X)	Grzyźnia powietrzna: obfita, pudrowata, o barwie zielonej (water green). Sporofory produkowane w wiązkach. Zarodniki kuliste do elipsoidalnych, 0,8 do 1,7 $\times$ 0,8 μ . Wzrost wegetatywny: kolonie gładkie lub pofałdowane bezbarwne (colorless), później przechodzące w oliwkowe (olive-buff)	Sporofory proste, produkowane w wiązkach. Zarodniki kuliste do owalnych, 0,8 $\times$ 0,8 do 1,7 μ ; powierzchnia gładka	Sporofory proste, produkowane w gronach lub wiązkach, bez spiral. Zarodniki pałeczkowate 1,0 do 1,8 $\times$ 0,8 do 1,0 μ

¹ „Bergey's Manual of Determinative Bacteriology”, wydanie VII (1957)
² Waksman, S.A., „The Actinomycetes”, vol. 2 (1961)

Jeżeli nie podano inaczej, powyższe obserwacje poczyniono po upływie 3 tygodni inkubacji w temperaturze 28°C. Odczyn stosowanych w badaniach pożywek był mniej więcej obojętny, to jest wartość pH była w granicach 6,8—7,2. Próby fizjolo-

giczne przeprowadzano po upływie 7 i 22 dni. Stosowane w opisie barwy są zgodne ze zdefiniowanymi w „Color Harmony Manual”, wydanie IV, 1958, Container Corporation of America.

Antybiotyk 810 A. Utylizacja węglowodanów.

Tablica 1a
Porównawcza charakterystyka szczepu NRRL 3851

Pożywka	NRRL 3851	<i>S. griseus</i> (Bergey)	<i>S. griseus</i> (Waksman)	<i>S. friseinus</i> (Waksman)
1	2	3	4	5
Agar z pastą pomidorową i mąką owsianą	Wzrost vegetatywny: spód o barwie brązowej, płaski, rozprzestrzeniający się. Grzybnia powietrzna: środek o barwie brązowej do szarawożółtej, krawędzie o barwie brązowo-żółtej. Brak rozpuszczalnego pigmentu.			
Agar z gliceryną i asparaginą	Wzrost vegetatywny: spód o barwie brązowej, płaski, rozprzestrzeniający się. Grzybnia powietrzna: pudrowata, o barwie brązowawo-żółtej. Rozpuszczalny pigment: jasny o barwie brązowawo-żółtej.			
Agar Czapek-Doxa (agar z sacharozą i azotanami)	Wzrost vegetatywny: spód o barwie żółtawo-pomarańczowej, płaski, rozprzestrzeniający się. Grzybnia powietrzna: pudrowata, o barwie brązowawo-żółtej (kilka odcieni, głównie na krawędziach barwa brązowawo-żółta), wzrost jasny w centrum, ciemniejszy na krawędziach. Rozpuszczalny pigment: jasny, o barwie brązowawo-żółtej.		Wzrost rzadki, rozprzestrzeniający się, bezbarwny, następnie przechodzi w oliwkowy. Grzybnia powietrzna: gęsta, pudrowata, o barwie zielonej, pigment nierozpuszczalny.	Wzrost substratowy pomarszczony, spód o barwie kremowej do brązowawej. Grzybnia powietrzna o barwie białej do kremowej z odcieniem jasnozielonym. Brak rozpuszczalnego pigmentu.
Agar z albuminą jaja	Wzrost vegetatywny: spód o barwie szarawo-brązowej, płaski, rozprzestrzeniający się. Grzybnia powietrzna: barwa brązowo-żółta z zielonym odcieniem, wzrost jasny w centrum, ciemniejszy na krawędziach.			
Agar odżywczy	Wzrost vegetatywny: spód o barwie brązowawo-żółtej. Grzybnia powietrzna: aksamitna, o barwie brązowawo-żółtej, krawędzie o barwie brązowawo-żółtej.		Wzrost obfity, prawie przezroczysty, kremowy. Grzybnia powietrzna pudrowata, o barwie białej do jasnoszarej. Brak rozpuszczalnego pigmentu.	
Agar		Obfity, kremowy prawie przezroczysty wzrost. Grzybnia powietrzna pudrowata, o barwie białej do jasnoszarej. Brak rozpuszczalnego pigmentu.		

Tablica 1a (ciąg dalszy)

1	2	3	4	5
Agar syntetyczny		Rzadki, rozprze- strzeniający się, bezbarwny wzrost, później przecho- dzący w oliwko- wy. Grzybnia po- wietrzna gęsta, pu- drowata, o barwie zielonej.		
Skos żelatynowy	Płatkowaty, kremowy wzrost, opadający na dno probówki. Cał- kowite upłynnienie.		Zielonawo-żółty wzrost powierzch- niowy z brązowa- wym odcieniem. Szybkie upłynnie- nie.	Wzrost kremowy z odcieniem brązo- wawym. Grzybnia powietrzna nie występuje, wzglę- nie skąpa, o bar- wie białej. Szyb- kie upłynnienie.
Agar odżywczy z żelatyną	Wzrost wegetatywny: kremowy. Grzybnia powietrzna: jasna o barwie brązowawo-żółtej. Brak rozpuszczalnego pigmentu. Upłyn- nienie żelatyny dobre.			
Mleko lakmusowe	Częściowy pierścień. Wzrost wegetatywny: brązowa- wy. Grzybnia powietrzna: skąpa, biaława. Peptonizacja, następnie alkalizacja.		Kremowy pier- ścień. Koagulacja z szybką peptoni- zacją, następnie alkalizacja.	Wzrost kremowy. Koagulacja i pep- tonizacja.
Mleko odtłuszczone	Częściowy pierścień. Wzrost wegetatywny: brązowa- wy. Brak grzybni powietrznej. Rozpuszczalny pigment: jasno- brązowy. Peptonizacja, następnie alkalizacja.			
Agar z odtłuszczonym mlekiem	Wzrost wegetatywny: kremowy, płaski. Grzybnia powietrzna: ską- pa, o barwie żółtowo-białej do kremowej. Rozpuszczalny pigment: bardzo jasnobrązowy. Hydroliza kazeiny.			
Agar z glukozą			Wzrost podwyż- szony w centrum, promienisty o bar- wie kremowej do pomarańczowej, brzegi uniesione.	
Bulion z glukozą		Obfite, żółtawe obłe otwory z zie- lonawym odcie- niem, silne sfałdo- wanie.		
Agar skrobiowy		Rzadki, rozprze- strzeniający się, przezroczysty wzrost. Hydroliza skrobi.	Wzrost skąpy, roz- prze- strzeniający się, przezroczysty, silna hydroliza.	Wzrost bezbarwny do kremowego. Grzybnia po- wietrzna o barwie szarawo - oliwko- wej. Szybka hy- droliza.

Tablica 1a (ciąg dalszy)

1	2	3	4	5
Agar odżywczy ze skrobią	Wzrost vegetatywny: kremowy. Grzybnia powietrzna: jasna, o barwie brązowawo-żółtej. Brak rozpuszczalnego pigmentu, hydrolyza dobra.			
Skos ziemniaczany	Wzrost vegetatywny: jasnobrązowy. Grzybnia powietrzna: umiarkowanie obfita, brązowa. Słabe zbrązowanie ziemniaka.	Żółtawy, pomarszczony wzrost, pokryty białą, pudrowatą grzybnią powietrzną.	Wzrost pomarszczony, żółtawy do brązowawego, pokryty białą, pudrowatą grzybnią powietrzną.	Wzrost pomarszczony, żółtawo-biały. Grzybnia powietrzna o barwie szarawo-białej z odcieniem oliwkowym.
Agar z jabłczanem wapnia	Wzrost vegetatywny: płaski, rozprzestrzeniający się, przeświecający, bezbarwny na krawędziach, a nieprzejrzysty i kremowy w centrum. Grzybnia powietrzna: umiarkowanie obfita, o barwie kremowej do żółtej. Brak rozpuszczalnego pigmentu.		Zielony lub żółty rozpuszczalny pigment w pożywkach z jabłczanem i bursztynianem wapnia.	Brak rozpuszczalnego pigmentu na pożywkach z jabłczanem i bursztynianem wapnia.
Agar odżywczy z tyrozyną	Wzrost vegetatywny: płaski, rozprzestrzeniający się, kremowy. Grzybnia powietrzna o barwie żółtawo-brązowej z zielonawym odcieniem, brzegi o barwie brązowawo-żółtej. Rozpuszczalny pigment: bardzo jasnobrązowy. Rozłożone kryształy tyrozyny.		Często produkowany ciemny pigment.	Brak pigmentu.
Agar z żelazem, peptonem i ekstraktem drożdżowym Produkcja H ₂ S Skosy Loefflera z osoczem krwi	Wzrost vegetatywny: kremowy. Grzybnia powietrzna: brak. Rozpuszczalny pigment: brak. Melanina negatywna. Wzrost vegetatywny: o barwie brązowej. Grzybnia powietrzna: o barwie lekko żółtawej. Rozpuszczalny pigment: brązowawy. Całkowite upłynnienie.		negatywna	negatywna
Zakres temperatury (skosy agarowe z ekstraktem drożdżowym, dekstrozą i solami) Wzrost mikroaerofilny (skos o głębokości 40 mm) Z ekstraktem drożdżowym, dekstrozą i solami	28°C — dobry wzrost 37°C — dobry wzrost 50°C — brak wzrostu. Dobry wzrost pokrywający całą powierzchnię skosu.	Optymalna temperatura — 37°C Aerobowy		
Redukcja azotanów do azotynów	negatywna	pozytywna	pozytywna	pozytywna

Szczep *Streptomyces griseus* NRRL 3851 zbadano również na zdolność utylizacji względnie asymilacji różnych węglowodanów, hodując organizmy na zasadowej syntetycznej pożywce (T. G. Pridham, D. Gottlieb, 1948), zawierającej 1% węglowodanów, w temperaturze 28°C, w ciągu 3 tygodni. W tablicy 2 przedstawiono utylizację względnie asymilację węglowodanów przez *Streptomyces griseus* NRRL 3851. Znaczenie symboli użytych w tablicy 2 jest następujące: + dobry wzrost, ± słaby wzrost, — brak wzrostu.

Charakterystyka przedstawiona w tablicach 1, 1a i 2 miała na celu sklasyfikowanie szczepu *Streptomyces griseus* NRRL 3851 według klucza opisanego w „Bergey's Manual of Determinative Bacteriology”, wydanie VII, str. 694—829 (1957) oraz w „The Actinomycetes” vol. 2, str. 61—292 (1961). Porównanie szczepu NRRL 3851 ze znanymi gatunkami wskazuje na jego podobieństwo do *Streptomyces griseus*.

Występują pewne różnice morfologiczne, jak np. w zabarwieniu grzybni powietrznej, która w przypadku *Streptomyces griseus* ma barwę głównie żół-

tą lub zielonawo-żółtą, lecz w świetle znacznej liczby cech podobnych i jedynie nieznacznych różnic, nie ma podstaw do nadania szczepowi NRRL 3851 odrębnej nazwy gatunkowej. Tak więc mikroorganizm z kultury NRRL 3851, wytwarzający antybiotyk 810 A został zidentyfikowany jako gatunek *Streptomyces griseus*.

Charakterystyka kultur NRRL 3951, NRRL 3953 i NRRL 3952 mikroorganizmu z gatunku *Streptomyces griseus* jest przedstawiona w tablicy 2a.

Tablica 2

Węglowodan	Kultura NRRL 3851	Węglowodan	Kultura NRRL 3851
glukoza	+	laktoza	+
arabinoza	+	inozytol	±
ksyloza	+	sacharoza	±
maltoza	+	ramnoza	±
mannoza	+	rafinoza	±
fruktoza	—	celuloza	—
mannitol	+		

Tablica 2a

Charakterystyka kultur gatunku <i>streptomyces griseus</i> wytwarzających antybiotyki 810 A			
Pożywka	NRRL 3951	NRRL 3953	NRRL 3952
Morfologia	Sporofory tworzą wiązki z łańcuchami zarodników prostymi do lekko sfalowanych. Zarodniki kuliste do owalnych — średnicy 0,9 μ do 0,9 $\times$ 1,2 μ — w łańcuchach składających się z 10—16 jednostek.		
Agar z pastą pomidorową i makią owsianą	Wzrost vegetatywny: dobry, płaski, rozprzestrzeniający się, o barwie brązowej. Grzybnia powietrzna: pudrowata, o barwie brązowej z zielonawym odcieniem Rozpuszczalny pigment: barwa jasnobrązowa		
Agar z gliceryną i asparaginą	Wzrost vegetatywny: dobry, płaski, brązowy Grzybnia powietrzna: pudrowata, o barwie brązowej z zielonym odcieniem i pasmami szaro-zielonymi. Rozpuszczalny pigment: barwa jasnobrązowa		
Agar Czapek-Doxa	Wzrost vegetatywny: płaski, rozprzestrzeniający się, przezroczysty Rozpuszczalny pigment: barwa jasnobrązowa Grzybnia powietrzna: umiarkowanie obfita, o barwie brązowej		
Agar z ekstraktem drożdżowym, dekstrozą i solami	Wzrost vegetatywny: płaski, rozprzestrzeniający się, barwa brązowa Grzybnia powietrzna: dobra, pudrowata, barwa beżowa Rozpuszczalny pigment: barwa jasnobrązowa		
Rozpuszczalny pigment na agarze z peptonem, żelazem i ekstraktem drożdżowym	brak	brak	brak

Badania in vitro i in vivo. Biologiczną charakterystykę antybiotyku 810 A in vitro prowadzono metodą krążkowo-dyfuzyjną na płytkach z agarem. Krążki zwilżone roztworem antybiotyku umieszczano na powierzchni płytek Petriego, na które wlewano po 5 ml agaru odżywczego (Difco) z 0,2% dodatkiem ekstraktu drożdżowego z posiewem 5 lub 10 ml hodowli posiewowej na 150 ml pożywki, prowadząc inkubację w temperaturze 25°C lub w temperaturze 37°C, w ciągu 16 godzin.

Powyższa metoda opisana jest w publikacji „Cross

Resistance Studies and Antibiotic Identification”, Applied Microbiology, vol. 6, str. 392—398 (1958). W poniższych tablicach 3—5 przedstawiono wyniki badań własności antybakteryjnych i badań oporności krzyżowej, z podaniem organizmów, stosowanych do badań i warunków badań.

Do badań stosowano płytki Analtech G. F. Plates. Są to płytki z żelu krzemionkowego z siarczanem wapnia jako środkiem wiążącym, o grubości 0,25 mm. Analtech Inc., 100 South Justison Street, Wilmington, Delaware, 19801.

Tablica 3
Antybiotyk 810 A spektrum antybakteryjne. Aktywność in vitro

Organizm stosowany do badań	Warunki badania		Srednica strefy zahamowania mm*
	Posiew** 150 ml/ml	Temperatura inkubacji °C	810 A 5 mg/ml
<i>Escherichia coli</i>	5	25	15
<i>Bacillus species</i>	5	25	22
<i>Proteus vulgaris</i>	5	37	29
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	25	7
<i>Serratia marcescens</i>	5	25	7
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	25	26
<i>Bacillus subtilis</i>	5	25	33
<i>Sarcina lutea</i>	5	25	26
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	37	19
(odporny na streptomycynę i streptotrycynę)			
<i>Streptococcus faecalis</i>	15	37	7
<i>Alcaligenes faecalis</i>	5	37	25
<i>Brucella bronchiseptica</i>	10	37	21
<i>Salmonella gallinarum</i>	10	25	15
<i>Vibrio parcolans</i>	10	27	36
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	5	25	15

* 7 mm średnica krążka (brak strefy zahamowania)

** Hodowla prowadzona w ciągu nocy rozcieńczona do odczytu 60 m na kolorymetrze Lumetron

Tablica 4
Antybiotyk 810 A — oporność krzyżowa; badania in vitro

Szczep <i>Escherichia coli</i> **	Warunki badania		Srednica strefy zahamowania mm*
	Posiew*** ml/150 ml	Temperatura inkubacji °C	810 A 5 mg/ml
Wrażliwy szczep wyjściowy	5	25	15
Odporny na: streptomycynę	5	25	13
streptotrycynę	10	25	17
oksamycynę	10	25	10
pleocydynę	10	37	26
chloramfenikol	10	25	7
chlortetracyklinę	10	25	7
oksytetracyklinę	10	25	7
neomycynę	10	37	20
tetracyklinę	10	25	7
wiomycynę	10	37	17
polimyksynę	10	25	15
gryzeinę	5	25	15

* 7 mm = średnica krążka (brak strefy zahamowania).

** Próby wykonane z serią szczepów *E. coli*, izolowanych z tej samej kultury wyjściowej, a następnie wystawionych na działanie indywidualnych antybiotyków.

*** Hodowla prowadzona w ciągu nocy, rozcieńczona do odczytu 60 m na kolorymetrze Lumetron.

Tablica 5
Antybiotyk 810 A spektrum efektów specjalnych; badania in vitro

Escherichia coli W-MB-60 (ze specjalnymi dodatkami, jak zaznaczono)	Warunki badania		Srednica strefy zahamowania mm*
	Posiew** ml/150 ml	Temperatura inkubacji °C	810 A 5 mg/ml
Kontrola (bez dodatków)	5	25	13
0,1 m bufor fosforanowy — pH = 5	5	25	13
0,1 m bufor fosforanowy — pH = 7	5	25	16
0,1 m bufor fosforanowy — pH = 9	5	25	18
20% plazma krwi ludzkiej	5	25	15
Zywica kationitowa (Dow ET 91—1%; stężenie agaru obniżone do 1% jedynie w przypadku płyt z żywicą)	5	25	12

* Srednica krążka 7 mm

** Hodowla prowadzona w ciągu nocy, rozcieńczona do odczytu 60 m na kolorymetrze Lumetron

Antybiotyk 810 A in vivo. Charakterystyka biologiczna in vivo wykazuje, że antybiotyk 810 A ma szerokie spektrum, chroniące przeciwko infekcjom 25 trzema gatunkami *Proteus*, dwoma *Salmonella*, jednym szczepem *Escherichia coli*, dwoma *Klebsiella* i trzema gram-dodatnimi organizmami: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* i *Diplococcus pneumoniae*.

Sposób prowadzenia badań. Samice białych myszy o przeciętnej wadze 20—23 g zakażono dootrzewnowo mikroorganizmami w ilości 3—20-krotnie przewyższającej wartości określone jako śmiertelne dla 50% zakażonych zwierząt kontrolnych (3—20 LD₅₀). 35 W momencie zakażenia i w 6 godzin po zakażeniu stosowano określoną terapię. Badano również zjadliwość szczepu i toksyczność, przejawianą przez antybiotyk w stosunku do niezakażonych myszy. W 7 dni po infekcji badanie zakończono i obliczono 40 ilość antybiotyku, potrzebną do ochrony 50% zakażonych i poddanych terapii zwierząt, stosując sposób Knudsen i Curtisa; J. Amer. Stat. Assoc. vol. 42 str. 282 (1947).

Wyniki. Wyniki powyższych badań przedstawione są w tablicy 6. Wykazują one, że antybiotyk 810 A, 45 otrzymany z hodowli szczepu NRRL 3851, jest antybiotykiem o szerokim spektrum, chroniącym przed mikroorganizmami zarówno gram-dodatnimi, jak i gram-ujemnymi.

Antybiotyk 810 A przejawia aktywność przy wprowadzeniu doustnym (p.o.), jednak najlepsze 50 wyniki uzyskuje się przy podawaniu podskórnym (s.c.) lub dootrzewnowym (i.p.). Kompleks antybiotyczny nie zabija myszy przy dwóch dawkach po 1 mg produktu, wprowadzonych dootrzewnowo lub przy dwóch dawkach po 18 mg, wprowadzanych 55 podskórnym lub doustnie.

Jak wyżej wspomniano, antybiotyk 810 A wytwarza się na drodze aerobowej hodowli, w kontrolowanych warunkach, pożywek zaszczepionych kulturami *Streptomyces griseus* NRRL 3851, NRRL 3951, NRRL 3953, NRRL 3952.

Do wytwarzania antybiotyku 810 A nadają się również pożywki, stosowane do wytwarzania innych antybiotyków. Pożywki takie zawierają 60 65

dla węgla i azotu przyswajalnego przez mikroorganizmy oraz nieorganiczne sole.

Tablica 6
Antybiotyk 810 A. Aktywność in vivo

Mikroorganizm stosowany do badań	Sposób wprowadzenia	ED ₅₀ × × 2 dawki
<i>Proteus vulgaris</i>	i.p.	33
	s.c.	500
	p.o.	12 100
<i>Proteus mirabilis</i>	i.p.	200
	p.o.	5 000
<i>Salmonella</i> <i>schottmuelleri</i>	i.p.	419
	s.c.	9 000
<i>Escherichia coli</i>	i.p.	3 750
<i>Escherichia coli</i>	i.p.	1 330
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	i.p.	2 500
<i>Salmonella gallinarum</i>	i.p.	1 670
<i>Salmonella pullorum</i>	i.p.	625
<i>Diplococcus</i> <i>pneumoniae</i>	i.p.	258
	i.p.	927
<i>Staphylococcus aureus</i>	i.p.	927
<i>Streptococcus pyogenes</i>	i.p.	625

Ogólnie jako źródło przyswajalnego węgla można stosować osobno lub w mieszaninie węglowodany takie, jak cukry, np. glukozę, arabinozę, maltozę, ksylozę, mannitol itp., skrobię w postaci ziarna np. owsa czy ryżu, skrobi kukurydzianej, mąki kukurydzianej. Ilość źródła względnie źródeł węglowodanów jest częściowo zależna od innych składników, na ogół jednak wynosi 1—6% wagowych tej pożywki. Jako źródło azotu w procesie fermentacyjnym może być stosowany w zasadzie każdy materiał białkowy.

Odpowiednimi źródłami są np. hydrolizaty drożdżowe, mąka sojowa, hydrolizaty kazeiny, wyciąg z namoku kukurydzianego, oleje fuzlowe, pasta pomidorowa itp. Źródła azotu, osobno lub w mieszaninie, stosowane są w ilościach od około 0,2 do 60 65 6% wagowych wodnej pożywki.

Typowe pożywki, nadające się do wytwarzania antybiotyku 810 A, są podane poniżej. Pożywki te, jak również pożywki, opisane w przykładach, mają charakter jedynie ilustracyjny i nie ograniczają zakresu wynalazku.

Pożywka I

ekstrakt drożdżowy Difco	10,0 g
glukoza	10,0 g
*bufor fosforanowy	2,0 ml
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,05 g
woda destylowana	1000,0 ml
agar Difco	25,0 g

* bufor fosforanowy

KH ₂ PO ₄	91,0 g
Na ₂ HPO ₄	95,0 g
woda destylowana	1000,0 g

Pożywka II

ekstrakt wołowy	3,0 g
*NZ Amine	10,0 g
dekstroza	10,0 g
NaCl	5,0 g
woda destylowana	1000,0 ml
pH doprowadzone do 7,2 przy pomocy NaOH	

* enzymatycznie zhydrolizowana kazeina

Pożywka III

dekstroza	10,0 g
asparagina	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,1 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g
ekstrakt drożdżowy	0,5 g
*mieszanina pierwiastków śladowych Nr 2	10,0 ml
woda destylowana	1000,0 ml

* mieszanina pierwiastków śladowych

Nr 2:

FeSO ₄ · 7 H ₂ O	1,0 g
MnSO ₄ · H ₂ O	1,0 g
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	25,0 mg
CaCl ₂	100,0 mg
H ₃ BO ₃	56,0 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	19,0 mg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	200,0 mg
woda destylowana	1000,0 ml

Pożywka IV

sok pomidorowy z dodatkiem soku z marchwi, buraka i pietruszki	100,0 ml
mąka sojowa Staley 4S	20,0 g
dekstroza	2,0 g
agar	25,0 g
woda destylowana	do 1000,0 ml

Pożywka V

autolizat drożdżowy (Ardamine)	10,0 g
glukoza	10,0 g
*bufor fosforanowy	2,0 ml
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,05 g

woda destylowana 1000,0 ml
pH doprowadzone do 6,5 przy pomocy NaOH

* bufor fosforanowy

5	KH ₂ PO ₄	91,0 g
	NaHPO ₄	95,0 g
	woda destylowana	1000,0 ml

Pożywka VI

10	wyciąg z namoku kukurydzianego (w odniesieniu do cieczy)	40,0 g
	dekstroza	20,0 g
	NaCl	2,5 g
15	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g
	Polyglycol 2000	0,25%
		objętościowych (dodaje się do każdej kolby indywidualnie)

20 woda destylowana 1000,0 ml
pH — doprowadza się do 7,0 za pomocą NaOH

25 Polyglycol 2000 jest to środek przeciwko pienieniu, będący polimerem glikolu propylenowego o przeciętnym ciężarze cząsteczkowym 2000. Dow Chemical Company Midland, Michigan.

Pożywka VII

	Posiew	Wytwarzanie
30	L-asparagina	5,0 g
	L-histydyna	4,0 g
	DL-fenylalanina	—
	glutaminian jedno-	2,0 g
35	sodowy	—
	NaCl	5,0 g
	K ₂ HPO ₄	2,0 g
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,4 g
	MnSO ₄ · H ₂ O	0,1 g
40	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1 g
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,05 g
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,0 g
	gliceryna	20,0 g
	sacharoza	2,5 g
45	woda destylowana	*1000,0 ml **1000,0 ml

* pH doprowadzone do wartości 7,0 za pomocą NaOH

** pH doprowadzone do wartości 7,1 za pomocą NaOH

Pożywka VIII

50	wyciąg mięsny	0,3%
	NaCl	0,5%
	NZ Amine	1%
	dekstroza	1%
55	pH = 7,0	

60 Fermentację prowadzi się w temperaturze 20—37°C. Optymalne wyniki uzyskuje się prowadząc fermentację w temperaturze 22°C—30°C. pH pożywek do hodowli Streptomyces griseus NRRL 3851 i wytwarzania antybiotyku 810A winno wynosić 5,5—8,0.

65 Na małą skalę wytwarzanie antybiotyku 810 A korzystnie jest przeprowadzać, szczepiąc odpowiednią pożywkę kulturą, wytwarzającą antybiotyk, po

czym utrzymywać ją w stałej temperaturze 24—28°C na wytrząsarce, w ciągu dłuższego okresu czasu, np. w ciągu kilku dni. Po zakończeniu okresu inkubacji usuwa się grzybnie, a przesączoną brzeczkę poddaje się badaniom.

W praktyce wytwarzanie antybiotyku 810 A prowadzi się w sterylizowanym naczyniu, przeprowadzając posiew jedno-, dwu-, trzy- lub czterokrotnie. W stadium posiewu pożywką może być jakakolwiek odpowiednia kombinacja źródeł węgla i azotu takła, jak np. jedna z wyżej opisanych pożywek I—VIII. Naczynie z posiewem wytrząsa się w termostatowej komorze, utrzymywanej w temperaturze około 28°C w ciągu 1—3 dni, a uzyskaną hodowlę bądź to wykorzystuje się do drugiego posiewu, bądź też szczepi się nią pożywkę produkcyjną. Jeżeli stosuje się posiew pośredni, to naczynie z tym posiewem traktuje się zasadniczo w taki sam sposób, to znaczy zawartość naczynia stosuje się do szczepienia pożywki produkcyjnej, szczepione naczynie wytrząsa się w stałej temperaturze w ciągu kilku dni, a po zakończeniu okresu inkubacji zawartość naczyni poddaje się wirowaniu w celu usunięcia grzybni. Pozostałą ciecz zależa się i oczyszcza, otrzymując antybiotyk 810 A.

Przy produkcji na większą skalę korzystnie jest przeprowadzać wytwarzanie antybiotyku 810 A w odpowiednich zbiornikach, wyposażonych w mieszadło i urządzenia do napowietrzania pożywki. Według tego sposobu, pożywkę przygotowuje się w zbiorniku, w którym następnie wyjałowia się ją przez podgrzanie do temperatury około 120°C. Po ochłodzeniu wyjałowioną pożywkę szczepi się szczepem produkcyjnym i prowadzi fermentację w ciągu kilku, np. 2—4 dni, mieszając i/lub napowietrzając pożywkę, utrzymuje się temperaturę w zakresie 24—28°C. Zmiany w rozwoju posiewu i w pożywce produkcyjnej umożliwiają kilkukrotny wzrost ilości wyprodukowanego antybiotyku oraz wzrost jego mocy.

Oznaczanie antybiotyku 810 A z zastosowaniem *Proteus vulgaris*.

Dogodnym sposobem oznaczania antybiotyku 810 A jest metoda krążkowo-płytkowa z zastosowaniem szczepu *Proteus vulgaris* MB-838 (ATCC 21100 i NRRL B-3361), hodowanego na agarze skośnym (Difco) z 0,2% dodatkiem ekstraktu drożdżowego (Difco). Zaszczepione skosy inkubuje się w temperaturze 37°C, w ciągu 18—24 godzin, a następnie aż do użycia przechowuje się w lodówce. Zaszczepione skosy można przechowywać w ciągu tygodnia.

Posiew dla płyt testowych przygotowuje się codziennie, szczepiąc w kolbie Erlenmayera 50 ml bulionu odżywczego (Difco) z 0,2% dodatkiem ekstraktu drożdżowego (Difco) kulturą zeszkobaną ze skosów. Inkubację prowadzi się na wytrząsarce w temperaturze 37°C, w ciągu 18—24 godzin. Następnie bulion rozcieńcza się do 40% przepuszczalności światła o długości fali 660 mμ, mierzonej na przyrządzie Bausch and Lomb Spectronic 20, 0,2% roztworem ekstraktu drożdżowego. Jako odniesienie stosuje się nieszczepiony bulion. Odpowiednio rozcieńczony bulion (30 ml) służy do szczepienia 1 litra pożywki.

Jako pożywkę testową stosuje się agar odżywczy (Difco) z 0,2% dodatkiem ekstraktu drożdżowego (Difco), wyjałowiony w autoklawie i ochłodzony do temperatury 50°C. Zaszczepioną pożywkę rozlewa się na płytki Petriego, w ilości po 10 ml na płytkę i pozostawia do zastygnięcia.

Na tak przygotowanych płytkach przeprowadza się test krążkowo-płytkowy, stosując krążki bibuły o średnicy 0,5 cala. Płytki testowe inkubuje się w ciągu 20—24 godzin w temperaturze 37°C. Wyniki wyraża się w mm średnicy strefy zahamowania. Określa się aktywność względną, odniesioną do wzorca roboczego (reference standard), wyrażając ją w μg/ml. Przeprowadzając badania w sposób ilościowy można wykryć antybiotyk w ilości 2—4 μg/ml.

Oznaczanie antybiotyku 810 A z zastosowaniem *Vibrio percolans*.

Oznaczanie antybiotyku 810 A z zastosowaniem *Vibrio percolans* (MB-1272) przeprowadzano również metodą krążkowo-płytkową, stosując krążki bibuły o średnicy 0,5 cala. Płytki do badań przygotowywano stosując agar odżywczy (Difco) z dodatkiem ekstraktu drożdżowego Difco w ilości 2,0 g/l. Na płytki wylewano po 10 ml pożywki. Prowadzoną w ciągu nocy hodowlę organizmu testowego *Vibrio percolans* (MB-1272) w bulionie odżywczym z 0,2% dodatkiem ekstraktu drożdżowego rozcieńczano wyjałowionym fizjologicznym roztworem soli do zawiesiny o 40% przepuszczalności światła o długości fali 660 mμ. Zawiesinę tę wprowadzano do pożywki w ilości 20 ml/l, a następnie pożywkę rozlewano na płytki.

Płytki do badań przechowywano nie dłużej niż 5 dni, w temperaturze 4°C. Po nałożeniu krążków nasyconych antybiotykami, płytki inkubowano w temperaturze 28°C, w ciągu 3—24 godzin. Wielkość strefy zahamowania wyrażano w mm średnicy.

Inaktywacja bakteryjna antybiotyku 810 A.

Próbowane *in vitro* badania miały na celu porównawcze określenie odporności antybiotyku 810 A na inaktywację przez bakterie w stosunku do odporności cefalosporyny C, cefalosporydyny i cefalotyny. Badania te wykazały, że antybiotyk 810 A jest bardziej niż wyżej wymienione odporny na działanie pewnych mikroorganizmów.

Badanie przeprowadzono z zastosowaniem bakterii, które całkowicie inaktywują cefalosporynę C, mianowicie *Alcaligenes faecalis* (MB-9).

a) Hodowla komórek bakteryjnych. Komórki *Alcaligenes faecalis* (MB-9) wyhodowano w sposób następujący: zawartość próbówki wymieszano z kilkoma ml bulionu odżywczego, zawierającego 0,2% dodatek ekstraktu drożdżowego. Zawiesinę w ilości jednego oczka naniesiono na powierzchnię skosu agarowego i inkubowano w ciągu 18 godzin w temperaturze 37°C. Skosy przechowywano w temperaturze 5°C, nie dłużej niż tydzień po inkubacji. Oczko powierzchniowego wzrostu z każdej kultury przenoszono aseptycznie do 50 ml bulionu z 0,2% dodatkiem ekstraktu drożdżowego i inkubowano na wytrząsarce w ciągu 18 godzin w temperaturze 28°C. Następnie hodowlę poddano wirowaniu z prędkością 4000 obrotów na minutę, w ciągu 10 minut. Ciecz zdekantowano, a pozostałe w osa-

dzie komórki dwukrotnie przemyto wyjałowionym 0,1 m buforem fosforanowym o wartości $\text{pH} = 7,5$ (6,8 g KH_2PO_4 + 7,1 g Na_2HPO_4 na litr wody destylowanej). Przemyte komórki zawieszono w roztworze 4 mg/ml antybiotyku w 0,1 m buforze fosforanowym, użytym w ilości równej 0,1 początkowej objętości hodowli bakteryjnej. Mieszaninę testową inkubowano, bez wytrząsania, na łaźni wodnej, utrzymywanej w temperaturze 37°C , w ciągu 4 godzin. Następnie mieszaninę tę poddano wirowaniu z prędkością 2000 obrotów na minutę, w ciągu 10 minut, a uzyskaną klarowną ciecz zdekantowano do wyjałowionych probówek, natychmiast zamrożono w suchym lodzie i przechowywano w tych warunkach do badań biologicznych, które zwykle przeprowadzano po 3 godzinach. Próby kontrolne inkubowano w identyczny sposób, nie wprowadzając jednak komórek bakteryjnych.

b) Zakres inaktywacji antybiotyku 810 A. Badania aktywności antybakteryjnej płynów pofermentacyjnych przeprowadzano w następujący sposób: krążki bibuły o średnicy 6 mm wysycało cieczą i umieszczano na powierzchni płytek pokrytych agarą z dodatkiem ekstraktu drożdżowego (0,2%), zakażonym odpowiednim mikroorganizmem stosowanym do badań. W przypadku *B. subtilis* (MB-964) płytki do badań przygotowywano w następujący sposób: 5 ml zawiesiny przemytych zarodników w 0,9% roztworze soli wprowadzano do 150 ml agaru z 0,2% dodatkiem ekstraktu drożdżowego, a zakażoną pożywkę rozlewano na płytki Petriego o wymiarach 15×100 mm, w ilości po 5 ml pożywki na płytkę. Płytki do badań inkubowano w ciągu nocy w temperaturze 25°C , a następnie mierzono strefy zahamowania wokół krążków.

W celu wykreślenia krzywej dla wzorca roboczego, przeprowadzono próby kontrolne z wolnym od komórek bakteryjnych antybiotykiem w rozcieńczeniach 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 i 1:32. Roztwory testowanych antybiotyków badano w pełnej ich mocy, po inkubacji w obecności przemytych komórek bakteryjnych. Wszystkie próby przeprowadzano trzykrotnie.

c) Wyniki. Procent inaktywacji obliczano w ten sposób, że na podstawie wielkości strefy zahamowania (średniej z trzech pomiarów), posługując się krzywą wzorcową, obliczano ilość antybiotyku pozostającego w badanym roztworze: wartość tę odejmowano od stężenia wyjściowego (4 mg/ml), a resztę dzielono przez stężenie wyjściowe i mnożono przez 100. W tablicach 7 i 8 przedstawiono wartości inaktywacji cefalosporyny C, cefalotyliny i antybiotyku 810 A, zmierzone w wyżej opisany sposób.

Tablica 7

Procent inaktywacji po inkubacji
z przemytymi komórkami bakteryjnymi

Próby na płytkach zakażonych *B. subtilis* (MB-964).

Antybiotyk	3 godziny inkubacji <i>Alcaligenes faecalis</i>
810 A	0
Cefalosporyna C	99+
Cefalotyna	62,5

Tablica 8

Procent inaktywacji po inkubacji
z przemytymi komórkami bakteryjnymi
Próby na płytkach zakażonych *V. percolans*
(MB-1272).

Antybiotyk	3 godziny inkubacji <i>Alcaligenes faecalis</i>
810 A	0
Cefalosporyna C	99+
Cefalotyna	50

Zbadano również odporność antybiotyku 810 A i cefalosporyny C na degradacyjny wpływ kultury *Aerobacter cloacae* (MB-2648). Mikroorganizm jest gram-ujemny i odporny na cefalosporynę C. Sporządzono mieszaniny mikroorganizmu z antybiotykiem, które inkubowano w ciągu 2 godzin i następnie badano na aktywność antybiotyczną. Metoda jest identyczna z opisaną powyżej dla *Alcaligenes faecalis*. Źródłem materiału inaktywującego jest rozcieńczony w stosunku 1:160 przesącz hodowli *Aerobacter cloacae* (MB-2648) w bulionie z 0,2% dodatkiem ekstraktu drożdżowego, wytrząsanej w ciągu 13 godzin w temperaturze 37°C . W tablicy 9 przedstawiono zmierzony w powyższy sposób przy użyciu *Vibrio percolans* (MB-1272), procent inaktywacji antybiotyku 810 A, cefalotyliny, cefalorydyny i cefalosporyny C.

Tablica 9

Procent inaktywacji po inkubacji
z ekstraktem pozbawionym komórek
Próby na płytkach zakażonych *V. percolans*
(MB-1272).

Antybiotyk	2 godziny inkubacji <i>Aerobacter cloacae</i>
810 A	16
Cefalotyna	66
Cefalorydyna	99
Cefalosporyna C	96

Stosując wyżej opisaną metodę, zbadano przedstawioną w tablicy 10 względną odporność antybiotyku 810 A na enzymatyczną inaktywację przez *Aerobacter cloacae*. Stężenie wyjściowe wynosi 250 $\mu\text{g/ml}$, wyniki wyrażono w $\mu\text{g/ml}$.

Tablica 10

Pozostała aktywność antybiotyczna ($\mu\text{g/ml}$)
Stężenie wyjściowe 250 $\mu\text{g/ml}$

Antybiotyk	Organizm stosowany do badań	2 godziny inkubacji z <i>Aerobacter cloacae</i> *
810 A	<i>B. subtilis</i>	190
Cefalotyna	<i>B. subtilis</i>	140
Cefalorydyna	<i>B. subtilis</i>	<10
810 A	<i>V. percolans</i> 1272	210
Cefalotyna	<i>V. percolans</i> 1272	85
Cefalorydyna	<i>V. percolans</i> 1272	<10

* ekstrakt pozbawiony komórek

W świetle powyższych danych jest oczywiste, że antybiotyk 810 A jest bardziej niż cefalosporyna C, cefalotyna i cefalorydyna odporny na inaktywację przez *Aerobacter cloacae*.

Ponieważ antybiotyk 810 A oraz jego sole skutecznie inhibują wzrost różnych gatunków *Salmonella*, przeto związki te mogą być stosowane jako środki dezynfekujące w gospodarstwie domowym i w przemyśle. Antybiotyk 810 A wykazuje np. aktywność w stosunku do *Salmonella schottmuellerii* i *S. gallinarum*.

Wyosabianie i oczyszczanie antybiotyku 810 A. Antybiotyk 810 A można oczyszczać drogą adsorpcji na żywicy jonitowej takiej, jak np. syntetyczna żywica anionitowa wytworzona z dekstranu, kopolimery akrylowe lub niejonowe, usieciowane polimery. Zaadsorbowany antybiotyk eluuje się z żywicy, względnie polimeru wodą lub wodno-alkoholowym roztworem odpowiedniej soli takiej, jak chlorek amonu, chlorek sodu itp. Przykładami żywic jonitowych i polimerów, które nadają się do stosowania są opisane poniżej DEAE Sephadex A-25, Amberlite IRA-68 i Amberlite XAD-2. W razie potrzeby otrzymany eluat można oczyścić po raz drugi i trzeci, w drodze adsorpcji i elucji. Z koncentratów eluatów otrzymuje się produkt oczyszczony.

Antybiotyk 810 A można rozdzielić chromatograficznie na następujące składniki: kwas 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksywaleramido)-7-metoksycefemo-3-karboksyloxy-4 i kwas 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-hydroksycynamiloiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksyloxy-4. Stosuje się następujące metody chromatograficzne:

1) Chromatografia na silnie hydrofilowych żywicach anionitowych takich, jak DEAE Sephadex A-25 z zastosowaniem układu eluującego: bromek amonu + kwas mrówkowy. Stosować można układy o różnym stężeniu, w praktyce jednak korzystnie jest stosować roztwór 0,5 m bromku amonu + 0,1 kwasu mrówkowego.

2) Chromatografia na słabo zasadowej żywicy anionitowej takiej, jak Amberlite IRA-68. Jest to rozdział grupowy, w którym surowy materiał adsorbowany jest przy wartości pH = 3 — 3,5, a eluowany jest początkowo kwasem o wartości pH około 2, a następnie mieszaniną NaCl/HCl przy wartości pH około 1.

3) Chromatografia na niejonowych, usieciowanych polimerach polistyrenowych takich, jak Amberlite XAD-2. Eluuje się odpowiednim układem wodnym, przy czym na ogół korzystnie jest stosować mieszaninę wody i niższego alkiloketonu. Typowymi eluentami, które mogą być w tym przypadku stosowane są np. 10% wodny roztwór metanolu, a następnie roztwór 50%. Zamiast 50% wodnego roztworu metanolu stosować można 20% wodny roztwór acetonu.

Indywidualne składniki otrzymane tym sposobem mogą być oczyszczane także na drodze chromatografii. Tak np. kwas 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksywaleramido)-7-metoksycefemo-3-karboksyloxy-4 (Ic) można dalej oczyścić sposobem (1) uzupełnionym odsole-
niem na adsorbencie Amberlite XAD-2. Kwas

7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-hydroksycynamiloiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksyloxy-4 można dodatkowo oczyścić, stosując chromatografię na żywicy anionitowej Sephadex A-25, eluując 0,5 m bromkiem amonu i 0,05 m kwasem octowym.

Podane wyżej nazwy handlowe środków stosowanych w tych procesach mają następujące znaczenia:

DEAE Sephadex A-25 jest syntetyczną żywicą anionitową opartą na polisacharydzie, dekstranie, w postaci chlorkowej, to jest, obsadzoną jonami chlorkowymi. Producent: Pharmacia Fine Chemicals, Inc.

Amberlite IRA-68 jest to syntetyczna żywica anionitowa; usieciowany kopolimer akrylowy, zawierający słabo zasadowe trzeciorzędowe grupy aminowe. Producent: Rohm and Haas Co., Philadelphia, Pensylwania.

Amberlite XAD-2 jest to sorbent niejonowy, usieciowany polimer styrenowy. Producent: Rohm and Haas Co., Philadelphia, Pensylwania.

Antybiotyk 810 A i jego składniki oraz sole mogą być stosowane pojedynczo lub w mieszaninie, jako aktywna grupa składników różnorodnych preparatów farmaceutycznych. Mogą być one stosowane w postaci kapsulek, tabletek, proszków lub ciekłych roztworów, jako zawiesiny lub eliksiry. Wprowadza się je doustnie, dożylnie lub domięśniowo. Odpowiednimi nośnikami, mogącymi stanowić składniki mieszanin są np. mannitol, sacharoza, glukoza lub wyjałowione ciecze takie, jak woda, fizjologiczny roztwór soli, glikole lub oleje — pochodzenia nadtowego, zwierzęcego, roślinnego lub syntetyczne takie, jak np. olej arachidowy, olej parafinowy lub sezamowy. Mieszaniny obok nośników mogą zawierać również inne składniki takie, jak stabilizatory, środki wiążące, przeciwutleniacze, środki konserwujące, środki smarne, środki dyspergujące, środki zmieniające lepkość, środki zapachowe itp. Mieszanina zawierać może również inne aktywne składniki, zwiększające spektrum aktywności antybioty-
cznej.

Wielkość dawki w znacznej mierze zależna jest od warunków leczenia i wagi żywiciela. Przy zakażeniach ogólnych wskazane jest wprowadzanie pozajelitowe, doustne przy zakażeniach jelitowych. Ogólnie dawka dzienna wynosi od około 15 do około 175 mg aktywnego składnika na kg wagi ciała, przy czym dawka ta może być wprowadzana jednorazowo lub rozdzielana na mniejsze i wprowadzana kilkakrotnie w ciągu dnia.

Mieszaniny mogą być stosowane w różnych postaciach, np. jako stałe lub ciekłe, wprowadzane doustnie formy leków. Jednostkowe dawki, ciekłe lub stałe, zawierają na ogół od około 15 do około 700 mg aktywnego składnika. Na ogół korzystne jest stosowanie dawek wielkości od około 80 do 320 mg. Przy wprowadzaniu pozajelitowym jednostką leku jest zwykle czysty składnik w wyjałowionym roztworze wodnym lub w postaci rozpuszczalnego proszku, przeznaczonego do rozpuszczenia.

Typową jednostkową dawką leku jest żelatynowa kapsułka Nr 3, zawierająca 120 mg antybiotyku 810 A lub 120 mg jednego z jego składników lub

jego soli, 20 mg laktazy i 5 mg stearynianu magnezu. Stosując większą ilość aktywnego składnika i mniejszą ilość laktazy można do kapsułki Nr 3 wprowadzać większe dawki, a jeżeli konieczne jest zmieszanie więcej niż 145 mg składników, można stosować większe kapsułki. W podobny sposób można sporządzać inne jednostkowe dawki takie, jak sprasowane tabletki i pigułki. Ilustrują to poniższe przepisy.

Napełniane na sucho kapsułki, zawierające po 120 mg związku o wzorze 2.

na kapsułkę

kwask 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksyloxy-4	120 mg
laktaza	20 mg
stearynian magnezu	5 mg
kapsułka Nr 3	145 mg

Kwas 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksyloxy-4 rozciera się na proszek Nr 60, do którego przez sito Nr 60 dodaje się laktazę i stearynian magnezu. Składniki mieszają się w ciągu 10 minut, a mieszaninę napelnia suchą kapsułką Nr 3.

Tabletki, zawierające po 250 mg związku o wzorze 2, wytwarza się, stosując na 1 tabletkę następujące składniki:

kwask 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksyloxy-4	250 mg
fosforan dwurwapiowy, U.S.P.	192 mg
stearynian magnezu	5 mg
laktaza, U.S.P.	65 mg

Aktywny składnik miesza się z fosforanem dwurwapiowym i laktazą. Mieszaninę granuluje się 15% pastą ze skrobi kukurydzianej (6 mg) i przesiewa. Suszy w temperaturze 45°C i ponownie przesiewa przez sito Nr 16. Dodaje się stearynian magnezu i sprasowuje w tabletkę o średnicy około 12,5 mm.

Roztwór iniekcyjny, zawierający w ampułce 500 mg związku o wzorze 2, wytwarza się, stosując na 1 ampułkę 500 mg kwasu 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksyloxy-4 i 2 ml wyjąłowanej wody.

Kwas 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksyloxy-4 można stosować sam lub w mieszaninie z innymi biologicznie aktywnymi składnikami, np. z innymi antybiotykami takimi, jak linkomycyna, dowolna penicylina, streptomycyna, nowobiocyna, gentamycyna, neomycyna, kolistyna, czy kanamycyna.

Niżej podane przykłady ilustrują sposób według wynalazku.

Przykład I. Probówkę z liofilizowaną kulturą *Streptomyces griseus* NRRL 3851 otwiera się ase-

ptycznie i zawartością jej szczepi się 4 skosy pożywki o następującym składzie:

Pożywka I

5	ekstrakt drożdżowy Difco	10,0 g
	glukoza	10,0 g
	*bufor fosforanowy	2,0 g
	woda destylowana	1000,0 ml
	agar Difco	25,0 g
10	* bufor fosforanowy	
	KH_2PO_4	91,0 g
	Na_2HPO_4	95,0 g
	woda destylowana	1000,0 ml

15 Skosy przygotowano w probówkach 14 ml/22 × 75 mm. Probówki zamyka się korkiem z waty, po czym wyjąławia, ogrzewając w temperaturze 120°C w ciągu 15 minut i odstawia do wystygnięcia pożywki w położeniu skośnym. Zaszczepione skosy inkubuje się w temperaturze 28°C w ciągu tygodnia, a następnie aż do użycia przechowuje w temperaturze 4°C. Hodowlą na jednym z tych skosów szczepi się przewężone kolby Erlenmayera o pojemności 250 ml, zawierające po 50 ml pożywki II. Szczepienia dokonuje się w ten sposób, że do pożywki ze skosem wprowadza się 5 ml wyjąłowanej pożywki, zeszkrobując się z powierzchni skosu hodowlę, a następnie odpipetowuje się po 1 ml cieczy do każdej z trzech kolb posiewowych. Pożywka II ma następujący skład:

Pożywka II

	wyciąg wołowy	3,0 g
	NZ Amine (enzymatycznie zhydrolizowana kazeina)	10,0 g
35	dekstroza	10,0 g
	NaCl	5,0 g
	woda destylowana	1000,0 ml
	wartość pH doprowadzono NaOH do 7,2.	

40 Kolby posiewowe umieszcza się na okres 3 dni na obracanej z prędkością 220 obrotów na minutę wytrząsarce obrotowej o 5 cm wykorbieniu. Hodowlę z kolb posiewowych szczepi się 11 przewężonych kolb Erlenmayera o pojemności po 2 litry, zawierających po 350 ml pożywki III, wprowadzając posiew w ilości 2—3% w stosunku do pożywki.

Pożywka III

	dekstroza	10,0 g
50	asparagina	1,0 g
	K_2HPO_4	0,1 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
	ekstrakt drożdżowy	0,5 g
	*mieszanina pierwiastków śladowych Nr 2	10,0 ml
55	woda destylowana	1000,0 ml
	wartość pH doprowadzona NaOH do 7,2	

60	* mieszanina pierwiastków śladowych Nr 2	
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0 g
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,0 g
	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25,0 mg
	CaCl_2	100,0 mg
	H_3BO_3	56,0 mg
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	19,0 mg
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200,0 mg
65	woda destylowana	1000,0 ml

Kolby umieszcza się na okres 4 dni na obracanej z prędkością 135—150 obrotów na minutę wytrząsarce obrotowej o 5 cm wykorbieniu, utrzymując temperaturę 28°C. Po zakończeniu inkubacji zawartość kolb miesza się razem i poddaje badaniom. Odwirowana brzeczka wykazuje 22 mm strefę zahamowania (krążki o średnicy 12,7 mm) na płycie badawczej, zakażonej kulturą *Proteus vulgaris*. Produkt stanowi antybiotyk 810 A, to jest mieszanina kwasów 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-hydroksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksyowego-4 i 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksyowego-4 (wzór 1).

Przykład II. Probówkę z liofilizowaną kulturą *Streptomyces griseus* NRRL 3851 otwiera się aseptycznie, a zawartością szczepi się skosy, opisane w przykładzie I jako pożywka I. Skosy inkubuje się w temperaturze 28°C w ciągu tygodnia, a następnie przechowuje w temperaturze 4°C. Częścią hodowli na jednym ze skosów szczepi się przewężoną kolbę Erlenmayera o pojemności 250 ml, zawierającą 50 ml pożywki III, opisanej w przykładzie I. Zaszczepioną pożywkę inkubuje się w temperaturze 28°C w ciągu 2 dni, na wytrząsarce obrotowej z 5 cm wykorbieniem, obracanej z prędkością 220 obrotów na minutę. Następnie posiew przemycia się aseptycznie odwirowuje grzybnie, zlewa ciecz pofermentacyjną, zawiesza grzybnie w takiej samej objętości fizjologicznego roztworu soli, ponownie odwirowuje i zawiesza w 0,9% roztworze chlorku sodowego. Przenyętą grzybnie szczepi się (posiew w ilości 2%) 2 przewężone kolby Erlenmayera o pojemności 250 ml, zawierające po 50 ml pożywki produkcyjnej, wyjaławianej w temperaturze 120°C w ciągu 15 minut. Pożywka produkcyjna ma następujący skład:

Pożywka produkcyjna

L-prolina	15,0 g
gliceryna	20,0 g
sacharoza	2,5 g
glutaminian jednosodowy	1,5 g
NaCl	5,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
CaCl ₂	0,4 g
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,1 g
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	0,1 g
ZnCl ₂	0,05 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,0 g
woda destylowana	1000,0 ml
wartość pH (niekorygowana) = 7,1.	

Kolby produkcyjne umieszcza się na okres 4 dni na wytrząsarce obrotowej z 5 cm wykorbieniem, obracanej z prędkością 220 obrotów na minutę, utrzymując temperaturę 28°C. Zawartość odwirowuje się, a ciecz pofermentacyjną bada metodą krążkowo-płytkową. Na krążkach o średnicy 0,5 cala, strefa zahamowania po 3 dniach inkubacji wynosi 21 mm, a po 4 dniach 26 mm. Produkt stanowi antybiotyk 810 A.

Przykład III. Wytwarzanie antybiotyku 810 A i rozdział na składniki. Stadium A. Hodowla.

Etap 1. Zawartość probówki z liofilizowaną kulturą *Streptomyces griseus* NRRL 3851 miesza się z 2 ml pożywki I, opisanej w przykładzie I, po czym otrzymanym posiewem szczepi się skosy z tej samej pożywki. Skosy inkubuje się w temperaturze 28°C w ciągu 5 dni, względnie do osiągnięcia intensywnej sporulacji, a następnie do skosów dodaje się po 10 ml pożywki VIII.

Pożywka VIII

wyciąg mięsny	0,3%
NaCl	0,5%
NZ Amine	1%
dekstroza	1%
wartość pH = 7,0.	

Wzrost z każdego ze skosów zeszkrobuje się do pożywki, a otrzymaną zawiesinę używa się jako posiew w etapie 2.

Etap 2. Zawiesinę, otrzymaną w etapie 1, szczepi się przewężoną kolbę Erlenmayera o pojemności 250 ml, zawierającą 50 ml wyjałowionej pożywki VIII. Zaszczepioną kolbę umieszcza się na okres 48 godzin na wytrząsarce obrotowej, obracanej z prędkością 220 obrotów na minutę, utrzymując temperaturę 28°C.

Etap 3. Hodowlą z etapu 2 szczepi się kolbę Erlenmayera o pojemności 2 litrów, zawierającą 500 ml pożywki VIII, opisanej w etapie 1. Zaszczepioną kolbę umieszcza się na wytrząsarce obrotowej, obracanej z prędkością 220 obrotów na minutę i inkubuje się w ciągu 48 godzin w temperaturze 28°C.

Etap 4. 500 ml hodowli z etapu 3 stosuje się do zaszczepienia zbiornika fermentacyjnego ze stali kwasoodpornej o pojemności 760 litrów, zawierającego 487 litrów wyjałowionej pożywki VIII (opisanej w etapie 1). Fermentację prowadzi się w ciągu 65 godzin w temperaturze 28°C, mieszając z prędkością 130 obrotów na minutę i przepuszczając powietrze z prędkością 0,28 m³ na minutę. W celu zapobieżenia nadmiernemu pienieniu, w czasie fermentacji dodaje się w małych ilościach środek przeciwko pienieniu Polyglycol 2000.

Etap 5. 400 litrów hodowli z etapu 4 stosuje się do zaszczepienia zbiornika fermentacyjnego ze stali kwasoodpornej o pojemności 6000 litrów, zawierającego 4800 litrów pożywki IX.

Pożywka IX

wyciąg namoku kukurydzianego	4%
dekstroza	2%
wartość pH doprowadzono NaOH do 7,2.	

Fermentację prowadzi się, mieszając zawartość zbiornika z prędkością 120 obrotów na minutę, przepuszczając powietrze z prędkością 1,5 m³ na minutę, w ciągu 30—36 godzin, w temperaturze 28°C. W celu zapobieżenia nadmiernemu pienieniu w czasie fermentacji dodaje się w małych ilościach środka przeciwko pienieniu Polyglycol 2000. Po 31 godzinach fermentacji krążki o średnicy 12,7 mm wysycone brzeczka dają na płytkach zakażonych kulturą *Proteus vulgaris* MB-836 strefę zahamowania o średnicy 32,5 mm.

Stadium B. Wyosabnianie kompleksu antybiotycz-

nego 810 A. Po 36 godzinach fermentacji brzeczkę ze stadium A, etapu 5 zakwasza się w zbiorniku fermentacyjnym kwasem fosforowym, doprowadzając wartość pH do 3 z 7–8. Grzybnie usuwa się na prasie filtracyjnej i odrzuca, otrzymując 4300 litrów przefiltrowanej brzeczki, którą przepuszcza się przez złożo adsorbentu — żywicy Amberlite XAD-2 o objętości 400 litrów z prędkością 40 litrów na minutę. Wyciek analizuje się i odrzuca, a złożo przemywa dwiema objętościami wody. Antybiotyk eluuje się z żywicy 60% wodnym roztworem metanolu, przepuszczanym z prędkością 20 litrów na minutę. Zbiera się i analizuje 40 frakcji o objętości po 20 litrów. Z połączonych frakcji 2–40 odparowuje się metanol pod zmniejszonym ciśnieniem. Wartość pH koncentratu 166 litrów doprowadza się wodorotlenkiem amonu do 3,5 i koncentrat zamraża się.

Pobrane próbki poddaje się badaniom biologicznym metodą krążkowo-płytową, stosując do badań szczep *Proteus vulgaris*.

Przesączona brzeczka. Próby przeprowadzone z przesączoną brzeczką o objętości 4240 litrów dają następujące wartości strefy zahamowania.

Przesączona brzeczka

Rozcieńczenie	Wielkość strefy zahamowania
1 : 2	26,8 mm
1 : 4	23,8 mm
1 : 8	21,1 mm

Wyciek i popłuczyny. 10 frakcji po 400 litrów wykazuje wartości zerowe bez rozcieńczenia. Wartość zerową wykazują również popłuczyny.

Frakcje eluatu. Przebadano wszystkie frakcje. Średnice stref zahamowania zestawione są poniżej.

Frakcje eluatu			
Frakcja	Wielkość strefy	Frakcja	Wielkość strefy
1	0	21	63 mm
2	28 mm	22	33
3	35	23	34
4	34	24	34
5	36	25	33
6	36	26	34
7	36	27	32
8	36	28	33
9	38	29	32
10	36	30	32
11	36	31	32
12	38	32	30
13	40	33	30
14	37	34	30
15	36	35	26
16	37	36	27
17	38	37	28
18	36	38	26
19	36	39	26
20	35	40	26

Eluat i koncentrat eluatu. Zbadano również eluat (780 litrów) i koncentrat eluatu (166 litrów), zawierające antybiotyk 810 A.

Rozcieńczenie	Wielkość strefy	Rozcieńczenie	Wielkość strefy
1 : 5	28,9 mm	1 : 16	27,25 mm
1 : 10	27,0 mm	1 : 32	24,5 mm
1 : 20	23,8 mm		
1 : 40	21,0 mm		

Oznaczenie suchej masy

Przesączona brzeczka	119 kg
780 litrów eluatu	7,23 kg
166 litrów koncentratu eluatu	7,20 kg

Stadium C. Adsorpcja na żywicy anionitowej. 83 litry koncentratu ze Stadium B rozcieńcza się wodą do objętości 124 litry i przepuszcza przez złożo słabozasadowej żywicy anionitowej (Amberlite IRA-68 w postaci chlorkowej) o objętości 22,5 litra. Koncentrat o wartości pH = 4 przepuszcza się przez złożo z prędkością 8 litrów na minutę. Następnie złożo przemywa się 45 litrami wody, po czym przeprowadza się elucję roztworem 1 m azotanu sodu i 0,1 m octanu sodu o wartości pH = 7,5. Zbiera się 10 frakcji o objętości po 20 litrów, które zakwasza się kwasem solnym do wartości pH = 4.

Wszystkie frakcje poddaje się badaniom biologicznym metodą krążkowo-płytową z zastosowaniem do badań szczepu *Proteus vulgaris*. Otrzymuje się następujące wyniki:

Roztwór zasilający		Frakcje eluatu; rozcieńczenie 1 : 10			
Rozcieńczenie	Wielkość strefy	Frakcja	Wielkość strefy	Frakcja	Wielkość strefy
1 : 10	28,5 mm	1	27 mm	6	25 mm
1 : 20	26,5 mm	2	30 mm	7	23 mm
1 : 40	24 mm	3	28,5 mm	8	22 mm
		4	26 mm	9	21 mm
		5	26 mm	10	17,5 mm

Dla wycieku uzyskuje się wartość strefy zahamowania 25 mm bez rozcieńczenia, a dla popłuczyn 23 mm bez rozcieńczenia.

Stadium D. Adsorpcja na żywicy anionitowej. Połączone frakcje 1–40 ze stadium C, o wartości pH 3,0 przepuszcza się przez złożo adsorbentu Amberlite XAD-2 o objętości 45 litrów, z prędkością 5 litrów/min. Złożo przemywa się następnie 90 litrami wody, przepuszczanej z taką samą prędkością. Następnie eluuje się antybiotyk 25% wodnym roztworem acetonu, z prędkością 5 litrów/min. Zbiera się 16 frakcji o objętości po 23 litry.

Wszystkie frakcje analizuje się metodą krążkowo-płytową, stosując do badań szczep *Proteus vul-*

gąs. Dla roztworu zasilającego (190 litrów) uży-
skuje się następujące średnice stref zahamowania:

Roztwór zasilający	
Rozcieńczenie	Wielkość strefy
1 : 5	30 mm
1 : 10	27,5 mm
1 : 20	24,2 mm

Średnice stref zahamowania frakcji eluatu zesta-
wione są w poniższej tablicy.

Frakcje eluatu		
Frakcja	Rozcieńczenie	Wielkość strefy
1	1 : 10	20,5 mm
2	1 : 10	29 mm
3	1 : 10	29 mm
4	1 : 10	29 mm
5	1 : 10	28 mm
6	1 : 10	27 mm
7	1 : 10	26 mm
8	1 : 10	26 mm
9	1 : 10	25 mm
10	1 : 10	26,5 mm
11	1 : 5	26 mm
12	1 : 5	28 mm
13	1 : 5	27,5 mm
14	1 : 5	25 mm
15	1 : 5	25 mm
16	1 : 5	24,5 mm

Frakcje 2-16 łączy się i odparowuje pod zmniej-
szonym ciśnieniem aceton, otrzymując 17,4 litra
koncentratu, którego wartość pH doprowadza się
wodorotlenkiem amonu do wartości 4,0. Następnie
koncentrat liofilizuje się, otrzymując 620 g anty-
biotyku 810 A, to jest mieszaniny kwasów 7β-(D-5-
-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sul-
foksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-kar-
boksylowego-4 i 7β-(D-5-amino-5-karboksywalerami-
do)-3-(α-metoksy-p-hydroksycynamoiloksymetylo)-7-
-metoksycefemo-3-karboksylowego-4. Suchy produkt
daje przy stężeniu 320 µg/ml strefę zahamowania
o średnicy 25 mm.

Stadium E. Kwas 7β-(D-5-amino-5-karboksywale-
ramido)-3-(α-metoksy-p-hydroksycynamoiloksymety-
lo)-7-metoksycefemo-3-karboksylowy-4.

Kolumnę chromatograficzną o średnicy 2,5 cm
napelnia się do wysokości 100 cm żywicą anionito-
wą DEAE Sephadex A-25. Stosuje się układ elu-
ujący 0,5 m bromku amonu + 0,05 m kwasu octo-
wego. 10,0 g kompleksu antybiotycznego 810 A,
otrzymanego w stadium D, rozpuszcza się w 18 ml
tego układu i wprowadza na kolumnę. Roztwór elu-
ujący przepompowuje się przez złoże z prędkością
18 ml/godzinę, odbierając automatycznie frakcje
o objętości 10 ml. Strumień eluatu kontroluje się
refraktometrem różnicowym. Zapis refraktometrycz-
ny wykazuje maksima masowe dla próbek 19, 36,
79, 109 i 206. Co trzecią frakcję poddaje się bada-
niom biologicznym metodą krążkowo-płytkową

z użyciem kultury *Proteus vulgaris* (MB-838), sto-
sując krążki o średnicy 12,7 mm, wysycone bufo-
rem o wartości pH = 7. W poniższej tablicy zesta-
wione są średnice stref zahamowania (dla frakcji
1-66 otrzymano wartości zerowe).

Frakcja	Średnica strefy
69	18 mm
72	24
75	26
78	31
81	—
83	35
86	37
89	38
92	38
95	40+
98	40+
101	40+
104	40+
107	40+
110	40+
113	40
116	38
119	33
122	29
125	28
128	27
131	26
134	24
137	21
140	20
150	18
160	20
170	29
180	35
183	38
186	40
189	40+
192	40+
195	40+
198	40+
201	40+
204	40+
207	40+
210	40+
213	40+
216	40+
219	40
222	38
225	35
228	32
231	31
234	27
237	24
240	23
243	19
246	17
249	0
252	0

Łączy się frakcje 80-133 oraz frakcje 170-230.
Powtarza się powyższy sposób rozdzielu i łączy
się frakcje 82-130 oraz 180-234.

Łączy się frakcje z obu rozdzielów, zawierające pierwszy aktywny składnik i przepuszcza przez złożę żywicy Amberlite XAD-2 o objętości 100 ml. Złożę przemywa się jedną objętością wody, a następnie eluuje 90% roztworem wodnym metanolu. Metanol odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, a wodny koncentrat liofilizuje się. Otrzymuje się 810 mg produktu zidentyfikowanego jako kwas 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-hydroksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksylowy-4. Aktywność produktu określona metodą krążkowo-płytkową w stosunku do *Proteus vulgaris* wynosi 18 g/ml roztworu, dającego strefę zahamowania o średnicy 25 mm. Produkt charakteryzuje się następującymi wskaźnikami absorpcji w nadfiolecie:

roztwór w 0,1 n HCl $\lambda_{\max}$ 305 mμ $E_1^{1\%}$ cm 524

roztwór w 0,1 n NaOH $\lambda_{\max}$ 328 mμ $E_1^{1\%}$ cm 564

Stadium F. Kwas 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksylowy-4.

Frakcje z rozdzielu na adsorbencie Sephadex A-25, zawierające drugi aktywny składnik, łączy się i przepuszcza przez złożę żywicy Amberlite XAD-2 o objętości 100 ml. Złożę przemywa się 1 objętością wody, a następnie eluuje 3 objętościami 90% wodnego roztworu metanolu. Łączy się bogate w składnik eluaty i odparowuje z nich pod próżnią metanol. Wodny koncentrat liofilizuje się otrzymując 720 mg kwasu 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksylowego-4 (Ic). Produkt charakteryzuje się następującymi wskaźnikami absorpcji w ultrafiolecie:

roztwór w 0,1 n HCl $\lambda_{\max}$ 287 mμ $E_1^{1\%}$ cm 432

roztwór w 0,1 n NaOH $\lambda_{\max}$ 280 mμ $E_1^{1\%}$ cm 432

Przykład IV. Wydzielenie z kompleksu antybiotycznego kwasu 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksylowego-4.

20 g kompleksu antybiotycznego 810 A z przykładu III, stadium D, zawierającego kwasy 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksylowy-4 (wzór 2) i 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-hydroksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksylowy-4 rozpuszcza się w 200 ml wody i wartość pH roztworu doprowadza się do 3,5. Roztwór przepuszcza się przez 200 ml złoża żywicy anionitowej Amberlite IRA-69 w postaci chlorkowej, po czym złożę przemywa się 300 ml wody. Elucję złoża przeprowadza się 1% (objętościowo) roztworem wodnym kwasu mrówkowego. Następnie przez złożę przepuszcza się 2 porcje rozdzielonego kwasu solnego (pH = 0,95). Roztwór zasilający, wyciek, popłuczyny i eluaty 1, 2 i 3 analizuje się metodą elektroforezy na bibule (pH = 4,0, prąd stały o napięciu 1000 V przyłożony na okres 1 godziny). Elektroforegram suszy się i wystawia na działanie par amoniaku w celu zobojętnienia kwasu, po czym inkubuje się na płycie z agarą zakażonym kulturą *Proteus vulgaris* (MIB-838). Po inkubacji w ciągu 17 godzin w tem-

peraturze 37°C stwierdza się obecność dwóch stref zahamowania wzrostu szczepu testowego (przesunięcie w kierunku anody) w przypadku roztworu zasilającego, jednego tylko składnika (wolniej wędrującego) w przypadku wycieku i eluatu kwasem mrówkowym i jednego składnika (szybciej wędrującego) w przypadku drugiego eluatu kwasem solnym. W poniższej tabeli przedstawione są dane dotyczące ilości suchej masy i oznaczeń biologicznych.

	Masa	Objętość	Biologiczne jednostki suma	Produkt(y)
Roztwór zasilający	20 g	200 ml	60,000	Ia i Ib
Wyciek + popłuczyny	11,15 g	500 ml	7,500	Ib
Eluat kwasem mrówkowym	4,52 g	1000 ml	20,000	Ib
1 eluat kwasem solnym	—	500 ml	1,000	—
2 eluat kwasem solnym	2,10 g	500 ml	10,000	Ia

Z powyższych frakcji wydziela się kwas 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksylowy-4 (Ic) o wysokiej czystości, drogą adsorpcji na żywicy Amberlite XAD-2 i elucji 50% roztworem wodnym metanolu.

Przykład V. Wydzielenie z kompleksu antybiotycznego 810 A kwasu 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksylowego-4.

5,0 g kompleksu antybiotycznego z przykładu III stadium D, zawierającego kwasy 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksylowy-4 i 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-hydroksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksylowy-4 rozpuszcza się w 20 ml 20% roztworu wodnego acetonu, a wartość pH roztworu doprowadza się do 4,0. Roztwór przepuszcza się przez złożę adsorbentu Amberlite XAD-2 o średnicy 5 cm i wysokości 100 cm w 20% roztworze wodnym acetonu. Taki sam roztwór przepompowywuje się następnie przez złożę z prędkością 880 ml/godzinę, odbierając automatycznie frakcje o objętości 20 ml. Co trzecią frakcję poddaje się badaniom biologicznym metodą krążkowo-płytkową z *Proteus vulgaris* (MIB-838) jako szczepem testowym, stosując krążki o średnicy 0,6 cm.

Średnice stref zestawione są w poniższej tablicy.

Frakcja	Średnica strefy
1—41	0
44	12 mm
47	22

Frakcja	Średnica strefy
50	25
53	29
56	31
59	35
62	30
65	28
68	27
71	25
74	24
77	21
80	20
83	19
86	16
89	14
92	13
95	13
98	13
101	13
104	14
107	13
110	13
113	11
116	10
119	9
122	8
125	8
128	8
131	0
134	0
137	0
140	8
143	11
146	13
149	13
152	15
155	15
158	16
161	17
164	18
167	17
170	18
173	20
176	21
179	21
182	21
185	21
188	22
191	23
194	23
197	23
200	22
203	24
206	24
209	24
212	24
215	24
218	19
221	18
224	18
227	18
230	17

Frakcja	Średnica strefy
233	17
236	15
239	15
242	15
245	15
248	14
251	14
254	14
257	13
260	13
263	12
266	12
269	12
272	11
275	11
278	10
281	10
284	9
287	8
290	0
293	0
296	0
299	0
302	0
330	zero

Łączy się frakcje 44—90 i pod zmniejszonym ciśnieniem odparowuje się aceton, a wodny koncentrat liofilizuje się, otrzymując 3,3 g surowego kwasu 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksy-cynamoiłoksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksyłowego-4 o wzorze 2.

W podobny sposób z połączonych frakcji 150—225 otrzymuje się 700 mg kwasu 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-hydroksycynamoiłoksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksyłowego-4.

W powtórny sposób rozdzielając otrzymuje się 3,1 g surowego kwasu 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksy-cynamoiłoksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksyłowego-4 (Ic) i 400 mg kwasu 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-hydroksycynamoiłoksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksyłowego-4.

Połączone porcje 6,4 g kwasu 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksy-cynamoiłoksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksyłowego-4 nanosi się na złożo adsorbentu Amberlite XAD-2 w 5% roztworze wodnym metanolu (średnica 5,7 cm, wysokość 100 cm). Przez złożo przepompowuje się 5% roztwór wodny metanolu z prędkością 880 ml/godzinę, odbierając automatycznie frakcje o objętości 20 ml. Zbiera się 287 frakcji, poddając co czwartą z nich badaniom biologicznym metodą krążkowo-płytkową z *Proteus vulgaris* (MB-838) jako szczepem testowym, stosując krążki o średnicy 6,5 mm. Wyniki przedstawione są w poniższej tablicy. Frakcji 1—50 nie badano.

Frakcja	Wielkość strefy
51	23 mm
55	26

Frakcja	Wielkość strefy
59	23
63	18
67	12
71	0
75	0
79	0
83	7
87	9
91	13
95	19
99	21
103	22
107	22
111	21
115	20
119	20
123	19
127	18
131	19
135	16
139	17
143	15
147	16
151	15
155	13
159	11
163	9
167	0
171	0
287	zero

Łączy się frakcje 95—159 i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem metanol, a wodny koncentrat liofilizuje się, otrzymując 700 mg kwasu 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksyłowego-4 o wzorze 2. Widmo w ultrafio-

lecie kwasu 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksycynamoiloksymetylo)-7-me-

toksycefemo-3-karboksyłowego-4 przedstawia się następująco:

roztwór w 0,1 n HCl $\lambda_{\max}$ 285 mμ $E_1^{1\%}$ cm 160

roztwór w 0,1 n NaOH $\lambda_{\max}$ 277 mμ $E_1^{1\%}$ cm 166

5 Badany metodą krążkowo-pływową wobec *Proteus vulgaris*, przy krążkach o średnicy 12,7 mm, kwas 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksyłowy-4 daje strefę zahamowania 10 o średnicy 25 mm przy stężeniu 88 μ/ml, a kwas 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-hydroksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksyłowy-4 taką samą strefę przy stężeniu 15 167 μg/ml.

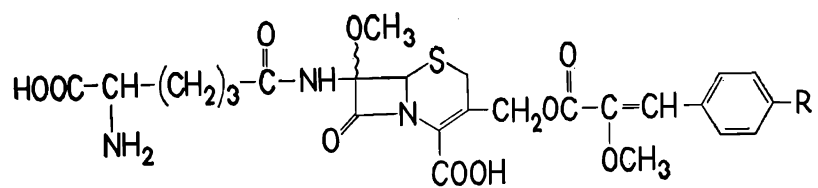
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowego antybiotyku 810 A, będącego mieszaniną kwasów 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-sulfoksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksyłowego-4 i 7β-(D-5-amino-5-karboksywaleramido)-3-(α-metoksy-p-hydroksycynamoiloksymetylo)-7-metoksycefemo-3-karboksyłowego-4, **znamienny tym**, że wodną 25 pożywkę szczepi się nowym mikroorganizmem z gatunku *Streptomyces griseus*, którego kultury są zdeponowane pod numerami NRRL 3851, NRRL 3951, NRRL 3953, NRRL 3952 i poddaje hodowli 30 w warunkach aerobowych, po czym wyosabia się antybiotyk 810 A w znany sposób.

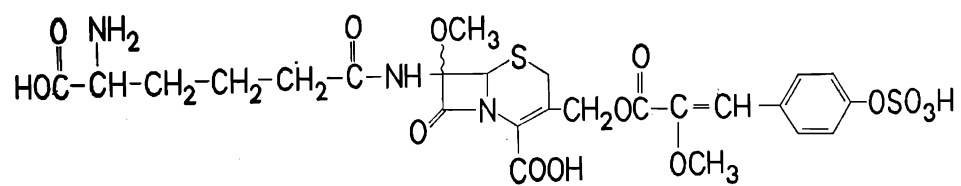
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się wodną pożywkę, w skład której wchodzi węglowodany w ilości 1—6% wagowych oraz 35 składniki, zawierające przyswajalny azot w ilości 0,2—6% wagowych.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hodowlę prowadzi się w temperaturze około 20—37°C.

40 4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wartość pH wodnej pożywki utrzymuje się w granicach 6,0—8,0.



Wzór 1



Wzór 2