

1007/92

**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

55.474/SZE

**59932**

4460/89

KIVONAT

Eljárás savas, policiklusos éter-típusú antibiotikumok  
mikrobiológiai előállítására

PFIZER INC., NEW YORK, New York,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: ~~1991. 11. 28.~~ 1989. 06. 01.

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US89/02400

A nemzetközi közzététel száma: WO 90/15062

A találmány tárgya eljárás a (III) általános kép-  
letű savas, policiklusos éter-típusú antibiotikum, ne-  
vezetesen a CP-91243 - ahol R jelentése hidrogénatom -  
és CP-91244 - ahol R jelentése metilcsoport - előállítá-  
sára oly módon, hogy az Actinomadura roseorufa ATCC  
törzs antibiotikumot termelő mutánsát vagy a nevezett  
mutáns antibiotikumot termelő további mutánsát, transzfor-  
mánsát vagy rekombinánsát asszimilálható szénforrást,  
asszimilálható nitrogénforrást és szervesetlen sókat tar-  
talmazó vizes táptalajon, süllyesztett tenyészetben,  
aerob körülmények között nevelik. Az így előállított új  
antibiotikumokat és az ismert UK-58852 antibiotikumot  
felhasználják baromfiak kokcidiális fertőzésének megelőzé-  
sére és gyógyítására, lábasjószág enteritiszének, sertés  
dizentériájának kezelésére, valamint a kérődzők és egy-  
szerű gyomrúak növekedésszerkentésére és/vagy tápanyag-  
hasznosításuk fokozására.

*Jelentés a... t. alk...*

55.474/SZE

4460/89

1 1 0 4 7 / 9 2

ifj. Szentpéteri Ádám  
szabadalmi ügyvivő  
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi  
Szabadalmi Iroda tagja  
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.  
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

59932

**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

"B"

NSO: C076 3/00  
C127 17/18  
C124 1/20  
B236 1/17

Eljárás savas, policiklusos éter-típusú antibiotikumok  
mikrobiológiai előállítására

PFIZER INC., NEW YORK, New York,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Feltaláló:

TYNAN Edward, Joseph, GALES FERRY,

Connecticut, AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: ~~1991. 11. 28.~~ 1989. 06. 01.

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US89/02400

A nemzetközi közzététel száma: WO 90/15062

A találmány tárgya eljárás új savas, policiklusos  
éter-típusú antibiotikumok és gyógyászati szempontból  
alkalmazható kationsóik előállítására. Foglalkozik a ta-  
lálmány új Actinomadura roseorufa törzsekkel is. A talál-  
mány további tárgya, eljárás a már ismert UK-58852 savas,

policiklusos éter-típusú antibiotikumnak az előállítására, valamint eljárás a baromfiak kokcidiális fertőzésének megelőzésére és kezelésére, lábasjóság enteritiszének és sertés-dizentéria gyógyítására, oly módon, hogy a nevezett állatok szervezetébe az antibiotikumot bejuttatjuk.

Ugyancsak foglalkozik a találmány azokkal a tápkészítményekkel, melyek a találmány szerinti új antibiotikumokat tartalmazzák, valamint azokkal a módszerekkel, melyek a találmány szerinti antibiotikumokat felhasználják a kérődzők és a nem-kérődzők növekedésének serkentésére és/vagy a tápanyagfelhasználásuk javítására.

A savas, policiklusos éter-típusú antibiotikumokra az jellemző, hogy hatással vannak a mitokondriumokba történő kationszállításra. Az antibiotikumoknak ebbe a csoportjába olyan jól ismert hatóanyagok tartoznak, mint a monenzin, nigericin, grizoricin, dianemicin, szalinomicin, mutalomycin, ionomicin és leuszeramicin. Ezekről Westley ad áttekintést a "Polyether antibiotics" című munkájában /Adv. Appl. Microbiol., 22: 177 (1977)/.

A fent felsorolt policiklusos éter-típusú antibiotikumok aktívak a gram-pozitív baktériumok, gombák és protozoák ellen. Különösen kitűnnek az anti-kokcidiális hatásukkal. Ezért különböző mértékben, de sikeresen alkalmazhatók állatok különféle fertőző megbetegedésével szemben. Az állatorvosi gyakorlatban, különösen a baromfiiparban nagy gazdasági jelentősége van

a jól ismert protozoa megbetegedés, a kokcidiózis megelőzésének és kezelésének. A kokcidiózis fertőzést az *Eimeria* vagy az *Isospora* egy vagy több faja okozza. (Összefoglaló munka: Lund és Farr, "Diseases of poultry", 5. kiadás Biester és Schwarte szerkesztésében, Iowa State University Press, Ames, Ia, 1965; 1056-1096. old.).

Hat olyan kokcidiafaj van, ami könnyen jelentős elhullást okoz az érzékeny csirkéknél. Az *Eimeria tenella*, *E.necatrix*, *E.brunetti*, *E.acervulina*, *E.maima* és *E.mitavi* vagy úgy károsít, hogy közvetlenül tönkreteszi az emésztőrendszer epitéliasejtjeit vagy közvetve, az általa termelt toxinokon keresztül. Ugyan- ehhez a nemhez tartozó másik három protozoa faj viszonylag ártalmatlan, de az *E.mitis*, *E.hagani* és az *E.praecox* képesek csökkenteni a súlyt, lerontani a tápanyaghasznosítást és a tojáshozamot.

Tekintettel a kokcidiózis okozta nagy gazdasági veszteségekre, az eddig alkalmazott anti-kokciális hatóanyagok ismert hátrányos tulajdonságaira, kutatómunka folyik tökéletesebb kokcidiaellenes hatóanyagok előállítására.

Az enteritisz a másik olyan betegség, ami jelentős gazdasági veszteséget okoz. Az enteritisz csirkénél, sertésnél, szarvasmarhánál és juhoknál fordul elő; főként anaerob baktériumok, mindenek előtt a *Clostridium perfringens* és vírusok okozzák. A kérődzők

enterotoxiemiáját, például a juhok "túlevési betegségét" a *C. perfringens* fertőzés okozza.

Az Egyesült Államokban a leggyakoribb sertésbetegség a dizentéria. Ez a betegség sok más országban is elől jár, és így évente hatalmas veszteségeket okoz az egész földön. Ma már tudjuk, hogy a betegség okozója egy nagy spirocheta, a *Treponema hyodysenteriae*, amit most izoláltak, és bebizonyították, hogy képes kiváltani ezt a betegséget/Harris D.L. és munkatársai, "Swine-Dysentery-1, Inoculation of pigs with *Treponema hyodysenteriae* (New species) and reproduction of the disease", *Vet.Med./SAC*, 67: 61-64 (1972)/. Megjegyzendő, hogy nem tudjuk, vajon a *T. hyodysenteriae* az egyetlen olyan mikroorganizmus-e, ami sertés dizentériát okozhat. A rendelkezésre álló adatokból azonban az megállapítható, hogy ez a fertőzés elsődleges tényezője.

Az állatorvostudomány másik gazdasági szempontokból jelentős területe a kérődzők, például a szarvasmarha, a nem-kérődzők, például a sertés, tenyésztésének hatékonyabbá tétele a növekedés meggyorsításával és/vagy a tápanyaghasznosítás fokozásával. Különösen lényeges a tápanyaghasznosítás fokozása. A kérődzők tápanyaghasznosításának mechanizmusa jól ismert. A bendőben élő mikroorganizmusok a szénhidrátokat monoszacharidokká bontják, majd ezeket az egyszerű cukrokat piruvátokká alakítják.

A piruvátot a mikrobiológiai folyamatok acetáttá,

butiráttá, propionáttá, összefoglaló néven illó zsírsavakká metabolizálják. /Ennek részletesebb tárgyalását lásd: Leng, "Physiology of digestion and metabolism in the ruminant", szerk.: Phillipson és munkatársai; Oriel Press, Newcastle-upon-Tyne, England, 1970, 408-410. old.).

Az illó zsírsavak felhasználásának viszonylagos hatékonyságát foglalja össze McCullough ("Feedstuffs" 1971, június 19., 19. old.), Eskeland és munkatársai /J.An.Sci., 33: 282 (1971)/ és Church és munkatársai ("Digestive physiology and nutrition of ruminants", 2. köt., 1971, 622. és 625. old.).

Noha az acetátokat és butirátokekat is felhasználják az állatok, a propionátokat hasznosítják a leghatékonyabban. Ha az állatok számára túllékeves propionát hozzáférhető, kialakulhat a ketózis. Ezért kedvező hatásúak azok a vegyületek, melyek elősegítik, hogy szénhidrátokból nagyobb arányban keletkezzen propionát, ezáltal növekedjen a szénhidrátok hasznosításának hatékonysága és csökkenjen a ketózis kialakulásának lehetősége.

Ugyancsak nagy gazdasági károkat okozhat az állattenyésztőnek egy másik protozoa parazita, a Theileria parva. A parazita által okozott betegség a teileriózis, amit "keleti parti láznak", "parti láznak" vagy "rodéziai atka-láznak" is neveznek. A Theileria parazita megtámadja, de nem pusztítja el a vörösvértesteket, aminek

következtében heveny vagy krónikus lázas fertőzések állapot alakul ki. A betegséget szarvasmarháknál magas láz, a nyirokcsomók megduzzadása, lesoványodás és magas elhullási arány jellemzi. A betegség igen súlyos probléma Kelet- és Közép-Afrikában. /Lásd: "The Merck veterinary manual", szerk.: Siegmund és munkatársai, Merck et. Co., Rahway, N.J. 5. kiadás, 431-433. old., (1979)/.

A 4 746 650 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom foglalkozik az UK-58852 előállításával, ami az *Actinomadura roseorufa* Huang Sp. nov., ATCC 39697 törzsvizes tápközegben tenyésztett, süllyesztett, aerob tenyésztésével történik. A nevezett találmány az UK-58852 antibiotikumot az (I) képlettel leírható savas, policiklusos éterként határozza meg. Az *Actinomadura roseorufa* Huang sp. nov., ATCC 39697 törzskét rokonszerkezetű minor komponens is termel, melyek a kokcidiózissal szemben antibiotikus hatással rendelkeznek. A két minor komponens a (II) általános képlettel írható le, ahol az egyikénél R jelentése hidrogénatom,  $R^1$  jelentése metilcsoport; a másikonál az R és  $R^1$  jelentése egyaránt metilcsoport.

A jelen találmány két új savas policiklusos éter-típusú antibiotikummal foglalkozik, ezek a (III) általános képlettel jellemezhetők, ahol a CP-91243 antibiotikumnál R jelentése hidrogénatom, a CP-91244 antibiotikumnál R jelentése metilcsoport. Ugyancsak kiterjed a

találmány oltalmi köre a nevezett antibiotikumok gyógyászati szempontból alkalmazható kation-sóira is.

Foglalkozik a találmány az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53666-ból kapott új mutánsokkal. Ezek az új mikroorganizmusok CP-91243 és/vagy CP-91244 antibiotikumokat termelnek. Ilyen új mikroorganizmusok az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53869 és az ATCC 53870 törzs. Kiterjed a találmány a nevezett új mikroorganizmus törzsek további olyan mutánsaira, transzformánsaira és rekombinánsaira, melyek CP-91243 és/vagy CP-91244 antibiotikumot termelnek. Foglalkozik a találmány továbbá azokkal az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53666 törzsből származó mutánsokkal, transzformánsokkal és rekombinánsokkal is, melyek a CP-91243 és/vagy CP-91244 antibiotikum mellett UK-58852 antibiotikumot is termelnek. A találmány tárgya tehát, eljárás a CP-91243 és CP-91244, valamint az ismert savas, policiklusos éter típusú UK-58852 antibiotikum előállítására a találmányban szereplő új mikroorganizmusok tenyésztésével. A találmány módszert nyújt a szárnyasok kokcidiális fertőzésének, a lábasjóság - például csirke, sertés, szarvasmarha, juh - enteritiszének, a sertés dizentériájának kezelésére oly módon, hogy az állatnak CP-91243 és/vagy CP-91244 antibiotikumot adunk be egy magában vagy UK-58852 antibiotikummal kombinálva. A találmány további tárgya, eljárás a kérődzők és a nem-kérődzők növedkedésserkentésére és/vagy tápanyaghasznosításának fokozására, mely abból áll, hogy az állatnak

CP-91243 és/vagy CP-91244 antibiotikumot adunk be egymagában vagy egymással és/vagy UK-58852 antibiotikummal kombinálva. Foglalkozik a találmány továbbá azokkal a tápkészítményekkel, melyek CP-91243 és/vagy CP-91244 antibiotikumot tartalmaznak egymagukban vagy UK-58852 antibiotikummal kombinálva.

Az "Actinomadura roseofurfa ATCC... törzs" kifejezésen egyrészt azt a tényleges törzset értjük, mely a megadott számon az ATCC törzsgyűjteményben szerepel, másrészt bármely más Actinomadura roseorufa mikroorganizmust, amelyeknek jellemző tulajdonságai a letétbe helyezett törzs tulajdonságaival megegyezik.

Az új, savas, policiklusos éter-típusú CP-91243 és CP-91244 antibiotikumokat az Actinomadura roseorufa Huang sp. nov. ATCC 53666 törzsből - az alábbiakban ismertetett módon - kapott mutánsokkal állítjuk elő. Az Actinomadura roseorufa ATCC 53666 törzs a Budapesti Egyezmény előírásai szerint került letétbe az Amerikai Törzsgyűjteményben (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) az 1987. október 26-án benyújtott 113 563 sorozatszámú, függőben lévő U.S. szabadalommal kapcsolatban.

Mutagénként N-metil-N'-nitro-N-nitrozo-guanidint (NTG) használtunk. A kezelt mikroorganizmus különálló telepeit megvizsgáltuk az antibiotikumtermelés szempontjából.

Az eljárás abból állt, hogy az ATCC 53666 törzset vizes táptalajban tenyésztettük süllyesztett tenyészetként,

aerob körülmények között rázatva 28°C hőmérsékleten.  
A tenyésztéshez használt tápközeg kiválasztása nem döntő.

Az alkalmas tápközeg: egy liter vízben 10,0 g cerelese, 5,0 g kukoricakeményítő, 5,0 g kukoricalekvár, 5,0 g N-Z Amine YTT (enzimatikusan lebontott kazein márkaneve, Humko Sheffield Chemical Co., Inc.) és 0,002 g kobalt-klorid; a kémhatást nátrium-hidroxiddal pH=7,0 értékre állítottuk be, és 800 ml táptalajt mértünk egy Fernbach edénybe. Autoklávós sterilizálás után a táptalajt ferde tenyészetről készített szuszpenzióval vagy lefagyasztott vegetatív micéliummal oltottuk be, és 200 percenkénti fordulatszámmal kevertetve, 28°C hőmérsékleten növesztettük 7-8 napon át. 50 ml tenyészetet kivéve, a micéliumot egy Teflon perselyű szövethomogenizátorban eldörzsöltük, és ultrahanggal homogenizáltuk. A fragmentált micéliumot lecentrifugáltuk, a táptalajt kimostuk mellőle, és 300 ml-es Erlenmeyer lombikban 50 ml friss táptalajban újraszuszpendáltuk, majd 2 órán át inkubáltuk 32°C hőmérsékleten rázatva. A sejteket újra lefugáltuk, a táptalajt kimostuk, és 50 ml trisz(hidroxi-metil)-amino-metán-malát pufferben, pH = 9,0, szuszpendáltuk. A szuszpenzió kivétjét NTG-vel kezeltük 750-1500 µg/ml koncentrációtartományban egy órán át, miközben 34°C-os vízfürdőben rázattuk. A kezelés után a sejteket lefugáltuk, a mutagént a sejtek mellől kimostuk, kivétekből higitási sorozatot készítettünk, amiket szilárd táptalajra szélesztettünk. A lemezeket 28°C hőmérsékleten tartottuk, amíg az egyes telepek akkora nagyságot nem

érték el, hogy át lehetett vinni őket a ferdetenyészetre. A lemezek és a ferdetenyészetek alkalmas anyaga az ATCC Medium No. 172, 1,0 g N-Z Amine Type A-val literenként (Humko Sheffield Chemical Co., Inc.). A beoltott ferdetenyészetet 28°C hőmérsékleten növesztettük 10-14 napon át, mely idő után már könnyen levizsgálhatók voltak. Ehhez a 300 ml-es Erlenmeyer lombikban lévő 25 ml alkalmas tápközeget (az egyik ilyennek az összetétele: 45,0 g cerelese, 10,0 g szójaliszt, 15,0 kukoricalekvár, 0,1 g mangán-szulfát ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ ), 0,1 g 7 kristályvizes magnézium-szulfát ( $MgSO_4 \cdot H_2O$ ), 0,002 g kobalt-klorid, 3,0 g kalcium-karbonát egy liter vízben, a kémhatás beállítva pH = 7,0 értékre) 30 perces 121°C hőmérsékleten történő autoklávós sterilizálás után az egyes ferdetenyészet szuszpenziójával oltottuk be, és 28°C hőmérsékleten rázattuk 7 napon át. A mutációs kezelésnek alávetett mikroorganizmusokat oly módon vizsgáltuk, hogy a tenyészeteket metil-izobutil-ketonnal extraháltuk, az extraktumot szilikagél vékonyrétegen kromatografáltuk, és a kromatogramot vanilines reagenssel hívtuk elő 100°C hőmérsékleten történő 5 perces hőkezeléssel. A futtatórendszer: kloroform/metanol, 9:1.

Az  $R_f$ -értékek: CP-91243: 0,2

CP-91244: 0,4

UK-58852: 0,7.

Két olyan mutánst kaptunk, melyek CP-91243, CP-91244 és UK-58852 antibiotikumokat termeltek. Ezek a

mutánsok a Pfizer Inc. törzsgyűjteményben mint FD 28455 és FD 28518 lettek meghatározva. Az így kapott mutánsok alaktani tulajdonságai és tenyészetek jellemzői lényegében megegyeznek az A. roserufa ATCC 53666 törzs tulajdonságaival. A mutánsok megkülönböztető jellegzetessége, hogy CP-91243 és CP-91244 keveréket termelnek.

A mutánsok tenyésztését és a CP-91243 és CP-91244 antibiotikumok kinyerését olyan körülmények között végezhetjük, melyeket a policiklusos éter-típusú antibiotikumoknál eddig is alkalmaztak. Erre példát a 4 361 649 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom-ban találunk. A tenyésztés előnyösen vizes tápközegben történik, süllyesztett tenyészettel, aerob körülmények között kevertetve, 24-36°C hőmérsékleten. A tápközeg asszimilálható szénforrást - például cukrok, keményítők, glicerin -, szerves nitrogénforrást - például kazein, enzimmel emésztett kazein, szójaliszt, gyapotmagliszt, földimogyoróliszt, búzasikér, vérliszt, húsliszt, hal-liszt - tartalmaz. Ugyancsak alkalmazhatunk - előnyös eredménnyel - növekedési anyagokat tartalmazó komponenseket - például gabona kivonatok, halliszt, gyapotmagliszt és élesztőkivonat -, valamint ásványi sókat - például nátrium-klorid és kalcium-karbonát -, nyomele-meket - például vas, magnézium, réz, cink, kobalt és mangán. Ha a fermentáció alatt túlzott habzást észle-lünk, alkalmazhatunk habzástgátlókat, például növényi olajokat vagy szilikonokat. Süllyesztett tenyészetnél

a tápközeg levegőztetését előnyösen percenként a tenyészet térfogatának 0,5-2-szeresét kitevő steril levegő átvezetésével végezzük egy bekeverőn keresztül. A kevertetést a szokásos keverőberendezések valamelyikével végezhetjük. A kevertetés sebessége attól függ, hogy milyen típusú keverőt alkalmazunk. A rázott lombikokat általában percenkénti 150-300 fordulatszámmal rázatjuk, a fermentor keverési sebessége általában 300-1700 fordulattal percenként. A mikroorganizmus átvitelénél és a tenyésztés alatt természetesen steril körülményeket kell biztosítani. Az antibiotikum termeléshez használt inokulumot elkészíthetjük a kívánt mikroorganizmus ferdetenyészetéről származó kinövesztéssel vagy Roux edényben a kívánt mikroorganizmussal való leoltással vagy a megoltvasztott ferdetenyészet micéliumszuszpenziójával. A ferdetenyészethez és a Roux edényben elkészített tenyészethez

alkalmas táptalaj lehet az ATCC No. 172 tápközeg. A mutációs kezelésnél az előzőekben ismertetett folyékony táptalaj alkalmas a lefagyasztásra szánt vegetatív micélium kinövesztéséhez is. A nyert tenyészetet használhatjuk rázott lombikok vagy oltóedények beoltásához vagy az oltóedényeket beolthatjuk rázott lombikokról. Rázott lombikoknál a maximális növekedés 4-8 nap alatt érhető el, míg süllyesztett tenyészetű oltóedényeknél az inokulum elkészítésének legkedvezőbb ideje 4-5 nap.

Az antibiotikumtermelés mennyiségi nyomonkövetését vékonyrétegkromatográfiával követjük nyomon. A

kifejlesztett kromatogramot vanilines reagenssel hívjuk elő, amint azt az előzőekben már leírtuk. A kromatogramon lévő antibiotikumok megjelenítésének másik módja, hogy a vékonyréteget olyan agy/szív kivonatos agarral rétegezzük felül, melyet *Bacillus subtilis*szel oltottunk be, majd a felülrétegzett lemezt 37°C hőmérsékleten inkubáljuk 16 órán át. A fermentléből nyert nyers és tisztított termék analíziséhez ugyancsak használhatunk vékonyrétegekromatográfiát.

A CP-91243, CP-91244 és az UK-58852 antibiotikumok a micéliumban és a tápközegben találhatóak, kinyerésükhöz a teljes, szüretlen fermentlevet szerves oldószerrel extraháljuk a természetes körülmények között kialakult kémhatásnál. Az extraháláshoz például kloroformot, etil-acetátot, metil-izobutil-ketont vagy butanolt használhatunk. Az emulziós probléma kikerülésére eljárhatunk úgy is, hogy a micéliumot előzetesen elválasztjuk, és a fermentlé közeget elválasztva extraháljuk a szerves oldószerrel. Az extraktumot sűrű sziruppá töményítjük, és a CP-91243, CP-91244 és UK-58852 antibiotikumokat oszlopkromatografálással izoláljuk.

Az antibiotikumok elválasztása és kinyerése tipikusan az alábbiak szerint történik: A mutáns teljes fermentlevét metil-izobutil-ketonnal extraháljuk. Csökkentett nyomáson bepároljuk az extraktumot, és a nyert vöröses, olajos anyagot szilikagél-oszlopra visszük. Az anyagot kloroform/metanol, 9:1 eleggyel eluáljuk, az

eluátumokat vékonyrétegkromatográfiával vizsgáljuk. A CP-91243, CP-91244, illetve az UK-588852 antibiotikumot tartalmazó frakciókat külön-külön egyesítjük, és betöményítjük vagy szárazra pároljuk. A bepárlási maradványokat etil-acetátban oldtjuk és szilikagél-oszlopokra visszük. A felvitt anyagot etil-acetáttal eluáljuk, az eluátumot vékonyrétegkromatográfiával vizsgáljuk. A CP-91243 és a CP-91244 antibiotikumot tartalmazó frakciókat etil-acetátból, az UK-58852 antibiotikumot tartalmazót hexánból kikristályosítjuk.

Az antibiotikumot kinyerhetjük a micéliummal együtt, úgy, hogy a teljes fermentlevet ismert módon - például permetezéses szárítással - bepároljuk vagy a micéliumot szűréssel vagy centrifugálással elválasztjuk a fermentléből. Az így kapott micéliumtermék az antibiotikumot a micélium felszínén és a micélium közti térben tartalmazza, a micélium ezáltal egy alkalmas hordozóként szolgál.

A Pfizer Inc. törzstenyészetben FD-28455 és FD-28518 jelöléssel meghatározott mutánsokat a Budapesti Egyezménynek megfelelően helyeztük letétbe az amerikai törzsgyűjteménybe, az American Type Culture Collection-ba. Az FD-28455 tenyészet az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53869, az FD-28518 tenyészet az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53870 megjelölést kapta.

Az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53869 és az ATCC 53870 lényegében azonos az *Actinomadura roseorufa*

53666 törzssel, azzal a különbséggel, hogy az ATCC 53869 és az ATCC 53870 törzsek CP-91243 és CP-91244 antibiotikumokat termelnek.

Az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53666 taxonomiai vizsgálatait L.H. Huang végezte, és az alábbi leírást adta.

A ferdeagarról a tenyészetet ATCC No. 172 táptalajra oltjuk át, és 28°C hőmérsékleten rázatjuk négy napon át. A tenyészetet 20 percen át centrifugáljuk, steril desztillált vízzel háromszor átmoszuk, és olyan táptalajra oltjuk le, melyeket az Actinomyceták meghatározására használunk.

A tenyészetet 28°C hőmérsékleten inkubáljuk és különböző időben megfigyeléseket teszünk, leginkább azonban a 14. napon. A színek megjelölése a szokásos terminológiával történik, de a pontosabb megnevezéshez a Color Harmony Manual negyedik kiadásának színcsíkjaival való összehasonlítást alkalmazzuk. A teljes-sejt aminosavanalízisét Becker és munkatársai módszerével /Appl.Microbiol., 12: 421-423 (1964)/ végezzük. A teljes-sejt cukorösszetételének analíziséhez Lechevalier módszerét /J.Lab.Clin.Med., 71: 934-944 (1968)/ és Staneck és Roberts módszerét /Appl.Microbiol., 28: 226-231 (1974)/ használjuk. Összehasonlításként az *Actinomadura roseorufa* ATCC 39697 törzset szolgált.

A tenyészetek jellemzéséhez használt azonosító táptalajok és az összetételük meghatározására szolgáló

## referencia módszerek:

- 1) Tripton/élesztőkivonat táptalaj (ISP 1 táptalaj, Difco).
- 2) Élesztőkivonat/malátakivonat táptalaj (ISP 2 táptalaj, Difco).
- 3) Zablisztes agar (ISP 3 táptalaj, Difco).
- 4) Szervetlen só/keményítő agar (ISP 4 táptalaj, Difco).
- 5) Glicerín/aszparaginos agar (ISP 5 táptalaj, Difco).
- 6) Pepton/élesztőkivonat/vasas agar (ISP 6 táptalaj, Difco).
- 7) Czapek/szacharóz agar /S.A. Walesman, The Actinmycets, 2. köt., medium 1., 328. old., (1961)/.
- 8) Glükóz/aszparaginos agar (mint előző, medium 2., 328. old.).
- 9) Bennett-féle agar (mint előző, medium 30., 331. old.).
- 10) Emerson-féle agar (mint előző, medium 28., 331. old.).
- 11) Nutrient agar (mint előző, medium 14., 330. old.).
- 12) Gordon és Smith-féle tirozinos agar /R.E. Gordon és M.M.Smith, J.Bacteriol., 69: 147-150, (1955)/.
- 13) Kazeines agar (mint előző).
- 14) Kalcium-malátos agar /S.A. Waksman, Bacteriol. Rev., 21: 1-29, (1957)/.
- 15) Zselatin /R.E.Gordon és J.M.Mihm. J.Bacteriol., 73: 15-27 (1957)/.
- 16) Keményítő (mint előző).
- 17) Szerves nitrátos táptalaj (mint előző).

- 18) Dextróz/nitrátos táptalaj /S.A. Waksman, The Actinomycetes, 2. köt., medium 1, 328. old. (1961), 3 g dextrózzal pótolva 30 g szacharóz, az agar elhagyva).
- 19) Burgonya/sárgarépas agar (M.P. Lechevalier, J. Lab. and Clinical Med., 71: 934-944 (1968), de csak 30 g burgonya, 2,5 g sárgarépa és 20 g agar).
- 20) 2 %-os csapvizes agar.
- 21) Gauze-féle ásványi sós agar (1) /G.F.Gauze és munkatársai, Problems in the classification of antagonistic Actinomycetes, English Ed., 13. old. (1957)/.
- 22) Gauze-féle szerves komponensű agar (2) (mint előző).
- 23) Lefölözött tej - Difco.
- 24) Cellulózhasznosítás:
  - a/ H.L.Jensen, Proc.Linn.Soc. N.S.W., 55: 231-248 (1930);
  - b/ M.Levine és H.W. Schoenlein, A compilation of culture media, medium no. 2511 (1930).
- 25) Szerves savak hasznosítása:

R.E.Gordon és munkatársai, Int. J.Syst.Bacteriol., 24: 54-63 (1974).
- 26) Savtermelés szénhidrátokból:

mint előző.
- 27) Hippurát és eszkulin hidrolizise:

mint előző.
- 28) Adenin, hipoxantin, xantin és karbamid lebontás:

mint előző.

29) Lizozim rezisztencia:

mint előző.

30) Szénhidráthasznosítás -C-2 táptalaj:

H.Nonomura és Y.Ohara, J.Ferment. Technol., 49:

887-894 (1971).

31) Növekedési hőmérséklettartomány; ATCC 172. táptalaj

Culture Collection Catalogue, 15. kiadás, 608. old.

(1982),

Az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53666 törzs leírása:

(N: növekedés, T: telepek, F: fonák oldal, O.f.: oldható festékanyag).

Élesztőkivonat/malátakivonatos agar

N: jó

T: rózsaszín-vörös (6 1/2ia, 7ia, 6ia), kiemelkedő,  
redőzött, fehér légmicélium

F: vörös (7ia)

O.f.: nincs

Zablisztes agar

N: mérsékelt

T: csontszínű (2ca), kissé kiemelkedő sima, vagy  
különálló telepek, légmicélium nincs vagy szor-  
ványos, fehér

F: csontszínű (2ca)

O.f.: nincs

## Szervetlen só/keményítő agar

N: gyenge-közepes

T: színtelen-csontszínű (2ca), vékony, sima;  
légmicélium nincs vagy szorványos, fehér

F: mint a felszín

O.f.: nincs

## Glicerín/aszparaginos agar

N: gyenge-közepes

T: csontszínű (2ca), rózsaszín-vörös pontokkal  
(6ea, 6 1/2ga); légmicélium nincs vagy szorványos,  
fehér

F: színtelen-csontszínű (2ca) vörös pontokkal

O.f.: nincs

## Czapek-féle szacharóz agar

N: gyenge-közepes

T: csontszínű (2ca), rózsaszín-vörös pontokkal  
(5ea, 6 1/2ia); légmicélium nincs vagy szor-  
ványos, fehér

F: színtelen-csontszínű (2ca)

O.f.: nincs

## Glükóz/aszparaginos agar

N: közepes - jó

T: rózsaszín-vörös (6 1/2ga, 6 1/2na), kiemel-  
kedő, sima, szemcsés vagy redőzött; légmicélium  
fehér-halványrózsaszín (6ea)

F: vörös (6 1/2ga, 6 1/2ia)

O.f.: halványsárga (3ca)

## Gordon-Smith-féle tirozinos agar

N: közepes - jó

T: rózsaszínes narancs (5ea), mérsékelten kiemelkedő, redőzött; légmicélium nincs vagy szorványos, fehér

F: mint a felszín

O.f.: sárgás (21c)

## Kalcium malátos agar

N: gyenge

T: színtelen, vékony, sima; légmicélium nincs

F: színtelen

O.f.: nincs

## Kazeines agar

N: közepes - jó

T: rózsaszínes narancssárga - narancssárga (4ia, 5ia), mérsékelten kiemelkedő, redőzött; légmicélium nincs

F: sárgás - halványrózsaszín (3ga, 5ea)

Of.: barna (31c)

## Bennett-féle agar

N: jó

T: vörös - sötét vörös (6 1/2ne, 6 1/2ng), kiemelkedő, redőzött; légmicélium fehér - rózsaszín (6ea)

F: vörös (6 1/21c)

O.f: barna (3ne)

## Emerson-féle agar

N: jó - kiváló

T: narancssárga (5la, 5na), kiemelkedő, redőzött;  
fehér légmicélium

F: narancssárga (5ic)

O.f: nincs

## Nutrient agar

N: közepes

T: halvány narancssárga (5ea, 5ga), gyengén kiemelkedő, sima, vagy mint különálló telepek jelenik meg; légmicélium nincs

F: halvány narancssárga (5ga)

O.f: nincs

## Zselatinos agar

N: mérsékelt - jó

T: halvány narancssárga (4ga), enyhén kiemelkedő, sima - redőzött; légmicélium szorványos, fehér

F: halvány narancssárga (4ga)

O.f: nincs

## Keményítő agar

N: közepes - jó

T: halvány narancssárga (5ga), mérsékelten kiemelkedő, sima - redőzött; légmicélium szorványos, fehér

F: mint a felszín

Of.: nincs

## Burgonya/sárgarépas agar

N: gyenge - közepes

T: csontszínű - halvány rózsaszín (2ca, 4ca),  
vékony - enyhén kiemelkedő; légmicélium szorványos, fehér

F: csontszínű - halvány rózsaszín (4ca)

O.f: nincs

## Csapvizes agar

N: gyenge

T: színtelen - csontszínű (1 1/2ca), vékony,  
sima; légmicélium szorványos, fehér

F: mint a felszín

O.f: nincs

## Gauze-féle ásványisós táptalaj (1)

N: közepes

T: rózsaszín - vörös (5ca, 6la) vörös ponokkal  
(6lc), enyhén kiemelkedő, sima; légmicélium  
nincs vagy szorványos, fehér

F: mint a felszín

O.f: nincs

## Gauze-féle szerves komponensű táptalaj (2)

N: közepes - jó

T: rózsaszín narancs (5ga), mérsékelten kiemel-  
kedő, enyhén redőzött; szorványos légmicélium,  
fehér

F: mint a felszín

O.f: nincs.

**Morfológiai tulajdonságok:**

Hét hetes inkubáció után egyik táptalaj esetében sem találunk spórákat. Burgonya/sárgarépás agaron azonban terminális, laterális vagy interkalláris duzzanatok figyelhetők meg a hifán; ezek egyedülállóak és simák. Alakjuk gömbalakú, ovális vagy elliptikus; méretük 1,2-2,5  $\mu$ m átmérőjűek vagy 1,2-2,2x0,9x1,8  $\mu$ m nagyságúak. Hasonló képződményeket találunk az élesztőkivonat/malátakivonatos, agaron, zablisztes agaron, csapvizes agaron, zselatinos agaron, Czapek-féle szacharózos agaron és a Gauze-féle ásványisós táptalajon (1) nőtt tenyészeteknél is.

**Biokémiai tulajdonságok:**

Melamint nem termel, hidrogén-szulfidot nem termel, nitrátot nitritté redukál, a zselatint elfolyósítja, a keményítőt nem hidrolizálja, gyengén nő a Jensen-féle cellulózós táptalajon, de nem nő a Levine és Schoenlein-féle cellulóz táptalajon, egyik cellulózos táptalajon sincs szétesés (dezintegráció); a tejet koagulálja és peptonizálja; kalcium-malát lebontás negatív; tirozinbontás pozitív; kazeinbontás pozitív.

**Szénhidráthasznosítás:**

Glükózt, ramnózt és szacharózt hasznosít; arabinózt, fruktózt, inozitolt, mannitolt, rafinózt és xilózt nem.

**Pozitív tesztek:**

Acetát-, propionát- és piruváthasznosítás; savtermelés glükózból, ramnózból, maltózból és trehalózból.

## Negatív tesztek:

adenin, xantin, hipoxantin és karbamid lebontása; eszkulin és hippurát hidrolizise; lizozimmal szembeni ellenállás; benzoát, citrát, dextrin, laktát, malát, mukát, oxalát, fenol és szukcinát hasznosítása; savtermelés arabinózból, fruktózból, inozitolból, mannitolból, rafinózból, szacharózból, xilózból, adonitolból, cellobiózból, dulcitolból, eritritolból, galaktózból, glicerinből, laktózból, mannózból, melezitózból, malibiózból, alfa-metil-D-glükozidból, ribózból, szalicinből, szorbitolból, szorbózból és keményítőből.

## Teljes-sejt analízis:

A hidrolizátum mezo-diamino-pimelinsavat, galaktózt, glükózt, madurózt, ribózt és ramnózt tartalmaz.

## Növekedés különböző hőmérsékleten:

21°C közepes

28°C jó

37°C közepes

45°C nincs.

Az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53666 törzsre jellemző, hogy nem képez melanint; a szubsztrát-micélium rózsaszínű, rózsaszín-narancsszínű, narancsszínű-vörös; a teljes-sejt komponensek között szerepel a mezo-diamino-pimelinsav és a maduróz. A hosszú, hét hetes inkubáció ellenére a tenyészet nem termel spórát, noha némelyik táptalaj esetében a hifán duzzاناتok keletkeznek.

A tenyészetek legtöbb tulajdonsága és szinte valamennyi biokémiai jellegzetesség tekintetében az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53666 törzs hasonló az *Actinomadura roseorufa* Huang ATCC 39697 törzshöz (169001 számú európai szabadalmi bejelentés). Zselatinos agaron és keményítős agaron az ATCC 53666 telepek inkább narancssárga, mint halvány csontszínű. Tirozinos agaron és az Emerson-féle agaron a tenyészet inkább narancssárga, mint barna. Az ATCC 53666 eltérően az *A.roseorufa*tól koagulálja a tejet. Ezek az eltérések kicsinyek, és ezért az ATCC 53666 tenyészetet az *A.roseorufa* új törzseként határozhatjuk meg.

A találmány oltalmi köre kiterjed azokra az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53666 törzsből származó további mutánsokra, transzformánsokra és a mutánsok rekombinánsaira, melyeket az ATCC 53869 vagy ATCC 53870 törzsként tartanak nyilván. Ezek a mutánsok létrejöhetnek spontán vagy a jól ismert módon indukálva. A mikroorganizmusok transzformánsait és rekombinánsait a klasszikus technika és a biotechnológia jól ismert módszereivel állíthatjuk elő. Mindezek a mutánsok, transzformánsok és rekombinánsok beletartoznak a találmány oltalmi körébe, feltéve, hogy a CP-91243 és CP-91244 antibiotikum egyikét vagy mindkettőt termelik. Az oltalmi kör kiterjed minden olyan további mutánsra, transzformánsra és rekombinánsra, mely a CP-91243 és/vagy CP-91244, illetve UK-58852 antibiotikumot termel.

Az új, savas, policiklusos éter-típusú antibiotikumok in vitro antibakteriális hatását a szokásos módszerekkel vizsgáljuk, és megadjuk az egy vagy több mikroorganizmussal szemben mért minimális gátlási koncentrációkat (MIC értékeket)  $\mu\text{g/ml}$ -be kifejezve. Az egyik ilyen eljárás agy/szív kivonatos (BHI) agart alkalmazva szaporodásra alkalmas mikroorganizmussal /International collaborative study on antibiotic sensitivity testing, Ericsson és Sherris, Acta Pathologica et Microbiologia Scandinav, Supo. 217, Section B: 64-68 (1971)/. Az egy éjszakán át kinövesztett tenyészetet 100-szorosra hígítjuk és 0,001 ml-t (20000 - 100000 sejtet) helyezünk az agar felszínére (20 ml BHI agar csészénként). 12 lépéses hígítású sorozatot készítünk a vizsgálati anyagból, a kezdeti koncentráció: 200  $\mu\text{g/ml}$ , az egyes lépések közt a hígítás kétszeres. 37°C hőmérsékleten 18 órás kinövesztés után értékeljük a lemezeket, a különálló telepeket nem véve figyelembe. A teszt mikroorganizmussal szembeni érzékenységet (MIC) úgy határozzuk meg, hogy megadjuk azt a legkisebb koncentrációt, melynél szabad szemmel megállapíthatóan a gátlás teljes.

A csirkék kokcidiális fertőzéssel szembeni hatékonyságát a CP-91243, CP-91244 és sói esetében az alábbi módszer segítségével határozhatjuk meg. Tíz napos, kórokozó mentes, fehér leghorn kaka<sup>ok</sup>sból álló háromtagú csoportokat olyan darakeveréssel etetünk, mely a vizsgálandó vegyületet vagy annak nátrium és/vagy káliumsóját

egyenletesen elosztva tartalmazza. Miután az állatokat 24 órán át ilyen táplálási körülmények között tartottuk, per os megfertőztük őket az Eimeria speciális fajainak oocisztáival. Egy másik ugyanilyen csoportot hasonló keverékkel etetünk, de az az említett vegyületeket nem tartalmazza. 24 óra elmúltával ezeket az állatokat is befertőztük, és ezek alkotják a fertőzött állatok kontrollcsoportját. Egy harmadik ugyanilyen csoportot ugyanúgy antibiotikumot nem tartalmazó táplálékkal etetünk, de nincsenek befertőzve kokcidiával. Ez a normál kontrollcsoport. Hat nap után értékeljük a kezelés eredményét.

A kokcidia elleni hatás mérésére J.E. Lynch módszerét használjuk /A new method of the primary evaluation of anticoccidial activity", Am.J.Vet.Res., 22: 324-326 (1961)/, aki a léziót 0-4 pontszámmal minősíti. A vegyület aktivitását úgy állapítjuk meg, hogy az egyes kezelt csoportoknál megállapított léziós pontszámot elosztjuk a fertőzött kontrollcsoport pontszámaival.

Az állati takarmány értékét általában közvetlenül határozták meg, megetetve azt az állattal. Az 1 197 826 számú brit szabadalmi leírás egy in vitro bendő módszert ismertet, ahol a táplálék mikroorganizmusok által okozott változásait gyorsabban és nagyobb pontossággal nyomonkövetve értékelhetjük a takarmányt. Az eljárás egy olyan eszközt alkalmaz, melyben az állatok emésztési folyamatai in vitro nyomonkövethetők és tanulmányozhatók. Gondosan

ellenőrzött körülmények között tartott laboratóriumi edénybe bevisszük az állati takarmányt, a bendőből származó oltóanyagot és különféle növekedésserkentőket, majd miközben a mikroorganizmusok lebontják a takarmányt, folyamatosan tanulmányozzuk a történt változásokat. A propionsavnak a bendőnedvben történő növekedése azt mutatja, hogy a tápkészítményben lévő növekedésserkentő a bendőben lezajló folyamatokat a kívánt irányba vitte. A propionsavtartalom változását százalékosan fejezzük ki a kontroll bendőnedv propionsavtartalmához viszonyítva. Hosszú ideig tartó in vitro etetési kísérletek bizonyítják, hogy megbízható korrekció van a bendőnedv propionsavtartalmának növekedése és az állati terméknövekedés között.

A bendőnedvet fisztulán keresztül olyan tehénből nyerjük, amit a hízlalásnál szokásos táplálék-adaggal és szénával etetünk. A bendőnedvet azonnal átszűrjük egy túrós-zsákon, és 10 ml szűrletet adunk egy 50 ml-es kónikus edénybe, amiben 400 mg standard szubsztrát (68 % kukoricakeményítő, 17 % cellulóz és 15 % extrahált szójaliszt), 10 ml puffer, pH = 6,8 és a vizsgálati vegyület van. Az edényeket 2 percen át oxigénmentes nitrogéngázzal átmoszuk, és 39°C hőmérsékletű vízfürdőben rázatjuk 16 órán át. Mindegyik vizsgálatot három párhuzamossal végezzük el.

Inkubáció után 5 ml mintát összekeverünk 1 ml 25 %-os metafoszforsavval. 10 perc múlva 0,25 ml hangyaszavat adunk hozzá, és a keveréket 1500 percenkénti fordulatszámmal centrifugáljuk 10 percen át. A mintákat D.W.

Kellog és J.Dairy által leírt gáz-folyadékkromatográfiás módszerrel analizáljuk /Science, 52: 1690 (1969)/. Meghatározzuk a kezelt és kezeletlen inkubációs edényekből származó mintákban az ecetsav, propionsav és vaj-sav csúcsainak magasságát.

A szárnyasok kokcidózisa, a lábasjószágek - például csirke, sertés, szarvasmarha, juh - enteritiszének és a sertésdizertériának a kezelésére a találmány szerinti vegyületeket megfelelő vívőanyagok kíséretében szájon át adjuk be. A gyógyszer beadása egyszerűen megoldható az ivóvízzel vagy a baromfitápban, úgy, hogy a hatóanyag dozированияát a napi ivóvízzel vagy a táp mennyiségével szabályozzuk. A gyógyszert közvetlenül kimérhetjük az ivóvízbe előnyösen folyadék, vizoldékony koncentrátum (például a vizoldékony só vizes oldata) formájában vagy hozzáadjuk a takarmányhoz premix vagy koncentrátum alakjában. A premix vagy koncentrátum, mely a hatóanyagot valamely vívőanyag kíséretében tartalmazza, általánosan alkalmazott eljárás a hatóanyagnak a táplálékba való bevételéhez. Az alkalmas vívőanyag lehet folyékony vagy szilárd, az igényeknek megfelelően. Ilyen vívőanyag lehet például a víz, különféle lisztek, kukoricatorzsa-liszt, kisajtolt szója lisztje, kisajtolt lenmag lisztje, ásványi keverékek, melyeket általánosságban használnak a baromfitápoknál. Különösen hatékony vívőanyag maga az illető állati takarmány, azaz annak kis adagja. Továbbá a micélium is használható vívőanyagként. A vívő-

anyag elősegíti, hogy a hatóanyag egyenletesen eloszolva legyen abban a végső takarmányban, amivel a premixet összekeverjük. Ez fontos, minthogy a hatóanyagoknak csak kis adagjaira van szükség. Fontos, hogy a hatóanyagot alaposan elkeverjük a premixben, majd azt a takarmányban. Ehhez a hatóanyagot alkalmas olajos vivőközegben - például szója-, kukorica-, gyapotmagolajban stb. - vagy illó szerves oldószerben diszpergáljuk vagy oldjuk és ezt a keveréket, illetve oldatot keverjük össze a vivőanyaggal. Nyilvánvaló, hogy a hatóanyag mennyisége a koncentrátumban széles határok között változhat, minthogy a végső állapotban a mennyiségét azáltal állítjuk be, hogy a takarmányt megfelelő mennyiségű premixszel keverjük össze a megfelelő hatóanyagkoncentrációt beállítva.

Nagy hatékonyságú koncentrátumok készíthetők el úgy, hogy a hatóanyagot fehérjetartalmú vivőanyaggal - például a sajtolt szója lisztjével vagy más fentebb említett liszttel - keverjük össze, és az így elkészített koncentrált adalékanyagot közvetlenül feletetjük az állatokkal. Ebben az esetben az állatok megkapják a szokásos takarmányadagjukat. Alternatív módon eljárhatunk úgy is, hogy a koncentrált adalékanyagot közvetlenül a takarmányhoz adjuk és egy olyan beállított tápanyagösszetételű, kész takarmány kerül az állatok elé, mely a találmány szerinti vegyületet gyógyászati szempontból hatásos koncentrációban tartalmazza.

A keveréket a szokásos módszerekkel alaposan összekeverjük, hogy a homogenitását biztosítsuk.

A szakemberek előtt nyilvánvaló, hogy a hatóanyagok itt ismertetett koncentrációi változhatnak a körülményeknek megfelelően. Így például a baromfiak kokcidiózisának kezelésekor a még növekedő állatoknál egy alacsony szintű gyógyszerkezést alkalmazunk. 6-12 hetes csirkéknél ez a hatásos megelőző kezelés. Tényleges fertőzés megállapításakor magasabb gyógyszerkezési szint szükséges, hogy a fertőzöttséget leküzdjük. A takarmányban alkalmazott szint általában 15-120 ppm. Ha a gyógyszerkezelés ivóvízen keresztül történik, a gyógyszer koncentrációját a vízben úgy állítjuk be, hogy a napi elfogyasztott ivóvízben lévő hatóanyag mennyisége megfeleljen a napi elfogyasztott takarmányban lévő hatóanyag mennyiségével.

A találmány szerinti antibiotikumokat beadhatjuk szabad sav vagy kationos sóik alakjában. Így például alkalmazhatjuk az antibiotikumok nátrium- vagy káliumsóit. Ezek a sók a szakemberek által jól ismert módszerekkel előállíthatók. A CP-91243 és CP-91244 antibiotikumot beadhatjuk külön-külön vagy egymással, illetve UK-58852 antibiotikummal kombinálva. A CP-91243, CP-91244 és az UK-58852 antibiotikumokat alkalmazhatjuk nyers formában vagy az antibiotikumot a kívánt koncentrációban tartalmazó beszárított fermentlé formájában is.

Az elmondottakat az alábbiakban példákban illusztráljuk. A példák kizárólag szemléltető célzatúak, és a találmány oltalmi körét nem korlátozzák.

1. példa

Az *Actinomadura roseorufa* FD 28455 (ATCC 53869) fermentálása és az antibiotikumok kinyerése az alábbiak szerint történik.

Az inokulum elkészítéséhez steril vizes táptalajt állítunk össze, melynek összetételw:

cerelose	10,0 g/l
kukoricakeményítő	5,0 g/l
kukoricalekvár	5,0 g/l
NZ Amine YTT <sup>*</sup>	5,0 g/l
kobalt-klorid	0,0002 g/l

\* Enzimmel emésztett kazein; védett márkanev (Humko Sheffield Chemical Co. Inc.).

Miután a kémhatástbeállítottuk pH = 7,0 értékre, 800 ml táptalajt mérünk 2800 ml-es Fernbach edénybe, vattadugóval és papírborítással lezárjuk, és 121<sup>o</sup>C hőmérsékleten (15 p.s.i, 1 atm.) nyomáson 60 percen át sterilizáljuk autoklávban. Miután lehült, a táptalajt beoltjuk az FD 28455 ferdetenyészetről származó vegetatív sejtek szuszpenziójával. Az edényeket 28<sup>o</sup>C hőmérsékleten rázatjuk körkörös rázógépen, melynek kitérése 4-6 cm, fordulatszámá percenként 150-200. A rázatást 6 napon keresztül végezzük.

A Fernbach edényben kinövesztett 800 ml tenyészetet használjuk a 14 literes fermentorban lévő 8 liter steril táptalaj beoltására, melynek összetétel a következő:

alkotórész	g/l
cerelóse	55,0
szójaliszt	10,0
kukoricalekvár	15,0
vérlist	10,0
mangánszulfát	
( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	0,1
magnézium-szulfát	
( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,1
kobalt-klorid	
( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0,002
kalcium-karbonát	3,0

pH beállítva 6,9-7,0 értékre.

A táptalajhoz hozzáadunk még 4 ml szilikonolajos habzásgátlót.

A fermentációt  $30^\circ\text{C}$  hőmérsékleten végezzük, percenkénti 500-as fordulatszámmal kevertetve, levegőztetésként a fermentlé 3/4 térfogatának megfelelő térfogatú levegőt átvezetve percenként a tenyészetben. A fermentációt addig végezzük, amíg lényeges hatóanyag-termelődést tapasztalunk. A CP-91243/CP-91244/UK-58852 antibiotikumok termelődésének nyomonkövetésére vékonyrétegkromatográfiát használunk. Adsorbens: szilikagél; futtatószer: kloroform/metanol, 9:1. A kifejlesztett kromatogramot vanillines reagenssel (6 g vanillin 100 ml etanolban és 3 % tömény kénsavban) hívjuk elő 5 percen át  $100^\circ\text{C}$  hőmérsékleten. Az antibiotikumok vöröses-kék foltokként jelennek meg.

A kimutatásnál eljárhatunk úgy is, hogy a lemezt B. subtilis teszt-mikroorganizmussal beoltott és 0,4 ml 5 %-os 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolium-kloridot tartalmazó agarral öntjük le. 16 órás, 37°C hőmérsékleten történő inkubálás után az antibiotikumot tartalmazó helyek színtelen foltokként jelennek meg a vörös háttérben.

Két fermentor fermentlevének egyesítésével kapott 14 liter fermentlevet azonos térfogatú metil-izobutil-ketonnal kevertetjük 20 percen át. A fázisokat elválasztjuk, és a szerves fázist bepároljuk 24 g olajat nyerve. Ezt a bepárlási maradékot 700 g szilikagélből (70-230 mesh, Universal Absorbents) készített oszlopon kromatografáljuk (oszlopméret: 5,5 cm x 8 cm üvegcsőben), eluensként kloroform/metanol, 19:1 elegyet használva. Az átfolyási sebesség: 10 ml/perc, és percenként veszünk egy frakciót. A frakciókat vékonyrétegekromatográfiával vizsgáljuk (Ameltech szilikagél GF lemezeken), kifejtéshez kloroform/metanol, 9:1 elegyet használva; előhívás vanillines reagenssel és melegítéssel. A CP-91243, CP-91244 vagy UK-58852 antibiotikumot tartalmazó frakciókat egyesítjük, és bepároljuk, így 0,7 g CP-91243, 4,9 g CP-91244 és 3,6 g UK 58852 antibiotikumot nyerünk.

A CP-91244 antibiotikumot tartalmazó bepárlási maradékot 200 g szilikagélből (70-230 mesh, Universal Adsorbents) készített oszlopon (2,5x100 cm) kromatografáljuk, eluensként etil-acetátot használva. Az átfolyási sebesség: 10 ml/perc, és percenként veszünk egy frakciót.

A frakciókat a fentiekben ismertetett módon vékonyréteg-kromatográfiával vizsgáljuk, és a CP-91244 antibiotikumot tartalmazó frakciókat egyesítjük, bepároljuk, és etil-acetátban átkristályosítjuk, 850 mg CP-91244 antibiotikumot nyerve.

A CP-91243 és UK-58852 frakciókat ugyanígy kromatografálva 280 mg, etil-acetátból kristályosított CP-91243-t és 1,5 g, hexánból kristályosított UK 58852-t nyerünk.

A CP-91243 és CP-91244 nátriumsó szerkezetének megállapításához a  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumát, az elemanalízisét és a FAB tömegspektrumát az ismert UK-58852 és UK 61689 adataival hasonlítjuk össze.

CP-91243 antibiotikum

Op.: 178-180°C.

/alfa/ $^{25}_D$  : -7,6° (c = 1, metanol).

FAB/MS: 996 (M + Na)<sup>+</sup>.

Elemanalízis a  $\text{C}_{50}\text{H}_{83}\text{O}_{18}\text{Na}\cdot\text{H}_2\text{O}$  képlet alapján:

számított: C: 59,22, H: 8,47 %;

mért: C: 59,22, H: 8,23 %.

$^{13}\text{C}$ -NMR( $\text{CDCl}_3$  + 2 csepp  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):

179,3 (0), 107,6(0), 103,3(1), 102,5(1), 98,0(0),  
 97,0(0), 87,1(1), 84,8(0), 84,3(0), 82,6(1), 82,4(1),  
 81,8(1), 81,0(1), 80,2(1), 76,0(1), 75,8(1), 73,4(1),  
 71,4(1), 70,9(1), 70,2(1), 67,9(1), 67,6(1), 59,6(3),  
 45,4(2), 44,7(1), 39,9(1), 39,0(2), 36,6(2), 33,8(1),  
 33,8(2), 33,5(1), 33,5(2), 33,1(1), 32,5(2), 32,5(2),  
 32,3(2), 32,3(2), 31,4(2), 31,0(2), 27,5(3), 26,9(2),  
 26,1(3), 23,2(3), 18,1(3), 17,9(3), 17,4(3), 16,8(3),  
 12,3(3), 10,9(3) és 10,3(3) ppm (zárójelben a hidrogén-  
 atomok száma).

CP-91244 antibiotikum

Op.: 154-157°C.

$[\alpha]_D^{25}$ : -4,8 (c = 1, metanol).

FAB/MS: 1010 (M + Na)<sup>+</sup>.

Elemanalízis a C<sub>51</sub>H<sub>85</sub>O<sub>18</sub>Na képlet alapján:

számított: C: 60,65, H: 8,59 %;

mért: C: 60,41, H: 8,58 %.

<sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>):

179,3(0), 107,6(0), 103,2(1), 102,5(1), 98,0(0), 97,0(0),  
87,1(1), 84,7(0), 84,3(0), 82,6(1), 82,4(1), 81,8(1),  
80,9(1), 80,3(1), 80,0(1), 75,8(1), 74,7(1), 73,1(1),  
71,7(1), 70,2(1), 67,8(1), 67,5(1), 59,6(3), 56,8(3),  
45,7(2), 44,8(1), 40,0(1), 39,0(2), 36,6(2), 33,9(2),  
33,7(1), 33,6(1), 33,6(2), 33,2(1), 32,6(2), 32,4(2),  
31,7(2), 31,5(2), 30,7(2), 27,7(3), 27,0(2), 26,9(2),  
26,1(3), 23,3(3), 18,4(3), 18,1(3), 17,5(3), 17,0(3),  
12,4(3), 11,1(3) és a 10,4(3) ppm.

Ezek szerint a két antibiotikum a (III) általános képlettel jellemezhető, ahol R jelentése CP-91243 esetén hidrogénatom, CP-91244 jelenlétében metilcsoport.

## 2. példa

Az *Actinomadura roseorufa* FD 28518 (ATCC 53870) törzs fermentálása úgy történik, ahogy azt az 1. példában az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53870 törzs esetében leírtuk. A 15 liter fermentlevet extraháljuk, és bepárolva 17 g olajos maradékot nyerünk. A bepárlási maradék-

kot az 1. példában leírtak szerint kromatografáljuk.  
A CP-91243, CP-91244 vagy UK-58852 antibiotikumot tartalmazó frakciókat egyesítjük, és bepárolva 5 g CP-91243-at, 3,5 g CP-91244-et és 2,5 g UK-58852-t kapunk. A bepárlási maradékot tovább kromatografáljuk, és kristályosítjuk az 1. példában leírtak szerint. Így 1,2 g CP-91243, 480 mg CP-91244 és 190 mg UK-58852 antibiotikumot nyerünk.

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás a (III) általános képletű - ahol R jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport - antibiotikum vagy gyógyászati szempontból alkalmazható kationsói előállítására, azzal jellemezve, hogy az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53666 törzs antibiotikumot termelő mutánsát vagy a nevezett mutánsantibiotikumot termelő további mutánsát, transzformánsát vagy rekombinánsát asszimilálható szénforrást, nitrogénforrást és szervesetlen sókat tartalmazó vizes táptalajon, süllyesztett tenyészetben, aerob körülmények között tenyésztjük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53869 vagy ATCC 53870 törzset vagy ezek valamelyikének a nevezett antibiotikumot termelő mutánsát, transzformánsát vagy rekombinánsát tenyésztjük.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53869 törzset tenyésztjük.

4. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53870 törzset tenyésztjük.

5. Eljárás a (III) általános képletű - ahol R jelentése hidrogénatom - antibiotikum vagy gyógyászati szempontból alkalmazható kationsói előállítására, azzal jellemezve, hogy az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53666 törzs nevezett

antibiotikumot termelő mutánsát vagy a nevezett mutáns antibiotikumot termelő további mutánsát, transzformánsát vagy rekombinánsát asszimilálható szénforrást, nitrogénforrást és szervesetlen sókat tartalmazó vizes táptalajon, süllyesztett tenyészetben, aerob körülmények között tenyésztjük.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53869 vagy ATCC 53870 törzset vagy ezek valamelyikének a nevezett antibiotikumot termelő mutánsát, transzformánsát vagy rekombinánsát tenyésztjük.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53869 törzset tenyésztjük.

8. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53870 törzset tenyésztjük.

9. Eljárás a (III) általános képletű - ahol R jelentése metilcsoport - antibiotikum vagy gyógyászati szempontból alkalmazható kationsói előállítására, azzal jellemezve, hogy az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53666 törzs nevezett antibiotikumot termelő mutánsát vagy a nevezett mutáns antibiotikumot termelő további mutánsát, transzformánsát, rekombinánsát asszimilálható szénforrást, nitrogénforrást és szervesetlen sókat tartalmazó vizes táptalajon, süllyesztett tenyészetben, aerob körülmények között tenyésztjük.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53869 vagy ATCC 53870 törzset vagy ezek valamelyikének a nevezett antibiotikumot termelő mutánsát, transzformánsát vagy rekombinánsát tenyésztjük.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az *Actinomadura* ATCC 53869 törzset tenyésztjük.

12. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az *Actinomadura* ATCC 53870 törzset tenyésztjük.

13. Eljárás az (I) képletű, valamint a (III) általános képletű - ahol R jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport - antibiotikumok előállítására, azzal jellemezve, hogy az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53666 törzs nevezett antibiotikumot termelő mutánsát vagy a nevezett mutáns antibiotikumot termelő további mutánsát, transzformánsát vagy rekombinánsát asszimilálható szénforrást, nitrogénforrást és szeretlen sókat tartalmazó vizes táptalajon, süllyesztett tenyészetben, aerob körülmények között tenyésztjük.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53869 vagy ATCC 53870 törzset vagy ezek valamelyikének a nevezett antibiotikumokat termelő mutánsát, transzformánsát, rekombinánsát tenyésztjük.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53869 törzset tenyésztjük.

16. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53870 törzset tenyésztjük.

17. Eljárás az (I) képletű antibiotikum előállítására, azzal jellemezve, hogy az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53666 törzs antibiotikumot termelő mutánsát vagy a nevezett törzs antibiotikumot termelő további mutánsát, transzformánsát vagy rekombinánsát asszimilálható szénforrást, nitrogénforrást, és szervesetlen sókat tartalmazó vizes táptalajon, süllyesztett tenyészetben, aerob körülmények között tenyésztjük.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53869 vagy ATCC 53870 törzset vagy ezek valamelyikének a nevezett antibiotikumot termelő mutánsát, transzformánsát vagy rekombinánsát tenyésztjük.

19. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nevezett antibiotikumot kinyerjük.

20. A 18. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53869 törzset tenyésztjük.

21. A 18. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53870 törzset tenyésztjük.

22. A 18. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nevezett antibiotikumot kinyerjük.

23. A 22. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az *Actinomadura roseorufa* ATCC 53869 törzset tenyésztjük.

24. A 22. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az Actinomadura roseorufa ATCC 53870 törzset tenyésztjük.

25. Eljárás baromfiak kokcidiális fertőzöttségének megelőzésére vagy kezelésére, azzal jellemezve, hogy az állatoknak az alábbi antibiotikum(ok) antikokcidiális hatású mennyiségét adjuk be:

- a) az 1. igénypont szerint előállított egyik antibiotikumot; vagy
- b) az 1. igénypont szerint előállított antibiotikumokat; vagy
- c) az 1. igénypont szerint előállított egyik antibiotikum és az UK-58852 antibiotikumot; vagy
- d) az 1. igénypont szerint előállított antibiotikumokat és az UK 58852 antibiotikumot.

26. A igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nevezett antibiotikumot vagy antibiotikumokat úgy adjuk be a baromfiaknak, hogy a táplálékukhoz keverjük.

27. Baromfi takarmánykészítmény, azzal jellemezve, hogy a készítmény az alábbi antibiotikumoknak a baromfi antikokcidiális fertőzésére vagy annak megelőzésére hatással rendelkező mennyiségét tartalmazza:

- a) az 1. igénypont szerint előállított egyik antibiotikum; vagy
- b) az 1. igénypont szerint előállított antibiotikumok vagy
- c) az 1. igénypont szerint előállított egyik antibiotikum és az UK-58852; vagy

- d) az 1. igénypont szerint előállított antibiotikumok és az UK-58852 antibiotikum.

28. Eljárás lábasjószág enteritiszének kezelésére, azzal jellemezve, hogy az állatoknak az alábbi antibiotium(ok) enteritisz-ellenes hatású mennyiségét adjuk be:

- a) az 1. igénypont szerint előállított egyik antibiotikum; vagy
- b) az 1. igénypont szerint előállított antibiotikumok; vagy
- c) az 1. igénypont szerint előállított egyik antibiotikum és az UK-58852 antibiotikum; vagy
- d) az 1. igénypont szerint előállított antibiotikumok és az UK-58852 antibiotikum.

29. A 28. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nevezett antibiotikumot vagy antibiotikumokat úgy adjuk be a lábasjószágnak, hogy hozzáadjuk az állatok eleségéhez.

30. Lábasjószágok tápkészítménye, azzal jellemezve, hogy az alábbi antibiotikum(ok) enteritisz ellenes hatású mennyiségét tartalmazza:

- a) az 1. igénypont szerint előállított egyik antibiotikum; vagy
- b) az 1. igénypont szerint előállított antibiotikumok;
- c) az 1. igénypont szerint előállított egyik antibiotikum és az UK-58852 antibiotikum; vagy
- c) az 1. igénypont szerint előállított antibiotikumok és az UK-58852 antibiotikum.

31. Eljárás a sertés dizentéria kezelésére, azzal

jellemezve, hogy az állatnak az alábbi antibiotikum(ka)t adjuk be:

- a) az 1. igénypont szerint előállított egyik antibiotikumot; vagy
- b) az 1. igénypont szerint előállított antibiotikumokat; vagy
- c) az 1. igénypont szerint előállított egyik antibiotikumot és az UK-58852 antibiotikumot; vagy
- d) az 1. igénypont szerint előállított antibiotikumokat és az UK-58852 antibiotikumot.

32. A 31. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nevezett antibiotikumot vagy antibiotikumokat úgy adjuk be a sertéseknek, hogy hozzáadjuk az állatok eleségéhez.

33. Eljárás kérődzők vagy egyszerű gyomrúak növekedésserkentésére és/vagy tápanyaghasznosításuk fokozására, azzal jellemezve, hogy az állatoknak az alábbi antibiotikum(ok) növekedést serkentő és/vagy tápanyaghasznosítást fokozó mennyiségét adjuk be:

- a) az 1. igénypont szerint előállított egyik antibiotikumot; vagy
- b) az 1. igénypont szerint előállított antibiotikumokat; vagy
- c) az 1. igénypont szerint előállított egyik antibiotikumot és az UK-58852 antibiotikumot; vagy
- d) az 1. igénypont szerint előállított antibiotikumokat

és az UK-58852 antibiotikumot.

34. A 33. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nevezett antibiotikumot vagy antibiotikumokat az állatok eleségéhez adjuk.

*Waldel + Lakóval*  
*AKI*

A meghatalmazott

**ifj. Szentpéteri Ádám**  
szabadalmi ügyvivő  
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi  
Szabadalmi Iroda tagja  
H-1061 Budapest, Daiszínház u. 10.  
Telefon: 153-3783, Fax: 153-3664

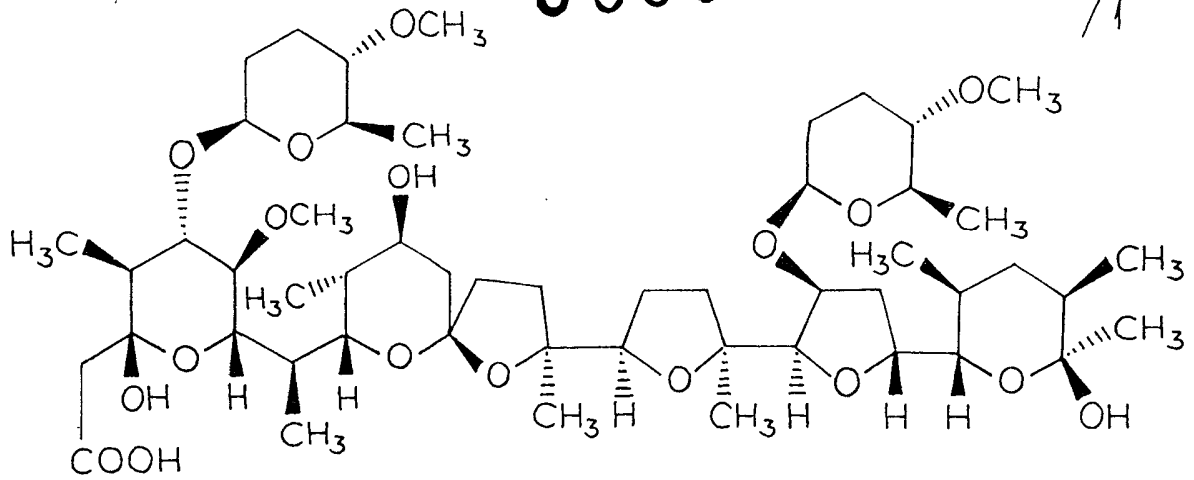
KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY

11347/92

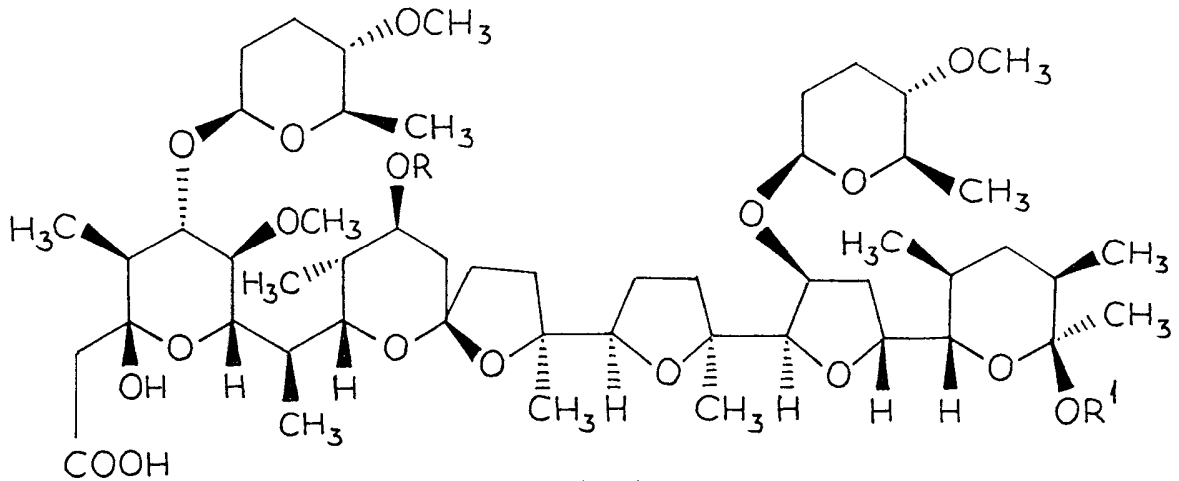
4460/89

59932

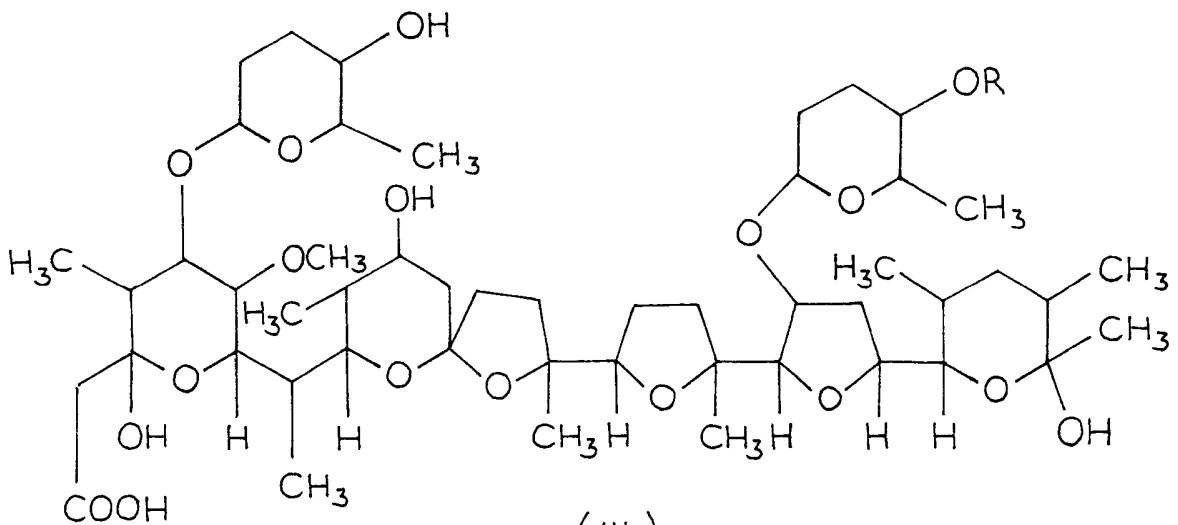
1/1



(I)



(II)



(III)

ifj. Szentpéteri Ádám  
szabadalmi ügyvivő  
az S.B.G. & K. Budapesti Szemlétközi  
Szabadalmi Ároda tagja  
H-1061 Budapest, Duna u. 10.  
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664