



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 21.10.1970, (P. 144003)

Pierwszeństwo: 03.02.1970 dla zastrz. 1—5
12.05.1970 dla zastrz. 6
Japonia

Zgłoszenie ogłoszono: 10.04.1973

Opis patentowy opublikowano: 09.02.1976

MKP C12d 13/02

Int. Cl.² C12d 13/02

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Państwa Rzeczypospolitej (L. 12.000)

Twórcy wynalazku: Hamao Umezawa, Osamu Tanabe, Tomio Takeuchi

Uprawniony z patentu: Zaidan Hojin Biseibutsu Kagaku Kenkyu Kai,
Tokio (Japonia).

Sposób wytwarzania oudenonu oraz jego soli, obniżających ciśnienie krwi

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowego środka hipotensyjnego (obniżającego ciśnienie krwi) — oudenonu o wzorze 1. W szczególności, wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania oudenonu na drodze fermentacyjnej oraz sposobu jego wyodrębniania i oczyszczania. Sposobem według wynalazku otrzymuje się wspomniany środek hipotensyjny oraz jego sole w rozcieńczonych roztworach, pod postacią zagęszczonych surowych roztworów, surowych preparatów stałych, oczyszczonych preparatów stałych oraz czystych form krystalicznych. Substancja ta hamuje wzrost hydroksylazy tyrozynowej oraz obniża ciśnienie krwi. Znajduje ona zastosowanie przy leczeniu schorzeń wywołanych nadciśnieniem.

Związek otrzymany sposobem według wynalazku, rozpuszcza się w wodzie, metanolu, etanolu, propanolu, butanolu, acetonie, metyloizobutyloketonie, octanie etylu, octanie butylu, chloroformie i w benzenie, nie rozpuszcza się w eterze, heksanie i w eterze naftowym, wykazuje maksimum przy 246 m w buforze fosforanowym (pH = 7.0) oraz dwa maksima przy 221 mμ i 285 mμ w 0,1 n HCl, daje dodatnią próbę z 2,4-dwunitrofenylohydrazyną i z odczynnikami tetrazoliowym, natomiast ujemną z odczynnikami Fehlinga i Tollensa, tworzy kryształy o temperaturze topnienia 77—79°C, jest czynna optycznie ($\alpha_D^{20} = -10,6^\circ$ w 0,5% etanolu), przy miareczkowaniu jej wodnego roztworu wykazuje $pK' = 4,1$, posiada wzór cząsteczkowy

2

$C_{12}H_{16}O_3$, a jej widmo w podczerwieni, wykonane w bromku potasowym, wykazuje maksima przy następujących wartościach liczb falowych w cm^{-1} : 3400, 2900, 1710, 1660, 1560, 1455, 1420, 1380, 1300, 1270, 1255, 1195, 1170, 1130, 1100, 1050, 1015, 990, 980, 955, 935, 895, 885, 860, 840, 820, 810, 780; krystalizuje dobrze z heksanu.

Na fig. 1 przedstawiono widmo absorpcyjne oudenonu w ultrafiolecie, wykonane w buforze fosforanowym o pH = 7,0 oraz w 0,1 n HCl.

Na fig. 2 przedstawiono widmo absorpcyjne oudenonu w podczerwieni, wykonane w bromku potasowym.

Na fig. 3 przedstawiono widmo absorpcyjne w podczerwieni soli potasowej oudenonu, wykonane w bromku potasowym.

Zgodnie z wynalazkiem, sposób produkcji oudenonu, obejmuje hodowlę wytwarzających oudenon mikroorganizmów w środowisku wodnym, zawierającym źródła węgla i azotu, przy napowietrzaniu, do momentu nagromadzenia się w tym roztworze znacznej ilości oudenonu. Ilość oudenonu w pożywce określić można spektrofotometrycznie lub na podstawie własności hamowania hydroksylazy tyrozynowej.

Organizm, wytwarzający oudenon, stanowiący rodzaj grzyba, odkryto i zebrano pod drzewami iglastymi w Kirizumiyama w prefekturze Gumma.

Hodowano go i oznaczono jako szczep 10F w Institute of Microbial Chemistry, Shinagawa-ku, Tokyo. Powierzono go Kogoyo Gijutsuin Hakko Kenkyujo w prefekturze Chiba, gdzie włączono go do stałej kolekcji jako No. 503. Owocniki tego grzyba wyhodowano na podłożu z trocin (10 g trocin zmieszano z 60 ml pożywki, zawierającej 2,0% glukozy i 0,5% suchych drożdży, umieszczono w kolbie o pojemności 500 ml i poddano sterylizacji w temperaturze 120°C przez 20 minut) w temperaturze 27°C; są to owocniki typu Collybia. Kapelusz grzyba ma 4–11 cm średnicy. Początkowo kapelusz jest wypukły, z czasem otwiera się i spłaszcza, a jego środkowa część nieco się unosi. Gdy jest mokro, jego powierzchnia jest pokryta śluzem i jasnobrązowa lub jasno szarobrązowa. Dają się na niej zauważyć żyłki (zmarszczki), ułożone promieniście lub tworzące siatkę.

Oddzielne blaszki, białe lub żółtobiałe łączą się bezpośrednio z łodyżką. Wewnętrzna część łodyżki jest pusta, a zarodnia jest koloru białego. Jeśli chodzi o podobieństwo do znanych grzybów, to szczep 10F posiada wspólne własności z *Oudemansiella*, a spośród trzech znanych gatunków *Oudemansiella* najbardziej przypomina *Oudemansiella radicata*.

Grzyby klasyfikuje się na podstawie morfologii ich owocnika, nie jest jednak zupełnie pewne, czy owocnik wyhodowany na sztucznym podłożu jest identyczny z ukształtowanym w warunkach naturalnych. Szczep 10F, który we wczesnych stadiach wzrasta na opisanym wcześniej podłożu z trocin, przypomina *Pseudohiatula ohshimae*, Hongo et Matsuda. Jednakże w okresie dojrzałości sklasyfikowano go jako *Oudemansiella radicata*, który zdeponowano w Amerykańskim Banku Szczepów pod nr ATCC 20 295. Jest rzeczą znaną, że ten sam związek znajduje się często w materiale z hodowli różnych rodzajów grzybów. Spektrofotometryczna metoda, pozwala na wykrycie oudenonu w materiale z hodowli mikroorganizmów.

Sposobem według wynalazku można także wyodrębnić i oczyszczać oudenon. Spektrofotometryczna metoda oznaczania oudenonu znajduje również zastosowanie do ustalania wydajnych sposobów jego ekstrakcji i oczyszczania. Wyrażenie „szczep wytwarzający oudenon” stosowane w opisie wynalazku, obejmuje szczep 10F.

Zgodnie z wynalazkiem oudenon wytwarza się w napowietrzanej hodowli szczepu wytwarzającego oudenon. Hodowlę można prowadzić na podłożu stałym, jednakże dla wytwarzania większych ilości oudenonu korzystna jest hodowla w ośrodku ciekłym. Szczep 10F hoduje się np. na skosie agarowym o zawartości 2,0% glukozy, 0,5% suchych drożdży, 1,5% agaru (sterylizację prowadzono przez 20 minut w temperaturze 120°C, nie regulowano pH, przy czym po sterylizacji wartość pH wynosiła 5,6), z wyhodowaną grzybnią zaszczepiono na pożywkę, na której wytwarzano oudenon.

Dobre wyniki daje także inna metoda szczepienia: szczep produkujący oudenon hoduje się na opisanej już pożywkę z trocin w temperaturze 27°C przez 10–20 dni, podłoże to wraz z grzybnią zawieszają się w świeżej pożywkę (zawierającej np.

2,0% glukozy i 0,5% suchych drożdży), a zawieszinę zaszczepia się na pożywkę, w której wytwarzany jest oudenon.

Można też zaszczepiać brzeczkę z hodowli na wytrząsarce lub z napowietrzanej wewnętrznie fermentacji na pożywkę do wytwarzania oudenonu. Szczep, wytwarzający oudenon, może wzrastać w temperaturze 20–35°C, jednakże przy produkcji oudenonu dobrze jest utrzymywać go w temperaturze 25–30°C. Do hodowli tego szczepu nadają się substancje znane jako pożywki dla mikroorganizmów. Jako źródło węgla stosować można np. glukozę, dekstrynę, skrobię, laktozę, sacharozę, glicerynę lub kwas octowy. Dodając wymienione źródła węgla do zasadniczej pożywki zawierającej 0,5% peptonu, 0,3% suchych drożdży, 0,3% KH_2PO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i 0,1% NaCl , badano tworzenie się oudenonu w pożywkach z różnymi źródłami węgla w hodowli na wytrząsarce, w temperaturze 27°C przez okres 14 dni. Szczep, wytwarzający oudenon, hodowany na opisaną pożywkę z trocin przez 14 dni w temperaturze 27°C, zawieszono w pożywkę zawierającej 2,0% glukozy i 0,5% suchych drożdży, a następnie po 10 ml zawiesiny zaszczepiono na 120 ml pożywki w 500 ml kolbach.

Wytwarzanie oudenonu w płynie z hodowla ($\mu\text{g/ml}$) oraz wzrost tej hodowli (obfity wzrost +++, średni wzrost ++, słaby wzrost +), kształtowały się w następujący sposób: glukoza 59 $\mu\text{g/ml}$ 7 dnia, 300 $\mu\text{g/ml}$ i +++ 10 dnia, maltoza: 7 $\mu\text{g/ml}$ 7 dnia, mniej niż 5 $\mu\text{g/ml}$ i ++ 10 dnia, dekstryna: 12,5 $\mu\text{g/ml}$ 7 dnia, mniej niż 5 $\mu\text{g/ml}$ i ++ 10 dnia, skrobia: 5 $\mu\text{g/ml}$ 7 dnia, mniej niż 5 $\mu\text{g/ml}$ i ++ 10 dnia, laktoza: 25 $\mu\text{g/ml}$ 7 dnia, 100 $\mu\text{g/ml}$ i + 10 dnia, sacharoza: 14 $\mu\text{g/ml}$ 7 dnia, 15 $\mu\text{g/ml}$ i ++ 10 dnia, octan sodowy: mniej niż 5 $\mu\text{g/ml}$ 7 i 10 dnia, 18 $\mu\text{g/ml}$ i + 15 dnia.

Jako źródło węgla i środków przeciw pienieniu używać można olejów roślinnych takich, jak sojowy, sezamowy itp. oraz tłuszczów zwierzęcych w rodzaju oleju smalcowego itp. Oudenon składa się z węgla, wodoru i tlenu, a nie zawsze zawiera azot. Jednakże, w hodowli szczepu, wytwarzającego ten związek, można stosować substancje znane jako dostarczyciele azotu w innych hodowlach. Należą do nich: pepton, ekstrakt z mięsa, drożdże, ekstrakt z drożdży, mączka sojowa, mączka z nasion bawełny, mączka z orzeszków ziemnych, namok z kukurydzy, otręby ryżowe oraz nieorganiczne związki, dostarczające azot.

Jako przykłady pożywek, stosowanych do hodowli szczepu wytwarzającego oudenon, wymienić można: pożywka A, zawierająca 2,0% glukozy, 0,5% peptonu, 0,3% KH_2PO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH nie było regulowane), pożywka B, zawierająca 2,0% glukozy, 1,0% namoku z kukurydzy (pH = 5,6), pożywka C, zawierająca 2,0% glukozy, 1,0% mączki sojowej, 0,5% suchych drożdży (pH = 5,6).

Każdą pożywkę o objętości 125 ml umieszczano w 500 ml kolbie i zaszczepiano wyhodowanym w opisany już sposób szczepem, wytwarzającym oudenon. Wytwarzanie oudenonu oraz zmiany pH przebiegały w następujący sposób:

Tablica 1

Dni	pH	Pożywka A μg/ml	pH	Pożywka B μg/ml	pH	Pożywka C μg/ml
5	4.4	11	4.8	5	4.4	15
7	4.4	5	4.4	12	4.4	64
8	4.4	11	4.8	29	4.4	88
11	4.4	62	4.6	100	5.0	95
12	4.8	158	5.0	215	2.2	229
15	5.2	180	5.2	255	5.6	475

Jak widać z powyższego opisu, pepton, namok z kukurydzy, mączka sojowa i suche drożdże stanowią przykłady odpowiednich dla produkcji oudenonu źródeł azotu. W tym samym celu można też, jak stwierdzono, stosować mączkę z orzeszków ziemnych, mączkę z nasion bawełny, kazeinę i hydrolizat kazeiny. Można też dodawać soli nieorganicznych i, jeśli to potrzebne, minimalnych ilości soli metali ciężkich.

Do produkcji oudenonu na drodze fermentacji zastosować można fermentacyjne metody produkcji antybiotyków: np. związek ten wytwarza się w hodowli na trzęsawce lub przez napowietrzaną fermentację wglębną, dodając środków zapobiegających pienieniu takich, jak oleje roślinne, tłuszcze zwierzęce lub żywice silnikowe.

W celu oznaczenia ilości oudenonu mierzy się jego zdolność do hamowania hydroksylazy tyrozynowej. Sposób ten opisano w Journal of Antibiotics 21, 350—352 (1968). Oudenon może być oznaczony następującą spektrofotometryczną metodą: badany roztwór tego związku rozcieńcza się $\frac{1}{15}$ M buforem fosforanowym o pH=7,0 (krotność rozcieńczenia oznaczono jako n) i odczytuje się wartość gęstości optycznej (a) rozcieńczonego roztworu przy 246 μm w kiuwecie o długości 1 cm, wspomniany roztwór rozcieńcza się 0,1 N HCl (krotność rozcieńczenia oznaczono jako n) i przy 246 μm odczytuje się wartość gęstości optycznej rozcieńczonego roztworu w kiuwecie o długości 1 cm, ilość oudenonu w badanym roztworze oblicza się w następujący sposób:

$$\frac{(a-b)n}{1000-60} \times 10^4 = \mu\text{g/ml oudenonu w roztworze}$$

W przypadku, gdy szczep wytwarzający oudenon hodowano w pożywce ciekłej, związek ten znajdował się zarówno w części ciekłej, jak i w części stałej brzcзки hodowlanej. Np. w hodowli tego szczepu na trzęsawce w pożywce, zawierającej 2,0% glukozy i 0,5% peptonu (125 ml pożywki w kolbie o pojemności 500 ml) 10 ml brzcзки zawierało następujące ilości oudenonu w części stałej i w części ciekłej) oudenon znajdujący się w części stałej ekstrahowano metanolem i oznaczano spektrofotometrycznie):

Tablica 2

Dni	μg oudenonu w części ciekłej	μg oudenonu w części stałej
5	372	185
7	845	365
8	1300	410
11	2180	342

Oudenon rozpuszcza się w wodzie, metanolu, etanolu, butanolu, octanie etylu, octanie butylu, chloroformie oraz w benzenie i daje się wyekstrahować z wody za pomocą takich rozpuszczalników, jak butanol, octan etylu, octan butylu, chloroform i benzen. Oznaczone współczynniki podziału są następujące: butanol — woda: 8 przy pH=2,0, 7,5 przy pH=3, przy pH=4, 2,5 przy pH=5, 2,5 przy pH=6, 3 przy pH=8, 0,6 przy pH=9, 0,8 przy pH=10, octan etylu — woda: 5 przy pH=2,0, 4 przy pH=3, 1,5 przy pH=4, 0,2 przy pH=5, mniej niż 0,1 przy pH=6, octan butylu — woda: 3 przy pH=2, 2,5 przy pH=3, 1 przy pH=4, 0,1 przy pH=5, mniej niż 0,1 przy pH=6, chloroform — woda: 19 przy pH=4, 1 przy pH=5 i 0,1 przy pH=6. Współczynnik podziału pomiędzy ketonem metyloizobutylowym a wodą, oznaczony za pomocą pomiarów stopnia hamowania hydroksylazy tyrozynowej był następujący: 1 przy pH=2, 1 przy pH=3, 0,3 przy pH=4, 0,1 przy pH=5, 0,1 przy pH=6.

Oudenon jest związkiem trwałym przy pH=2,0, 7,0 i 9,0: aktywność jego nie zmniejsza się po 30 minutach w temperaturze 60°C i po 5 minutach w temperaturze 100°C. Można go wyekstrahować z roztworu kwaśnego za pomocą rozpuszczalnika, niemieszącego się z wodą. Jego roztwory można zataczać przez odparowanie rozpuszczalnika. Jak widać z wartości współczynników podziału, oudenon rozpuszczony w niemieszącym się z wodą rozpuszczalniku przechodzi do warstwy wodnej o odczynie obojętnym bądź alkalicznym. Np. można wyekstrahować oudenon z brzcзки fermentacyjnej za pomocą butanolu, octanu etylu, octanu butylu, chloroformu itp. przy pH=2—3. Do ekstrakcji tej nadaje się wielostopniowy ekstraktor, zwiększający znacznie wydajność procesu, który można zastosować do całej brzcзки łącznie z grzybnia. Oddestylowanie rozpuszczalnika pod normalnym lub zmniejszonym ciśnieniem daje syrop lub suchy, surowy proszek, z którego można wykrystalizować oudenon, w postaci białych kryształów.

W pewnych przypadkach zachodzi konieczność przesączenia brzcзки; oudenon wyodrębnia się z przesączu w sposób wyżej podany, a z części stałej ekstrahuje się go metanolem, etanolem, acetonem, octaniem etylu, octaniem butylu, chloroformem itp. Do krystalizacji małych ilości oudenonu używać można heksanu lub mieszaniny heksanu z benzenem, przy większych jednak ilościach można zastosować rozpuszczalniki, w których oudenon jest lepiej rozpuszczalny, a więc wodę, metanol, etanol, butanol, octan etylu, aceton, benzen i chloroform. Przy krystalizacji oudenonu stosuje się

także dodawanie do jego roztworu, rozpuszczalnika, w którym jest on źle rozpuszczalny.

Jeżeli surowy materiał zawiera zanieczyszczenia, uniemożliwiające krystalizację, to przeprowadza się go z roztworu w rozpuszczalniku, nie mieszającym się z wodą, do roztworu wodnego o odczynie obojętnym lub alkalicznym i ekstrahuje się go z tego roztworu, ale już o odczynie kwaśnym, rozpuszczalnikiem niemieszającym się z wodą. W niektórych przypadkach, oudenon można oczyścić chromatograficznie. Przykładem odpowiedniego sposobu jest chromatografia na silikażelu za pomocą mieszaniny benzen-octan etylu (1:2).

Jak podano w opisie wynalazku, oudenon ma własności kwasowe, a zatem do jego ekstrakcji i wyodrębniania można zastosować żywice anionowymienne i tak np. 130 ml brzezki fermentacyjnej, zawierającej 310 µg/ml oudenonu, przepuszczono przez kolumnę wypełnioną 20 mililitrami żywicy Dowex 1 × 2 (dostawca: Dow Chemical, U.S.A.) w postaci Cl⁻, przemyto kolumnę wodą destylowaną i eluowano ją 0,2 N HCl. Eluat dzielono na 20 gramowe frakcje i we frakcjach 2–9 znajdowało się 16 mg oudenonu. Do wyodrębniania oudenonu służyć może także żywica anionowymienna IRA-400 (dostawca: Rhom and Haas, U.S.A.). Zastosowanie żywicy anionowymiennych w opisanych procesach pozwala na wyodrębnienie oudenonu z brzezki fermentacyjnej z co najmniej 75% wydajnością. Wykorzystując własności kwasowe oudenonu, można go wytrącić z jego roztworów, np. z wodnego roztworu związek ten daje się wytrącić w postaci osadu przez dodanie jonu miedziowego. Poddanie tego osadu działaniu kwasu, ekstrakcja rozpuszczalnikiem organicznym i odparowanie daje oudenon w postaci oczyszczonej.

Jak wynika z opisu, stosując sposób według wynalazku, można wyodrębnić oudenon przez ekstrakcję rozpuszczalnikiem, absorpcję i eluowanie, wytrącanie w postaci osadu z roztworów lub destylację.

Oudenon, otrzymany sposobem według wynalazku, posiada następujące własności i aktywność biologiczną; krystaliczny oudenon (białe płatki), otrzymany przez krystalizację z heksanu lub z mieszaniny benzen-heksan, topi się w temperaturze 77–79°C, posiada wzór sumaryczny C₁₂H₁₆O₃ (analiza elementarna: obliczono C 69,21, H 7,74, O 23,05, znaleziono: C 69,5, H 7,86, O 23,01, C₁₂H₁₆O₃ według spektroskopii masowej o dużej rozdzielności), rozpuszcza się w wodzie, metanolu, etanolu, propanolu, butanolu, acetonie, ketonie metyloizobutyloowym, octanie etylu, octanie butylu, benzenie, chloroformie, a nie rozpuszcza się w eterze, eterze naftowym i heksanie, jest czynny optycznie ([α]_D²⁰ = –10,6°, 0,5% etanol). Jego roztwór (10 µg/ml) w buforze fosforanowym (1/15 M) o pH = 7,0 wykazuje maksimum przy 246 mµ (E_{1cm}^{1%} = 1000), w jego roztworze (10 µg/ml) w 0,1 N HCl wykazuje dwa maksima przy 221 mµ (E_{1cm}^{1%} = 625) i 285 mµ (E_{1cm}^{1%} = 963,

Wykonane w KBr widmo w podczerwieni tego związku wykazuje pasma absorpcji przy 3400, 2900,

1710, 1660, 1560, 1455, 1420, 1380, 1300, 1270, 1255, 1195, 1170, 1130, 1100, 1050, 1015, 990, 980, 955, 935, 895, 885, 860, 840, 820, 810 i 780 cm⁻¹. Ma własności kwasowe i przechodzi do rozpuszczalnika, niemieszającego się z wodą, w środowisku kwaśnym, a z rozpuszczalnika tego przechodzi do wody przy wartościach pH wyższych od 5–6. Jest adsorbowany przez żywicę anionowymienną, a miareczkowanie wykazuje pK' około 4,1. Daje dodatnie reakcje z 2,4-dwunitrofenylohydrazyną i takimi odczynnikami, jak kwas hydroksamowy — chlorek żelazowy, czy odczynnik tetrazoliawy, a ujemne reakcje z odczynnikami Fehlinga i Tollensa.

Wobec palladu na węglu pochłania dwa mole wodoru, dając C₁₂H₂₀O₃. Chromatografowany na cienkiej warstwie silikażelu wykazuje R_f około 0,7 w układzie butanol: kwas octowy: woda (4:1:1) a R_f około 0,1 w układzie benzen-octan etylu (2:1).

W stężeniu 100 µg/ml oudenon nie hamuje wzrostu następujących bakterii na pożywce agarowej: *S. aureus*, *E. coli* (K12), *S. typhosa*, *S. dysenteriae*, *K. pneumoniae*, *B. anthracis*, *B. subtilis*, *Mycobacterium* 607, nie hamuje również *Pyricularia oryzae*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium chrysogenum* na pożywce agarowej z glukozą. W stężeniu 12,5 µg/ml hamował wzrost *Pyricularia oryzae* na pożywce ryżowej o pH = 5,0.

Związek o wzorze C₁₂H₁₆O₃, topiący się w temperaturze 75–80°C, nie był dotąd znany, oudenon jest zatem związkiem nowym, co zostało również potwierdzone przez jego wzór strukturalny. Jest słabo toksyczny dla zwierząt. Kiedy oudenon rozpuszczono w wodzie destylowanej (pH = 2,3) i podano myszom, to LD₅₀ wynosiła 138 mg/kg przy wstrzyknięciu dożylnym, 163 mg/kg przy wstrzyknięciu dootrzewnowym, 1000 mg/kg przy wstrzyknięciu podskórnym i 1100 mg/kg przy podaniu doustnym. Kiedy oudenon rozpuszczono w wodzie destylowanej i zobojętniono, to LD₅₀ wynosiła, odpowiednio, 1270 mg/kg, 1310 mg/kg, 1400 mg/kg i 2200 mg/kg. Podawanie oudenonu w ilościach 160 mg/kg 40 mg/kg lub 10 mg/kg dziennie, doustnie lub dootrzewnowo, przez 30 dni, nie wywołało żadnych objawów zatrucia, natomiast spowodowało spadek ciśnienia krwi.

Wpływ oudenonu na hydroksylazę tyrozynową badano w następujących sposób: mieszanina reakcyjna zawierała 0,1 µmol L-tyrozyny-¹⁴C (1,1 × 10⁵ sygnałów na minutę), 1 µmol 2-amino-4-hydroksy-6,7-dwumetylotetrahydropterydyny, 0,1 ml roztworu hydroksylazy tyrozynowej (1 mg białka/ml), 200 µmoli buforu octanowego o pH = 6,0, 100 µmoli merkaptioetanolu, 100 µg, 50 µg, 25 µg, 12,5 µg lub 0 µg oudenonu w 1 ml; po 15 minutach w temperaturze 30°C wyodrębniano 3,4-dwuhydroksyfenyloalaninę-¹⁴C za pomocą chromatografii na tlenku glinowym i oznaczono jej ilość na podstawie radioaktywności. Próba ta wykazała następujące % hamowania przy klejonych stężeniach oudenonu: 74,1% przy 100 µg/ml, 57,6% przy 50 µg/ml, 39,0% przy 25 µg/ml, 30,6% przy 12,5 µg/ml. Hamowanie nie cofało się po dodaniu Fe⁺⁺ (1 × 10⁻³M).

Po przedstawieniu wyników na wykresie zgodnie z równaniem Lineweaver-Burk, daje się zau-

ważąc niekonkurencyjny charakter oudeonu w stosunku do tyrozyny, a konkurencyjny w stosunku do 2-amino-4-hydroksy-6,7-dwumetylotetrahydrop-terydyny.

Struktura oudenonu, krystalizowanego z heksanu, została ustalona i obrazuje ją wzór 1.

Jak widać ze wzoru strukturalnego, oudenon nie posiada grupy karboksylowej, ma jednak, jak to już wcześniej opisano, własności kwasowe. Jego sole z metalami mają wzór $(C_{12}H_{17}O_4/nM/M \text{ tworzy jon } M^{n+})$. Ustalono z pewnością, że budowę oudenonu można opisać wzorami strukturalnymi 1,2,3,4, przedstawionymi na schemacie 1.

Na schemacie tym M^{n+} oznacza jony metali, np. Ca^{++} odpowiada M^{2+} .

W czasie biosyntezy, w płynie hodowlanym, oudenon występuje głównie w formie związków o wzorach 2, 3 i 4, natomiast ekstrahowany niemieszającym się z wodą rozpuszczalnikiem przybiera postać wzoru 1.

Zgodnie z wynalazkiem do roztworu oudenonu dodaje się nieorganiczne lub organiczne związki metali, dające łatwo jony tych metali, dodaje się, jeśli trzeba, wodę i wyodrębnia się sole oudenonu o wzorze 4 przez usunięcie rozpuszczalnikiem lub przez krystalizację. Np. do oudenonu, rozpuszczonego w octanie etylu, dodaje się sól sodową 2-etyloheksanolu i krystalizuje się wytrącającą się sól sodową oudenonu; do oudenonu, który w wodzie przechodzi w związki o wzorach 2 i 3 dodaje się $KHCO_3$ aż do uzyskania pH o wartości 6,0, a sól potasową oudenonu wyodrębnia się przez odparowanie roztworu, przy czym w celu ułatwienia odparowania dodaje się n-butanol; do oudenonu, który w wodzie przechodzi w związki o wzorach 2 i 3 dodaje się wodorotlenek barowy do uzyskania pH o wartości 6,0 a zagęszczanie z jednoczesnym dodawaniem n-butanolu daje krystaliczną sól barową oudenonu. Jak widać z położenia maksimum w widmie oudenonu w ultrafiolecie, wykonanym w wodzie $1 \cdot 10^{-5}$ M buforze fosforanowym o pH—7,0, oraz, jak wynika ze wzorów cząsteczkowych opisanych poniżej soli, oudenon reaguje z wodą i tworzy związki o wzorach 2 i 3. Związki te oraz ich formy racemiczne można otrzymać również na drodze syntezy chemicznej. Wynalazek obejmuje sposoby otrzymywania soli oudenonu i jego formy racemicznej ze związków o wzorach 2 i 3, otrzymanych na drodze syntezy chemicznej.

Sole oudenonu posiadają następujące własności: sól sodowa: biały, krystaliczny proszek, temperatura topnienia 145—148°C, dla $C_{12}H_{17}O_4$ Na obliczono: C 58,05, H 6,90, O 25,77, Na 9,26, otrzymano: C 57,79, H 7,32, O 24,96, Na 8,77; sól potasową: białe kryształy, temperatura topnienia 116—117°C, dla $C_{12}H_{17}O_4$ K obliczono: C 54,51, H 6,48, O 24,20, K 14,78, znaleziono: C 55,73, H 6,77, O 23,6, K 13,37; sól wapniowa: białe kryształy, temperatura topnienia 167—169°C, dla $(C_{12}H_{17}O_4)_2Ca$ obliczono: C 58,76, H 6,96, O 26,09, Ca 8,15, otrzymano: C 58,40, H 7,15, Ca 8,19; sól magnezowa: białe kryształy, temperatura topnienia 252—255°C, obliczono dla $(C_{12}H_{17}O_4)_2Mg$: C 60,70, H 7,21, Mg 5,01 znaleziono: C 60,53, H 7,62, Mg 5,15; sól barowa: białe kryształy, temperatura topnienia 135—138°C, dla $(C_{12}H_{17}O_4)_2Ba$

obliczono: C 49,03, H 5,82, O 21,77, Ba 23,36, znaleziono: C 49,24, H 6,01, O 20,00, Ba 22,91. Sól glinową oudenonu otrzymano w postaci białego proszku. Sól sodową, potasową, wapniową lub magnezową oudenonu, dającą roztwór wodny o pH = 6—7 można stosować doustnie lub w postaci zastrzyków.

Dzięki własnościom kwasowym oraz znajomości budowy różnych form oudenonu w roztworach, oraz, znając sposoby otrzymywania jego soli z zasadami, można z łatwością otrzymać szereg modyfikacji opisanych sposobów.

Hydroksylowanie tyrozyny jest etapem biosyntezy norepinefryny, decydującym o szybkości tego procesu. Dlatego też, hamowanie hydroksylazy tyrozynowej prowadzi do zahamowania syntezy norepinefryny in vivo, co powoduje obniżenie ciśnienia krwi.

Zmniejszenie szybkości syntezy norepinefryny w komórkach mózgowych ma działanie sedatywne. Wstrzyknięcie dużej dawki oudenonu myszom lub szczurom nie powoduje zasypiania i nie zauważono przy tym żadnych objawów działania sedatywnego. Uważa się zatem, że bariera krew-mózg hamuje przenikanie oudenonu do komórek mózgu. Jak już wspomniano, codzienne wstrzykiwanie lub podawanie doustne oudenonu szczurom obniżało ciśnienie krwi. Działanie hipotensyjne da się zauważyć jeszcze wyraźniej, gdy podaje się oudenon szczurom o wrodzonym nadciśnieniu. Szczury takie udało się wyhodować prof. Okamoto, Medical School, University of Kyoto.

Kiedy dawkę 6,25 mg/kg zastrzyknięto dootrzewnowo szczurowi o ciśnieniu krwi 183 mm, oraz innemu szczurowi o ciśnieniu 193 mm, to ciśnienie krwi obniżyło się, odpowiednio, do 115—145 mm i 150—170 mm w czasie 1—22 godzin po zastrzyknięciu. Gdy dawkę 3,13 mg/kg zastrzyknięto szczurowi o ciśnieniu 173 mm, to ciśnienie to obniżyło się do 140—148 mm w czasie 1—22 godzin po wstrzyknięciu. Gdy dawkę 25 mg/kg wstrzyknięto dootrzewnowo szczurowi o ciśnieniu 190 mm, to ciśnienie to obniżyło się do 140—163 mm w czasie 1—22 godz. po wstrzyknięciu. Doustne podawanie oudenonu (dzienne dawki: 3,1 mg/kg, 6,25 mg/kg, 12,5 mg/kg, 25 mg/kg) przez trzy dni wywołało znaczne obniżenie ciśnienia krwi. Obniżenie to wynosiło 20—30% i utrzymywało się przez około 5 dni po podaniu ostatniej dawki.

Oudenon hamuje hydroksylazę tyrozynową i obniża ciśnienie krwi. Łączenie go z innymi środkami hipotensyjnymi powoduje zatem wzmocnienie działania. Zwłaszcza w połączeniu z rezerpiną wzmocnienie działania jest bardzo duże.

Poniżej opisano przykłady sposobów produkcji i otrzymywania oudenonu i jego soli. Łatwo zatem znaleźć sposoby, będące modyfikacjami opisanych tu metod. Wynalazek obejmuje wszystkie sposoby powstałe przez modyfikację sposobów, opisanych w wynalazku.

Przykład I. Szczep 10F wyhodowany na skosie agarowym zawierającym 2% glukozy, 0,5% suchych drożdży i 1,5% agaru zaszczerpiono na pożywkę z trocin w 4 kolbach. Pożywkę tę przygotowano w następujący sposób: 10 g trocin (z Mag-

nolia hypolenea) dodano 60 ml pożywki zawierającej 2,0% glukozy i 0,5% suchych drożdży, całość umieszczono w kolbie o pojemności 500 ml i sterylizowano w temperaturze 120°C przez okres 20 minut.

Okres inkubacji trwał 14 dni w temperaturze 27°C. Do każdej z kolb dodano 250 ml pożywki zawierającej 2,0% glukozy i 0,5% suchych drożdży, wytrząsano przez pewien czas i tak otrzymaną zawiesinę z 4 kolb zaszczepiono na 150 litrach pożywki zawierającej 2,0% glukozy, 0,5% peptonu, 0,3% suchych drożdży, 0,3% KH_2PO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, w tanku fermentacyjnym ze stali nierdzewnej o pojemności 400 l, wyjałowionego w temperaturze 120°C przez okres 20 minut. Fermentację prowadzono mieszając z szybkością 200 obr/min i napowietrzając zawartość tanku 150 litrami wyjałowionego powietrza na minutę w temperaturze 27°C.

Początkowo pH wynosiło 5,68, po 45 godzinach 5,1, po 55 godz. 4,6, po 65 godz. 4,35, po 83 godz. 4,8 i 4,7 po 96 godzinach fermentacji. Poziom cukru zmniejszał się stopniowo i po 96 godzinach wynosił 0,53%. Zawartości oudenonu w przesączu z brzcзки były następujące: 19,5 g/ml po 40 godz., 91 µg/ml po 65 godz., 94 µg/ml po 71 godz., 605 µg/ml po 80 godz. Proces przerwano po 97 godzinach, pH brzcзки doprowadzono do wartości 3,0 za pomocą kwasu solnego i przesączono ją otrzymując 110 l przesączu, który zawierał 607 µg/ml oudenonu. Odsączona, wilgotna grzybnia o wadze 4,1 kg zawierała 2,0 g oudenonu. Do przesączu dodano 100 litrów n-butanolu, wymieszano, rozdzielono warstwy i dodano znów 50 litrów n-butanolu.

Ekstrakty butanolowe połączono (objętość całkowita 166 litrów) — zawierały one 49,8 oudenonu. Otrzymany po zateżeniu pod zmniejszonym ciśnieniem syrop rozpuszczono w 800 ml mieszaniny benzen-octan etylu (2:1 w stosunku objętościowym) i roztwór przepuszczono przez kolumnę z silikażelem (1,75 kg silikażelu zawieszono w mieszaninie benzen-octan etylu). Średnica kolumny wynosiła 4 cm. Przez kolumnę przepuszczano kolejno: 6 l mieszaniny benzen-octan etylu (2:1), 6 l mieszaniny benzen-octan etylu (1:1) i 30 l mieszaniny benzen:octan etylu (1:2). Otrzymano eluat, zawierający 28,6 g (1100 µg/ml) oudenonu. Po zateżeniu tego roztworu pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymano 40 g roztworu o konsystencji syropu. Do syropu tego dodano 3 l gorącego heksanu, roztwór oziębiono i odsączono 17 g krystalicznego oudenonu. Z ługów pokryształizacyjnych wykrystalizowano jeszcze 8 g oudenonu.

Oudenon, zawarty w odsączonej grzybni, wyekstrahowano 8 litrami metanolu, a ekstrakt odparowano do objętości 1,5 l pod zmniejszonym ciśnieniem, pH roztworu doprowadzono do wartości 3,0 za pomocą kwasu solnego i ekstrahowano go 1,5 litrami i 0,75 l m-butanolu. Ekstrakty butanolowe połączone, odparowano do konsystencji syropu, który rozpuszczono w 100 ml mieszaniny benzen-octan etylu (2:1) i poddano chromatografii na silikażelu (120 g silikażelu w kolumnie). W sposób wyżej już opisany otrzymano 1,0 g oudenonu.

Przykład II. Zawiesinę grzybni szczepu, wytwarzającego oudenonu, przygotowano w sposób, jak w przykładzie I, tj. wyhodowano szczep 10F na pożywce zawierającej trociny. 10 ml zawiesiny zaszczepiono na 125 ml pożywki zawierającej 2,0% glukozy, 0,5% peptonu, 0,3% suchych drożdży, 0,3% KH_2PO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, w kolbie o pojemności 500 ml. Hodowlę prowadzono na trzęsawce, przez 11 dni w temperaturze 27°C, otrzymując 1000 ml brzcзки (310 µg/ml), którą przepuszczono następnie przez kolumnę z IRA-400 (dostawca: Rhom and Haas, USA) 50 ml żywicy (Cl-) umieszczono w kolumnie o 2 cm średnicy. Przepuszczono 100 ml wody destylowanej, a następnie 350 ml 0,1 N HCl.

Eluat zawierał 250 mg oudenonu. Ekstrahowano go 350 i 100 mililitrami n-butanolu, ekstrakty zateżono pod próżnią do konsystencji syropu. Syrop rozpuszczono w benzenie, a oudenon wytrącono heksanem. Otrzymano 150 mg krystalicznego oudenonu.

Przykład III. Szczep 10F wyhodowano w sposób, jak w przykładzie I. Fermentację przerwano po 96 godzinach. Przesącz zawierał 500 µg/ml oudenonu, a grzybnia odsączona z 1 ml brzcзки zawierała 80 µg oudenonu. 100 l tej brzcзки zakwaszono HCl do pH=2,5 i ekstrahowano kolejno 100 litrami i 50 litrami n-butanolu. Ekstrakty butanolowe połączono (zawierały one 52 g oudenonu) i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem do konsystencji syropu. Oudenon ekstrahowano z syropu za pomocą kolejno 4 litrów i 1 litra octanu etylu. Ekstrakty połączone i dodano do 1,5 l wody. Mieszając, warstwę wodną zobojętniono 10 N NaOH do pH=7,0 i oddzielono. Zakwaszono ją HCl do pH=3,0 i ekstrahowano oudenon, kolejno, 3 litrami i 1 litrem octanu etylu.

Warstwy octanu etylu połączono i odparowano do konsystencji syropu. Syrop rozpuszczono w 3 l gorącego heksanu i oziębiono, co dało 18 g krystalicznego oudenonu, a dalsze 11 g otrzymano przez stężenie ługów pokryształizacyjnych.

Przykład IV. Do 5,0 ml 0,02 M roztworu oudenonu (4,17 mg/ml) dodano kroplami 0,02 M CuSO_4 w temperaturze 17°C. Wytrąciła się niebieska sól miedziowa oudenonu. Najwięcej osadu wytrąciło się po dodaniu 2,45–3,0 ml 0,02 M CuSO_4 . Pozostałość zawierała 2,08 mg/ml oudenonu. Osad odsączono i wysuszone, otrzymując 9,5 mg soli miedziowej oudenonu.

Przykład V. 650 mg krystalicznego oudenonu (temperatura topnienia 77,5–78,5°C) rozpuszczono w 20 ml octanu etylu i dodano 4 ml roztworu 2-etyloheksanolanu sodowego w ketonie metyloizobutylovym (45,2% objętościowych). Mieszano jeszcze przez okres 65 minut w temperaturze pokojowej, odsączono wytrąconą sól sodową oudenonu, przemyto 5 mililitrami octanu etylu i wysuszone, otrzymując 670 mg produktu o temperaturze topnienia 145–148°C. Roztwór wodny tej soli miał pH=6, sól rozpuszcza się w wodzie, metanolu, etanolu, nierozpuszcza się w octanie etylu, benzenie i acetonie.

Przykład VI. Surowe kryształy oudenonu (1,18 g, temperatura topnienia 74–76°C) rozpuszczono w 25 ml octanu etylu i dodano 25 ml wody

destylowanej. Do tego roztworu dodano 2,65 ml roztworu 2-etyloheksanolanu sodowego w ketonie metylowoizobutylovym (45,2% objętościowych). Mieszano jeszcze przez 2 godziny w temperaturze pokojowej i dalszą godzinę w temperaturze 10°C.

Wytrąconą sól sodową oudenonu odsączono, przemyto 5 mililitrami octanu etylu i wysuszono, otrzymując 1,35 g krystalicznego produktu. Dla $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ przy 246 mμ w obojętnym roztworze otrzymano wartość 853, a dla $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ w roztworze kwaśnym przy 285 mμ wartość 765.

Przykład VII. 30 g syropu otrzymanego przez ekstrakcję butanolem brzojki fermentacyjnej ze szczepem, wytwarzającym oudenon, i odparowanie rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem, zawierającego 12 g aktywnego związku rozpuszczonego w 400 ml octanu etylu i do tego roztworu dodano 70 ml roztworu 2-etyloheksanolanu sodowego w ketonie metylowoizobutylovym (45,2% objętościowych).

Po godzinie mieszania w temperaturze pokojowej, mieszaninę pozostawiono na kilkanaście godzin w lodówce. Wykryształizowaną sól sodową oudenonu przemyto 40 mililitrami octanu etylu i suszono, otrzymując 10,7 g produktu. W obojętnym roztworze wodnym, przy 246 mμ $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 842$, a w roztworze kwaśnym, przy 285 mμ $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 760$.

2,0 g tak otrzymanej soli sodowej oudenonu (wzór 4, $Mn^+ = Na^+$) rozpuszczono w 40 ml wody destylowanej i ekstrahowano 40 mililitrami octanu butylu. Mieszaninę wytrząsano przez 10 minut przy pH = 2,0 z 3 N HCl, a następnie oddzielono warstwę octanu butylu.

Operację powtórzono, ekstrakty octanowe połączono i osuszono siarczanem sodowym. Roztwór odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem do konsystencji syropu, z którego wykryształizowano oudenon za pomocą 100 ml cykloheksanu. Otrzymano 1 g krystalicznego oudenonu (temperatura topnienia 76–78°C).

Przykład VIII. 2,08 g krystalicznego oudenonu rozpuszczono w 50 ml wody destylowanej i do roztworu dodano 1,0 g $KHCO_3$, doprowadzając w ten sposób pH do wartości 6,0. Do tego roztworu dodano 150 ml n-butanolu i mieszaninę destylowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Po pojawieniu się kryształów dodano jeszcze 100 ml n-butanolu i kontynuowano destylację.

Białe kryształy odsączono, przemyto n-butanolem i odsączono, otrzymując 2,39 g krystalicznej soli potasowej oudenonu o temperaturze topnienia 116–117°C. pH roztworu o stężeniu 10 mg/ml wynosiło 6,95. W 99% metanolo, przy 246 mμ $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 592$, w obojętnym roztworze wodnym, przy 246 mμ $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 788$, a w roztworze kwaśnym, przy 285 mμ $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 672$,

Przykład IX. W sposób, jak w przykładzie VIII, używając 185 mg wodorotlenku wapniowego zamiast wodorowęglanu potasowego, z 1,04 g oudenonu otrzymano 0,89 g jego soli wapniowej.

Przykład X. W sposób, jak w przykładzie VIII, używając 787 mg $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ zamiast wodorowęglanu potasowego, z 1,04 g oudenonu otrzymano 1,28 g jego soli barowej.

Przykład XI. W sposób, jak w przykładzie VIII, używając 145 mg wodorotlenku magnezowego zamiast wodorowęglanu potasowego, z 1,04 g oudenonu otrzymano 0,64 g jego soli magnezowej.

Przykład XII. W sposób, jak w przykładzie VIII, używając 420 mg wodorowęglanu sodowego zamiast wodorowęglanu potasowego, z 1,04 g oudenonu otrzymano 1,2 g jego soli sodowej.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania oudenonu o wzorze 1 i jego soli, obniżających ciśnienie krwi, **znamienny tym**, że szczep grzybów *Oudemansiella radicata* ATCC nr 20 295 hoduje się w wodnym roztworze węglowodanu, zawierającym substancję odżywczą, stanowiącą źródło azotu, w temperaturze 20–35°, korzystnie 25–30°C, przez 10–20 dni w warunkach napowietrzanej hodowli wgłębnnej, po czym oudenon wyodrębnia się ze środowiska hodowlanego w postaci wolnej lub ewentualnie przeprowadza w sole.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że oudenon wyodrębnia się z jego wodnego roztworu o odczynie kwaśnym przez ekstrakcję niemieszącą się z wodą rozpuszczalnikiem.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że oudenon wyodrębnia się z roztworu w niemieszącym się z wodą rozpuszczalniku, przez ekstrakcję wodnym roztworem o odczynie obojętnym lub alkalicznym.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że oudenon wyodrębnia się przez absorpcję na żywicy anionowymiennej.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że oudenon wyodrębnia się z surowej masy stałej lub syropu przez rozpuszczenie jej w rozpuszczalnikach organicznych, w których oudenon rozpuszcza się.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku otrzymywania soli oudenonu z metalami wyodrębniony oudenon poddaje się działaniu nieorganicznych lub organicznych związków metali tworzących jony metali, a otrzymane sole z metalami o wzorze 5, w którym M jest jonem metalu, pochodzącego z zasady, wyodrębnia się i kryształuje.

FIG. 1

Widma UV oudenonu (5 $\mu\text{g/ml}$) w roztwarze
obojętnym (bufor fosforanowy, pH=7,0)
i kwaśnym (0,1 N HCl)

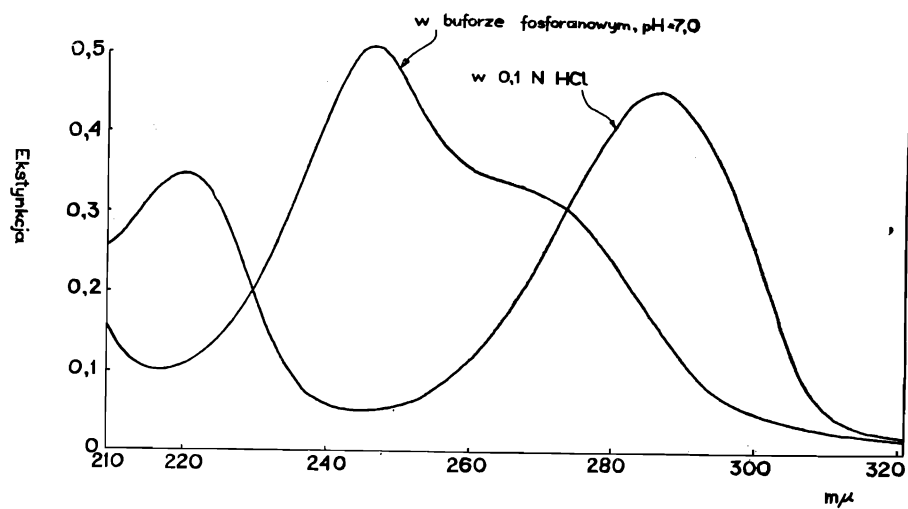


FIG. 2

Widmo IR oudenonu (KBr)

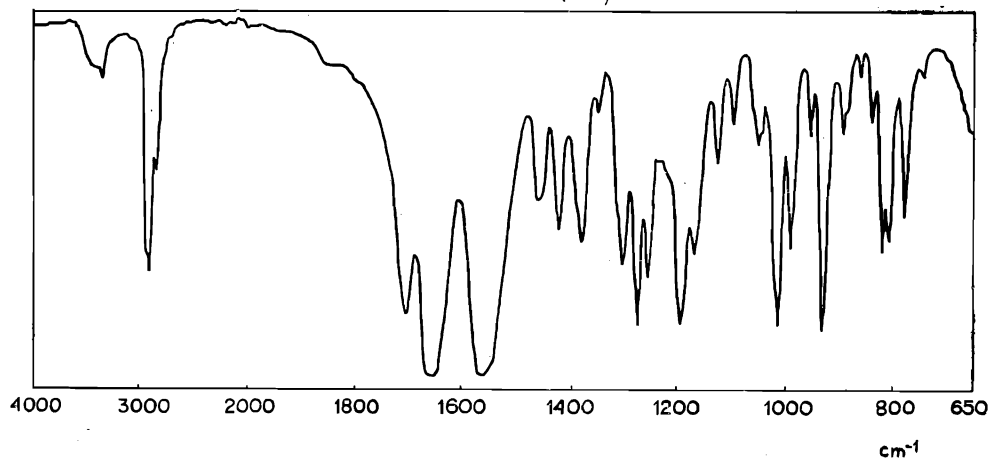
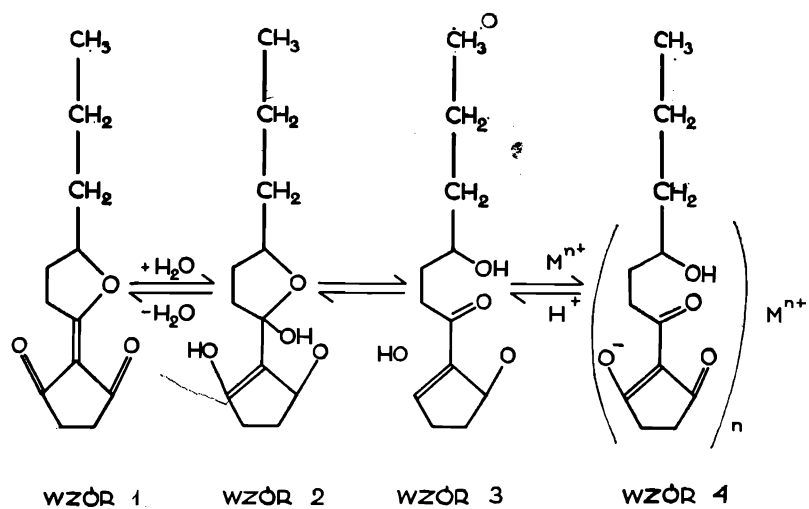
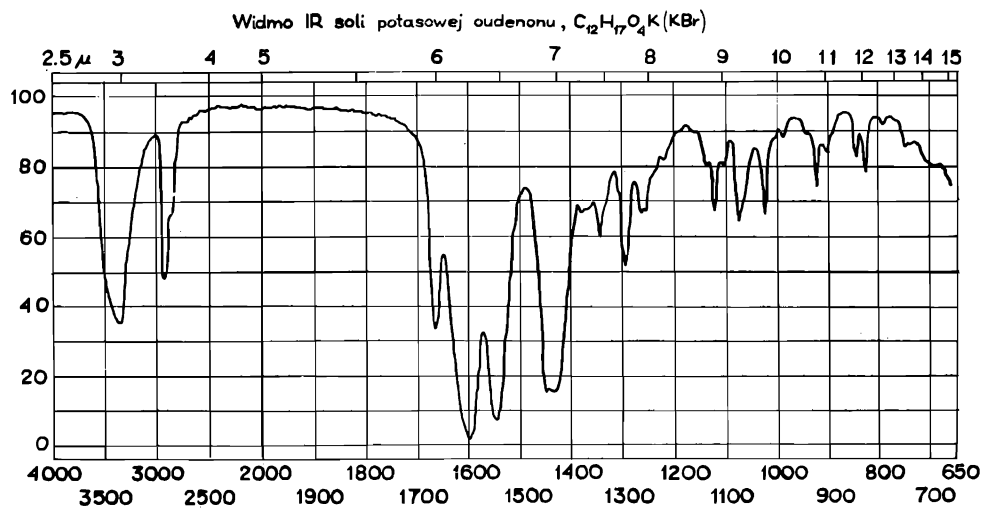


FIG. 3



Schemat 1

