



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

209489
(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
A 61 K 35/74

(22) Přihlášeno 04 03 77
(21) [PV 1472-77]
(32) (31) (33) Právo přednosti od 08 03 76
(664321) Spojené státy americké
(40) Zveřejněno 28 11 80
(45) Vydáno 15 05 84

(72)
Autor vynálezu

HLAVKA JOSEPH JOHN, WAYNE, NEW JERSEY (Sp. st. a.)

(73)
Majitel patentu

AMERICAN CYANAMID COMPANY, WAYNE, NEW JERSEY (Sp. st. a.)

(54) Způsob přípravy cis p-2-[(3-4-aminobutyl/amino)-propyl]karbamoyl|vinyl|glykosidů

1

Vynález se týká způsobu přípravy nových antibakteriálně účinných cis-p-2-[(3-4-aminobutyl/amino)-propyl]karbamoyl|vinyl|glykosidů, označovaných jako látky cis-BM123_{γ1} a cis-BM123_{γ2}, které jsou blíže charakterizovány dále. Účinky těchto nových antibakteriálních prostředků na specifické mikroorganismy a jejich chemické a fyzikální vlastnosti jsou odlišné od účinků a vlastností až dosud známých popsaných antibakteriálních prostředků.

Nové antibakteriální prostředky připravené podle vynálezu jsou organickými bázemi a jsou tedy schopny tvořit adiční soli s kyselinami za použití různých organických a anorganických solitvorných reakčních činidel. Adiční soli s kyselinami, vznikající smícháním antibakteriálně účinné volné báze s až třemi ekvivalenty kyseliny, účelně v neutrálním rozpouštědle, lze tedy připravit za použití kyselin, jako kyseliny sírové, fosforečné, chlorovodíkové, bromovodíkové, amidosulfonové, citrónové, maleinové, fumarové, vinné, octové, benzoové, glukonové, askorbové a podobných kyselin. Adiční soli antimikrobiálních činidel podle vynálezu s kyselinami jsou obvykle krystalické pevné látky poměrně rozpustné ve vodě, methanolu a ethanolu ale poměrně nerozpustné v nepolárních roz-

2

pouštědlech, jako v diethyletheru, benzenu, toluenu a podobně. Pro účely vynálezu jsou antibakteriální volné báze ekvivalentní svým netoxickým adičním solím s kyselinami. V následujícím textu se pod označením cis-BM123_γ-látky rozumí směs cis-BM123_{γ1}-látky a cis-BM123_{γ2}-látky v jakémkoli poměru a pod označením trans-123_γ-látky se rozumí směs trans-BM123_{γ1}-látky a trans-BM123_{γ2}-látky v jakémkoli poměru.

Nové antibakteriální prostředky označené jako cis-BM123_{γ1}-látky a cis-BM123_{γ2}-látky lze připravit fotochemickou transformací jejich odpovídajících trans-isomerů. Fotochemická konverze trans-BM123_γ-látky, trans-BM123_{γ1}-látky a trans-BM123_{γ2}-látky na odpovídající cis-BM123_γ-látku, cis-BM123_{γ1}-látku a cis-BM123_{γ2}-látku se přednostně provádí tak, že se výchozí trans-isomer rozpustí nebo disperguje ve vodě a pak se roztok ozařuje světlem. Koncentrace výchozího trans-isomeru ve vodě není kritická.

Světlo, použité při fotolytickém postupu podle předloženého vynálezu, nemá s výhodou vlnovou délku nižší než asi 250 nm a přednostně má vlnovou délku v rozmezí od 250 do 400 nm. Ozařování světlem takové vlnové délky se účelně dosahuje tím,

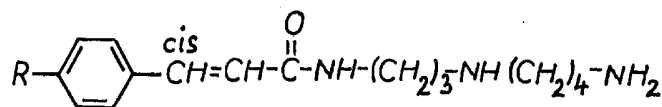
že se reakce provádí v nádobě vyrobené z takového materiálu jako je křemen, který odfiltruje v podstatě všechno světlo procházející nádobou, která má vlnovou délku pod 250 nm. Jako zdroje světla se účelně používá vysokotlaké rtuťové lampy o příkonu asi 450 W.

Teplota, při které se fotolýza provádí, nemá rozhodující význam pro dosažení dobrých výtěžků produktu, ale účelně se pracuje při teplotě v rozmezí 5 až 50 °C, například při asi 25 až 30 °C. Doba potřebná pro podstatnou konverzi trans-isomeru na odpovídající cis-isomer přirozeně závisí na intenzitě světla a teplotě a nejlépe se proto stanovuje v každém jednotlivém případě pokusem. Obvykle však postačuje doba

v rozmezí od asi 20 minut do asi 2 hodin.

Po skončení ozařování se může produkt získat standardními postupy. Tak se například reakční směs může lyofilizovat nebo odpařit do sucha a zbytek se může rozpustit v minimálním množství rozpouštědla, jako ethanolu nebo methanolu. Výsledný roztok se může zředit diethyletherem nebo acetonem a vzniklý vysrážený produkt se může izolovat filtrací. Další čištění se může provádět standardními metodami, jako krystalizací nebo chromatografií.

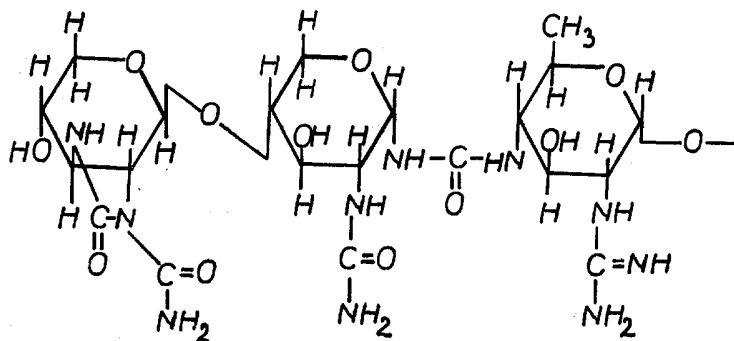
Předmětem vynálezu je způsob přípravy cis-[p-{2-[(3-(4-aminobutyl/amino)propyl)-karbamoyl]vinyl}glykosidů, označených jako cis-BM123_{γ1} a cis-BM123_{γ2}-sloučenina, obecného vzorce I



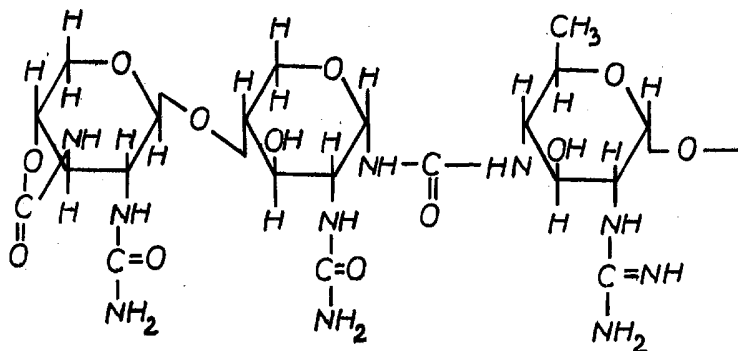
(1)

kde

R představuje v případě BM123_{γ1}-sloučeniny zbytek vzorce



a v případě BM123_{γ2}-sloučeniny zbytekvzorce



vyznačený tím že se vodný roztok odpovídajícího trans-isomeru ozařuje světlem o vlnové délce 250 až 400 nm tak dlouho dokud se výchozí trans-isomer v podstatě nepřevědne na odpovídající cis-isomer obecného vzorce I.

Antibiotika označená jako BM123 β_1 , BM123 β_2 , trans-BM123 γ_1 a trans-BM123 γ_2 vznikají kultivací za kontrolovaných podmínek nového kmene neurčeného druhu *Nocardia*. Tento nový kmen produkující antibiotika byl izolován ze vzorku zahradní půdy odebraného v Oceole ve státě Iowa, USA a je chován ve sbírce kultur Lederle Laboratories Division, American Cyanamid Company, Pearl River, N. Y. jako kultura číslo BM123. Životaschopná kultura nového mikroorganismu byla uložena ve sbírce Culture Collection Laboratory, Northern Utilization Research and Development Division, United States Department of Agriculture, Peoria, Illinois a byla zařazena do stálé sbírky. Je volně dostupná pro veřejnost pod číslem NRRL 5646. Pod označením BM123 β -látky se rozumí směs v BM123 β_1 -látky a BM123 β_2 -látky v libovolném poměru.

Obecný popis mikroorganismu *Nocardia* sp. NRRL 5646 založený na pozorovaných rozpoznávacích znacích je tento. Byly pozorovány vlastnosti organismu v kultuře a fyziologické a morfologické vlastnosti organismu podle metod, které popsal Shirling a Gottlieb, Internat. Journ. of Syst. Bacteriol. **16**, 213—240 (1966). Chemické složení kultury bylo určováno postupy, které popsali Lechevalier et al., Advan. Appl. Microbiol. **14**, 47—72 (1971). Podtržený popis barvy a čísla barevného odstínu je použit v souladu s prací Jacobson et al., Color Harmony Manual, 3rd ed. (1948), Container Corp. of America, Chicago, Illinois. Podrobnosti popisu jsou uvedeny v dalších tabulkách II až VI.

Intenzita růstu

Střední na agaru s kvasničným extraktem, agaru s dextrózou a asparaginem, Benedictově a Bennetově agaru, agaru s bromborem a dextrózou a Weinstreinově agaru, slabá na Hickeyově a Tresnerově agaru, agaru s rajským protlakem, agaru s ovesnou moukou a „pabum”—agaru(?) a nepatrný růst na agaru s anorganickými solemi a škrobem, s Kusterovými ovesnými vločkami, Czapekovým roztokem a na agaru s rýží.

Vzdušné mycelium

Pokud je přítomno, je vzdušné mycelium bělavé, vzniká jen na agaru s kvasničným extraktem, agaru s dextrózou a asparaginem, na Bennetově a Benedictově agaru a na agaru s bramborem a dextrózou.

Rozpustné pigmenty

Nevznikají žádné rozpustné pigmenty.

Reverzní barva

Bezbarvé až nažloutlé odstíny.

Různé fyziologické reakce

Neztekucuje želatinu, dusičnany redukuje na dusitany za 7 dní, na agaru s peptonem a železem netvoří melanoidové pigmenty, na mléce s lakmusem nedochází k peptonizaci ani ke tvorbě sraženiny, tolerance vůči chloridu sodnému na agaru s kvasničným extraktem je větší nebo rovná 4 %, ale menší nebo rovná 7 %, optimální teplota růstu 32 °C. Využití zdroje uhlíku podle Pridhamovy a Gottliebovy metody [J. Bacteriol. **56**, 107—114 (1948)] je následující: dobré využití glycerinu, salicinu, d-trehalózy a dextrózy, střední využití i-inositu a špatné využití až vůbec žádné využití d-fruktózy, maltózy, adonitu, l-arabinózy, laktózy, d-mannitu, d-melibiózy, d-raffinózy, l-rhamnózy, sacharózy a d-xyulózy.

Chemické složení

Organismus náleží k organismům s buněčnou stěnou typu IV, tj. obsahuje meso-2,6-diaminopimelovou kyselinu a má celobuněčné spektrum cukrů typu A, tj. obsahuje arabinózu a galaktózu. Methylované celobuněčné extrakty vykazují při chromatografii spektrum mastných kyselin podobné spektru, které poskytuje organismus *Nocardia asteroides* ATCC 3308.

Mikromorfologie

Vzdušné mycelium roste z substrátového mycelia ve formě mírně rozvětvených středně dlouhých ohebných prvků, které obvykle končí v prodloužených jednoduchých spirálách. Ohebné prvky jsou nepravidelně uspořádány do krátkých eliptických nebo válcovitých úseků (spory?), které se snadno rozčleňují. Koncové spirálovité části jsou méně nápadně uspořádány do segmentů. Velikost segmentů je obvykle 0,8 až 1,7 μm $\times$ 0,3 až 0,5 μm , v průběhu 0,4 μm $\times$ 1,2 μm .

Diagnóza

Morfologické znaky kultury č. BM123 je obtížné sledovat a interpretovat v důsledku chabého vývinu vzdušného mycelia na většině médií. V důsledku toho je nutno věnovat značnou pozornost při určení rodové příbuznosti organismu chemické analýze. Na základě systému navrženého Lechevalierem a dalšími obsahuje kultura BM123 v celé hmotě buněk kyselinu meso-

diaminopimelovou a na základě analýzy cukrů je zřejmé, že je přítomna arabinóza a galaktóza. Kultura náleží proto k organismům s typem buněčné stěny IV. Porovnáním diagramu plynové chromatografie kultury č. BM123 s diagramem kultury *Nocardia asteroides* ATCC 3308 se zjistí jejich nápadná příbuznost. Jiné vlastnosti kultury č. BM123, které jsou v souladu s chováním *Nocardia* je zlomkovitý vzdušný ná-

růst na některých médiích a úplná nepřítomnost vzdušného nárustu na většině médií. Vzhledem k tomu, že není k dispozici vhodné kritérium pro charakterizaci *Nocardia* na úrovni druhu, nebyl činěn pokus provést toto stanovení. Kultura BM123 bude tedy považována až do té doby, než bude diagnóza dosažitelná, za neurčený druh *Nocardia*.

Tabulka II

Charakteristické vlastnosti kultury kmene *Nocardia* sp. NRRL 5646

Médium	Intenzita růstu	Inkubace: 14 dní	Vzdušné mycelium a/nebo spóry	Teplota: 32 °C		Poznámky
				Rozpustné pigmenty	Reverzní barva	
agar s kvasničným extraktem	střední		vzdušné mycelium bělavé, světlé	nejsou	hořčičná (3 ie)	Tmavší oblasti v substrátovém myceliu. Na povrchovém myceliu vzniká koremie
Hickeyův a Tresnerův agar	slabá		vzdušné mycelium není	nejsou	bezbarvá až nažloutle zelená	Okrajové oblasti kolonie přecházejí do olivově zelené barvy
Agar s asparaginem a dextrózou	střední		nepatrné bělavé vzdušné mycelium	nejsou	jantarová (3 1c)	Povrch lehce, zvrásněný
Benediktův agar	střední		vzdušné mycelium bělavé, světlé	nejsou	světle hnědá	Na povrchovém myceliu se
Bennettův agar	střední		nepatrné bělavé vzdušné mycelium	nejsou	(Nude Tan) (4 gc)	bohatě tvoří koremie
Agar s anorganickými solemi a škrobem	slabá		vzdušné mycelium není	nejsou	žlutohnědá (camel) (E ie)	Povrch lehce zvrásněný
Kusterův agar s ovesnými vločkami	nepatrný		vzdušné mycelium není	nejsou	bezbarvá	
Agar s Czapekovým roztokem	nepatrný		vzdušné mycelium není	nejsou	bezbarvá	
Agar s bramborem a dextrózou	střední		vzdušné mycelium bělavé, světlé	nejsou	žlutohnědá	
agar s rajským protlakem a ovesnou moukou	slabý		vzdušné mycelium není	nejsou	(camel) (3 ie)	
agar „pabulum“	nepatrný		vzdušné mycelium není	nejsou	bezbarvá	
agar s rýží	střední		vzdušné mycelium není	nejsou	bezbarvá až nažloutlá	

Tabulka III

Mikromorfologie kmene *Nocardia* sp. NRRL5646

Médium	Vzdušné mycelium a/nebo struktury typu spor
agar s kvasničným extraktem	Vzdušné mycelium roste ze substrátového mycelia ve formě mírně rozvětvených středně dlouhých ohebných prvků, které obvykle končí v prodloužených jednoduchých spirálách. Ohebné prvky jsou nepravidelně uspořádány do krátkých úseků (spory?), které se snadno rozčleňují. Koncové spirálové části jsou méně nápadně uspořádány do segmentů. Velikost segmentů je obvykle 0,8 až 1,7 $\mu\text{m} \times 0,3$ až 0,5 μm , v průměru 0,4 $\mu\text{m} \times 1,2 \mu\text{m}$.

Tabulka IV

Různé fyziologické reakce kmene *Nocardia* sp. NRRL 5646

Médium	Inkubační doba	Intenzita růstu	Fyziologická reakce
želatina	7 dní	nízká	nedochází ke ztekucování
želatina	14 dní	dobrá	nedochází ke ztekucování
bujón s organickými dusičnany	7 dní	dobrá	dusičnany se redukují na dusitany
bujón s organickými dusičnany	14 dní	dobrá	dusičnany se redukují na dusitany
agar s peptonem a železem	24—48 hodin	dobrá	neredukují se melaninové pigmenty
mléko s lakmusem	7 dní	dobrá	nedochází k peptonizaci nebo tvorbě sraženiny
kvasničný extrakt se (4,7,10 a 13 %) chloridu sodného	7 dní	střední	tolerance vůči chloridu sodnému $\geq 4 \%$ ale $\leq 7 \%$

Tabulka V

Využití zdroje uhlíku kmenem *Nocardia* sp. NRRL 5646

Inkubace: 10 dnů Teplota: 32 °C

Zdroj uhlíku	využití *)
adonit	0
l-arabinóza	0
glycerin	3
d-fruktóza	1
i-inosit	2
laktóza	0
d-mannit	0
salicin	2
d-melibióza	0
d-raffinóza	0
rahamnóza	0
maltóza	1
sacharóza	0
d-trehalóza	3
d-xylóza	0
dextróza	3
negativní kontrolní pokus	0

*) 3 dobré využití
 2 střední využití
 1 slabé využití
 0 žádné využití

Tabulka VI

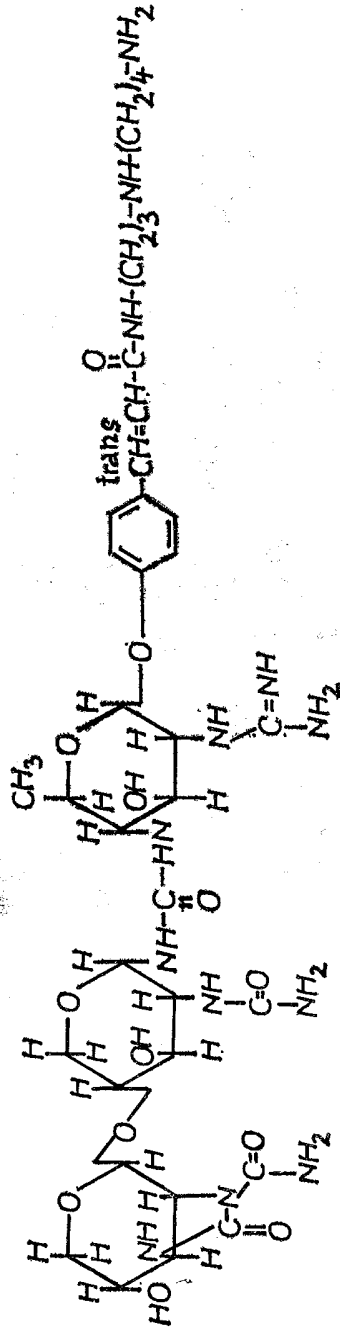
Chemické složení kmene *Nocardia* sp. NRRL 5646

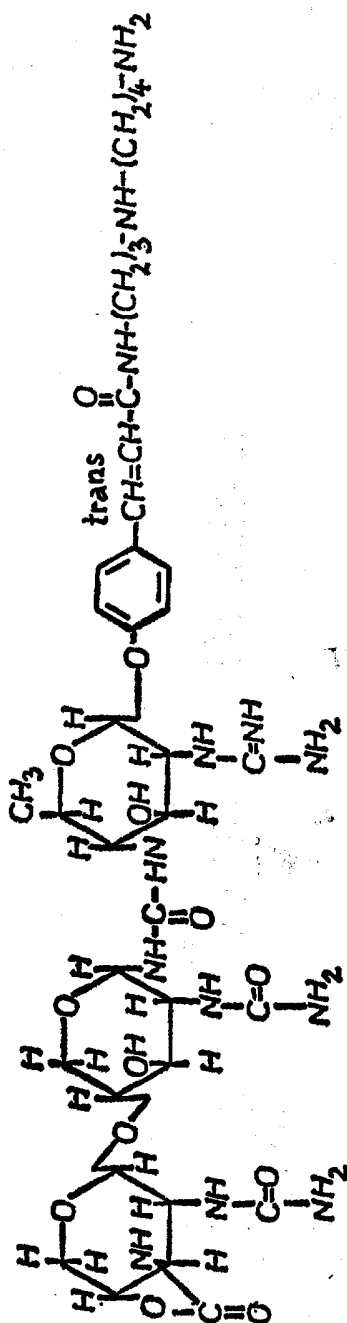
Typ buněčné stěny	Hlavní složky
Typ IV	meso-DAP, arabinóza, galaktóza

Produkce BM123 β a trans-BM123 není omezena na tento konkrétní organismus nebo na organismy, které plně odpovídají shora uvedeným charakteristikám růstu a vzhledu pod mikroskopem. Uvedené charakteristické vlastnosti jsou uvedeny pouze pro ilustraci. Ve skutečnosti se může použít mutant získaných z tohoto organismu různými prostředky, jako vystavením rentgenovému záření, UV-záření, dusíkatému yperitu, aktinofágům apod. Životaschopná kultura takové typické mutanty je uložena v Culture Collection Laboratory,

a) redukce dusičnanů na dusitany je pomalejší,

Nové antibakteriálně účinné látky podle vynálezu jsou obecně pevné krystalické látky s poměrně nízkou rozpustností v nepolárních rozpouštědlech, jako v diethyletheru a n-hexanu, ale se značnou rozpustností v rozpouštědlech, jako je voda a nižší alkanoly. Antibiotika trans-BM123 γ_1 a trans-NM123 γ_2 jsou strukturálními isomery a lze je znázornit následujícími strukturálními vzorci:

trans-BM123 γ_1

trans-BM123 γ_2

Užitečnost cis-isomerů derivátů trans-BM123 je demonstrována na jejich schopnosti potlačovat systemické lethální infekce u myši. Tyto nové látky vykazují in vivo vysoký antibakteriální účinek u myši proti *Escherichia coli* US 311 při podání jedné subkutánní dávky skupinám myši o hmotnosti asi 20 g (Carworth Farms CF—

—1). Infikace se provádí intraperitoneálně lethální dávkou těchto bakterií pětihodinové TSP krevní kultury zředěné tryptikázovým bujónem se sójou TSP na koncentraci 10^{-3} . Aktivita cis-B123 γ -látky proti *Escherichia coli* US 311 in vivo u myši je uvedena v tabulce VII.

Tabulka VII

Sloučenina	Orální dávka mg/kg tělesné hmotnosti	Poměr počtu živých myši k celkovému počtu zkoušených myši 7 dní po infekci
cis-BM123γ	2	4/5
	1	1/5
	0,5	1/5
Kontrolní pokus (bez podání látky)	0	18 z 20 myši zahynulo do 3 dnů po infekci

Postup fermentace upravený pro produkci především látky BM123 a trans-BM123γ

Kultivace *Nocardia* sp. NRRL 8050 se může provádět na velkém počtu kapalných kultivačních médií. Média užitečná pro produkci antibiotik obsahují asimilovatelný zdroj uhlíku, jako škrob, cukr, melasu, glycerin atd. asimilovatelný zdroj dusíku, jako je bílkovina, hydrolyzovaná bílkovina, polypeptidy, aminokyseliny, kukuřičný extrakt, atd., anorganické anionty a kationty, jako je draslík, hořčík vápník, amonium, sulfát, uhličitan, fosforečnan, chlorid, atd. Stopové prvky, jako bór, molybden, měď atd. se dodávají ve formě nečistot spolu s ostatními složkami média. Provzdušňování v nádržích a lahvích se provádí tak, že se do kvasného prostředí nebo na jeho povrch vhání sterilní vzduch. Míchání v nádržích se provádí pomocí mechanického rotačního míchadla. Podle potřeby se může přidávat protipěnový prostředek jako Hodag (R) FD 82.

Příprava inokula pro BM123β a trans-BM123

Primární inokulum *Nocardia* sp. NRRL 8050 v třepací baňce se připraví inokulací 100 ml sterilního kapalného média v 500 ml baňkách pomocí stěru nebo promývacího louhu obsahujícího spory, získaného ze šikmého agaru kultury. Obvykle se používá tohoto média:

bakto-trypton	5 g
kvasničný extrakt	5 g
extrakt z hovězího masa	3 g
glukóza	10 g
voda do	1000 ml

Baňky se inkubují při teplotě 25 až 29 °C, přednostně 28 °C a intenzívně se promíchávají 30 až 48 hodin na rotační třepacíce. Pak se inokula převedou do sterilních tub pro uchovávání kultur se šroubovým uzávěrem a skladují se při teplotě pod -18 stupňů Celsia. Této zásoby vegetativního inokula se používá místo stěru ze šikmého agaru pro inokulaci dalších třepacích baňek určených pro přípravu tohoto inokula prvního stupně.

Takto získaného inokula prvního stupně se používá pro inokulaci 12 litrů dávek stejného média ve 20 litrových skleněných fermentačních nádobách.

Médium s inokulem se provzdušňuje sterilním vzduchem a v růstu se pokračuje 30 až 48 hodin.

12 litrů dávek inokula druhého stupně se používá pro očkování nádržových fermentačních nádob obsahujících 300 litrů následujícího sterilního kapalného média.

masový extrakt	15 g
síran amonný	3 g
střední fosforečnan draselný	3 g
uhličitan vápenatý	1 g
síran hořečnatý (heptahydrát)	1,5 g
glukóza	10 g
voda do	1000 ml

Glukóza se sterilizuje odděleně. Uvedeným způsobem se získá třetí a konečné stadium inokula. Kultivace se provádí tak, že se půdou v nádobě probíhá sterilní vzduch rychlostí 0,4 až 0,8 litrů na litr půdy za minutu a fermentační směs se míchá rotačním míchadlem pracujícím při 150 až 300 ot./min. Teplota se udržuje na 25 až 29 °C, obvykle na 28 °C. Kultivace se provádí po dobu 48 až 72 hodin a pak se inokula použije pro očkování nádržové fermentační nádoby o obsahu 3000 litrů.

Fermentace v nádržích pro výrobu látky BM123β a látky trans-BM123γ.

Jako živné půdy se pro výrobu BM123β-látky a trans-BM123γ-látky přednostně používá následujícího média

masový extrakt	30 g
síran amonný	6 g
střední fosforečnan draselný	6 g
uhličitan vápenatý	2 g
síran hořečnatý heptahydrát	3 g
glukóza	20 g
voda do	1000 ml

Glukóza se sterilizuje odděleně.

Každá nádrž se inokuluje 5 až 10 % inokula třetího stupně získaného shora uvedeným způsobem. Fermentační směs se udržuje při teplotě 25 až 28 °C, obvykle 26 stupňů Celsia. Směs se provzdušňuje sterilním vzduchem rychlostí 0,3 až 0,5 litrů sterilního vzduchu na litr směsi za minutu a míchá se rotačním míchadlem, pracujícím při 70 až 100 ot./min. Fermentace se provádí po dobu 65 až 90 hodin a pak se výsledný produkt zpracuje.

Následující specifické příklady slouží k bližšímu objasnění vynálezu. Příklady mají pouze ilustrativní charakter a rozsah vynálezu v žádném směru neomezuje.

Produkt „Hodag FD—82“ používaný jako pomocná látka je podle udání výrobce silikonové protipěnové činidlo. Výrobek „Agar pabulum“ rovněž používaný v příkladech je vysokokapacitní katexová a anexová pryskyřice, popřípadě napuštěná v papíru.

Příklad 1

Příprava inokula pro produkci BM123 β a trans-BM123

Podle následujícího receptu se připraví typické médium pro kultivaci inokula prvního a druhého stupně

lakto-trypton	5 g
kvasničný extrakt	5 g
extrakt z hovězího masa	5 g
glukóza	10 g
voda do	1000 ml

Dvě 500 ml baňky, z nichž každá obsahuje 100 ml shora uvedeného sterilního prostředí se inokulují vždy 5 ml zmrazeného vegetativního inokula *Nocardia* sp. NRRL 8050. Baňky se umístí na rotační třepačku a intenzívně se míchají 48 hodin při 28 °C. Výsledné inokulum v baňce se převede do 23 litrové skleněné fermentační nádoby obsahující 12 litrů shora uvedeného sterilního média. Směs se provzdušňuje sterilním vzduchem a růst se provádí po dobu asi 48 hodin a pak se obsahu nádoby použije pro inokulaci 454 litrové fermentační nádoby obsahující 300 litrů následujícího sterilního kapalného média

masový extrakt	15 g
síran amonný	3 g
střední fosforečnan draselný	3 g
uhlíčitán vápenatý	1 g
síran hořečnatý (heptahydrát)	1,5 g
glukóza	10 g
voda do	1000 ml

Do média pro přípravu inokula třetího stupně se vhání sterilní vzduch rychlostí 0,4 litru vzduchu na litr směsi za minutu. Míchání se provádí rotačním míchadlem pracujícím při 240 ot/min. Směs se udržuje při 28 °C a pak se jí použije po přidávku Hodag (R) FD 82 pro inokulaci 3000 litrů živné půdy.

Příklad 2

Fermentace za použití *Nocardia* sp. NRRL 8050 a média favorizujícího produkci BM123 a trans-BM123 γ

Fermentační médium se připraví podle následujícího receptu

masový extrakt	30 g
síran amonný	6 g
střední fosforečnan draselný	6 g
uhlíčitán vápenatý	2 g
síran hořečnatý heptahydrát	3 g
glukóza	20 g
voda do	1000 ml

Glukóza se sterilizuje odděleně.

Fermentační médium se sterilizuje při 120 stupních Celsia párou o tlaku 138 KPa po dobu 60 minut. Hodnota pH média po sterilizaci je 6,9. 3000 litrů sterilního média ve 4000 litrové fermentační nádrži se inokuluje 300 litry inokula popsaného v příkladě 1 a fermentace se provádí za použití protipěnového činidla Hodag (R) FD 82. Vzduch se dodává rychlostí 0,35 litru sterilního vzduchu na litr směsi za minutu. Směs se míchá rotačním míchadlem pracujícím při 70 až 72 ot./min. Po 67 hodinách fermentace se fermentační směs zpracuje.

Příklad 3

Izolace BM123 β -látky a trans-BM123 γ -látky

Hodnota pH 3000 litrů fermentační směsi získané způsobem popsaným v příkladě 2 o pH 4,3 se nastaví na pH 7,0 pomocí hydroxidu sodného a pak se směs přefiltruje za použití 5% křemeliny, jako pomocného filtračního prostředku. Filtrační koláč se promyje asi 100 litry vody a pak se zlikviduje. Směs filtrátu a promývacího louhu se čerpá zdola nahoru třemi paralelními nezavými kolonami o rozměrech 210 × 1220 milimetrů, z nichž každá obsahuje 15 litrů ionexu CM Sephadex (R) C—25 v sodíkové formě (zesíťovaný dextran-epichlorhydrinový katex v gelové formě, výrobek firmy Pharmacia Fine Chemicals Inc.). Sloupce katexu se po adsorbci promyjí celkem asi 390 litry vody a pak se eluují 200 litry 1% vodného roztoku chloridu sodného a pak 560 litry 5% vodného roztoku chloridu sodného. Eluát tvořený 5% vodným roztokem chloridu sodného se vyčerpá filtrací přes křemelinu a vyčerpáný filtrát se nechá projít skleněnou kolonou o rozměrech 229 × 1524 mm obsahující 25 litrů granulovaného produktu Darco (R) G—60 (o zrnění 20 až 40 mesh), což je granulované aktivní uhlí vyráběné firmou Atlas Chemical Industries Inc. Sloupec se promyje 12 litry vody a pak se vyvíjí 120 litrů 15% vodného methanolu a pak 340 litry 50% vodného methanolu a nakonec 120 litry 50% vodného acetonu. Eluát tvořený 15% vodným methanolem se za vakua zkoncentruje na asi 7 litrů vodné fáze a pH vodné fáze se ze 4,5 nastaví na 6,0 pomocí ionexu Amberlite (R) IR—45 v hydroxylové formě (slabě zásaditá anexová pryskyřice polystyren-polyaminového typu). Pryskyřice se odfiltruje a filtrát se zkoncentruje za vakua na asi 1 litr a pak se lyofilizuje, čímž se získá

38 g látky sestávající především z látky BM123 spolu s malým množstvím látky trans-BM123 γ (převážně trans-BM123 γ_2 -látky).

Eluát tvořený 50% vodným methanolem se z hodnoty 4,65 zalkalizuje ionexovou pryskyřicí Amberlite IR—45 v hydroxylové formě na hodnotu 6,0. Pryskyřice se odfiltruje a filtrát se za vakua zkoncentruje na asi 6,3 litru a tento koncentrát se lyofilizuje. Získá se 213 g látky sestávající převážně z látky trans-BM123 γ . Eluát tvořený 50% vodným acetonem se z hodnoty 4,0 zalkalizuje pomocí ionexové pryskyřice Amberlite (R) IR—45 v hydroxylovém cyklu na hodnotu 6,0. Pryskyřice se odfiltruje a filtrát se za vakua zkoncentruje na asi 1,5 litru. Koncentrát se pak lyofilizuje, čímž se získá 56 g nečisté látky trans-BM123.

Příklad 4

Další čištění trans-BM123 γ -látky

Suspenze CM Sephadexu (R) C—25 v amonném cyklu (NH_4^+) ve 2% vodném roztoku chloridu amonného se nalije do skleněné kolony o průměru 2,6 cm, až je sloupec pryskyřice v koloně asi 62 cm vysoký. Přbytek 2% vodného roztoku chloridu amonného se odpustí. Vzorek trans-BM123 γ -látky o hmotnosti 5 g, vyrobený způsobem popsaným v příkladě 3 se rozpustí v asi 10 ml 2% vodného chloridu amonného a roztok se nanese na sloupec. Sloupec se eluuje vodným chloridem amonným o koncentraci jednak 2 a jednak 4 % (vždy 6 litrů), přičemž se používá koncentračního gradientu. Každých 15 minut se automaticky odebírají 75 ml frakce. Antibiotikum trans-BM123 γ se lokalizuje v jednotlivých frakcích kontrolou eluátu vytékajícího z kolony pomocí ultrafialového světla a bioautografií pomocí navlhčených papírových kotoučů na velkých agarových deskách inokulovaných kmenem *Klebsiella pneumoniae* AD. Většina látky trans-BM123 γ se lokalizuje mezi frakcemi 71 až 107 včetně.

130 ml granulovaného produktu Darco (R) G—60 o zrnění 20 až 40 mesh se suspenduje ve vodě, suspenze se převede do skleněné kolony, nechá se usadit a přbytek vody se nechá odtéci. Frakce 84 až 96 včetně, ze shora uvedené chromatografie na CM Sephadexu, se spojí, a nechají projít sloupcem granulovaného uhlí. Sloupec s absorbovanou látkou se promyje 600 ml vody a vyvíjení se provádí 1 litrem 50% vodného acetonu. Eluáty, z nichž oba obsahují trans-BM123 γ -látku, se zkoncentrují za vakua na vodné fáze a koncentráty se lyofilizují. Získá se celkem 886 mg trans-BM123 γ -látky ve formě hydrochloridu. Mikroanalytický vzorek se získá tak, že se tato látka podrobí shora uvedenému čištění ještě jednou.

Antibiotikum trans-BM123 γ nemá určitý bod tání, ale postupný rozklad začíná v

blízkosti 200 °C. Mikroanalýzou vzorku ekvilibrovaného 24 hodin při 22,2 °C v atmosféře o relativní vlhkosti 23 % se zjistí toto složení: C 39,44 %, H: 6,10 %, N: 16,19 proc., Cl (iontový) 11,54 %, ztráta sušením 8,19 %. Ve vodě poskytuje trans-BM123 γ -látka v U. V. absorpčním spektru maximum při 286 nm s $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 250$.

Poloha tohoto maxima se nemění s hodnotou pH. Trans-BM123-látka má specifickou otáčivost $[\alpha]_D^{25} = +71^\circ$ ($C = 0,97$ ve vodě) a vykazuje charakteristické absorpce v infračervené oblasti spektra při následujících vlnových délkách: 770, 830, 870, 930, 980, 1035, 1105, 1175, 1225, 1300, 1340, 1370, 1460, 1510, 1555, 1605, 1660, 1740, 2950 a 3350 cm^{-1} .

Příklad 5

Isolace trans-BM123 γ_1 -látky

Suspenze CM Sephadexu (R) C—25 v sodíkové formě (Na^+) ve 2% vodném roztoku chloridu sodného se nalije do skleněné kolony o průměru 2,6 cm, až je sloupec pryskyřice v koloně 70 cm vysoký. Přbytek 2% vodného roztoku chloridu sodného se odpustí. Vzorek trans-BM123 γ_1 -látky a malého množství trans-BM123 γ_2 -látky a jiných nečistot o hmotnosti 4,11 g, vyrobený způsobem popsaným v příkladě 3 se rozpustí v asi 10 ml 2% vodného roztoku chloridu sodného a nanese na sloupec. Sloupec se eluuje vodným chloridem sodným o koncentraci jednak 2 a jednak 4 % (vždy 4 litry), přičemž se používá koncentračního gradientu. Každých 15 minut se automaticky odebírají 75 ml frakce. Antibiotikum trans-BM123 γ se lokalizuje v jednotlivých frakcích kontrolou eluátu vytékajícího z kolony pomocí ultrafialového světla a bioautografií pomocí navlhčených papírových kotoučů na velkých agarových deskách inokulovaných kmenem *Klebsiella pneumoniae* AD. Většina látky trans-BM123 γ se lokalizuje mezi frakcemi 64 až 90 včetně. První frakce (64 až 80) obsahují směs trans-BM123 γ_1 a trans-BM123 γ_2 -látky, zatímco pozdější frakce (81 až 90) obsahují v podstatě čistou trans-BM123 γ_1 -látku.

100 ml granulovaného produktu Darco (R) G—60 o zrnění 20 až 40 mesh se suspenduje ve vodě, suspenze se převede do skleněné kolony, nechá se usadit a přbytek vody se nechá odtéci. Frakce 81 až 90 včetně, ze shora uvedené chromatografie na CM Sephadexu, se spojí, a nechají projít sloupcem granulovaného uhlí. Sloupec s absorbovanou látkou se promyje 500 ml vody a vyvíjí 500 ml 10% vodného methanolu a pak 1 litrem 50% vodného methanolu. Hodnota pH eluátu v 50% vodném methanolu, který obsahuje většinu trans-BM123 γ_1 -látky se upraví z 5,9 na 6 pomocí ionexové pryskyřice Amberlite (R) IR—45 v hydroxylovém cyklu. Pryskyřice se

odfiltruje a filtrát se za vakua zkoncentruje na vodnou fázi, která se lyofilizuje. Získá se 294 mg bílé amorfni trans-BM123 γ_1 -látky ve formě hydrochloridu.

Antibiotikum trans-BM123 γ_1 nemá ostrý bod tání, ale postupný rozklad začíná v blízkosti 200 °C. Mikroanalýzou vzorku ekvilibrovaného v atmosféře o určité vlhkosti se zjistí toto složení: C: 37,84 %, H: 5,73 %, N: 15,56 %, Cl (iontový), 10,01 %, ztráta sušením 10,45 %. V methanolu poskytuje trans-BM123 γ_1 -látku U.V. absorpční maximum při 286 nm s $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 225$.

Poloha maxima se nemění s hodnotou pH. Trans-BM123 γ_1 -látku má specifickou otáčivost +55° [C = 0,803, ve vodě] a vykazuje charakteristiku absorpce v infračervené oblasti spektra při následujících vlnových délkách: 770, 830, 870, 930, 980, 1045, 1080, 1110, 1125, 1175, 1225, 1305, 1345, 1380, 1465, 1515, 1560, 1605, 1660, 1730, 2950 a 3350 cm⁻¹.

Příklad 6

Izolace trans-BM123 γ_2 -látky

25 gramový vzorek obsahující především trans-BM123 γ_2 - a BM123 β -látku připravený způsobem popsaným v příkladě 3, se rozpustí v asi 120 ml 2% vodného chloridu sodného a nanese na sloupec obsahující 1800 ml CM Sephadexu (R) C-25 v sodíkové formě ve 2% vodném chloridu sodném. Sloupec se eluuje gradientem mezi 20 litry 2% a 20 litry 4% vodného chloridu sodného. Prvních 12 litrů eluátu se jímá do velké láhve a pak zlikviduje. Pak se každých 40 minut automaticky zachytí frakce asi o objemu 800 ml. Antibiotikum trans-BM123 γ se lokalizuje sledováním frakcí eluátu v ultrafialovém světle. Většina trans-BM123 γ -látky se lokalizuje mezi frakcemi 7 až 18 včetně. Počáteční frakce (7 až 15) obsahují v podstatě čistou trans-BM123 γ_2 -látku a pozdější frakce (16 až 18) obsahují směs trans-BM123 γ_1 a trans-BM123 γ_2 -látky.

600 ml granulovaného produktu Darco (R) G-60 o zrnění 20 až 40 mesh se suspenduje ve vodě, suspenze se převede do skleněné kolony, nechá se usadit a přebytek vody se nechá odtéci. Frakce 7 až 15 včetně, ze shora uvedené chromatografie na CM Sephadexu se spojí, a nechají projít sloupcem granulovaného uhlí. Sloupec s absorbovanou látkou se promyje 3 litry vody a vyvíjí se 3 litry 10% vodného methanolu a 6 litry 50% vodného methanolu. Hodnota pH 10% vodně-methanolickeho eluátu se upraví z 5,8 na 6,0 pomocí ionexové pryskyřice Amberlite (R) IR-45 v hydroxylové formě. Pryskyřice se odfiltruje a filtrát se za vakua zkoncentruje na vodnou fázi, která se lyofilizuje. Získá se 595 mg bílé amorfni trans-BM123 γ_2 -látky ve formě hydrochloridu. Hodnota pH 50% vod-

ně-methanolickeho eluátu se nastaví z pH 4,6 na pH 6,1 pomocí ionexové pryskyřice Amberlite (R) IR-45 v hydroxylové formě. Pryskyřice se odfiltruje a filtrát se za vakua zkoncentruje na vodnou fázi, která se lyofilizuje. Získá se 3,645 g poněkud méně čisté bílé amorfni trans-BM123 γ_2 -látky ve formě hydrochloridu.

Antibiotikum trans-BM123 γ_2 nemá ostrý bod tání, ale postupný rozklad začíná v blízkosti teploty 200 °C. Mikroanalýza vzorku ekvilibrovaného 24 hodin při 22,2 °C v atmosféře o 60 % relativní vlhkosti poskytuje tyto výsledky: C: 36,14 %, H: 5,67 %, N: 15,1 %, Cl (iontový) 11,11 %, ztráta sušením 10,87 %. V methanolu poskytuje trans-BM123 γ_2 -látku U. V. absorpční maximum při 286 nm s $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 220$.

Poloha tohoto maxima se nemění s pH. Trans-BM123 γ_2 -látku má specifickou otáčivost +60 [C = 0,51 ve vodě] a vykazuje charakteristické absorpce v infračervené oblasti spektra při následujících vlnových délkách: 770, 830, 870, 950, 980, 1035, 1110, 1175, 1225, 1285, 1345, 1380, 1470, 1515, 1560, 1605, 1660, 1755, 2950 a 3350 cm⁻¹.

Příklad 7

Papírová rozdělovací chromatografie a chromatografie v tenké vrstvě látek BM123 β a trans-BM123 γ .

Antibiotika BM123 lze rozlišit papírovou chromatografií. K tomuto účelu se na proužky papíru Whatman č. 1 nanese skvrny vodného nebo methanolickeho roztoku látek a ekvilibrují se 1 až 2 hodiny v přítomnosti jak horní, tak dolní fáze. Proužky se vyvíjejí přes noc spodní (organickou) fází získanou smícháním 90 % fenol : m-kresol : kyselina octová : pyridin : voda (objemově 100 : 25 : 4 : 4 : 75). Po vyvíjení se proužky vyjmou z chromatografické komory, 1 až 2 hodiny se suší na vzduchu, promyjí se etherem, aby se odstranil zbylý fenol a bioautografují na velkých agarových deskách naočkovovaných *Klebsiella pneumoniae* kmenem AD. Reprezentativní hodnoty R_f jsou uvedeny v následující tabulce VIII:

Tabulka VIII

Složka	R _f
trans-BM123 γ -látku	0,65
BM123 β -látku	0,50, 0,70

β složka se za použití tohoto systému chová jako směs 2 antibiotik. BM123 β -látku se skládá z hlavního antibiotika (R_f = 0,50) označeného BM123 β_1 a z menší míře zastoupeného antibiotika (R_f = 0,70) označeného BM123 β_2 .

BM123-antibiotika lze rovněž rozlišit chromatografií v tenké vrstvě. K tomuto úč-

čelu se nanese na předem povlečené desky z celulózy F (R) (o tloušťce 0,10 mm), [celulóza ve formě tenkých vrstev, dodávaná firmou EM-Laboratories Inc., Elmsford, New York (USA)] skvrny vodného roztoku látky, která má být chromatografována (asi 20 až 40 μ g na skvrnu). Desky se vyvíjejí přes noc rozpouštědlem získaným smícháním 1-butanolu, vody, pyridinu a kyseliny octové (objemově 15 : 12 : 10 : 1). Po vyvíjení se desky odstraní z chromatografické komory a nechají na vzduchu během asi 1 hodiny uschnout. Antibiotika se detegují za použití buď standardního ninhydridnového nebo Sakaguchiho reakčního činidla ve formě spraye. Reprezentativní R_f hodnoty jsou uvedeny v tabulce IX:

Tabulka IX

Složka	R_f
BM123 γ -látka	0,17, 0,23
BM123 β -látka	0,08, 0,14

Jak BM123 β , tak trans-BM123 γ -látka se za použití tohoto systému chová jako směs dvou složek. BM123 β -látka se skládá z hlavní složky ($R_f = 0,08$) označená jako

BM123 β_1 -složka a z vedlejší složky ($R_f = 0,14$) označené jako BM123 β_2 . Méně polární složka trans-BM123 γ -látky ($R_f = 0,23$) je označována jako trans-BM123 γ_1 -látka a polárnější složka ($R_f = 0,17$) jako trans-BM123 γ_2 -látka.

Příklad 8

Příprava cis-BM123 γ -látky

Roztok 200 mg trans-BM123 γ -látky ve 200 ml vody se fotolyzuje světlem Hanovia v tříhrdlé baňce s kulatým dnem opatřené vodním pláštěm po dobu 1/2 hodiny. Během této doby se maximum ultrafialové absorpce reakčního roztoku přesune z vlnové délky 290 m μ na 275 m μ .

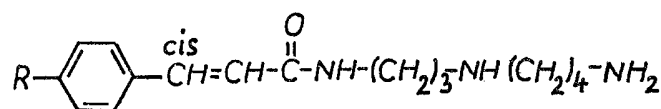
Tato fotolytická reakce se nejlépe sleduje tak, že se odebírají v různou dobu z reakční směsi alikvótní vzorky a měří se jejich ultrafialová absorpce. Reakce je skončena poté, co se maximum absorpce přesune z 290 m μ na 275 m μ . Produkt se z reakční směsi získá lyofilizací.

Shora uvedený postup se opakuje s tím rozdílem, že se roztok fotolyzuje 1,5 hodiny. Lyofilizací se získá 170 mg látky cis-BM123 γ .

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy cis-[p-2-[(3-/4-amino-butyl/amino)propyl]karbamoyl]vinyl]gly-

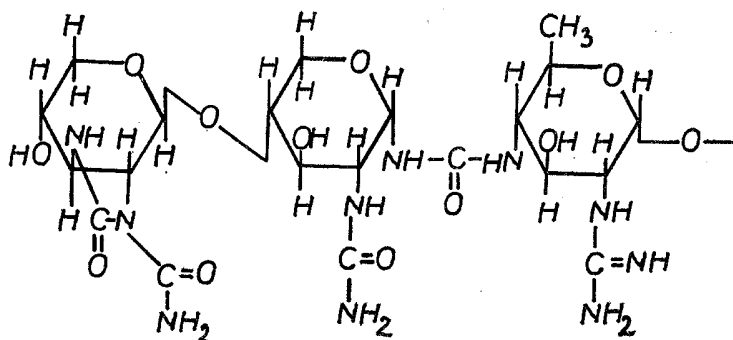
kosidů, označených jako cis-BM123 γ_1 a cis-BM123 γ_2 -sloučenina, obecného vzorce I



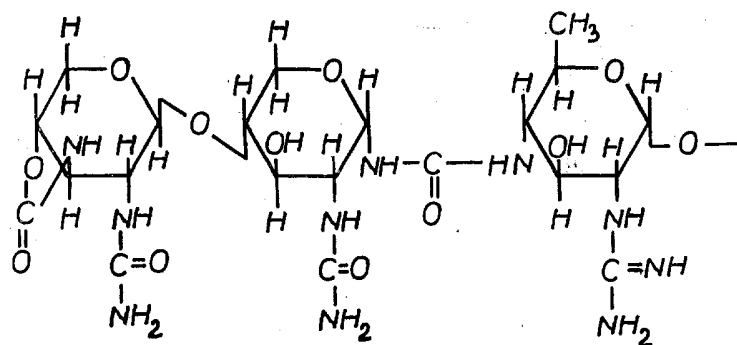
(I)

kde

R představuje v případě BM123 γ_1 -sloučeniny zbytek vzorce



a v případě BM123 γ_2 -sloučeniny zbytek vzorce



vyznačený tím, že se vodný roztok odpovídajícího trans-isomeru ozařuje světlem o vlnové délce 250 až 400 μm tak dlouho, do-

kud se výchozí trans-isomer v podstatě nepřevěde na odpovídající cis-isomer obecného vzorce I.