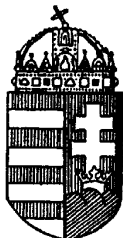


(19) Országkód

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG  
ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATAL**

# SZABADALMI LEÍRÁS

SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY

(11) Lajstromszám

**200367 B**

(22) Bejelentés napja: 1988. 04. 29. (21) (2197/88)

(83) NCAIM B (P) 001036

(41) (42) Közzététel napja: 1989. 11. 28.

(51)

NSZO<sub>5</sub>  
C12P 17/16  
A61K 31/40

(45) Megadás meghirdetésének dátuma  
a Szabadalmi Közlönyben: 1990. 06. 28.

(72) (71) Feltaláló(k):

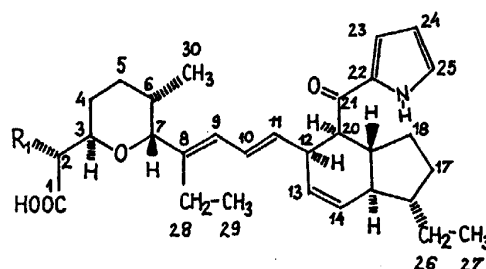
TÓTH Piroska	18%
Dr. SZÉLL Valéria	18%
Dr. KOCZKA István	18%
Dr. HORVÁTH Gyula	8%
Dr. SZABÓ István Mihály	7%
SZAYLY Márta	6%
Dr. AMBRUS Gábor	5%
BEDŐ Julianna	5%
Dr. BÉRDY János	5%
JEKKE Antalné Dr. Budapest	5%
Dr. MAKK Nándor Verőcemas, HU	5%

(73) (72) (71) Szabadalmas:  
Gyógyszerkutató Intézet KV.  
Budapest, HU

## (54) ELJÁRÁS INDANOMICIN ÉS HOMOINDANOMICIN, VALAMINT EZEKET TARTALMAZÓ GYÓGYSZERKÉSZÍTMÉNYEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

### (57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás az Ia képletű indanomicin - ahol R<sub>1</sub> jelentése metilcsoport - és az Ib képletű új homoindanomicin - ahol R<sub>1</sub> jelentése etilcsoport - antibiotikum előállítására aerob fermentációval, amely abban áll, hogy a *Streptomyces galbus* sugárgomba faj NCAIM B(P) 001036 számon letétbe helyezett új törzsét vagy annak valamely - indanomicint és/vagy homoindanomicint termelő - mutánsát vagy variánsát szerves nitrogén és szénforrást, valamint ásványi sókat tartalmazó táptalajon 24 és 32 °C közötti hőmérsékleten tenyésztik, majd a bioszintetizált antibiotikumokat a tenyészetből elkülönítik és kívánt esetben egymástól elválasztják.



Ia - Ib

A leírás terjedelme: 12 oldal, 2 ábra

**HU 200367 B**

A találmány tárgya, eljárás indanomicin és homoindanomicin előállítására aerob fermentációval.

Állatgyógyászatban és állattenyésztésben hasznosítható új antibiotikumok felismerésére irányuló kutatási programunk keretében egy Magyarországon begyűjtött talajmintából izoláltuk a 83-394 jelű, Actinomycetales rendbe tartozó mikroorganizmust, mely két, Gram-pozitív baktériumok szaporodását alacsony töménységben jelentősen gátló, ionofór tulajdonságú antibiotikumot bioszintetizál. Ezek közül az egyik antibiotikum a szerkezetvizsgálat során azonosnak bizonyult a már korábban feltalált indanomicinnel (857 513 sz. belga szabadalom), mely kérődző haszonállatok tenyésztésénél takarmány kiegészítőként alkalmazva

elősegíti a tápanyag hasznosítását. A másik antibiotikumot az indanomicinnel rokon szerkezetű és hasonló biológiai tulajdonságú új hatóanyagként találtuk, és homoindanomicinnel neveztuk el. Az indanomicint először Ch.-M. Liu és munkatársai izolálták [J. Antibiotics 32: 95,(1979)] a *Streptomyces antibioticus* mikroorganizmus tenyészetéből.

Az általunk izolált 83-394 jelű mikroorganizmust a rendszertani meghatározás során a *Streptomyces galbus* fajjal azonosítottuk. E fajnak indanomicint termelő törzse eddig még nem volt ismeretes.

A 83-394 jelű *Streptomyces* törzs rendszertani vizsgálatának eredményeit az alábbiakban adjuk meg:

I. táblázat  
A *Streptomyces* sp. 83-394 jelű törzs összehasonlítása  
autentikus *Streptomyces galbus* törzsekkel

Vizsgált tulajdonság	<i>Streptomyces galbus</i> (ISP 5089) <sup>+</sup>	<i>Streptomyces galbus</i> (ISP 5480) <sup>++</sup>	<i>Streptomyces</i> sp. 83-394
Spóra-lánc morfológia	Retinaculiaperti	Spirális	Retinaculiaperti
Spórák száma lánconként	≥50	≥50	≥50
Spórafelszín (elektr.opt.)	sima	sima	sima
Spóratömeg szín-sorozat	szürke	szürke	szürke
Szubsztrátmicélium szín-sorozat	sárgás-barna	sárgás-barna	sárgás-barna
Melanoid pigment pepton-élesztőkivonat-vas-agar	pozitív	pozitív	pozitív
Tirozin-agar	negatív	gyengén pozitív	negatív
Oldódó pigment	sárga	sárgás v. sárgászöld	sárga
Szubsztrátmicélium indikátor-karaktere	negatív	negatív	negatív
Oldódó pigment indikátor-karaktere	negatív	negatív	negatív
Szénforrás értékesítés			
D-glükóz	pozitív	pozitív	pozitív
L-arabinóz	pozitív	kérdéses	kérdéses
D-xilóz	pozitív	pozitív	pozitív
i-inozit	pozitív	pozitív	pozitív
D-mannit	pozitív	pozitív	pozitív
D-fruktóz	pozitív	pozitív	pozitív
Szacharóz	negatív	negatív	negatív
Rammóz	negatív	negatív	gyengén pozitív
Raffinóz	negatív	kérdéses	negatív

+ = W.Frommer: Archiv für Mikrobiologie 32, 187 (1959),

++ = M. Murase és munkatársai: J. Antibiotics, Ser. A. 12, 126 (1959).

Mikromorfológia: A spóratartók morfológiája azonos a *Streptomyces galbus* típus törzsekével: különböző tápagar közegeken, variálva laza vagy tömött, 3–8 kanyarulatú spirál vagy retinaculum-apertum típusú spóraláncok képződnek, melyekben általában több mint 50 spóra helyezkedik el. A spórák nem ornamentáltak és hatereszeres nagyításnál sima felületű spóraburokról tanúskodnak.

A törzs ISP-táplálajokon erőteljesen fejlett, sárgásbarna telepeket fejleszt, amelyeket porszerű, hamuszürke spóratömeg borít.

A szubsztrát micélium színe nem indikátorkarakterű, és az esetenként termelt világossárga oldódó pigment sem az. A törzs pepton-élesztőkivonat-vas agraron melanoid pigmentet termel, míg tirozin agraron nem képez pigmentet.

Az 1. táblázatban a 83-394 jelű *Streptomyces* törzs rendszertani tulajdonságait összehasonítottuk a korábban leírt *Streptomyces galbus* törzsek rendszertani jellemzőivel.

A fenti rendszertani vizsgálatok adatai szerint a törzs a *Streptomyces galbus* faj tipikus alakja.

A 83-394 jelű *Streptomyces galbus* törzset 1988. január 20-án letétbe helyeztük Budapesten a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében, ahol az NCAIM B(P) 001036 letéti számot kapta.

A fentiek alapján a találmány eljárás az Ia képletű indanomicin - ahol R<sub>1</sub> jelentése metilcsoport - és az Ib képletű homoindanomicin - ahol R<sub>1</sub> jelentése etilcsoport - antibiotikumok előállítására aerob fermentációval, amely abban áll, hogy a *Streptomyces galbus* sugárgomba faj NCAIM B(P) 001036 számon letétbe helyezett törzsét vagy annak valamely - indanomicint és/vagy homoindanomicint termelő - mutánsát vagy variánsát szerves nitrogén és szénforrást, valamint ásványi sókat tartalmazó táptalajon 24 és 32 °C közötti hőmérsékleten tenyésztjük, majd a bioszintetizált antibiotikumokat a tenyészetből elkülönítjük és a kívánt esetben egymástól elválasztjuk.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazott *Streptomyces galbus* törzs tenyésztésére a sugárgombák tenyésztésére szolgáló általánosan ismert módszereket használhatjuk.

Az indanomicin és homoindanomicin antibiotikumokat bioszintetizáló 83-394 jelű *Streptomyces galbus* törzs tenyésztésénél szénforrásként glükóz, keményítő és növényi olajok, nitrogénforrásként szójaliszt, kukoricafehérje, illetve kazein, szervesen sóként NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> és CaCO<sub>3</sub> alkalmazható előnyösen.

A törzset célszerűen élesztőkivonat-keményítő agraron tartjuk fenn. Ezen a táptalajon a törzs megőrzi termelőképességét háromhavonkénti átoltás esetén.

A törzs szülyesztett tenyészetben, 24–32 °C közötti hőmérsékleten jó növekedést mutat, az antibiotikum bioszintézis szempontjából előnyös a tenyésztést 26–30 °C között végezni.

A savas jellegű, erősen lipofil indanomicin és homoindanomicin a fermentlé pH 4,0–4,5-en történő szűrésénél nagyrészt a mikroorganizmus sejtfelületéhez kötődik és a sejtekről extrakciós módszerekkel nyerhető ki. A szűrőkor kapott nedves micéliumról az antibiotikumok előnyösen vízzel elegyedő neutrális, szerves oldószerekkel, pl. alkoholokkal (metilalkohol, etilalkohol, butanol), illetve acetonnal oldhatók le.

Az így kapott kivonatot csökkentett nyomáson bepárolva vizes maradékhoz jutunk, melyből vízzel nem elegyedő szerves oldószerekkel, előnyösen etilacetáttal extrahálhatjuk az antibiotikumokat. Az etilacetátos extraktum vákuumban történő bepárlásával kapjuk a nyersterméket. Az antibiotikum-komplex tisztítására és komponenseinek egymástól való elválasztására oszlop és vékonyréteg-kromatográfias módszereket alkalmazhatunk.

A tisztításnál különösen előnyösen a szilikagél oszlopkromatográfia, eluensként n-hexán-kloroform elegyet, majd kloroformot, végül kloroform-metanol elegyet alkalmazva.

Az indanomicin és a homoindanomicin előnyösen elválasztható preparatív vékonyréteg-kromatográfias módszerrel is, szilikagél G adszorbenst és etilacetát-kloroform-metanol (2:1:0,15) arányú oldószerelegyet használva kifejlesztőszerként.

Az izolált antibiotikumok szerkezetét az alábbi módon igazoltuk. Az indanomicin fizikai állandói (olvadáspont, optikai forgatóképesség), elemi analízise, valamint spektroszkópiái adatai: ultrabolya-, infravörös-, <sup>1</sup>H-NMR-, <sup>13</sup>C-NMR és tömegspektrumai egyeztek a szakirodalomban közltekkel.

A homoindanomicin szerkezetét tömegspektroszkópiái vizsgálatokkal állapítottuk meg. Összehasonlítottuk az indadomicinnek, a homoindanomicinnek, valamint diazometánnal végzett észterezéssel előállított metilésztereknek elektron bombázás hatására végbemenő fragmentációját. A vizsgált 4 vegyület töredései mechanizmusát az 1. ábra és 2. táblázat mutatja.

Az a, b, c, d, e töredék-ionok összevetésével és nagyfelbontású tömegmérésekkel megállapítottuk, hogy a homoindanomicin és az indanomicin rokon szerkezetű vegyületek, melyek abban különböznek egymástól, hogy a kettes helyzetűszénatomhoz az indanomicin esetében metilcsoport, a homoindanomicin esetében pedig etilcsoport kapcsolódik. A tömegspektroszkópiái vizsgálatok alapján meghatározott szerkezettel összhangban van a homoindanomicin ultrabolya, infravörös, <sup>1</sup>H-NMR és <sup>13</sup>C-NMR spektruma. A feltételezett szerkezetet proton-proton korrelációs NMR-vizsgálatokkal is alátámasztottuk.

A homoindanomicin és az indanomicin biológiai hatásainak vizsgálatára végzett kísérleteink eredményeit az alábbiakban foglaltuk össze.

A homoindanomicin és indanomicin biológiai hatékonysága igen hasonló. A homoindanomicin antibakteriális hatásspektruma egyező az indanomicinével, azaz a Gram szerint pozitívan festődő baktériumok szaporodását igen alacsony koncentrációban meggátolja, de a Gram szerint negatívan festődő baktériumok, továbbá élesztőgombák szaporodására gyakorlatilag hatástalan. A lét antibiotikum antibakteriális spektrumát a 3. táblázat mutatja.

A homoindanomicin és az indanomicin ugyanolyan mértékben gátolja a különböző, más típusú hatóanyagok hatásával szemben rezisztens Gram szerint pozitívan festődő mikroorganizmusok szaporodását, mint az érzékenyekét, mert a MIC értékek azonosak más antibiotikumokra és kemoterápiás szerekre érzékeny vagy rezisztens törzsekre egyaránt.

2. táblázat  
Az indanomicin és metilészterének tömegspektroszkópai vizsgálata

Vegyület neve	Képletben levő szubsztituensek		Törédéklionok:					
			M	a	b	c	d	e
indanomicin	(R <sub>1</sub> =CH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> =H)	493	464	420	399	251	94
indanomicin-metilészter	(R <sub>1</sub> =CH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> =CH <sub>3</sub> )	507	478	420	413	265	94
homoindanomicin	(R <sub>1</sub> =CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> =H)	507	478	420	413	265	94
homoindanomicin-metilészter	(R <sub>1</sub> =CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> =CH <sub>3</sub> )	521	492	420	427	279	94

3. táblázat

## A homoindanomicin és indanomicin antibakteriális spektruma

Módszer: Makrodilúciós eljárás, 3 ml táptalaj (Penassay Broth, BACTO B-243, Difco Laboratories Inc., Detroit, USA), 24<sup>h</sup> inkubációs idő, leolvasás szabad szemmel.

Tesztorganizmusok	MIC <sup>+</sup> mg/l	
	Homoindanomicin	Indanomicin
Bacillus subtilis ATCC 6633	0,03	0,03
Staphylococcus aureus SMITH, béta-laktamáz -	0,06	0,06
Staphylococcus aureus 1110 <sup>++</sup> , béta-laktamáz +	0,06	0,06
Streptococcus faecalis	0,03	0,03
Streptococcus pneumoniae	2,5	6,2
Streptococcus pyogenes A 118	2,5	2,5
Streptococcus pyogenes A 115	1,25	6,2
Clostridium perfringens 70500	-	0,04
Mycoplasma pneumoniae	-	25,0
Acinetobacter anitratus	>100	>100
Alcaligenes faecalis 14001	>100	>100
Bordetella bronchiseptica ATCC 4617	>100	>100
Escherichia coli K <sub>12</sub> béta-laktamáz -	>100	>100
Escherichia coli 6R béta-laktamáz +	>100	>100
Klebsiella pneumoniae ATCC 10031	>100	>100
Proteus inconstans NCTC 8055	>100	>100
Pseudomonas pyogenes NCTC 10490	>100	>100
Salmonella typhimurium	>100	>100
Serratia marcescens	>100	>100
Candida albicans	>100	>100

<sup>+</sup>MIC = legkisebb gátló töménység,

<sup>++</sup> = rezisztens penicillin-G, sztreptomycin, eritromicin, oxitetracliklin hatásával szemben.

Az indanomicin és homoindanomicin hatékonyságának mértéke jelentősen függ a baktériumok tenyésztésére használt tápfolyadék hidrogén-ion koncentrációjától, és a legnagyobb baktériumellenes hatást enyhén lúgos (pH = 7,5 és pH = 8,0) közegben

50 lehet megfigyelni. A 4. táblázatban az antibakteriális hatékonyság változást mutatjuk be a pH függvényében Bacillus subtilis 6633 indikátor törzset és agar-diffúziós mérési módszert használva.

4. táblázat

## Homoindanomicin és indanomicin hatékonyságának változása a pH függvényében

Módszer: Agar-diffúziós technika [Analytical Microbiology, II. kötet 31. oldal, szerkeszti: F. Kavanagh (1972) Academic. Press, New York].

Konc. mg/l	Gátolt zóna átmérő (mm)					
	Indanomicin			Homoindanomicin		
	pH = 8,0	pH = 7,0	pH = 6,5	pH = 8,0	pH = 7,0	pH = 6,5
10	23,36	19,7	17,6	26,5	21,7	19,8

Konc. mg/l	Gátolt zóna átmérő (mm)					
	pH = 8,0	Indanomicin pH = 7,0	pH = 6,5	pH = 8,0	Homioindanomicin pH = 7,0    pH = 6,5	
5	20,5	19,4	17,2	22,86	21,2	19,2
2,5	17,6	17,66	16,1	19,2	19,0	18,2
1,25	0 <sup>x</sup>	15,2	14,5	0	15,4	16,1

<sup>x</sup> = nincs gátlásgyűrű

A vizsgált antibiotikumok melegvérűek sejtjeire kifejtett toxicitását a 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat  
*A homioindanomicin és indanomicin szövettoxicitásának vizsgálata*

Módszer: S. Horváth: Toxicology. 16: 59, (1980)  
Szövet: HeLa sejtenyészlet

Vegyület	CT <sub>0</sub> (mg/l)	CT <sub>50</sub> (mg/l)
Homioindanomicin	0,5	2,0
Indanomicin	0,079	0,158

CT<sub>0</sub> = a hatóanyag olyan legnagyobb koncentrációja, amely a HeLa sejtekre még mérhető károsodást nem fejt ki.

CT<sub>50</sub> = a hatóanyag olyan koncentrációja, amely a HeLa sejtek felén látható toxikus hatást okoz.

HeLa sejt = human cervix-carcinoma laboratóriumi tenyésztetben fenntartott sejtvonala.

A táblázatból kiténik, hogy a homioindanomicin kevésbé szövettoxicus, mint az indanomicin.

Ames tesztben [D.M. Maron, B.N. Ames: mutation Research 113: 173 (1983)] sem az indanomicin, sem a homioindanomicin nem emeli a revertánsok számát jelentősen még 500 µg/lemez, azaz kb. 20 µg/ml töménységben sem. Ez a töménység hatástalan Gram negatív tesztorganizmusok szaporodására, de sokszorosra a melegvérű állatok sejtjeire toxikus koncentrációnak.

Az indanomicin és homioindanomicin akut toxicitását egerekben határoztuk meg. Az eredményeket az 5. táblázat tartalmazza.

6. táblázat

*A homioindanomicin és indanomicin akut, egyszeri toxicitásának vizsgálata egerekben*

Egerek: OF<sub>1</sub> (LATI, Budapest) fajtájú, 21–23 g-os hím egerek csoportonként 3 db.

Megfigyelés: 14 nap

Kiértékelés módja: grafikus

A homioindanomicin Tween 80-nal és fizioológias sós vízzel készített szuszpenzióját vizsgáltuk, a hígításokat is fizioológias sós vízzel készítettük.

Az indanomicint dimetilszulfoxidban oldottuk és fizioológias töménységű sós vízzel hígítottuk. Az így keletkező szuszpenzióval végeztük az állatok kezelését.

A vegyület jele    Adagolás módja    LD<sub>50</sub> mg/kg

Indanomicin	p.o.	110
	s.c.	42
	i.p.	23
Homioindanomicin	p.o.	60
	s.c.	–
	i.p.	40

Az indanomicin és a homioindanomicin, illetve a két antibiotikumot tartalmazó antibiotikum-komplex jól alkalmazható haszonállatok, főleg sertések és kerdzók takarmánykegészítőként. Mivel nem szívódik fel, hatását helyileg fejt ki, ezért az állatok szerveiben, izomzatában és szekrétaiban maradék antibiotikum megjelenésére nem kell számítani. Az indanomicin és a homioindanomicin a hatás csökkenése nélkül kombinálhatók más takarmány-adalékokkal.

A találmány eljárást az alábbi kiviteli példákkal szemléltetik.

1. példa

Streptomyces galbus NCAIM 001036 sz. törzs élesztővelkivatot és keményítőt tartalmazó ferdeagaron növesztett tenyészetéről készített spóraszuszpenzióval 500 ml-es Erlenmeyer lombikban sterilizett 100 ml R-jelű, alábbi összetételű táptalajt oltunk:

Glükóz	3,0 %
kazein-hidrolizátum (10 %-os oldat)	1,0 %
kukoricalekvár (50 % szárazanyag tartalom)	0,2 %
Napraforgóolaj	0,2 %
nátrium-klorid	0,5 %
kalcium-karbonát csapvízben.	0,5 %

50 Sterilizés előtt a táptalaj pH-ja 7,0–7,2. A táptalajt 121 °C-on, 25 percig sterilizzük.

A tenyésztést síkrázógépen (270 fordulat/perc, 3,5 cm kitérés) végezzük, 28 °C-on. A fermentáció során keletkező antibiotikumok mennyiségét mikrobiológiai módszerrel, agar-diffúziós technikával mérjük [Analytical Microbiology, I. kötet: 87. oldal, szerkeszti: F. Kavanagh (1963) Academic, Press, New York], Bacillus subtilis ATCC 6633 tesztorganizmust és 8-as pH-jú agartáptalajt valamint indanomicin standardot alkalmazva. A tenyésztés 96. órájában a fermentáléban 180 mg/ml-es antibiotikum-koncentrációt mérünk.

2. példa

65 Streptomyces galbus NCAIM 001036 sz. törzs élesztőkivonatát és keményítőt tartalmazó ferdeagaron

növesztett tenyészetéről készített spóraszuszpenzióval 2 db 500 ml-es Erlenmeyer lombikban sterilizált 100-100 ml 1. példában megadott összetételű, R-jelű táptalajt oltunk, majd a lombikokat sákrázógépen (270 fordulat/perc, 3,5 cm kitérés) 28 °C-on rázatjuk 48 óráig. Ezután a két lombik tenyészetével 10 l-es üvegfertentőben 5 liter steril F-jelű táptalajt oltunk, melynek összetétele a következő:

Glükóz	2,0 %
burgonya-keményítő	2,0 %
szójaliszt	2,5 %
kazein-hidrolizátum (10 %-os oldat)	2,0 %
kukoricalekvár (50 % szárazanyag tartalom)	0,2 %
napraforgóolaj	0,4 %
calcium-karbonát	0,5 %
csapvízben.	

A táptalaj pH-ját 1n nátrium-hidroxid oldattal 7,0–7,2-re állítjuk, majd 121 °C-on 1 órán át sterilizáljuk.

A fermentációt 28 °C-on végezzük 300 liter/óra levegőztetés és 375 fordulat/perc kevertetés mellett. Habzás esetén polipropilén- glikolt adagolunk. A fermentáció 120. órájában 550 mg/ml antibiotikum koncentrációt mérünk a fermentlében az 1. példában leírt módon.

Ezután a fermentlé pH-ját 4-es értékre állítjuk telített oxálsav oldattal, majd a fermentlét szűrjük. A szűrletet kétszer 500 ml etil-acétáttal extraháljuk és az etil-acetátos extraktumokat egyesítjük.

A kiszűrt mikroorganizmus sejteket háromszor 1,5 liter metanolal kivonatoljuk, a metanolos kivonatokat egyesítjük és a metanolt csökkentett nyomáson, 50 °C-on lepároljuk. A vizes maradék pH-ját telített oxálsavval 4-es értékre állítjuk, majd a megsavanyított oldatot kétszer 500 ml etil-acétáttal extraháljuk. A kapott etil-acetátos kivonatokat és a fermentlé szűrletének etil-acetátos extraktumát egyesítjük, vízmentes nátrium-szulfáton szárítjuk, és vákuumban bepároljuk. A kapott olajos bepárlási maradékot 100 ml n-hexánnal eldörzsöljük, és hidegen egy napig állni hagyjuk. Ezután a kivált csapadékot leszűrjük, így 4,1 g nyersterméket kapunk.

A kapott nyersterméket 200 g Kiesegel (szemcseátmérő: 0,05–0,2 mm, Reanal, Budapest) adszorbent tartalmazó oszlopon kromatografáljuk. Az elúciót 1,5 liter n-hexán-kloroform (1:1) eleggyel, majd 1,0 liter kloroformmal, végül 1,5 liter kloroform-metanol (1:1) eleggyel végezzük. Az oszlopkromatográfiás frakciók antibiotikum tartalmát vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel analizáljuk [adszorbens: szilikagél G (Reanal, Budapest), kifejlesztő elegy: etil-acetát-kloroform-metanol (2:1:0,3) elegy, előhívás foszformolibdén-sav reagenssel]. Az oszlopról n-hexán-kloroform (1:1) eleggyel először homoin-danomicin, majd homo-indanomicin és indanomicin keveréke oldódik le, s végül kloroform, illetve kloroform-metanol (1:1) eleggyel az indanomicin. A megfelelő frakciókat vákuumban bepárolva 475 mg homoin-danomicint, 1,3 g indanomicint és 430 mg homoin-danomicinből és indanomicinből álló keveréket kapunk.

A keveréket preparatív rétegekromatográfiás módszerrel választjuk szét, szilikagél G adszorbent és

az oszlopkromatográfiás frakciók vizsgálatánál alkalmazott kifejlesztő elegyet használva. Így további 80 mg homoin-danomicint és 202 mg indanomicint kapunk.

5 A kromatográfiásan tiszta antibiotikumokat diklór-metánban oldjuk, az oldatot 2n sósav oldattal, majd vízzel mossuk, végül szárítjuk és vákuumban bepároljuk. Az így tisztán sav formában kapott antibiotikumokat acetonnitrilből kristályosítjuk át.

10 A *homoin-danomicin* fizikai és spektroszkópiai adatai:

Op.: 84–87 °C

Optikai forgatóképesség:  $[\alpha]_D^{20} = -360^\circ$  (c=0,5, CHCl<sub>3</sub>)

15 Elemanalízis: C: H: N:

számított: 75,6 % 8,48 % 2,76 %

talált: 74,2 % 9,1 % 2,85 %

Ultraibolya színkép (metanol):  $\lambda_{\max}$  nm (E<sub>1cm</sub><sup>1%</sup>): 245 (610), 252 váll (599), 291 (325).

20 Infravörös spektrum, jellemző sávok (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3245, 2965, 2935, 1710, 1635, 1410.

<sup>1</sup>H-NMR spektrum, jellemző jelek (CDCl<sub>3</sub> δ, ppm): 2,84 (H-2), 4,17 (H-3), 4,38 (H-7), 5,4–6,0 (H-9, 10, 11, 12, 13, 14), 6,87 (H-23), 6,25 (H-24), 7,04 (H-25), 0,93 (H-27, 32), 0,69 (H- 29), 0,79 (H-30).

25 <sup>13</sup>C-NMR spektrum (CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 179,5 (C-1), 49,3 (DEPT:CH) (C-2), 73,3 (C-3), 22,8 (C-4), 26,1 (C-5), 29,1 (DEPT:CH) (C-6), 76,0 (C-7), 140,0 (C-8), 122,4 (C-9), 126,5 (C- 10), 132,5 (C-11), 46,4 (C-12), 129,4 (C-13, C-14), 49,7 (C-15), 43,6 (C-16), 29,6 (C-17), 26,9 (C-18), 40,9 (C-19), 52,9 (C-20), 191,6 (C-21), 132,9 (C-22), 116,7 (C-23), 109,8 (C-24), 125,5 (C- 25), 27,4 (C-26), 12,5 (C-27), 22,6 (C-28), 13,0 (C-29), 12,2 (C- 30), 22,7 (DEPT:CH<sub>2</sub>) (C-31), 12,5 (DEPT:CH<sub>3</sub>) (C-32).

30 Tömegspektrum

Molekulatömeg: 507

Jellemző ionok: m/z (R.I.%): 507 (37), 478 (7), 420 (3), 413 (5), 265 (56), 94 (100).

40 Az *indanomicin* fizikai és spektroszkópiai adatai:

Op.: 146–149 °C

Optikai forgatóképesség:  $[\alpha]_D^{20} = -338^\circ$  (c=1; CHCl<sub>3</sub>)

45 Elemanalízis: C: H: N:

számított: 75,42 % 8,78 % 2,84 %

talált: 75,45 % 8,97 % 2,61 %

Ultraibolya színkép (metanol):  $\lambda_{\max}$  nm (E<sub>1cm</sub><sup>1%</sup>): 243 (691), 249 váll (677), 289 (340).

50 Infravörös spektrum, jellemző sávok (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3240, 2965, 2940, 1710, 1625, 1410, 1215, 760.

<sup>1</sup>H-NMR spektrum, jellemző jelek (CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 2,85 (H-2), 3,90 (H-3), 4,20 (H-7), 5,2–6,0 (H-9, 10, 11, 13, 14), 6,95 (H-23, 25), 6,25 (H-24), 0,95 (H-27), 0,75 (H-29), 0,85 (H- 30), 1,15 (H-31, d, J = 6,5 Hz).

55 <sup>13</sup>C-NMR spektrum (CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 179,4 (C-1), 41,4 (C-2), 75,0 (C-3), 22,1 (C-4), 26,5 (C-5), 30,6 (C-6), 74,8 (C- 7), 140,7 (C-8), 124,6 (C-9), 127,4 (C-10), 132,6 (C-11), 45,5 (C-12), 129,6 (C-13, 14), 50,0 (C-15), 43,8 (C-16), 29,7 (C-17), 27,2 (C-18), 40,7 (C-19), 52,7 (C-20), 192,0 (C-21), 132,6 (C-22), 116,3 (C-23), 110,4 (C-24), 125,6 (C-25), 27,4 (C-26), 12,6 (C-27), 22,1 (C-28), 13,6 (C-29, 30), 14,0 (C-31).

60 Tömegspektrum

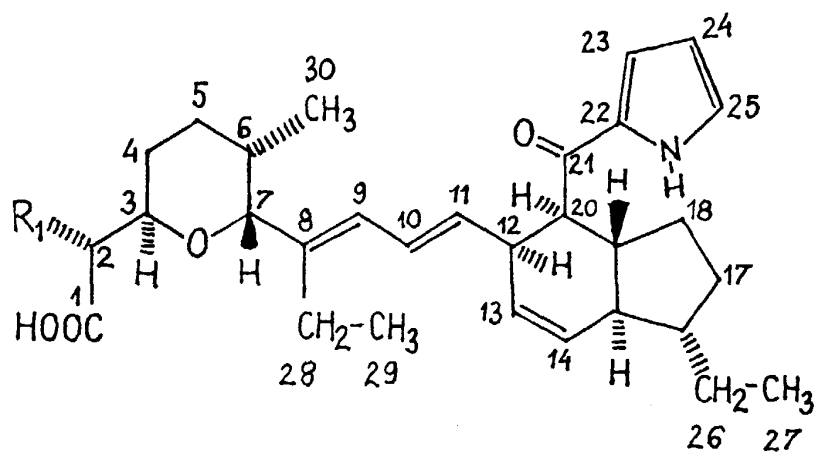
65

Molekulatömeg: 493  
 Jellemző ionok: m/z (R.I.%): 493 (44), 464 (7),  
 420 (5), 399 (7), 251 (78), 94 (100).

#### SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás az Ia képletű indanomicin - ahol R<sub>1</sub> jelentése metilcsoport - és az Ib képletű homoindanomicin - ahol R<sub>1</sub> jelentése etilcsoport - antibiotikumok előállítása aerob fermentációval, *azzal jellemezve*, hogy a *Streptomyces galbus* sugárgomba faj NCAIM B(P) 001036 számon letétbe helyezett törzsét vagy annak valamely - indanomicint és/vagy homoindanomicint termelő - mutánsát vagy variánsát szerves nitrogén és szénforrást, valamint ásványi sókat tartalmazó táptalajon 24 és 32 °C közötti hőmérsékleten tenyésztjük, majd a bioszintetizált antibiotikumokat a tenyészetből elkülönítjük és kívánt esetben egymástól elválasztjuk.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a fermentálást sülyesztett tenyészetben, 26 és 30 °C közötti hőmérsékleten végezzük.
3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szénforrásként glükózt, keményítőt és/vagy növényi olajokat, nitrogénforrásként szójalisztet, kukoricalekvárt és/vagy kazeint; szervesen sóként nátrium-kloridot, dikáliumhidrogénfoszfátot és/vagy kalciumkarbonátot alkalmazunk.
4. Eljárás állattakarmányozási célokat szolgáló készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1. igénypont szerinti eljárással előállított homoindanomicint vagy indanomicin-homoindanomicin keveréket önmagukban vagy egyéb, az állattenyésztésben és takarmányozásban szokásos vivőanyagokkal, hígító- és/vagy tartósítószerrel, valamint tápanyagokkal együtt, orális készítménnyé alakítjuk.

2/1



1a - 1b

