



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 77 05 23 (P. 216678)

Pierwszeństwo: 76 05 24 Stany Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 76 05 24

Opis patentowy opublikowano: 1985 11 30

CZYTELNIA

Urzedu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Int. Cl⁸ A61K 37/02
C12P 21/00

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Eli Lilly and Company, Indianapolis (Stany
Zjednoczone Ameryki)

Sposób wytwarzania aglikonowej pochodnej czynnika B miesza- niny antybiotycznej A-35512

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarza-
nia aglikonowej pochodnej czynnika B miesza-
niny antybiotycznej A-35512.

Antybiotyki A-35512 są blisko spokrewnionymi
antybiotykami glikopeptydowymi. Czynniki B anty-
biotyków A-35512, najdokładniej scharakteryzo-
wany składnik kompleksu antybiotycznego A-35512,
jest nowym antybiotykiem z grupy antybiotyków
zawierających ugrupowanie peptydowe, takich jak
wankomycyna (opis patentowy Stanów Zjednoczo-
nych Ameryki Nr 3067099), antybiotyki A-4696, H,
B i C (opis patentowy Stanów Zjednoczonych
Ameryki nr 3952095), awoparcyna (opis patento-
wy Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3855410),
restomycyna A/N, Łomakina, 7th International
Symposium of Chemistry of Natural Products, Ry-
ga, 1970, str. 625) i rystocetyna A (opis paten-
towy Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 2990329).

Antybiotyki A-35512 różnią się od powyższych
znanych antybiotyków, między innymi ruchliwo-
ścią w różnych układach chromatograficznych i
składem aminokwasowym i cukrowym.

Chociaż znane są obecnie liczne środki przeciw-
bakteryjne, istnieje w dalszym ciągu potrzeba po-
szukiwania nowych, lepszych antybiotyków. Jed-
nym z problemów współczesnej terapii antybio-
tykami jest fakt różnej skuteczności różnych an-
tybiotyków w stosunku do patogennych drobnou-
strojów. Z drugiej strony szczepy drobnoustro-

2

jów uodporniają się na działanie obecnie stoso-
wanych antybiotyków.

Ponadto, u indywidualnych pacjentów często
występują poważne reakcje uboczne po podaniu
określonych antybiotyków, takie jak nadwrażli-
wość i/lub działanie toksyczne. Dlatego też ko-
rzystne jest wytwarzanie nowych antybiotyków
aktywnych w chorobach wywoływanych przez dro-
bnoustroje.

Ponadto korzystne jest otrzymanie dodatków
paszowych zwiększających efektywność karmienia
zwierząt przeżuujących i drobiu. Zwiększenie e-
fektywności karmienia nabiera coraz większego
znaczenia. Środkami zwiększającymi efektywność
karmienia u wielu zwierząt i ptactwa są dwuety-
lostilbestrol i inne estrogeny.

Połączone jest to jednak z ryzykiem, że resztki
tych dodatków paszowych przechodzą do mięsa
przeznaczonego do spożycia. Dlatego też istnieje
realna potrzeba ekonomiczna poszukiwania nowych
sposobów zwiększania efektywności ograniczonych
zasobów pasz, dostępnych dla produkcji mięsa ze
zwierząt przeżuujących i drobiu.

Zastosowanie mieszaniny antybiotycznej A-35512
lub poszczególnych czynników i ich pochodnych
jest postępek w tej dziedzinie.

Sposobem według wynalazku wytwarza się agli-
konową pochodną czynnika B mieszaniny antybio-

tycznej A-35512, określonego jako czynnik antybiotyczny A-35512-B.

Cechą sposobu według wynalazku jest to, że drobnoustroj *Streptomyces candidus* NRRL 8156, hoduje się w pożywce zawierającej źródło przyswajalnego węglowodanu i azotu oraz sole nieograniczone, w warunkach podpowierzchniowej fermentacji aerobowej, do uzyskania znacznej aktywności antybiotycznej, po czym mieszaninę antybiotyczną A-35512 wyodrębnia się z pożywki hodowlanej, z mieszaniny tej wydziela się czynnik B mieszaniny antybiotycznej A-35512 i czynnik ten poddaje się hydrolizie za pomocą umiarkowanie mocnego kwasu.

Aglikon czynnika A-35512-B oraz jego dopuszczalne w fermentacji sole stosuje się jako dodatek do karmy dla drobiu w ilości zwiększającej efektywność karmienia.

Ponadto aglikon czynnika A-35512-B i jego dopuszczalne w farmacji sole podany doustnie zwierzętom przeżuującym z rozwiniętą funkcją żwacza, w dawce zwiększającej ilość propionianu, powoduje zwiększenie przyswajania pokarmu u tych zwierząt.

Aglikon czynnika A-35512-B i jego dopuszczalne w farmacji sole można także stosować do zwiększania przyswajania pokarmu u drobiu, podając tym zwierzętom doustnie skuteczną dawkę aglikonu czynnika A-35512-B lub jego soli.

Widmo w podczerwieni, w zawiesinie w oleju parafinowym, aglikonu czynnika A-35512-B przedstawia fig. 1.

Poszczególne czynniki A-35512 są blisko spokrewnionymi związkami. Jako mieszaninę antybiotyczną A-35512 izoluje się z brzojki fermentacyjnej aż siedem czynników antybiotycznych. Poszczególne czynniki rozdziela się i wyodrębnia czynniki A, B, C, E i H. Mieszanina A-35512 jest rozpuszczalna w wodzie, częściowo rozpuszczalna w alkoholach, takich jak metanol i etanol, ale nierozpuszczalna w innych rozpuszczalnikach organicznych, takich jak benzen, chloroform, aceton, eter dwuetylowy, octan etylu, toluen, heksan, acetonitryl i dioksan.

Czynnik A-35512-B jest białą, bezpostaciową, zasadową substancją o przybliżonym wzorze empirycznym $C_{97-99}H_{101-105}N_8-9O_{46-48}Cl$ i następującym przybliżonym składzie elementarnym: C — 53,97%, H — 4,75%, N — 5,25%, O — 34,29%, Cl — 1,59%.

Powyższe wyniki analizy elementarnej w szczególności są zgodne z korzystnym wzorem empirycznym $C_{98}H_{104}N_8O_{47}Cl$ (obliczono: C — 53,60, H — 4,75, N — 5,47, O — 34,30, Cl — 1,61). Innym korzystnym wzorem empirycznym jest $C_{98}H_{103}N_8O_{47}Cl$ (obliczono: C — 54,00, H — 4,75, N — 5,15, O — 34,50, Cl — 1,60).

W widmie absorpcyjnym w nadfiolecie czynnika A-35512-B występuje maksimum w kwaśnym i obojętnym metanolu przy 282 nm ($\epsilon = 15.000$)

i w zasadowym metanolu przy 292 nm ($\epsilon = 16.000$), przy czym molarny współczynnik ekstynkcyj obliczono dla ciężaru cząsteczkowego 2000. W widmie w nadfiolecie występuje także pasmo absorpcji końcowej przy 225 nm.

Czynnik A-35512-B wykazuje następujące wartości skręcalności właściwej: $[\alpha]_D^{25} = -123^\circ$ ($c = 1$, woda) oraz $[\alpha]_{365}^{25} = -446^\circ$ ($c = 1$, woda).

Miareczkowanie elektrometryczne czynnika A-35512-B w 66% roztworze wodnym dwumetyloformamidu wskazuje na obecność czterech dających się miareczkować grup o wartościach pK_a około 7,15, 8,81, 10,20, 12,00 i możliwą obecność grupy o pK_a wyższym niż 13,50. Prawdopodobny ciężar cząsteczkowy czynnika A-35512-B wynosi według miareczkowania około 2143.

Dwuchlorowodorek czynnika A-35512-B jest po krystalizacji z 50% roztworu wodnego metanolu białą krystaliczną substancją. Chociaż dwuchlorowodorek czynnika A-35512-B jest higroskopijny i nie posiada wyraźnej temperatury topnienia, to termogram wykazuje ubytek wagi rozpoczynający się od temperatury $25^\circ C$ i wyrażający się 7,4% straty w temperaturze $121^\circ C$ i rozkładem w temperaturze $135^\circ C$.

Dwuchlorowodorek czynnika A-35512-B ma następujący skład elementarny: C — 52,57%, H — 4,80%, N — 5,66%, O — 32,86%, Cl — 4,51%.

Powyższe wyniki analizy elementarnej są w szczególności zgodne z innym alternatywnym wzorem empirycznym $C_{98}H_{103}N_8O_{47}Cl \cdot 2HCl$ (obliczono: C — 51,93, H — 4,65, N — 5,57, O — 33,20, Cl — 4,65).

W widmie absorpcyjnym w nadfiolecie dwuchlorowodoru czynnika A-35512-B występuje maksimum w kwaśnym i obojętnym metanolu przy 282 nm ($\epsilon = 12.000$) i w zasadowym metanolu przy 292 nm ($\epsilon = 14.000$), przy czym molarny współczynnik ekstynkcyj obliczono dla ciężaru cząsteczkowego 2000. W widmie w nadfiolecie występuje także pasmo absorpcji końcowej przy 225 nm.

Dwuchlorowodorek czynnika A-35512-B wykazuje następujące wartości skręcalności właściwej: $[\alpha]_D^{25} = -128^\circ$ ($c = 1$, woda) i $[\alpha]_{365}^{25} = -475^\circ$ ($c = 1$, woda).

Miareczkowanie elektrometryczne dwuchlorowodoru czynnika A-35512-B w 66% roztworze wodnym dwumetyloformamidu wskazuje na obecność czterech dających się miareczkować grup o wartościach pK_a około 7,15, 8,87, 10,30 i 12,10 i możliwą obecność grupy o pK_a wyższym niż 13,1.

Prawdopodobny ciężar cząsteczkowy dwuchlorowodoru czynnika A-35512-B wynosi na podstawie miareczkowania około 2027.

W widmie magnetycznym rezonansu jądrowego węgla ^{13}C dwuchlorowodoru czynnika A-35512-B, wykonanym w D_2O , występują następujące sygnały zestawione w tablicy 1.

Tablica 1

Nr	ppm	wysokość (%)
2	173,0	4,1
3	171,9	3,7
4	171,6	3,3
5	171,0	5,8
6	170,8	5,0
7	169,6	3,6
8	159,0	4,1
9	157,9	4,4
10	157,5	3,7
11	156,6	4,8
12	155,6	6,1
13	155,3	4,2
14	154,9	3,3
15	154,3	4,2
16	151,7	3,3
17	144,3	3,1
18	136,7	3,5
19	136,2	4,9
20	135,4	4,0
21	135,2	4,4
22	133,6	4,2
23	133,3	4,1
24	129,8	1,7
25	129,3	3,0
26	128,8	2,6
27	127,6	1,5
28	126,1	3,9
29	124,2	5,6
30	122,4	1,4
31	122,0	4,4
32	120,7	3,3
33	116,5	2,7
34	109,5	0,8
35	108,2	1,1
36	107,7	2,7
37	104,5	1,7
38	101,8	2,9
39	100,9	1,6
40	98,2	1,0
41	76,9	1,2
42	76,1	1,8
43	74,1	2,0
44	73,5	2,7
45	72,7	2,4
46	72,3	4,0
47	71,0	7,1
48	70,3	2,5
49	69,7	2,5
50	67,4	74,7*
51	64,6	1,2
52	62,0	1,5
53	58,0	1,3
54	56,8	1,7
55	55,4	3,9
56	54,3	2,5
57	24,5	2,0
58	17,9	3,0
59	17,2	2,0
60	16,3	2,5

* Sygnał stosowanego jako standard dioksanu

Dwuchlorowodorek czynnika A-35512-B, krystalizowany z mieszaniny metanol-woda, posiada następujące widmo rentgenowskie wykonane metodą proszkową (promieniowanie Cu^{++} , 1,5405 Å, filtr niklowy, d oznacza odległości międzypłaszczyznowe w angstrmach) o charakterystyce przedstawionej w tablicy 2.

Tablica 2

	d	względne natężenie
15	17,15	100
	12,90	80
20	10,85	70
	9,25	70
	8,87	60
25	8,22	50
	7,86	50
	6,93	40
30	6,20	40
	5,62	40
	5,04	05
35	4,02	02
	3,54	02

Widmo w podczerwieni dwuchlorowodoru czynnika A-35512-B wykonane w tabletkach z bromku potasowego, przedstawia fig. 2. Ważniejsze pasma absorpcji występują przy następujących częstotliwościach (cm^{-1}): 3420 (silne), 3300 (przegięcie), 2950 (słabe), 1725 (słabe), 1675 (silne), 1630 (przegięcie), 1605 (silne), 1520 (silne), 1470 (słabe), 1440 (słabe), 1410 (słabe), 1345 (przegięcie), 1312 (średnie), 1225 (średnie), 1180 (słabe), 1135 (słabe), 1080 (silne) i 1020 (słabe).

Analiza aminokwasowa hydrolizowanego kwasem dwuchlorowodoru czynnika A-35512-B wykazuje, że czynnik ten zawiera co najmniej pięć reszt aminokwasów, jednym z których jest glicyna. Cztery pozostałe reszty aminokwasowe czynnika A-35512-B tworzą kompleks i wydają się być identyczne ze znalezionymi w czynieku A-35512-A. Jedna z tych reszt aminokwasowych ma prawdopodobnie budowę określoną wzorem przedstawionym na rysunku.

Analiza produktów hydrolizy kwaśnej wskazuje, że dwuchlorowodorek czynnika A-35512-B zawiera następujące cukry: glukoza, fukoza, mannoza, ramnoza i 3-amino-2,3,6-trójdoksy-3-C-metylo-L-ksyloheksopiranoza.

W wyniku łagodnej hydrolizy kwaśnej zostają usunięte glukoza, fukoza, mannoza oraz ramnoza i otrzymuje się charakterystyczną pochodną aglikonową.

Dwuchlorowodorek czynnika A-35512-B posiada co najmniej jedną dającą się estryfikować grupę hydroksylową.

Dwuchlorowodorek czynnika A-35512-B jest rozpuszczalny w wodzie, częściowo rozpuszczalny w alkoholach, takich jak metanol i etanol, i nierozpuszczalny w innych mniej polarnych rozpuszczalnikach organicznych, takich jak benzen, chloroform, aceton, eter dwuetylowy, octan etylu, toluen, heksan, acetonitryl i dioksan.

Dwuchlorowodorek czynnika A-35512-B jest trwały nawet w ciągu 72 godzin w wodnych roztworach o pH od około 3 do około 10.

Aglikon czynnika A-35512-B.

Chlorowodorek aglikonu czynnika A-35512-B jest białą, bezpostaciową substancją o następującym przybliżonym składzie elementarnym: C — 54,29%, H — 4,34%, N — 7,40%, Cl — 5,02%, O — 28,95% (z różnicy).

Widmo w podczerwieni chlorowodoru aglikonu czynnika A-35512-B przedstawia fig. 1. Widmo wykonane w zawiesinie w oleju parafinowym. Najważniejsze pasma absorpcji występują przy następujących częstotliwościach (cm^{-1}): 3440 (przebiegięcie), 3340 (przebiegięcie), 3215 (silne), 2950 (przebiegięcie), 2910 (silne), 2840 (silne), 2640 (przebiegięcie), 1735 (słabe), 1655 (silne), 1590 (średnie), 1500 (silne), 1460 (silne), 1378 (średnie), 1365 (przebiegięcie), 1298 (średnie), 1215 (średnie), 1155 (średnie), 1120 (przebiegięcie), 1105 (słabe), 1060 (słabe), 1040 (słabe), 1008 (średnie), 925 (słabe), 875 (słabe), 765 (przebiegięcie), i 718 (słabe).

Miareczkowanie elektrometryczne chlorowodoru aglikonu czynnika A-35512-B w 60% roztworze wodnym dwumetyloformamidu wskazuje na obecność trzech dających się miareczkować grup o wartościach pK_a około 7,5, 9,25 i 11,0 i możliwą obecność dalszych dwóch grup o wartościach pK_a powyżej 11,0.

Prawdopodobny ciężar cząsteczkowy chlorowodoru aglikonu czynnika A-35512-B, obliczony na podstawie miareczkowania, wynosi około 1282.

Chlorowodorek aglikonu czynnika A-35512-B wykazuje następujące wartości skręcalności właściwej: $[\alpha]_D^{25} = -178^\circ$ ($c = 5$, metanol) i $[\alpha]_{365}^{25} = -716,8^\circ$ ($c = 5$, metanol).

W widmie absorpcyjnym w nadfiolecie chlorowodoru aglikonu czynnika A-35512-B występuje maksimum w obojętnym i kwaśnym metanolu przy 282 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 102,62$) oraz maksimum w zasadowym metanolu przy 302 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 182,09$).

W widmie magnetycznego rezonansu jądrowego węgla ^{13}C aglikonu czynnika A-35512-B, wykonanym w dwumetylosulfotlenku- d_6 w temperaturze 90°C , występują następujące sygnały zestawione w tablicy 3.

Tablica 3

Nr	ppm	wysokość (%)
1	187,8	37,2
2	172,0	40,9
3	170,7	45,2
4	170,1	46,9
5	169,6	47,7
6	168,4	57,6
7	166,7	52,5
8	157,4	49,9
9	156,6	45,5
10	155,7	55,8
11	155,6	71,5
12	155,4	56,7
13	154,3	50,5
14	149,3	43,0
15	138,8	38,8
16	136,9	54,3
17	136,3	40,2
18	135,2	31,7
19	134,7	28,4
20	133,8	40,9
21	128,2	102,9
22	126,2	77,2
23	123,0	57,5
24	121,3	38,1
25	117,7	44,4
26	117,0	31,5
27	108,6	31,0
28	106,7	47,9
29	105,7	81,2
30	103,2	26,5
31	93,6	33,4
32	74,9	39,8
33	71,8	33,9
34	68,9	40,2
35	63,2	43,1
36	60,4	33,6
37	57,1	57,8
38	55,2	33,1
39	53,2	30,1
40	51,8	36,0
41	40,7	43,4*
42	39,9	60,9*
43	39,1	43,9*
44	23,8	55,7
45	17,1	47,8
46	0,0	43,7

*) Sygnał dwumetylosulfotlenku- d_6

Widmo magnetycznego rezonansu jądrowego węgla ^{13}C wykazuje, że w aglikonie czynnika A-35512-B znajduje się w dalszym ciągu 2-amino-2,3,6-trójdoksy-3-C-metylo-L-ksylo-heksozonoza, jeden z cukrów, znajdujących się w cząsteczce czynnika A-35512-B.

Analiza aminokwasowa poddanego dalszej kwaśnej hydrolizie chlorowodoru aglikonu czynnika A-35512-B wykazuje, że aglikon ten zawiera glicynę i co najmniej trzy reszty aminokwasowe.

Jedna z tych reszt aminokwasowych posiada prawdopodobnie budowę określoną wzorem przedstawionym na rysunku.

Chlorowodorek aglikonu czynnika A-35512-B posiada co najmniej jedną dającą się estryfikować grupę hydroksylową.

Chlorowodorek aglikonu czynnika A-35512-B jest rozpuszczalny w wodzie i w metanolu ale nierozpuszczalny w mniej polarnych rozpuszczalnikach organicznych, takich jak benzen, chloroform, aceton, eter etylowy, octan etylu, toluen, heksan, acetonitryl i dioksan.

Wartość R_f chlorowodoru aglikonu czynnika A-35512-B wynosi 0,80, podczas chromatografii cienkowarstwowej na celulozie i rozwijaniu mieszaniną n-butanolu, pirydyny, kwasu octowego i wody (15:10:3:12). Korzystnym sposobem wywoływania jest bioautografia z zastosowaniem *Sarcina Lutea*.

Wartość R_f chlorowodoru aglikonu czynnika A-35512-B podczas chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym i rozwijania mieszaniną metanolu, chloroformu i stężonego NH_4OH (3:2:1) wynosi 0,26.

Aglikon czynnika A-35512-B (wolna zasada) jest białą, bezpostaciową substancją o następującym przybliżonym składzie elementarnym: C — 52,65%, H — 4,57%, N — 6,81%, Cl — 2,94%, O — 27,04%, pozostałe — 4,70%.

W widmie w podczerwieni aglikonu czynnika A-35512-B (wolnej zasady), w tabletkach z bromku potasowego, występują ważniejsze maksima absorpcji przy następujących częstotliwościach (cm^{-1}): 3360 (silne), 3260 (przebiegłe), 2940 (przebiegłe), 1735 (przebiegłe), 1660 (silne), 1598 (średnie), 1510 (silne), 1440 (średnie), 1295 (słabe), 1215 (średnie), 1165 (średnie), 1122 (słabe), 1070 (słabe), 1018 (silne), 940 (słabe) i 820 (słabe).

Miareczkowanie elektrometryczne aglikonu czynnika A-35512-B (wolnej zasady) w 66% roztworze wodnym dwumetyloformamidu wskazuje na obecność pięciu dających się miareczkować grup o wartościach pK_a około 6,2, 8,2, 10,1, 11,4 i 12,4 i możliwą obecność dalszych jednej lub dwóch grup o wartościach wyższych niż 12,5.

Aglikon czynnika A-35512-B (wolna zasada) posiada skręcalność właściwą $[\alpha]_D^{25} = -64,5^\circ$ ($c=3$, dwumetylosulfotlenek).

W widmie absorpcyjnym w nadfiolecie aglikonu czynnika A-35512-B (wolnej zasady), występuje maksimum absorpcji w obojętnym i kwaśnym metanolu przy 282 nm ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 43,65$) oraz maksimum w zasadowym metanolu przy 301 nm ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 87,48$).

Przybliżone wartości R_f aglikonu czynnika A-35512-B (wolnej zasady) są takie same jak opisane uprzednio dla chlorowodoru.

Poza wolną zasadą i chlorowodorkiem aglikonu czynnika A-35512-B, aglikonu czynnika A-35512 można otrzymać w postaci dopuszczalnych w farmacji addycyjnych soli z kwasami. Określenie „dopuszczalne w farmacji” oznacza sole, których toksyczność wobec zwierząt ciepłokrwistych nie przekracza toksyczności wolnych czynników A-35512. Odpowiednimi i reprezentatywnymi solami agli-

konu czynnika A-35512-B są sole otrzymywane w typowej reakcji z kwasami organicznymi i nieorganicznymi, takimi jak siarkowy, fosforowy, octowy, bursztynowy, cytrynowy, mlekowy, maleinowy, fumarowy, palmitynowy, cholewowy, pamowy, mukowy, D-glutaminowy, d-kamforowy, glutarowy, glikolowy, ftalowy, winowy, laurylowy, stearynowy, salicylowy, metanosulfonowy, benzenosulfonowy, sorbinowy, pikrynowy, benzoowy, cynamonowy i podobne.

Antybiotyki A-35512 wytwarza się podczas hodowania, wytwarzającego A-35512, szczepu *Streptomyces candidus* NRRL 8156, w warunkach fermentacji podpowierzchniowej, z napowietrzaniem, w odpowiedniej pożywce, prowadzonej aż do otrzymania znacznej ilości antybiotyków. Antybiotyki wyodrębnia się za pomocą różnych technik izolacji i oczyszczania, stosowanych w procesach fermentacyjnych.

Nowy drożdżoustrój stosowany dla wytwarzania antybiotyków A-35512 został wyizolowany z próbek gleby zebranej na atolu Eniwetok. Drożdżoustrój został sklasyfikowany jako nowy szczep *Streptomyces candidus* (Krassilnikov) Waksmana, zgodnie z opisem E. B. Shirlinga i D. Gottlieba w „Cooperative Description of Type Cultures of Streptomyces. II. Species Descriptions from Second Study”. Intern. J. Systematic Bacteriol., 18 (4). 279—302 (1968) i S.A. Waksmana „The Actinomycetes. Vol. 2 Classification, Identification, and Descriptions of Genera and Species”, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1961.

Klasyfikacja powyższa oparta jest na metodach zalecanych przez International Streptomyces Projekt (E.B. Shirling i D. Gottlieb, „Methods for Characterization of Streptomyces Species”, Intern. Bull. Systematic Bacteriol., 16, 313—340, 1966), oraz na innych uzupełniających testach. Barwy opisywane zgodnie z metodą ISCC-NBS, według K. L. Kelly’ego i D. B. Judde, „The ISCC-NBS Method of Determining Colors and a Dictionary of Color Names”, U.S. Department of Commerce Cir. 533, Washington, D. C., 1955.

Symbole w nawiasach zwykłych odnoszą się do serii barw według Trešniera i Backusa (H. D. Trešnier i S. J. Backus, „System of Color Wheels for Streptomyces Taxonomy”. Appl. Microbiol., 11, 335—338, 1963), a oznaczenia barw z tablic są podkreślone. W nawiasach kwadratowych podano symbole barw według Maerza i Paula (A. Maerz i M. R. Paul, „Dictionary of Color”, McGraw-Hill, New York, N. Y., 1950). Hodowlę prowadzono w temperaturze 30°C , w ciągu 14 dni, jeśli nie podano inaczej.

Charakterystyka szczepu wytwarzającego antybiotyki A-35512. Morfologia.

Wytwarzane są długie, faliste sporofory. Spory łączące się w łańcuchy zawierające 10—50 jednostek, mają kształt cylindryczny i wymiary 0,7 do $1,05 \times 1,4$ do 3,5 mikronów. Na różnych pożywkach wytwarzane są struktury przetrwalnikopodobne. W niektórych przypadkach obserwuje się rozwidlenie lub ułożone w wiązki strzępki. Po-

wierzchnia zarodników, obserwowana pod mikroskopem elektronowym jest gładka.

Charakterystyki hodowlane na różnych pożywkach przedstawia tablica 4.

Tablica 4

Pożywka	Charakterystyka
1	2
ISP nr 2 (agar z wyciągiem drożdżowym i wyciągiem słodowym)	Wzrost obfity, spód szarawo-żółty (11J5), obfita grzybnia powietrzna i zarodnikowanie, biała (w) a; brak rozpuszczalnych pigmentów
ISP nr 3 (agar z mąką owsianą)	Wzrost umiarkowany, spód blado-żółto-zielony (10B1); ładna grzybnia powietrzna i zarodnikowanie, biała (w) 13ba; brak rozpuszczalnych pigmentów, obserwuje się ciała przetrwalnikowopodobne.
ISP nr 4 (agar skrobiowy z solami nieorganicznymi)	Wzrost dobry; spód bursztynowo-biały (10C1), dobra grzybnia powietrzna i zarodnikowanie, żółtawo-szara (GY) 2dc; lekko-brązowe rozpuszczalne pigmenty; obserwuje się ciała przetrwalnikowopodobne
ISP nr 5 (agar asparaginowy z gliceryną)	Wzrost dobry; spód bladożółto-zielony (10B2); dobra grzybnia powietrzna i zarodnikowania, biała (w) a; brak pigmentów rozpuszczalnych; grzybnia wydaje się być ułożona w wiązki.
Agar Emersona	Wzrost dobry; spód lekkooliwkowy (14L6); brak grzybni powietrznej i zarodnikowania; lekko-brązowe rozpuszczalne pigmenty.
Zmodyfikowany agar Bennetta	Wzrost obfity; spód umiarkowanie żółty (11J6); obfita grzybnia powietrzna i zarodnikowanie, biała (w) a; brak rozpuszczalnych pigmentów.

c.d. tablicy 4

1	2
Agar Czapek'a	Wzrost dobry; spód bladożółtozielony (10B1); dobra grzybnia powietrzna i zarodnikowanie, biała (w) b; brak rozpuszczalnych pigmentów; grzybnia wydaje się być ułożona w wiązki.
Agar z pastą pomidorową i mąką owsianą	Wzrost obfity; spód szarawożółty (11I5); obfita grzybnia powietrzna i zarodnikowanie, biała (w) a; grzybnia „stacza się” z powierzchni agaru; brak rozpuszczalnych pigmentów.
Agar odżywczy	Wzrost umiarkowany do dobrego; spód bladożółto-zielony (18D2); dobra grzybnia powietrzna i zarodnikowanie, biała (w) a; lekko brązowe rozpuszczalne pigmenty.
Agar asparaginowy z glukozą	Wzrost dobry; spód bladożółtozielony (17E1); dobra grzybnia powietrzna i zarodnikowanie, biała (w) 13ba; brak rozpuszczalnych pigmentów.
Agar z tryptonem i wyciągiem drożdżowym	Wzrost wyraźny; spód biały (10A1); wyraźna grzybnia powietrzna i zarodnikowanie, biała (w) b; brak rozpuszczalnych pigmentów.
Agar tyrozynowy	Wzrost dobry, spód biały (10B2); dobra grzybnia powietrzna i zarodnikowanie, biała (w) e; brązowe rozpuszczalne pigmenty; obserwuje się ciała przetrwalnikowopodobne.
Agar z gliceryną i glicyną	Wzrost dobry; spód biały (10B2); dobra grzybnia powietrzna i zarodnikowanie, biała (w) b; brak pigmentów rozpuszczalnych.

c.d. tablicy 4

1	2
Agar z jableczanem wapnia	Wzrost dobry; spód biały (10B1); dobra grzybnia powietrzna i zarodnikowanie, biała (w) a; brak rozpuszczalnych pigmentów; podłoże staje się przezroczyste wokół zakażonej powierzchni.

Drobnoustroj badano pod względem wybranych właściwości fizjologicznych, stosując standardowe postępowanie. Stwierdzono następujące właściwości podane w tablicy 5.

Tablica 5

Obserwowana właściwość	Charakterystyka
Działanie na mleko	Koagulacja z pewnymi przejaśnieniami w ciągu 14 dni
Redukcja azotanów	Zachodzi
Wytwarzanie pigmentu maleinowego na: skosach z agaru żelazowego z peptonem; skosach z agaru tyrozynowego, pożywkę zawierającą trypton i wyciąg drożdżowy	brak słabe wytwarzanie pigmentów po 7 dniach; brak;
Upłynnianie żelatyny	Całkowite w ciągu 14 dni
Wymagania temperaturowe (pożywka ISP nr 2 — skosy z wyciągiem drożdżowym i słodowym)	26—30°C — wzrost dobry i zarodnikowanie 37°C — słaby wzrost; brak grzybni powietrznej i zarodników 40°C — słaby wzrost wegetatywny 45°C — brak wzrostu.

W tablicy 6 przedstawiono wyniki testów na przyswajanie węgla przez drobnoustroje NRRL 8156. Znaczenie użytych symboli jest następujące:

- + — wzrost dobry, przyswajanie
- (+) — wzrost ubogi do wyraźnego
- (—) — wzrost słaby, prawdopodobnie brak przyswajania
- — brak wzrostu, brak przyswajania

Tablica 6

	Źródło węgla	Oznaczenie
5	Brak (negatywna próba kontrolna)	(—)
	D-glukoza (pozytywna próba kontrolna)	+
10	L-arabinoza	(—)
	Sacharoza	(—)
	i-Inozyt	+
	D-mannit	+
	D-fruktoza	+
15	Ramnoza	(—)
	Rafinoza	(—)
	D-ksyloza	(+)

Niektóre cechy charakterystyczne szczepu *S. candidus* NRRL 8156, wytwarzającego antybiotyki A-35512, różnią się od cech drobnoustroju opisanego przez Elwooda B. Shirlinga i Davida Cottlieba w „Cooperative Description of Type Cultures of Streptomyces III. Additional Species Descriptions from First and Second Studies”, Intern. J. Systematic Bacteriol., 18, (2), 69—189 (1968) oraz przez Waksmana S. A. w „The Actinomycetes. Classification, Identifications and Descriptions of Genera and Species”, Vol. 2, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Ed., 1961.

Różnice powyższe zestawiono w tablicy 7.

Tablica 7

	NRRL 8156	Opublikowany opis
35	Przyswajanie węgla	
40	L-arabinoza	—
	Ramnoza	—
	i-Inozyt	+
	Upłynnianie żelatyny	Całkowite w ciągu 14 dni
45	Działanie na mleko	Koagulacja z pewnymi przejaśnieniami w ciągu 14 dni

Szczep *Streptomyces candidus* wytwarzający antybiotyki A-35512 został zdeponowany w kolekcji szczepów Northern Regional Research Center, U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Peoria, Illinois, 61604, z której to kolekcji jest powszechnie dostępny pod numerem NRRL 8156.

Jako pożywki wzrostowe dla *Streptomyces candidus* NRRL 8156 można stosować którekolwiek z wielu możliwych. Jednak ze względów ekonomicznych oraz ze względu na optymalną wydajność i łatwość izolowania produktu, korzystne są niektóre pożywki hodowlane. Na przykład korzystnym środkiem węglowodanów w produkcji na skalę przemysłową jest sacharoza, chociaż można

stosować również glukozę, dekatrinę z tapioki, fruktozę, mannit, maltozę, laktozę i podobne.

Korzystnym źródłem azotu jest rozpuszczalny pepton mięsny, ale również można stosować mąkę sojową, mączkę mięsną, aminokwasy, takie jak kwas glutaminowy i podobne produkty. Do odżywczych soli nieorganicznych wchodzących w skład pożywek należą handlowe rozpuszczalne sole, będące źródłem cynku, sodu, magnezu, wapnia, amonu, chloru, węglanów, siarczanów, azotanów i podobnych jonów.

W skład pożywki mogą również wchodzić podstawowe pierwiastki śladowe niezbędne dla wzrostu i rozwoju drobnoustroju. Pierwiastki takie zazwyczaj znajdują się jako zanieczyszczenia w innych składnikach pożywki, w ilościach wystarczających dla zaspokojenia potrzeb wzrostowych drobnoustroju.

W razie potrzeby dodaje się małą ilość (0,2 ml/100 ml) środka przeciwpiennego, takiego jak glikol polipropyleńowy, jeśli podczas fermentacji w dużej skali pienienie staje się problemem.

Dla wytwarzania znacznych ilości antybiotyków A-35512 korzystna jest fermentacja podpowierzchniowa z napowietrzaniem. Małe ilości antybiotyków A-35512 można otrzymywać w hodowli w kolbach na trzęsawkach. Ze względu na opóźnienie w wytwarzaniu antybiotyków, związane na ogół ze szczerpieniem dużych fermentorów zarodnikującą postacią drobnoustroju, korzystnie jest stosowanie inokulumu wegetatywnego.

Inokulum wegetatywne przyrządza się zaszczepiając małą objętość pożywki hodowlanej formami zarodnikującymi lub fragmentami grzybni drobnoustroju, w celu otrzymania świeżej, aktywnie wzrastającej hodowli drobnoustroju. Inokulum wegetatywne przenosi się następnie do większych fermentorów.

Drobnoustroj wytwarzający antybiotyki A-35512 można hodować w zakresie temperatur około 20–40°C. Optymalną wydajność wytwarzania antybiotyków A-35512 osiąga się w temperaturze 30–34°C.

Jak to zwykle ma miejsce w hodowli podpowierzchniowej z napowietrzaniem, przez pożywkę przetłacza się jałowe powietrze.

W celu uzyskania wydajnego wzrostu drobnoustroju w fermentorach przemysłowych, przez pożywkę przepuszczają się korzystnie powyżej 0,1 objętości powietrza na minutę na jedną objętość pożywki. Dla uzyskania wydajnego wytwarzania antybiotyków A-35512 korzystnie jest przepuszczać około 0,25 objętości powietrza na minutę na jedną objętość pożywki.

Proces wytwarzania antybiotyków A-35512 podczas fermentacji może być kontrolowany za pomocą analizowania próbek brzożki lub ekstraktów grzybni na zawartość antybiotyku.

Do testowania stosuje się drobnoustroj, o którym wiadomo, że jest wrażliwy na wytwarzane antybiotyki. Do takich drobnoustrojów należy *Bacillus subtilis* ATCC 6033. Oznaczenie biologiczne prowadzi się korzystnie przy użyciu krąków

bibułowych na płytkach z agarem zawierającym ubogi w składniki odżywcze agar.

Po zakończeniu fermentacji antybiotyki A-35512 można wyodrębnić z brzożki fermentacyjnej za pomocą znanych w praktyce sposobów. Antybiotyki wytwarzane w procesie fermentacji drobnoustroju wytwarzającego A-35512 znajdują się prawie wyłącznie w przesączu brzożki.

Stąd też, najlepszą wydajność izolacji antybiotyków A-35512 uzyskuje się odsączając najpierw masę grzybni. Przesączoną brzożkę można oczyszczać dla uzyskania mieszaniny A-35512, stosując rozmaite sposoby. Korzystna metoda polega na adsorpcji na kolumnie z poliamidem i następnie elucji wodą i wodnym roztworem alkoholu. Frakcje eluatu zawierające antybiotyki łączą się i otrzymuje mieszaninę A-35512. Można również za pomocą takiej samej techniki łączyć poszczególne frakcje na podstawie wyników chromatografii cienkowarstwowej i otrzymywać oczyszczony czynnik A-35512-B i wzbogacone mieszaniny pozostałych czynników A-35512.

Dalsze oczyszczanie poszczególnych czynników A-35512 polega na dodatkowej adsorpcji i elucji. Jako materiały adsorbcyjne można z powodzeniem stosować tlenek glinu, żel krzemionkowy, wymieniacze jonowe i podobne.

Czynniki A-35512 występują w brzożce fermentacyjnej w postaci chlorowodorów. W korzystnym sposobie rozdzielu na materiale poliamidowym otrzymuje się czynnik A-35512 i mieszaninę pozostałych czynników w postaci chlorowodorów. Każdy z poszczególnych czynników można przekształcać w wolną zasadę nie zawierającą chloru jonowego, stosując na przykład chromatografię na słabo zasadowym wyłnieniu jonowym.

Alternatywnie, stałe składniki hodowli, w tym składniki pożywki i grzybnie można stosować jako źródło antybiotyków A-35512, z pominięciem operacji ekstrakcji lub rozdzielania, ale korzystnie po usunięciu wody. Na przykład po zakończeniu fermentacji brzożkę zawierającą antybiotyki A-35512 można liofilizować i stosować bezpośrednio jako domieszkę do past.

Aglikon czynnika A-35512-B wytwarza się na drodze łagodnej kwaśnej hydrolizy czynnika A-35512-B, który to czynnik najłatwiej jest otrzymać w postaci dwuchlorowodoru.

Stąd też dwuchlorowodorek czynnika A-35512-B jest korzystnym materiałem wyjściowym do wytwarzania aglikonu czynnika A-35512-B. Można do tego celu stosować wolny czynnik A-35512-B lub inną jego addycyjną sól kwasową. Hydrolizę kwaśną prowadzi się stosując znane sposoby postępowania.

Chociaż można do tego celu stosować wiele różnych kwasów, to korzystnym jest kwas solny. Jeśli stosuje się kwas solny to aglikon czynnika A-35512-B otrzymuje się w postaci chlorowodoru. Hydrolizę korzystnie prowadzi się w wodzie, w temperaturze wrzenia — w ciągu od około 1 do około 2 godzin. Dłuższy czas reakcji prowadzi do degradacji aglikonu, w wyniku której otrzymuje się mniej aktywne, a w końcu nieaktywne

produkty. Optymalny czas dla specyficznych warunków reakcji można wyznaczać za pomocą analizowania mieszaniny reakcyjnej na aktywność biologiczną.

W tabelicy 8 podano aktywność aglikonu czynnika A-35512-B oznaczoną metodą dyfuzji w agar. Test wykonano umieszczając na płytkach agarowych zakażonych badanym drobnoustrojem krążki bibułowe o średnicy 6 mm zanurzone uprzednio w roztworze zawierającym testowy związek w stężeniu 1 mg/ml.

Tabela 8

Drobnoustrój testowy	Wielkość strefy zahamowania (w mm) aglikonu czynnika A-35512-B w 1% wodnej zasady
<i>Staphylococcus aureus</i>	19
<i>Bacillus subtilis</i>	13
<i>Saroina lutea</i>	14
<i>Bacillus subtilis</i> *	22

*) Na ubogim w składniki odżywcze agarze.

W tabelicy 9 zestawiono najmniejsze stężenia hamujące (MIC), obrazujące aktywność chlorowodoru aglikonu czynnika A-35512-B wobec wybranych szczepów *Staphylococcus aureus*, w standardowym teście rozcieńczeniowym na agarze.

Tabela 9

Drobnoustrój testowy	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Staphylococcus aureus</i> 3055 *	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> H290 *	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> V92 *	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> V104 *	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i> 3074 **	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i> H43 **	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> V57 **	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> H356 **	1,0
<i>Staphylococcus aureus</i> 3730 ***	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> 3131 ****	0,5

*) wrażliwy na penicylinę G

**) oporny na penicylinę G

*** oporny na penicylinę G i metycylinę

**** oporny na penicylinę G, metycylinę i klinedamycynę

W tabelicy 10 podano wyniki dodatkowego testu rozcieńczeniowego na agarze obrazujące aktywność chlorowodoru aglikonu czynnika A-35512-B wobec różnych szczepów *Streptococci* Grupy D.

Tabela 10

Drobnoustrój testowy	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Streptococcus</i> sp. Shrigley	1,0
<i>Streptococcus</i> sp. Mitis	1,0
<i>Streptococcus</i> sp. 12253F	1,0
<i>Streptococcus</i> sp. SS992	1,0
<i>Streptococcus</i> sp. 9933	1,0
<i>Streptococcus</i> sp. 9913	1,0
<i>Streptococcus</i> sp. 292	1,0
<i>Streptococcus</i> sp. 238	1,0

Aglikon czynnika A-35512-B wykazuje in vivo aktywność przeciwbakteryjną wobec wywołanych doświadczalnie infekcji bakteryjnych. Zakażonym myszom podawano dwie dawki podskórne chlorowodoru aglikonu czynnika A-35512-B i obserwowaną aktywność oznaczano jako ED₅₀. Uzyskane wartości ED₅₀ dla chlorowodoru czynnika A-35512-B podane są w tabelicy 11.

Tabela 11

Drobnoustrój testowy	ED ₅₀	Natężenie infekcji (dootrzewnowo)
<i>Streptococcus pyogenes</i> C203	5,8	1570 × LD ₅₀
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	7,0	374 × LD ₅₀
<i>Staphylococcus aureus</i> 3055	1,04	370 × LD ₅₀

Antybiotyki A-35512 są względnie nietoksyczne, na przykład LD₅₀ dla dwuchlorowodoru czynnika A-35512-B przy podawaniu dootrzewnowym myszom wynosi około 1356 mg/kg, a przy podawaniu dożylnym 1000–1250 mg/kg.

Inną cenną właściwością mieszaniny A-35512 i jej składników jest zdolność zwiększania wydajności karmienia u zwierząt. Stwierdzono to na przykładzie zwierząt przeżuujących, posiadających rozwiniętą funkcję żwacza.

Wiadomo jest, że wydajność przyswajania węglowodanów u przeżuujących wzrasta w wyniku działania, które stymuluje wytwarzanie przez florę bakteryjną żwacza propionianów zamiast octanów lub maślanów. Zostało to szczegółowo opisane przez Churcha i współpracowników w „Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants”, tom 2, 1971, str. 622 i 625.

Wydajność paszy może być określana w testach in vivo u bydła z założoną przetoką, przy zastosowaniu sposobu podanego przez Arthura P. Rauna w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3794732, zwłaszcza w przykładzie VIII. W tabelicy 12 przedstawiono wyniki takiego testu dla dwuchlorowodoru czynnika A-35512-B. Podane stężenie kwasu propionowego w żwaczu jest

średnim z pięciu analiz przeprowadzonych w ciągu 21 dni.

Tablica 12

	Ilość zwierząt	Średni procent molo- wy kwasu propiono- wego	Procent molewy wzrostu w stosunku do próby kontrolnej
Próba kontrolna	5	19,3	—
Próba z czynnikiem A-35512-B (50 g/tonę)	5	26,0	6,7

Mieszanina A-35512 i jej składniki zwiększają stężenie propionianów i tym samym wydajność paszy przy podawaniu przeżuwającym w dawkach dziennych 0,15—10,0 mg/kg. Lepsze wyniki osiąga się przy podawaniu w dawkach 1,0—2,0 mg/kg/dzień.

Korzystnym sposobem podawania mieszaniny A-35512 lub poszczególnego związku jest mieszanie ich z paszą dla zwierząt. Antybiotyki te mogą być również podawane w inny sposób, na przykład w postaci tabletek, wlewów do gardła lub kapsułek. Powyższe formy farmaceutyczne przygotowuje się sposobami dobrze znanymi w farmacji leków weterynaryjnych. Każda pojedyncza dawka leku powinna zawierać mieszaninę A-35512 lub jej składnik w ilości odpowiadającej dziennej dawce podawanej zwierzęciu.

Mieszanina A-35512 i jej składniki są także użyteczne jako czynniki wzrostowe dla zwierząt.

Podane niżej przykłady ilustrują dokładniej sposób według wynalazku. Z przykładów tych, przykłady I—VI dotyczą wytwarzania substancji wyjściowych.

Przykład I. A. Fermentacja A-35512 w kolbach na trzęsawkach.

Liofilizowane pastylki *Streptomyces candidus* NRRL 8156 rozpuszcza się w 1—2 ml jałowej wody i zakaża roztworem skosy agarowe zawierające wyciąg drożdżowo-słodowy Bacto (ISP nr 2, produkcji Difco Laboratories, Detroit, Michigan).

Zakażone skosy inkubuje się w temperaturze 30°C, w ciągu około 7 dni. Dojrzałą hodowlę na skosach pokrywa się 2 ml wody i zdrapuje sterylną pipetą spory. Porcję 0,1 ml wodnej zawiesiny sporów stosuje się do zakażenia następnego skosu agarowego z pożywką ISP nr 2.

Zakażony skos inkubuje się w temperaturze 30°C w ciągu około 7 dni. Dojrzałą hodowlę na skosach pokrywa się 5 ml wody i zdrapuje spory sterylną pipetą. Porcję 2,5 ml otrzymanej zawiesiny sporów stosuje się do zakażenia 30 ml pożywki vegetatywnej o następującym składzie:

Składnik	Ilość
Pożywka tryptykazo-sojowa (Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, Md). Woda odmineralizowana	30 g do 1 litra

Zakażoną pożywkę vegetatywną inkubuje się w kolbach Erlenmayera o objętości 250 ml, w temperaturze 30°C, w ciągu 48 godzin, na trzęsawce obrotowej o 250 obrotach na minutę i wychyleniach 50 mm.

0,5 ml inkubowanej pożywki vegetatywnej stosuje się do zakażenia 50 ml pożywki produkcyjnej o następującym składzie:

Składnik	Ilość w g/litr
Dekstryna z tapioki	25,0
Glukoza	10,0
NH ₄ NO ₃	2,5
KCl	1,5
MgSO ₄	1,1
FeCl ₂ ·4H ₂ O	0,03
ZnCl ₂	0,03
KH ₂ PO ₄	0,1
Kwas L-glutaminowy	1,0
DL-citrulina	0,1
CaCO ₃	5,0
Woda odmineralizowana	do 1 litra

Zakażoną pożywkę produkcyjną inkubuje się w kolbach Erlenmayera o pojemności 250 ml, w temperaturze 32°C, w ciągu 8—10 dni, na trzęsawce obrotowej o 250 obrotach na minutę i wychyleniach 50 mm.

B. Fermentacja A-35512 w fermentorach.

W celu uzyskania większej ilości inokulum, 20 ml inkubowanej pożywki vegetatywnej, otrzymanej w sposób opisany powyżej stosuje się do zakażenia 400 ml wzrostowej pożywki vegetatywnej II etapu o składzie takim samym jak skład pożywki vegetatywnej. Pożywkę II etapu inkubuje się w kolbach o pojemności 2 litry, w ciągu 24 godzin, w temperaturze 32°C, na trzęsawce obrotowej o 250 obrotach na minutę i wychyleniach 50 mm.

800 ml pożywki vegetatywnej II etapu stosuje się do zakażenia 100 litrów jałowej pożywki produkcyjnej. Zakażoną pożywkę produkcyjną podaje się fermentacji w fermentorze o pojemności 165 litrów, w ciągu około 8—10 dni, w temperaturze 32°C. Zawartość fermentora napowietrza się stosując 0,25 objętości powietrza na minutę na objętość pożywki, oraz miesza stosując zwykłe mieszadło o 200 obrotach na minutę.

Przykład II. Inkubowaną pożywkę vegetatywną, przygotowaną w sposób podany w punkcie A, można ewentualnie przechowywać do póź-

niejszego użycia, utrzymując ją pod parami ciekłego azotu.

W tym celu, w próbówce o wymiarach 13 × 100 mm wyjalowanej i zaopatrzonej w przykrywkę śrubową, umieszcza się 2 ml zawiesiny środka rozpraszającego o następującym składzie:

Składnik	Ilość
Gliceryna	20%
Laktoza	10%
Woda odmineralizowana	70%

Do powyższej zawiesiny dodaje się 2 ml inkubowanej w ciągu 48 godzin hodowli vegetatywnej, przygotowanej w sposób opisany uprzednio. Mieszaninę zamraża się i przetrzymuje pod oparami w pojemniku zawierającym ciekły azot.

Przechowywane w taki sposób inokulum vegetatywne rozmraża się przed użyciem zanurzając fiolkę w łaźni wodnej o temperaturze 43°C. 1 ml rozmrożonego inokulum stosuje się do zakażenia 50 ml pożywki vegetatywnej o składzie podanym w punkcie A.

Zakażoną pożywkę vegetatywną stosuje się, jak to zostało wyżej opisane do fermentacji w kolbach na trzęsawkach lub dla uzyskania większej ilości inokulum do fermentacji w fermentorach.

Przykład III. Proces fermentacji prowadzi się w sposób opisany w przykładzie I, stosując pożywkę produkcyjną do hodowli w kolbach lub fermentorach o następującym składzie:

Składnik	Ilość (g/litr)
Dekstryna z tapioki	75,0
Melasa	40,0
Rozpuszczalny pepton mięsny	15,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
CaCO ₃	2,0
Woda	do 1,0 litra

Przykład IV. Izolacja mieszaniny antybiotyecznej A-35512.

Całość brzezki fermentacyjnej (946 litrów) otrzymanej w sposób opisany w przykładzie I, sący się stosując pomoc filtracyjną (ziemia okrzemkowa Hyflo Super-cel firmy Johns-Manville Products Corp.). Wartość pH brzezki wynosi 6,8—7,2. Klarowny przesącz przepuszcza się przez kolumnę zawierającą żywicę Amberlit XAD-4 (produkcji firmy Rohm and Haas Co.), stosując 10 ml żywicy na 100 ml przesączu brzezki. Kolejne frakcje bada się na aktywność biologiczną stosując standardową analizę krążkową wobec *Sarcina lutea*. Frakcje nieaktywne biologicznie odrzuca się. Kolumnę przemywa się wodą w ilości równej

1/8 objętości brzezki, z szybkością 150 ml/minutę.

Nieaktywną wodę z przemycia odrzuca się. Następnie eluuje się produkt 600 litrami 50% roztworu wodnego metanolu z szybkością 200 ml/minutę. Eluaty zawierające mieszaninę antybiotyków A-35512 zatają się pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości około 15 litrów. W jednym litrze znajduje się około 200 gramów mieszaniny antybiotyecznej A-35512.

Przykład V. Wyodrębnianie poszczególnych czynników z mieszaniny antybiotyecznej A-35512.

Około 3000 gramów mieszaniny antybiotyecznej A-35512 rozpuszczonej w 15 litrach metanolu, otrzymanej w sposób opisany w przykładzie IV, chromatografuje się na kolumnie wypełnionej 100 litrami poliamidu produkcji firmy Woelm. Kolumnę eluuje się odmineralizowaną wodą z szybkością około 80—120 ml/minutę.

Odbierane frakcje bada się metodą chromatografii cienkowarstwowej na celulozie lub chromatografii bibułowej, stosując do rozwijania mieszaninę n-butanolu, pirydyny, kwasu octowego i wody (15:10:3:12) i do wywoływania bioautografię wobec *Sarcina lutea*.

Pierwsze 100 litrów eluatu odrzuca się i ustala szybkość przepływu na około 16—200 ml/minutę. Zbiera się 12 frakcji o objętości 12 litrów każda. Następnie zmienia się eluent i eluuje w gradiencie metanolu i wody, stosując następujące postępowanie.

Zbiornik zawierający 360 litrów metanolu łączy się połączeniem syfonowym ze zbiornikiem zawierającym 120 litrów wody. Mieszaninę rozpuszczalników miesza się i podaje na kolumnę. Zbiera się 24 frakcje o objętości 24 litrów każda, prowadząc eluację z szybkością 200—300 ml/minutę.

Na podstawie wyników bioautografii łączy się poszczególne frakcje w grupy i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując dwuchlorowodorek czynnika A-35512-B i następujące wzbogacone mieszaniny innych czynników co przedstawia tablica 13.

Tablica 13

Frakcje	Objętość (w litrach)	Czynnik	Ilość
1—10	120	A+H	192 g
11—24	216	B	269 g
15—31	168	B+C	590 g
32—44	312	C, E, F, G	224 g

Przykład VI. Oczyszczanie czynnika A-35512-B.

Częściowo oczyszczone 400 g dwuchlorowodorku czynnika A-35512-B, otrzymanego według przykładu V, rozpuszcza się w 1,2 litra 50% roztworu wodnego metanolu i chromatografuje na kolumnie z tlenkiem glinu. Kolumnę przygotowuje się w następujący sposób.

10 kg kwaśnego tlenku glinu (firmy Woelm) miesza się z 50% roztworem wodnym metanolu. Mieszaninę pozostawia się do odstania, dekantuje su-

pernatant i odrzuca go. Tlenek glinu miesza się powtórnie z 50% roztworem wodnym metanolu i wprowadza do kolumny o średnicy 13,5 cm a następnie przemywa 50% roztworem wodnym metanolu aż do uzyskania klarownego eluatu.

Produkt eluuje się 50% roztworem wodnym metanolu z szybkością około 8–10 ml/minutę, zbierając frakcje o objętości około 240–300 ml. Kolejne frakcje bada się za pomocą chromatografii cienkowarstwowej, stosując do wywoływania bioautografię, jak to zostało opisane w przykładzie V. Na podstawie wyników oznacza poszczególne frakcje łączy się i otrzymuje oczyszczony dwuchlorowodorek czynnika A-35512-B. Wyniki przedstawia tablica 14.

Tablica 14

Frakcje	Ilość
17–21	9,6 g
22–29	72,0 g
30–37	117,0 g

Każdą z powyższych frakcji krystalizowano w temperaturze 4°C z zateżonego 50% roztworu wodnego metanolu. Otrzymany dwuchlorowodorek czynnika A-35512-B zawiera około 4,6% chloru. Wartość pH roztworu dwuchlorowodoru czynnika A-35512-B w 66% roztworze wodnym dwumetyloformamidu wynosi około 6,5.

Przykład VII. Wytwarzanie aglikonu czynnika A-35512-B.

5,0 g dwuchlorowodoru czynnika A-35512-B, otrzymanego według przykładu VI, rozpuszcza się w 200 ml wody. Otrzymany roztwór zakwasza się za pomocą 14 ml 4n kwasu solnego i ogrzewa w temperaturze wrzenia w ciągu dwóch godzin, po czym ochładza i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem do 3/4 objętości pierwotnej. Następnie wkrapla się 6n kwas solny aż do całkowitego wytrącenia osadu. Osad odsąca się i suszy otrzymując 3,56 g surowego chlorowodoru aglikonu A-35512-B.

Po zateżeniu i zanalizowaniu przesączu stwierdza się obecność glukozy, fukozy, mannozy i ramnozy.

Surowy aglikon A-35512-B oczyszcza się za pomocą chromatografii na przemywanym kwasem tlenku glinu (Woelm, typ I), stosując do elucji mieszaninę 1:9 wody i metanolu. Kolejne frakcje

analizuje się za pomocą chromatografii cienkowarstwowej na celulozie. Frakcje zawierające aglikon A-35512-B łączy się i zateża pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymuje się 398 mg częściowo oczyszczonego produktu. Wyniki chromatografii cienkowarstwowej z zastosowaniem do wywoływania ninhydryny, wskazują na obecność nieaktywnych biologicznie zanieczyszczeń.

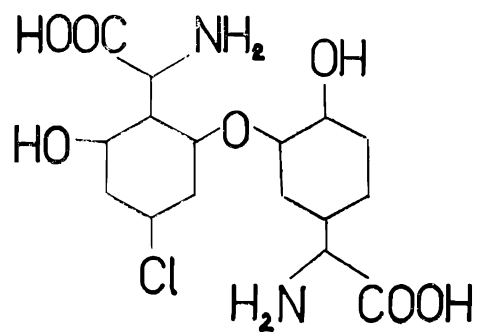
Porcję (100 mg) powyższego częściowo oczyszczonego aglikonu czynnika A-35512-B poddaje się dalszemu oczyszczaniu za pomocą chromatografii na poliamidzie MN-SC-6 (producent Machery, Nögel and Co., sprzedawca Brinkman Instruments Co., wielkość 0,07 mm) przy zastosowaniu do elucji wody. Frakcje analizuje się za pomocą chromatografii cienkowarstwowej w sposób opisany uprzednio. Frakcje eluatu zawierające aglikon czynnika A-35512-B łączy się i liofilizuje. Otrzymuje się 64 mg oczyszczonego chlorowodoru aglikonu czynnika A-35512-B. Całkowita wydajność w stosunku do wyjściowego czynnika A-35512-B wynosi 5,08%.

Przykład VIII. Wytwarzanie wolnej zasady aglikonu czynnika A-35512-B.

50 mg chlorowodoru aglikonu czynnika A-35512-B, otrzymanego według przykładu VII, rozpuszcza się w 10 ml mieszaniny 1:1 metanolu i wody. Roztwór zobojętnia się za pomocą 3,5 ml wymienniczy jonowego Bio-Rad AC-3-X w formie wodorotlenkowej. Całość miesza się w ciągu 15 minut w temperaturze pokojowej, po czym odsąca wymienniczy a przesącz zateża pod zmniejszonym ciśnieniem do połowy objętości, w temperaturze nie przekraczającej 60°C i następnie liofilizuje. Otrzymuje się 68 mg wolnej zasady aglikonu czynnika A-35512-B.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania aglikonowej pochodnej czynnika B mieszaniny antybiotycznej A-35512, **znamienny tym**, że drobnoustrój *Streptomyces candidus* NRRL 8156 hoduje się w pożywce zawierającej źródło przyswajalnego węglowodanu i azotu oraz sole nieorganiczne, w warunkach podpowierzchniowej fermentacji aerobowej, do uzyskania znacznej aktywności antybiotycznej, po czym mieszaninę antybiotyczną A-35512 wyodrębnia się z pożywki hodowlanej, z mieszaniny tej wydziela się czynnik B mieszaniny antybiotycznej A-35512 i czynnik ten poddaje się hydrolizie za pomocą umiarkowanie mocnego kwasu.



Wzor

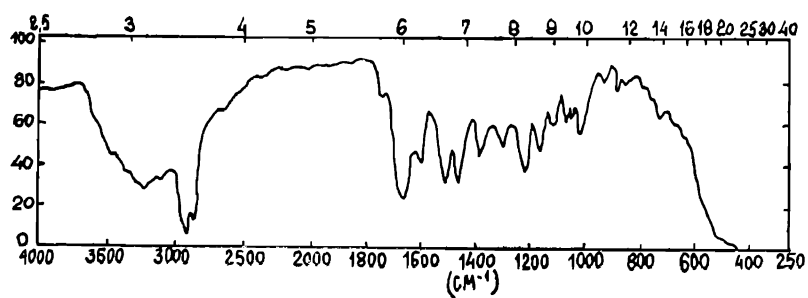


FIG. 1

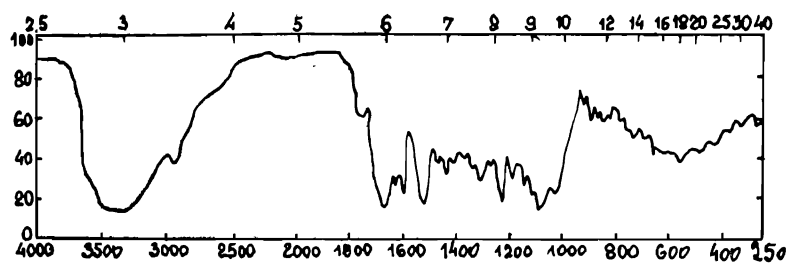


FIG. 2.