



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 19.01.76 (P. 186665)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 01.08.77

Opis patentowy opublikowano: 30.12.1978

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Int. Cl.² C12D 9/14

Twórcy wynalazku: Jerzy Luba, Anna Sokół, Edward Żukowski, Zygmunt Gmaj, Maria Dutkiewicz, Andrzej Dalewski, Danuta Kuwał

Uprawniony z patentu: Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa”.
Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania ryfamycyny S

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania ryfamycyny S, która jest substratem do otrzymywania jej pochodnych, będących ważnymi lekami antybiotycznymi.

Znane są sposoby otrzymywania ryfamycyny S na drodze chemicznej transformacji ryfamycyny B (opis patentowy Wielkiej Brytanii nr 924 472, belgijski opis patentowy nr 820 517). Transformacja ta wymaga stosowania specjalnej aparatury, a jej prowadzenie jest dość uciążliwe.

Stosowanie sposobu według wynalazku pozwala na wyeliminowanie procesów chemicznych przy wytwarzaniu ryfamycyny S, co znacznie skraca i upraszcza technologię produkcji leków z grupy ryfamycyn. Sposób wytwarzania ryfamycyny S według wynalazku polega na tym, że mutant *Streptomyces mediterranei* TAR-17 hoduje się metodą podpowierzchniową w warunkach aerobowych na pożywce, zawierającej przyswajalne źródła węgla i azotu oraz sole mineralne.

Mutant *Streptomyces mediterranei* TAR-17 otrzymano w wyniku działania N-metylo-N-nitrozo-N'-nitroguanidyny na strzępki *Streptomyces mediterranei* ATCC 13685, zawieszone w roztworze fizjologicznym i selekcji kolonii, wyhodowanych na podłożu agarowym A-7.

W tablicy 1 i 2 podano charakterystykę mutantu *Streptomyces mediterranei* TAR-17.

2

Tablica 1

Przyswajalność węglowodanów, będących źródłem węgla:

5	d-glukoza	++
	d-fruktoza	+
	d-mannitol	+
	d-ksyloza	+
10	L-arabinoza	+
	m-inozytol	+
	celuloza	-
	laktoza	++
	ramnoza	++
15	podłoże bezwęglowe	-

Tablica 2

20	Podłoże	Ocena hodowli szczepu
	1	2
25	agar słodowo-drożdżowy	wzrost średni, powierzchnia pofałdowana, grzybnia podstawowa jasno-brązowa CO-77
30	agar owsiany	wzrost bardzo obfity, grzybnia podstawowa jasno-brązowa Oc-117

1	2
podłoże skrobiowe	wzrost bardzo obfity, grzybnia podstawowa zielono-brązowa CO-82
podłoże asparaginowo-glicerolowe	wzrost średni, grzybnia podstawowa zielono-brązowo-żółta CO-77
podłoże z dekstryną	wzrost średni, grzybnia podstawowa żółto-zielona CO-77
podłoże odżywcze według Waksmana	wzrost średni, grzybnia podstawowa jasno-beżowa CO-74
podłoże Lindenbeina	wzrost bardzo słaby
podłoże Czapek Doxa z gliceryną	wzrost średni, gładki, grzybnia podstawowa żółto-zielona CO-77
podłoże tyrozynowe	wzrost dobry, brak barwnika typu melaniny w podłożu
żelatyna	brak upłynięcia
bulion azotanowy	brak redukcji azotanów
mleczko lakmusowe	brak koagulacji i peptyzacji

Obserwację rozwoju *Streptomyces mediterranei* TAR-17 na różnych podłożach oraz obserwację przyswajalności węglowodanów prowadzono według metody, podanej przez E. Shirlinga i D. Gottlieba (Methods Manual 1964) oraz S.A. Waksmana (The Actinomycetes 1962).

Biosyntezę ryfamycyny S przy użyciu mutanta *Streptomyces mediterranei* TAR-17 prowadzi się na podłożach, zawierających przyswajalne źródła węgla i azotu pochodzenia naturalnego oraz sole mineralne. Podłoża te mogą również zawierać pochodne kwasu barbiturowego, korzystnie etylofenylobarbituran sodowy lub dwuetylobarbituran sodowy, jako inhibitory powstawania innych ryfamycyn. Hodowlę prowadzi się w temperaturze około 26 — 32°C. W czasie biosyntezy w miarę potrzeby dozuje się środki przeciwpienne.

Aktywność brzcзки, otrzymanej w wyniku biosyntezy, oznacza się metodą, opisaną przez G.G. Gallo, C.R. Pasqualucci (II Farmaco Ed. Prat. 18, 78, 1963) i C.R. Pasqualucci, A.V. Igevan i inni (Journ. Pharm. Sci. 59, 686, 1970). Analizę chromatograficzną wykonuje się w układzie chloroform-metanol (100:3) na płytkach, pokrytych zawiesiną żelu krzemionkowego GF₂₅₄ w wodzie oraz na płytkach, pokrytych zawiesiną żelu krzemionkowego GF₂₅₄ w 5% roztworze wodnym kwasu cytrynowego. Chromatogramy ogląda się w świetle widzialnym i ultrafioletowym.

Po zakończeniu biosyntezy ryfamycyny S izoluje się z przesączu brzcзки metodami chemicznymi. Otrzymana ryfamycyna S posiada następujące właściwości fizyko-chemiczne:

temperatura topnienia 180—182°C,
[α]_D²⁰ + 476 (w 1% CH₃OH),

widmo UV i w świetle widzialnym w buforze fosforanowym o wartości pH=8,04: 224 nm E_{1cm}^{1%} 478, 317 nm E_{1cm}^{1%} 436, 525 nm E_{1cm}^{1%} 68.

Poniższe przykłady wyjaśniają bliżej istotę wynalazku, nie ograniczając jego zastosowania.

Przykład I. Szczep *Streptomyces mediterranei* TAR-17, wytwarzający ryfamycynę S, hoduje się na podłożu agarowym A-7 o następującym składzie: ekstrakt drożdżowy 4 g, ekstrakt słodowy 10 g, glukoza czysta 4 g, płatki owsiane 20 g, agar-agar 20 g, woda destylowana 1000 ml. Pożywkę agarową wyjaławia się w temperaturze 120°C w czasie 30 minut, tworząc agary skośne, które szczepi się strzępkami mutanta *Streptomyces mediterranei* TAR-17, zliofilizowanymi w nośniku — mleku odłuszczonego. Agary skośne inkubuje się w temperaturze 28°C w czasie 8 dni. Po upływie tego czasu wstawia się je do chłodni, w której temperatura wynosi +4°C. Okres przechowywania w tej temperaturze nie może być dłuższy niż dwa miesiące.

Pochodzącymi z hodowli agarowej strzępkami *Streptomyces mediterranei* TAR-17, uprzednio zdeintegrowanymi i zawieszonymi w 3 ml roztworu fizjologicznego, szczepi się 50 ml umieszczanego w kolbach trzęsawkowych o pojemności 250 ml podłoża P-73 o następującym składzie: glukoza 30 g, 50% wyciąg namokowy kukurydzy 20 g, mąka bawełniana 10 g, (NH₄)₂SO₄ 6 g, CaCO₃ 5 g, ZnSO₄·7H₂O 0,05 g, MnSO₄·5H₂O 0,05 g, olej silikonowy 1 g, woda wodociągowa 1000 ml. Podłoże przed szczepieniem wyjaławia się w temperaturze 120°C w czasie 20 minut; wartość pH po wyjałowieniu powinna wynosić 6,4 — 6,8. Zaszczepione podłoże P-73 wstawia się na trzęsawkę obrotową i inkubuje się przez 72 godziny w temperaturze 28°C. Po upływie tego czasu przenosi się 2,5 ml wyhodowanego inoculum do 50 ml podłoża P-73 i inkubuje przez 30 godzin w temperaturze 28°C. 2 ml tak przygotowanego inoculum przenosi się do 20 ml podłoża FOS-75, umieszczonego w kolbach trzęsawkowych o pojemności 250 ml. Skład podłoża FOS-75: mielone wytloki orzechów ziemnych 10 g, mąka bawełniana 20 g, KH₂PO₄ 1 g, (NH₄)₂SO₄ 10 g, MgSO₄·7H₂O 1 g, glukoza 60 g, sacharoza 50 g, gliceryna 40 g, etylofenylobarbituran sodowy 0,4 g, CaCO₃ 14 g, CuSO₄·5H₂O 0,0033 g, ZnSO₄·7H₂O 0,05 g, CoCl₂·4H₂O 0,002 g, MnSO₄·4H₂O 0,004 g, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0,001 g, FeSO₄·7H₂O 0,01 g, glikol propylenowy 5 g, olej silikonowy 1 g, woda wodociągowa 1000 ml. Przed zaszczepieniem podłoża FOS-75 wyjaławia się w czasie 30 minut w temperaturze 120°C; po wyjałowieniu wartość pH podłoża powinna wynosić 6,5—6,8. Kolby z zaszczepionym podłożem FOS-75 wstawia się na trzęsawkę. Inkubację prowadzi się w temperaturze 28°C w ciągu 240—260 godzin. Aktywność otrzymanej

brzeczki, określona metodą opisaną powyżej, wynosi 4000 mcg/ml.

Przykład II. 2 ml inokulum, otrzymanego sposobem, opisanym w przykładzie I, szczepi się 20 ml umieszczonego w kolbach trzęsawkowych o pojemności 250 ml podłoża FOS-12 o następującym składzie: mielone wytloki orzechów ziemnych 25 g, mielone wytloki nasion soi 10 g, KH_2PO_4 1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, glukoza czysta 110 g, gliceryna 40 g, CaCO_3 11 g, dwuetylobarbituran sodowy 1,5 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0033 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,002 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,004 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, glikol propylenowy 5 g, olej silikonowy 1 g, woda wodociągowa 1000 ml; pH podłoża koryguje się 20‰ ługiem sodowym do wartości 7,8. Po wyjałowieniu wartość pH podłoża powinna wynosić 6,4—6,6. Wyjałowienie oraz inkubację zaszczepionego podłoża FOS-12 prowadzi się sposobem, opisanym w przykładzie I. Po upływie 192 godzin inkubacji uzyskuje się aktywność brzeczki rzędu 3000 mcg/ml (aktywność brzeczki określa się metodą, podaną w przykładzie I).

Przykład III. 20 ml podłoża FOS-14, przygotowanego tak samo, jak w przykładzie I, szczepi się 2 ml inokulum, otrzymanego sposobem, opisanym w przykładzie I, w kolbach trzęsawkowych o pojemności 250 ml. Kolby z zaszczepioną pożywką umieszcza się na trzęsawce i inkubuje w temperaturze 28°C. Skład podłoża FOS-14 jest następujący: mielone wytloki orzechów ziemnych 10 g, mąka bawełniana 20 g, KH_2PO_4 1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g, MgSO_4 1 g, glukoza 110 g, gliceryna 40 g, CaCO_3 14 g, kwas etylcykloheksenylobarbiturowy 2 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0033 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,002 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,004 g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,001 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, glikol propylenowy 5 g, olej silikonowy 1 g, woda wodociągowa 1000 ml. Wartość pH po wyjałowieniu powinna wynosić 6,6—6,8. Po upływie 192 godzin inkubacji aktywność brzeczki, oznaczona metodą, podaną w przykładzie I, wynosi 3300 mcg/ml.

Przykład IV. Podłoże FOD-5 o składzie: mielone wytloki orzechów ziemnych 25 g, mielone wytloki nasion soi 10 g, KH_2PO_4 1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 g, MgSO_4 1 g, glukoza 110 g, gliceryna 40 g, CaCO_3 14 g, etylcykloheksenylobarbituran wapniowy 2 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0033 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,002 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,004 g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,001 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, glikol propylenowy 5 g, olej silikonowy 1 g, woda wodociągowa 1000 ml.

$\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,001 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, glikol propylenowy 5 g, olej silikonowy 1 g, woda wodociągowa 1000 ml. Przed szczepieniem pH podłoża koryguje się 20‰ ługiem sodowym do wartości 7,8, a następnie wyjaławia w temperaturze 120°C w ciągu 30 minut; wartość pH po wyjałowieniu powinna wynosić 6,6—6,8. Kolby z zaszczepioną pożywką umieszcza się na trzęsawce i inkubuje w temperaturze 28°C. Po upływie 192 godzin inkubacji aktywność brzeczki, oznaczona metodą, podaną w przykładzie I, wynosi 2200 mcg/ml.

Przykład V. Podłoże FOS-75/1 o składzie: mielone wytloki orzechów ziemnych 10 g, mąka bawełniana 20 g, KH_2PO_4 1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, glukoza 60 g, sacharoza 50 g, gliceryna 40 g, CaCO_3 14 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0033 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,002 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,004 g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,001 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, glikol propylenowy 5 g, olej silikonowy 1 g, woda wodociągowa 1000 ml. Wyjaławia się w temperaturze 120°C w ciągu 30 minut; wartość pH po wyjałowieniu powinna wynosić 6,4—6,8. Następnie podłoże szczepi się inokulum, otrzymanym metodą, opisaną w przykładzie I. Kolby z zaszczepioną pożywką umieszcza się na trzęsawce i inkubuje w temperaturze 28°C. Po upływie 192 godzin inkubacji aktywność brzeczki wynosi 2500 mcg/ml.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania ryfamycyny S, znamienny tym, że mutant *Streptomyces mediterranei* TAR-17 hoduje się metodą podpowierzchniową w warunkach aerobowych na pożywce, zawierającej przyswajalne źródła węgla i azotu oraz sole mineralne.

2. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że stosuje się pożywkę, zawierającą pochodne kwasu barbiturowego, korzystnie etylofenylobarbituran sodowy lub dwuetylobarbituran sodowy.

3. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że hodowlę prowadzi się w temperaturze około 26—32°C.