

C 12 d 9/22



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 43809

Kl. 6 b, 16/03

Instytut Antybiotyków

Warszawa, Polska

Sposób otrzymywania nowego antybiotyku, onkostajny K

Patent trwa od dnia 21 listopada 1959 r.

Wynalazek dotyczy sposobu otrzymywania i wyodrębniania nowego antybiotyku, onkostajny K, drogą biosyntezy za pomocą nowego i nie opisanego dotychczas szczepu *Streptomyces species* INA 1-79/58.

Szczep *Streptomyces species* INA 1-79/58, otrzymywany na drodze selekcji naturalnej szczepu *Streptomyces melanochromogenes* 1779, różni się od dotychczas opisanego szczepu, wytwarzającego aktynomycynę K.

Szczep *Streptomyces species* INA 1-79/58 hodowany na podłożu Pridhama zawierającym: skrobi — 1%, K_2HPO_4 — 0,1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,1%, NaCl — 0,1%, $(NH_4)_2SO_4$ — 0,2%, $CaCO_3$ — 0,2%, agaru — 2,0%, wykazuje sporofory spiralne, a zarodniki lekko owalne. Wytwarza on grzybnię podstawową kremową, grzybnię powietrzną szarą i wydziela żółty pigment, rozpuszczalny w podłożu.

Szczep *Streptomyces species* INA 1-79/58 na podłożu peptonowym, zawierającym: Bactotryptonu — 0,1%, Bacto-Yeast-Extract — 0,1%,

NaCl — 0,85%, agaru — 1,7%, wytwarza pigment typu melaniny.

Na podłożu Czapek-Doxa, zawierającym: $NaNO_3$ — 0,2%, K_2HPO_4 — 0,1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,05%, KCl — 0,05%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,001%, sacharozy — 3,0%, agaru — 2,0%, szczep *Streptomyces species* INA 1-79/58 wytwarza grzybnię podstawową jasno-żółtą, grzybnię powietrzną barwy kremowej i wydziela jasno-brązowy pigment, rozpuszczalny w podłożu.

Na podłożu tryptonowym, zawierającym 1,0% Bactotryptonu, 1,0% glukozy, 2,0% agaru, szczep *Streptomyces species* INA 1-79/58 wytwarza kremową grzybnię podstawową, grzybnię powietrzną jasno-żółtą i wydziela ciemno-brązowy pigment, rozpuszczalny w podłożu.

Na podłożu Kraińskiego, zawierającym: glukozy — 1,0%, NH_4NO_3 — 0,05%, K_2HPO_4 — 0,05%, agaru — 2,0% i wodę wodociagową, szczep *Streptomyces species* INA 1-79/58 wytwarza grzybnię podstawową kremową, grzyb-

nię powietrzną szarą oraz wydziela żółty pigment, rozpuszczalny w podłożu.

Na podłożu owsianym, zawierającym: płatków owsianych — 2,0%, agaru — 2,0%, szczep *Streptomyces species* INA 1-79/58 wytwarza jasno-kremową grzybnię podstawową, grzybnię powietrzną szarą i wydziela żółty pigment, rozpuszczalny w podłożu.

Na podłożu dekstrynowym, zawierającym: dekstryny — 1,0%, peptonu — 0,5%, NaNO_3 — 0,3%, KH_2PO_4 — 0,1%, KCl — 0,05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001%, wyciągu drożdżowego — 0,04%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001%, agaru — 3,0%, szczep *Streptomyces species* INA 1-79/58 wytwarza grzybnię podstawową jasno-kremową, grzybnię powietrzną białą i wydziela żółty pigment, rozpuszczalny w podłożu.

Na podłożu Sabouraud, zawierającym: glukozy — 2,0%, peptonu — 1,0%, agaru — 2,0%,

szczep *Streptomyces species* INA 1-79/58 wytwarza grzybnię podstawową jasno-kremową, grzybnię powietrzną jasno-żółtą oraz żółty pigment, rozpuszczalny w podłożu.

Na podłożu syntetycznym z peptonem, zawierającym: glukozy — 0,5%, peptonu — 0,5%, KNO_3 — 0,1%, K_2HPO_4 — 0,5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,02%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001%, agaru — 2,5%, szczep *Streptomyces species* INA 1-79/58 wytwarza grzybnię podstawową jasno-kremową, grzybnię powietrzną białą oraz ciemno-brązowy pigment, rozpuszczalny w podłożu.

W poniższych tabelach zestawiono biologiczne właściwości wyjściowego szczepu *Streptomyces melanochromogenes* 1779 i szczepu *Streptomyces species* INA 1-79/58, uzyskanego ze szczepu *Streptomyces* 1779 na drodze selekcji naturalnej.

Charakterystyka szczepu na ziemniaku:

Szczep	<i>Streptomyces melanochromogenes</i>	<i>Streptomyces species</i> INA 1-79/58
Zarodnikowanie	słabe	obfite
grzybnia powietrzna	żółta	brązowa
pigment rozpuszczalny	żółty	brązowy

Charakterystyka szczepu na podłożu asparaginowym: asparaginy — 0,1%, KH_2PO_4 — 0,025%, wyciągu wołowego — 0,2%, glukozy — 1,0%, agaru — 2,0%.

Szczep	<i>Streptomyces melanochromogenes</i>	<i>Streptomyces species</i> INA 1-79/58
Zarodnikowanie	dobrze	dobrze
grzybnia powietrzna	żółto-żółta	szara
grzybnia podstawowa	żółto-żółta	żółta
pigment rozpuszczalny	żółto-czerwony	żółty

Charakterystyka szczepu *Streptomyces species* INA 1-79/58 na agarze zwykłym, zawierającym: NaCl — 0,5%, pepton — 1,0%, agar — 2,0% i wyciąg wołowy rozcieńczony wodą w stosunku 3 : 1.

Szczep	<i>Streptomyces melanochromogenes</i> 1779	<i>Streptomyces species</i> INA 1-79/58
Zarodnikowanie	brak	brak
grzybnia powietrzna	brak	brak
grzybnia podstawowa	jasno-brązowa	bezbarna
pigment rozpuszczalny	jasno-brązowy	ciemno-brązowy

Szczep *Streptomyces melanochromogenes* 1779 upłynnia częściowo żelatynę i wytwarza brązowy pigment. Szczep *Streptomyces species* INA 1-79/58 nie upłynnia żelatyny i nie wytwarza pigmentu.

Zdolność wykorzystywania różnych źródeł węgla w agarze syntetycznym Pridhama i Gottlieba, zawierającym: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,264%, KH_2PO_4 — 0,238%, K_2HPO_4 — 0,565%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1%, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,00064%,

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,00011%, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,00079%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,00015%, źródło węgla — 1,0, agar — 1,5%, przedstawia się następująco: szczep *Streptomyces species* INA 1-79/58 metabolizuje d(—)fruktozę, d(+)galaktozę, d(+)glukozę, d(+)mannozę, laktozę, maltozę, sacharozę, trehalozę, d(—)rafinozę, skrobię oraz inozytol i mannit. Szczep ten nie przyswaja octanu sodowego, dulcytu i nie rozkłada celulozy. Szczep *Streptomyces species* INA 1-79/58 metabolizuje bursztynian sodowy i 1-ramnozę, co różni go od szczepu *Streptomyces melanochromogenes* 1779, który niezużywa bursztynianu sodowego i 1-ramnozy jako źródła węgla.

Szczep *Streptomyces species* INA 1-79/58 nie redukuje azotanów do azotynów, na podłożu tryptonowym płynnym wytwarza H_2S , peptonizuje mleko i nie rozkłada celulozy.

Podłożem sporulacyjnym dla szczepu *Streptomyces species* INA 1-79/58 jest agar asparaginowy o wymienionym wyżej składzie. Hodowle inkubuje się w termostacie w temperaturze 25 — 30°C przez 7 — 10 dni. Wyrósłe hodowle na sporulacyjnym, skośnym agarze przechowuje się w chłodni w temperaturze 4°C. Szczep można przechowywać także w ziemi i w postaci zliofilizowanej.

Sposób wytwarzania onkostatyny K drogą biosyntezy polega na fermentacji szczepu *Streptomyces species* INA 1-79/58 w temperaturze poniżej 30°C aż do czasu wytworzenia maksymalnej ilości tego antybiotyku w brzeczce. Grzybnie, oddzieloną z brzeczki fermentacyjnej przez wirowanie lub sączenie, ekstrahuje się trzykrotnie acetonem, stosując każdorazowo 1 część objętościową acetonu na jedną część objętościową grzybni lub dwukrotnie ekstrahując acetonem w wyżej podanej ilości, a po raz trzeci 1/2 części objętościowej acetonu na 1 część objętościową grzybni. Następnie połączone wyciągi acetonowe odparowuje się w próżni w temperaturze nie przekraczającej 30 — 35°C do całkowitego usunięcia acetonu, a pozostałość wodną ekstrahuje dwukrotnie benzenem, biorąc 1/10 do 1/5 części objętościowych benzenu na 1 część objętościową pozostałości wodnej. Przesącz brzeczki zadaje się dwukrotnie benzenem, zobojętnia i prowadzi ekstrakcję, przy czym na 1 część objętościową brzeczki stosuje się 1/5 — 1/15 części objętościowych benzenu. Połączone wyciągi benzenowe z grzybni i z przesączu brzeczki zlewa się razem, zagęszcza w próżni i wprowadza na kolumnę z tlenkiem glinowym. Na kolumnie tworzy

się pierścień barwy ciemno-czerwonej, który, w zależności od ilości onkostatyny K w wyciągu benzenowym, jest szerszy lub węższy. Po przepuszczeniu całej objętości wyciągu benzenowego, antybiotyk eluuje się z kolumny acetonem aż do jego całkowitego usunięcia. Eluaty acetonowe zagęszcza się w próżni do suchej pozostałości i rekrytalizuje z wrzącego roztworu octanu etylowego lub innych rozpuszczalników organicznych, w których onkostatyna K jest dobrze rozpuszczalna. W przypadkach, gdy brzeczka wykazuje szczególnie wysoką aktywność, można pominąć etap chromatografii na kolumnie z Al_2O_3 i po zagęszczeniu do sucha wyciągów benzenowych można rekrytalizować pozostałość w sposób opisany wyżej.

Przykład I. Jednostadiowa fermentacja w kolbach na trzęsawce. Kolbę o pojemności 750 ml, zawierającą 100 ml pożywki o składzie: mąka sojowa — 2%, glukoza — 2%, $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ — 0,2%, NaCl — 0,2%, K_2HPO_4 — 0,05%, CaCO_3 — 0,4%, pH — 7,0, wyjałowioną w sposób powszechnie znany, zaszczepia się zawiesiną zarodników szczepu *Streptomyces species* INA 1-79/58 w 0,85%owym roztworze NaCl . Kolbę z zaszczepioną pożywką umieszcza się na trzęsawce i inkubuje w temperaturze 25 — 30°C przez 120 — 168 godzin.

Przykład II. Trzystadiowa fermentacja w fermentorach. Stadium I przeprowadza się w kolbach, jak w przykładzie I, lecz fermentację prowadzi się przez 48 — 72 godziny. Stadium II prowadzi się w fermentorze o objętości np. 100 litrów. Podłoże produkcyjne o składzie jak wyżej, zawierające ponad to olej sojowy w ilości około 1%, wyjaławia się w temperaturze 115°C przy 0,8 atm. w ciągu 1 godziny. Wyjałowioną pożywkę szczepi się 48 — 72 godziną hodowlą ze stadium I i podaje 36 — 48 — godzinnej fermentacji w temperaturze 25 — 30°C przy napowietrzaniu 0,4 — 1,0 objętości powietrza na objętość pożywki na minutę. Stadium III prowadzi się w fermentorze o pojemności np. 1500 litrów na podłożu podanym wyżej, wyjałowionym jak w stadium II i przy utrzymywaniu takich samych parametrów, lecz przy napowietrzaniu 0,2 — 0,6 objętości powietrza na objętość pożywki na minutę przez okres średnio 80 godzin.

Oznaczenie onkostatyny K w przesączu brzeczki przeprowadza się metodą biologiczną płytkowo-cylinderkową, używając jako szczepu wzorcowego *Bacillus subtilis* 6633.

Po fermentacji oddziela się z brzeczki grzybnę np. przez odwirowanie na wirówce koszowej lub odsączenie na nuczach próżniowych o dużej powierzchni sączącej, po czym grzybnę w ilości 60 litrów umieszcza się w reaktorze o pojemności około 150 litrów, zadaje 1 częścią objętościową acetonu na 1 część objętościową grzybni i ekstrahuje mieszając do całkowitego wyciągnięcia onkostatyny K z grzybni. W przypadku niecałkowitej ekstrakcji antybiotyku, ekstrakcję powtarza się dwu- lub trzykrotnie.

Połączone wyciągi acetonowe odparowuje się w próżni w temperaturze nie przekraczającej 30 — 35°C, do całkowitego odpędzenia acetonu. Pozostałość wodną ekstrahuje się trzykrotnie benzenem, biorąc każdorazowo 1/6 część objętościową benzenu na 1 część objętościową pozostałości wodnej. Oddzielony od grzybni przesącz brzeczki umieszcza się w reaktorach o pojemności około 100 litrów na 700 litrów przesączu, dodaje do niego 1/20 — 1/6 części objętościowych benzenu na 1 część objętościową przesączu brzeczki, mieszaninę wodno-benzenową zobojętnia się i miesza 1 — 1,5 godziny, po czym zostawia do odstania na 12 — 20 godzin. Następnie fazę dolną ekstrahuje się jeszcze raz 1/20 — 1/6 części objętościowych benzenu na 1 część objętościową fazy wodnej. Emulsję powstającą na granicy faz wiruje się na wirówce Sharplesa lub innej, odpowiedniej wirówce szybkoobrotowej, po uprzednim dodaniu do niej Na_2SO_4 , NaCl lub innej soli i wymieszaniu. Połączone wyciągi benzenowe z grzybni i z przesączu brzeczki, po uprzednim zagęszczeniu w próżni, chromatografuje się na kolumnie z tlenkiem glinowym. Zaadsorbowaną na tlenku glinowym onkostatynę K eluuje się acetonem w ilości potrzebnej do całkowitego wymycia antybiotyku z kolumny. Eluaty acetonowe zagęszcza się w próżni w temperaturze nie przekraczającej 30 — 35°C do uzyskania suchej pozostałości i rekrytalizuje z wrzącego roztworu octanu etylowego lub innych rozpuszczalników organicznych, w których onkostatyna K jest dobrze rozpuszczalna na gorąco i mało rozpuszczalna na zimno. Krystaliczny osad zostawia się na 5 — 7 dni w temperaturze 4 — 10°C, sączy, przemywa wodą lodową i suszy w temperaturze pokojowej w próżni. Wydajność antybiotyku w przeliczeniu na zawartość antybiotyku w grzybni i w przesączu brzeczki wynosi 60%.

Onkostatyna K jest substancją o barwie ciemno-czerwonej. Tworzy kryształy w formie dwupiramid i płytek. Chromatografia bibułowa

w różnych układach rozpuszczalników wykazuje obecność 4 komponentów, zidentyfikowanych jako I_{0a} , I_0 , I_1 , I_2 . Nie zawiera komponentu I_3 , występującego w aktynomycynach z grupy D. Temperatura topnienia onkostatyny K wynosi 250 — 253°C, temperatura ciemnienia 241°C. Skręcalność właściwa w absolutnym etanolu

$$(\alpha)_{\text{D}}^{20} = -260^\circ. \text{ Ekstynkcja właściwa (33\%-\text{ego}}$$

etanolowego roztworu z buforem fosforanowym, PH 7,01) przy 445 milimikronach wynosi 20 8. Spektrum antybiotyczne onkostatyny K przedstawia tabela 1.

Tabela 1.

Szczepy wzorcowe	Najmniejsze stężenie onkostatyny K powodujące zahamowanie wzrostu szczepu wzorcowego (mcg/ml)
<i>Micrococcus pyogenes</i> var. aureus 209-P	0,2
<i>Micrococcus pyogenes</i> var. albus	0,2
<i>Sarcina lutea</i>	0,05
<i>Bacillus circulans</i> 8144	0,2
<i>Bacillus brevis</i> 10068	0,45
<i>Bacillus subtilis</i> 6633	0,01
<i>Escherichia coli</i> 308	125,0
<i>Proteus vulgaris</i> OX ₁₉	125,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62,0
<i>Candida albicans</i> 102	125,0
<i>Mycobacterium</i> 607	7,5
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	15,0
<i>Mycobacterium phlei</i>	3,7
<i>Penicillium chrysogenum</i> Q 176	62,0
<i>Aspergillus niger</i>	31,0

Badania przeprowadzone na myszach z 5 różnymi nowotworami wykazały, że dobową dawką onkostatyny K wynoszącą 100 mcg/kg działa hamująco na rozwój raka Ehrlicha oraz czerniaka (melanoma). Podobne działanie wykazują dawki 50 i 25 mcg/kg wobec mięsaka Crockera 180. Onkostatyczne działanie onkostatyny K zanotowano również w doświadczeniu z mięsakiem SA 37.

LD_{50} onkostatyny K w stosunku do myszy przy podaniu dootrzewnowym wynosi 745 mcg/kg, po dodaniu dożylnym 1 mg/kg.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania nowego antybiotyku, onkostatyny K, znamieny tym, że prowadzi się biosyntezę metodą fermentacji głębino-wej szczepu *Streptomyces species* INA 1-79/58, otrzymanego na drodze selekcji naturalnej szczepu *Streptomyces melanochromogenes* 1779, w temperaturze poniżej 30°C na pożywce zawierającej przyswajalny węgiel, azot i sole mineralne, do czasu wytworzenia przez ten szczep w brzeczce antybiotyku, który izoluje się metodą ekstrakcji i adsorpcji oraz eluacji.
2. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że z brzeczki oddziela się grzybnię, na przykład przez odsączenie lub odwirowanie, ekstrahuje antybiotyk z przesączu dwukrotnie benzenem lub innym rozpuszczalnikiem nie mieszającym się z wodą, a antybiotyk wy-

tworzony w grzybni ekstrahuje z niej kilkakrotnie acetonem lub innym odpowiednim rozpuszczalnikiem, po czym odparowuje ten rozpuszczalnik, a pozostałość ekstrahuje benzenem, a następnie połączone zagęszczone wyciągi benzenowe z brzeczki i z grzybni przepuszcza się przez kolumnę z tlenkiem glinowym i eluuje acetonem, odparowuje eluaty w próżni w temperaturze 25 — 35°C, a uzyskaną suchą pozostałość rekrytalizuje z gorącego octanu etylu lub innego, odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego, a krystaliczny osad po odsączeniu przemywa wodą lodową i suszy w próżni w temperaturze pokojowej.

Instytut Antybiotyków

Zastępca: mgr inż. Jerzy Hanke

rzecznik patentowy