



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 28.02.73 (P. 160965)

Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 02.01.74

Opis patentowy opublikowano: 30.12.1977

MKP C12d 9/04

Int. Cl.²
C12D 9/04

Twórca wynalazku: _____

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

Sposób wytwarzania mieszaniny nowych antybiotyków A-25822 oraz jej poszczególnych składników A, B, D, H, L, M i N

1

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania mieszaniny nowych antybiotyków A-25822 oraz jej poszczególnych składników. Antybiotyki te należą do grupy wielopierścieniowych związków zawierających atom azotu.

Poszczególne związki z tej grupy zostały oznaczone oprócz symbolu A-25822 symbolami A, B, D, H, L, M i N.

Sposób wytwarzania mieszaniny nowych antybiotyków A-25822, oraz jej poszczególnych składników A, B, D, H, L, M i N i ich soli addycyjnych z kwasami, polega na tym, że prowadzi się hodowlę nowego szczepu *Geotrichum flava-brunneum* NRRL 3862 na podłożu, zawierającym przyswajalne źródła węgla, azotu i soli nieorganicznych w warunkach napowietrzanej fermentacji głębinowej i otrzymaną mieszaninę antybiotyków izoluje się i ewentualnie rozdziela się poszczególne składniki lub przeprowadza w sól albo jedno i drugie, lub składnik A korzystnie przeprowadza się w pochodną octanową.

Antybiotyki A-25822 wytwarza się metodą głębinowej, napowietrzanej fermentacji nowego szczepu *Geotrichum flava-brunneum*, prowadzonej aż do chwili uzyskania znacznej aktywności antybiotyecznej. Antybiotyki A-25822 wydziela się z brzojki fermentacyjnej przez ekstrakcję do rozpuszczalnika organicznego, a następnie po alkalicznym przemyciu organicznego roztworu, reekstrakcję antybiotyków A-25822 do wodnego roztworu kwa-

2

su mineralnego. Kwaśny ekstrakt alkalinizuje się i część antybiotyków o aktywności większej przeekstrahuje się do rozpuszczalnika węglowodorowego, a następnie część o mniejszej aktywności antybiotyecznej do polarnego rozpuszczalnika organicznego. Ekstrakty organiczne łączy się i odparowuje rozpuszczalnik, uzyskując surową mieszaninę antybiotyków A-25822.

Pojedyncze składniki mieszaniny A-25822 wydziela się, stosując metodę chromatografii kolumnowej, cienkowarstwowej, gazowej oraz metodę krystalizacji.

Antybiotyki A-25822 wykazują działanie hamujące na drobnoustroje, wywołujące zakażenie u zwierząt i roślin, i są szczególnie cenne ze względu na działanie przeciwgrzybowe *in vitro* i *in vivo* wobec takich szczepów, jak np.: *Candida* sp. i *Cryptococcus* sp.

Absorpcję w podczerwieni poszczególnych składników mieszaniny A-25822 przedstawiono na rysunku, gdzie fig. 1 dotyczy składnika A; fig. 2 — składnika B; fig. 3 — składnika D; fig. 4 — składnika H; fig. 5 — składnika L; fig. 6 — składnika M; fig. 7 — składnika N.

Na podstawie analizy właściwości chemicznych i fizycznych oraz analizy spektralnej antybiotykom A-25822 została przypisana struktura azasteroidów. Każdy ze składników A-25822 zawiera w swojej cząsteczce jeden zasadowy atom azotu.

Poszczególne składniki mieszaniny antybiotyków

otrzymuje się równocześnie w procesie fermentacji w postaci mieszaniny, a następnie wydziela się je w sposób opisany powyżej.

Mieszanina antybiotyków A-25822 jest olejem o barwie żółtej, rozpuszczalnym w większości pospolitych rozpuszczalników organicznych i praktycznie nie rozpuszczalnym w wodzie. Zarówno mieszanina, jak i poszczególne składniki są trwałe w słabo kwaśnych roztworach wodnych w ciągu szeregu miesięcy.

Charakterystyka poszczególnych składników mieszaniny A-25822.

Składnik A jest krystaliczną substancją o barwie białej i temperaturze topnienia 147°C (bezbarwne płytki z acetonitrylu). Masa cząsteczkowa, oznaczona metodą spektrofotografii masowej, wynosi 439. Wyliczony wzór sumaryczny — $C_{30}H_{49}NO$. Analiza elementarna wykazała procentową zawartość węgla — 82,17%, wodoru 11,31%, azotu — 3,38%. Skręcalność właściwa, oznaczona w metanolu, wynosi $[\alpha]_D^{25} = -70^\circ$ ($C = 1,15$ MeOH). Miareczkowanie elektrometryczne, wykonane w 68% dwumetyloformamidzie (DMF), wykazało obecność jednej grupy miareczkującej się o wartości pKa 8,45. Widmo w podczerwieni, wykonane w chloroformie, przedstawione na fig. 1, wykazuje następujące maksima absorpcji, wyrażone w mikronach: 2,79, 3,0, 3,26, 3,42, 3,48, 6,10, 6,17, 6,87, 6,95, 7,29, 7,42, 7,62, 7,75, 8,68, 9,19, 9,37, 9,80, 9,96, 10,31, 10,73, i 10,87. Składnik A wykazuje w ultrafiolecie w obojętnym i zasadowym etanolowym roztworze absorpcję przy λ_{max} 293 m μ .

Składnik B mieszaniny A-25822 jest krystaliczną substancją o barwie białej i temperaturze topnienia około 115—118°C (igły z mieszaniny acetonheksan). Chlorowodorek składnika B, otrzymany podczas przepuszczania suchego chlorowodoru przez eterowy roztwór tego składnika i odsączenie wydzielonego osadu, topnieje w temperaturze 128—141°C. Wzór sumaryczny — $C_{28}H_{45}NO$. Masa cząsteczkowa, wyznaczona metodą spektrofotografii masowej, wynosi 411. Miareczkowanie elektrometryczne wykonane w 66% wodnym roztworze dwumetyloformamidu, wykazało obecność jednej grupy miareczkującej się o wartości pKa 8,5.

Analiza elementarna wykazała procentową zawartość węgla — 81,47%; wodoru — 10,91% i azotu 3,21%.

Skręcalność właściwa $[\alpha]_D^{25} = -16,7^\circ$ ($C = 0,775$, MeOH). Widmo w podczerwieni wykonane w chloroformie, przedstawione na fig. 2, wykazuje następujące charakterystyczne maksima absorpcji: 2,78, 2,92, 3,12, 3,27, 3,40, 3,48, 6,1 (silne), 6,15, 6,73, 6,93, 7,1, 7,27, 7,96, 8,63, 8,86, 9,17, 9,30, 9,53, 9,72, 9,81, 9,95, 10,15, 10,44, 10,76, 10,94, 11,23 i 11,78 mikronów.

Podobnie, jak składnik A, składnik B wykazuje absorpcję w nadfiolecie przy λ_{max} 239 m μ (roztwór obojętny) i przy λ_{max} 279 m μ w środowisku kwaśnym.

Składnik D mieszaniny A-25822 jest bezpostaciową substancją o barwie białej, i temperaturze topnienia około 51—55°C, i masie cząsteczkowej,

oznaczonej metodą spektrofotografii masowej, 427. Wzór sumaryczny — $C_{28}H_{45}NO_2$.

Miareczkowanie elektrometryczne wykazuje istnienie jednej miareczkującej się grupy o wartości pKa 7,7.

Analiza elementarna składnika D wykazuje procentową zawartość węgla — 78,40%, wodoru — 10,28% i azotu 3,17%. Skręcalność właściwa wynosi $[\alpha]_D^{52} = +39^\circ$ ($C = 0,725$, MeOH). Widmo w podczerwieni, przedstawione na fig. 3, wykazuje następujące maksima absorpcji przy długości fali: 2,97, 3,43, 3,50, 3,7 (szerokie), 5,97, 6,04, 6,09, 6,15, 6,82, 6,93, 7,28, 7,34, 7,42, 7,7, 7,94, 8,1, 8,34, 8,6, 8,87, 9,10, 9,18, 9,35, 9,61, 9,77, 10,29, 10,4, 10,76, 10,92 i 11,32 mikronów.

Widmo w nadfiolecie składnika D, wykonane w etanolu, wykazuje λ_{max} 235 m μ (roztwór obojętny) i 270 m μ w środowisku kwaśnym.

Składnik H jest bezpostaciową substancją o barwie białej, masie cząsteczkowej, oznaczonej metodą spektrofotografii masowej, 425 i temperaturze topnienia około 74—77°C. Wzór sumaryczny — $C_{28}H_{43}NO_2$.

Miareczkowanie elektrometryczne składnika H w 66% dwumetyloformamidzie wykazuje istnienie jednej miareczkującej się grupy o pKa 6,9.

Skręcalność właściwa $[\alpha]_D^{25} = +15^\circ$ ($C = 0,147$, MeOH). Jak pokazano na fig. 4, składnik H wykazuje charakterystyczne maksima absorpcji w podczerwieni przy następujących długościach fal: 3,40, 3,50, 6,20, 6,60, 6,90, 7,20, 8,35, 9,35, 9,70, 10,40, 10,85 i 11,25 mikronów.

W świetle nadfioletowym składnik H wykazuje maksimum absorpcji w roztworze obojętnym i zasadowym przy λ_{max} 235 m μ i λ_{max} 270 m μ w środowisku kwaśnym.

Składnik L mieszaniny A-25822 jest bezpostaciową substancją o barwie żółtej, masie cząsteczkowej 425, oznaczonej metodą spektrofotografii masowej. Wzór sumaryczny $C_{28}H_{43}NO_2$. Analiza elementarna wykazuje następujący skład składnika L: węgiel 78,68%, wodór — 9,74%, azot — 3,06%. Miareczkowanie elektromagnetyczne, wykonane w 66% dwumetyloformamidzie, wykazuje istnienie jednej miareczkującej się grupy o pKa 4,75.

Widmo w podczerwieni, wykonane w chloroformie, wykazuje następujące charakterystyczne maksima absorpcji: 2,80, 2,93, 3,40, 3,50, 6,0, 6,10, 6,19, 6,32, 6,84, 6,89, 7,29, 7,36, 7,44, 7,66, 7,79, 7,95, 8,04, 8,18, 8,40, 8,74, 8,88, 9,18, 9,37, 10,41, 10,75, 10,90, 11,28 i 11,85 mikronów.

Widmo w nadfiolecie wykazuje maksimum absorpcji przy λ_{max} 262 m μ w roztworach obojętnych i zasadowych, i przy λ_{max} 279 m μ w roztworze kwaśnym. Skręcalność właściwa $[\alpha]_D^{25} = +75^\circ$ ($C = 0,072$, MeOH).

Składnik M mieszaniny A-25822 jest półkrystaliczną substancją o barwie żółtej i temperaturze topnienia 140°C. Masa cząsteczkowa, oznaczona metodą spektrofotografii masowej, wynosi 452.

Wzór sumaryczny określono jako — $C_{30}H_{47}NO_2$.

Analiza elementarna wykazała następujący skład procentowy pierwiastków: węgiel — 78,04%, wodór — 10,83%, azot — 3,07%.

Skrećalność właściwa składnika M wynosi $[\alpha]_D^{25} = -15^\circ$ ($C = 0,021$, MeOH).

Miareczkowanie elektrometryczne tego składnika w 66% dwumetyloformamidzie wykazało istnienie jednej grupy miareczkującej się o pK_a 7,9.

Widmo w podczerwieni (fig. 6) składnika M, wykonane w chloroformie, wykazuje charakterystyczne maksima absorpcji przy: 3,45, 3,52, 5,82, 6,20, 6,84, 6,90, 7,0, 7,30, 7,38, 8,2—8,35, 9,21, 9,36, 9,60, 9,77, 9,80, 10,20, 10,60 i 11,28 mikronów.

Składnik M wykazuje absorpcję w nadfiolecie przy λ_{max} 239 m μ w roztworach obojętnych i zasadowych. W roztworach kwaśnych λ_{max} jest przesunięta i wynosi 279 m μ .

Składnik N grupy antybiotyków A-25822 jest krystaliczną substancją o barwie białej, topniejącą w temperaturze około 165°C. Masa cząsteczkowa, oznaczona na podstawie spektrografii masowej, wynosi 409, a wyliczony wzór sumaryczny - $C_{28}H_{43}NO$.

Analiza elementarna składnika N wykazuje następującą zawartość pierwiastków: węgiel — 82,09%, wodór — 10,58% i azot — 3,42%.

Skrećalność właściwa $[\alpha]_D^{25} = -14^\circ$ ($C = 0,05$ MeOH).

Miareczkowanie elektrometryczne składnika N w 68% dwumetyloformamidzie wykazuje istnienie jednej grupy miareczkującej się o pK_a 7,45.

Jak pokazano na fig. 7, widmo w podczerwieni składnika N, wykonane w chloroformie, wykazuje charakterystyczne maksima absorpcji przy: 3,40, 3,50, 5,88, 6,30, 6,85, 7,28, 8,15—8,38, 9,35 i 11,25 mikronów.

W nadfiolecie składnik N wykazuje maksimum przy λ_{max} 240 m μ w środowisku obojętnym i zasadowym, przesunięte w środowisku kwaśnym do wartości 280 m μ .

Ustalono strukturę składnika A, pochodnych octanowych składników A, B i M (pochodna octanowa składnika B) i przedstawiono we wzorze ogólnym 1, w którym R_1 i R_2 oznaczają równocześnie atomy wodoru lub grupy metylowe, a R_3 oznacza grupę hydroksylową lub acetoksyłową.

Gdy R_1 i R_2 oznaczają równocześnie atomy wodoru, a R_3 grupę hydroksylową wzór ogólny 1 przedstawia składnik B. Składnik M przedstawiony jest wzorem ogólnym 1, w którym R_1 i R_2 oznaczają równocześnie atomy wodoru, a R_3 oznacza grupę acetoksyłową. Gdy R_1 i R_2 oznaczają równocześnie grupy metylowe, a R_3 oznacza hydroksylową, wzór ogólny 1 przedstawia składnik A. Pochodną octanową składnika A ($R_1 = R_2 =$ grupa metylowa, R_3 — grupa acetoksyłowa (wytwarza się syntetycznie ze składnika A, poddając go reakcji z bezwodnikiem octowym w pirydynie. Również składnik M można otrzymać na drodze syntezy, poddając reakcji z bezwodnikiem octowym w pirydynie składnik B.

We wzorze ogólnym 1 wiązanie pomiędzy atomami zaznaczone poziomymi kreskami, oznaczają konfigurację, podczas gdy wiązania dwóch angularnych (narożnych) grup metylowych i grupy hydroksylowej lub acetoksyłowej zaznaczone liniami ciągłymi oznaczają konfigurację β .

Nazwy systematyczne antybiotyków A-25822 zostały utworzone zgodnie z ogólnie przyjętą nomenklaturą związków stereoidowych. Sposób numerowania poszczególnych pozycji jest przedstawiony we wzorze ogólnym 2. Składnik A — 3 β -hydroksy-24-metyleno-14a-aza-D-homo-4,4-dwumetylo-5 α -cholestdien-8(9), 14(14a). Pochodna octanowa składnika A — 3 β -acetoksy-24-metyleno-14a-aza-D-homo-4,4-dwumetylo-5 α -cholestdien-8(9), 14(14a).

Składnik B i jego pochodna octanowa M noszą nazwy: 3 β -hydroksy-24-metyleno-14a-aza-D-homo-5 α -cholestdien-8(9), 14(14a) i 3 β -acetoksy-24-metyleno-14a-aza-D-homo-5 α -cholestdien-8(9)-, 14(14a). Składnik N jest 3-keto-24-metyleno-14a-aza-D-homo-5 α -cholestdienem-8(9), 14(14a).

Strukturę składników mieszaniny A-25822 A, B, M i N ustalono na podstawie badania ich właściwości fizycznych i chemicznych oraz na podstawie widm magnetycznego rezonansu jądrowego i widm w podczerwieni, i potwierdzono krystalograficzną analizą rentgenowską.

Struktura pozostałych składników A-25822 (D, L i H) nie została jeszcze ustalona, jakkolwiek dla składników D i L została wstępnie zaproponowana. Składnik D, zawierający dwie grupy hydroksylowe, odpowiadałby podstawionemu w pozycji 15 grupą hydroksylową składnikowi B czyli byłby 3,15-dwuhydroksy-24-metyleno-14a-aza-D-homo-5 α -cholestdienem-8(9), 14(14a). Składnik L odpowiadałby 15-keto pochodnej składnika B, czyli 3 β -hydroksy-15keto-24-metyleno-14a-aza-D-homo-5 α -cholestdienowi-8(9), 14(14a). Struktury składnika H jeszcze nie ustalono.

Antybiotyki A-25822 stosuje się w postaci wolnej zasady lub w postaci nietoksycznych, dopuszczalnych w farmacji soli addycyjnych.

Wolne zasady antybiotyków A-25822 tworzą łatwo addycyjne sole z kwasami mineralnymi takimi, jak kwasy chloro i bromowodorowy, siarkowy i fosforowy oraz z kwasami karcoksyłowymi takimi, jak octowy, propionowy, cytrynowy, maleinowy, benzoowy, winowy, szczawiowy, bursztynowy, askorbinowy, jabłkowy i podobne, oraz z kwasami sulfonowymi takimi, jak np. benzenosulfonowy, p-toluenosulfonowy, metanosulfonowy, laurylosulfonowy i inne.

Składniki A-25822 reagują z jodkiem metylu, dając krystaliczne metylojodki.

Mieszanina A-25822, jak i poszczególne składniki w postaci wolnych zasad nie rozpuszczają się praktycznie zupełnie w wodzie, są natomiast rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych takich, jak dwumetyloformamid, dwumetylosulfotlenek, aceton, octan etylu i izoamylu, metanol, etanol, chloroform i innych. Rozpuszczalność ich jest mniejsza w niżej podanych polarnych rozpuszczalnikach takich, jak benzen czy czterochlorek węgla i najmniejsza w węglowodarach parafinowych takich, jak pentan, heksan i heptan.

Sole mieszaniny A-25822 i jej składników są dobrze rozpuszczalne w wodzie, jak na przykład chlorowodorek lub siarczan składnika B.

Składnik B jako wolna zasada jest substancją

polimorficzną. Krystalizacja z różnych rozpuszczalników prowadzi do uzyskiwania substancji o różnych temperaturach topnienia i różnych rentgenowskich obrazach dyfrakcyjnych. Na przykład krystalizacja wolnej zasady z n-heksanu prowadzi do wytworzenia substancji o temperaturze topnienia 56–58°C. Krystalizacja z pentanu prowadzi do uzyskania wolnej zasady o temperaturze topnienia 42–44°C, natomiast z mieszaniny aceton-heksan 115–118°C.

Każda z form krystalicznych wykazuje takie same wyniki analizy elementarnej, miareczkowania i analizy spektralnej, a różni się jedynie temperaturą topnienia i analizą rentgenograficzną. Ze względu na czynność optyczną składników A-25822 wydaje się, że polimorficzność wykazywana przez składnik B jest związana ze zjawiskiem diastereomerii.

Występowanie składnika B w wielu postaciach jest typowe dla wielu azasteroidów.

Składniki A, B i L reagują z bezwodnikiem octowym, dając pochodną jednooctanową, natomiast składnik D tworzy pochodną dwuoctanową.

Mieszanina antybiotyków A-25822 oraz poszczególne składniki hamują wzrost mikroorganizmów, wywołujących choroby u zwierząt i roślin. Mieszanina A-25822, jak również jej pojedyncze składniki są szczególnie aktywne *in vivo* i *in vitro* w stosunku do chorobotwórczych grzybów i mogą być stosowane przy zwalczaniu chorób wywołanych grzybami u zwierząt i ludzi.

Pochodna octanowa składnika A, o wzorze podanym uprzednio ($R_1 = R_2 =$ grupa metylowa — $R_3 =$ grupa acetoksylova), wytwarzana na drodze reakcji z bezwodnikiem octowym w pirydynie, jest nieco mniej aktywna niż składnik A. Podobnie pochodna octanowa składnika B (składnik M) jest nieco mniej aktywna od składnika B. Obie pochodne octanowe stosuje się w podobny sposób, jak wyjściowe związki hydroksylowe, w hamowaniu wzrostu grzybów.

Tablica I przedstawia najmniejsze stężenie hamujące antybiotyków A-25822, oznaczone standardową metodą płytkową w stosunku do szeregu wybranych szczepów mikroorganizmów.

Tablica I

Aktywność przeciwbakteryjna antybiotyków A-25822 *in vitro*

	Drobnoustrój	Najmniejsze stężenie hamujące mcg/ml
5		
10	Staphylococcus aureus 3055	25
	Streptococcus faecalis	50
	Klebsiella aerobacter KA 17	50
	Pasteurella multocida	10
15	Erwinia amylovora	6,25
	Xanthomonas phaseoli	50
	Candida tropicalis A 17	78
	Trichophyton mentagrophytes	78
	Botrytis cinerea	3,12
20	Fusarium oxysporum	25
	Verticillium albo-atrum	1,56

Wrażliwość *in vitro* wybranych patogennych grzybów na mieszaninę A-25822 oraz na poszczególne składniki A, B i D oznacza się metodą rozcieńczeń, stosując pożywkę Sabourauda. Silikonowane szklane próbówki, zawierające podwójnie rozcieńczony antybiotyk w pożywkę Sabourauda, inokuluje się zawiesiną, sporządzoną ze zhomogenizowanych grzybni. Inokulowane próbówki inkubuje się na obrotowej wstrząsarce przy 250 obrotach/minutę. Wszystkie oznaczenia wykonuje się wtedy, gdy w próbówkach kontrolnych pozbawionych antybiotyku pojawi się obfity wzrost. Najmniejsze stężenie hamujące wyznacza się jako najmniejsze stężenie antybiotyku, hamujące w wyraźny sposób rozwój grzybów.

Próbówki, nie zawierające w pożywkę antybiotyku, inokuluje się następnie z próbek, w których było najmniejsze stężenie hamujące wzrost grzybów, celem oznaczenia dawki letalnej.

Tablica II pokazuje najmniejsze stężenie hamujące i najmniejszą dawkę letalną mieszaniny A-25822 oraz składników A, B i D w odniesieniu do wybranych grzybów chorobotwórczych.

Tablica II

Aktywność przeciwgrzybowa antybiotyków A-25822 *in vitro*
Oznaczenie brzożki metodą rozcieńczeniową

Antybiotyk	Candida albicans A-25	Candida albicans A-26	Cryptococcus neoformans	Trichophyton mentagrophytes	Trichophyton rubrum	Mycosporum gypseum
Najmniejsze stężenie hamujące/najmniejsza dawka letalna mcg/ml						
A-25822 mieszanina	1.25/2.5	2.5/5.0	0.078/0.625	0.0156/0.0625	0.0156/0.0625	0.0625/0.5
Składnik A	1.25/40	2.5/40	0.156/1.25	0.0019/1.0	0.0019/0.5	0.0156/1.0
Składnik B	0.625/20	2.5/40	0.156/1.25	0.0039/1.0	0.0156/1.0	0.0156/1.0
Składnik D	10/40	10/40	1.25/5	0.5/1.0	0.5/1.0	1.0/1.0

W tablicy III pokazano aktywność przeciwgrzybową in vitro składników H, L, M i N. Podane wielkości oznaczają najmniejsze stężenie hamujące danego antybiotyku, wyrażone w mikrogramach na mililitr.

Tablica III

Aktywność przeciwgrzybowa antybiotyków A-25822 in vitro

Najmniejsze stężenie hamujące mcg/ml					
Składnik A-25822	Candida ¹ albicans	Trichophyton ¹ mentagrophytes	Cryptococcus ² neoformans	Blastomyces ² dermatitidis	Histoplasma ³ capsulatum
H	0.625	0.156	10	0.625	0.625
L	0.625	0.156	2.5	0.625	0.625
M	1.0	0.25	10	5.0	2.5
N ³	2.5	0.312	5.0	0.625	0.625

¹) metoda płytkowa

²) metoda rozcieńczeń agarowych

³) siarczan składnika N

Aktywność in vivo mieszaniny antybiotyków A-25822 oraz jego pojedynczych składników oznaczano na myszach, zakażonych *C. albicans*.

W tablicy IV przedstawiono aktywność in vivo mieszaniny A-25822 składników A, B i D. Wyniki, podane w tablicy, otrzymano na podstawie testowania myszy, przeprowadzonego w następujący sposób.

Grupę myszy po uprzednim napromieniowaniu dawką 400 r (rentgenów) zakażono przez podanie dożylnie komórek *Candida albicans* A26 1×10^6 komórek/mysz. Następnie po czasie od 0 do 2 godzin podawano podskórnie oznaczany składnik. Przedłużenie czasu życia myszy, której podano antybiotyk w stosunku do czasu życia myszy kontrolnej, której nie podano antybiotyku, oznacza aktywność przeciwgrzybową.

Tablica IV przedstawia wyniki, uzyskane po podaniu podskórnym (sc.) dawki antybiotyku, wyrażonej w mg/kg wagi ciała. Czas przeżycia podano w procentach w stosunku do czasu przeżycia myszy kontrolnej. Prawa kolumna wskazuje LD₅₀ (dawka śmiertelna 50% testowanej grupy myszy), oznaczoną po czasie 7 dni, badaną tylko dla dawki 50 mg/kg wagi ciała.

Składniki A-25822 stosuje się jako środki przeciwgrzybowe w postaci wolnej zasady lub nietoksycznych, dopuszczalnych w farmacji soli z kwasami takimi, jak kwas solny lub siarkowy. Sole te ze względu na łatwą rozpuszczalność w wodzie są korzystne podczas ich stosowania. Na przykład mogą być stosowane w postaci rozpylanych roztworów wodnych z dodatkiem środka zwilżającego do zwalczania szkodliwych grzybów. Podobnie sole te można podawać przy zakażeniach grzybami do otrzewnowo w postaci izotonicznych roztworów.

W pewnych przypadkach można stosować oczyszczoną mieszaninę antybiotyków A-25822 bez konieczności rozdzielania i stosowania pojedynczych składników. Na przykład przy zwalczaniu grzybów,

atakujących zewnętrznie powierzchnie przedmiotów, na przykład pomieszczenia do pryszniców, zewnętrzne powierzchnie drewniane, powierzchnię papieru i przedmiotów plastikowych itp., stosuje się mieszaninę antybiotyków w postaci wolnych

Tablica IV

Aktywność przeciwgrzybowa in vivo antybiotyków A-25822

Składnik antybiotyku	Dawka mg/kg sc.	Procent przeżywalności w stosunku do myszy kontrolnej	LD ₅₀ mg/kg (po 7 dniach)
Mieszanina A-25822	50	32	19,95
	25	105	
	12,5	71	
	6,25	63	
Składnik A	50	46	10
	25	75	
	12,5	58	
Składnik B	50	16	10
	25	106	
	12,5	16	
	6,25	23	
Składnik D	50	64	10
	25	9	

zasad lub rozpuszczalnych w wodzie soli. Natomiast, gdy zwalcza się infekcję wewnątrz organizmów żywych, pożądane jest stosowanie wyizolowanego, pojedynczego składnika, np. składnika B.

Antybiotyki A-25822 stosuje się również w zwalczaniu infekcji, przypisywanych pasożytom skóry. Na przykład zaatakowaną powierzchnię skóry poddaje się działaniu wodnego roztworu składnika A-25822 o stężeniu większym, niż najmniejsze stężenie hamujące rozwój danego drobnoustroju. Zabieg ten przeprowadza się, stosując antybiotyk w postaci aerozolu lub pynu, lub stosując przecie-

ranie chorej powierzchni skóry. Roztwory antybiotyków A-25822 mogą służyć do zapobiegania rozprzestrzenianiu się grzybic, na przykład przez stosowanie ich w miejscach mycia nóg na pływalniach, w budynkach gospodarczych i użyteczności publicznej.

Drobnoustrój, wytwarzający antybiotyki A-25822, został wyodrębniony metodą kolejnych rozcieńczeń z próbki gleby, pochodzącej z Grand Teton National Park z okolic Wyoming. Drobnoustrój ten został taksonomicznie zidentyfikowany jako nowy szczep *Geotrichum Flavobrunneum* (Miller i współpracownicy), co opisano zgodnie z odpowiednimi przepisami.

Na ogół nowy szczep, produkujący antybiotyki A-25822, jest niepełnym grzybem, który tworzy grzybnię podzieloną. Konidia, powstające przy podziale grzybni, są grubocienne, krótkie, cylindryczne, przezroczyste, o ściętych końcach.

Kolonie, wyhodowane na agarze ziemniaczano-dakstrynowym, po inkubacji w temperaturze pokojowej w ciągu 18 godzin, mają średnicę, wynoszącą 7,8 cm. Powierzchnia kolonii ma barwę jasno-czekoladowo-brązową (6E tablica 13 w Maerz and Paul, A Dictionary of Color, 1950, Mc Graw-Hill, N.Y.). Kolonia wykazuje powolny wzrost, matowieje i strzępki grzybni wzrastają pasmowo. Grzybnia podstawowa ma barwę jasno-karmelowo-żółtą i wytwarza pigment, dyfundujący poprzez agar.

Kolonie, wyhodowane na agarze kukurydzianym, są cienkie, przeważnie głębinowe, bezbarwne, albo o barwie jasnożółtej lub jasnobrązowej. Strzępki wegetatywne są bezbarwne lub posiadają jasną pigmentację w wyraźnymi przegrodami.

Na podłożu, opisanym powyżej, powstają dwa rodzaje komórek rozrodczych:

1) artrospory o wymiarach $4,0 - 9,0 \times 2,2 - 4,0$ mikronów, ścięte, gładkie o jasnym pigmentcie, powstające poprzez fragmentację pionowych strzępków grzybni powietrznej lub fragmentację strzępków pełzających lub obydwu rodzajów jednocześnie, połączone w łańcuchy nierozgałęzione lub rzadko tworzące jedno lub dwa boczne odgałęzienia, o najczęściej spotykanej długości od 90 do 100 mikronów.

2) włączone chlamydospory: grubocienne, gładkie, bezbarwne lub o barwie żółtawej, kuliste lub owalne, o wymiarach od 9×7 mikronów do 21×11 mikronów, o średnich wymiarach $14 - 16 \times 9 - 11$ mikronów.

Na podstawie wyżej opisanych badań taksonomicznych szczep, produkujący antybiotyki A-25822, sklasyfikowano jako nowy szczep *Geotrichum flavo-brunneum* (Miller, J.H. i współpracownicy *Mycologia* — 49, 779—808, (1957).

Opisywana hodowla w charakterystyczny sposób wytwarza wiele dodatkowych chlamydosporów, o czym nie wspomina taksonomia, umieszczona w cytowanym odsyłaczu, ale zgadza się to pod każdym względem z taksonomią, publikowaną dla tego gatunku.

Drobnoustrój, wytwarzający antybiotyk A-25822, pochodzi z kolekcji Agricultural Research Service, Northern Utilization Research and Development Division, Department of Agriculture, Peoria, Illi-

nois, gdzie został zdeponowany bez ograniczeń korzystania z kolejnym numerem kolekcji NRRL 3862.

Drobnoustrój, wytwarzający mieszaninę antybiotyków A-25822 hoduje się na jakimkolwiek podłożu, zawierającym źródła energii, niezbędne dla rozwoju szczepu. Tak więc w podłożu hodowlanym mogą znajdować się różnorodne węglowodany, zaspokajając zapotrzebowanie drobnoustroju na węgiel, oraz różne źródła azotu takie, jak aminokwasy i ekstrakty gorzelniane.

Ze względu na ekonomikę wytwarzania, optymalną wydajność oraz łatwość izolowania antybiotyków, pewne podłoża są bardziej korzystne. Np. jednym z bardziej korzystnych źródeł węglowodanów jest melasa, chociaż można także stosować glukozę lub sacharozę. Korzystnymi źródłami azotu są peptony, mączka sojowa, mieszanina aminokwasów itp. Jak zwykle do podłoża omawianej hodowli dodaje się sole nieorganiczne, zawierające jony sodowe, potasowe, amonowe, wapniowe, fosforanowe, chlorkowe, węglanowe itp. Dla zapewnienia wzrostu i rozwoju drobnoustrojów, wytwarzających antybiotyki A-25822, w podłożu hodowlanym muszą znajdować się pewne pierwiastki w ilościach śladowych. Te pierwiastki zwykle występują jako zanieczyszczenia w innych składnikach podłoża w ilościach, wystarczających do osiągnięcia ilości, niezbędnych dla wzrostu drobnoustroju.

Drobnoustrój, wytwarzający mieszaninę antybiotyków A-25822, może wzrastać w różnych warunkach. Np. będzie wzrastać na różnych podłożach, w których wartość początkowa pH zawiera się w szerokich granicach. Jednak pożądana wartość pH podłoża, dla zapoczątkowania fermentacji mięsici się w granicach około 6—8 pomiędzy około 6—7. Zwykle podczas wzrostu drobnoustroju pH podłoża zwiększa się stopniowo od wartości początkowej do pH = 7,5 lub wyżej. Końcowa wartość pH podłoża zależy przynajmniej w części od wielu czynników takich, jak: początkowa wartość pH podłoża, bufora obecne w podłożu, oraz czasu wzrastania drobnoustroju.

Drobnoustrój, wytwarzający mieszaninę antybiotyków A-25822, może wzrastać w różnych typach podłoży, np. na skosach agarowych, w wytrząsanych kolbach lub w tankach fermentacyjnych.

Sposobem według wynalazku mieszaninę antybiotyków A-25822 wytwarza się w dużej skali w warunkach napowietrznej fermentacji głębinowej. Dla wytworzenia odpowiednio mniejszych ilości mieszaniny antybiotyków A-25822, stosuje się wytrząsane kolby lub butle (hodowle powierzchniowe).

Podczas wytwarzania mieszaniny antybiotyków A-25822 metodą napowietrznej fermentacji głębinowej, drobnoustrój początkowo wzrasta na skosie agarowym, który następnie wprowadza się do inokulum wegetatywnego. Otrzymane w ten sposób inokulum wegetatywne zabezpiecza szybki wzrost drobnoustroju w małej skali.

Inokulowane podłoże wegetatywne pozwala otrzymać zdolną do życia hodowlę wzrastającego drobnoustroju, którą następnie używa się do inokulowania tanków.

Zastosowanie inokulum wegetatywnego jako pośredniego stadium w wytwarzaniu mieszaniny antybiotyków jest korzystne w bezpośredniej inokulacji i w dużej skali tanku fermentacyjnego zarodnikami, uzyskanymi ze skosów agarowych. Podłoże fermentacyjne w tanku, inokulowane przy użyciu podłoża wegetatywnego, daje szybszy wzrost drobnoustroju, niż w przypadku bezpośredniej inokulacji tanku skosami agarowymi. Tak szybki wzrost, uzyskany przy zastosowaniu inokulum wegetatywnego, jest bardzo pożądany, ponieważ skraca czas produkcji antybiotyków.

Szczep, wytwarzający mieszaninę antybiotyków A-25822, najszybciej wzrasta w zakresie temperatur 26—35°C. Optymalna produkcja mieszaniny antybiotyków zachodzi w zakresie temperatur około 25—28°C.

Jak zwykle w procesach napowietrzanej fermentacji głębinowej, do podłoża fermentacyjnego podczas fermentacji wprowadza się sterylne powietrze. Dla zapewnienia wysokiego wzrostu drobnoustroju i w konsekwencji wydajnej produkcji mieszaniny antybiotyków objętość wprowadzanego powietrza musi być większa, niż 1/10 objętości podłoża w ciągu 1 minuty. W napowietrzanej fermentacji głębinowej uzyskuje się optymalną wydajność mieszaniny antybiotyków A-25822, jeśli wprowadza się co najmniej 0,3 objętości powietrza w ciągu 1 minuty na 1 objętość podłoża hodowlanego.

Przeważnie maksymalną produkcję mieszaniny antybiotyków A-25822 w warunkach napowietrzanej fermentacji głębinowej uzyskuje się pomiędzy około 3—6 dniem po inokulacji podłoża hodowlanego, w wytrząsanych kolbach. Maksymalną wartość produkcji mieszaniny antybiotyków w dużych tankach fermentacyjnych uzyskuje się po czasie 72 godzin. W warunkach hodowli powierzchniowej pożądaną wielkość produkcji mieszaniny antybiotyków osiąga się po znacznie dłuższym okresie czasu.

Przebieg fermentacji śledzi się poprzez okresowe badanie podłoża fermentacyjnego wobec szczepów, wrażliwych na działanie mieszaniny antybiotyków A-25822, takich jak *Candida tropicalis* i *Trichophyton mentagrophytes*.

Opisaną powyżej mieszaninę antybiotyków, wytworzoną w procesie napowietrzanej fermentacji głębinowej, izoluje się z brzożki fermentacyjnej metodami ogólnie znanymi. Większą część wyprodukowanej przez drobnoustroj mieszaniny antybiotyków zawiera grzybnia, zaś w odsączonej brzożce znajdują się tylko niewielkie ilości antybiotyków. Np. po przeprowadzeniu fermentacji w tanku o pojemności około 1000 litrów, około 90% wyprodukowanej mieszaniny antybiotyków odsąca się razem z grzybnia, zaś pozostałe 10% zawarte jest w przesączu.

W opisanych powyżej warunkach szczep, opisany powyżej i oznaczony jako szczep NRRL 3862, wytwarza mieszaninę antybiotyków, w której głównym składnikiem jest składnik B. Na ogół składnik B stanowi około 80—90% całkowitej uzyskiwanej aktywności antybiotycznej. Wszystkie pozostałe

składniki stanowią resztę aktywności antybiotycznej.

Antybiotyki A-25822 wyodrębnia się po fermentacji, w postaci mieszaniny.

Ponieważ przeważająca ilość aktywności antybiotycznej wiąże się z grzybnia, podłoże fermentacyjne sączy się, oddzieloną grzybnia ekstrahuje odpowiednimi rozpuszczalnikami organicznymi takimi, jak niższe alkohole np. metanol, etanol lub izopropanol, estry, np. octan amylu i octan izoamylu. Korzystnie stosuje się octan etylu. Ekstrakt suszy się, rozpuszczalnik oddestylowuje i otrzymuje surową mieszaninę antybiotyków w postaci suchej pozostałości.

Mozna także ekstrahować całą brzożkę fermentacyjną organicznym rozpuszczalnikiem, nie mieszając się z wodą takim, jak octan etylu. Następnie otrzymany ekstrakt sączy się i stosuje tak postępowania taki, jak w pierwszym etapie przy otrzymywaniu surowej mieszaniny antybiotyków. Otrzymaną surową mieszaninę antybiotyków A-25822 rozpuszcza się w rozpuszczalniku organicznym i oczyszcza się przez przemycie kwasem lub zasadą, albo metodami chromatografii kolumnowej na odpowiednim absorbencie takim, jak tlenek glinu lub żel krzemionkowy.

Sposób korzystny według wynalazku polega na ekstrahowaniu całej brzożki fermentacyjnej odpowiednim rozpuszczalnikiem organicznym takim, jak octan etylu lub amylu i przemyciu ekstraktu w celu usunięcia zanieczyszczeń. Korzystnie ekstrakt przemyci się wodnym roztworem kwasu w celu wymycia zasadowych antybiotyków w postaci soli addycyjnych. Otrzymaną kwaśną fazę wodną alkalinizuje się zasadą taką, jak wodorotlenek sodowy i antybiotyki w postaci wolnych zasad ponownie ekstrahuje rozpuszczalnikiem organicznym takim, jak octan etylu lub eter dwuetylowy. Ekstrakt organiczny przemyci się, suszy, rozpuszczalnik oddestylowuje i otrzymuje oczyszczoną mieszaninę rozpuszczalników w postaci suchej pozostałości.

Otrzymaną oczyszczoną mieszaninę antybiotyków rozdziela się znanymi metodami, np. chromatograficznymi i izoluje poszczególne składniki. Rozdział przeprowadza się na tlenku glinu lub żelu krzemionkowym albo metodą frakcjonowanej krystalizacji. Ze względu na ilość składników, obecnych w otrzymanej mieszaninie antybiotyków, a także z powodu podobieństw budowy składników mieszaniny, rozdziela się je i izoluje połączonymi metodami chromatografii i frakcjonowanej krystalizacji.

Składnik B, wytwarzany w przeważających ilościach, izoluje się bardzo łatwo. Pozostałe opisane powyżej składniki występują w mniejszych ilościach i rozdzielenie ich, i wyizolowanie jest znacznie trudniejsze. Np. składnik B otrzymuje się w postaci krystalicznej, stosując następujący sposób postępowania: mieszaninę antybiotyków rozpuszcza się w minimalnej ilości acetonu lub octanu etylu, rozcieńcza dużą ilością heksanu i oziębia do temperatury około -20 do -5°C.

Krystalizuje wtedy znaczna ilość składnika B. Osad odsąca się i oczyszcza przez ponowną kry-

stalizację. Przesącz odparowuje się do sucha, otrzymując pozostałość, zawierającą pozostałe składniki mieszaniny antybiotyków oraz niewielkie ilości składnika B. Pozostałość tę rozdziela się metodą chromatografii kolumnowej, stosując technikę gradientową na kolumnie, wypełnionej zasadowym tlenkiem glinu. Kolumnę eluuje się mieszaniną octanu etylu z heksanem i wodą, uzyskując rozdział pożądaných składników. Otrzymane eluaty rozdziela się ponownie, stosując metodę chromatografii oraz metodę frakcjonowanej kryształizacji i uzyskuje poszczególne składniki, występujące w mieszaninie w małych ilościach.

Następujące przykłady ilustrują całkowicie sposób wytwarzania mieszaniny antybiotyków A-25822 według wynalazku.

Przykład I. Zarodniki szczepu *Geotrichum flavo-brunneum* NRRL 3862 inokulowano na skosach agarowych o następującym składzie:

Składnik	Waga/objętość w g/l
Glukoza	20
Pepton	5
Fosforan jednopotasowy	0,5
Siarczan magnezowy	0,02
Siarczan żelazowy	0,01
Agar	20

Hodowle na skosach agarowych inkubuje się w temperaturze 25°C w ciągu 7 dni, a następnie przechowuje w lodówce aż do użycia. Zarodniki z hodowli na skosach, otrzymane sposobem, opisanym powyżej, przenosi się do podłoża vegetatywnego o objętości 100 mililitrów, umieszczonego w kolbie o pojemności 500 mililitrów i uzyskuje w ten sposób inokulum vegetatywne.

Skład podłoża inokulum vegetatywnego:

Składnik	Waga/objętość w g/l
Sacharoza	25
Melasa jadalna	36
Moczona kukurydza	6
Fosforan jednopotasowy	2
NZ case ¹	10
Woda wodociągowa	

Hodowlę vegetatywną wytrząsa się na wytrząsarce obrotowej przy 250 obrotach/minutę, w ciągu 24 do 48 godzin w temperaturze około 25°C i inkubuje się. 5% objętości otrzymanego inokulum vegetatywnego, zawierającego wznastający drobnoustrój, stosuje się do inokulowania podłoża fermentacyjnego do produkcji mieszaniny antybiotyków A-25822.

Skład podłoża fermentacyjnego:

Składnik	Waga/objętość w g/l
Glukoza	25
Moczona skrobia	10

¹ enzymatycznie hydrolizowana kazeina Scheffield Chemical Co., Norwich, N.Y.

Pepton (mięsny)	10
NZ Amina A ²	4
Melasa	5
Siarczan magnezowy średniowodny	5
Węglan wapniowy	2
Woda wodociągowa	

Początkowa wartość pH podłoża produkcyjnego wynosi 6,2. Po inokulowaniu prowadzi się fermentację w sterylnym tanku fermentacyjnym, mieszając w temperaturze 25°C w ciągu 72 godzin. Podczas fermentacji do podłoża produkcyjnego wprowadza się sterylne powietrze w ilości równej połowie objętości powietrza na jedną objętość podłoża fermentacyjnego w ciągu 1 minuty. Podczas fermentacji od czasu do czasu pobiera się próbki podłoża fermentacyjnego i bada ich aktywność antybiotyczną wobec szczepu *Trichophyton mentagrophytes*. W czasie fermentacji wartość pH podłoża stopniowo rośnie do końcowej wartości 7,3.

Mieszaninę antybiotyków A-25822 oddziela się od podłoża fermentacyjnego w następujący sposób: 900 litrów brzezki fermentacyjnej miesza się z równą objętością octanu etylu, sączy i rozdziela obie warstwy przesączu. Fazę wodną odrzuca się. Odsączoną grzybnię ekstrahuje się po raz drugi 100 litrami octanu etylu i odrzuca. Ekstrakty octanowe łączy się, rozpuszczalnik oddestylowuje się, a pozostałość przeprowadza do fazy wodnej o objętości 50 litrów i rozcieńcza wodą destylowaną do objętości 100 litrów. pH roztworu doprowadza się do wartości 10, dodając 5n roztwór wodorotlenku sodowego. Alkaliczny wodny roztwór dwa razy ekstrahuje się równymi porcjami octanu etylu.

Fazę wodną odrzuca się, zaś fazy organiczne łączy i oddestylowuje z nich rozpuszczalnik, uzyskując pozostałość w postaci oleju, zawierającą mieszaninę antybiotyków. Pozostałość tę rozpuszcza się w 20 litrach eteru dwuetylowego i przemycza dwukrotnie 10 litrowymi porcjami 2,5 n roztworu wodorotlenku sodowego, a następnie trzykrotnie 10 litrowymi porcjami zimnej wody destylowanej. Wszystkie fazy wodne odrzuca się, a roztwór eterowy zateża do objętości 5 litrów i dwukrotnie ekstrahuje 2 litrowymi porcjami 0,2 n roztworu kwasu siarkowego. Fazę organiczną odrzuca się, a kwaśne ekstrakty łączy, doprowadza pH do wartości 10,0 przy użyciu 5,0 n roztworu wodorotlenku sodowego. Następnie roztwór alkaliczny ekstrahuje się dwukrotnie 5-litrowymi porcjami n-heksanu i raz 5 litrami octanu etylu. Fazę wodną odrzuca się, a ekstrakty n-heksanowe łączy się i sączy. Przesącz suszy się nad Na₂SO₄, oddestylowuje się z niego rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem i otrzymuje 43 gramy surowej mieszaniny antybiotyków A-25822 w postaci piany. Ekstrakt octanowy sączy się, przesącz suszy nad Na₂SO₄, oddestylowuje z niego rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem i otrzymuje 1 gram mieszaniny antybiotyków A-25822 w postaci spienionej pozostałości.

W przykładzie II opisano rozdzielanie, oczyszczanie i izolowanie poszczególnych składników

² pankreatynowy hydrolizat kazeiny Scheffield Chemical Company, Norwich, N.Y.

mieszaniny antybiotyków A-25822. Ponieważ w mieszaninie antybiotyków A-25822 przeważa składnik B, to można go najłatwiej wyizolować spośród pozostałych 7 zidentyfikowanych składników wymienionej mieszaniny.

Przykład II. Mieszaninę antybiotyków, otrzymaną sposobem, opisanym w przykładzie I, rozpuszcza się w 200 mililitrach mieszaniny n-heksanu i acetonu o składzie 4:1. Otrzymany roztwór rozcieńcza się n-heksanem do objętości 1 litra i oziębia do temperatury -20°C . Krystaliczny składnik B w ilości 22,0 g odsącza się. Z przesączu oddestylowuje się rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem i otrzymuje 20 gramów mieszaniny antybiotyków w postaci stałej. Mieszaninę tę rozpuszcza się w górnej warstwie mieszaniny, zawierającej 80 części octanu etylu, 16 części n-heksanu i 4 części wody destylowanej. Roztwór przeprowadza się przez kolumnę o wymiarach 13 cm $\times$ 62 cm, wypełnioną zasadowym tlenkiem glinu (Woelm W200, Water Associates Inc., Framingham, Mass). Kolumnę napełnia się w górnej fazie mieszaniną octan etylu : n-heksan : woda 80:16:4, a następnie wypełnia adsorbentem. Kolumnę eluuje się tą samą mieszaniną, która służy jako rozpuszczalnik i zbiera frakcje o objętości 1 litra. Identyfikację składników w poszczególnych frakcjach przeprowadza się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Chromatografię cienkowarstwową prowadzi się na płytkach szklanych o wymiarach 20 cm $\times$ 20 cm, powleczonych warstwą żelu krzemionkowego F_{254} o grubości warstwy 0,25 mm, wyprodukowanych przez Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, N.Y. 11590. Płytki rozwija się w mieszaninie eter dwuetylowy : etanol 3:1. Identyfikację poszczególnych składników w odpowiednich frakcjach przeprowadza się metodą chromatografii gazowo-cieczowej.

W tablicy V przedstawiono kombinacje antybiotyków, występujące we frakcjach, otrzymanych po rozdzieleniu na kolumnie chromatograficznej.

Tablica V

Chromatograficzny rozdział składników mieszaniny antybiotyków A-25822 na zasadowym tlenku glinu

Zestaw antybiotyków	Frakcje połączone	Składnik mieszaniny antybiotyków
I	7—8	M i N
II	9—23	A i L
III	24—42	B i H
IV	43—48	B
V	55—70	D

Każdy zestaw antybiotyków zateża się przez oddestylowanie rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem i uzyskuje pozostałość w postaci oleju.

500 miligramów I zestawu antybiotyków, zawierającego składniki M i N, rozpuszcza się w

20 ml acetonu i oziębia do temperatury -20°C . Po krystalizacji, odsączeniu i wysuszeniu otrzymuje się 39 mg składnika N mieszaniny antybiotyków A-25822 w postaci słupów o barwie białej i temperaturze topnienia $156-9^{\circ}\text{C}$. Po powtórnej krystalizacji z acetonu otrzymuje się składnik N o temperaturze topnienia około 165°C . Z przesączu oddestylowuje się rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem i otrzymuje pozostałość w postaci oleju. Pozostałość tę rozpuszcza się w chloroformie i roztwór przeprowadza przez kolumnę o wymiarach 1,0 $\times$ 25 cm, wypełnioną zasadowym tlenkiem glinu, który uprzednio dezaktywuje się wodą destylowaną i przemycza chloroformem.

Wodę po dezaktywacji i chloroform po przemyciu odrzuca się. Kolumnę eluuje się chloroformem i zbiera frakcje o objętości 10 ml. Frakcje od 18 do 31 łączy się, rozpuszczalnik oddestylowuje pod zmniejszonym ciśnieniem i otrzymuje pozostałość w postaci oleju. Pozostałość tę rozpuszcza się w benzenie liofilizuje i otrzymuje 334 mg składnika M mieszaniny antybiotyków A-25822 jako bezpostaciowe ciało stałe o temperaturze topnienia około 140°C z rozkładem.

6,0 g II zestawu antybiotyków, zawierającego składniki A i L, rozpuszcza się w 100 ml acetonu, oziębia się do temperatury 4°C i pozostawia do krystalizacji. Otrzymane kryształy odsącza się i ponownie krystalizuje z gorącego acetonu, otrzymując 1,78 g składnika A mieszaniny antybiotyków A-25822 o temperaturze topnienia 147°C . Z pierwszego acetonowego przesącza oddestylowuje się aceton pod zmniejszonym ciśnieniem i otrzymuje pozostałość w postaci oleju. Pozostałość tę rozpuszcza się w chloroformie i roztwór przeprowadza przez kolumnę o wymiarach 1,7 cm $\times$ 58 cm, wypełnioną żelem krzemionkowym (Woelm Dry Column Grade, Activity III/30 mm., Alupharm Chemicals, New Orleans, La.).

Kolumnę wypełnia się suchym żelem i eluuje chloroformem. Rozdziela frakcje, zawierających poszczególne składniki A i L mieszaniny antybiotyków, wykrywa się w świetle ultrafioletowym przy długości fali 254 milimikrony. Następnie po nałożeniu kolumnę eluuje się porcją chloroformu o objętości, odpowiadającej 2,3 objętości kolumny. Składnik L zbiera się w objętości chloroformu, odpowiadającej jednej objętości kolumny. Z eluatu, zawierającego składnik L, oddestylowuje się rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem i otrzymuje 0,191 g składnika L mieszaniny antybiotyków A-25822 jako bezpostaciowe ciało stałe o temperaturze topnienia około 30°C .

8,0 g III zestawu antybiotyków, zawierającego składniki B i H, rozpuszcza się w chloroformie i przeprowadza przez kolumnę o wymiarach 6,2 cm $\times$ 12 cm, wypełnioną zdezaktywowanym zasadowym tlenkiem glinu. Kolumnę eluuje się chloroformem i zbiera większość frakcji o objętości 20 ml każda. Frakcje od 10 do 40, które zawierają składnik B łączy się. Osobno łączy się frakcje od 81 do 210, które zawierają składnik H. Obecność poszczególnych składników mieszaniny antybiotyków w wymienionych frakcjach stwierdza się me-

todami chromatografii gazowo-cieczowej i chromatografii cienkowarstwowej.

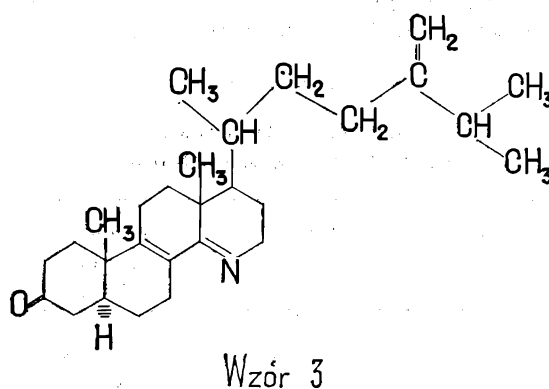
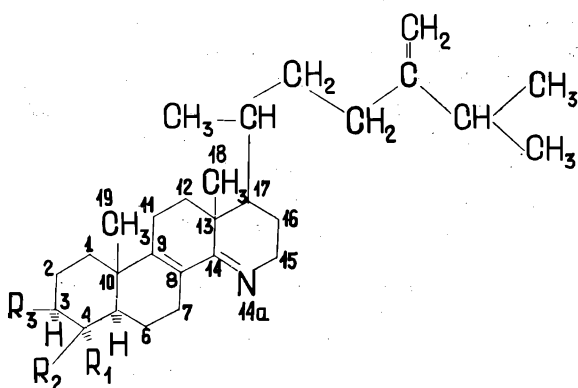
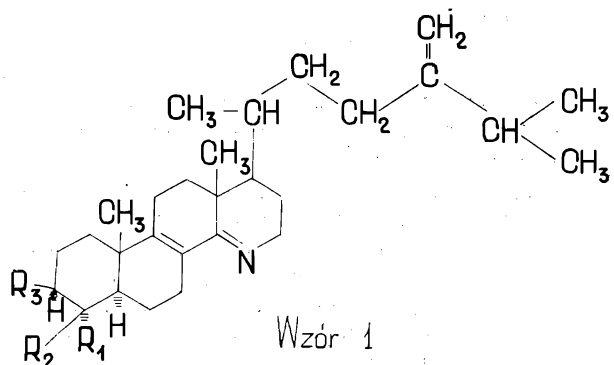
Z połączonych frakcji, zawierających składnik H, rozpuszczalnik oddestylowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem i otrzymuje się olej. Olej ten rozpuszcza się w 4 ml acetonu, roztwór acetonowy dzieli się na 6 części i każdą z nich nanosi na wyprodukowaną przez E. Merck płytkę szklaną do chromatografii cienkowarstwowej o wymiarach 20 cm × 20 cm, pokrytą warstwą żelu krzemionkowego F₂₅₄ o grubości 2,0 mm (Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, N.Y.), którą rozwija się w mieszaninie eter dwuetylowy: etanol 3:1. Z każdej płytki zeszkrobuje się żel, zawierający składnik H, a otrzymany materiał łączy, suszy na powietrzu i nanosi na wierzchołek kolumny o wymiarach 6,2 cm × 3 cm, wypełnionej żelem krzemionkowym (Grade 62,60 — 200, Mexh, Matheson, Coleman and Bell, Norwood, Ohio), który uprzednio przemywa się octanem etylu. Kolumnę eluuje się 1 litrem octanu etylu, eluat zbiera, rozpuszczalnik oddestylowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem i otrzymuje 0,146 g składnika H mieszaniny antybiotyków A-25822 jako bezpostaciowe ciało stałe o temperaturze topnienia 74—7°C.

2,5 g V zestawu antybiotyków, zawierającego składnik D, co stwierdza się metodą chromatografii cienkowarstwowej, rozpuszcza się w chloroformie i przeprowadza przez kolumnę o wymiarach 4,6 cm × 55 cm, wypełnioną żelem krzemion-

kowym, który uprzednio przemywa się chloroformem. Kolumnę eluuje się chloroformem, do którego dodaje się od 0 do 40% metanolu w gradencie liniowym. Zbiera się większość frakcji o objętości 20 ml. Składnik D eluuje się we frakcjach od 135 do 170, co wykrywa się metodami chromatografii cienkowarstwowej i chromatografii gazowo-cieczowej. Frakcje od 135 do 170 łączy się, rozpuszczalnik oddestylowuje pod zmniejszonym ciśnieniem i otrzymuje 0,818 g składnika D mieszaniny antybiotyków A-25822, jako bezpostaciowe ciało stałe o temperaturze topnienia około 51—5°C.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania mieszaniny nowych antybiotyków A-25822 oraz jej poszczególnych składników A, B, D, H, L, M i N w postaci wolnej lub soli addycyjnych z kwasami, **znamienny tym**, że hodowlę szczepu *Geotrichum flavo-brunneum* NRRL 3862 prowadzi się na podłożu, zawierającym przyswajalne źródła węgla, azotu i soli nieorganicznych, w warunkach napowietrzanej fermentacji głębinowej i otrzymaną mieszaninę antybiotyków ewentualnie izoluje się i rozdziela na poszczególne składniki lub przeprowadza w sól albo jedno i drugie, lub składnik A korzystnie przeprowadza w pochodną octanową.



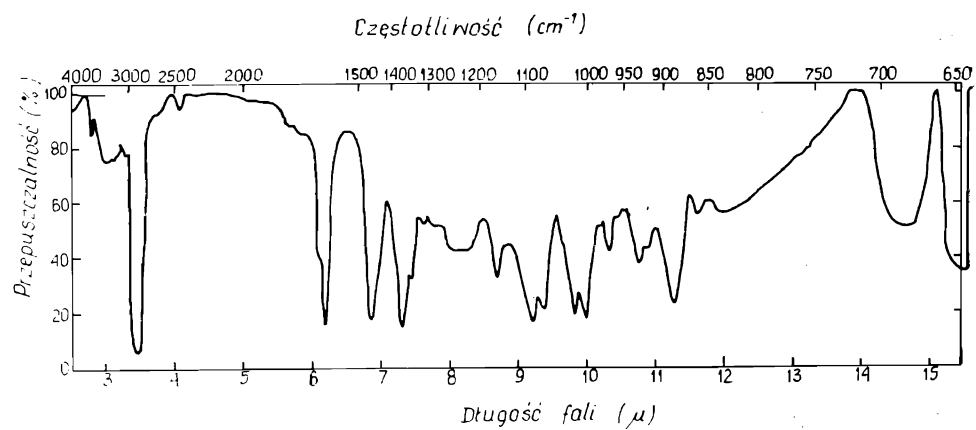


Fig. 1

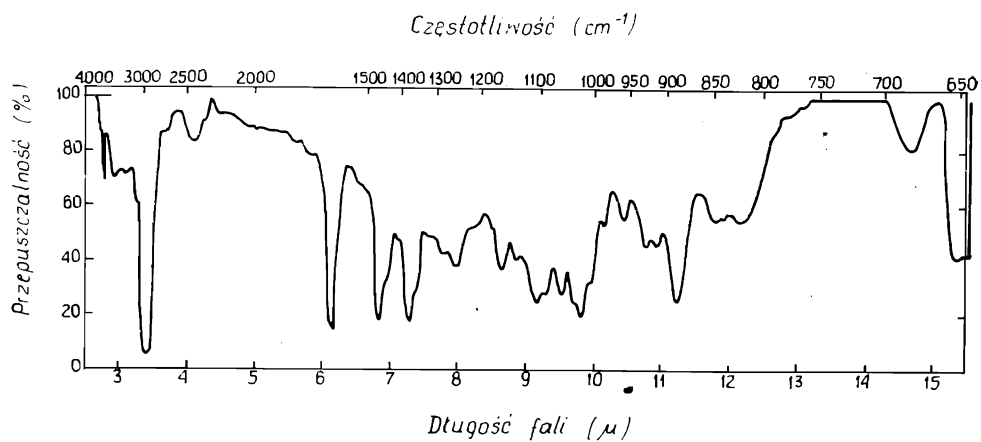


Fig. 2

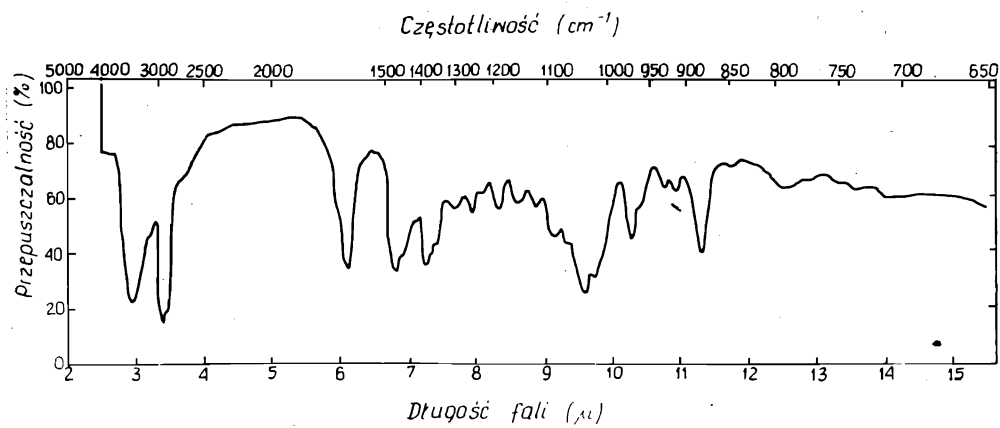


Fig. 3

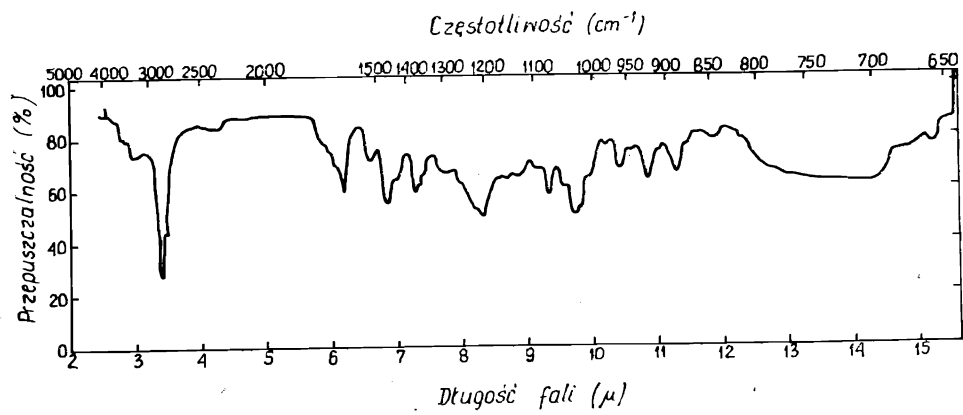


Fig. 4

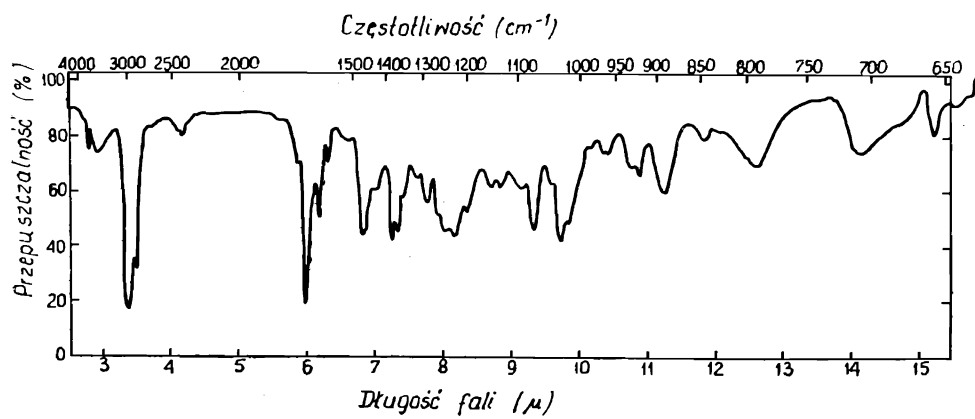


Fig. 5

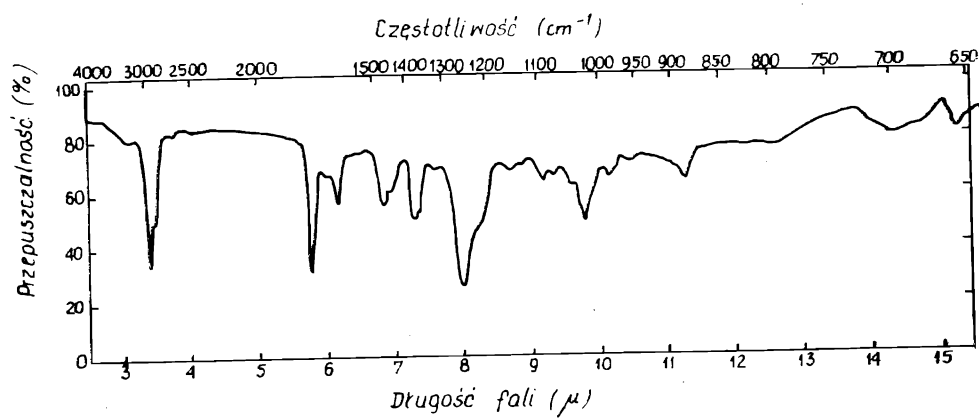


Fig. 6

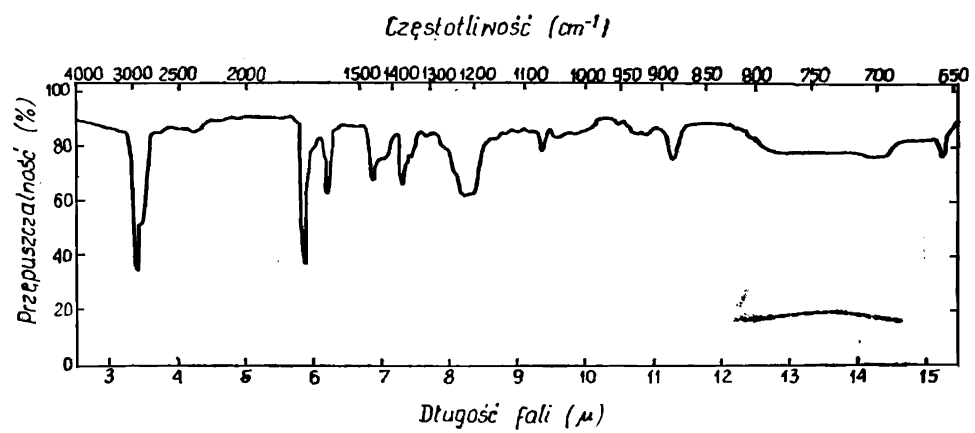


Fig. 7