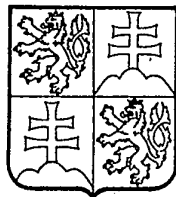


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

274 177

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
C 12 P 13/00

(21) PV 1502-88.T
(22) Přihlášeno 09 03 88

(40) Zveřejněno 12 09 90
(45) Vydáno 26 06 92

(75) Autor vynálezu

SAILER MILOSLAV RNDr.,
ŠAŠEK VÁCLAV RNDr. CSc.,
MUSÍLEK VLADIMÍR RNDr. PhMr. DrSc.,
SEJBAL JAN RNDr. CSc.,
BUDEŠÍNSKÝ MILOŠ RNDr. CSc., PRAHA

(54)

Kyselina 2-amino-2-hydroxymethyl-3,4-
-trans-epoxy-14-oxo-6-trans-eikosenová
a způsob její přípravy

(57) Řešení spadá do oblasti mikrobiologie s využitím ve zdravotnictví, popř. zemědělství. Nová sloučenina je kyselina 2-amino-2-hydroxymethyl-3,4-trans-epoxy-14-oxo-6-trans-eikosenová, která patří do skupiny aminokyselin s dlouhým alifatickým řetězcem obecného vzorce I. Kyselina se vyznačuje antibiotickými účinky proti kvasinkám a vláknitým houbám. Způsob přípravy kyseliny se provádí aerobní submerzní kultivací produkčního kmene *Melanconis flavovirens* s výhodou jeho mutanty (CCF č. 1 886) a ze získané biomasy se izoluje uvedená kyselina extrakčními a chromatografickými postupy.

Vynález se týká kyseliny 2-amino-2-hydroxymethyl-3,4-trans-epoxy-14-oxo-trans-eikosenové a způsobu její přípravy.

Dále je předmětem vynálezu použití této látky jako antibiotika. Kyselina se vyznačuje vysokou antibiotickou účinností proti kvasinkám a vláknitým houbám.

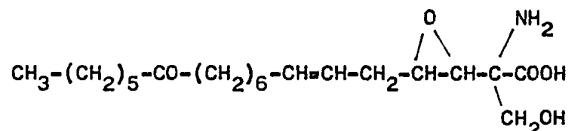
Je znám celkem malý počet antibiotik a syntetických preparátů užívaných v terapii mykotických onemocnění člověka. Vzhledem k současnému vzrůstajícímu počtu těchto onemocnění a stoupající rezistenci původců onemocnění proti užívaným preparátům je trvalá potřeba hledat další látky, které mají antifungální účinek.

Z používaných antifungálních antibiotik lze uvést zejména antibiotika polyénového typu produkovaná streptomycety, jako např. nystatin (Hazen E. L. a Brown R., Science 112: 423, 1950), amfotericin B (Gold W. a kol., Antibiotics Ann.: 579, 1955/1956) nebo primaricin (Struyk A. P. a kol., Antibiotics Ann.: 878, 1957/1958) dále griseofulvin produkovaný kulturou *Penicillium griseofulvum* (Oxford A. F. a kol., Biochem. J. 33: 240, 1939) a konečně i československý mucidin (Mucidermin SPOFA) produkovaný kulturou *Oudemansiella mucida* (Čs. pat. 136 492).

K léčbě mykotických onemocnění se vedle antibiotik používají i synteticky připravená antimykotika, z nichž se v posledních letech zjemněna uplatňují imidazolové sloučeniny.

Nevýhodou některých těchto známých látek je, že například řada z nich není účinná proti kvasinkám nebo jejich specifická účinnost je malá.

Tyto nevýhody odstraňuje kyselina 2-amino-2-hydroxymethyl-3,4-trans-epoxy-14-oxo-6-trans-eikosenová obecného vzorce



u které byla zjištěna vysoká antibiotická účinnost proti kvasinkám a vláknitým houbám. Z tohoto důvodu lze tuto kyselinu použít jako účinné antibiotikum.

Kyselina 2-amino-2-hydroxymethyl-3,4-trans-epoxy-oxo-6-trans-eikosenová se připravuje tak, že se aerobně kultivuje houba *Melanconis flavovirens* na tekuté živné půdě obsahující jednoduché cukry nebo polysacharidy v koncentraci 1 až 10 % hmot. jako zdroj uhlíku a komplexní zdroj dusíku a to při teplotě v rozmezí 18 až 30 °C, pH v rozmezí 4,0 až 6,5.

Výhodné je provádět kultivaci submerzním způsobem, Jako produkční organismus se může použít například kmen houby *Melanconis flavovirens* uložený ve sbírce CCF pod č. 1 886. Uvedená kyselina podle vynálezu se vyznačuje antifungální účinností zejména proti kvasinkám a vláknitým houbám.

Podrobná charakteristika nového antibiotika

Kyselina 2-amino-2-hydroxymethyl-3,4-trans-epoxy-14-oxo-6-trans-eikosenová (dále jen pracovní název flavovirin) je bílá krystalická sloučenina s následujícími vlastnostmi: teplota tání 156 až 158 °C, optická otáčivost $^{20}_D + 13,5^\circ \pm 1^\circ$ (c = 0,66 % pyr.), UV spektrum nemá žádné charakteristické maximum, IČ spektrum (KBr) má významná maxima při 3 415, 2 926, 2 854, 1 709, 1 645, 1 499, 1 457, 1 254, 1 064, 972, 908 cm⁻¹, viz obr. 1; ¹H NMR spektrum, viz obr. 2; ¹³C NMR spektrum, viz tabulka 1. Elementární analýza: pro sumární vzorec C₂₁H₃₇NO₅ (m. h. 383) vypočteno: C 65,77 %, H 9,72 %, N 3,65 %; nalezeno: C 65,67 %, H 9,65 %, N 3,72 %. Pozitivní reakce: s ninhydrinem a dinitrofenylhydrazinem. Rozpustnost: flavovirin je nerozpustný v petroletheru, diethyletheru, benzenu, částečně rozpust-

ný v chloroformu, methanolu, ethanolu, n-butanolu, dimethylformamidu, dimethylsulfoxidu, pyridinu.

Stabilita: sloučenina je v roztoku v rozsahu pH 2 až 10 stabilní, při zahřívání na 100 °C po 15 min. klesá její aktivita na polovinu, při skladování při teplotě 4 °C se aktivita antibiotika během několika měsíců nezměnila.

Antibiotická účinnost je výrazná proti kvasinkám a některým vláknitým houbám, proti bakteriím nebyla zjištěna; viz tabulka 2.

Tabulka 1

¹³C NMR spektrum flavovirinu (50,31 MHz, v hexadeuterodimethylsulfoxidu)

Uhlík č.	δ (ppm)
1	168,11
2	63,60
3	58,08 ^a
4	53,66 ^a
5	34,33
6	133,09
7	124,62
8	32,21
9	31,27
10	28,89 ^b
11	28,64 ^b
12	23,39
13	41,98
14	210,75
15	41,98
16	23,39
17	28,58 ^b
18	28,45 ^b
19	22,16
20	14,09
21	62,16

a, b Přiřazení signálů označených stejným písmenem může být zaměněno.

Tabulka 2

Biologické spektrum flavovirinu a jeho srovnání s myriocinem

Testovací organismu	MIC ^S (μg/mL)	
	flavovirin	myriocin
<i>Candida albicans</i>	0,39	1,56
<i>C. pseudotropicalis</i>	0,39	3,12
<i>C. utilis</i>	0,39	0,78
<i>Cytospora leucostoma</i>	0,78	0,78
<i>Fusarium oxysporum</i>	>200	6,25
<i>Hansenula anomala</i>	0,78	0,78
<i>Chaetomium globosum</i>	0,78	1,56
<i>Kloeckera apiculata</i>	0,10	0,78
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	0,78	3,12
<i>Penicillium stipitatum</i>	200	>200
<i>Pichia fermentans</i>	0,10	1,56
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,39	1,56
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellips.</i>	0,39	1,56
<i>S. lipolytica</i>	0,39	0,78
<i>Verticillium cinnabarinum</i>	25	>200
<i>Bacillus subtilis</i>	>200	>200
<i>Escherichia coli</i>	>200	>200

^S MIC - minimální inhibiční koncentrace

Testy byly prováděny plotnovou difusní metodou.

Způsob přípravy antibiotika

Produkčním organismem je kmen houby *Melanconis flavovirens* uložený ve sbírce CCF pod č. 1886 (autorské osvědčení č. 234 407). Kultura je uchovávána na šikmém sladidlovém agaru při teplotě 4 °C; přeočkovávána po 6 měsících. Dále jsou uvedeny příklady výroby kyseliny (flavovirinu) podle vynálezu.

Příklad 1

Fermentace flavovirinu probíhá buď v baňkách na třepačce, nebo ve fermentačním tan-ku při použití půdy o složení: glukosa 3 % hmot., kukuřičná máčecí voda (50 % hmot. sušiny) 1,5 % hmot., MgSO₄·7 H₂O 0,15 % hmot., pH 5,5 (upraveno KOH před sterilizací), optimální teplota kultivace 24 °C. Inokulum je 5 % obj. submerzní kultury. Maximum produkce je mezi 12 až 14. dnem kultivace, kdy kultura obsahuje 20 až 35 mg flavovirinu v 1 L.

Narostlá submerzní kultura se filtrací rozdělí na médium a mycelium. Mycelium se extrahuje methanolem. Zahuštěný methanolicový extrakt se spojí s médiem a je dále čištěn chromatograficky na sloupci amberlitu XAD 2 (směs voda, methanol, až do 80 % obj. konc. methanolu). Aktivní frakce po odpaření methanolu je extrahována chloroformem. Po odpaře-

ní chloroformu je vzorek čištěn chromatograficky na sloupci s polyamidem (směs voda : ethanol, až do 96 % obj. konc. ethanolu). Následuje adsorpční chromatografie na sloupci silikagelu (směs chloroformmethanol, až do 80 % obj. konc. methanolu).

Vzhledem k tomu, že antibiotický komplex kromě flavovirinu obsahuje také antibiotikum myriocin (thermozymocidin) (Aragozzini F. a kol., Tetrahedron 28: 5493, 1972, US patent 3 758 529; Begli J. F. a kol., J. Org. Chem. 38: 1253, 1973), je nutno obě sloučeniny rozdělit. Flavovirin se ze směsi izoluje jednak precipitací v ethylacetátu, jednak chromatografií na silikagelu (soustava isopropanol : HCOOH : H₂O, v poměru 97 : 1,5 : 1,5) a analytické čistoty je dosaženo opakovanou krystalizací ze směsi ethanol : voda (8 : 2).

Příklad 2

Fermentace probíhala stejně jako v příkladu 1. Narostlá submerzní kultura byla homogenizována s dvojnásobným objemem n-butanolu. Po oddělení mycelia filtrací se butanolicke fáze odpaří a odparek je dále zpracován roztřepáváním mezi chloroformem a vodou. Další postup je shodný jako v příkladu 1.

Srovnání flavovirinu s myriocinem (thermozymocidinem)

Vzhledem k tomu, že flavovirin je strukturou blízký myriocinu (thermozymocidinu), byla obě antibiotika porovnána jak z hlediska fyzikálně-chemických vlastností, tak z hlediska biologické aktivity.

Prvý rozdíl je v produkčních organismech. Myriocin je produkován termofilní houbou *Myriococcum albomyces* Cooney a Emerson, což je synonymum pro *Thielavia albomyces* (Cooney a Emerson) Malloch a Cain, produkční kultura je uložena ve sbírce NRRL pod č. 3 858. Totéž antibiotikum bylo pod názvem thermozymocidin izolováno z blíže neurčené termofilní houby, která je uložena ve sbírce ATCC pod č. 20 349. Naproti tomu produkční organismus *Melanconis flavovirens* (Otth) Wehm. patří do skupiny hub *Pyrenomycetes* a vedle myriocinu (thermozymocidinu) produkuje další antibiotikum flavovirin.

Rozdíl fyzikálně-chemických charakteristik mezi flavovirinem a myriocinem je zřejmý z tabulky č. 3. Chemické příbuznosti flavovirinu s myriocinem bylo využito při řešení struktury flavovirinu vzhledem ke známé absolutní konfiguraci myriocinu.

Tabulka 3

Srovnání některých fyzikálně-chemických charakteristik flavovirinu a myriocinu (thermozymocidinu)

	FLAVOVIRIN	MYRIOCIN
Sumární složení	C ₂₁ H ₃₇ NO ₅	C ₂₁ H ₃₉ NO ₆
Teplota tání	156 až 158 °C	176 až 179 °C
Optická otáčivost [α] _D ²⁰ ± 1° (pyridín)	+13,5° (c = 0,66 %)	+19,5° (c = 0,48 %)
Chromatografická pohyblivost TLC (Rf)		
a) silikagel (n-acylacetát : EtOH : : HCOOH : H ₂ O = 12 : 6 : 1 : 1)	0,49	0,39
b) Celulóza - org. fáze (n-acylacetát : : aceton : CH ₃ COOH : H ₂ O = 7 : 2 : 1 : 4)	0,54	0,29

Další rozdíl mezi oběma látkami je v biologické účinnosti. Při použití difusní plotnové metody je účinek flavovirinu ve srovnání s myriocinem ve většině případů vyšší až 15x u druhu *Pichia fermentans*; viz tabulka 2. Odpovídající rozdíly byly zjištěny i pomocí zkumavkové zředovací metody, již byly porovnávány minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální fungicidní koncentrace (MFC) proti vybraným druhům kvasinek, viz tabulka 4.

Tabulka 4

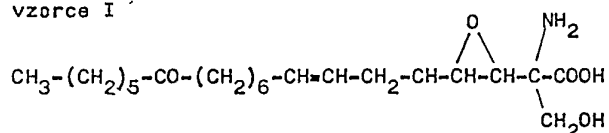
Srovnání minimálních inhibičních koncentrací (MIC) a minimálních fungicidních koncentrací (MFC) flavovirinu a myriocinu na vybrané druhy kvasinek[§]

Testovací organismus	MIC (µg/mL)		MFC (µg/mL)	
	flavovirin	myriocin	flavovirin	myriocin
<i>Candida pseudotropicalis</i>	0,25	2,5	0,75	7,5
<i>C. albicans</i>	0,20	1,0	1,0	5,0
<i>Kloeckera apiculata</i>	0,10	0,5	0,5	2,0

§ Testy byly prováděny zkumavkovou zředovací metodou

PŘEDMĚT VÝNÁLEZU

1. Kyselina 2-amino-2-hydroxymethyl-3,4-trans-epoxy-14-oxo-6-trans-eikosenová obecného vzorce I



2. Způsob přípravy kyseliny podle bodu 1; vyznačený tím, že se aerobně kultivuje houba *Melanconis flavovirens* na tekuté živné půdě obsahující jednoduché cukry nebo polysacharidy v koncentraci 1 až 10 % hmot. jako zdroj uhlíku a komplexní zdroj dusíku při teplotě v rozmezí 18 až 30 °C; pH v rozmezí 4,0 až 6,5; načež ze získané biomasy se kyselina izoluje extrakcí; sloupcovou chromatografií a opakovanou krystalizací.
3. Způsob podle bodu 2; vyznačený tím, že se kultivace provádí submerzně.
4. Způsob podle bodu 2; vyznačený tím, že se použije kmen houby *Melanconis flavovirens* uložený ve sbírce CCF pod č. 1 886.