



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 23.06.1969 (P.134428)

Pierwszeństwo: 27.06.1968 (Stany
Zjednoczone
Ameryki)

Zgłoszenie ogłoszono: 15.03.1973

Opis patentowy opublikowano: 25.02.1976

MKP C12d 9/14

Int. Cl.² C12D 9/14

Twórcy wynalazku: Marvin Joseph Weinstein, George Miller Leudemann, Gerald Howard Wagman

Uprawniony z patentu: Scherico Ltd., Lucerna (Szwajcaria)

Sposób wytwarzania nowego antybiotyku

¹
Przedmiotem wynalazku jest wytwarzanie nowego antybiotyku o wzorze podanym na rysunku, nazwanego antybiotykiem 66-40 lub sizomycyną. Antybiotyk 66-40 ma szeroki zakres działania i wykazuje hamujący wpływ na rozwój bakterii Gram — dodatnich i Gram — ujemnych. W zakres wynalazku wchodzi sposób wytwarzania antybiotyku 66-40 na drodze mikrobiologicznej, zarówno w wolnej postaci, jak i w postaci jego dopuszczalnych w lecznictwie pochodnych funkcjonalnych.

Antybiotyk 66-40 jest biosyntetycznym produktem, otrzymywanym na drodze aerobowej hodowli w pożywce wodnej nowego szczepu *Micromonospora inyoensis*. Szczep ten wyisobniono z próbki gleby pobranej w Inyo National Forest w White Mountains w Kalifornii. Jedną z cech tego szczepu jest zdolność wytwarzania antybiotyku 66-40. Kulturowo tego szczepu złożono w zbiorze The Northern Utilization and Research Division, Agriculture Research Service, U.S. Departament of Agriculture, Peoria, Illinois, za numerem NRRL 3292. Jest to mikroorganizm aerobowy i rozwija się dobrze na powierzchni różnych stałych i ciekłych pożywek, jednak szczególnie dobrze rozwija się i wytwarza antybiotyk w zanurzeniu, w warunkach aerobowych.

M. inyoensis odróżnia się od innych gatunków *Micromonospora* wieloma parametrami taksonomicznymi. W wyniku hodowli, prowadzonej w ciągu 14 dni w temperaturze 24—26°C na pożywce

²
agarowej zawierającej 1,5% agaru, 1% dekstrozy i 3% NZ Amine Type A (preparat produkowany przez przedsiębiorstwo Sheffield Chemical Company, Norwich, New York), obserwuje się wzrost dostateczny lub nikły. Mikroskopowe badanie nie wykazuje grzybni. W niektórych miejscach powierzchni zaszczerpionej pojawiają się następnie dobrze rozwinięte kolonie i na niektórych płytkach widoczne jest w miejscu kolonii słabe, czerwono-brązowe zabarwienie. Przy określeniu tej barwy, jak i w innych podanych w opisie, stosuje się dwa określenia. Pierwszym z nich jest nazwa barwy według „Descriptive Color Name Dictionary”, Taylor, Knoche i Granville 1950, z numerem odpowiadającym tej barwie według „The Color Harmony Manual” wydanie 4, 1958, zaś drugie określenie składa się z nazwy barwy i numeru, który odnosi się do barwy identycznej lub prawie identycznej według National Bureau of Standards, Stany Zjednoczone Ameryki, okólnik nr 553, 1 listopada 1955 r. Barwa tej kolonii powierzchniowej waha się od ceglasto-brązowej g 5 ne czyli brązowej 55 do mahoniowo-brązowej m 6 pi. Pod mikroskopem z zastosowaniem kontrastu widać długą, rozgałęzioną grzybnę regularną, bez przegród. Średnica grzybni wynosi około 0,5 mikrona. Zarodniki tworzą się pojedynczo w torebkach zarodnikowych o średnicy 1,0—1,5 mikrona. Zarodniki są w przybliżeniu walcowate i jajowate lub prawie kuliste.

M. inyoensis rozwija się dobrze w temperaturze 28–37°C, natomiast nie obserwuje się wzrostu w temperaturze 50°C. Na pożywce asparaginowo-agarowej wzrost jest nikły. Rozwijająca się kolonia *M. inyoensis* hydrolizuje żelatynę, mleko, skrobię i przy zastosowaniu metody Gordona i in. (*J. Bacteriology* 69, 147 (1965) i 73, 15 (1957) redukuje azotan do azotynu. Jako źródło węgla przy hodowli tego mikroorganizmu można też stosować sacharozę. Inne cechy charakterystyczne *M. inyoensis* są podane w tablicy A.

Tablica A

Pożywka	Cechy charakterystyczne
Agar Bennett'a	Wzrost mierny, barwa rdzawo-brązowa g 5 pg, lub mocno brązowa 55
Agar Emersona	Wzrost dobry, barwa ceglasto-czerwona g 6 ng lub nieco czerwono-brązowa 43
Pasta pomidorowa mączka owsiana — agar Glikoza — aspargina agar	Wzrost dobry Wzrost słaby
Glikoza — wyciąg drożdżowy — agar	Wzrost dobry, barwa różowo-brązowa g 7 n i lub ciemnoszaro-czerwona 20 w niektórych koloniach słabe zabarwienie kasztanowe.
Płatki ziemniaczane Agar Czapka	Wzrost słaby, poprawia się po dodaniu węglanu wapniowego Wzrost dobry
Agar tyrozynowy Pepton — żelazo — agar	Wzrost dobry, brak rozpuszczalnego barwnika Wzrost dobry, brak rozpuszczalnego barwnika

M. inyoensis może wykorzystywać różne źródła węgla i azotu, a tablica B uwidacznia wzrost tego mikroorganizmu na różnego rodzaju węglowodanach. Ocenę wzrostu przeprowadzono wzrokowo na pożywkach zawierających 0,5% wyciągu drożdżowego, 1% węglowodanu i 1,5% agaru w wodzie destylowanej.

Tablica B

Węglan w pożywce	Wzrost
Próba porównawcza	mierny
L-arabinoza	mierny
D-glikoza	dobry
D-galaktoza	dostateczny lub mierny
β-laktoza	dostateczny lub mierny
D-lewuloza	mierny

dalszy ciąg tablicy B

Węglan w pożywce	Wzrost
rafinoza	mierny
L-ramnoza	mierny
skrobia	dobry
sacharoza	dobry
D-ksyloza	dostateczny lub mierny
inozytol	mierny
D-mannit	mierny
d(—)-arabinoza	mierny
dulcyt	mierny
d-ryboza	dostateczny
α-melibioza	mierny
D(+)-melicytoza	mierny
glicerol	mierny

W tablicy C podano wzrost *M. inyoensis* na różnych pożywkach azotowych, określany wzrokowo na płytkach agarowych w środowisku zawierającym 1% glikozy, 1,5% agaru i podaną w tablicy pożywkę azotową w wodzie destylowanej.

Tablica C

Źródło azotu	Wzrost
1% aminy NZ typ A	dostateczny lub słaby
0,5% drożdży	dobry
1% asparaginy	mierny
1% kwasu glutaminowego	mierny
1% azotanu amonowego	mierny

Antybiotyk 66-40 jest zasadowym pseudo-oligosacharydem, który od innych pseudo-oligosacharydów odróżnia się wyraźnie właściwościami biologicznymi, fizycznymi i chemicznymi, jak to opisano niżej. Widmo absorpcyjne antybiotyku 66-40 w podczerwieni w oleju mineralnym (nujol) podano na fig. 1 rysunku, a wyraźniejsze pasma absorpcyjne podano w tablicy D. W tablicy tej podano długość fali świetlnej w mikronach, a w nawiasach określono poszczególne pasma, stosując następujące skróty: S — wyraźne, M — średnie, W — słabe, brd — szerokie, VS — bardzo wyraźne i VW — bardzo słabe.

Tablica D

2,98 (M-S)	8,77 (M-S)
3,05 (M-S)	9,00 (M-S)
3,16 (M-S)	9,47 (S)
3,3 5-3,50 (nujol)	9,72-10,07 (S, brd)
5,93 (W-M)	10,46 (M-S)
6,25 (M)	11,97 (M)
6,82 (nujol)	12,75 (VW, brd)
7,25 (nujol)	13,45-13,90 (W, brd)

Na fig. 2 rysunku uwidoczniono charakterystyczne widmo jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) antybiotyku 66-40. Widmo to otrzymano za pomocą spektrometru A-60-A wytwarzanego przez

Varián Associates, Kalifornia, stosując około 0,4 ml roztworu antybiotyku w tlenku deuteru o stężeniu około 20 mg/ml. Jest ono wyrażone w częściach na 1 milion, przy użyciu soli sodowej kwasu 3-(trójmetylosilo)-propanosulfonowego jako międzynarodowego wzorca.

W tablicy E podano wyniki badań jakościowych i stałe fizyczne antybiotyku 66-40 w postaci wolnej zasady.

Tablica E

- a) Reakcje barwne
- | | |
|--------------------------|------------|
| Sakaguchi | — ujemna |
| skrobia — jodek potasowy | — dodatnia |
| Ninhydrina | — dodatnia |
| Chlorek cynowy | — ujemna |
| Molisch | — ujemna |
| Biuretowa | — dodatnia |

b) Stałe fizyczne

$$[\alpha]_D^{26} (C = 0,3\% \text{ w } H_2O) + 188,9^\circ$$

Temperatura topnienia jednowodzianu 185-190°C

Równoważnik wagowy 92

PKa 8,0

Analiza elementarna:		obliczono	
znaleziono		dla jednowodzianu	
C	49,80		49,02
H	8,20		8,44
N	14,95		15,04
O (z różnicy			
27,05			27,50

Wyniki analizy elementarnej odpowiadają obliczeniom dla wzoru $C_{19}H_{37}N_5O_7 \cdot H_2O$.

Ciepota cząsteczkowa (spektrometrycznie) 447,26

Absorpcja w świetle pozafioletowym przy długości fali 220—400 milimikronów

c) Rozpuszczalność antybiotyku 66-40 jako za-

sady, określona zgodnie z U.S. Pharmacopoeia XVIII, str. 8.

Rozpuszczalnik	Rozpuszczalność
metanol	słaba
5 aceton	nierozpuszczalny
chloroform	nikła
eter	nierozpuszczalny
benzen	nierozpuszczalny
woda	bardzo dobra

10 W tablicy F podano widmo masowe antybiotyku 66-40 jako wolnej zasady, przy czym kolumny m/e oznaczają stosunek: masy do ładunku, a kolumny Rel. Int. oznaczają natężenie szczytowe różnych stosunków masy do ładunku m/e w stosunku do szczytu m/e = 118.

15 Jak wspomniano wyżej, antybiotyk 66-40 wytwarza się sposobem według wynalazku przez hodowanie mikroorganizmu *M. inyoensis* NRRL 3292 w wodnym środowisku odżywczym, w warunkach aerobowych, korzystnie w zanurzeniu. W celu wytworzenia niewielkich ilości antybiotyku, można stosować hodowlę powierzchniową w butlach lub kolbach wstrząsanych. Mikroorganizm hoduje się w pożywce zawierającej źródło węgla, na przykład ulegający przyswojeniu węglowodan, przy czym 25 niezbędny jest też przyswajalny związek azotu lub substancja białkowa. Jako źródło węgla korzystnie stosuje się glikozę, maltozę, mannozę, sacharozę, skrobię, krochmal zbożowy itp., zaś jako źródło 30 azotu namok kukurydziany, wyciąg drożdżowy, mączkę sojową, peptony mięsne, produkty, hydrolyzy kazeiny, wyciągi z mięsa wołowego itp. Korzystnie jest stosować kombinację źródeł węgla i azotu. Na ogół nie trzeba dodawać pierwiastków 35 śladowych, ponieważ do wytwarzania środowiska, stosuje się wodę wodociągową, ale korzystnie jest stosować dodatek soli kobaltu.

Wytwarzanie antybiotyku 66-40 odbywa się w do-

Tablica F

m/e	Rel. Int.	m/e	Rel. Int.	m/e	Rel. Int.	m/e	Rel. Int.	m/e	Rel. Int.	m/e	Rel. Int.
40	3.0	75	3.0	113	11.0	146	11.0	199	2.0	300	4.0
41	30.0	80	24.0	114	14.0	147	3.5	200	2.0	304	41.0
42	63.0	81	19.5	115	2.5	151	2.0	201	3.0	305	7.0
43	50.0	82	35.5	116	2.5	152	2.5	202	2.5	317	8.5
44	100 %	83	16.5	117	1.0	155	3.0	203	22.0	322	3.0
45	8.0	84	51.0	118	100.	156	2.0	205	6.0	330	5.0
46	5.0	85	21.0	119	8.0	157	2.5	206	6.0	331	2.0
51	2.5	86	58.0	120	2.0	158	4.5	215	6.0	332	23.0
52	3.5	87	28.0	121	2.0	159	3.5	216	2.0	333	4.0
53	10.0	88	11.0	122	2.0	160	98.0	219	2.0	350	5.0
54	10.0	92	7.0	123	2.0	161	9.5	220	2.0	362	15.0
55	20.0	93	6.0	124	3.0	162	2.0	236	7.0	363	3.0
56	50.0	94	15.0	125	6.0	163	20.0	237	2.0	411	0.5
57	23.5	95	7.0	126	20.0	164	2.0	238	6.0	412	0.6
58	64.0	96	10.0	127	35.0	168	2.0	239	2.0	414	0.5
59	40.0	97	15.0	128	12.0	169	3.5	245	4.0	429	0.9
60	13.5	98	23.0	129	5.0	170	2.5	246	6.0	430	4.5
65	4.0	99	11.0	130	15.0	173	19.0	253	2.5	431	1.0
66	3.5	100	44.0	131	2.5	147	3.0	254	4.5	447	5.0
67	12.0	101	14.0	133	2.0	176	3.0	255	2.5	448	1.3
68	65.0	102	17.0	135	2.0	178	7.0	256	10.0		
69	21.0	107	3.0	138	2.0	185	2.0	270	2.0		
70	19.0	108	7.5	140	3.0	186	2.5	271	11.0		
71	30.0	109	17.0	142	16.0	187	17.0	272	6.0		
72	66.0	110	50.0	143	3.5	188	2.5	282	5.0		
73	66.0	111	13.0	144	6.0	191	32.0	289	4.5		
74	28.0	112	19.0	145	65.0	192	3.5	299	9.0		

wolnej temperaturze odpowiedniej dla dobrego wzrostu mikroorganizmu, na przykład w temperaturze 20–40°C, a korzystnie 25–35°C. Zwykle optimum produkcji osiąga się po upływie 3–7 dni. Wartość pH środowiska w ciągu fermentacji utrzymuje się w pobliżu 7, a końcowa wartość zależy w pewnej mierze od ewentualnie dodanych substancji buforowych i przed sterylizacją nastawia się ją korzystnie na około 8,0. W przypadku hodowli w dużych zbiornikach, korzystnie jest wytwarzać wegetatywny materiał do szczepienia przez zaszczepienie brzeczki hodowlanej skośną lub liofilizowaną kulturą mikroorganizmu. Otrzymany w ten sposób materiał do zaszczepienia przenosi się aseptycznie do większych naczyń lub zbiorników. Jako środowisko do wytwarzania materiału do szczepienia można stosować takie samo środowisko, jakie stosuje się do hodowli w zbiornikach lub inne, umożliwiające dobry wzrost mikroorganizmu.

Po zakończeniu fermentacji materiał przerabia się następnie, na przykład w ten sposób, że do brzeczki dodaje się kwasu mineralnego, korzystnie wodnego roztworu kwasu siarkowego, aż do uzyskania wartości pH około 2, przy czym rozpuszczalny w wodzie antybiotyk uwalnia się z grzybni i rozpuszcza w wodnym środowisku fermentacyjnym. Następnie mieszaninę odsącza się, zobojętnia przesączając i dodaje doń kwasu szczawowego w celu wytrącenia jonów żelaza. Po ponownym przesączeniu i zobojętnieniu, korzystnie za pomocą wodorotlenku amonowego, klarowny, zobojętniony przesącz przepuszcza się przez żywiczny wymiennik jonowy, korzystnie IRC-50 Amberlit w postaci amoniowej. Przykłady żywicznych wymienników jonowych typu Amberlitu, stosowanych w procesie według wynalazku, zarówno amoniowych jak i kationowych, są podane w Handbook of Chemistry and Physics, wydanie 42, 1960. Ciecz odpływająca z kolumny wymiennicza jonowego odrzuca się, a następnie antybiotyk eluuje się z żywicy za pomocą wodorotlenku amonowego. Eluat stęży się i odparowuje otrzymując jako pozostałość surowy antybiotyk 66-40, a aktywność około 500 mikrogramów/mg. Sposób oznaczania aktywności jest omówiony niżej.

Surowy antybiotyk oczyszcza się za pomocą anionowego wymiennicza żywicznego, korzystnie typu Dowex 1X2 lub Amberlite IRA. Surowy produkt absorbuje się z wodnego roztworu i eluuje z kolumny destylowaną wodą, otrzymując produkt o aktywności około 900 mikrogramów/mg. Można też oczyszczać surowy antybiotyk na kolumnie celulozowej, stosując jako rozpuszczalnik mieszaninę chloroformu z metanolem i 17% wodorotlenkiem amonowym (2:1:1). Górna faza tego układu rozpuszczalników służy do pierwszego zwilżania kolumny, a dolna stanowi eluent. Antybiotyk kieruje się na kolumnę przez adsorpcję ze stężonego roztworu w górnej fazie podanego wyżej układu rozpuszczalników.

W celu oznaczenia aktywności różnych preparatów w mikrogramach antybiotyku na 1 miligram preparatu, stosuje się typową metodę próby w kubku cylindrycznym, przy użyciu *Staphylococcus aureus* ATCC 6 538P (American Type Culture Collection) jako próbnego mikroorganizmu. Metoda ta

jest w pełni analogiczna do metody opisanej przez Oden'a i in. W *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1963). Według tej metody aktywność 1 mikrograma antybiotyku oznacza taką ilość preparatu, która w warunkach prowadzenia próby daje reakcję strefową $16,3 \pm 0,9$ mm i wyraża się ją w mikrogramach na 1 miligram.

Jak wyżej wspomniano, antybiotyk wytwarzany sposobem według wynalazku można przeprowadzać w farmakologicznie dopuszczalne pochodne, na przykład solwaty, takie jak wodziany, sole lub produkty kondensacji z aldehydami i/lub ketonami. Właściwości niektórych tych pochodnych podano poniżej.

Dzięki zasadowemu charakterowi antybiotyk 66-40 łatwo tworzy nietoksyczne sole z kwasami organicznymi i nieorganicznymi, takimi jak kwas solny, siarkowy, fosforowy, octowy, stearynowy, propionowy, winowy, maleinowy, benzoesowy itp. Można też stosować wielozasadowe kwasy częściowo zobojętnione, na przykład zasadę nieorganiczną taką jak wodorotlenek sodowy lub zasadę organiczną. Sole z kwasami nieorganicznymi takimi jak kwas solny, siarkowy, fosforowy itp. są rozpuszczalne w wodzie i otrzymuje się je przez stężanie lub liofilizację ich wodnych roztworów lub przez strącanie za pomocą mieszających się z wodą organicznych rozpuszczalników, korzystnie niższych alkoholi alifatycznych lub ketonów. Należy nadmienić, że chlorowodorki antybiotyku 66-40 są pod tym względem nietypowe, gdyż rozpuszczają się w znacznym stopniu w metanolu. Z roztworów wodnych strąca się je za pomocą niższych alkiloketonów, takich jak aceton. Miareczkując wodny roztwór antybiotyku 66-40 kwasem w ilości mniejszej od stechiometrycznej, można wytwarzać niepełne sole addycyjne. Takie sole są w niniejszym opisie objęte również określeniem „sole addycyjne z kwasami”. Sole addycyjne z kwasami mają zakres działania antybiotycznego taki sam, jak wolna zasada, ale różniąc się od niej rozpuszczalnością.

Antybiotyk otrzymywany sposobem według wynalazku i jego sole addycyjne z kwasami tworzą z wodą wodziany, a z rozpuszczalnikami organicznymi dają solwaty. Z tego powodu, w wyniku opisanych niżej operacji zwykle otrzymuje się antybiotyk w postaci wodzianu, zaś jego sole addycyjne z kwasami jako solwaty niższych alifatycznych alkoholi lub ketonów. Te wodziany i solwaty są stosunkowo trwałe, toteż wyosobnione produkty zawierają wodę lub rozpuszczalnik, zwykle w ilości 1 mola na 1 mol antybiotyku. Właściwości fizyczne niektórych związków tego typu podano w tablicy G.

Tablica G

Chlorowodorek antybiotyku 66-40 w postaci solwatu metanolowego. $[\alpha]_D^{25}$ (c = 1% w H_2O) + 112,2°			
Analiza elementarna	Znaleziono	Obliczono	
C	37,70	36,29	
H	7,15	7,00	
N	10,61	10,58	
Cl	25,60	26,78	

Wyniki analizy odpowiadają wzrostowi $C_{18}H_{37}N_5O_7 \cdot 5 HCl \cdot CH_3OH$ absorpcja w świetle nadfioleto-

wym: przepuszczalność promieni przy długości fali 220—400 milimikronów.

Siarczan antybiotyku 66-40 w postaci solwatu metalowego. $[\alpha]_D^{25}$ ($c = 1\%$ w H_2O) +105,1°

Analiza elementarna	Znaleziono	Obliczono
C	32,52	33,14
H	6,33	6,39
N	9,32	9,66
SO ₄	33,90	33,13

Wyniki analizy odpowiadają wzorowi $(C_{19}H_{37}N_5O_7)_2 \cdot 5H_2SO_4 \cdot 2CH_3OH$. Absorpcja w świetle nadfioletowym: przepuszczalność promieni przy długości fali 220—400 milimikronów.

Jak już wspomniano, antybiotyk 66-40 tworzy również nietoksyczne produkty kondensacji z aldehydami i/lub ketonami, w sposób znany dla wytwarzania związków tego typu. Korzystnie stosuje się je jako zasady Schiffa, wytwarzane przez kondensację antybiotyku z aldehydem i/lub ketonami, zawierającymi do 12 atomów węgla, takimi jak alifatyczne, alicykliczne, aromatyczne i heterocykliczne. Aldehydy i ketony o budowie pierścieniowej mogą zawierać podstawniki, takie jak grupy wodorotlenowe, atomy chlorowców, grupy nitrowe, niższe rodniki alkoksylowe lub alkanoiloksylowe itp. Przykładami takich aldehydów i ketonów są: aldehyd octowy, aceton, keton metyloetylowy, aldehyd krotonowy, furfural, aldehyd cyklopentyloctowy, wanilina, aldehyd weratrowy, benzofen, aldehyd benzoowy, acetofenon, aldehyd salicylowy, pirydoksal itp. Należy nadmienić, że te produkty kondensacji nie są trwałe w obecności wody.

Antybiotyk 66-40 i jego dopuszczalne w lecznictwie pochodne funkcjonalne mają szeroki zakres działania przeciwbakteryjnego. Hamuje on wzrost bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, toteż może być stosowany sam lub w połączeniu z innymi środkami antybiotycznymi do hamowania rozwoju lub zmniejszenia ilości bakterii w różnych środowiskach, na przykład do dezynfekowania szklanych sprzętów laboratoryjnych, narzędzi i wyposażenia dentystycznego i medycznego, zarażonych bakteriami *Staphylococcus aureus* lub innymi, ulegającymi działaniu antybiotyku 66-40. Ze względu na szczególną skuteczność przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, antybiotyk ten jest użyteczny przy zwalczaniu zakażeń tymi bakteriami.

Aktywność antybiotyku 66-40 przeciw różnym bakteriom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym jest podana w tablicy H. Minimalne stężenie, przy którym antybiotyk działa hamująco na rozwój bakterii, oznaczone w skrócie MIC, określa się stosując jako środowisko próbne brzeczkę drożdżowo-wołową i przy użyciu metody dwukrotnego rozcieńczania seryjnego. Minimalne stężenie MIC odpowiada stężeniu w środkowym punkcie pomiędzy ostatnią próbką z zawartością wzrokowo klarowną i pierwszą próbką z zawartością mętną. Oznaczenia prowadzi się stosując rozcieńczenie 10^{-3} hodowli badanych bakterii mającej 24 godziny. Wszystkie próbki zaszczepia się po upływie 18 godzin w temperaturze 37°C. Do badań stosuje się antybiotyk 66-40 o aktywności 1000 mikrogramów/mg. Symbol DA w tablicy oznacza próbę ze zbioru Schering Corporation.

10
Tablica H

Badane mikroorganizmy	MIC w mikrogramach/ml
Bakterie Gram-dodatnie	
<i>Diplococcus pneumoniae</i> DA 150	3,0
<i>Enterococcus</i> sp. DA 800	2,25
<i>Enterococcus</i> sp. DA 801	2,25
<i>Enterococcus</i> sp. DA 802	2,25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	0,23
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 11631	0,21
<i>Staphylococcus aureus</i> Gray	0,05
<i>Staphylococcus aureus</i> DA 2033	0,08
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 10541	3,0
<i>Streptococcus pyogenes</i> DA 1	3,0
<i>Streptococcus pyogenes</i> DA 21	3,7
<i>Streptococcus pyogenes</i> DA 15	3,7
Bakterie Gram-ujemne	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	0,6
<i>Escherichia coli</i> DA 3	0,3
<i>Escherichia coli</i> DA 4	0,6
<i>Escherichia coli</i> DA 1	0,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i> DA 20	0,23
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	3,0
<i>Proteus vulgaris</i> DA 121	0,6
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 9921	0,6
<i>Proteus vulgaris</i> DA 13	0,3
<i>Proteus vulgaris</i> DA 12	3,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 8709	0,45
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 8689	0,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0,6
<i>Salmonella schottmuelleri</i> DA 10	0,53
<i>Salmonella</i> sp. DA 101	0,5
<i>Salmonella</i> sp. DA 102	0,3
<i>Aerobacter</i> sp. DA 3a	0,3

Ostrą toksyczność antybiotyku 66-40 w postaci jego siarczanu określa się typową metodą, przy podawaniu antybiotyku różnymi drogami myszom o ciężarze ciała 18—20 g. Dane dotyczące toksyczności są podane w tablicy J i wyrażone w przeliczeniu na wolną zasadę.

Tablica J

Sposób podawania antybiotyku	LD ₅₀ w mg/kg
podskórnie	288
dootrzewnie	221
dożylnie	34

Antybiotyk 66-40 przejawia działanie przeciwbakteryjne w przypadku licznych zakażeń bakteryjnych wywołanych u zwierząt w laboratorium, a zwłaszcza u myszy. W celu określenia in vivo właściwości ochronnych antybiotyku 66-40 w przypadku zakażeń chorobotwórczych bakteriami u myszy, podaje się myszom antybiotyk dwukrotnie, raz bezpośrednio przed dootrzewnym zaszczepieniem bakteriami i drugi raz po upływie 4 godzin od tego zaszczepienia. Liczbę żywych myszy określa się po upływie 48 godzin od zarażenia i zebrane dane analizuje w zwykły sposób w celu ustalenia wartości PD_{50} z dokładnością 95%. W tablicy K podano wyniki oznaczania aktywności antybiotyku 66-40 w stosunku do różnych bakterii chorobotwórczych.

Tablica K

Mikroorganizm	Podawanie	PD_{50} w mg/kg
Staphylococcus aureus Gray DC 445	podskórnienie doustnie	0,12 25,0
Streptococcus pyogenes CDC 28	podskórnienie	0,87
Klebsiella pneumoniae DC 801	podskórnienie doustnie	0,70 50,0
Pseudomonas aeruginosa ATCC 8709	podskórnienie	1,12
Salmonella paratyphi BDC 837	podskórnienie	1,91

Z tablicy K wynika, że wskaźnik temperatury LD_{50}/PD_{50} przy podawaniu podskórnym wynosi 330—2400 w odniesieniu do bakterii Gram-dodatnich i 150—410 w odniesieniu do bakterii Gram-ujemnych.

Badania wykazały również, że myszy zakażone dootrzewnie 8 dawkami LD_{50} Rickettsia akaria uzyskują 100% ochrony przy podawaniu im podskórnienie 2 mg antybiotyku 66-40 raz dziennie w ciągu 4 dni.

Biorąc pod uwagę podane wyżej dane in vivo, a zwłaszcza korzystny wskaźnik terapeutyczny antybiotyku 66-40, jest rzeczą oczywistą, że antybiotyk ten może być stosowany do hamowania i zwalczania różnych zakażeń u ssaków, na przykład powodowanych przez Streptococcus, Staphylococcus, Escherichia, Salmonella, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas itp. Bakterie te powodują lub uważa się że powodują zapalenie gruczołu sutkowego u bydła, zakażenie przewodu moczowego i biegunkę. Niektóre szczepy tych bakterii powodują prawdopodobnie chorobę skóry i górnego układu oddechowego lub przyczyniają się do nasilania tych schorzeń występujących w złej postaci u ssaków. Antybiotyk 66-40 i jego pochodne stanowią przeto ważny środek do zwalczania wymienionych wyżej mikroorganizmów i zapobiega wywołanym przez nie chorobom.

Antybiotyk 66-40 i jego pochodne można sto-

sować miejscowo w postaci maści, zarówno hydrofilowych, jak i hydrofobowych, w postaci płynów do przemywania, zarówno wodnych jak i niewodnych lub typu emulsji, czy też w postaci kremów. Jako nośniki w takich preparatach stosuje się na przykład wodę, oleje, tłuszcze, poliestry, alkohole wielowodorotlenowe itp. Środki do stosowania miejscowego przeważnie zawierają około 0,1—3,0 g antybiotyku na 100 g maści, płynu lub kremu i stosuje się je na miejsca schorzeń 2—5 razy dziennie.

Preparaty zawierające antybiotyk wytwarzany sposobem według wynalazku mogą być też stosowane w postaci cieczy jako roztwory, zawiesiny itp. przy schorzeniach uszu i oczu, a także mogą być podawane pozajelitowo jako zastrzyki domięśniowe. Roztwór lub zawiesinę do zastrzyków stosuje się zwykle w ilości około 1—5 mg antybiotyku na 1 kg ciężaru ciała w postaci 2—4 dawek w ciągu 1 dnia. Wielkość dawek zależy od nasilenia choroby, podatności chorobotwórczych bakterii na działanie antybiotyku i właściwości lezonego ssaka.

W poniższych przepisach podano sposoby wytwarzania preparatów zawierających antybiotyki wytwarzany sposobem według wynalazku.

Przepis I. Roztwór do wstrzykiwania

Składnik	Na 1 ampułkę 2 ml	Na 50 litrów
Siarczan antybiotyku 66-40	84,0 mg	2100,0 g
Ester metylowy kwasu p-hydroksybenzoesowego	3,6 mg	90,0 g
Ester propylowy kwasu p-hydroksybenzoesowego	0,4 mg	10,0 g
Wodorosiarczan sodowy	6,4 mg	160 g
Dwuwodzian soli dwusodoetylenodwuaminy nowiej kwasu czteroocowego	0,2 mg	5,0 g
Woda do zastrzyków	2,0 ml	do 50,0 litrów

W zestawieniu składników podano 5% nadmiar w stosunku do ilości teoretycznie potrzebnych. W celu wytworzenia 50 litrów roztworu preparatu, 35 litrów wody do wstrzykiwania ogrzewa się w naczyniu ze stali nierdzewnej, zaopatrzonem w płaszczy grzejny, do temperatury 70°C i mieszając rozpuszcza oba estry kwasu p-hydroksybenzoesowego. Następnie roztwór chłodzi się do temperatury 25—30°C przepuszczając przez płaszczy zimną wodę, przedmuchuje roztwór azotem w ciągu co najmniej 10 minut i w dalszej fazie procesu utrzymuje w atmosferze azotu. Następnie w roztworze rozpuszcza się sól kwasu czteroocowego i kwaśny siarczyn sodowy, a na koniec siarczan antybiotyku 66-40. Dodaje się wody do objętości 50 litrów i miesza w celu wytworzenia homogenicznego roztworu. Roztwór ten przesącza się w warunkach sterylnych przez filtr zatrzymujący bakterie i prze-

sącem napełnia ampulki sterylizowane i wolne od pyrogenów.

Przepis II. Maść antybiotyczna

Stapia się 990 g wazeliny i około 100 g wazeliny miesza się 10 g antybiotyku 66-40 w postaci zasady. Mieszaninę przepuszcza się przez młyn koloidalny, dodaje pozostałą część wazeliny i chłodzi mieszaninę do konsystencji półstałej. Produkt pakuje się w odpowiednie pojemniki.

Niżej podane przykłady wyjaśniają bliżej sposób prowadzenia fermentacji i wyosabniania antybiotyku 66-40 sposobem według wynalazku.

Przykład I. Fermentację *Micromonospora inyoensis* NRRL 3292 przeprowadza się w zbiornikach. W pierwszej fazie rozwoju liofilizowaną kulturę lub komórki otrzymane ze skośnej kultury *M. inyoensis* umieszcza się w warunkach aseptycznych w 300 ml kolbie do wytrząsania, zawierającej 100 ml środowiska o następującym składzie.

Ekstrakt wołowy	3 g
trypton	5 g
ekstrakt drożdżowy	5 g
dekstroza	1 g
skrobia	24 g
węglan wapniowy	2 g
woda wodociągowa	1000 ml

Hodowlę tę wytrząsa się w ciągu 5 dni w temperaturze 35°C za pomocą wstrząsarki obrotowej o 280 obrotów/min. i suwie 50,8 mm. W drugiej fazie rozwoju 25 ml hodowli otrzymanej w 1 gazie, wlewa się w aseptycznych warunkach do kolby wstrząsowej o pojemności 2 litry, zawierającej 500 ml środowiska sterylnego o wyżej podanym składzie i wstrząsa w temperaturze 28°C w ciągu 3 dni, stosując wstrząsarkę o wyżej podanej charakterystyce.

W stadium fermentacji 500 ml hodowli otrzymanej w 2 fazie rozwoju, wlewa się w warunkach aseptycznych do zbiornika fermentacyjnego o pojemności 14 litrów, zawierającego 9,5 litra sterylizowanego środowiska o następującym składzie:

dekstryna	50 g
dekstroza	5 g
mączka sojowa	35 g
węglan wapniowy	7 g
chlorek kobaltu	10 ⁻⁶ molowy roztwór w środowisku
woda wodociągowa	1000 ml
emulsja silikonowa GE60	10 ml jako środek zapobiegający pienieniu

Przed sterylizowaniem tego środowiska nastawia się jego wartość pH = 8. Fermentację aerobową prowadzi się w ciągu 66—90 godzin, mieszając za pomocą mieszadła o 250 obr./min. i wprowadzając na 1 litr cieczy w ciągu 1 minuty 4,5 litra powietrza pod ciśnieniem 22,5 atm. Aktywność antybiotyku wytwarzanego do końca tego okresu osiąga maksimum 150—225 mikrogramów/ml. i pozostaje

względnie stała. Wartość pH środowiska waha się podczas fermentacji w granicach 6,8—7,3.

W celu wyosabnienia antybiotyku 66-40 łączy się brzezki otrzymane w 17 szarżach prowadzonych w wyżej podany sposób i otrzymuje 170 litrów brzezki, do której dodaje się tyle 6 n kwasu siarkowego, aby uzyskać wartość pH = 2. Zakwaszoną brzezkę miesza się w ciągu 15 minut i odsąca, przemylając grzybną wodą, przy czym popłuczyny łączy się z przesączem. Zobojętnia się przesącz 6 n wodorotlenkiem amonowym do wartości pH = 7, dodaje kwasu szczawowego w celu strącenia wapnia i odsąca. Przesącz zobojętnia się ponownie wodorotlenkiem amonowym i przepuszcza przez kolumnę z wymiennicem kationowym, zawierającą 1500—2000 preparatu Amberlite IRC-50 w postaci amonowej. Odciek odrzuca się, a kolumnę przemylwa wodą i eluuje 2 n roztworem wodorotlenku amonowego. Gromadzi się frakcje po 400 ml i bada metodą tarczową, stosując *S. aureus* ATCC 6538P. Frakcje aktywne łączy się i odparowuje do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując 28 g surowego antybiotyku 66-40 o aktywności około 500 mikrogramów/g.

W celu oczyszczenia surowego antybiotyku 66-40 28 g surowego antybiotyku 66-40, otrzymanego w wyżej podany sposób, rozpuszcza się w 100 ml destylowanej wody i wprowadza na kolumnę z amonowym wymiennicem w postaci hydroksylowej (Dowex 1X2). Kolumna zawiera 2000 g żywicy w postaci zawiesiny wodnej i ma średnicę 63,5 mm oraz wysokość 914,4 mm. Kolumnę eluuje się destylowaną wodą z prędkością 23 ml/min., zbiera się frakcje po 100 ml i mierzy ich przewodnictwo oraz aktywność przeciwko *Staphylococcus aureus*. Pomiar aktywności metodą tarczową umożliwia przybliżony podział eluatu na frakcje zawierające antybiotyk i nie zawierające go. W celu upewnienia się, że frakcje miesza się właściwie, część każdej frakcji bada się metodą chromatografii bibulowej, stosując dolną fazę mieszaniny zawierającej chloroform, metanol i 17% roztwór wodorotlenku amonowego (2:1:1). Każdą bibułę zwilża się ninydryną i eluaty zawierające podobny materiał łączy się i liofilizuje, otrzymując 5,7 g antybiotyku 66-40 o aktywności około 900 mikrogramów/mg.

Przykład II. 3,9 g antybiotyku 66-40 w postaci zasady, otrzymanej i oczyszczonej w sposób opisany w przykładzie I, rozpuszcza się w 60 ml wody za pomocą 6 n kwasu siarkowego zakwasza roztwór do wartości pH = 4,5. Zakwaszony roztwór miesza się z węglem aktywnym w ciągu około 1/2 godziny i przesącza. Przesącz dodaje się do około 1 litra metanolu, odsąca osad i suszy, otrzymując 4,8 g siarczanu antybiotyku 66-40 o aktywności około 640 mikrogramów/mg.

W celu oczyszczenia antybiotyku 66-40 poprzez jego siarczan, 200 g sproszkowanej celulozy Whatman nr 1 miesza się z 20 ml górnej fazy układu rozpuszczalników zawierających chloroform, metanol i 17% roztwór wodorotlenku amonowego (2:1:1) i umieszcza w małych segmentach w kolumnie o wewnętrznej średnicy 6,35 mm i wysokości 508 mm. Dolną fazę układu rozpuszczalników rozpuszcza się przez kolumnę aż ukaże się żółte pasmo zanieczy-

szczeń. 2 g siarczanu antybiotyku 66-40, wytworzonego w wyżej opisany sposób rozpuszcza się w około 3 ml górnej fazy układu rozpuszczalników, miesza z niewielką ilością sproszkowanej celulozy, suszy pod zmniejszonym ciśnieniem i umieszcza w wierzchołku kolumny. Dalszą fazę układu rozpuszczalników przepuszcza się przez kolumnę z prędkością 1 ml/min. i zbiera co 15 minut frakcje po 5 ml.

Próbki poszczególnych frakcji nanosi się na bibułę i bada za pomocą odczynnika ninhydrynowego w celu oznaczenia obecności lub braku antybiotyku. Metodą chromatografii bibułowej stwierdza się, że żądany antybiotyk znajduje się w frakcjach 121—190. Frakcje te łączy się, odparowuje do sucha, pozostałość rozpuszcza w wodzie i przepuszcza przez anionowy wymienniczy żywiczny IRA 401S w cyklu wodorotlenowym. Do eluatu dodaje się kwasu siarkowego, aż do uzyskania wartości pH = 4,5, miesza z węglem aktywnym, odsącza i stęża do małej objętości. Otrzymany koncentrat dodaje się do metanolu użytego w nadmiarze i odsącza pozostały biały osad. Osad ten rozpuszcza się w wodzie i przepuszcza przez wymieniony wyżej anionowy wymienniczy IRA 401S. Eluat stęża się i liofilizuje, otrzymując około 300 mg antybiotyku 66-40 w postaci zasady o aktywności około 1000 mikrogramów/mg.

Przykład III. 104,7 g antybiotyku 66-40, otrzymanego w sposób podany w przykładzie I, rozpuszcza się w 4 ml wody i dodaje kwasu solnego, aż do otrzymania wartości pH = 4,5. Roztwór odparowuje się do sucha i pozostałość rozpuszcza się w metanolu. Do roztworu dodaje się nadmiar acetonu i odsącza powstały osad. Otrzymuje się 130 mg chlorowodoru antybiotyku 66-40 o aktywności 753 mikrogramy/mg.

Przykład IV. Wytwarza się kolumnę chromatograficzną (25×2,5 cm) z żelu krzemionkowego, stosując jako wywoływacz/eluent dolną fazę organiczną mieszaniny rozpuszczalników składających się z izopropanolu, chloroformu i wodorotlenku amonowego (1:2:1). W 5,0 ml tej mieszaniny rozpuszcza się 1,0 g zasady antybiotyku 66-40 i chromatografuje na żelu krzemionkowym, zbierając frakcje po 5,0 ml. We frakcjach tych oznacza się zawartość antybiotyku metodą chromatografii cien-

kowarstwowej na płytkach z żelu krzemionkowego. Łączy się frakcje 44-78 i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując bladożółty syrop, który po azeotropowym przedestylowaniu z etanolem krystalizuje w postaci jasnożółtych rozetek. Otrzymuje się 650 mg jednowodzianu antybiotyku 66-40 o temperaturze topnienia 185—190°C.

Przykład V. 5,0 g antybiotyku 66-40 w 60 ml bezwodnego etanolu traktuje się 5,9 g aldehydu benzoowego (niewielki nadmiar ponad 5 równoważników) i utrzymuje w stanie wrzenia w ciągu 1 godziny. Roztwór chłodzi się i przesącza otrzymując 7,0 g białego produktu krystalicznego o temperaturze 123—126°C, $(\alpha)_D^{25} = +43,2^\circ$ ($C = 0,3\%$ w chloroformie). Analiza elementarna produktu wskazuje obecność 5 reszt aldehydu benzoowego.

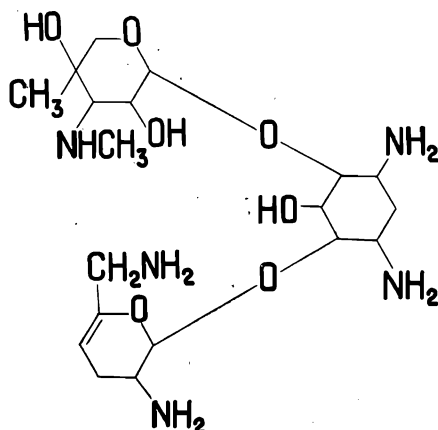
Postępując w sposób analogiczny, lecz stosując zamiast aldehydu benzoowego równoważną ilość aldehydu octowego, furfuralu, aldehydu cyklopentylloctowego, aldehydu krotonowego, waniliny, aldehydu weratrowego lub pirydoksalu, otrzymuje się odpowiednie produkty kondensacji, które z punktu widzenia budowy chemicznej stanowią prawdopodobnie zasady Schiffa.

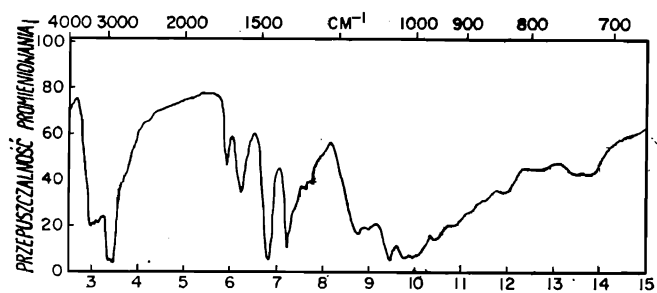
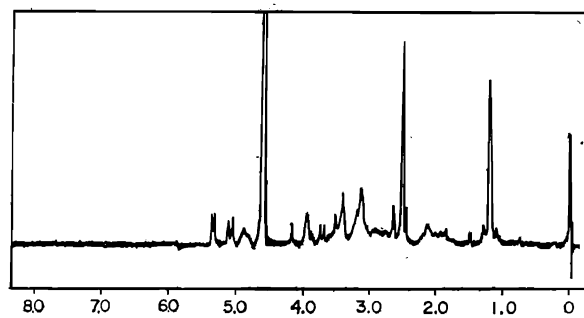
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowego antybiotyku 66-40 o wzorze podanym na rysunku, nazwanego sizomycyną, albo jego farmakologicznie dopuszczalnych pochodnych funkcjonalnych, **znamienny tym**, że mikroorganizm ze szczepu *Micromonospora inyoensis* NRRL 3292 poddaje się hodowli w wodnej pożywce w warunkach aerobowych, po czym antybiotyk wyosabnia się i w razie potrzeby oczyszcza znanymi sposobami i ewentualnie przeprowadza znanymi sposobami w farmakologicznie dopuszczalne pochodne funkcjonalne.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hodowlę prowadzi się w zanurzeniu w pożywce zawierającej źródła przyswajalnego azotu i węgla.

3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że hodowlę prowadzi się w temperaturze 20—40°C, korzystnie 25—35°C w środowisku o wartości pH = 7—8.



**FIG.1** DŁUGOŚĆ FALI W MIKRONACH**FIG.2**