



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

209848

(11)

(B2)

(22) Přihlášeno 10 06 75
(21) (PV 4068-75)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 10 06 74
(477954) Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 31 03 81

(45) Vydáno 15 05 84

(51) Int. Cl.³
C 12 P 1/04
//C 12 R 1/485

(72)
Autor vynálezu

BERG DAVID HERBERT, GREENFIELD, HAMILL ROBERT L., NEW ROSS,
HOEHN MARVIN MARTIN, INDIANAPOLIS, (Sp. st. a.)

(73)
Majitel patentu

ELI LILLY AND COMPANY, INDIANAPOLIS, INDIANA (Sp. st. a.)

(54) Způsob přípravy polyetherických antibiotik A-28086

1

Vynález se týká způsobu přípravy polyetherických antibiotik A-28086 faktorů A, B a D a způsobu přípravy komplexu antibiotik A-28086, z něhož jsou faktory A, B a D odvozeny. Antibiotické sloučeniny jsou použitelné jako antibakteriální, fungicidní, antivirová činidla, jako činidla proti organismům obdobným pleuropneumonii, dále jako antikokcidální, insekticidní a akaricidní činidla a pro zvýšení využitelnosti potravy u přežvýkavců.

Vynález se týká způsobu přípravy komplexu antibiotik A-28086 obsahujících faktor A, faktor B a faktor D, který se vyznačuje tím, že se kultivuje *Streptomyces aureofaciens* NRRL 5758 nebo *Streptomyces aureofaciens* NRRL 8092 v živném médiu obsahujícím asimilovatelné zdroje sacharidů, dusíku a anorganických solí za submerzních aerobních fermentačních podmínek tak dlouho, až je tímto organismem produkováno v uvedeném živném médiu značné množství antibiotické účinnosti.

Antibiotikum A-28086 faktor A je po krystalizaci ze směsi aceton-voda bílá krystalická sloučenina, která je rozpustná v nižších alkoholech, dimethylformamidu, dimethylsulfoxidu, ethylacetátu, chloroformu, acetonu a benzenu, ale v hexanu je pouze mírně rozpustná a je nerozpustná ve vodě.

2

Sloučenina taje asi při 98 až 100 °C, znovu ztuhne a potom znovu taje při 195 až 200 °C a vykazuje

a) molekulární hmotnost 764, stanoveno hmotovou spektrometrií,

b) přibližně elementární složení 66,69 % C, 9,85 % H a 23,10 % O,

c) empirický vzorec $C_{43}H_{72}O_{11}$ stanovený hmotovou spektrometrií,

d) specifickou rotací -54° ($c = 0, 2$, methanol), stanoveno 25 °C,

e) infračervené absorpční spektrum v chloroformu s následujícími odlišitelnými absorpčními maximy: 2,85, 3,34, 5,83, 6,82, 7,22, 7,53 (slabý), 7,78 (slabý), 8,75 (silný), 8,95 (silný), 9,15, 9,50 (silný), 9,55 (silný), 9,60, 9,85, 10,15, 10,45 a 10,70 (slabý) mikronů,

f) ultrafialové spektrum v ethanolu má pouze koncovou absorpci pod 200 $m\mu$,

g) NMR spektrum v deuteriochloroformu má následující charakteristiky: δ 6,01, 4,21, 4,11, 3,99, 3,89, 3,80, 3,67, 3,65, 3,57, 3,55, 2,83, 2,76, 2,74, 2,68, 2,66, 2,58, 2,56, 2,30, 2,22, 2,17, 2,10, 2,05, 1,96, 1,90, 1,85, 1,70, 1,62, 1,60, 1,47, 1,39, 1,31, 1,25, 1,18, 0,95, 0,93, 0,90, 0,88, 0,85, 0,77, 0,75, 0,73, 0,68 a 0,66 ppm,

h) titrovatelnou skupinu s $pK_a = 7,9$ v 80% vodném dimethylformamidu,

i) práškovou difrakci X-paprsky (Cu^{++} radiace, 1,5405 λ , niklový filtr) s následujícími interplanárními vzdálenostmi v angströmech (d),

d	Relativní intenzita
12,00	100
10,10	50
9,25	90
8,00	40
7,50	15
6,92	90
6,40	40
5,98	05
5,68	15
5,20	40
4,98	40
4,62	40
4,21	20
3,48	10

j) Rf hodnota 0,24 při chromatografii na tenké vrstvě silikagelu ve směsi benzen—ethylacetát (3 : 2) při použití *Bacillus subtilis* ATCC 6633 jako detekčního organismu,

k) následující Rf hodnoty při chromatografii na papíře v systémech níže uvedených, za použití *Bacillus subtilis* ATCC 6633 jako detekčního organismu

Rf hodnota	Systém rozpouštědel
0,11	voda nasycená methylisobutylketonem (MIBK)
0,41	voda nasycená MIBK a 2 % p-toluensulfonové kyseliny a 1 % piperidinu
0,54	voda : methanol : aceton (12 : 3 : 1) — upraveno na pH 10,5 NH_4OH a potom na pH 7,5 H_3PO_4
0,48	1 % MIBK, 0,5 % NH_4OH ve vodě
0,15	17,4 g K_2HPO_4 , 30 ml ethanolu na litr vody
0,24	benzen nasycený vodou
0,24	voda
0,75	voda : MIBK : ethylacetát (98 : 1 : 1),

l) kyselou funkci schopnou tvorby solí a esterů a

m) alespoň jednu hydroxylovou skupinu schopnou esterifikace a

acylestery s 2 až 6 atomy uhlíku v acylu a jejich fyziologické soli.

Antibiotikum A-28086 faktor B je po krystalizaci ze směsi aceton—voda bílá krystalická sloučenina, která je rozpustná v nižších alkoholech, dimethylformamidu, dimethylsulfoxidu, ethylacetátu, chloroformu, acetonu a benzenu, ale je pouze mírně rozpustná v hexanu a nerozpustná ve vodě a vykazuje:

a) teplotu tání asi 150 až 153 °C,

b) molekulární hmotnost 762, stanoveno

hmotovou spektrometrií s vysokou rozlišovací schopností,

c) empirický vzorec $\text{C}_{43}\text{H}_{70}\text{O}_{11}$ stanovený hmotovou spektrometrií s vysokou rozlišovací schopností,

d) infračervené absorpční spektrum v chloroformu s následujícími rozlišitelnými absorpčními maximy: 2,82, 3,30, 5,77, 5,85, 6,80, 7,20, 7,50 (slabý), 7,72 (slabý), 7,80 (slabý), 8,57 (silný), 8,68, 8,90 (silný), 9,10, 9,50, 9,83 (silný), 9,90, 10,10, 10,17 (silný), 10,43 (slabý), 10,80 (slabý), 11,20 (slabý), 11,35 (slabý), 11,73 (slabý) a 12,03 (slabý) mikronů,

e) absorpční maximum ultrafialového spektra v ethanolu při 220 $\text{m}\mu$ ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 137,5$, $\epsilon = 10\,477$),

f) NMR spektrum v deuteriochloroformu s následujícími charakteristikami: δ 7,20, 7,09, 6,26, 6,15, 4,19, 4,12, 4,05, 3,95, 3,89, 3,78, 3,62, 3,59, 3,52, 3,48, 2,81, 2,73, 2,63, 2,54, 2,52, 1,99, 1,91, 1,71, 1,67, 1,64, 1,55, 1,43, 1,33, 1,18, 1,11, 0,96, 0,94, 0,90, 0,87, 0,84, 0,77, 0,74 a 0,68 ppm,

g) Rf hodnotu 0,42 při chromatografii na tenké vrstvě silikagelu ve směsi benzen—ethylacetát (3 : 2) použitím *Bacillus subtilis* ATCC 6633 jako detekčního organismu,

h) následující Rf hodnoty při chromatografii na papíře v systémech uvedených níže, při použití *Bacillus subtilis* ATCC 6633 jako detekčního organismu

Rf hodnota	Systém rozpouštědel
0,16	voda nasycená MIBK a 2 % p-toluensulfonové kyseliny a 1 % piperidinu
0,46	voda : methanol : aceton (12 : 3 : 1) — upraveno na pH 10,5 NH_4OH a potom na pH 7,5 H_3PO_4
0,36	1 % MIBK, 0,5 % NH_4OH ve vodě
0,51	benzen nasycený vodou
0,11	voda
0,61	voda : MIBK : ethylacetát (98 : 1 : 1),

i) kyselou funkci schopnou tvorby solí a esterů,

j) dvě ketonické funkční skupiny,

k) alespoň jednu hydroxylovou funkční skupinu,

a jeho fyziologicky vhodné soli.

Antibiotiku A 28086 faktor D je po krystalizaci ze směsi aceton—voda bílá krystalická látka, která je rozpustná v methanolu, ethanolu, dimethylformamidu, dimethylsulfoxidu, ethylacetátu, chloroformu, acetonu a benzenu, ale je pouze mírně rozpustná v hexanu a je nerozpustná ve vodě, má teplotu tání asi 96 až 98 °C a vykazuje:

a) molekulární hmotnost 778, stanoveno hmotovou spektrometrií s vysokou rozlišovací schopností,

b) přibližné elementární složení 67,59 % C, 9,38 % H a 22,77 % O,

c) empirický vzorec $C_{44}H_{74}O_{11}$ stanovený hmotovou spektrometrií s vysokou rozlišovací schopností,

d) specifickou rotací -56° ($c = 0,1$, methanol), stanoveno při 25°C ,

e) infračervené absorpční spektrum v chloroformu s následujícími absorpčními maximy: 2,89, 3,39, 3,43, 3,50, 5,88, 6,90, 7,27, 7,60, 7,84, 9,00, 9,26, 9,62, 10,31, 10,58, 11,10 a 11,49 mikronů,

f) nepozorovanou ultrafialovou absorpci v 95% vodném ethanolu,

g) NMR spektrum v chloroformu s následujícími charakteristikami: δ 6,00, 4,20, 4,10, 4,00, 3,98, 3,92, 3,86, 3,83, 3,79, 3,67, 3,64, 3,57, 3,54, 2,88, 2,81, 2,71, 2,62, 2,58, 2,48, 2,43, 2,37, 2,29, 2,21, 2,15, 2,10, 2,04, 1,97, 1,89, 1,83, 1,76, 1,68, 1,61, 1,58, 1,55, 1,47, 1,39, 1,30, 1,25, 1,18, 0,95, 0,90, 0,88, 0,84, 0,74 a 0,68 ppm,

h) titrovatelnou skupinu s pK_a hodnotou 8,67 v 80% vodném dimethylformamidu,

i) charakteristickou práškovou difrakci X paprsky (Cu^{++} radiace $1,545 \text{ \AA}$, niklový filtr) s následujícími interplanárními vzdálenostmi v angströmech (d):

d	Relativní intenzita
12,40	100
10,20	70
8,85	90
7,80	30
6,80	10
6,30	100
5,70	20
5,35	20
5,10	20
4,90	10
4,65	20
4,45	40
4,20	30
3,30	10
3,15	10
2,99	05
2,77	05
2,28	05

j) následující R_f hodnoty při chromatografii na tenké vrstvě silikagelu v systémech uvedených níže, za použití *Bacillus subtilis* ATCC 6633 jako detekčního organismu:

R_f hodnota	Systém rozpouštědel
0,26	benzen—ethylacetát (3 : 2)
0,66	ethylacetát—diethylamin (95 : 5),

k) následující R_f hodnoty při chromatografii na papíře v systémech uvedených níže, použitím *Bacillus subtilis* ATCC 6633 jako detekčního organismu:

R_f hodnota	Systém rozpouštědel
0,10	voda nasycená methylisobutylketonem (MIBK)
0,26	voda nasycená MIBK a 2 % p-toluensulfonové kyseliny a 1 % piperidinu
0,36	voda : methanol : aceton (12 : 3 : 1) — upraveno na pH 10,5 NH_4OH a potom na pH 7,5 H_3PO_4
0,29	1 % MIBK, 0,5 % NH_4OH ve vodě
0,25	17,4 g K_2HPO_4 , 30 ml ethanol na litr vody
0,26	benzen nasycený vodou
0,09	voda
0,64	voda : MIBK : ethylacetát (98 : 1 : 1),

l) kyselou funkci schopnou tvorby solí a esterů,

m) alespoň jednu hydroxylovou skupinu schopnou esterifikace,

a acylestery s 2 až 6 atomy uhlíku v acylu a fyziologicky vhodné soli.

I když je v současné době známo značné množství antibakteriálních činidel, je stálá potřeba nových lepších antibiotik. Jedním z problémů současné terapie antibiotiky je fakt, že antibiotika se liší v účinnosti proti patogenním organismům. Jiným problémem je vyvinutí kmenů organismů, které jsou rezistentní vůči standardním antibiotikům. Ještě dalším problémem je fakt, že jednotliví pacienti často mají vážné reakce na určitá antibiotika, což je způsobeno přecitlivělostí a/nebo toxickými účinky. Vzhledem k těmto problémům v současné terapii jsou stále zapotřebí nová antibiotika.

Kromě požadavku na nová antibiotika, která by byla použitelná pro léčení onemocnění u lidí, jsou zapotřebí také antibiotika ve veterinární oblasti. Jedním důležitým rysem, pro který jsou zapotřebí lepší antibiotika, je potřeba antibiotik pro urychlení růstu drůbeže a skotu. Urychlení růstu se dosáhne například snížením onemocnění a zvýšením využitelnosti potravy.

Dobře známé onemocnění ekonomického dosahu z veterinární oblasti, přesněji z drůbežářského průmyslu, je kokcidióza způsobená prvoky. Kokcidióza vzniká infekcí jedním nebo více druhy *Eimeria* nebo *Isospora* (pro přehled viz Lund a Farr „Diseases of Poultry“ 5. vydání Biester and Schwarte, Eds. Iowa State University Press, Ames, Ia., 1965, str. 1056—1096). Z hlediska velkých ekonomických ztrát způsobených kokcidiózou a nevýhodností některých známých činidel proti kokcidióze stále pokračuje výzkum lepších činidel proti kokcidióze.

Enteritis a jiná onemocnění mohou způsobit značné ekonomické ztráty u živočišných producentů. Enteritis se vyskytuje u kuřat, prasat, dobytka a ovcí a je způsobována převážně anaerobní bakterií, zejména

Clostridium perfringens a viry. Enterotoxemie u přežvýkavců, jejíž příkladem je „onemocnění z přežrání“ u ovcí, je stav způsobený infekcí *C. perfringens*.

Urychlení růstu u přežvýkavců, jako je dobytek, je jiným ekonomicky požadovaným cílem veterinárních věd. Mechanismus pro využití hlavních živných částí (sacharidů) potravy přežvýkavců je dobře znám. Mikroorganismy v žaludku přežvýkavců degradují sacharidy na monosacharidy a potom převádějí tyto monosacharidy na sloučeniny pyruvátu. Pyruvát se metabolizují mikrobiálními postupy na acetáty, butyráty nebo propionáty, obecně známé jako těkavé mastné kyseliny. Pro detailní diskuzi viz Leng v „Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant“, Phillipson aj., Eds. Oriel Press, Newcastle-upon-Tyne, England, 1970, str. 408—410.

Relativní využitelnost těkavých mastných kyselin je diskutována McCullough v Feed-stuffs, June 19, 1971, str. 19; Eskeland aj. v J. An. Sci 33, 282 (1971); a Church aj. v „Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants, sv. 2, 1971, str. 622 a 625. I když acetáty a butyráty se využívají, propionáty se využívají více. Dále jestliže je dostupno příliš málo propionátu, vyvíjí se u zvířat ketóza. Výhodné sloučeniny proto stimulují u zvířat produkci vyššího poměru propionátu ze sacharidů, což vede k vyšší využitelnosti sacharidů a také ke snížení případů ketózy.

Antibiotika A-28086 faktory A, B a D jsou novými členy polyetherických antibiotik. Příklady této skupiny jsou: monensin (US patent 3 501 568); dianemycin [R. L. Hamill, M. M. Hoehn, G. E. Pittenger, J. Chamberlin a M. Gorman, J. Antibiotics 22, 161 (1969)]; nigericin [K. L. Steinrauf, Mary Pinkerton a J. W. Chamberlin, Biochem. Biophys. Res. Comm. 33 29 (1968)]; a salinomycin [japonský publikovaný patent 47-25392, 20. X. 1972, Derwent No. 76960T, U. S. patent č. 3 857 948 a H. Kinashi, N. Otake, H. Yonehara, S. Sato a Y. Saito, Tetrahedron Lett. 49, 4955—4958 (1973)].

Výraz „komplex antibiotik“, jak je používán při fermentaci, neznamená chemický komplex, ale je směsí současně produkovaných jednotlivých antibiotických faktorů. Jak je známo odborníkům z oblasti fermentace, poměr jednotlivých faktorů produkovaných v komplexu antibiotik je různý v závislosti na podmínkách fermentace.

Komplex antibiotik A-28086 je produkován kultivací nového kmenu *Streptomyces aureofaciens* NRRL 5758 za submerzních aerobních fermentačních podmínek tak dlouho, až vznikne značná hladina antibiotické aktivity. Komplex antibiotik A-28086 může být také produkován jiným kmenem *Streptomyces aureofaciens* NRRL 8092.

Jestliže je komplex antibiotik A-28086 produkován buď kmenem *S. aureofaciens* NRRL 5758, nebo kmenem *S. aureofaciens* NRRL

8092, potom se z fermentačního roztoku a mycelia extrahuje polárními organickými rozpouštědly. Extrahovaná antibiotická směs se oddělí odpařením rozpouštědel, koncentrát se přidá k nadbytku petroletheru, aby se vysrážely nečistoty a po filtraci a odpaření filtrátu se získá antibiotická směs A-28086. Antibiotická směs se dále čistí a dělí na individuální faktory chromatografií na koloně.

Sloučeniny A-28086 vykazují inhibici růstu organismů, které jsou patogenní pro živočišný a rostlinný život. Podle jednoho rysu této inhibiční aktivity působí sloučeniny A-28086 jako činidla proti kokcióze. Kromě toho jsou sloučeniny A-28086 antibakteriální činidla, antivirová činidla, anti-PPLO (pleuropneumonia-like organismus) činidla, insekticidní činidla a akaricidní činidla a zvyšují využití potravy u přežvýkavců.

Následující infračervená absorpční spektra v chloroformu jsou uvedena na výkresech, kde na

- obr. 1 je antibiotikum A-28086 faktor A,
- obr. 2 je antibiotikum A-28086 faktor B,
- obr. 3 je antibiotikum A-28086 faktor A acetyl ester
- obr. 4 je antibiotikum A-28086 faktor A propionyl ester,
- obr. 5 je antibiotikum A-28086 faktor A butyryl ester,
- obr. 6 je antibiotikum A-28086 faktor A valeryl ester,
- obr. 7 je antibiotikum A-28086 faktor A kaproyl ester,
- obr. 8 představuje antibiotikum A-28086 faktor D.

Faktory antibiotik A-28086 jsou si vzájemně strukturně příbuzné. Během fermentace se současně produkují alespoň čtyři antibiotické faktory a získá se jejich směs. Faktory se vzájemně oddělí a faktory A, B a D se izolují jako individuální sloučeniny postupem popsáním dále. Směs faktorů A-28086 je rozpustná v převážné části organických rozpouštědel, avšak je nerozpustná ve vodě.

Následující odstavce popisují fyzikální a spektrální vlastnosti A-28086 faktorů A, B a D.

Antibiotikum A-28086 faktor A krystaluje ze směsi aceton—voda. A-28086 faktor A taje při teplotě asi 98 až 100 °C, znovu ztuhne a opět taje při 195 až 200 °C. Elementární analýza faktoru A poskytla následující průměrné procentuální složení: uhlík 66,69 procenta, vodík 9,85 % a kyslík 23,10 %.

Empirický vzorec navržený pro faktor A je $C_{43}H_{72}O_{11}$.

Faktor A má molekulární hmotnost 764, stanoveno hmotovou spektrometrií.

Infračervené spektrum faktoru A v chloroformu je znázorněno na obr. 1 připojeného výkresu. Byly pozorovány následující absorpční maxima: 2,85, 3,34, 5,83, 6,82, 7,22, 7,53 (slabý), 7,78 (slabý), 8,75 (silný), 8,95 (silný), 9,15, 9,50 (slabý), 9,55 (silný), 9,60,

9,85, 10,15, 10,45 a 10,70 (slabý) mikronů.

Ultrafialové spektrum faktoru A v ethanolu vykazuje pouze koncovou absorpci pod 220 m μ .

NMR spektrum A-28086 faktoru A v deuteriochloroformu má následující charakteristiky: δ 6,01, 4,21, 4,11, 3,99, 3,89, 3,80, 3,67, 3,65, 3,57, 3,55, 2,83, 2,76, 2,74, 2,68, 2,66, 2,58, 2,56, 2,30, 2,22, 2,17, 2,10, 2,05, 1,96, 1,90, 1,85, 1,70, 1,62, 1,60, 1,47, 1,39, 1,31, 1,25, 1,18, 0,95, 0,93, 0,90, 0,88, 0,85, 0,77, 0,75, 0,73, 0,68 a 0,66 ppm.

Antibiotikum A-28086 faktor A krystaluje ze směsi aceton—voda a vykazuje následující charakteristickou práškovou difrakci X-paprsky [Cu⁺⁺ radiace 1,5405 λ], niklový filtr (d = interplanární vzdálenosti v angströmech (10⁻¹⁰ m)

d	Relativní intenzita
12,00	100
10,10	50
9,25	90
8,00	40
7,50	15
6,92	90
6,40	40
5,98	05
5,68	15
5,20	40
4,98	40
4,62	40
4,21	20
3,48	10

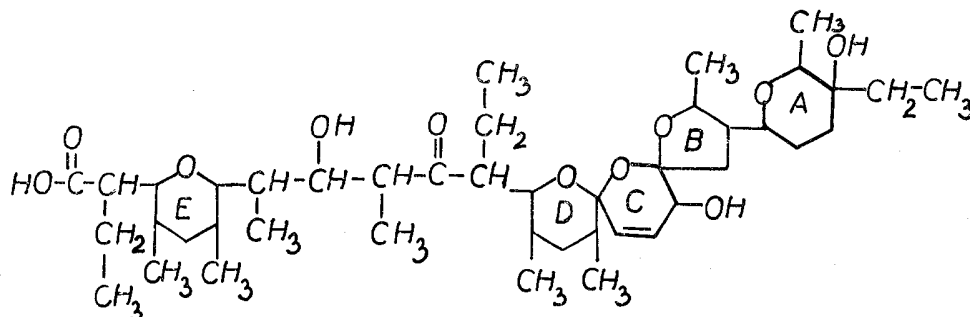
Specifická rotace antibiotika A-28086 faktoru A je -54° (c = 2, methanol), stanovené při 25 °C. Tato specifická rotace je průměrná hodnota několika stanovení.

Elektrometrická titrace faktoru A v 80% vodném dimethylformamidu indikuje přítomnost titrovatelné skupiny pKa = 7,9.

Antibiotikum A-28086 faktor A je rozpustný v různých organických rozpouštědlech, jako je methanol, ethanol, dimethylformamid, dimethylsulfoxid, ethylacetát, chloroform, aceton a benzen, avšak je pouze mírně rozpustný v nepolárních organických rozpouštědlech, jako je hexan, a je nerozpustný ve vodě.

Antibiotikum A-28086 faktor A má kyselou funkční skupinu schopnou tvorby solí a esterů a alespoň jednu hydroxylovou skupinu schopnou esterifikace.

Na základě výše uvedených fyzikálních vlastností je možno navrhnout strukturu antibiotika A-28086 faktor A. Vzhledem k tomu, že strukturní stanovení je pouze navržené, rozumí se, že struktura uvedená zde představuje pouze pracovní hypotézu. Návrh struktury pro A-28086 faktor A je znázorněn vzorcem I.



vzorec I

Antibiotikum A-28086 faktor B je bílá krystalická sloučenina (ze směsi aceton—voda), která má teplotu tání 150 až 153 °C.

Jak bylo stanoveno hmotovou spektrometrií s vysokou rozlišovací schopností, má faktor B molekulární hmotnost 762 a navržený empirický vzorec je C₄₃H₇₀O₁₁.

Infračervené spektrum faktoru B v chloroformu je uvedeno na obr. 2 připojeného výkresu a má následující absorpční maxima: 2,82, 3,30, 5,77, 5,85, 6,80, 7,20, 7,50 (slabý), 7,72 (slabý), 7,80 (slabý), 8,57 (silný), 8,68, 8,90 (silný), 9,10, 9,50, 9,83 (silný), 9,90, 10,10, 10,17 (silný), 10,43 (slabý), 10,80 (slabý), 11,20 (slabý), 11,35 (slabý), 11,73 (slabý), a 12,03 (slabý) mikrony.

Ultrafialové spektrum faktoru B v ethanolu vykazuje absorpční maximum při 220 m μ (E_{1cm}^{1%} = 137,5, ϵ = 10,477).

NMR spektrum A-28086 faktoru B v deuteriochloroformu vykazuje následující charakteristiky: δ 7,20, 7,09, 6,26, 6,15, 4,19, 4,12, 4,05, 3,95, 3,89, 3,78, 3,62, 3,59, 3,52, 3,48, 2,81, 2,73, 2,63, 2,54, 2,52, 1,99, 1,91, 1,84, 1,71, 1,67, 1,64, 1,55, 1,43, 1,33, 1,18, 1,11, 0,96, 0,94, 0,90, 0,87, 0,84, 0,77, 0,74 a 0,68 ppm.

Antibiotikum A 28086 faktor B je rozpustné v různých organických rozpouštědlech, jako je například methanol, ethanol, dimethylformamid, dimethylsulfoxid, ethylacetát, chloroform, aceton a benzen, avšak je

mírně rozpustné v nepolárních organických rozpouštědlech, jako je hexan, a nerozpustné ve vodě.

I když chemická struktura antibiotika A-28086 faktor B nebyla stanovena, dostupná fyzikálně-chemická data indikují, že faktor B má jednu karboxylovou skupinu a dvě ketoskupiny a jednu nebo více hydroxylů.

Antibiotikum A-28086 faktor D při produkci *S. aureofaciens* NRRL 5758 je minoritním faktorem. Jestliže se však kultivuje *S. aureofaciens* NRRL 8092, je A-28086 faktor D produkován v množství až do 10 % izolované antibiotické aktivity.

Antibiotikum A-28086 faktor D je bílá krystalická látka (voda—aceton), jejíž teplota tání je asi 96 až 98 °C. Antibiotikum A-28086 faktor D má molekulární možnost 778, stanoveno hmotovou spektrometrií s vysokou rozlišovací schopností.

Elementární složení pásu hmotového spektra sodné soli A-28086 faktor D je 800,5050 (vypočteno pro $C_{44}H_{73}O_{11}Na = 800,5050$). V hmotovém spektru volné kyseliny antibiotika A-28086 faktor D je pozorován malý pás při 778 a větší pás při 760,5117 (vypočteno pro $C_{44}H_{72}O_{10} = 760,5125$), m/e 760 v hmotovém spektru volné kyseliny vzniká ztrátou vody z molekulárního iontu. Složení molekulárního iontu A-28086 faktor D volné kyseliny je tudíž $C_{44}H_{74}O_{11}$.

Empirický vzorec navržený pro A-28086 faktor D je $C_{44}H_{74}O_{11}$. Elementární analýzu faktoru D poskytuje následující složení: uhlík 67,59 %, vodík 9,38 %, kyslík 22,77 %.

Teoretické procentické složení pro $C_{44}H_{74}O_{11}$ je uhlík 67,87 %, vodík 9,51 %, kyslík 22,77 %.

Infračervené absorpční spektrum A-28086 faktor D (obr. 8) obsahuje následující absorpční maximum: 2,89, 3,39, 3,43, 3,50, 5,88, 6,90, 7,27, 7,60, 7,84, 9,00, 9,26, 9,62, 10,31, 10,58, 11,10 a 11,49 mikronů.

A-28086 faktor D v 95% vodném ethanolu nevykazuje ultrafialovou absorpci.

NMR spektrum A-28086 faktor D v deuteriochloroformu vykazuje následující charakteristiky: δ 6,00, 4,20, 4,10, 4,00, 3,98, 3,92, 3,86, 3,83, 3,79, 3,67, 3,64, 3,57, 3,54, 2,88, 2,81, 2,71, 2,62, 2,58, 2,48, 2,43, 2,37, 2,29, 2,21, 2,15, 2,10, 2,04, 1,97, 1,89, 1,83, 1,76, 1,68, 1,61, 1,58, 1,55, 1,47, 1,39, 1,30, 1,25, 1,18, 0,95, 0,90, 0,88, 0,84, 0,74 a 0,68 ppm.

Antibiotikum A-28086 faktor D krystaluje ze směsi aceton—voda a má následující charakteristickou práškovou difrakci X-paprsků (Cu^{++} radiace, 1,5405 Å, nikelnatý filtr, $d =$ interplanární vzdálenosti v angströmech 10^{-10} m)

d	Relativní intenzita
12,40	100
10,20	70
8,85	90
7,80	30
6,80	10
6,30	100
5,70	20
5,35	20
5,10	20
4,90	10
4,65	20
4,45	40
4,20	30
3,30	10
3,15	10
2,99	05
2,77	05
2,28	05

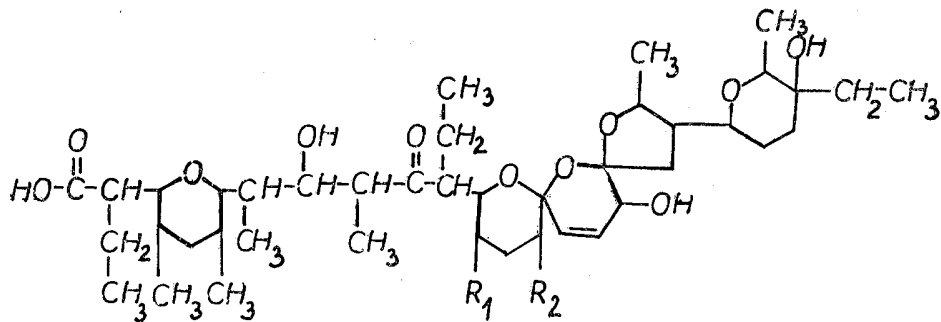
Specifická rotace antibiotika A-28086 faktor D je -56° ($c = 0,1$, methanol), stanoveno při 25 °C.

Elektrometrická titrace A-28086 faktor D v 80% vodném dimethylformamidu indikuje přítomnost titrovatelné skupiny pKa 8,67.

Antibiotikum A-28086 faktor D je rozpustný v mnoha organických rozpouštědlech, jako je methanol, ethanol, dimethylformamid, dimethylsulfoxid, ethylacetát, chloroform, aceton a benzen. A-28086 faktor D je pouze mírně rozpustný v nepolárních organických rozpouštědlech, jako je hexan, a je nerozpustný ve vodě.

Antibiotikum A-28086 faktor D má kyslou funkční skupinu schopnou tvorby solí a esterů a alespoň jednu hydroxylovou skupinu schopnou esterifikace.

Na základě fyzikálních charakteristik uvedených výše byla navržena struktura antibiotika A-28086 faktor D. Protože struktura je pouhým návrhem, rozumí se, že uvedená struktura je pouze pracovní hypotézou. Návrh struktury A-28086 faktor D je uvedený vzorec II



vzorec II

kde

bud' $R_1 = \text{CH}_3$ a $R_2 = \text{C}_2\text{H}_5$,
nebo $R_1 = \text{C}_2\text{H}_5$ a $R_2 = \text{CH}_3$.

R_f hodnoty antibiotika A-28086, faktoru

A, B a D v různých systémech při papírové chromatografii za použití *Bacillus subtilis* ATCC 6633 jako detekčního organismu jsou uvedeny v tabulce I.

TABULKA I

faktor A	R_f hodnoty faktor B	faktor D	Systém rozpouštědel
0,11	0,09	0,10	voda nasycená methylisobutylketonem (MIBK)
0,41	0,16	0,26	voda nasycená MIBK a 2 % p-toluensulfonové kyseliny a 1 % piperidinu
0,54	0,46	0,36	voda : methanol : aceton (12 : 3 : 1) — pH upraveno NH_4OH na 10,5 a pak na pH 7,5 přidáním H_3PO_4
0,48	0,36	0,29	1 % MIBK, 0,5 % NH_4OH ve vodě
0,15	0,33	0,25	17,4 g K_2HPO_4 , 30 ml ethanolu na litr vody
0,24	0,51	0,26	benzen nasycený vodou
0,24	0,11	0,09	voda
0,75	0,61	0,64	voda : MIBK : ethylacetát (98 : 1 : 1)

V tabulce II jsou uvedeny R_f hodnoty antibiotika A-28086 faktorů A, B a D ve dvou chromatografických systémech při chromatografii na tenké vrstvě silikagelu (hotové

desky E. Merck, Darmstadt F-254, síla vrstvy 0,25 mm) rovněž za použití *B. subtilis* ATCC 6633 jako detekčního organismu.

TABULKA II

faktor A	R_f hodnoty faktor B	faktor D	Systém rozpouštědel
0,24	0,42	0,26	benzen-ethylacetát (3 : 2)
0,54	0,34	0,66	ethylacetát-diethylamin (95 : 5)

Současně s komplexem antibiotik A-28086 je produkována další látka označená A-28086-I. I když A-28086-I není mikrobiálně aktivní, je strukturně příbuzná faktorům antibiotika A-28086. Látka A-28086-I je bílá krystalická sloučenina (ze směsi aceton—voda) a má teplotu tání asi 160 až 162 °C. Srovnávací studie NMR spektra a jiné vlastnosti A-28086-I a synteticky připraveného methylesteru A-28086 faktoru A ukazují, že A-28086-I je methylesterem A-28086 faktoru A nebo jeho blíže příbuznou sloučeninou, jako je stereoisomer.

I když A-28086-I se původně sráží s aktivními A-28086 faktory, snadno se od nich odděluje chromatografií na silikagelu. A-28086-I má přibližně Rf-hodnotu 0,53 při chromatografii na tenké vrstvě silikagelu použitím ethylacetátu jako elučního činidla a detekcí vanilinovým detekčním činidlem (3 % vanilinu v methanolu + 0,5 ml koncentrované H₂SO₄ na 100 ml roztoku). Po postříkání vanilinem a zahřívání poskytuje A-28086-I modrou skvrnu, zatímco A-28086 faktory poskytují jasně růžové skvrny, které rychle přecházejí na temně hnědomodré skvrny.

Antibiotikum A-28086 faktory A, B a D a uvedené acylestery faktorů A a D jsou schopny tvořit soli. „Fyziologicky vhodné soli“ jsou soli farmaceuticky vhodné, tj. takové, ve kterých toxicita sloučeniny jako celku není u teplokrevných živočichů relativně vyšší než u volné sloučeniny. Reprezentativní a vhodné soli alkalických kovů a kovů alkalických zemin A-28086 faktorů A a B jsou sodné soli, draselné soli, lithné soli, cesné soli, rubidné soli, barnaté soli, vápenaté soli a hořečnaté soli. Vhodnými amoniiovými solemi A-28086 faktorů A a B jsou amonná sůl, primární, sekundární a terciární alkylamoniové soli s 1 až 4 atomy uhlíku a hydroxyalkylamoniové soli s 2 až 4 atomy uhlíku. Vhodnými amoniiovými solemi jsou ty, které tvoří k antibiotikům A-28086 faktory A a B s hydroxidem amoniiovým, methylaminem, sebutylaminem, isopropylaminem, diethylaminem, diisopropylaminem, ethanolaminem, triethylaminem, 3-amino-1-propanolem apod.

Soli A-28086 faktorů A, B a D a acylesterů faktorů A a D s kationty alkalických kovů a kovů alkalických zemin se připravují postupem běžně používaným pro přípravu solí s kationty. Například volná kyselina faktoru antibiotika nebo odpovídajícího esteru se rozpustí ve vhodném rozpouštědle, jako je horký methanol nebo ethanol a k tomuto roztoku se přidá roztok obsahující stechiometrické množství požadované anorganické báze ve vodném methanolu. Takto vzniklá sůl se izoluje běžným způsobem filtračí nebo odpařením rozpouštědla.

Soli tvořené s organickými aminy se mohou připravit obdobným způsobem. Například plynné nebo kapalné aminy se mohou přidat k roztoku antibiotika ve vhodném

rozpouštědle, jako je aceton a rozpouštědlo a přebytek aminu se odstraní odpařením.

Z veterinární farmaceutické praxe je dobře známo, že forma antibiotika není rozhodující při léčení živočicha antibiotikem. V mnoha případech živočich mění formu preparátu na jinou formu než je ta, ve které se antibiotikum aplikuje. Forma soli, ve které se antibiotikum aplikuje, není rozhodující pro způsob léčení. Forma soli je však mnohdy vhodná z důvodů ekonomických, aplikační vhodnosti a toxicity.

A-28086 faktor A tvoří acylestery. Esterifikace probíhá na jedné z hydroxyskupin A-28086 faktoru A reakcí s anhydridy nebo chloridy kyselin s 2 až 6 atomy uhlíku. Tyto estery se připravují reakcí A-28086 faktoru A například s odpovídajícím anhydridem kyseliny při teplotě místnosti. Tyto estery jsou také použitelné jako antibiotika a jako činidla zvyšující využití potravy.

Následující odstavce popisují charakteristiky těchto acylesterů A-28086 faktoru A.

Acetylderivát A-28086 faktoru A je bílá krystalická sloučenina (ze směsi aceton—voda) teploty tání 100 až 103 °C. Acetyler A-28086 faktoru A má empirický vzorec C₄₅H₇₄O₁₂ a molekulární hmotnost kolem 807, vztaženo na empirický vzorec navržený pro A-28086 faktor A. Elementární analýza acetyleru faktoru A má následující procentické složení:

Pro C₄₅H₇₄O₁₂:

Vypočteno:

66,97 % C, 9,24 % H, 23,79 % O;

nalezeno:

67,67 % C, 8,71 % H, 23,13 % O.

Infračervené spektrum acetyleru A-28086 faktoru A v chloroformu je uvedeno na obr. 3 připojeného výkresu. Ve spektru jsou pozorovatelná následující absorpční maxima: 2,85, 3,36, 3,38 (silný), 5,80, 6,83, 7,25, 7,52 (silný), 7,60 (slabý), 7,80 (silný), 8,45 (silný), 8,80 (silný), 8,95 (silný), 9,10 (silný), 9,20, 9,63, 9,80 (silný), 10,12 (slabý), 10,25 (slabý) a 10,50 mikronů.

Ultrafialové spektrum acetyleru A-28086 faktoru A v ethanolu vykazuje pouze koncovou absorpci.

Elektrometrická titrace acetyleru A-28086 faktoru A v 80% vodném dimethylformamidu uvádí přítomnost titrovatelné skupiny s hodnotou pKa 8,5.

Propionylester A-28086 faktoru A je bílá krystalická sloučenina (ze směsi aceton—voda) teploty tání 96 až 98 °C. Propionylester A-28086 faktoru A má empirický vzorec C₄₆H₇₆O₁₂ a molekulární váhu 821, vztaženo na empirický vzorec navržený pro A-28086 faktor A. Elementární analýza propionylesteru faktoru A má následující procentické složení:

Pro $C_{46}H_{76}O_{12}$:

Vypočteno:

67,29 % C, 9,33 % H, 23,38 % O;
nalezeno:
66,06 % C, 9,17 % H, 23,41 % O.

Infračervené spektrum propionylesteru A-28086 faktoru A v chloroformu je na obr. 4 připojeného výkresu. Ve spektru jsou pozorovatelná následující absorpční maxima: 2,85, 3,33, 3,38 (silný), 3,45 (silný), 5,75 (silný), 5,82, 6,81, 7,22, 7,30 (silný), 7,50 (slabý), 7,60 (slabý), 7,80, 8,43, 8,75 (silný), 8,90, 9,05, 9,15 (silný), 9,50 (silný), 9,63, 9,83 (slabý), 10,05 (silný), 10,13, 10,20 (silný), 10,45 a 10,68 mikronů.

Ultrafialové spektrum propionylesteru A-28086 faktoru A v ethanolu, vykazuje pouze koncové absorpce.

Butyrylester antibiotika A-28086 faktoru A je bílá krystalická sloučenina (ze směsi aceton-voda), teploty tání asi 96 až 98 °C. Butyrylester A-28086 faktoru A má empirický vzorec $C_{47}H_{76}O_{12}$, molekulární váhu asi 835 a přibližné složení 67,60 % C, 9,41 % H a 22,99 % O, jak je odvozeno z empirického vzorce navrženého pro A-28086 faktor A.

Infračervené spektrum butyrylesteru A-28086 faktoru A v chloroformu je uvedeno na obr. 5 připojeného výkresu. Byla pozorována následující absorpční maxima: 2,89, 3,40, 3,45, 3,51, 5,85, 5,92 (silný), 5,97 (silný), 6,90, 7,30, 7,84 (slabý), 8,55, 8,85 (slabý), 9,01 (silný), 9,26, 9,76, 9,95, 10,31 a 10,64 mikronů.

Valerylester A-28086 faktoru A je bílá krystalická sloučenina (ze směsi aceton-voda), má teplotu tání 173 až 175 °C. Valerylester A-27086 faktoru A má empirický vzorec $C_{48}H_{80}O_{12}$, molekulární hmotnost asi 849 a přibližné složení 67,89 % C, 9,50 % H a 22,61 % O, jak je odvozeno od empirického vzorce navrženého pro A-28086 faktor A.

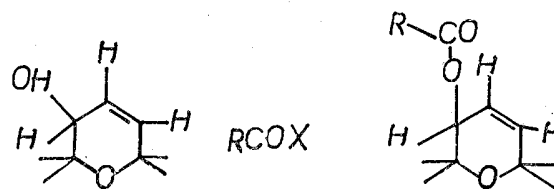
Infračervené spektrum valerylesteru A-28086 faktoru A v chloroformu je patrné na obr. 6 připojeného výkresu. Ve spektru jsou pozorovatelná následující absorpční maxima: 2,90, 3,40, 3,45, 3,51, 5,87, 5,92 (silný), 5,99 (silný), 6,91, 7,30, 7,69 (slabý), 7,87 (slabý), 8,16, 8,58, 8,85 (slabý), 9,26, 9,76, 10,00 (slabý), 10,31 a 10,64 mikronů.

Kaproylester A-28086 faktoru A je bílá krystalická sloučenina (ze směsi acetonu a vody) teploty tání 163 až 167 °C. Kaproylester A-28086 faktoru A má empirický vzorec $C_{49}H_{82}O_{12}$, molekulární hmotnost asi 863 a přibližné složení 68,18 % C, 9,58 % H a 22,24 % O, jak je odvozeno od empirického vzorce navrženého pro A-28086 faktor A.

Infračervené spektrum kaproylesteru A-28086 faktoru A v chloroformu je uvedeno na obr. 7 připojeného výkresu. Ve spektru jsou pozorovatelná následující absorpční maxima: 2,90, 3,40, 3,45, 3,51, 5,87, 5,92 (sil-

ný), 5,97 (silný), 6,90, 7,30, 7,66 (slabý), 7,84 (slabý), 8,16, 8,58, 8,85 (slabý), 9,05 (silný), 9,17, 9,72, 9,95, 10,29, 10,62 mikronů.

Acylace A-28086 faktoru A vede k následujícím změnám ve spektru protonové jaderné magnetické rezonance: Rezonance karbonylu vyskytující se při 4 ppm se posunuje dolů přibližně na 5,3 ppm (přesná poloha se mírně mění podle různých acylderivatů) a vinylové protonické signály se také posunují. Tyto charakteristické změny jsou reprezentovány parciálním vzorcem:



kde R je alkyl s 1 až 5 atomy uhlíku.

Tato parciální struktura je plně v souladu s decoupling pokusy v PMR spektru a s údaji z ^{13}C NMR spektra pro acetyl a propionylestery.

Acylylester A-28086 faktoru A s 2 až 6 atomy uhlíku v acylu jsou rozpustné v řadě organických rozpouštědel, jako je methanol, ethanol, dimethylformamid, dimethylsulfoxid, ethylacetát, chloroform, aceton a benzen, jsou ale pouze mírně rozpustné v nepolárních organických rozpouštědlech, jako je hexan a jsou nerozpustné ve vodě.

Každý z acylesterů s 2 až 6 atomy uhlíku A-28086 má karboxylovou skupinu a je schopen tvorby solí a esterů.

Nová antibiotika se produkují kultivací A-28086 produkujícího kmenu *Streptomyces aureofaciens* za submerzních aerobních podmínek ve vhodném živném médiu tak dlouho, až vznikne značná antibiotická aktivita. Antibiotikum se izoluje běžně známými postupy používanými pro izolaci a čištění antibiotik.

Jeden z nových organismů použitelný pro přípravu A-28086 antibiotik byl izolován ze vzorku půdy sebrané na hoře Ararat v Turecku. Tento organismus byl klasifikován jako kmen *Streptomyces aureofaciens* Duggar, jak je popsáno E. B. Shirling a D. Gottlieb v „Cooperative Description of Type Cultures of *Streptomyces*. III. Additional Species Descriptions from First and Second Studies“, Intern. Bull. Systematic Bacteriol. 18, 279 až 392 (1968). Tato klasifikace je založena na metodě doporučené International *Streptomyces* Project [E. B. Shirling a D. Gottlieb, „Methods for Characterization of *Streptomyces* species.“ Intern. Bull. Systematic Bacteriol. 16, 313 až 340 (1966)] spolu s některými doplňujícími testy. Názvy barev byly přiřazeny podle ISCC-NBS metody [K. L. Kelly a D. B. Judd, „The ISCC-NBS Method of Designating Color and a

Dictionary of Color Names", U. S. Dept. of Commerce, Circ. 553, 1955, Washington, D. C.). Hodnoty v závorkách odkazují na Tresner a Backus barevné řady [Tresner, H. D. a S. J. Backus, „System of Color Wheels for Streptomyces Taxonomy“, Appl. Microbiol. 11, 335 až 338 (1963)]; označení barevné kontroly je podtrženo. Maerz a Paul barevné hodnoty (A. Maerz a M. R. Paul, „Dictionary of Color“, Mc. Graw-Hill Book Co., Inc., New York, N. Y., 1950), jsou uvedeny v závorkách. Kultury byly pěstovány 14 dní při 30 °C, pokud není uvedeno jinak.

Charakterizace kmenu NRRL 5758, produkujícího A-28086

Morfologie

Sporulující vzdušné hyfy sestávající z háčků, oček a otevřených spirál. Také byla pozorována morfologie odpovídající typu *rectus flexibilis*. Spory jsou krátké a cylindrické a mají v řetězci 10 až 50 spor. Spory měří $1,3 \mu \times 1,75 \mu$ v rozmezí $1,3 \mu$ až $1,95 \mu \times 1,3 \mu$. Povrch spor při pozorování elektronovým mikroskopem je hladký.

Kultivační charakteristiky NRRL 5758 na různých médiích

Médium	Charakteristiky
ISP β 2 (extrakt z kvasnic a extrakt ze sladu)	růst hojný, rub mírně žlutý [11K3]; pěkné až dobré vzdušné mycelium a sporulace; bílý (W) 13ba a temně šedivý (Gy) 3 ih ; žádný rozpustný pigment.
ISP β 3 (ovesná mouka)	hojný růst, rub šedivožlutý [11B2]; pěkné vzdušné mycelium (Gy) temně šedivý, 3 ih , světle hnědý rozpustný pigment.
ISP β 4 (anorganické soli — škrobový agar)	hojný růst, rub světle žlutohnědý [12 E5], vzdušné mycelium a spory (W) purpurově bílé 13ba až (Gy) světle šedivý d , není žádný rozpustný pigment.
ISP β 5 (glycerol-asparaginový agar)	hojný růst, rub světle žlutý až zelený [10 B1], dobré vzdušné mycelium a spory (Gy) žlutošedé 2dc až světle šedočervenohnědé 5fe ; žádný rozpustný pigment.

Médium	Charakteristiky
Tomatová pasta — ovesná mouka agar	růst hojný, rub světle žlutohnědý [13 H7]; pěkné až dobré vzdušné mycelium a spory (W) bílé a až (Gy) médium šedé g ; velmi mírně hnědý rozpustný pigment.
Glycerol-glycin agar	růst hojný, rub šedivožlutý [12 I6]; dobré vzdušné mycelium a spory (Y) světle žluté 2db ; žádný rozpustný pigment.
Glukosa-asparagin agar	růst hojný, rub šedivozelenožlutý [12E2]; hojné vzdušné mycelium a spory (Gy) žlutošedivé 2dc ; velmi slabě hnědý rozpustný pigment.
Živný agar	růst dobrý, rub šedivožlutý [12B2]; vzdušné mycelium a spory, žádné barevné přiřazení vzhledem k chudému růstu; žádný rozpustný pigment.
Bennetův agar	růst hojný; rub šedivožlutý [12K3]; sporé vzdušné mycelium a spory (Gy) žlutošedé 2dc ; žádný rozpustný pigment.
Agar s maleátem vápenatým	dobrý růst; rub šedivohnědý [15C8]; žádné vzdušné mycelium nebo sporulace; hnědý rozpustný pigment, oblastí u oček se čeří.
Agar s Czapkovým roztokem	růst chudý, žádné barevné přiřazení vzhledem k špatnému růstu.
Emersonův agar	růst hojný; rub šedivožlutý [11]5]; žádné vzdušné mycelium nebo spory; žádný rozpustný pigment.
Tyrosin agar	růst hojný; rub světle olivově hnědý [14C4]; hojné vzdušné mycelium a spory od (W) b (střed) až (Gy) světlehnědošedivé 3fe (okraje); velmi světle hnědý rozpustný pigment.
Trypton-kvasnicový agar	růst sporý, žádné barevné přiřazení.

NRRL 5758 organismy byly studovány pro selekci fyziologických vlastností podle standardních postupů. Byly nalezeny následující vlastnosti a charakteristiky:

Sledované vlastnosti

působení na mléko

redukce nitrátů

živná želatina

melaminový pigment produkce na:

šikmém agaru styrosinem

Difco peptonu extrakt z kvasnic šikmý agar
 médium s Tryptonem a extraktem z kvasnic
 požadavky na teplotu (ISP médium $\beta 2$ ex-
 trakt z kvasnic, extrakt ze sladu šikmá
 půda)

Výsledků testů využití uhlíku provedené
 s organismem NRRL 5758 jsou uvedeny ní-
 že. Symboly použité pro hodnocení růstu
 jsou následující:

- + dobrý růst, pozitivní využití
- (+) chudý až pěkný růst
- (-) slabý růst, pravděpodobně žádné vy-
užití
- žádný růst, žádné využití

zdroj uhlíku

hodnocení

D-glukóza	+
L-arabinóza	+
D-xylóza	+
D-fruktóza	+
sacharóza	—
D-mannitol	—
i-inositol	+
rhamnóza	+
raffinóza	—
-C kontrola (žádný sacharid)	—

Druhý nový A-28086 produkující organis-
 mus, byl odvozen od *S. aureofaciens* NRRL
 5758 sérií přírodních selekcí a následující
 chemickou mutací. Tento organismus byl
 identifikován jako NRRL 8092 a je rovněž
 klasifikován jako kmen *Streptomyces aureo-
 faciens* Duggar. Tato klasifikace je založe-
 na na studiích organismu NRRL 8092, použi-
 tím dříve popsanych klasifikačních metod
 pro *Streptomyces* za podobných růstových
 podmínek. Charakteristiky organismu NRRL
 8092 pozorované v těchto studiích jsou shr-
 nuty v následujících odstavcích.

Charakterizace A-28086 produkujícího kme-
 nu NRRL 8092

Morfologie

Na médiu ISP $\beta 7$ (tyrosin agar) kultura
 produkuje příležitostně háčky, hlavně však
 produkuje krátké přímé sporofory. Řetězce
 spor jsou kratší než 10 spor na řetězec, ob-
 vykle 4 až 7 spor na řetězec. Krátké přímé
 řetězce spor byly pozorovány v následují-
 cích médiích: ISP $\beta 3$, agar s Czapkovým
 roztokem a ISP $\beta 5$. Hojné coremia byly po-
 zorovány v Emersonově agaru. Pozorování
 elektronovým mikroskopem byla prováděna
 na tyrosin-agar (ISP $\beta 7$) a glukóza-aspara-

Charakteristiky

mléko peptonuje, bílé růstové kroužky, čirá
 místa tříslově žlutá, pH reakce 5,7
 pozitivní
 30 % zkapalnění za 14 dní

velmi slabě pozitivní (pigment po 4 dnech)
 negativní
 negativní
 26 až 30 °C — dobrý růst; 30 až 37 °C vyni-
 kající růst a sporulace; 45 °C mírný vegeta-
 tivní růst; červený rozpustný pigment.

gin-agar. Spory jsou hladké a velikost od
 1,2 do 2,0 μ délky a průměr asi 1,0 μ . Prů-
 měrná velikost spor je 1,6 $\mu \times$ 1,0 μ .

Kultivační charakteristiky NRRL 8092 na
 různých médiích

Médium	charakteristika
ISP $\beta 2$ (extrakt z kvasnic, extrakt z melasy)	pěkný růst, rub světle žluto- hnědý [12H8]; pěkné vzdušné mycelium; chudá sporulace; vzdušná část světle šedivá [11A1]; žádný rozpustný pig- ment.
ISP $\beta 3$ (ovesná mouka)	růst řídký; rub křišťálový; žád- né vzdušné mycelium; žádný rozpustný pigment.
ISP $\beta 4$ (anorganic- ké soli, škrobový agar)	růst mírný; rub šedožlutý [11B2]; sporé vzdušné myce- lium a sporulace; vzdušná část světle žlutošedivá [10A1]; žád- ný rozpustný pigment.
ISP $\beta 5$ (glycerol- asparagin agar)	růst mírný; rub světle žlutý [10F2]; pěkné vzdušné myce- lium; sporá sporulace; vzduš- ná část bílá [10A1]; žádný roz- pustný pigment.
Tomatová pasta — ovesná mouka — agar	růst mírný; rub šedivě zeleno- žlutý; vzdušné mycelium pěk- né; mírná sporulace, mírně světle šedivě [53A2]; žádný rozpustný pigment.
Glycerol- glycin- agar	růst hojný; šedivožlutý [11E4]; mírně vzdušné mycelium, bílé [10A1]; žádná sporulace; žád- ný rozpustný pigment.
Glukosa- asparagin agar	růst mírný; rub světle žlutý [10F2]; mírné vzdušné myce- lium a sporulace, bílé [10A1]; žádný rozpustný pigment.
Živný agar	růst řídký; rub světle žlutý [10B2]; žádné vzdušné myce- lium; žádný rozpustný pigment.

Médium	charakteristika
Bonnettův agar	růst pěkný; rub média žluto-růžový [11A7]; velmi sporé vzdušné mycelium; žádné sporulace; žádný rozpustný pigment.
Agar s maleátem vápenatým	růst velmi sporý; rub křišťálový, žádné vzdušné mycelium; žádný rozpustný pigment.
Agar s Czapekovým roztokem	růst velmi sporý; rub křišťálový; žádné vzdušné mycelium; žádný rozpustný pigment.
Emersonův agar	růst mírný; rub šedivožlutý [11I5]; skvrny vzdušného mycelia; žádné sporulace; žádný rozpustný pigment.

Sledované vlastnosti

působení na mléko

redukce nitrátů

živná želatina

melaminový pigment produkce na:

šikmém agaru s tyrosinem

médium s tryptonem a extraktem z kvasnic

klínku z karotky

klínku z brambor

Požadavky na teploty (ISP médium $\beta 2$ extrakt z kvasnic, extrakt ze sladu, šikmá půda)

Výsledky testů využití uhlíku, provedené s organismem NRRL 8092 jsou uvedeny níže. Symboly použité pro hodnocení růstu jsou následující:

- + dobrý růst, pozitivní využití
- (+) chudý až pěkný růst
- (-) slabý růst, pravděpodobně žádné využití
- žádný růst, žádné využití

Médium	charakteristika
Tyrosin agar	růst mírný; rub světle žluto-hnědý [12H6]; mírné vzdušné mycelium; světlé mírně šedivé okraje [53A2], střed téměř bílý a mírná sporulace; žádný rozpustný pigment.
Trypton-kvasnice agar	růst velmi sporý; rub křišťálový; žádné vzdušné mycelium; žádný rozpustný pigment.

Organismus NRRL 8092 byl také studován pro selekci fyziologických vlastností podle standardních postupů. Byly nalezeny následující vlastnosti a charakteristiky:

Charakteristiky

mléko peptonuje (90 %) světle žluté růstové kroužky, čirá místa, světle žlutá, pH reakce 4,6

pozitivní

50% hydrolýza za 14 dnů

velmi slabě pozitivní

negativní

hojný růst, světle žlutý, žádné vzdušné mycelium

hojný růst, šedobílý, žádné vzdušné mycelium; žádné změny na klínku

25 °C — hojný růst; pěkné vzdušné mycelium; rub světle hnědý; žádný rozpustný pigment

30 °C — hojný růst; pěkné vzdušné mycelium; rub světle hnědý; žádný rozpustný pigment

37 °C — hojný růst; pěkné vzdušné mycelium; rub hnědý; rozpustný hnědý pigment

40 °C — hojný růst; sporé vzdušné mycelium; rub červenohnědý; rozpustný pigment

temně červenohnědý

45 °C — pěkný růst; žádné vzdušné mycelium; rub červenohnědý; mírný červenohnědý pigment.

zdroj uhlíku

hodnocení

D-glukóza	+
L-arabinóza	+
D-xylóza	+
D-fruktóza	+
sacharóza	—
D-manitol	—
i-inositol	+
rhamnóza	+
raffinóza	—
-C kontrola (žádný sacharid)	—

Některé charakteristiky kmenů *S. aureofaciens* produkujících A-28086 se odlišují od charakteristik organismu popsaného Schir-

lingem a Gottliebem. Tyto rozdíly jsou shrnuté v tabulce III.

TABULKA III

Využití uhlíku	NRRL 5758	NRRL 8092	publikovaný popis
sacharóza	—	—	+
i-inositol	+	+	—
rhamnóza	+	+	—
zkapalnění želatiny	30 % během 14 dnů	50 % během 14 dnů	omezené nebo žádné
účinek na mléko	mléko peptonuje, bílé růstové kroužky	mléko peptonuje světle žluté růstové kroužky	omezená a proměnlivá peptonace (často žádná), omezený růst a koagulace

Charakteristiky organismu NRRL 5758, které jsou odlišné od charakteristiky orga-

nismu NRRL 8092 jsou shrnuty v tabulce IV.

TABULKA IV

Charakteristiky	NRRL 5758	NRRL 8092
vegetativní barva	žlutá na některých médiích	krémová až světle žlutá na některých médiích
sporulace	některé spirální sporofory na tomatové pastě s ovesnou moukou a na anorganických solích se škrobem	krátké přímé sporofory s případnými háčky
růst na:		
maleátu vápenatém	růst pěkný, hnědý s vyčeřováním	růst sporý čirý, žádné vyčeřování
anorganických solích se škrobem	mírná sporulace; vzdušná část nafialověle bílá až šedá	řidká sporulace, vzdušná část světle žlutošedá, rub růžový světle žlutošedá
Benettově agaru	rub světle žlutý	rub růžový

Streptomyces aureofaciens kultury používané pro produkci A-28086 antibiotik byly uloženy jako část sbírky kultur Northern Marketing ang Nutrition Research Division, U. S. Dept. of Agriculture, Agricultural Research Service, Peoria, Illinois, 61 604, kde jsou veřejně dostupné pod čísly NRRL 5758 a NRRL 8092.

Předmětem vynálezu je způsob přípravy polyetherických antibiotik A-28086 tvořících komplex, sestávající z faktoru A, faktoru B a faktoru D, acylesterů faktorů A a D obsahujících 2 až 6 atomů uhlíku v acylu nebo jejich fyziologicky vhodných solí a způsobu izolace A-28086 faktoru A, A-28086 faktoru B, A-28086 faktoru D a z komplexu antibiotik A-28086, který se vyznačuje tím, že se kultivuje *Streptomyces aureofaciens* NRRL 5758 nebo *Streptomyces aureofaciens* NRRL 8092 v živném médiu obsahujícím asimilovatelné zdroje sacharidů, dusíku a anorganických solí za submerzních aerobních fermentačních podmínek při teplotě od 20 do 40 °C a při pH od 6,0 do 8,0, až je tímto organismem v tomto živném médiu produkováno dostatečné množství antibiotické aktivity a případně se oddělí komplex antibiotik A-28086 od živného média, případně se z komplexu antibiotik A-28086 oddělí

faktory A, B nebo D a načež se případně převádějí tyto faktory A, B nebo D v acyl-deriváty nebo farmaceuticky přijatelné soli.

Živné médium používané pro růst *Streptomyces aureofaciens* NRRL 5758 nebo *Streptomyces aureofaciens* NRRL 8092 může být kterékoli z řady médií. Pro ekonomickou produkci, optimální výtěžek a snadnou izolaci produktu jsou však určitá živná média výhodná. Tak například výhodným zdrojem uhlovodíků při fermentaci ve velkém měřítku je tapioca dextrin a sacharóza, i když glukóza, kukuřičný škrob, fruktóza, manóza, maltóza, laktóza apod., se mohou rovněž použít. Kukuřičný olej, podzemnicový olej, sójový olej a rybí olej jsou jinými vhodnými zdroji uhlíku. Výhodným zdrojem uhlíku je kasein hydrolyzovaný enzymem, i když peptony, sójová mouka, mouka se semen bavlníku, aminokyseliny, jako kyselina glutamová apod., lze také použít. Jako živné anorganické soli, které se mohou přidávat do živného média, lze uvést rozpustné soli poskytující ionty sodíku, hořčíku, vápníku, amonné, chloridové, karbonátové, sulfátové, nitrátové apod.

Hlavní stopové prvky nutné pro růst a vývoj organismu musí být rovněž přidány do živného média. Tyto stopové prvky se

běžně vyskytují jako nečistoty v jiných složkách média v množství dostatečném pro růstové požadavky organismu.

Může být nutné přidávat malá množství, tj. 0,2 ml/litr, protipěnicího činidla, jako je polypropylenglykol, k fermentačním médiům ve velkém měřítku, kde pění se stává problémem.

I když to není rozhodující, produkce antibiotika kmeny *Streptomyces aureofaciens* produkující A-28086 se zvyšuje přidáním malého množství oleje, jako je sójový olej.

Pro produkci dostatečného množství antibiotik A-28086 je výhodná submerzní aerobní fermentace v tancích. Malá množství A-28086 antibiotik se mohou získat z kultur v třepacích baňkách. Vzhledem k časovému zpoždění běžnému při produkci antibiotik očkovaním velkých tanků sporami, je výhodné používání vegetativních oček. Vegetativní očko se s výhodou připravuje naočkováním malého množství živného média sporami nebo mycelia organismu a získá se čerstvá aktivně rostoucí kultura organismu. Vegetativní očko se potom převede do velkého tanku. Médium použité pro růst vegetativního očka může být stejné jako médium použité pro velké fermentace, mohou se však také použít jiná média.

Organismus produkující A-28086 se může nechat růst při teplotě přibližně mezi 20 a 40 °C. Optimální A-28086 produkce probíhá při teplotě asi 27 až 30 °C.

Při aerobních submerzních kultivačních postupech je výhodné do živného média zavádět sterilní vzduch. Pro účinný růst organismu je objem použitého vzduchu při produkci v tanku, s výhodou větší než 0,1 objemu vzduchu na objem živného média za minutu. Pro účinnou produkci A-28086 antibiotik je objem vzduchu při produkci v tanku s výhodou větší než 0,25 objemu vzduchu na objem živného média za minutu. Vysoká hladina rozpuštěného kyslíku nesnižuje produkci antibiotika.

Produkce antibiotik se může během fermentace sledovat testováním vzorků živného média nebo extraktů z pevných podílů mycelia na antibiotickou aktivitu proti známým organismům, citlivým na antibiotika. Jedním z testujících organismů používaných při testování antibiotik podle vynálezu je *Bacillus butilis* ATCC 6633. Biologické testy se s výhodou provádějí pomocí papírových kotoučků na agarových deskách.

Původní pH naočkovaného živného média se pohybuje v rozmezí použitého média. Obecně pH má být v rozmezí 6,0 až 7,5. Hodnota pH při ukončení fermentace je obvykle poněkud vyšší, a to v rozmezí 6,5 až 8,0.

Obecně je antibiotická aktivita detegovatelná druhý den po fermentaci. Maximální produkce antibiotické aktivity se obvykle objevuje šestý až desátý den.

Pro produkci za submerzních aerobních podmínek se výše popsaná A-28086 antibiotika mohou izolovat z fermentačního média

způsobem běžně používaným při fermentacích. Antibiotická aktivita produkovaná během fermentace A-28086 produkujících organismů se objevuje jak ve hmotě mycelia, tak ve filtrovaném médiu. Maximální izolace A-28086 antibiotik se může dosáhnout tak, že se používané metody kombinují včetně filtrace, extrakce a adsorpční chromatografie. Výhodným rozpouštědlem pro izolace A-28086 antibiotik, jak z celého, tak filtrovaného fermentačního média je ethylacetát, i když ostatní, běžně používaná rozpouštědla jsou dostatečná.

Zejména výhodnou metodou pro izolace A-28086 faktorů A, B a D je snížení pH celého fermentačního média na asi pH 3,0. Při tomto pH 3,0 se A-28086 faktory A, B a D dobře oddělí od hmoty mycelia filtrací. Jinou výhodnou metodou izolace A-28086 faktorů je přidání bikarbonátu jako takového, například kyselého uhličitánu sodného k celkovému živnému médiu v množství asi 1 g na liter. A-28086 faktory se tím s výhodou oddělí od hmoty mycelia ve formě soli. Pro oddělení antibiotik od hmoty mycelia se s výhodou používá methanol, ale i ostatní nižší alkoholy a ketony jsou vhodné.

Při izolaci antibiotik A-28086 se může s výhodou použít také azeotropická destilace. Při této metodě se přidá k vodnému fermentačnímu médiu organické rozpouštědlo, které tvoří příslušný azeotrop s vodou. Tato směs rozpouštědla a média se podrobí azeotropické destilaci tak, aby se odstranila alespoň polovina vody z média a zbude směs vody a rozpouštědla, ve které A-28086 antibiotika jsou v roztoku v organickém rozpouštědle. Nerozpustné vedlejší produkty se mohou odstranit vhodným způsobem, jako je filtrace nebo centrifugace. A-28086 antibiotika se mohou izolovat z organického roztoku běžně známým způsobem, jako odpařením rozpouštědla, vysrážením přidáním nerozpouštědla nebo extrakcí.

Organická rozpouštědla, která tvoří příslušné azeotropické směsi s vodou pro provedení postupu jsou butylalkohol, amylalkohol, hexylalkohol, benzylalkohol, butylacetát, amylacetát, 1,2-dichloroethan, 3-pentanon, 2-hexanon, benzen, cyklohexanon, toluen, xyleny apod.

Zejména výhodná je izolace azeotropickou destilací v případě velkých fermentačních postupů. Jak voda, tak rozpouštědlo jímání při azeotropické destilaci se mohou běžným způsobem oddělit a potom recyklovat pro další použití. Takto oddělená voda není kontaminována a nevyžaduje čištění odpadních vod. Takto oddělené rozpouštědlo se může recyklovat do postupu.

Další čištění antibiotik A-28086 zahrnuje další extrakční a adsorpční postupy. Jako adsorpční materiály se mohou použít silikagel, uhlí, křemičitan hořečnatý (Florisil), apod.

Alternativně se jako zdroj antibiotik A-28086 mohou použít pevné látky z kultury,

včetně složek média a mycelia, a to bez extrakce a oddělení, s výhodou však po oddělení vody. Například po produkci antibiotické aktivity A-28086 se živné médium může sušit lyofilizací a mísit přímo do předsměsi potravy.

Podle jiného rysu po produkci A-28086 aktivity v živném médiu se mycelium může oddělit a vysušením se získá produkt, který se může přímo přidávat do předsměsi potravy. Jakmile se mycelium oddestiluje pro takovéto použití, získá se lepší suchý produkt přidáním uhličitanu vápenatého (asi 10 g/l) jako pomocné filtrační hmoty.

Za podmínek dosud používaných, dříve popsané kmeny *Streptomyces aureofaciens* a označované jako NRRL 5758 a NRRL 8092 produkují antibiotikum A-28086 faktor A jako převážný faktor. I když poměr faktorů je proměnlivý v závislosti na použitých fermentačních podmínkách, je obecně množství faktoru A větší než 99 % celkové izolované antibiotické aktivity při produkci kmenu NRRL 5758 a více než 90 % celkové antibiotické aktivity při produkci kmenu NRRL 8092. A-28086 faktor B tvoří téměř veškerou zbývající antibiotickou aktivitu u kmene NRRL 5758 a faktor D je minoritním faktorem. Naopak A-28086 faktor D tvoří asi

8 až 10 procent celkové izolované antibiotické aktivity u kmene NRRL 8092 a faktor B je minoritním faktorem.

Antibiotika A-28086 faktory A, B a D jsou navzájem od sebe oddělené sloučeniny a jsou izolovatelné jako individuální sloučeniny použitím běžně známých metod, jako je chromatografie na kolonách, chromatografie na tenké vrstvě apod. Například chromatografie na silikagelu se používá pro oddělení faktorů A, B a D elucí kolony různými směsmi rozpouštědel, jako je směs benzenu a ethylacetátu. Použitím směsi benzenu a ethylacetátu se z kolony silikagelu nejprve eluuje faktor B a později se eluují faktory A a D. Chromatografie na tenké vrstvě, popsaná výše, je výhodnou metodou pro sledování dělicího postupu.

A-28086 sloučeniny inhibují růst bakterií a plísní, které jsou patogenní u živočichů a rostlin. Relativní mikrobiální aktivita A-28086 faktorů A a B je popsána níže v tabulce V.

Jako testovací metoda se s výhodou používá disková difúzní metoda (6 mm vložky se namočí v roztoku obsahujícím 1 mg sloučeniny/ml roztoku; vložky se umístí na agarové desky naočkované organismem).

TABULKA V

testovaný organismus	zóna inhibice (mm)	
	A 28086 faktor A	A 28086 faktor B
<i>Staphylococcus aureus</i>	19	21
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	28	31
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	26	16
<i>Mycobacterium avium</i> ATCC 7992	12	12
<i>Saccharomyces pastorianum</i> ATCC 2360	17	—
<i>Candida tropicalis</i>	14	14
<i>Fusarium moniliforme</i>	12	netestováno

Podle dalšího důležitého rysu inhibují sloučeniny A-28086 růst aerobních bakterií. Minimální inhibiční koncentrace (MIC), při které A-28086 faktor A inhibuje různé anaerobní bakterie, stanovené standardním difúzním testem na agaru, jsou shrnuty v tabulce VI. Inhibiční koncentrace se odečítá po 24 hodinách inkubace.

TABULKA VI

Testovaný organismus	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Actinomyces bovis</i>	<0,5
<i>Clostridium innocuum</i>	<0,5
<i>Clostridium perfringens</i>	<0,5
<i>Clostridium ramosum</i>	4,0
<i>Clostridium septicum</i>	<0,5
<i>Clostridium septicum bovine</i>	<0,5
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	1,0
<i>Peptococcus anaerobius</i>	<0,5
<i>Peptostreptococcus intermedius</i>	16,0
<i>Propionibacterium acnes</i> 44	16,0
<i>Propionibacterium acnes</i> 79	2,0

<i>Bacteroides fragilis</i> ssp. <i>fragilis</i>	8,0
<i>Bacteroides fragilis</i> ssp. <i>thetaiotaomicron</i>	8,0
<i>Bacteroides fragilis</i> ssp. <i>vulgagis</i> 1563	8,0
<i>Bacteroides fragilis</i> ssp. <i>vulgatis</i> 1211	2,0
<i>Fusobacterium symbiosum</i>	0,5
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	8,0
<i>Veillonella alcalescens</i>	16,0

Acylestery A-28086 faktoru A s 2 až 6 atomy uhlíku v acylu mají rovněž antibakteriální a fungicidní účinek. Podle jednoho rysu mají tyto sloučeniny zvýšenou aktivitu na gram-pozitivní bakterie. Relativní gram-pozitivní aktivity určitých těchto derivátů byly srovnány s aktivitou faktoru A. Sloučeniny byly testovány turbidometrickým způsobem na poloautomatickém systému (Autoturb microbiological assay system, Elanco), popsaném N. R. Kuzel a F. W. Kavanaugh in *J. Pharmaceut. Sci.* 60 (5), 764 a 767 (1971).

Při testování A-28086 antibiotik byly po-

užity následující testovací parametry. *Staphylococcus aureus* (H-Heatley) NRRL B-314 v živném médiu (pH 7), inkubace 4 hodiny při 37 °C. Testované vzorky a standard se rozpustí ve směsi methanol : voda (10:90). Standardní A-28086 faktor A byl přítomen v Autoturb [®] dopravníku v koncentraci 2, 3, 4, 5 mcg/ml. Testovaná sloučenina byla zředěna tak, aby byla aktivita 3 nebo 4 mcg/ml. Relativní aktivity testovaných sloučenin srovnané se standardem jsou následující:

Sloučenina	Relativní G ⁺ aktivita
A 28086 faktor A (standard)	1
A 28086-A acetyléster	2,5
A 28086-A propionylester	7
A 28086-A n-butyryléster	8
A 28086-A n-valeryléster	14
A 28086-A n-kaproyléster	20

Jiným důležitým rysem antimikrobiální aktivity sloučenin A-28086 je aktivita vůči *Mycoplasma* druhům. Druhy *Mycoplasma*, také známé jako organismy obdobné pleuropneumonií (PPLO), jsou patogenní u lidí a různých živočichů. Činidla aktivní vůči PPLO organismům jsou zejména požadované v drůbežářství. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) antibiotika A-28086 faktoru A proti různým druhům *Mycoplasma*, stanovené in vitro ředicím testem jsou shrnuty v tabulce VII.

TABULKA VII

organismus	MIC (mcg/ml)
<i>M. gallisepticum</i>	12,5
<i>M. hyorhinis</i>	12,5
<i>M. synoviae</i>	6,25
<i>M. hypopneumoniae</i>	6,25
<i>M. hyosynoviae</i>	6,25

Roztoky obsahující asi 10 mikrogramů antibiotika A-28086 na ml roztoku jsou použitelné pro dezinfekci povrchu tak, aby zví-

řata byla chráněna před různými druhy *Mycoplasma*.

Sloučeniny A-28086 jsou také antivirová činidla. A-28086 faktor A jsou aktivní vůči typu III poliovirusu, vakcinia virusu, herpes virusu a Semliki Forest virusu, jak bylo prokázáno in vitro testem popsáním Stiminofem Applied Microbiolog 9 (1) 66 — 72 (1961). A-28086 faktor A je také aktivní vůči Transmissible Gastro-enteritis virus, Newcastle Disease virus, a Infectious Bovine Rhinotracheitis virus, jak bylo prokázáno obdobnými testy s tkáňovými kulturami.

Podle jednoho rysu se tedy A-28086 sloučeniny mohou aplikovat orálně, topikálně nebo parenterálně živočichům tak, aby byla dosažena kontrola virů. Užitečná dávková hladina pro prevenci nebo léčení virových onemocnění se pohybuje od asi 1 do asi 5 mg/kg tělesné hmotnosti živočicha, v závislosti na viru a na tom, zda lék byl aplikován profylakticky nebo terapeuticky.

Dále roztoky obsahující A-28086 sloučeninu, s výhodou s povrchově aktivní látkou se mohou použít pro dekantaminaci in vitro míst, kde se viry, jako je polio nebo herpes, mohou vyskytovat. Roztoky obsahující od asi 1 do asi 1500 mcg/ml A-28086 sloučeniny jsou účinné při kontrole virů.

Akutní toxicita antibiotik A-28086 faktoru A aplikovaná intraperitoneálně myším vyjádřená jako LD₅₀ je 7,15 mg/kg.

Sloučeniny A-28086 jsou také insekticidy a akaricidy. A-28086 sloučeniny jsou aktivní vůči hmyzu, jako jsou *Epilachna varivestis*, *Oncopeltus fasciatus*, moucha domácí a proti roztočům, jako je svíluška snovací při aplikaci v množství asi 500 ppm. Kromě toho A-28086 sloučeniny jsou účinné proti larvám moskytů v množství 1 ppm.

Antikocidiální aktivita je důležitou vlastností A-28086 sloučenin. Například pokusy s krměním vykazují, že A-28086 sloučeniny přítomné v potravě mladých kuřat v množství 0,003 % zlepšují hmotnostní přírůstek, v množství 0,005 % preventivně brání úmrtí a snížení počtu zranění u kuřat, které mohou být způsobeny kokcidii. Výsledky testů faktoru A u kuřat způsobených různými druhy *Eimeria* jsou shrnuty v tabulkách VIII až X.

209848

TABULKA VIII

Aktivita antibiotika A-28086 faktor A proti Eimeria Tenella.

množství v potravě hmotnostní procenta	počet kuřat	mortalita procenta	hmotnostní přírůstek	průměrná míra zranění	procenta redukce v míře zranění
0,04	10	0	50	0	100
0,02	10	0	82	0,2	95
0,01	10	0	94	0,2	95
infikované kontroly	20	35	68	3,65	—
normální kontroly	20	0	100	—	—
0,2	20	0	84	0	100
0,01	20	0	96	0	100
0,005	20	0	91	2,8	27
0,0025	20	10	87	3,85	0
infikované kontroly	20	40	74	3,85	—
normální kontroly	20	0	100	—	—

TABULKA IX

Aktivita antibiotika A-28086 faktor A proti různým Eimeria druhům¹

infikující organismus	množství antibioti- ka v potravě % hmot- nostní	procenta morta- lity	procenta hmot- nostního přírůstku	průměrná míra zranění	procenta ve snížení zranění	Oocysty celkem/ /pták/ (1 × 10 ²)	Prošlá procenta snížení
Eimeria acervulina	0,005	0	87	0,75	53	6,15	83
	0,0025	0	82	1,25	—	4,91	86
infikované kontroly	—	0	63	1,60	—	36,32	—
Eimeria maxima	0,005	0	85	0,2	85	1,95	40
infikované kontroly	—	0	65	1,3	—	3,24	—
Eimeria brunetti	0,005	0	88	1,2	—	2,31	58
infikované kontroly	—	0	62	1,7	—	5,55	—

¹ čtyřikrát opakováno, vždy 5 kohoutků v každém pokusu

TABULKA X

Aktivita antibiotika A-28086 faktor A proti směsi Eimeria druhům¹

Infekční organismus	Množství antibiotika hmotnostní procenta	Procenta mortality	Procenta hmotnostního přírůstku	Intestinální zranění průměr	procenta snížení	průměr	Cecální zranění procenta snížení
E. necatrix a E. tenella infikované kontroly	0,005	0 20	94 52	0,7 1,7	59 —	1,75 3,5	50 —
E. tenella, E. necatrix, E. maxima, E. brunetti, E. acervulina a E. mivati infikované kontroly	0,01 —	0 50	91 12	0,4 1,9	79 —	0,9 3,3	73 —

¹ Čtyřikrát opakováno, 5 kohoutků v každém pokusu.

Pro prevenci nebo léčení kokcidiózy u drůbeže se ptákům aplikuje netoxické antikokcidiální množství sloučeniny A-28086, s výhodou orálně na denní bázi. Sloučenina A-28086 se může podávat mnoha způsoby, nejlépe se provádí ve fyziologicky vhodném nosiči, nejlépe s potravou. I když při stanovení příslušného množství se musí brát v úvahu celá řada faktorů, aplikované množství sloučeniny A-28086 se obecně pohybuje v rozmezí od 0,003 do 0,04 procent hmotnostních potravy, s výhodou od 0,005 do 0,02 procenta.

Schopnost zlepšovat využitelnost potravy u živočichů je dalším důležitým rysem sloučenin A-28086. Například sloučeniny A-28086 zlepšují využitelnost potravy u přežvýkavců, které mají vyvinutý přežvýkavý žaludeční systém.

Jak bylo uvedeno výše, využitelnost sacharidů u přežvýkavců se zvyšuje, jestliže žaludeční flóra přežvýkavců produkuje spíše propionáty, než acetáty nebo butyráty. Využitelnost potravy se může sledovat stanovením produkce a koncentrace propionátů v žaludku přežvýkavců následujícím způsobem:

Kapalina ze žaludku se získá z vola chirurgicky zavedenou trubicí do žaludku. Vůl se udržuje v dobře živěném stavu. Vzorek žaludeční kapaliny se procedí přes čtyři vrstvy látky pro lisování sýra a jímá se filtrát. Částičky zbylé na látce se resuspendují v dostatečném množství fyziologického pufru odpovídajícím objemu původní kapaliny ze žaludku a tato suspenze se znovu procedí. Použitý pufr má následující složení:

Příspěvky	g/litr
Na ₂ HPO ₄	0,316
KH ₂ PO ₄	0,152
NaHCO ₃	2,260
KCl	0,375
NaCl	0,375
MgSO ₄	0,112
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,050
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,008
MnSO ₄ . H ₂ O	0,004
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,004
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,002
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,001

jak je popsáno Cheng et al. v J. Dairy Sci. 38, 1225—1230 (1955).

Oba filtráty se spojí a nechají se stát až se částicové látky oddělí na vrchu. Čirá fáze se oddělí, zředí stejným puftrem (1:1) a potom se pH upraví na 6,8 až 7,0.

Zředěná žaludeční kapalina (10 ml) se umístí do 25 ml baňky s 40 mg výše popsané potravy a přidá se 1 mg sójového proteinu a sloučeniny se testují. Pro každý pokus se použijí čtyři baňky. Kromě toho se také použijí dvě skupiny po čtyřech baňkách kontrol. Kontrola se použije v 0 dobu a kontrola po inkubaci 16 hodin. Veškeré testovací baňky se inkubují 16 hodin při 38 °C. Po inkubaci se měří pH a do každé baňky se přidají 2 ml 25% kyseliny metafosforečné. Vzorky se nechají usadit a supernatant se analyzuje plynovou chromatografií na propionát, acetát a butyrát. Aktivní sloučeniny významně zvyšují produkci propionátu oproti kontrolám.

Výsledky testů jsou statisticky srovnány s výsledky kontrol. Tabulka XI ukazuje poměr koncentrace těkavých mastných kyselin

v pokusných baňkách ke koncentraci v kontrolních baňkách.

TABULKA XI

Sloučenina	ppm v žaludeční kapalině přežvýkavce	molární % acetátu	Poměr ošetřených ke kontrole		
			molární % butyrátu	molární % propionátu	celkem VFA mM/l
A-28086 faktor A	1	0,94	0,87	1,34	1,26
A-28086 faktor B	1	0,97	0,96	1,15	1,29
A-28086 faktor A acetyléster	1	0,79	0,76	2,04	1,04
A-28086 faktor A propionylester	1	0,90	0,68	1,73	1,25
A-28086 faktor A butyryléster	1	0,91	0,81	1,56	1,19
A-28086 faktor A valeryléster	1	0,92	0,79	1,55	1,18
A-28086 faktor A kaproylester	1	0,86	0,97	1,57	0,99

Účinnost využití sacharidů je dále prokázána testy in vivo provedenými u živočichů, které mají trubicí zavedenou do žaludku tak, že je možno vyjmout vzorek obsahu žaludku přežvýkavce.

Testy uvedené v tabulce XII byly provedeny s dospělými voly o hmotnosti asi 450 kg. Dva voli byli krmeni normální potravou a čtyři voli byli krmeni stejnou potravou, ke které byl přidán A-28086 faktor A. Ke každému alikvotnímu množství (100 ml) odebrané kapaliny ze žaludku přežvýkavce se přidá 10% kyselina metafosforečná (100 ml). Vzorky se nechají usadit a supernatant se analyzuje plynovou chromatografií a stanoví se koncentrace kyseliny propionové.

Výsledky v tabulce XII udávají průměrné procentické zvýšení koncentrace kyseliny

propionové v žaludeční kapalině z pěti analýz během 14denní testovací periody. Kontroly měly přibližně 20 molárních procent kyseliny propionové.

TABULKA XII

A-28086 faktor A (mg/d)	Procenta zvýšení oproti kontrole
25	17,4
100	54,0

Dále bylo testy in vivo prokázáno, že A-28086 faktor A zvyšuje využitelnost potravy u ovcí. Výsledky těchto testů provedené během 56 dnů jsou shrnuty v tabulce XIII.

TABULKA XIII

A-28086 faktor A (g) na tunu potravy	Počet zvířat	Průměrný denní přírůstek (0,45 kg/den)	Přísun potravy (0,45 kg/den)	Potrava/pří- růstek	Procento zlepšení
9	13	0,44	3,29	7,40	12
18	13	0,38	3,15	8,31	1
kontrola	17	0,42	3,56	8,38	—

Sloučeniny A-28086 faktor D jsou protivi-
rová činidla. A-28086 faktor D je aktivní
proti Maryland B viru, typ III polioviru, COE
viru, herpes viru a Semliki Forest viru, jak
bylo prokázáno testy in vitro popsanými Si-
minoffem Applied Microbiology 9 (1), 66—
72, (1961). A-28086 faktor D je také aktivní
vůči Transmissible Gastroenteritis viru New-
castle Disease viru a Infection Bovine Rhi-
notracheitis viru, jak bylo prokázáno ob-
nými testy s tkáňovými kulturami.

Fakt, že A-28086 faktor D sloučeniny jsou
aktivní jak vůči virům, tak proti anerobním
bakteriím činí tyto sloučeniny zejména vý-
hodné pro léčení nebo prevenci enteritisu
u kuřat, vepřového a hovězího dobytka a
ovcí. A-28086 faktor D sloučeniny jsou také
použitelné pro léčení enterotoxemie u pře-
žvýkavců.

Antikokcidiální aktivita je důležitou vlast-
ností A-28086 faktoru D sloučenin podle vy-
nálezu. Pokusy in vitro prokázaly antikokci-
diální aktivitu A-28086 faktoru D proti Eime-
ria tenella. Byla použita následující metoda
(pro bližší viz L. R. McDougald a R. B. Gal-
loway v Exper. Parasitology 34, 189—196
[1973]).

Hostitelské buněčné kultury byly připrave-
ny běžným způsobem použitím Leighton-
ových trubíc, plastických misek nebo desek
nebo jiných vhodných nádob pro kultury.
Po dvou až třídenním růstu ve vhodném
živném médiu (Eagleho minimální základní
médiu, hydrolyzát laktalbuminu v Earle-
ho nebo Hankově vyváženém solném roztoku,
médiu 199 apod.) obvykle vznikne
vhodná monovrstva, která je vhodná pro in-
fekci a testování léčiva. Pro tyto studie se
jako primární kultura používají buňky z ku-
řecích ledvin.

Životaschopné oocyty Eimerie tenella se
získají z fekálií infikovaných kuřat a před
použitím se čistí a sterilizují. Oocyty sporu-
lují inkubací při teplotě místnosti a za pro-
ublávání vzduchu suspenzí nebo jemným
třepáním v třepačce nebo jiným způsobem.
Pro prevenci bakteriálního nebo plísňového
růstu během sporulace se používá dvoj-
chroman draselný nebo kyselina sírová (ne-
bo jiná chemikálie).

Excystace infikovaných sporozoitů z oocyt
se provádí kombinací mechanického rozbití
stěny oocytu a potom působením trypsinu a
solí žlučových kyselin se indukuje uvolnění
sporozoitů ze spor.

Buněčné kultury se infikují zavedením
životaschopných sporozoitů do živné nádoby.
Testované chemické sloučeniny se zavá-
dění současně nebo za sebou v požadované
koncentraci v 10 % dimethylformamidu ve
fyziologickém solném roztoku. Konec testu
je inhibice asexuálních vývojových stadií a
stanovuje se mikroskopickým sledováním
fixovaných kultur a barevných 95 hodin po
infekci. Výsledky jsou udávány jak aktivní
(A), inaktivní (N) nebo cytotoxické (C) po-
dle přítomnosti nebo nepřítomnosti schizon-

tů druhé generace a případné toxicity na
buněčnou monovrstvu.

Antikokcidiální aktivita A-28086 faktor D
prokázaná tímto testem je shrnuta v tabul-
ce VII.

TABULKA VII

Antikokcidiální aktivita antibiotika
A-28086 faktor D

Koncentrace A-28086 faktor D (mcg/ml)	Hodnocení
5	C
1	C
0,2	C
0,4	A, C*
0,03	A
0,02	A
0,01	± A
0,008	N

* výsledek dvou testů.

Jiným užitečným rysem sloučenin A-28086
faktor D je jejich schopnost zlepšit využi-
telnost potravy u přežvýkavců s vyvinutým
přežvýkavým žaludkem. Mechanismus pro
využití hlavní živné části (sacharidů) po-
travy přežvýkavců je dobře znám. Mikro-
organismy v žaludku přežvýkavců degradují
sacharidy na monosacharidy a potom pře-
vádějí tyto monosacharidy na pyruvátové
sloučeniny. Pyruváty se metabolizují mikro-
biálními postupy na acetáty, butyráty nebo
propionáty, dohromady známé jako těkavé
mastné kyseliny (VFA). Pro bližší diskuzi
viz Leng „Physiology of Digestion and Me-
tabolism in the Ruminant“, Phillipson et al.,
Eds., Oriel Press, Newcastle upon Tyne,
England, 1970, str. 408—410.

Relativní účinnost využití těkavých mast-
ných kyselin je diskutována v McCulloughem
v Feedstuffs, 19. VI. 1971, str. 19; Es-
keland aj., v J. An. Sci. 33, 282 (1971);
Church aj., v „Digestive Physiology and
Nutrition of Ruminants“, Vol. 2, 1971, str.
622 a 625. I když acetáty a butyráty se rov-
něž využívají, propionáty se využívají s vět-
ším účinkem. Dále jestliže je dostupné pou-
ze malé množství propionátu, vyvíjí se u ži-
vočíchů ketóza. Výhodou sloučenin podle
vynálezu je tedy stimulace produkce vyšší-
ho podílu propionátů ze sacharidů a tím
zlepšení využití sacharidů a také snížení
případů ketózy.

Aktivita těchto vhodných sloučenin se mů-
že stanovit sledováním účinku na produkci
a koncentraci propionátových sloučenin u
přežvýkavců použitím stejných metod jako
pro faktor A výše.

Výsledky testů jsou statisticky srovnatel-
né s výsledky kontrol. Tabulka VIII ukazuje
poměr koncentrace těkavých mastných ky-
selin v baňkách ošetřených A-28086 fakto-
rem D ke koncentraci kontrolních baňek.

TABULKA VIII

A-28086 D mcg/ml	Molární % acetátu	Molární % butyrátu	Molární % propionátu	Celkem VFA mM/l
1,0	0,8715	0,7973	1,7981	1,1979
0,3	0,8976	0,8726	1,5871	1,0630

Sloučeniny jsou typicky účinné při zvyšování propionátu a tak využitelnost je vyšší při aplikacích dávek přežvýkavcům, v rozmezí od 0,05 mg/kg/den do asi 5,0 mg/kg/den. Nejvýhodnější výsledky byly dosaženy, jestliže se aplikuje množství od 0,1 mg/kg/den až asi 2,5 mg/kg/den. Výhodným způsobem aplikace sloučenin je přimísení do potravy živočichů, avšak mohou se podávat i jiným způsobem, například ve formě tablet, nápojů, pilulek nebo kapslí. Formulace těchto různých dávkových forem se provádí běžně známými metodami používanými ve veterinární praxi. Každá individuální dávková jednotková forma může obsahovat kvantum sloučenin přímo vztažené na příslušnou denní dávku zvířete.

Sloučeniny A-28086 se mohou použít do směsí krmiv upravených pro výkrm dobytka, které zahrnují krmivo a od 1 do 30 gramů sloučeniny na tunu.

Jak je známo, krmivo dobytka je odlišné od jiných krmiv, například krmivo pro drůbež. Krmivo pro dobytek obsahuje hrubou píce, jako jsou například slupky z bavlněných semen, a kukuřičnou siláž. Kromě toho krmivo dobytka obsahuje velké procento části od 15 do 20 procent neproteinových zdrojů dusíku. Běžným neproteinovým zdrojem je močovina.

Jak bylo popsáno výše, sloučeniny jsou antivirová činidla a jsou také účinná proti aerobním bakteriím, zejména *Clostridium perfringens*. Sloučeniny A-28086 jsou proto výhodné pro léčení a prevenci enteritis u kuřat, vepřového a hovězího dobytka a u ovcí. Sloučeniny A-28086 jsou také použitelné pro léčení enterotoxemie u přežvýkavců.

Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech.

Příklad 1

A. Fermentace A-28086 v třepaných baňkách za použití *S. Aureofaciens* NRRL 5758

Připraví se kultura *Streptomyces aureofaciens* NRRL 5758 a udržuje se na šikmé půdě agaru následujícího složení:

Složka	Množství
agar	20 g
dextrin	10 g
enzymem hydrolyzovaný kasein	2 g
hovězí extrakt	2 g
extrakt z kvasnic	2 g
destilovaná voda	do 1 litru

Šikmá půda se naočkuje *Streptomyces aureofaciens* NRRL 5758 a naočkovaná šikmá půda se inkubuje šest až deset dní při 30 °C. Zralá šikmá kultura se převrství hovězím sérem a sterilní kličkou se seškrabe tak, aby se uvolnily spory. Vzniklá suspenze ze spor a fragmentů mycelia v hovězím séru se lyofilizuje do šesti pilulek.

Jedna takto připravená pilulka se použije pro naočkování 50 ml vegetativního média následujícího složení:

Složka	Množství
sójové otruby	15 g
kukuřičný výluh	10 g
CaCO ₃	2 g
voda	do 1 litru

Naočkované vegetativní médium v 250ml Erlenbeyerově baňce se inkubuje 72 hodin při 30 °C na třepačce s posunem 5 cm při 250 otáčkách za minutu.

B. Fermentace A-28086 v tanku za použití *S. aureofaciens* NRRL 5758

Pro získání většího objemu očka se 10 ml inkubovaného vegetativního média popsaného výše použije pro naočkování 400 ml druhého stupně vegetativního růstového média, které má stejné složení jako vegetativní médium. Toto médium druhého stupně v 2litrové baňce se inkubuje 24 hodin při 30 °C na třepačce s posunem 5 cm a 250 otáčkami za minutu.

Vegetativní médium druhého stupně (1 litr) se použije pro naočkování 100 litrů sterilního produkčního média a následujícího složení:

Složka	Množství
Tapioca dextrin	60,0 g/l
enzymem hydrolyzovaný kasein	8,0 g/l
melasa	15,0 g/l
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g/l
CaCO ₃	2,0 g/l
čištěný sójový olej	5,0 g/l
deionizovaná voda	do 1 litru

Médium mělo po sterilizaci 30 minut v autoklávu při 120 °C a tlaku 0,103 MPa až 1,373 MPa, pH 6,7. V 165litrovém fermentačním tanku se inkubované produkční médium nechá 10 dnů fermentovat při teplotě 29 °C. Fermentační médium se provzdušňuje sterilním vzduchem v množství 0,4 objemu vzduchu na objem živného média za minutu. Médium se míchá konvenčním míchadlem rychlostí 250 otáček za minutu.

Příklad 2

A-28086 antibiotika se produkuje postupem podle příkladu 1, ale pro baňky se používá produkční médium následujícího složení:

Složka	Množství
glukóza	10 g/l
melasa	20 g/l
pepton	5 g/l
CaCO ₃	2 g/l
voda	do 1 litru

Příklad 3

Izolace A-28086 komplexu antibiotik produkovaných *S. aureofaciens* NRRL 5758

Celé fermentační médium (132 l) získané metodou popsanou v příkladu 1 se filtruje přes filtrační pomocnou hmotu (Hyflo Super-cel, diatomická hlinka), a získá se 97 litrů filtrovaného média. Filtrované médium se extrahuje asi stejným objemem ethylacetátu. Ethylacetátový extrakt se oddělí od vodné fáze a potom zahustí na objem asi 500 ml. Tento zahuštěný ethylacetátový extrakt se přidá k velkému přebytku petroletheru (Skelly Solve F, asi 10 l), aby se tak vysrážel nežádoucí materiál. Oddělený filtrát se odpaří ve vakuu a získá se podíl A-28086 komplexu antibiotik (6,9 g) přítomný v médiu.

Část A-28086 komplexu antibiotik obsažená v myceliu se získá dvojnásobnou extrakcí odfiltrovaného mycelia asi polovičným objemem methanolu (62 l a 59 l). Oba methanolicke extrakty se spojí a zahustí ve vakuu tak, aby se odstranil methanol. Po tomto zahuštění zbude asi 10 litrů vodné fáze. Tato vodná fáze se upraví na pH 7,5 zředěným vodným roztokem hydroxidu sodného. Vzniklý roztok se dvakrát extrahuje stejným objemem ethylacetátu (9 l a 10 l).

Ethylacetátové extrakty se spojí a potom zahustí na objem asi 400 ml. Zahuštěný ethylacetátový extrakt se přidá k velkému přebytku petroletheru a odstraní se nežádoucí materiály postupem popsaným výše pro zahuštěný extrakt z média. Z filtrátu se získá část A-28086 komplexu antibiotik přítomná v myceliu o hmotnosti 20,6 g.

Příklad 4

Izolace A-28086 individuálních faktorů A a B

Část A-28086 komplexu antibiotik přítomná v myceliu (235 g, připravená postupem podle příkladu 3) se rozpustí v 80 ml benzenu. Tento benzenový roztok se aplikuje na kolonu silikagelu (9 × 130 cm, 8 l, silikagel Matheson Grade 62). Kolona se eluuje různými poměry směsí benzen-ethylacetát. Eluce se sleduje chromatografií na tenké vrstvě. Směsí benzen-ethylacetát (90 : 10) se nejprve eluuje faktor B a izoluje se jako individuální faktor. Faktor B (43 mg) se krystaluje ze směsí aceton—voda a má teplotu tání 150 až 153 °C.

Další elucí směsí benzen-ethylacetát, za zvyšujícího se poměru přítomného ethylacetátu ve směsi se eluuje faktor A; frakce obsahující faktor A se spojí a zahustí ve vakuu. Odparek se rozpustí v acetonu (asi 150 ml) a k roztoku se přidá voda (asi 150 ml).

Vzniklá směs se upraví na pH asi 3 přidáním 1 N kyseliny chlorovodíkové. Okyselená směs se míchá asi jednu hodinu a během této doby se vyloučí sraženina. Tato sraženina se odfiltruje a překrystaluje z acetonu (asi 150 ml) po přidání vody (asi 60 ml). Produkt se suší ve vakuu přes noc a získá se faktor A (asi 6,8 g). Po částečném odpaření acetonu z filtrátu se získá druhý podíl faktoru A (asi 1,2 g).

Příklad 5

A-28086 — faktor A acetyléster

Antibiotikum A-28086 faktor A (7,4 g) se rozpustí v pyridinu (150 ml). K tomuto roztoku se přidá anhydrid kyseliny octové (50 ml). Vzniklý roztok se dokonale smísí a potom nechá stát přes noc při teplotě místnosti.

Poté se za míchání přidá voda (200 ml) a směs se nechá stát 4 hodiny při teplotě místnosti. Vysráží se bílá pevná látka, která se odfiltruje, promyje vodou a vysuší na vzduchu. Vzniklá pevná látka se rozpustí v acetonu (100 ml) a acetonový roztok se odpaří k suchu ve vakuu (tato operace se opakuje třikrát). Získaný odparek krystaluje ze směsí acetonu (100 ml) a vody (50 ml) a získá se A-28086 faktor A acetyléster (6,14 g) teploty tání 100 až 103 °C.

Příklady 6 až 9

Antibiotikum A-28086 faktor A propionyl-ester se připraví reakcí faktoru A s anhydridem kyseliny propionové v přítomnosti pyridinu, postupem podle příkladu 5. Produkt má teplotu tání 96 až 98 °C.

Antibiotikum A-28086 faktor A n-butylester se připraví reakcí faktoru A s anhydridem kyseliny n-máselné v přítomnosti pyridinu, způsobem podle příkladu 5. Produkt má teplotu tání 79 až 81 °C.

Antibiotikum A-28086 faktor A n-kapronylester se připraví reakcí faktoru A s anhydridem n-kapronové kyseliny postupem podle příkladu 5. Produkt má teplotu tání 163 až 167 °C.

Antibiotikum A-28086 faktor A n-valeryl-ester se připraví reakcí faktoru A s anhydridem kyseliny valerové v přítomnosti pyridinu postupem podle příkladu 5. Produkt má teplotu tání 173 až 175 °C.

Příklad 10

Příprava sodné soli A-28086 faktoru A

Antibiotikum A-28086 faktor A (500 mg) se rozpustí v acetonu (50 ml). K tomuto roztoku se přidá voda (50 ml) a 5 N roztokem hydroxidu sodného se pH roztoku upraví na 10,5 až 11. Vzniklý roztok se míchá jednu hodinu a potom se extrahuje ethylacetátem. Ethylacetátový extrakt se odpaří ve vakuu k suchu. Odparek se sráží z roztoku aceton-voda a získá se 378 mg sodné soli A-28086 faktor A teploty tání 120 až 123 °C.

Příklady 11 až 15

Barnatá sůl A-28086 faktor A se připraví z antibiotika A-28086 faktor A (500 mg) a nasytí se hydroxidem barnatým, použitím metody podle příkladu 10. Získá se 369 mg barnaté soli A-28086 faktor A, teploty tání 188 až 190 °C.

Draselná sůl antibiotika A-28086 faktor A se připraví z antibiotika A-28086 faktor A (500 mg) a 5 N hydroxidu draselného použitím metody podle příkladu 10. Získá se 363 mg draselné soli A-28086 faktor A, teploty tání 165 až 167 °C.

Cesná sůl antibiotika A-28086 faktor A se připraví z antibiotika A-28086 faktor A (500 mg) a 1 N hydroxidu cesného, použitím postupu podle příkladu 10 a získá se 540 mg cesné soli A-28086 faktor A teploty tání 190 až 210 °C.

Sodná sůl antibiotika A-28086 faktor B a 5 N hydroxidu sodného postupem podle příkladu 10.

Příklad 16

Fermentace A-28086 v třepaných baňkách použitím *S. aureofaciens* NRRL 8092

Kultura *Streptomyces aureofaciens* NRRL 8092 se připraví a udržuje na šikmém agaru následujícího složení:

Složka	Množství
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,25 g
NH ₄ NO ₃	2 g
CaCO ₃	2,5 g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,001 g
MnCl ₂ · 7 H ₂ O	0,001 g
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,001 g
glukóza	10 g
agar	20 g
deionizovaná voda	do 1 litru
pH (neupravené)	7,7

Šikmá půda se naočkuje *Streptomyces aureofaciens* NRRL 8092 a naočkováná šikmá půda se inkubuje sedm dnů při 30 °C. Dozrálá šikmá kultura se převrství sterilním hovězím sérem a seškrábne se sterilní kličkou, aby se ze šikmé kultury připravila suspenze spor a mycelia. Vzniklá suspenze se lyofilizuje do maximálně šesti tabletek.

Jedna lyofilizovaná tableta připravená tímto způsobem se použije pro naočkování 50 ml vegetativního média následujícího složení:

Složka	Množství
glykóza	20 g
sójová mouka	15 g
kukuřičný výluh	10 g
CaCO ₃	2 g
voda	do 1 litru
pH upraveno na pH 6,5 zředěným NaOH	

Naočkované vegetativní médium v 250 ml Erlenmeyerově baňce se inkubuje při 30 °C 48 hodin na rotační třepačce s 250 otáčkami za minutu při posunu 5 cm.

Inkubované vegetativní médium popsané výše (0,5 ml, 1 %) se použije pro naočkování 50 ml fermentativního média následujícího složení:

Složka	Množství
Tapioca dextrin	60,0 g
enzymem hydrolyzovaný kasein	6,0 g
enzymatický hydrolyzát kaseinu	2,0 g
CaCO ₃	2,0 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g
Blackstrap melasa	15,0 g
čištěný sójový olej	5,0 ml
voda	do 1 litru
pH (neupraveno 6,6	

Příklad 17

Fermentace A-28086 v tanku za použití *S. aureofaciens* NRRL 8092

Počáteční postup popsáný v příkladu 16 pro fermentaci A-28086 v třepané baňce se

také použije pro fermentaci v tanku. Pro přípravu velkého objemu očka se 10 ml naočkovaného vegetativního média použije pro naočkování 400 ml druhého stupně vegetativního média stejného složení jako první vegetativní médium. Toto médium druhého stupně v 2litrové Erlenmeyerově baňce se inkubuje při 30 °C po 24 hodin na rotační třepačce při 250 otáčkách s posunem 5 cm.

Toto inkubované vegetativní médium druhého stupně (800 ml) se použije pro naočkování 100 litrů sterilního fermentačního média následujícího složení:

Složka	Množství
Tapioca dextrin	60,0 g/l
enzymem hydrolyzovaný kasein	6,0 g/l
enzymatický hydrolyzát kaseinu	2,0 g/l
CaCO ₃	2,0 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g/l
Blackstrap melasa	15,0 g/l
čištěný sójový olej	5,0 mg/l
voda	do 1 litru

Médium po sterilizaci v autoklávu při 121 °C 30 minut a při tlaku 0,103 až 0,1373 MPa má pH 6,8 ± 0,1. Ve 165litrovém fermentačním tanku se produkční médium naočkuje a fermentuje se 10 až 12 dnů při 28 ± 1 °C. Fermentační médium se provzdušňuje sterilním vzduchem v množství 0,4 objemů na objem živného média za minutu. Médium se míchá běžným míchadlem s 300 otáčkami za minutu.

Příklad 18

Antibiotika A-28086 se produkují postupem podle příkladu 17, ale v třepačkách a tanku se použije produkční médium následujícího složení:

Složka	Množství
Tapioca dextrin	30,0 g/l
glukóza	15,0 g/l
enzymem hydrolyzovaný kasein	3,0 g/l
enzymatický hydrolyzát kaseinu	1,0 g/l
extrakt z kvasnic	2,5 g/l
CaCO ₃	2,0 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,0 g/l
Blackstrap melasa	15,0 g/l
čištěný sójový olej	5,0 mg/l
voda	do 1 litru

Médium po sterilizaci v autoklávu, jak je popsáno v příkladu 17, má pH 6,4.

Příklad 19

Izolace A-28086 komplexu antibiotik produkovaného *S. aureofaciens* NRRL 8092

Fermentační médium (60 l) získané metodou popsanou v příkladu 17 se upraví na pH 3 přidáním zředěné HCl. Vzniklý roztok

se přefiltruje použitím filtrační pomocné látky (Hyflo Super cel, diatomická hlínka). Oddělený filtrační koláč mycelia se extrahuje 30 litry methanolu a za míchání se přidá 1,56 kg NaHCO₃. Po oddělení tohoto extraktu se koláč mycelia znovu extrahuje dalšími 30 litry methanolu. Dva methanolicke extrakty se spojí a zahuštěním ve vakuu se odstraní methanol. Zbýlý vodný roztok (asi 7 litrů) se upraví zředěnou kyselinou chlorovodíkovou na pH 7,5. Vzniklý roztok se dvakrát extrahuje ethylacetátem (7litrové dávky). Ethylacetátové extrakty se spojí a zahuštěním ve vakuu se získá olejovitý odparek. Olejovitý zbytek se rozpustí v 1500 ml acetonu. K tomuto acetonovému roztoku se přidá voda (1500 ml). Vzniklý roztok se upraví na pH 3 zředěnou kyselinou chlorovodíkovou a směs se míchá jednu hodinu. Vzniklá sraženina se oddělí filtrací a potom se rozpustí v acetonu (1500 ml) a k roztoku se přidá 400 ml vody. Vzniklý roztok se nechá stát 16 hodin, přičemž produkt vykristaluje. Vzniklé krystaly se odfiltrují a vysušením ve vakuu se získá 74 g surového krystalického produktu obsahujícího A-28086 faktory A a D a jiné krystalické nečistoty.

Tento surový krystalický produkt (40 g) se rozpustí v asi 250 ml benzenu. Benzenový roztok se potom nanese na kolonu silikagelu (9 × 120 cm silikagelu Grace-Davidson grade 62). Kolona se eluuje postupně 40 litry následujících rozpouštědel:

1. benzen
2. benzen : ethylacetát (9:1)
3. benzen : ethylacetát (4:1)
4. benzen : ethylacetát (7:3)
5. benzen : ethylacetát (1:1)
6. ethylacetát
7. methanol

Jímají se frakce po 1 litru. Každá frakce se testuje na aktivitu vůči *Bacillus subtilis* a chromatografií na tenké vrstvě. A-28086 se eluuje směsí benzen : ethylacetát (4:1), A-28086 faktor B se eluuje směsí benzen : ethylacetát (7:3). A-28086 faktory A a D se eluují ve frakcích směsí benzen : ethylacetát (7:3 a 1:1), frakce 119-až 156. Tyto frakce se spojí a odpaří k suchu ve vakuu. Takto získaný odparek se rozpustí v acetonu (500 ml). K acetonovému roztoku se přidá voda (500 ml) a vzniklý roztok se upraví na pH 3 zředěnou kyselinou chlorovodíkovou a míchá se jednu hodinu. Vzniklá sraženina se odfiltruje a krystaluje se ze směsi aceton (500 ml) — voda (180 ml). Takto vzniklé krystaly se odfiltrují a vysušením ve vakuu se získá 20,1 g směsi A-28086 faktory A a D.

Příklad 20

Oddělení a čištění jednotlivých faktorů A a D

Krystalická směs A-28086 faktory A a D získané v příkladu 18 (18,8 g) se rozpustí v benzenu (50 ml). Benzenový roztok se nanese na kolonu silikagelu (7 × 100 cm, silikagel E-Merck grade 60, jemnější než 230 mesh ASTM). Kolona se eluuje rychlostí 90 ml za hodinu postupně následujícími rozpouštědly:

1. 12 litrů benzenu
2. 12 litrů směsi benzen/ethylacetátu (9:1)
3. 12 litrů směsi benzen : ethylacetátu (4:1)
4. 32 litrů směsi benzen : ethylacetátu (7:3)
5. 10 litrů methanolu

Postup eluce se sleduje chromatografií na tenké vrstvě celulózy (celulózka, na hliníkové podložce) a bioautografií za použití B. subtilis. Pro chromatografii se používají následující systémy rozpouštědel: voda : methanol : aceton (12:3:1), přičemž pH roztoku se nejprve upraví na 10,5 roztokem NH₄OH a poté na pH 7,5 kyselinou chlorovodíkovou.

Až do detekce biologické aktivity se jímají jednolitrové až dvoulitrové frakce a potom se jímají 200 ml frakce. Frakce obsahující pouze A-28086 faktor D se spojí a odpaří ve vakuu na odparek. Tento odparek se krystaluje ze směsi aceton-voda (1:1). Krystaly se oddělí a vysuší ve vakuu. Získá se 140 mg krystalického A-28086 faktoru D.

Frakce obsahující A-28086 faktor D se stopou A-28086 faktoru A se zpracují stejným způsobem a získá se dalších 150 mg krystalického A-28086 faktoru D obsahujícího malé množství A-28086 faktoru A.

Frakce obsahující pouze A-28086 faktor A se také zpracují stejným způsobem a získá se 4,7 g krystalického A-28086 faktoru A.

Příklad 21

A-28086 antibiotika se produkují postupem podle příkladu 16, ale použije se šikmá půda následujícího složení:

Složka	Množství
hovězí extrakt	2,00 g
dextrin	20,00 g
extrakt z kvasnic	2,00 g
enzymatický hydrolyzát kaseinu	4,00 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,02 g
agar	20,00 g
deionizovaná voda	do 1 litru
pH upraveno na	7,0 KOH

a inkubace naočkované šikmé půdy se provádí při 28 °C sedm dnů.

Příklad 22

Antibiotika A-28086 se produkují postupem podle příkladu 17, ale jako médium pro produkci v baňkách se použije médium následujícího složení:

Složka	Množství
Tapioca dextrin	80 g/l
enzymem hydrolyzovaný kasein	15,0 g/l
Blackstrap melasa	15,0 g/l
uhličitan vápenatý	2,0 g/l
síran amonný	1,0 g/l
síran hořečnatý	0,5 g/l
čištěný sčjový olej	4,6 g/l

Příklad 23

Antibiotika A-28086 se produkují postupem podle příkladu 21, ale jako vegetativní médium třetího stupně se použije médium následujícího složení:

Složka	Množství
Cerelóza	20,0 g/l
kukuřičný výluh (vlhká váha)	10,0 g/l
sójové otruby	15,0 g/l
CaCO ₃	2,0 g/l
kvasnice	2,0 g/l
cukrovková melasa	5,0 g/l

Příklad 24

Kuřecí krmivo modifikované A-28086 pro kontrolu kokcidiózy

Yvážené, vysoce vydatné krmivo pro kuřata s rychlým přírůstkem váhy se připraví podle následujícího předpisu:

složky	%	kg
rozemletá žlutá kukuřice	50	453,6
sójová mouka bez slupek extrahovaná rozpuštědlem jemně rozemletá, 50 % proteinů	31,09	272
živočišný tuk (hovězí lůj)	6,5	57,9
sušená rybí moučka s rozpustnými podíly (60 % proteinu)	5,0	45,3
lihovarský výluh z kukuřice	4,0	36,3
fosforečnan vápenatý	1,8	16,3
uhličitan vápenatý	0,8	7,2
vitamínová předsměs (obsahující vitamíny A, D, E, K a B ₁₂ , cholin, niacin, pantho- thenovou kyselinu, riboflavin, biotin s glukózou jako nosičem)	0,5	4,5
předsměs stopových prvků (MnSO ₄ , ZnO, KJ, FeSO ₄ , CaCO ₃)	0,2	1,6
2-amino-4-hydroxymáselná kyselina (hyd- roxyanalogy methioninu)	0,1	0,9
A-28086 faktor A	0,01	0,09

Tyto látky se smísí postupem běžně používaným pro míšení krmiv. Kuřata se krmí tímto krmivem a vodou ad libitum a jsou chráněná proti propuknutí kokcidiózy; hmotnostní přírůstek je srovnatelný s kuřaty bez kokcidiózy, která byla krmena obdobnou dietou bez sloučenin podle vynálezu.

Příklad 25

Krmivo pro hovězí dobytek, zlepšená A-28086

Vyvážené, vysoce hodnotné krmivo pro hovězí dobytek se připraví následujícím způsobem:

složky	%	kg
jemně rozemletá kukuřice	67,8	615,0
rozemleté kukuřičné klasy	10	90,7
dehydratovaná vojtěšková mouka, 17 % proteinů	5	45,3
sójová mouka bez slupek extrahovaná rozpuštědlem, 50 % proteinů	9,9956	90,68
melasa ze třtiny	5	45,3
močovina	0,6	5,4
A-28086 faktor A	0,0044	0,0397
fosforečnan vápenatý	0,5	4,5
uhličitan vápenatý	0,5	4,5
chlorid sodný	0,3	2,7
předsměs stopových prvků	0,03	0,27
předsměs vitamínů A a D ₂ *	0,07	0,63
předsměs vitamínu E**	0,05	0,45
propionát vápenatý	0,15	1,3

* obsahující na 0,45 kg 2 000 000 m. j. vitamínu A, 227 200 m. j. vitamínu D₂ a 385,7 g sójového krmiva s 1 % oleje;

** kukuřičná lihovarská vysušená zrna s výluhy obsahující 20 000 m. j. d- α -tokoferylacetátu na 0,45 kg.

Smíšené krmivo se lisuje do peletek. Průměrná denní dávka krmiva v množství 6,7 kilogramu na zvíře obsahuje asi 300 mg A-28086 faktoru A na zvíře za den.
Příklad 26

Acetylderiváty A-28086 faktoru D

Antibiotikum A-28086 faktor D se rozpustí v pyridinu. Přidá se stechiometrické množství acetanhydridu a vzniklý roztok se promíchá a potom nechá stát při teplotě místnosti přes noc.

Poté se přidá přebytek vody, směs se promíchá a nechá stát několik hodin při teplotě místnosti. Vzniklá sraženina se odfiltruje, promyje vodou a vysuší. Vzniklá pevná látka se promyje vodou a vysuší. Pevný podíl se rozpustí v acetonu a odpaří ve vakuu k suchu. Získá se tak acetylderivát A-28086 faktoru D.

Příklady 27 až 30

Propionylester antibiotika A-28086 faktoru D se připraví reakcí A-28086 faktoru D, s anhydridem kyseliny propionové v přítomnosti pyridinu postupem podle příkladu 26.

n-butyrylester antibiotika A-28086 faktoru D se připraví reakcí A-28086 faktoru D s anhydridem n-máselné kyseliny v přítomnosti pyridinu, postupem podle příkladu 26.

n-Kapronylester antibiotika A-28086 faktoru D se připraví reakcí A-28086 faktoru D s anhydridem kyseliny kapronové v přítomnosti pyridinu, postupem podle příkladu 26.

n-Valerylester antibiotika A-28086 faktoru D se připraví reakcí A-28086 faktoru D

s anhydridem kyseliny valerové v přítomnosti pyridinu, postupem podle příkladu 26.

Příklad 31

Příprava sodné soli A-28086 faktor D

Antibiotikum A-28086 faktor D se rozpustí v acetonu. Přidá se ekvivalentní množství vody a dostatečné množství 5N hydroxidu sodného, aby pH roztoku bylo asi 11. Vzniklý roztok se míchá asi jednu hodinu a potom se extrahuje ethylacetátem. Ethylacetátový extrakt se odpaří ve vakuu a získá se sodná sůl A-28026 faktoru D.

Příklady 32 až 34

Draselná sůl antibiotika A-28086 faktoru D se připraví z A-28086 faktoru D a 5N hydroxidu draselného postupem podle příkladu 31.

Barnatá sůl antibiotika A-28086 faktor D se připraví z A-28086 faktoru D a nasyceného roztoku hydroxidu barnatého použitím metody podle příkladu 31.

Cesná sůl antibiotika A-28086 faktoru D se připraví z A-28086 faktoru D a 1N roztoku hydroxidu cesného použitím metody podle příkladu 31.

Příklad 35

Kuřecí krmivo obsahující A-28086 faktor D pro kontrolu kokcidiózy

Yvzážené, vysoce vydatné krmivo pro kuřata s rychlým přírůstkem váhy se připraví podle následujícího předpisu:

Složky	%	kg
rozemletá žlutá kukuřice	50	453,6
sójová mouka bez slupek, extrahovaná rozpouštědlem, jemně rozemletá, 50 % proteinů	31,09	272,0
živočišný tuk (hovězí lůj)	6,5	57,9
sušená rybí moučka s rozpustnými podíly (60 % proteinů)	5,0	45,3
lihovarský výluh z kukuřice	4,0	36,3
fosforečnan vápenatý	1,8	16,3
uhličitan vápenatý	0,8	7,2
vitamínová předsměs (obsahující vitamíny A, D, E, K a B ₁₂ , cholin, niacin, panthothenovou kyselinu, riboflavin, biotin, s glukózou jako nosičem)	0,5	4,5
předsměs stopových prvků MnSO ₄ , ZnO, KJ, FeSO ₄ , CaCO ₃	0,2	1,8
2-amino-4-hydroxymáselná kyselina (hydroxyanalogy methioninu)	0,1	0,9
A-28086 faktor D	0,01	0,09

Tyto látky se smísí postupem běžně používaným pro míšení krmiv. Kuřata se krmí tímto krmivem a vodou ad libitum a jsou chráněná proti propuknutí kokcidiózy; hmotnostní přírůstek je srovnatelný s kuřaty bez kokcidiózy, která byla krmena obdobnou dietou bez sloučenin podle vynálezu.

Příklad 36

Krmivo pro hovězí dobytek obsahující A-28086 faktor D

Vyvážené, vysoce hodnotné krmivo pro hovězí dobytek se připraví následujícím způsobem:

Složky:	%	kg
jemně rozemletá kukuřice	67,8	615,0
rozemleté kukuřičné klasy	10	90,7
dehydratovaná vojtěšková mouka, 17 % proteinů	5	45,3
séjová mouka bez slupek extrahovaná rozpouštědlem, 50 % proteinů	9,9956	90,68
melasa ze třtiny	5	45,3
močovina	0,6	5,4
A-28086 faktor D	0,0044	0,0397
fosforečnan vápenatý	0,5	4,5
uhličitan vápenatý	0,5	4,5
chlorid sodný	0,3	2,7
předsměs stopových prvků	0,03	0,27
předsměs vitamínů A a D ₂ *	0,07	0,63
předsměs vitamínu E**	0,05	0,45
propionát vápenatý	0,15	1,3

* obsahující na 0,45 kg 2 000 000 m. j. vitamínu A, 227 200 m. j. vitamínu D₂ a 385,7 g sójového krmiva s 1 % oleje;

** kukuřičná lihovarská vysušená zrna s výluhy, obsahující 20 000 m. j. d- α -tokoferylacetátu na 0,45 kg.

Smíšené krmivo se lisuje do peletek. Průměrná denní dávka v množství 6,7 kg na

zvíře obsahuje asi 300 mg A-28086 faktor D na zvíře za den.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

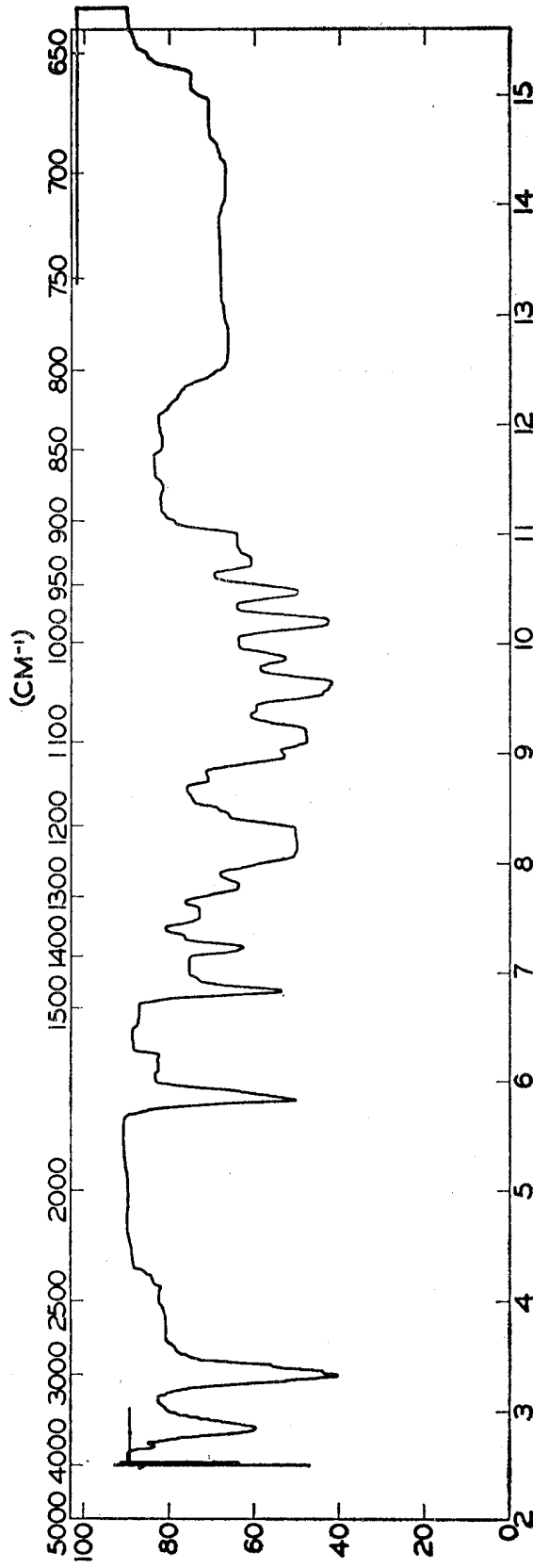
1. Způsob přípravy polyetherických antibiotik A-28086 tvořících komplex, sestávající z faktoru A, faktoru B a faktoru D, acyl-esterů faktorů A a D obsahujících 2 až 6 atomů uhlíku v acylu nebo jejich fyziologicky vhodných solí a způsobu izolace A-28086 faktoru A, A-28086 faktoru B, A-28086 faktoru D z komplexu antibiotik A-28086, vyznačený tím, že se kultivuje *Streptomyces aureofaciens* NRRL 5758 nebo *Streptomyces aureofaciens* NRRL 8092 v živném médiu obsahujícím asimilovatelné zdroje sacharidů, dusíku a anorganických solí za submerzních aerobních fermentačních podmínek při teplotě od 20 do 40 °C a při pH od 6,0 do 8,0, až je tímto organismem v tomto živném médiu produkováno dostatečné množství antibiotické aktivity a případ-

ně se oddělí komplex antibiotik A-28086 od živného média, případně se z komplexu antibiotik A-28086 oddělí faktory A, B nebo D a načež se případně převádějí tyto faktory A, B nebo D v acylderiváty nebo farmaceuticky přijatelné soli.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že se komplex z živného média extrahuje polárním organickým rozpouštědlem, takto vzniklý roztok se zahustí a koncentrát se přidá k přebytku petroletheru, aby se vysrážely nečistoty, načež se filtrací a odpařením filtrátu získá komplex antibiotik A-28086.

3. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že faktory A, B nebo D se oddělí ze živného média snížením pH živného média na hodnotu 3, načež se příslušné faktory odfiltrují.

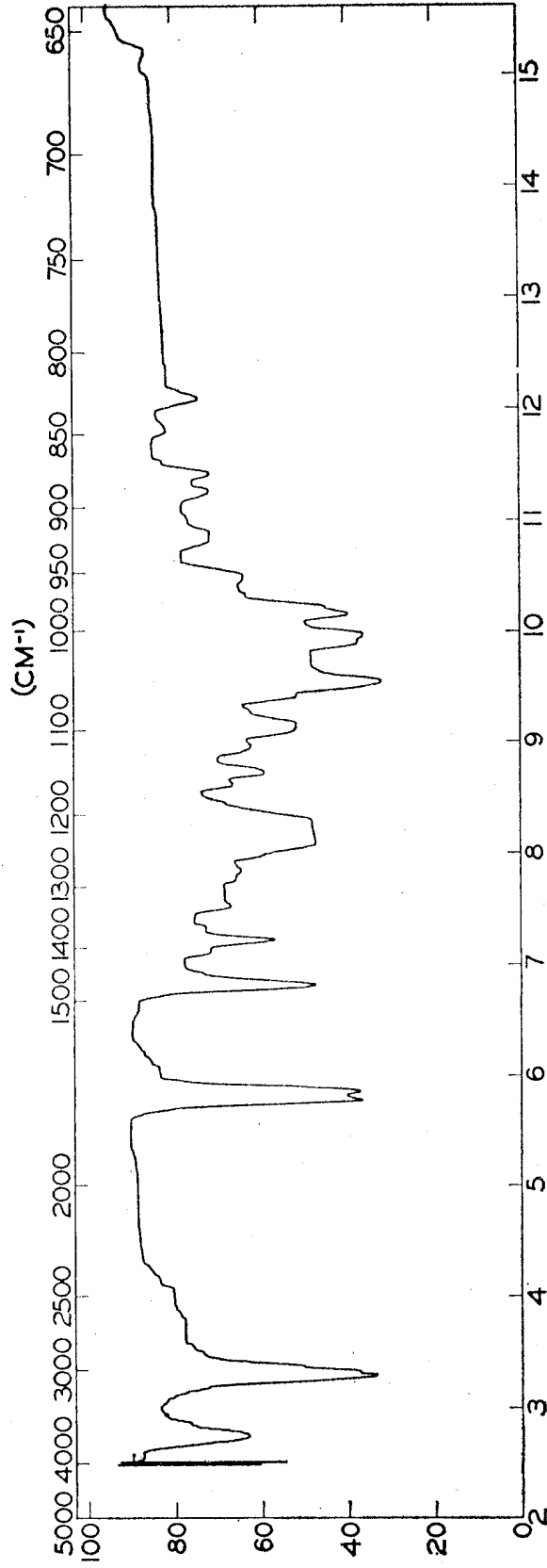
A-28086 A



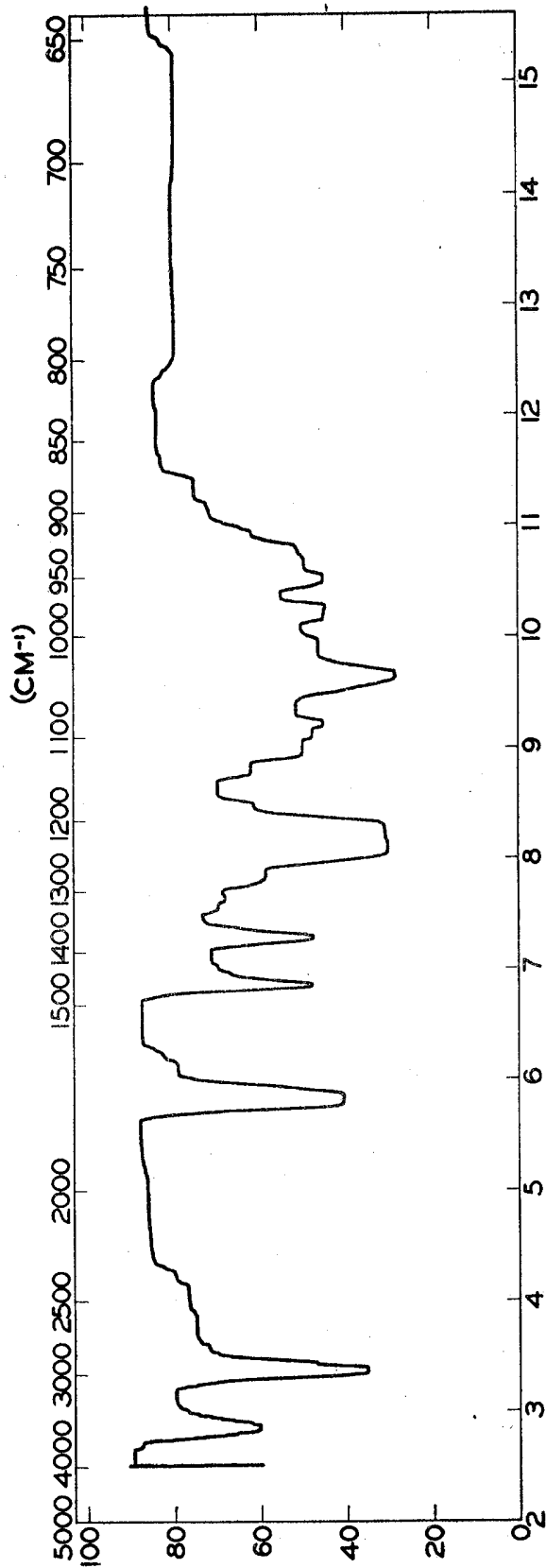
Obv. 1

A-28086

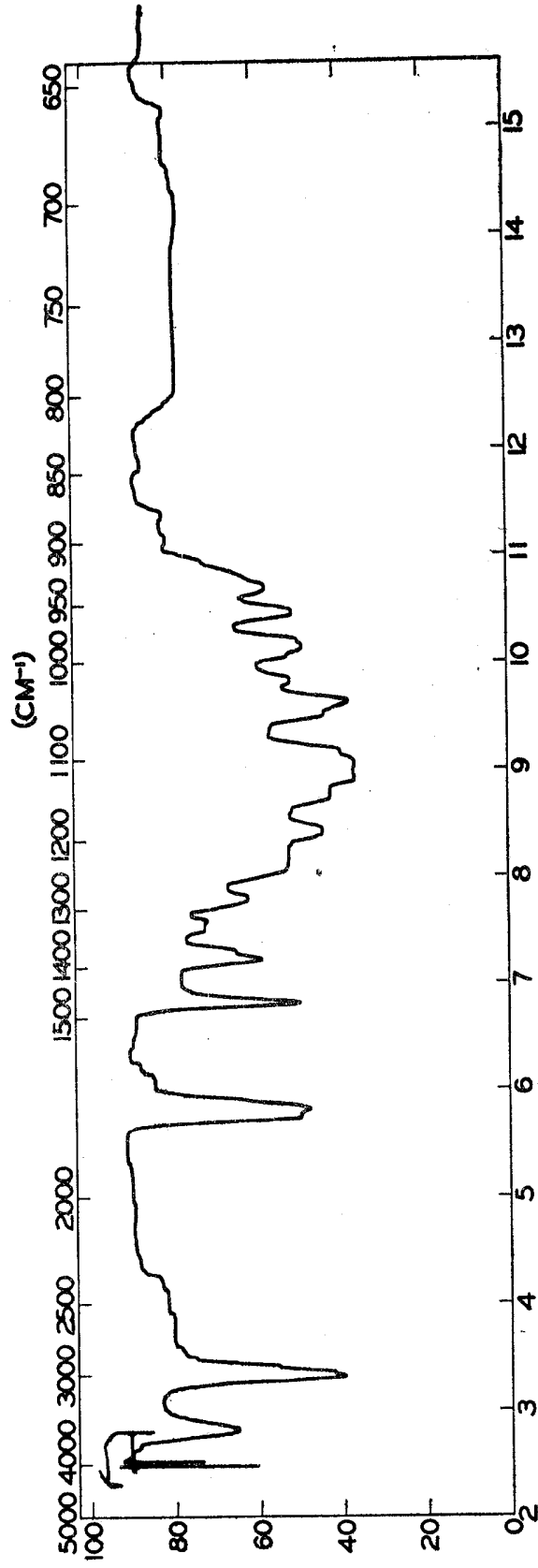
B



Obr. 2

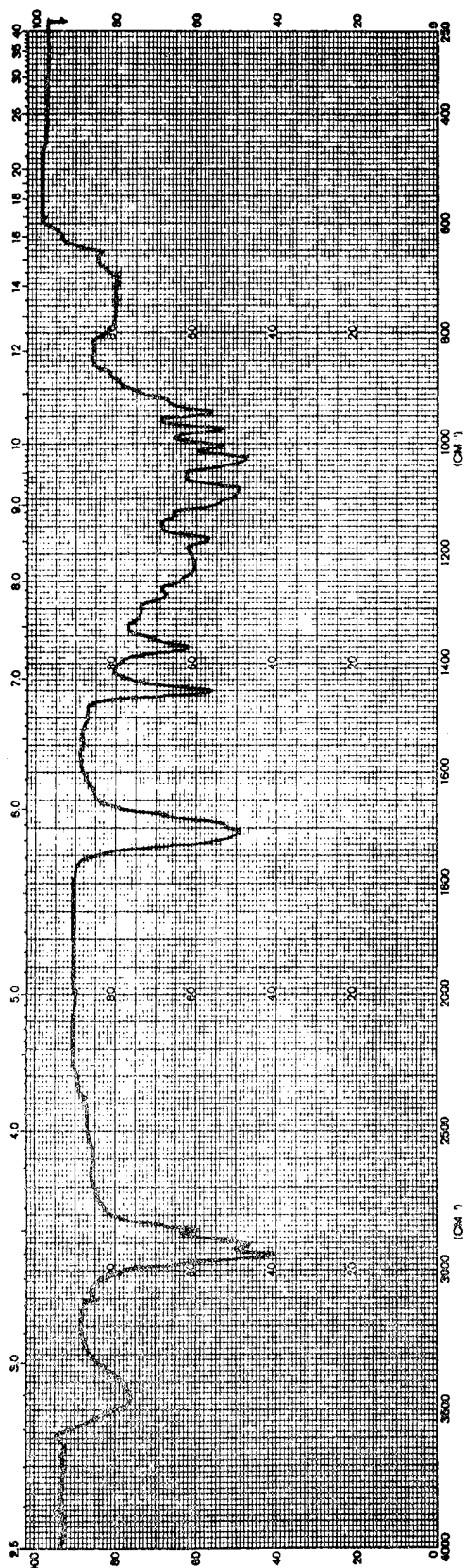


Obr. 3

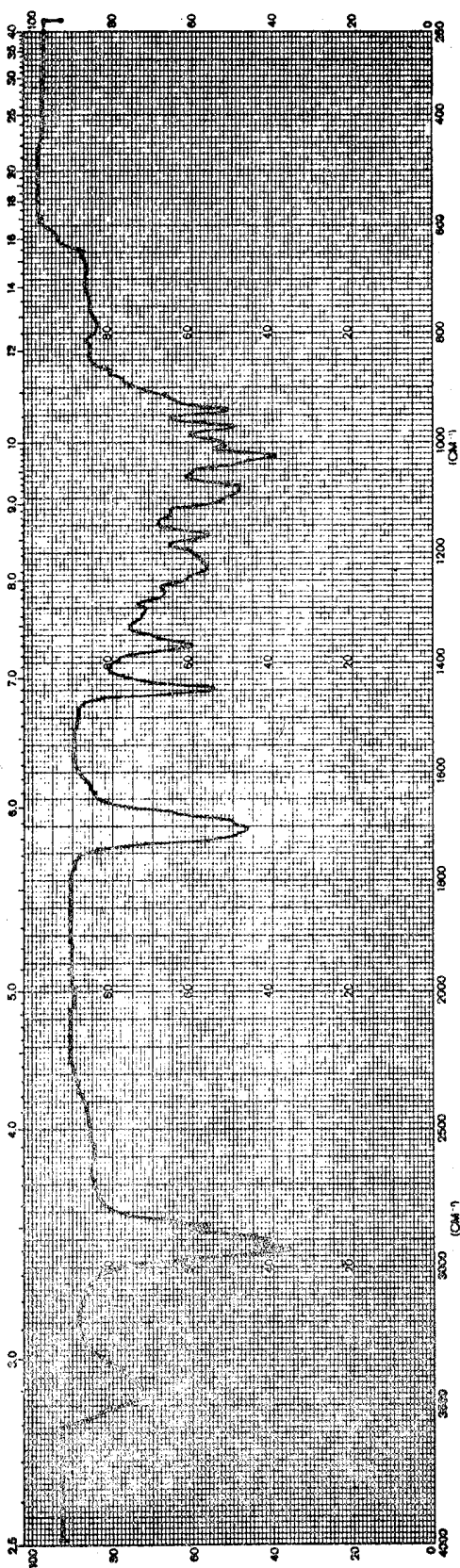


Obr. 4

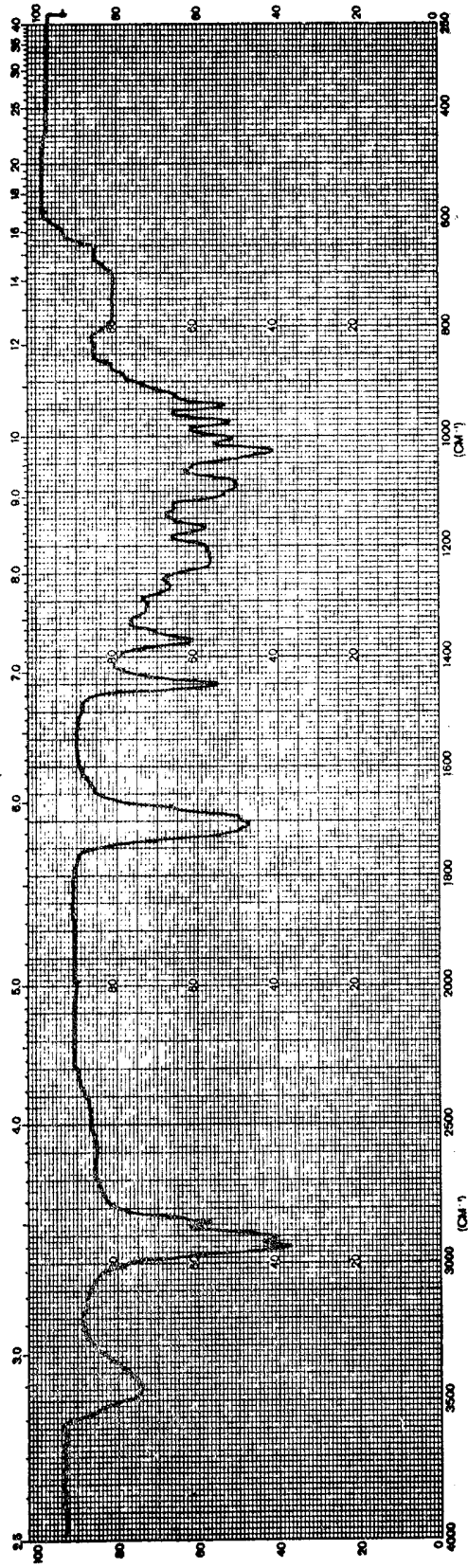
Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7



Obr. 8

