



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤ Int. Cl.³: C 07 H 15/22
A 61 K 31/71
C 12 P 19/48
// C 12 R 1/04

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

645 385

⑳ Gesuchsnummer: 9881/79

⑦③ Inhaber:
Meiji Seika Kaisha Limited, Chuo-ku/Tokyo (JP)

㉓ Anmeldungdatum: 02.11.1979

⑦② Erfinder:
Ohba, Kazunori, Yokohama-shi/Kanagawa-ken (JP)
Shomura, Takashi,
Yokohama-shi/Kanagawa-ken (JP)
Kojima, Michio, Shibuya-ku/Tokyo (JP)
Omoto, Shoji, Shinagawa-ku/Tokyo (JP)
Tsuruoka, Takashi, Kawasaki-shi/Kanagawa-ken (JP)
Inoue, Shigeharu, Yokohama-shi/Kanagawa-ken (JP)
Ito, Tatsuo, Isehara-shi/Kanagawa-ken (JP)

③⑩ Priorität(en): 06.11.1978 JP 53-135921
23.07.1979 JP 54-92642

㉔ Patent erteilt: 28.09.1984

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 28.09.1984

⑦④ Vertreter:
Patentanwalts-Bureau Isler AG, Zürich

⑤④ **Antibiotische Substanz SF-2052 und Verfahren zu ihrer Herstellung.**

⑤⑦ Ein neues Antibiotikum, Substanz SF-2052, wird hergestellt durch Züchtung eines Mikroorganismus, *Dactylosporangium matsuzakiense* SF-2052, hinterlegt unter FERM - P 4670 und ATCC No. 31570, oder *Micromonospora* sp. SF-2098, hinterlegt unter FERM - P 5073 und ATCC No. 31580, in einem flüssigen Kulturmedium unter aeroben Bedingungen, und dieses Antibiotikum kann aus der Kulturbrühe nach üblichen Methoden isoliert werden und ist nützlich als antibakterielles Mittel.

PATENTANSPRÜCHE

1. Antibiotische Substanz SF-2052 und ein pharmazeutisch annehmbares Säureadditionssalz davon, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz SF-2052 eine wasserlösliche basische Verbindung mit antibakterieller Wirksamkeit ist, das Hydrochlorid der Substanz SF-2052 in Form eines farblosen und amorphen Pulvers vorliegt, welches unter neutralen bis sauren pH-Bedingungen im wesentlichen stabil ist, aber unstabil unter alkalischen pH-Bedingungen, keinen bestimmten Schmelzpunkt aufweist, sondern sich bei oder annähernd bei 170 °C allmählich braun verfärbt und bei 209 bis 210 °C unter Schäumen zersetzt, eine positive Reaktion mit Ninhydrin, Lemieux-Reagens und Greig-Leaback-Reagens ergibt, aber negativ auf Sakaguchi-Reagens und auf Silbernitrat reagiert, leicht löslich ist in Wasser, löslich in Methanol und unlöslich in Äthylacetat, Chloroform, Benzol und Äthyläther, wobei das Hydrochlorid der Substanz SF-2052 ferner dadurch gekennzeichnet ist, dass

a) es eine Elementaranalyse von C 35,69%, H 7,04%, N 11,80% aufweist,

b) keine charakteristischen Absorptionsspitzen bei 220nm bis 370nm im Ultraviolett-Absorptionsspektrum in wässriger Lösung zeigt,

c) ein Infrarot-Absorptionsspektrum in Kaliumbromid pelletiert, wie in Fig. 1 dargestellt, aufweist,

d) ein Wasserstoff-Kernmagnetresonanz-Absorptionsspektrum in Deutero-Wasser, wie in Fig. 2 dargestellt, aufweist,

e) ein Kohlenstoff-Kernmagnetresonanz-Absorptionsspektrum in Deutero-Wasser, wie in Fig. 3 dargestellt, aufweist,

f) eine spezifische optische Drehung $[\alpha]_D^{25} = + 87^\circ$ (c = 1, Wasser) in wässriger Lösung besitzt, und

g) einen einzigen Fleck bei $R_f = 0,46$ in einer Cellulose-Dünnschichtchromatographie mit n-Propanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser des Volumenverhältnisses 15 : 10 : 3 : 12 als Entwicklungslösungsmittel und bei $R_f = 0,09$ in einer Papierchromatographie mit n-Butanol-Essigsäure-Wasser des Volumenverhältnisses 2 : 1 : 1 als Entwicklungslösungsmittel gemäss der steigenden Methode ergibt.

2. Substanz nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie das Hydrochlorid oder Sulfat der Substanz SF-2052 ist.

3. Verfahren zur Herstellung der Substanz SF-2052 nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man

a) einen die Substanz SF-2052 erzeugenden Stamm von Actinomycetes in einem wässrigen flüssigen Kulturmedium, welches assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthält, unter aeroben Bedingungen, während genügend langer Zeit züchtet, um die Substanz SF-2052 im Kulturmedium zu erzeugen und anzureichern, und

b) die Substanz SF-2052 aus dem Kulturmedium gewinnt.

4. Verfahren nach Patentanspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Züchtung bei einer Temperatur von 25 bis 37 °C während 2 bis 10 Tagen erfolgt.

5. Verfahren nach Patentanspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz SF-2052 als Hydrochlorid aus der Kulturbrühe von Dactylosporangium matsuzakiense SF-2052 gewonnen wird.

6. Verfahren nach einem der Patentansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Actinomycetes-Stamm ein Stamm von Dactylosporangium matsuzakiense SF-2052, der unter der Nummer ATCC 31570 registriert ist, verwendet wird.

7. Verfahren nach Patentanspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als Actinomycetes-Stamm einen Stamm von Micromonospora sp. SF-2098, der unter der ATCC-Nummer 31580 registriert ist, verwendet.

8. Verfahren nach Patentanspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Züchtung bei einer Temperatur von 25 bis 40 °C während 3 bis 10 Tagen erfolgt.

9. Verfahren nach Patentanspruch 7, dadurch gekennzeichnet,

dass die Substanz SF-2052 als Hydrochlorid aus der Kulturbrühe von Micromonospora sp. SF-2098 gewonnen wird.

10. Antibakterielle Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie als aktiven Bestandteil eine antibakteriell wirksame Menge von mindestens einem der pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalze der Substanz SF-2052 nach Patentanspruch 1, zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger für den aktiven Bestandteil enthält.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine neue antibiotische Substanz, welche als Substanz SF-2052 bezeichnet wurde. Die Erfindung bezieht sich ferner auf die Herstellung dieses neuen Antibiotikums durch Züchtung eines diese Substanz erzeugenden Stammes von Actinomyceten, insbesondere eines Stammes der Art Dactylosporangium oder der Art Micromonospora in einem Kulturmedium. Die Erfindung umfasst ferner eine antibakteriell wirksame Zusammensetzung, welche die Substanz SF-2052 als aktiven Bestandteil enthält.

Eine Anzahl nützlicher Antibiotika werden aus der Kulturbrühe verschiedener Stämme von Mikroorganismen erzeugt und isoliert. In dem Bestreben, neue und nützliche Antibiotika zu entwickeln, welche wirksam sind gegen gramnegative und grampositive Bakterien sowie gegen verschiedene Bakterienstämme, welche gegen bekannte Antibiotika resistent sind, wurde die Fermentationsbrühe eines neuen Mikroorganismus, welcher nunmehr als Dactylosporangium matsuzakiense SF-2052 bezeichnet wird, untersucht. Als Resultat dieser Forschungsarbeiten wurde gefunden, dass ein neues Antibiotikum erzeugt wird durch Züchten dieses neuen Organismus in einem Kulturmedium, welches assimilierbare Nährstoffe enthält, unter aeroben Bedingungen. Es gelang ferner, dieses neue Antibiotikum aus der Kulturbrühe zu isolieren, und es wurde als Substanz SF-2052 bezeichnet. Die chemischen, physikalischen und biochemischen Eigenschaften der Substanz SF-2052 wurden bestimmt. Ausserdem wurde gefunden, dass dieses neue Antibiotikum auch erzeugt wird durch Züchtung eines Stammes eines anderen neuen Mikroorganismus, welcher als Micromonospora sp. SF-2052 bezeichnet wurde.

Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Beschaffung eines neuen Antibiotikums, der Substanz SF-2052, welches nützlich ist als antibakterielles Mittel.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit eine neue antibiotische Substanz, Substanz SF-2052, sowie ein pharmazeutisch annehmbares Säureadditionssalz davon, welche Substanz SF-2052 eine wasserlösliche, basische Verbindung mit antibakterieller Wirksamkeit ist, und das Hydrochlorid der Substanz SF-2052 in Form eines farblosen und amorphen Pulvers vorliegt, welches im wesentlichen stabil ist unter neutralen bis sauren pH-Bedingungen, aber instabil unter alkalischen pH-Bedingungen, keinen bestimmten Schmelzpunkt aufweist, sondern sich allmählich bei oder nahe bei 170 °C verfärbt und sich bei 209 bis 210 °C unter Schäumen zersetzt, eine positive Reaktion auf Ninhydrin, Lemieux-Reagens und Greig-Leaback-Reagens ergibt, aber negativ auf Sakaguchi-Reagens und Silbernitrat reagiert, und leicht löslich ist in Wasser, löslich in Methanol und unlöslich in Äthylacetat, Chloroform, Benzol und Äthyläther, und wobei dieses Hydrochlorid der Substanz SF-2052 weiterhin gekennzeichnet ist durch:

a) die folgende Elementaranalyse : C 35,69%, H 7,04%, N 11,8 ,

b) das Fehlen charakteristischer Absorptionsspitzen bei 220nm bis 370nm im Ultraviolett-Absorptionsspektrum in wässriger Lösung,

c) ein Infrarot-Absorptionsspektrum in Kaliumbromid pelletiert entsprechend demjenigen in Fig. 1 der beiliegenden Zeichnungen.

d) ein Wasserstoff-Kernmagnetresonanz-Absorptionsspektrum in Deutero-Wasser entsprechend demjenigen von Fig. 2 der beiliegenden Zeichnungen,

e) ein Kohlenstoff-Kernmagnetresonanz-Absorptionsspektrum in Deutero-Wasser im wesentlichen entsprechend demjenigen in Fig. 3 der beiliegenden Zeichnungen,

f) eine spezifische optische Drehung $[\alpha]_D^{25} = +87^\circ$ (c = 1, Wasser) in wässriger Lösung, und

g) einen einzigen Flecken bei $R_f = 0,46$ in einer Cellulose-Dünnschichtchromatographie mit n-Propanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser (15 : 10 : 3 : 12) als Entwicklungslösungsmittel und bei $R_f = 0,09$ in einer Papierchromatographie mit n-Butanol-Essigsäure-Wasser (2 : 1 : 1) als Entwicklungslösungsmittel nach der aufsteigenden Methode.

Die oben erwähnten, zur Identifizierung der neuen Substanz verwendeten Lemieux-, Greig-Leaback- und Sakaguchi-Reagenzien sind dem Fachmann bekannt und in der Literatur beschrieben.

So beschreiben R. U. Lemieux et al. [Analytical Chemistry, 26, 920-921 (1954)], dass mit einer schwach alkalischen (pH 7,2) wässrigen Lösung von Natriummetaperiodat und Kaliumpermanganat Kohlehydrate durch das Auftreten einer grünlich-gelben Färbung nachgewiesen werden können.

Das Greig-Leaback-Reagens besteht einerseits aus einer wässrigen Kaliumhypochloritlösung, andererseits aus einem Gemisch gleicher Teile einer gesättigten Lösung von o-Toluidin in 2%iger Essigsäure und einer 0,85%igen wässrigen Kaliumiodidlösung. [C. G. Greig und D. H. Leaback Nature 188, 310 (1960)]. Es ermöglicht die Unterscheidung und den Nachweis von Amino- und Iminverbindungen.

Das Sakaguchi-Reagens ergibt mit Arginin und anderen Guanidinderivaten orange bis rote Färbungen. Das Reagens besteht einerseits aus einer 0,1%igen Lösung von 8-Hydroxychinolin, andererseits aus einer Lösung von 0,2 ml Brom in 100 ml 0,5 N NaOH. [J. B. Jepson und J. Smith, Nature 172, 1100 (1953); 177, 84 (1956)].

Die Substanz SF-2052 der vorliegenden Erfindung kann z. B. in Form ihres Säureadditionssalzes mit einer pharmazeutisch annehmbaren anorganischen Säure, wie Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure und Phosphorsäure, oder mit einer pharmazeutisch annehmbaren organischen Säure, wie Essigsäure, Zitronensäure, Benzoesäure, Ascorbinsäure oder Apfelsäure, vorliegen.

Eigenschaften des Hydrochlorides der Substanz SF-2052 sind im folgenden zusammengestellt:

1. Aussehen : farblos, amorphes Pulver

2. Schmelzpunkt : kein bestimmter Schmelzpunkt.

Langsame Verfärbung zu braun erfolgt beim Erhitzen bei oder nahe bei 170°C , gefolgt von einer Zersetzung von 209 bis 210°C unter Schäumen.

3. Elementaranalyse : C 35,69%, H 7,04%, N 11,80%.

4. Ultraviolett-Absorptionsspektrum : im Wellenlängenbereich von 220 nm bis 370 nm ist keine charakteristische Absorptionsspitze zu beobachten.

5. Infrarot-Absorptionsspektrum : das Hydrochlorid der Substanz SF-2052, in Kaliumbromid pelletiert, ergibt das in Fig. 1 der beiliegenden Zeichnungen dargestellte IR-Spektrum. Die wichtigsten Absorptionsspitzen werden bei 2900 bis 3500 , 1720 , 1640 , 1510 , 1120 und 1050cm^{-1} beobachtet.

6. Molekulargewicht : da die Substanz SF-2052 unter alkalischen pH-Bedingungen instabil ist, konnte die freie Base nicht in stabiler Form erhalten werden, und es war schwierig eine direkte Bestimmung des Molekulargewichtes mit Hilfe der Massenspektrometrie durchzuführen. Aus dem Kohlenstoff-Kernmagnetresonanzspektrum und einigen anderen Daten wurde geschätzt, dass die Substanz SF-2052 (freie Base) ein Molekulargewicht von etwa 400 bis 450 aufweist.

7. Löslichkeit : leicht löslich in Wasser, löslich in Methanol und

praktisch unlöslich in organischen Lösungsmitteln, wie Chloroform, Äthylacetat, Hexan, Benzol, Äthyläther usw.

8. Stabilität: verhältnismässig stabil unter sauren bis neutralen pH-Bedingungen, aber instabil unter alkalischen pH-Bedingungen.

9. Rf -Werte in Cellulose-Dünnschichtchromatographie:

a) $R_f = 0,46$, wenn mit n-Propanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser (Volumenverhältnis 15 : 10 : 3 : 12) entwickelt,

b) $R_f = 0,10$, wenn mit n-Butanol-Essigsäure-Wasser (Volumenverhältnis 2 : 1 : 1) entwickelt.

10. Rf -Werte in der Papierchromatographie (nach der ansteigenden Methode):

a) $R_f = 0,40$, wenn mit n-Propanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser (Volumenverhältnis 15 : 10 : 3 : 12) entwickelt,

b) $R_f = 0,09$, wenn mit n-Butanol-Essigsäure-Wasser (Volumenverhältnis 2 : 1 : 1) entwickelt.

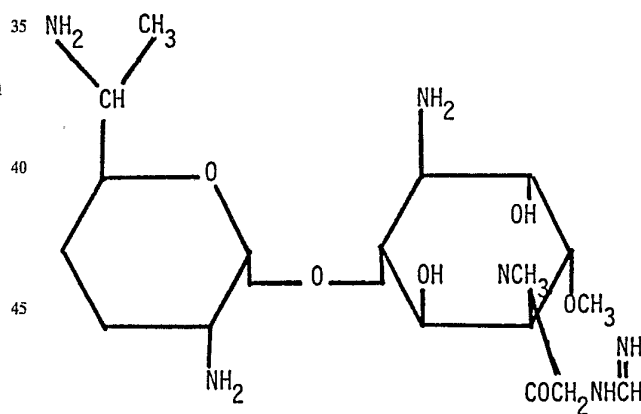
11. Farbreaktionen : positiv auf Ninhydrin, Greig-Leaback- und Lemieux-Reagenzien; negativ auf Sakaguchi- und Silbernitrat-Reagenzien.

12. Kernmagnetresonanzspektra : Wasserstoff-Kernmagnetresonanzspektrum des Hydrochlorides der Substanz SF-2052 in Deuterium-Wasser (100 MHz, TMS-äusserer Standard ist in Fig. 2 der beiliegenden Zeichnungen dargestellt. Die Hauptsignale wurden bei $1,34$ ppm (d), $2,00$ ppm (m), $3,16$ ppm (s),

$3,51$ ppm (s), $5,33$ ppm (d) und $7,99$ ppm (s) beobachtet. Das Kohlenstoff-Kernmagnetresonanzspektrum des Hydrochlorides der Substanz SF-2052 in Deuterium-Wasser (Dioxan - interner Standard) ist in Fig. 3 dargestellt.

13. Spezifische optische Drehung : $[\alpha]_D^{25} = +87^\circ$ (c = 1, H_2O).

Unter Berücksichtigung der oben erwähnten physikalischen chemischen Eigenschaften des Hydrochlorides der Substanz SF-2052 wird angenommen, dass die Substanz SF-2052 als freie Base durch die folgende Strukturformel dargestellt werden kann:



In den beiliegenden Zeichnungen stellt:

Fig. 1 eine Infrarot-Absorptionsspektrumskurve einer Probe des Hydrochlorides der Substanz SF-2052, pelletiert in Kaliumbromid,

Fig. 2 eine Kurve des Wasserstoff-Kernmagnetresonanz-Absorptionsspektrums einer Probe des Hydrochlorides der Substanz SF-2052 in Deuterium-Wasser bei 100 MHz, und

Fig. 3 eine Kurve des Kohlenstoff-Kernmagnetresonanz-Absorptionsspektrums einer Probe des Hydrochlorides der Substanz SF-2052 in Deuterium-Wasser bei 25 MHz dar.

Die antibakterielle Wirksamkeit der erfindungsgemässen Substanz SF-2052 (als Sulfat) zur Hemmung des Wachstums verschiedener Bakterien wurde nach einer Standard-Serienverdünnungsmethode geprüft unter Verwendung von Herzinfusions-

Agar als Inkubationsmedium. Die Inkubation erfolgte bei einer Temperatur von 37°C während 16 Stunden. Die minimalen hemmenden Konzentrationen (mcg/ml) des Sulfates der Substanz SF-2052 sind in der folgenden Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I

Antibakterielles Spektrum der Substanz SF-2052 (Sulfat)	
Test-Mikroorganismen	MIC. * (mcg/ml)
Bacillus subtilis PCI-219	1,56
Staphylococcus aureus 209P	3,12
Sarcina lutea	0,78
Escherichia coli	12,5
Escherichia coli B	6,25
Escherichia coli K-12-R	3,12
Klebsiella pneumonia	3,12
Proteus vulgaris	1,56
Pseudomonas aeruginosa	100
Mycobacterium smegmatis 607 Km-R	100
Mycobacterium smegmatis 607 Sm-R	1,56

* MIC = minimale inhibierende Konzentration.

Aus den Resultaten der obigen Tabelle I ist klar ersichtlich, dass die erfindungsgemässe Substanz SF-2052 eine hohe antibakterielle Wirksamkeit sowohl gegen gram-negative wie gegen gram-positive Bakterien aufweist.

Die Substanz SF-2052, welche die oben erwähnten chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften zeigt, ist mit keiner der bekannten Substanzen, wie sie in der Literatur des Standes der Technik erwähnt sind, identisch, und ist offensichtlich eine neue Substanz.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der Substanz SF-2052, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man

a) einen die Substanz SF-2052 erzeugenden Stamm von Actinomyceten, insbesondere einen Stamm von Dactylosporangium matsuzakiense SF-2052, in einem wässrigen flüssigen Kulturmedium, welches assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthält, unter aeroben Bedingungen während genügend langer Zeit züchtet, um die Substanz SF-2052 im Kulturmedium zu erzeugen und anzureichern, und

b) die Substanz SF-2052 aus der Kultur gewinnt.

Der die Substanz SF-2052 erzeugende Mikroorganismus, der Stamm Dactylosporangium matsuzakiense SF-2052, welcher mit Vorteil verwendet werden kann, wurde aus einer Bodenprobe isoliert, welche im Inagami-Schrein bei Matsuzaki-cho, Kamogun, Präfektur Shizuoka, Japan, im Februar 1977 gesammelt wurde. Die Isolierung des Stammes SF-2052 erfolgte durch Inkubierung einer wässrigen Suspension dieser Bodenprobe auf

einem isolierenden Kulturmedium, welches 0,2% lösliche Stärke, 0,04% Ammoniumsulfat, 0,02% Dikaliumphosphat, 0,02% Magnesiumsulfat, 0,04% Calciumcarbonat und 1,5% Agar enthält (pH nicht eingestellt) bei 28°C während 30 Tagen.

⁵ Dieser Stamm SF-2052 wurde in der öffentlichen japanischen Sammlung des «Fermentation Research Institute», Agency of Industrial Science and Industry, Inage, Chiba-City, Japan (welches nun umgezogen ist nach Yatabe-cho, Tsukuba-gun, Präfektur Ibaragi, Japan), unter der Nummer FERM - P 4670 deponiert, und wurde ferner am 26. September 1979 in der Sammlung des American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, unter der Nummer ATCC - 31570 hinterlegt.

¹⁰ Der Stamm SF-2052 weist die folgenden mikrobiologischen Eigenschaften auf. Die Beobachtungen erfolgten gemäss dem Verfahren von E. B. Shirling und D. Gottlieb, beschrieben im «International Journal of Systematic Bacteriology», 16, Seiten 313 bis 340 (1966).

I. Morphologische Beobachtungen

¹⁵ Die Substratmycelien sind sehr wellig mit reichlichen Verzweigungen gewachsen und weisen einen Durchmesser von 0,5 bis 0,6 Mikron auf. Sowohl auf Agar-Medium wie auf flüssigen Medien wurde üblicherweise keine Fragmentation des Substrat-Myceliums beobachtet.

²⁰ In den meisten Fällen wurden keine Luftmycelien beobachtet, und sie werden daher als nicht-gebildet betrachtet. Das Substrat-Mycelium des Stammes SF-2052 trägt Sporangien, einzeln oder in Büscheln, auf der Oberfläche des Agar-Mediums. Das Sporangium wird verhältnismässig reichlich auf Stärke-Agarmedium, jedoch schwach auf Glycerin-Asparagin-Agar-, Tyrosin-Agar- und Hafermehl-Agar-Medien gebildet. Das Sporangium ist von fingerartiger Form und weist eine Grösse von 0,9 bis 1,4 Mikron x 4,0 bis 6,0 Mikron auf. Jedes Sporangium enthält üblicherweise eine einzige Reihe von drei Sporen. Die meisten Sporen sind von zylindrischer oder ovaler Form, und die Oberflächenstruktur der Sporen ist glatt. Jede Spore weist eine Grösse von 0,8 bis 1,3 Mikron x 1,1 bis 1,6 Mikron auf. Wenn die Sporen z.B. in einem wässrigen Bodenextrakt suspendiert werden und während 15 bis 30 Minuten stehen gelassen werden, zeigen sie eine Bewegung.

II. Züchtungscharakteristiken auf verschiedenen Kulturmedien:

³⁵ Die Züchtungscharakteristiken des Stammes SF-2052 sind in der Tabelle II unten zusammengestellt. In dieser Tabelle beruhen die in Klammern angeführten Farbzeichnungen auf dem Standard der Color Harmony Manual of Container Corporation of America. Die Inkubation erfolgte bei 28°C und die Beobachtung nach einer Inkubationszeit von 21 Tagen.

Tabelle II

Kulturmedium	Wachstum und Farbe	Luft-Mycelium	lösliches Pigment
Saccharose-Nitrat-Agar	übliches Wachstum, bernsteinfarbig bis schwach orange [31c]	kein	kein
Glocose-Asparagin-Agar	übliches Wachstum, rötlich-orange [4pc]	kein	kein
Glycerin-Asparagin-Agar	schwaches dünnes Wachstum, schwach mellonengelb [3ea]	kein	kein
Stärke-Agar	übliches bis gutes Wachstum, rötlich-orange [4pc]	kein	kein

Kulturmedium	Wachstum und Farbe	Luft-Myce- lium	lösliches Pig- ment
Hafermehl-Agar	übliches Wachstum, orange [4lc bis 5nc]	kein	kein
Hefeextrakt-Malz- extrakt-Agar	übliches Wachstum, schrumpfig, bernsteinfarbig bis hellbraun [3lc bis 4ng]	kein	kein
Tyrosin-Agar	gutes Wachstum, schwach gräulich-orange bis hellbraun [4lc bis 4ng]	kein	bräunlich- rosa
Nähr-Agar	sehr schwaches Wachstum, schwach-orange	kein	kein
Bennet-Agar	übliches bis gutes Wachstum, rötlich-orange [4pc bis 5pc]	kein	kein
Calciummalat-Agar	schwaches bis übliches Wachstum, hellorange [3ga bis 4ga]	kein	kein

III. Physiologische Eigenschaften

1. Wachstumstemperaturbereich: Der Stamm SF-2052 wächst in einem Temperaturbereich von 15 bis 40°C auf einem Stärke-Agar-Medium. Die optimale Wachstumstemperatur liegt in einem Bereich von 25 bis 37°C.

2. Verflüssigung von Gelatine: Keine Verflüssigung tritt ein bei einer Inkubation bei 20°C während 21 Tagen.

3. Hydrolyse von Stärke: Positiv (bei einer Inkubation bei 28°C während 21 Tagen).

4. Reduktion von Nitrat: Negativ (bei einer Inkubation bei 28°C während 21 Tagen).

5. Koagulation von entrahmter Milch: Negativ (bei einer Inkubation bei 28°C während 21 Tagen).

6. Peptonisierung von entrahmter Milch: Negativ (bei einer Inkubation bei 28°C während 21 Tagen).

7. Bildung von Melanoidpigment: Negativ.

IV. Verwendung der Kohlenstoffquellen:

Die Untersuchung erfolgte mit einer Inkubation bei 28°C in einem Inkubationsmedium der folgenden Zusammensetzung:

Hefeextrakt (Difco)	5 g
Calciumcarbonat	1 g
Agar (Difco)	15 g
destilliertes Wasser	1000 ml.

Die Resultate der Untersuchung sind in der folgenden Tabelle III zusammengestellt.

Tabelle III

Kohlenstoffquelle	Wachstum
D-Glucose	+++
D-Xylose	+++
D-Fructose	++
L-Arabinose	+++

Kohlenstoffquelle	Wachstum
D-Mannit	+++
I-Ionosit	+
Rhamnose	+++
Saccharose	+++
Raffinose	+
kein Zusatz	+

40

V. Chemische Zusammensetzung der Zellwand:

Die chemische Zusammensetzung der Zellwand und der ganzen Zelle des Stammes SF-2052 wurde analysiert nach der Methode von T. Yamaguchi, J. Bact., 89, Seiten 444 bis 453 (1965); der Methode von B. Becker und Mitarbeiter, Appl. Microbiol., 12, Seiten 421 bis 423 (1964) oder der Methode von M. P. Lechevalier, J. Lab. Clin. Med., 71, Seiten 934 bis 944 (1968).

50

Aufgrund der derart erhaltenen analytischen Resultate wurde gefunden, dass der Stamm SF-2052 zum Zellwandtypus II gehört, weil seine Zellwand Hydroxydiamino-pimelinsäure und Glycin enthält. Ferner gehört sein Ganzzellenzuckermuster zum Typus A oder D, da das Hydrolysat der ganzen Zelle Xylose und Galactose zusammen mit einer Spur von Arabinose enthält.

In Anbetracht der oben erwähnten Eigenschaften des Stammes SF-2052 wird angenommen, dass der Stamm SF-2052 ein Stamm ist, welcher zur Gattung Dactylosporangium unter den Actinomycetalen gehört. Von den Arten der Gattung Dactylosporangium aurantiacum und Dactylosporangium thailandense (J. E. Thiemann und Mitarbeiter, Arch. Mikrobiol., 58, Seiten 42 bis 52 (1967) und »Bergey's Manual of Determinative Bacteriology«, 8. Ausgabe, 1974). Ein Vergleich des Stammes SF-2052 mit diesen bekannten Arten ist in der folgenden Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV

Eigenschaften	Stamm SF-2052	D. aurantiacum	D. thailandense
Wachstum auf Glucose-Asparagin-Agar-Medium	übliches Wachstum, rötlich-orange	übliches Wachstum, weiss	übliches Wachstum, hellorange
Bildung von Sporangium auf Calcium-malat-Agar-Medium	kein	reichlich	reichlich
Wachstum auf Nähr-Agar-Medium	sehr schwaches Wachstum, hellorange	sehr gutes Wachstum, weiss	gutes Wachstum, orange
Erzeugung von löslichem Pigment auf Hickey und Tresner-Agar-Medium	kein	kein	rötlich-braun
Wachstum auf Kartoffelstempel	kein Wachstum	sehr schwaches Wachstum, hellorange	sehr schwaches Wachstum, rötlich-braun
Verflüssigung von Gelatine	negativ	negativ	positiv
Reduktion von Nitrat	negativ	positiv	negativ
Peptonisierung von entrahmter Milch	negativ	positiv	positiv
Verwertung von Raffinose	nicht verwertet ³	verwertet ¹	gut verwertet ²

30

Anmerkung zu Tabelle IV:

*1: Auf dem Inkubationsmedium, welches von J. E. Thiemann in «Arch. Mikrobiol.», 58, Seiten 42 bis 52 (1967) beschrieben ist.

*2: Auf einem Inkubationsmedium wie unter *1, welches aber zusätzlich noch Vitamine enthält.

*3: Auf Hefeextrakt-Calciumcarbonat-Agar-Medium. Der Stamm SF-2052 wuchs nicht auf den Medien *1 und *2. Der Stamm SF-2052 ist mit keinem der bekannten Arten der Gattung *Dactylosporangium* übereinstimmend und der Stamm SF-2052 wird daher zurecht als neue Art angenommen und bezeichnet als *Dactylosporangium matsuzakiense* SF-2052.

Ausserdem gelang die Isolierung eines neuen Mikroorganismus aus einer, in Choshi-City, Präfektur Chiba, Japan, gesammelten Bodenprobe, und dieser neue Mikroorganismus wurde als Stamm SF-2098 bezeichnet. Dieser Stamm SF-2098 wurde als zu den Actinomycetales gehörend gefunden und zwar zur Art *Micromonospora*. Dieser Stamm SF-2098 wurde in der öffentlichen Sammlung des «Fermentation Research Institute», wie oben erwähnt, unter der Nummer FERM-P 5073 hinterlegt und ebenfalls in der American Type Culture Collection, unter der ATCC-No. 31580 am 16. Oktober 1979 eingetragen. Es wurde gefunden, dass dieser Stamm *Micromonospora* sp. SF-2098 die erfindungsgemässe Substanz SF-2052 erzeugt.

Eine weitere Ausführungsform des Verfahrens zur Herstellung der Substanz SF-2052 ist daher dadurch gekennzeichnet, dass man

a) einen Stamm von *Micromonospora* sp. SF-2098, identifiziert

als FERM-P 5073 oder ATCC No. 31580 in einem wässrigen flüssigen Kulturmedium, welches assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthält, unter aeroben Bedingungen während genügend langer Zeit züchtet, um die Substanz SF-2052 im Kulturmedium zu erzeugen und anzureichern, und b) die Substanz SF-2052 aus der Kultur gewinnt.

Der Stamm SF-2098 weist die folgenden mikrobiologischen Eigenschaften auf:

I. Morphologische Beobachtungen:

Dieser Stamm SF-2098 bildet kein Luftmycelium auf verschiedenen Agar-Kulturmedien, welche üblicherweise zur Inkubation von Actinomycetes-Stämmen verwendet werden. Die mikroskopische Untersuchung des Stammes SF-2098, welcher in einem flüssigen Kulturmedium inkubiert wurde, zeigt, dass Substratmycelium mit Ästen wächst, und dass jeweils eine Spore an verschiedenen Stellen des Substratmyceliums gebildet wird. Unter dem Elektronen-Mikroskop wurde beobachtet, dass die Spore annähernd kugelförmig ist und eine Grösse von 1,0 bis 1,3 Mikron im Durchmesser aufweist und die Sporenoberfläche stumpfe Dornen trägt.

II. Züchtungscharakteristiken auf verschiedenen Kulturmedien:

Die Kulturbedingungen des Stammes SF-2098, welcher auf verschiedenen Kulturmedien bei 28°C während 15 bis 20 Tagen inkubiert wurde, wurden beobachtet, und diese Beobachtungen sind in der folgenden Tabelle V zusammengestellt. Die Farban-gaben in Klammern basieren auf dem Standard des Color Harmony Manual of Container Corporation of America.

Tabelle V

Kulturmedium	Wachstum und Farbe	lösliches Pigment
Saccharose-Nitrat-Agar	übliches bis gutes Wachstum, erhöht, orange [4la bis 4na]	kein

Kulturmedium	Wachstum und Farbe	lösliches Pigment
Glucose-Asparagin-Agar	sehr schwaches Wachstum, farblos	kein
Glycerin-Asparagin-Agar	schwaches Wachstum, gelblich-braun [3ie] und später Umschlag auf olive bis grau [1½ ge]	kein
Stärke-Agar	übliches Wachstum, bernsteinfarbig [3lc] und später Übergang zu dunkeloliv [1½ pn]	kein
Hefeextrakt-Malzextrakt-Agar	übliches bis gutes Wachstum, hell oliv-grau [1½ li bis 1½ ig]	kein
Hafermehl-Agar	übliches Wachstum, bernsteinfarbig [3lc] und später Übergang zu oliv-grau [1½ ig]	kein
Tyrosin-Agar	schwaches Wachstum, bernsteinfarbig bis gelblich-braun [3lc bis 3ie]	kein
Nähr-Agar	schwaches Wachstum, schwach gelblich-braun [3gc]	kein
Bennet-Agar	übliches Wachstum, nass, bernsteinfarbig [3lc]	kein
Calciummalat-Agar	schwaches Wachstum, hell oliv-grau [1½ ge]	kein

III. Physiologische Eigenschaften:

1. Wachstumstemperaturbereich: Der Stamm SF-2098 wächst in einem Temperaturbereich von 15 bis 45°C.

2. Verflüssigung von Gelatine: Positiv (inkubiert bei 20°C während 21 Tagen)

3. Hydrolyse von Stärke: Positiv (inkubiert bei 28°C während 14 Tagen).

4. Wirkungen auf entrahmte Milch: Positiv auf Peptonisierung und Koagulation von entrahmter Milch (inkubiert bei 28°C während 21 Tagen).

5. Bildung von Melanoidpigment: Negativ.

6. Reduktion von Nitrat: Negativ (inkubiert bei 28°C während 14 Tagen).

7. NaCl-Toleranz (untersucht gemäss der Methode aus «Intern. J. Syst. Bacteriol.», 21, Seite 240 (1971)): Gutes Wachstum bei 0 bis 1,5%, schwaches Wachstum bei 3 bis 4%, kein Wachstum bei über 5%.

IV. Auswertung von Kohlenstoffquellen:

Die Untersuchung erfolgte unter Inkubation bei 28°C in einem Inkubationsmedium der folgenden Zusammensetzung:

Hefeextrakt (Difco)	0,5 %
Calciumcarbonat	0,1 %
Bacto-Agar (Difco)	1,5 %
destilliertes Wasser	Rest.

Die Resultate der Untersuchung sind in der folgenden Tabelle VI zusammengestellt.

Tabelle VI

Kohlenstoffquelle	Wachstum
Kein Zusatz	+
D-Glucose	+++
D-Fructose	++
D-Xylose	+++

³⁰ Kohlenstoffquelle	Wachstum
Glycerin	+
L-Arabinose	+
D-Mannit	+
³⁵ I-Innosit	+
Saccharose	+++
α-Melibiose	+
Raffinose	+
Rhamnose	+

⁴⁰

V. Chemische Zusammensetzung der Zellwand

Die chemische Zusammensetzung der Zellwand des Stammes SF-2098 wurde analysiert nach der Methode von B. Becker und ⁴⁵ Mitarbeiter, beschrieben in «Appl. Microbiol.», 13, Seite 236 (1965). Aus den derart erhaltenen analytischen Resultaten wurde gefunden, dass die Zellwand Hydroxydiamino-pimelinsäure enthält.

Aufgrund der oben genannten Eigenschaften des Stammes ⁵⁰ SF-2098 hat insbesondere unter Berücksichtigung, dass der Stamm SF-2098 kein Luftmycelium auf Agarmedien bildet, dass der Stamm SF-2098 ein mesophiles Actinomycetes ist, welcher ⁴⁵ einzelne Sporen auf dem Substrat-Mycelium zeigt, und dass die Zellwand Hydroxydiamino-pimelinsäure enthält, wurde ⁵⁵ geschlossen, dass der Stamm SF-2098 der Gattung Micromonospora zugehört. Entsprechend wurde der Stamm SF-2098 als Micromonospora sp. SF-2098 bezeichnet.

Der die Substanz SF-2052 erzeugende Stamm, insbesondere der Stamm Dactylosporidium matsuzakiense SF-2052 oder der ⁶⁰ Stamm Micromonospora sp. SF-2098 kann für den vorliegenden Gebrauch in bekannter Weise in einem Kulturmedium gezüchtet werden, welches Nährstoffquellen enthält, die durch übliche Mikroorganismen assimilierbar sind. Zu diesem Zweck können alle bekannten Nährstoffe, welche üblicherweise für die Züchtung von bekannten Stämmen der Actinomyceten verwendet ⁶⁵ wurden, eingesetzt werden. Beispiele der Nährmittelquellen umfassen Glucose, Glycerin, Saccharose, Stärke, Dextrin, Maltosesirup, Melassen und Soyabohnenöl als Kohlenstoffquelle sowie

Soyabohnenmehl, Weizenembryonen, Fleischextrakt, Pepton, Hefeextrakt getrockneter Hefe, Maiseinweichflüssigkeit, Baumwollsamenehl, Ammoniumsulfat und Natriumnitrat als Stickstoffquelle. Falls erforderlich können anorganische Salze, wie Calciumcarbonat, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Kalbaltchlorid, Phosphate und dergleichen zugesetzt werden. Ferner können organische oder anorganische Materialien, welche das Wachstum des verwendeten Stammes SF-2052 oder SF-2098 begünstigen und die Erzeugung der Substanz SF-2052 fördern, in das Kulturmedium einverleibt werden.

Als Züchtungsmethoden, welche hierbei angewandt werden können, werden die flüssige Züchtung und insbesondere die flüssige Züchtung unter submersen Bedingungen, im allgemeinen am meisten bevorzugt, wie dies bei der Herstellung bekannter Antibiotika auch zutrifft. Im vorliegenden Verfahren wird die Züchtung unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Der Stamm SF-2052 kann mit Vorteil bei einer Temperatur von 25 bis 37°C und insbesondere bei einer Temperatur von 28 bis 32°C inkubiert werden. Unter diesen Bedingungen erreicht die Erzeugung der Substanz SF-2052 in der Kulturbrühe ein Maximum am Ende von 2 bis 10 Tagen Inkubation entweder in einer Schüttelkultur oder in einer Tankkultur. Der Stamm SF-2098 kann mit Vorteil bei einer Temperatur von 25 bis 40°C und üblicherweise bei einer Temperatur in der Nähe von 30°C inkubiert werden. Das Inkubationsmedium wird vorzugsweise bei einem neutralen oder schwach alkalischen pH-Wert gehalten. Wenn der Stamm SF-2098 in einer Flüssigzüchtungsmethode inkubiert wird, erreicht die Erzeugung und Anreicherung der Substanz SF-2052 in der Kulturbrühe üblicherweise ein Maximum in 3 bis 10 Tagen Inkubation.

Zur Prüfung der erfindungsgemäss hergestellten Substanz SF-2052 kann die folgende Methode angewandt werden: Es wird ein Untersuchungs-Kulturmedium verwendet, welches 0,5 % Polypepton, 0,3 % Rindfleischextrakt und 1,5 % Agar (pH 7,0) enthält, verwendet, und der Bacillus subtilis PCI-219 wird als Testmikroorganismus verwendet. In dieser Methode kann bei einer Konzentration von 50 mcg/ml bis 10 mcg/ml der Substanz SF-2052 das Verhältnis zwischen dem Logarithmus der Konzentration und dem Durchmesser der Inhibitionszone linear aufgezeichnet werden, wobei die Inhibitionszone von 21,2 bis 12,8 mm erhalten wird, wie sie durch übliche Papierscheibenplattenverfahren bestimmt wird.

Die erfindungsgemässe Substanz SF-2052 ist ein wasserlösliches basisches Antibiotikum. Wenn sie durch Züchtung des Stammes SF-2052 oder SF-2098 erhalten wird, ist sie hauptsächlich in der flüssigen Phase der Kulturbrühe enthalten und kann aus der Kultur durch Verwertung der physico-chemischen Eigenschaften der Substanz SF-2052 gewonnen werden. Die Gewinnung und Reinigung der Substanz SF-2052 kann nach chromatographischen Verfahren unter Verwendung eines synthetischen adsorbierenden Harzes, wie z.B. «Amberlite» XAD-2 (ein synthetisches Adsorptionsharz, bestehend aus einem mikroporösen Copolymer von Styrol und Divinylbenzol, ein Produkt der Rohm & Haas Co., USA) und «Diaion» HP-20 (ein synthetisches Adsorptionsharz bestehend aus einem mikroporösen Copolymer aus Styrol und Divinylbenzol, ein Produkt der Mitsubishi Kasei Co., Japan) oder eines Gelfiltrationsmittels, wie «Sephadex» G-10 (ein Gelfiltrationsmittel bestehend aus mit Epichlorhydrin vernetztem Dextran, ein Produkt der Pharmacia Co., Schweden) und «Sephadex» LH-20 (ein Gel bestehend aus einem Derivat von Dextransulfat, ein Produkt von Pharmacia Co., Schweden), oder eines Kationenaustauscherharzes, wie «Amberlite» IRC-50 oder «Amberlite» CG-50 (ein schwach saures Kationenaustauscherharz, bestehend aus einem Copolymer von Methacrylsäure und Divinylbenzol, ein Produkt von Rohm & Haas Co., USA) und «CM-Sephadex» (ein Gelfiltrationsmittel, hergestellt aus einem carboxymethylsubstituierten vernetzten Dextrangel, ein Produkt von Pharmacia Co., Schweden) erfolgen. Das folgende

Verfahren ist wirksam zur Gewinnung der Substanz SF-2052 aus der Kulturbrühe. So wird die Kulturbrühe, welche die Substanz SF-2052 enthält, von den festen Bestandteilen durch Filtrieren oder Zentrifugieren befreit, und das erhaltene Brühenfiltrat wird mit «Diaion» HP-20-Harz (ein synthetisches Adsorptionsharz, ein Produkt der Mitsubishi Kasei Co., Japan) zur Adsorption der aktiven Substanz behandelt, und die aktive Substanz sodann aus dem Harz eluiert durch Entwickeln mit 50 %igem wässrigem Aceton (Wasser-Aceton-Gemisch, Volumenverhältnis 1:1), (pH nicht eingestellt) und 50 %igem wässrigem Aceton (pH 2,0 eingestellt mit Salzsäure) als Eluierungsmittel entwickelt und das erhaltene Eluat unter vermindertem Druck konzentriert, wobei das Hydrochlorid der Substanz SF-2052 als rohes pulverförmiges Produkt erhalten wird.

Dieses rohe Produkt wird sodann mit Hilfe einer Säulenchromatographie unter Verwendung von «CM-Sephadex» (H⁺-Form), «CM-Sephadex» (Na⁺-Form) und/oder Aktivkohle in solcher Kombination, dass ein hochgereinigtes Produkt der Substanz SF-2052 als Hydrochlorid erhalten wird, gereinigt. Da die Substanz SF-2052 als freie Base sehr instabil ist unter alkalischen Bedingungen, ist es schwierig, ein reines Produkt dieser Substanz als freie Base zu erhalten. Es ist daher wichtig, die Gewinnung und Reinigung der Substanz SF-2052 immer unter neutralen oder sauren Bedingungen durchzuführen, und es wird empfohlen, eine schwach saure wässrige Lösung der Substanz SF-2052 in einer Schlussstufe der Gewinnung und Isolierung gefrierzutrocknen, um die Substanz SF-2052 in Form ihres Hydrochlorides oder Sulfates als farbloses amorphes Pulver zu erhalten.

Wenn die Substanz SF-2052 aus der Kulturbrühe des Stammes SF-2052 gewonnen werden soll, ist es zweckmässig und wirksam, die Kulturbrühe zuerst durch Zusatz von Salzsäure auf pH 2,0 einzustellen, die Kulturbrühe sodann mit Hilfe einer Filterhilfe, wie z. B. Diatomeenerde, zu filtrieren, um den Myceliumkuchen und alle anderen festen Bestandteile aus der Kulturbrühe zu entfernen und das Brühenfiltrat sodann durch eine Säule von «Amberlite» IRC-50 (Na⁺-Form) zu filtrieren zwecks Adsorption der aktiven Substanz, gefolgt von der Eluierung der Harzsäure mit 0,4 N Salzsäure. Das erhaltene Eluat wird mit wässrigem Natriumhydroxid neutralisiert und anschliessend mit Aktivkohle entsalzt. Die derart entsalzte Lösung wird weiter durch Säulenchromatographie unter Verwendung von «CM-Sephadex», Aktivkohle und/oder «Sephadex» LH-20 gereinigt, um ein hochgereinigtes Produkt des Hydrochlorides der Substanz SF-2052 zu erhalten.

Zur Bestimmung der akuten Toxizität des Sulfates der Substanz SF-2052 wurde dieses intravenös als Lösung in isotonischer wässriger Lösung von Natriumchlorid verschiedenen Gruppen von Mäusen injiziert. Es wurde geschätzt, dass die Substanz SF-2052 als Sulfat einen LD₅₀-Wert von 350 mg/kg bei intravenöser Injektion an Mäusen aufweist und somit praktisch nicht toxisch ist. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine antibakterielle Zusammensetzung, welche als aktiven Bestandteil eine antibakteriell wirksame Menge von mindestens einem der pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalze der Substanz SF-2052 zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren flüssigen oder festen Träger enthält. Der Gehalt an diesem aktiven Bestandteil in der antibakteriellen Zusammensetzung kann im Bereich von 5 bis 50 Gewichtsprozent der Zusammensetzung liegen.

Die erfindungsgemässe antibakterielle Zusammensetzung kann zu einer wässrigen Lösung, welche 0,01 bis 0,1 Gewichtsprozent des Säureadditionssalzes der Substanz SF-2052 enthält, verarbeitet werden, welche nützlich ist zum Sterilisieren von chirurgischem Material und Instrumenten sowie anderen Apparaten und Stellen, welche steril gehalten werden sollen. Ausserdem kann die erfindungsgemässe antibakterielle Zusammensetzung zu üblichen oral verabreichbaren Formen, wie Tabletten,

Kapseln, Pulver, Lösungen und Suspensionen verarbeitet werden, entweder durch Vermischen einer gewissen Menge des pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalzes der Substanz SF-2052 der vorliegenden Erfindung mit einem üblichen pharmazeutisch annehmbaren festen Träger, wie Stärke, Saccharose, Talk und Calciumcarbonat, oder durch Auflösen oder Suspendieren dieses Salzes in einem pharmazeutisch annehmbaren flüssigen Träger, wie z. B. Äthanol oder Wasser. Das Verhältnis der aktiven Substanz gemäss der vorliegenden Erfindung zum festen oder flüssigen Träger kann je nach der Form des oral verabreichbaren Präparates gewählt werden und liegt üblicherweise in einem Gewichtsverhältnis von 1:1 bis 1:100.

Die antibakterielle Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung kann auch zu injizierbaren Lösungen oder Suspensionen verarbeitet werden und durch Auflösen oder Suspendieren der aktiven Substanz in einer entsprechenden Konzentration zwischen 0,1 bis 10 Gewichtsprozent in eine physiologische Kochsalzlösung oder ein anderes pharmazeutisch annehmbares flüssiges Vehikel, wie z. B. Ringer-Lösung, mit oder ohne Zusatz eines geeigneten Dispersiermittels. Die derart erhaltene injizierbare Lösung oder Suspension kann z. B. intravenös, intramuskulär oder intraperitoneal injiziert werden.

Es ist zu beachten, dass die tatsächlich verwendete bevorzugte Dosis an aktiver Substanz der vorliegenden Erfindung variieren kann, je nach der jeweiligen Zusammensetzung des Präparates, der Art der Verabreichung und der jeweils zu behandelnden Krankheit. Zahlreiche Faktoren, welche die Wirkung des Heilmittels der vorliegenden Erfindung modifizieren, werden vom Fachmann in Betracht gezogen, z. B. das Alter, des Körpergewicht, das Geschlecht, die Diät, die Verabreichungszeit, der Verabreichungsweg, die Geschwindigkeit der Ausscheidung, Arzneimittelkombinationen, Reaktionsempfindlichkeiten und schwere Erkrankung. Im allgemeinen werden etwa 0,5 mg/kg bis etwa 100 mg/kg der aktiven Verbindung pro Tag an erwachsene Personen verabreicht. Optimale Dosen für den jeweiligen Zustand eines Patienten können durch die Fachleute sichergestellt werden unter Verwendung üblicher Dosierungsbestimmungstests unter Berücksichtigung der obigen Richtlinien und der bereits vorhandenen Erfahrungen, wie sie durch die Bestimmung geeigneter Dosierungen für zuvor bekannte antibakterielle Mittel erhalten wurden.

Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele näher beschrieben.

Beispiel 1

1. Inkubation des Stammes SF-2052

Es wurde eine Stammkultur von *Dactylosporangium matsuzakiense* SF-2052 (identifiziert als FERM-P 4670 oder ATCC No. 31570), und ein sterilisiertes Impfkulturmedium, welches 2,0 % Glucose, 0,5 % Pepton, 0,2 % Fleischextrakt, 0,3 % Hefeextrakt, 0,2 % Soyabohnenmehl und 0,1 % Calciumcarbonat enthielt (pH 7,0 vor der Sterilisierung) wurde für die Inkubation verwendet.

Fünf bis sechs Ösen voll der oben genannten Stammkultur wurden in 20 ml des oben genannten Impfkulturmediums in einem 100 ml-Erlenmeyer-Kolben geimpft, gefolgt von der Inkubation bei 28°C während 6 Tagen, um eine erste Impfkultur zu ergeben. Die Herstellung dieser ersten Impfkultur erfolgte in zehn Kolben. Total 200 ml der ersten Impfkultur wurde in 20 ml-Portionen in zehn Erlenmeyer-Kolben von 500 ml Fassungsvermögen einverleibt, von denen jedes 80 ml des oben genannten Impfkulturmediums enthielt, gefolgt von der Inkubation bei 28°C während 72 Stunden.

Auf diese Weise wurde die zweite Impfkultur erhalten, und diese wurde weiter in 5 ml-Portionen in hundertfünfzig Erlenmeyer-Kolben von 500 ml Fassungsvermögen, von denen jeder 80 ml eines Produktionskulturmediums enthielt, inokuliert. Das verwendete Produktionskulturmedium enthielt 4,0 % Glucose,

1,0 % Pepton, 0,4 % Fleischextrakt, 0,6 % Hefeextrakt, 0,4 % Soyabohnenmehl und 0,2 % Calciumcarbonat, d.h. es enthielt jede Nährstoffkomponente in doppelter Menge im Vergleich zu derjenigen in den oben genannten Impfkulturmedien. Die Züchtung erfolgte bei 28°C während 6 Tagen nach einer üblichen Schüttelkulturmethode.

Nach der Züchtung wurde die Kulturbrühe einer kontinuierlichen Zentrifugierung unter Verwendung eines Gefrierzentrifugators (hergestellt von Tommy Company, Japan) unterworfen, wobei 10 Liter Brühenfiltrat in etwa 2 Stunden Zentrifugierarbeit erhalten wurden.

2. Gewinnung der Substanz SF-2052

Das oben erhaltene Brühenfiltrat (10 Liter) wurde durch eine Säule von 750 ml «Diaion» PH-20 (ein synthetisches Adsorptionsharz, hergestellt von Mitsubishi Kasei Co., Japan) zur Adsorption der aktiven Substanz hindurchgeführt. Die Harzsäule wurde mit 3 Liter Wasser gefolgt und anschliessend mit 1,8 Liter 50 %iges Aceton (pH nicht eingestellt) und anschliessend mit 1,8 Liter 50 %igem wässrigem Aceton (pH 2,0, eingestellt mit HCl) eluiert. Auf diese Weise wurde die Substanz SF-2052 aus der Harzkolonie eluiert. Das Eluat wurde in 1,8 Liter-Fractionen gesammelt.

Die aktiven Fractionen (total 3,6 Liter), welche die Substanz SF-2052 enthielten, wurden unter vermindertem Druck auf ein kleineres Volumen konzentriert durch Abdestillieren des Acetons. Das erhaltene Konzentrat wurde stehen gelassen und später filtriert, um den ausgeschiedenen Niederschlag zu entfernen. Das Filtrat wurde sodann durch eine Säule aus 300 ml «CM-Sephadex» C-25 (H⁺-Form) (ein Gelfilterhilfsmittel, hergestellt von Pharmacia Co., Schweden) zur Adsorption der aktiven Substanz hindurchgeleitet.

Die «CM-Sephadex»-Säule wurde mit 1,0 Liter 0,1 M wässrigem Natriumchlorid, mit 1,0 Liter 0,2 M wässrigem Natriumchlorid und schliesslich mit 3 Liter 0,4 M wässrigem Natriumchlorid gewaschen, gefolgt von der Eluierung mit 0,6 M wässrigem Natriumchlorid. Das Eluat wurde in 18 ml-Fractionen gesammelt, und die aktive Substanz wurde in den Fractionen No. 26 bis 92 eluiert.

Die aktiven Fractionen wurden durch eine Säule aus 200 ml Chromatographie-Aktivkohle (ein Produkt von Wako Junyaku Co., Japan) geleitet zur Adsorption der aktiven Substanz, und die Kohlsäule wurde sodann mit 900 ml Wasser gewaschen und anschliessend mit 1,2 Liter 50 %igem wässrigem Aceton (pH nicht eingestellt) und dann mit 600 ml 50 %igem wässrigem Aceton (pH 2,0 eingestellt mit HCl) eluiert. Das Eluat wurde in 1800 ml-Fractionen gesammelt und die aktive Fraction (total 1,8 Liter) wurden vereint und die vereinte Lösung unter vermindertem Druck konzentriert. Die konzentrierte Lösung wurde gefriergetrocknet und ergab 170 mg eines rohen, weissgefärbten pulverigen Produktes (Reinheit ca. 20 %) der Substanz SF-2052 als Hydrochlorid.

3. Reinigung

Das rohe Produktpulver (170 mg) der Substanz SF-2052 (HCl), welches im obigen Verfahren (2) von Beispiel 1 erhalten worden war, wurde in 5 ml Wasser aufgenommen und die erhaltene wässrige Lösung wurde durch eine Säule aus 180 ml «CM-Sephadex» C-25 (Na⁺-Form) geführt, welche zuvor mit 0,1 M wässrigem Natriumchlorid imprägniert worden war. Diese «CM-Sephadex»-Säule wurde mit 2 Liter 0,5 M wässrigem Natriumchlorid eluiert, gefolgt von der Entwicklung mit 1,0 M wässrigem Natriumchlorid. Der Ausschluss wurde in 18 ml-Fractionen gesammelt, und die aktiven Fractionen No. 8 bis 20, welche die eluierte Substanz SF-2052 enthielten, wurden vereint.

Die aktiven Fractionen (total 220 ml) wurden durch eine Säule aus 40 ml Chromatographie-Aktivkohle zwecks Adsorption der aktiven Substanz geleitet. Die Kohlsäule wurde sodann mit 250 ml Wasser gewaschen, gefolgt von Eluierung mit 200 ml

50 %igem wässrigem Aceton (pH nicht eingestellt) und dann mit 200 ml 50 %igem wässrigem Aceton (pH 2,0) um die aktive Substanz aus der Säule zu eluieren. Das Eluat wurde in 400-ml-Fractionen gesammelt und die aktive Fraktion (total 400 ml) wurde unter vermindertem Druck konzentriert. Die konzentrierte Lösung wurde gefriergetrocknet, und ergab 26 mg des Hydrochlorides der Substanz SF-2052 als farbloses Pulver, welches rein war.

4. Bildung des Sulfates der Substanz SF-2052

Das farblose Pulver (26 mg) des reinen Hydrochlorides der Substanz SF-2052, erhalten in der obigen Stufe (3) wurde in 10 ml Wasser aufgenommen und die erhaltene Lösung durch eine Säule von 10 ml eines stark basischen Anionenaustauscherharzes, nämlich «Amberlite» IRA-400 (Sulfatform) (ein Produkt von Rohm & Haas Co., USA) geführt. Der Ausfluss aus der Harzsäule wurde konzentriert und gefriergetrocknet und ergab 30 mg des Sulfates der Substanz SF-2052 als farbloses Pulver. Dieses Produkt zeigte einen Zersetzungspunkt oberhalb 220°C.

Beispiel 2

Das aus der Kultivationsstufe (1) von Beispiel 1 erhaltene Brühenfiltrat (10 Liter) wurde durch eine Säule aus 800 ml eines synthetischen adsorbierenden Harzes, «Diaion» HP-20 (ein Produkt von Mitsubishi Kasei Co., Japan) zwecks Adsorption der aktiven Substanz geführt. Die Harzsäule wurde mit 4 Liter Wasser gewaschen und anschliessend mit 50 %igem wässrigem Aceton (pH 4,0) eluiert, wobei das Eluat in 500-ml-Fractionen gesammelt wurde. Die Fractionen No. 2 bis 6 enthielten die eluierte aktive Substanz und diese aktive Fractionen wurden vereint und unter vermindertem Druck konzentriert, um das Aceton abzudestillieren.

Die konzentrierte Lösung wurde stehen gelassen und anschliessend filtriert, um den ausgeschiedenen Niederschlag zu entfernen. Das Filtrat wurde durch eine Säule aus 250 ml eines Kationenaustauscherharzes «Amberlite» IRC-50 (Na⁺-Form) (ein Produkt von Rohm & Haas Co., USA). Die Harzsäule wurde anschliessend mit 2 Liter Wasser gewaschen und mit 0,1 N Salzsäure eluiert. Das Eluat wurde in 18-ml-Fractionen gesammelt, und die aktive Substanz wurde in den Fractionen No. 240 bis 336 eluiert. Diese aktiven Fractionen wurden vereint und durch eine Säule von 150 ml eines Anionenaustauscherharzes, «Amberlite» IR-45 (OH⁻-Form) zur Neutralisation geführt.

Die Lösung (pH 5,4), welche aus der Säule ausfloss, wurde in eine Säule aus 80 ml Chromatographie-Aktivkohle zwecks Adsorption der aktiven Substanz verbracht und die Kohlsäule wurde sodann mit 400 ml Wasser gewaschen und anschliessend mit 300 ml 50 %igem wässrigem Aceton (pH nicht eingestellt) und dann mit 300 ml 50 %igem wässrigem Aceton (pH 2,4, eingestellt mit HCl) eluiert, um die aktive Substanz aus der Harzsäule zu desorbieren.

Die derart erhaltene vereinte aktive Lösung (total 600 ml) wurde unter vermindertem Druck konzentriert und gefriergetrocknet, um 260 mg des Hydrochlorides der Substanz SF-2052 als schwach gelblich gefärbtes rohes Pulver (Reinheit: 16 %) zu erhalten.

Beispiel 3

1. Inkubation des Stammes SF-2052

Eine Stamm-Kultur des Micromonospora sp SF-2098 (identifiziert als FERM-P 5073 oder ATCC No. 31580) wurde verwendet, und ein sterilisiertes Impfkulturmedium, welches 2,0 % Glucose, 0,5 % Pepton, 0,2 % Fleischextrakt, 0,3 % Hefeextrakt, 0,2 % Soyabohnenmehl und 0,1 % Kaliumcarbonat enthielt (pH nicht vor der Sterilisation eingestellt) wurde für die Inkubation verwendet.

Drei bis vier Oesen voll der oben genannten Stamm-Kultur wurden in 20 ml des genannten Impfkulturmediums in einem Erlenmeyer-Kolben von 100 ml Fassungsvermögen eingimpft, gefolgt von der Inkubation bei 28°C während 4 Tagen, um eine Impfkultur zu erhalten. Die Herstellung der Impfkultur erfolgte in zwanzig Kolben.

Die derart erhaltene Impfkultur (total 400 ml) wurde in 4-ml-Portionen in hundert Erlenmeyer-Kolben von 500 ml Fassungsvermögen gegeben, von denen jeder 80 ml eines Produktionskulturmediums enthielt, welches sterilisiert war. Dieses Produktionskulturmedium enthielt 4 % Maltosesirup, 0,3 % Soyabohnenöl, 0,5 % lösliches pflanzliches Protein, 1,0 % Baumwollsaamenmehl, 0,001 % Ferrosulfat, 0,0001 % Kobaltchlorid und 0,2 % Calciumcarbonat (pH 7,0 vor der Sterilisation). Die Inkubation erfolgte bei 28°C während 2 Tagen nach einer üblichen Schüttelkulturmethode.

Nach der Inkubation wurde die Kulturbrühe durch Zusatz von 6 N Salzsäure auf pH 2,0 eingestellt und anschliessend mit Diatomeenerde als Filterhilfe filtriert, wobei etwa 7,0 Liter des Brühenfiltrates erhalten wurden.

2. Gewinnung der Substanz SF-2052

Das in der obigen Stufe (1) erhaltene Brühenfiltrat (7 Liter) wurde durch eine Säule aus 220 ml eines Kationenaustauscherharzes, «Amberlite» IRC-50 (Na⁺-Form) (ein Produkt von Rohm & Haas Co., USA) zwecks Adsorption der aktiven Substanz geleitet.

Die Harzsäule wurde mit 1 Liter Wasser gewaschen und anschliessend mit 0,4 N Salzsäure eluiert. Das Eluat wurde in 250-ml-Fractionen gesammelt und die aktive Substanz wurde in den Fractionen No. 2 bis 5 eluiert. Diese aktiven Fractionen wurden vereint und durch Zusatz von 0,2 N wässrigem Natriumhydroxid auf pH 4 bis 6 eingestellt, und anschliessend durch eine Säule aus 150 ml Aktivkohle zwecks Adsorption der aktiven Substanz geführt. Die Kohlsäule wurde mit 500 ml Wasser gewaschen und anschliessend mit 400 ml 50 %igem wässrigem Aceton (pH nicht eingestellt) und dann mit 400 ml 50 %igem wässrigem Aceton (pH 2,2) eluiert, um die aktive Substanz aus der Kohlsäule zu desorbieren. Die aktiven Fractionen des Eluates wurden vereint (total 800 ml) und unter vermindertem Druck konzentriert durch Abdestillieren des Acetons.

Die derart erhaltene konzentrierte Lösung wurde durch eine Säule aus 200 ml «CM-Sephadex» C-25 (ein Produkt von Pharmacia Co., Schweden) geleitet zur Adsorption der aktiven Substanz.

Die «CM-Sephadex»-Säule wurde mit 1 Liter 0,3 M wässrigem Natriumchlorid und anschliessend mit 1 Liter 0,5 M wässrigem Natriumchlorid gewaschen, gefolgt von der Eluierung mit 0,5 M wässrigem Natriumchlorid. Das Eluat wurde in 20-ml-Fractionen gesammelt und die aktiven Fractionen No. 102 bis 172, welche die eluierte Substanz SF-2052 enthielten, wurden vereint. Die aktive Lösung wurde sodann durch eine Säule von 50 ml Chromatographie-Aktivkohle (ein Produkt der Wako-Junyaku Co., Japan) geleitet zwecks Adsorption der aktiven Substanz. Diese Kohlsäule wurde mit 200 ml Wasser gewaschen und anschliessend mit 200 ml 50 %igem wässrigem Aceton (pH nicht eingestellt) und dann mit 200 ml 50 %igem wässrigem Aceton (pH 2,0 eingestellt mit HCl) eluiert, wobei die aktive Substanz in guter Ausbeute eluiert wurde.

Die vereinten aktiven Fractionen (total 800 ml) wurden unter vermindertem Druck konzentriert und gefriergetrocknet, wobei 124 mg eines rohen, weissgefärbten Pulvers (Reinheit: 20 %) des Hydrochlorides der Substanz SF-2052 erhalten wurden.

Von diesem rohen Pulver wurden 120 mg in 4 ml 50 %igem wässrigem Methanol (d.h. Wasser-Methanol im Volumenverhältnis 1:1) aufgenommen und die erhaltene Lösung durch eine Säule aus 380 ml «Sephadex» LH-20 (ein Produkt von Pharmacia Co., Schweden) geführt, welche zuvor mit 90 %igem wässrigem Methanol (d.h. Wasser-Methanol im Volumenverhältnis 1:9) gut gewaschen worden war. Diese Säule wurde mit 90 %igem wässe-

rigem Methanol entwickelt und das Eluat wurde in 12 ml-Fractionen gesammelt. Die aktive Substanz wurde in den Fraktionen No. 12 bis 16 eluiert. Die vereinten aktiven Fraktionen (total 60 ml) wurden unter vermindertem Druck konzentriert und 5 gefriergetrocknet, wobei 20 mg des Hydrochlorides der Substanz SF-2052 als farbloses und pulveriges reines Produkt erhalten wurden.

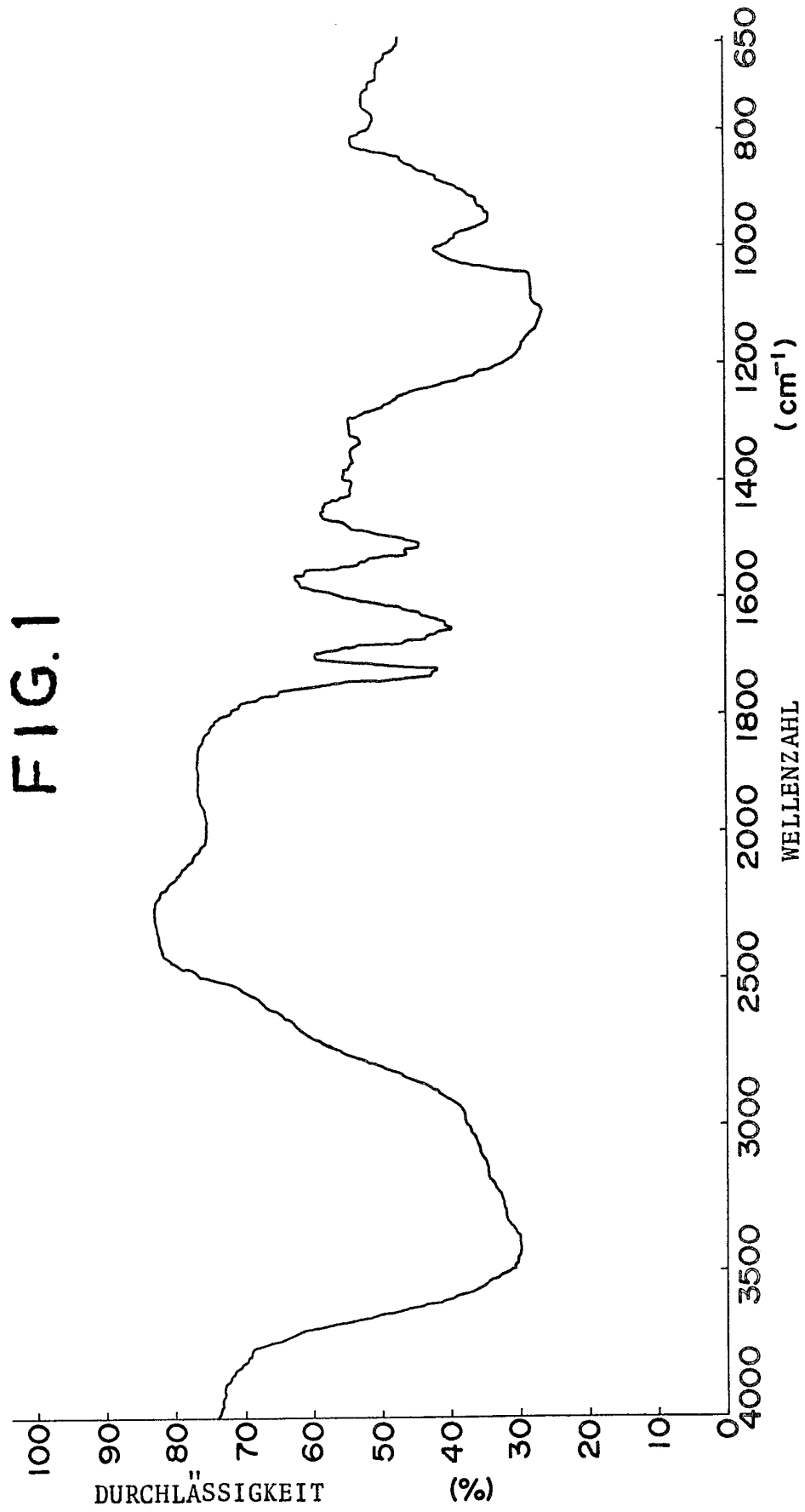


FIG.2

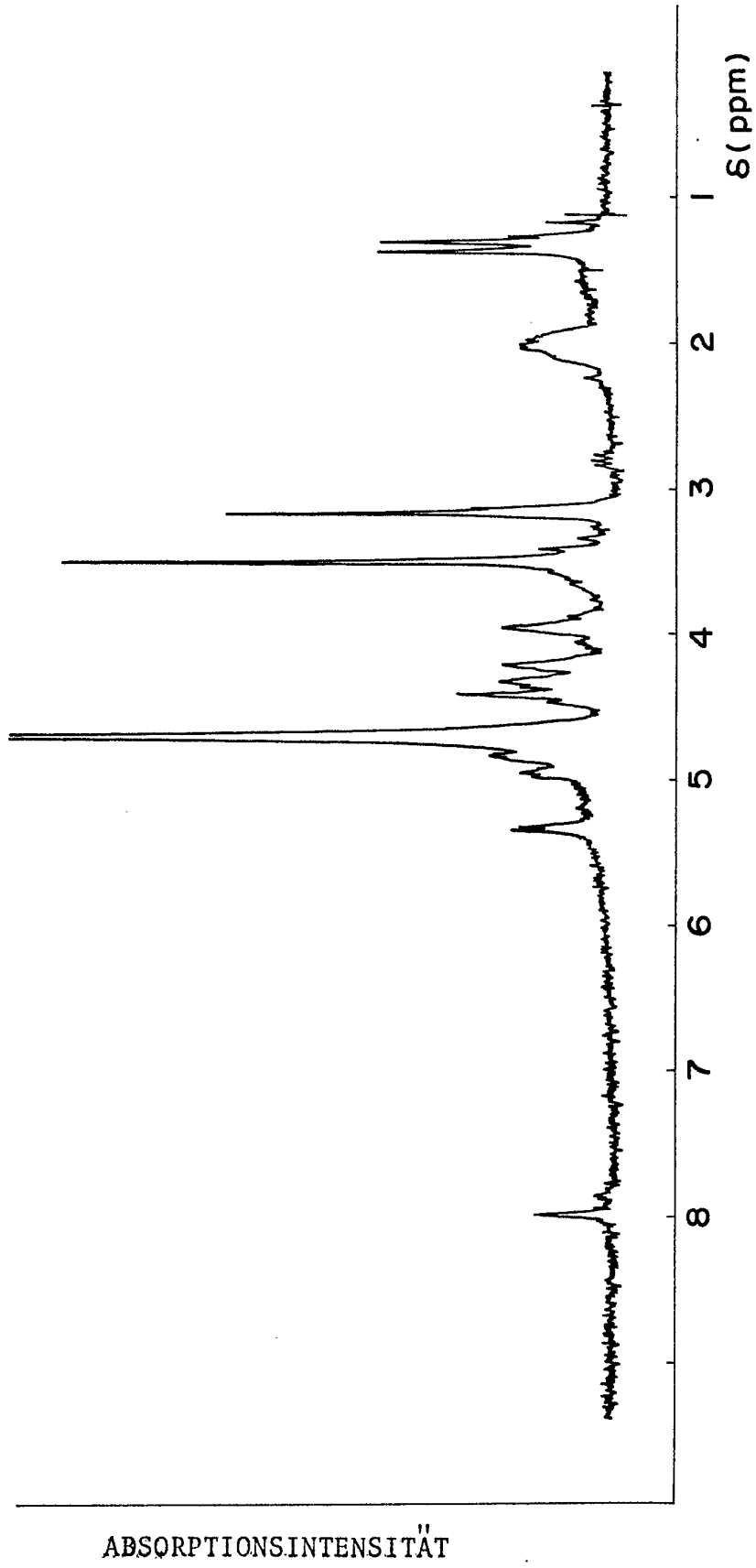
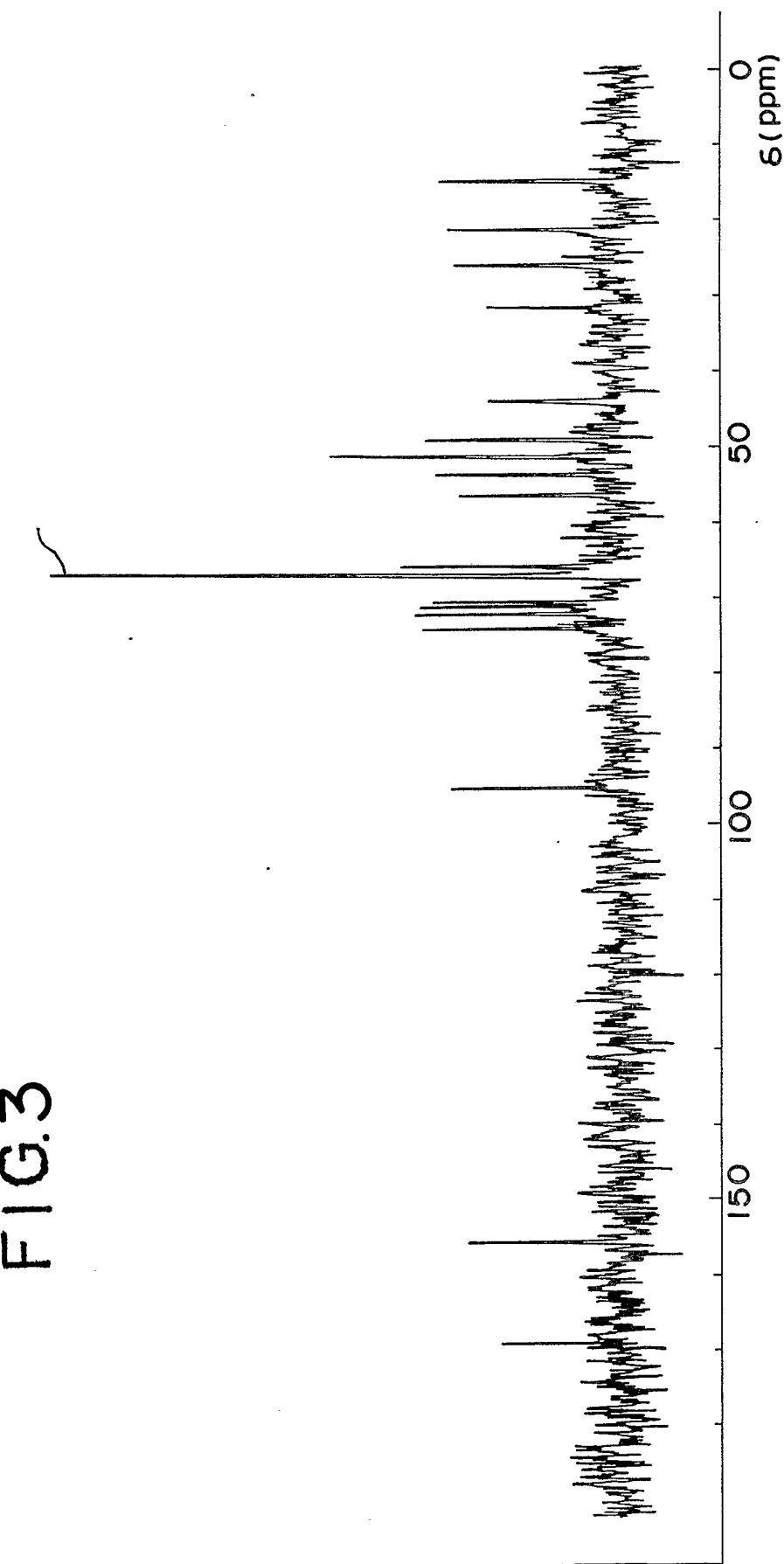


FIG.3



ABSORPTIONSINTENSITÄT