



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

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

644 871

⑳ Gesuchsnummer: 8864/79

㉒ Anmeldungsdatum: 02.10.1979

③① Priorität(en): 03.10.1978 JP 53-122277

㉔ Patent erteilt: 31.08.1984

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 31.08.1984

⑦③ Inhaber:
Takeda Chemical Industries, Ltd.,
Higashi-ku/Osaka-shi/Osaka (JP)

⑦② Erfinder:
Akira Imada, Hyogo (JP)
Kazuhiko Kintaka, Osaka (JP)
Konomi Haibara, Osaka (JP)

⑦④ Vertreter:
A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG,
Patentanwälte, Basel

⑤④ **Antibiotikum SB-72310 und Verfahren zu seiner Herstellung.**

⑤⑦ Ein neues Antibiotikum SB-72310 wird hergestellt, indem man einen Mikroorganismus, der zur Gattung *Pseudomonas* gehört und das Antibiotikum SB-72310 zu bilden vermag, in einem Nährmedium kultiviert, das Antibiotikum im Kulturmedium sich bilden und anhäufen lässt und das Antibiotikum isoliert.

Das Antibiotikum SB-72310 ist wertvoll als keimtötendes Mittel oder Desinfektionsmittel.

Das Antibiotikum SB-72310 ist durch folgende Eigenschaften gekennzeichnet:

- 1) Schmelzpunkt: nicht unter 110°C
- 2) Aussehen: weisses Pulver
- 3) Elementaranalyse in %

C 34,40 ± 0,5
H 5,50 ± 0,5
N 13,45 ± 0,5
O 38,90 ± 1,0
S 7,75 ± 0,5

nach 6-stündiger Trocknung über Phosphorpentoxid unter vermindertem Druck bei 40°C

- 4) Molekulargewicht: 400 ± 20 durch Titrimetrie
- 5) Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{25} +0,5^\circ \pm 5^\circ$, c = 0,93, in H₂O

6) Ultraviolettabsorptionsspektrum: keine charakteristische Absorption über 210 nm

7) Infrarotabsorptionsspektrum, Hauptabsorptionen in cm⁻¹, KBr-Tablette: 1770, 1650, 1530, 1240, 1043.

PATENTANSPRÜCHE

1. Antibiotikum SB-72310 und seine Salze, gekennzeichnet durch die folgenden Eigenschaften:

- a) Schmelzpunkt: nicht unter 110°C
- b) Aussehen: weisses Pulver
- c) Elementaranalyse in %

C 34,40 ± 0,5
H 5,50 ± 0,5
N 13,45 ± 0,5
O 38,90 ± 1,0
S 7,75 ± 0,5

nach 6-stündiger Trocknung über Phosphorpentoxid unter vermindertem Druck bei 40°C

- d) Molekulargewicht: 400 ± 20 durch Titrometrie
- e) Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{25} + 0,5^\circ \pm 5^\circ$, c = 0,93, in H₂O
- f) Ultraviolettabsorptionsspektrum: keine charakteristische Absorption über 210 nm
- g) Infrarotabsorptionsspektrum, Hauptabsorptionen in cm⁻¹, KBr-Tablette: 1770, 1650, 1530, 1240, 1043
- h) Löslichkeit: unlöslich in Petroläther, Hexan, Diäthyläther, Benzol, Äthylacetat und Chloroform; schwerlöslich in Äthanol, Pyridin und Aceton; löslich in Methanol und Dimethylsulfoxid; leicht löslich in Wasser;
- i) Farbreaktionen: Ninhydrin- und Kaliumpermanganat-Reaktionen positiv; Eisen(III)-chlorid-Kaliumferricyanid-, Sakaguchi- und Molisch-Reaktionen negativ; Ehrlich-Reaktion: unsicher positiv.
- j) basisch, neutral oder sauer: sauer.

2. Verfahren zur Herstellung von Antibiotikum SB-72310, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Mikroorganismus, der zur Gattung *Pseudomonas* gehört und Antibiotikum SB-72310 zu bilden vermag, in einem Nährmedium kultiviert, das Antibiotikum SB-72310 im Kulturmedium sich bilden und anhäufen lässt und das Antibiotikum isoliert.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als Mikroorganismus *Pseudomonas mesoacidophila* verwendet.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als Mikroorganismus *Pseudomonas mesoacidophila* SB-72310, IFO 13884, verwendet.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man das Kulturmedium durch eine Schwefelverbindung ergänzt, die von dem Mikroorganismus, der zur Gattung *Pseudomonas* gehört und Antibiotikum SB-72310 zu bilden vermag, verwertet wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man als Schwefelverbindung Ammoniumsulfat, Ammoniumsulfid, Ammoniumthiosulfat, Cystein, Cystin, L-Thiazolidin-4-carbonsäure, Hypotaurin oder Glutathion verwendet.

Die Erfindung betrifft ein neues Antibiotikum mit der Bezeichnung SB-72310, seine Salze und ein Verfahren zu ihrer Herstellung.

Mit dem Ziel, neue Antibiotika zu finden, isolierte die Anmelderin eine grosse Zahl von Mikroorganismen aus Bodenproben und untersuchte die von diesen Mikroorganismen gebildeten Antibiotika. Die Untersuchung ergab, dass einige dieser Mikroorganismen ein neues Antibiotikum bilden, dass diese Mikroorganismen zur Gattung *Pseudomonas* gehören und dass diese Mikroorganismen bei Kultivierung in einem geeigneten Nährmedium ein Antibiotikum anhäufen, das eine hemmende Wirkung auf grampositive und gramnegative Bakterien ausübt. Die Anmelderin iso-

lierte dieses Antibiotikum und stellte auf Grund seiner physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften fest, dass dieses Antibiotikum neu ist. Es wurde daher als Antibiotikum SB-72310 bezeichnet.

Die Bedingungen für die Herstellung von Antibiotikum SB-72310 wurden ebenfalls untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass die Bildung des Antibiotikums SB-72310 bedeutend gesteigert werden kann, wenn die in Frage kommenden Mikroorganismen in einem Nährmedium, das mit einer Schwefelverbindung ergänzt ist, die die Mikroorganismen zu verwerten vermögen, kultiviert werden. Diesen Feststellungen folgten weitere Untersuchungen, die in der vorliegenden Erfindung gipfelten.

In der vorliegenden Beschreibung und in den Patentansprüchen wird das Antibiotikum SB-72310 zuweilen kurz als SB-72310 bezeichnet.

Die Erfindung umfasst daher

1. Antibiotikum SB-72310 und seine Salze und
2. die Herstellung des Antibiotikums SB-72310 nach einem Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man einen Mikroorganismus, der zur Gattung *Pseudomonas* gehört und das Antibiotikum SB-72310 zu bilden vermag, in einem Nährmedium kultiviert, das Antibiotikum durch den Mikroorganismus im Kulturmedium sich bilden und anhäufen lässt und das Antibiotikum isoliert.

Erfindungsgemäss können als Stämme, die das Antibiotikum SB-72310 bilden, alle Bakterienstämme der Gattung *Pseudomonas* verwendet werden, vorausgesetzt lediglich, dass die Stämme das Antibiotikum zu bilden vermögen. Als Beispiel eines solchen Stammes ist *Pseudomonas* Stamm SB-72310 (nachstehend zuweilen als Stamm SB-72310 bezeichnet) zu nennen, der von der Anmelderin aus Bodenproben, die in Nishinomiya, Präfektur Hyogo, Japan, isoliert wurde.

Die bakteriologischen Eigenschaften von *Pseudomonas* Stamm SB-72310 sind nachstehend genannt.

- a) Morphologie
Nach 2 Tagen auf Schrägagar bei 28°C sind die Zellen stabförmig mit 0,8 bis 1,1 µm Durchmesser und 1,6 bis 4,1 µm Länge. Ohne Polymorphismus sind die Bakterien mit einer oder mehreren polaren Geisseln beweglich. Keine Sporulation; Poly-β-hydroxybuttersäure wird als intrazelluläre Kohlenstoffreserve angereichert (R.Y. Stanier et al., *Journal of General Microbiology* 43, [1966] 159). Gramnegativ, nicht säurefest.
- b) Kulturmerkmale auf verschiedenen Medien:
Bei 28°C kultiviert und 1 bis 14 Tage beobachtet.
 - 1) Nähragarplatte: kreisrunde erhabene Kolonien von 1 bis 3 mm Durchmesser mit ganzem Rand werden nach 3 Tagen gebildet. Glatt, undurchsichtig, grauweiss, kein diffundierbares Pigment gebildet.
 - 2) Schrägagar: mässiges Wachstum, fadenförmig, opak und grau.
 - 3) Nährbrühe: trübes Wachstum, im wesentlichen mit einer geringen Sedimentation. Ein Pellikel erscheint.
 - 4) Stickerkultur in Nährgelatine: Verflüssigung.
 - 5) Lackmusmilch: Peptonisierung.
- c) Physiologische Eigenschaften
 - 1) Reduktion von Nitraten: positiv
 - 2) Denitrifikation: negativ
 - 3) MR-Test (Methylrottest): negativ
 - 4) VP (Voges-Proskauer)-Test: negativ

- 5) Bildung von Indol: negativ
- 6) Bildung von Schwefelwasserstoff: negativ
- 7) Hydrolyse von Stärke: negativ
- 8) Verwertung von Zitrat: positiv
- 9) Verwertung von anorganischen Stickstoffquellen

- I) Kaliumnitrat: positiv
- II) Ammoniumsulfat: positiv

- 10) Bildung von Pigmenten: nein
- 11) Urease: positiv
- 12) Oxidase: positiv
- 13) Katalase: positiv
- 14) Wachstumsbereich

I) pH: Wachstum bei pH 4,0 bis 8,85, optimal pH 4,5 bis 7,0
 II) Temperatur: Wachstum bei 8 bis 42°C, optimal 24 bis 36°C.

- 15) Sauerstoffbedarf: aerob
- 16) O-F-Test (oxidativ-fermentativ) (Hugh-Leifson-Methode): oxidativ
- 17) Bildung von Säure und Gas aus Zuckern: schwache Säurebildung, aber keine Gasbildung wird in Pepton-Wasser festgestellt, das 1% (Gew./Vol.) L-Arabinose, D-Xylose, D-Glucose, D-Mannose, D-Fructose, D-Galactose, Maltose, Saccharose, Trehalose, D-Sorbit, D-Mannit, Inosit oder Glycerin enthält.
- 18) Assimilierung von Kohlenstoffquellen:
 Die Ergebnisse der Kultivierung in anorganische Salze enthaltenden Medien (Gew./Vol.: 0,7% Dikaliumhydrogenphosphat, 0,3% Monokaliumdihydrogenphosphat, 0,1% Ammoniumsulfat, 0,1% Natriumchlorid, 0,01% Magnesiumsulfat.7 H₂O), die verschiedenen Kohlenstoffquellen enthalten, für 14 Tage sind nachstehend in Tabelle 1 genannt.

Tabelle 1

Verwertung von Kohlenstoffquellen

Kohlenstoffquelle	Endkonzentration % (Gew./Vol.)	Wachstum
L-Arabinose	1	+
D-Xylose	1	+
D-Glucose	1	+
D-Mannose	1	+
D-Fructose	1	+
D-Galactose	1	+
Maltose	1	+
Saccharose	1	+
Lactose	1	-
Trehalose	1	+
D-Sorbit	1	+
D-Mannit	1	+
Inosit	1	+
Glycerin	1	+
Stärke	1	-
Raffinose	1	+
Citrat	0.3	+
Acetat	0.3	+
L-Alanin	0.3	+
β-Alanin	0.3	+
Succinat	0.3	+
2-Ketogluconat	0.3	+
L-Arginin	0.3	+
Betain	0.3	+

+ = Wachstum
 ± = spärliches Wachstum
 - = kein Wachstum

19) Andere Eigenschaften

- I) Verwertung von Malonat: positiv
- II) Desaminierung von Phenylalanin: negativ
- III) Decarboxylase-Aktivität

- a) Arginin: positiv
- b) Lysin: negativ
- c) Ornithin: negativ

- IV) Arginindehydrolase-Aktivität: positiv
- V) Hydrolyse von Esculin: positiv
- VI) Hydrolyse von «Tween 80»: positiv
- VII) GC-Gehalt (Guanin-Cytosin) von DNA: 64,3 Mol.-%

Ein Vergleich der vorstehend genannten bakteriologischen Eigenschaften des Stamms SB-72310 mit der Beschreibung in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Auflage 7 und 8, ergibt, dass der Stamm SB-72310 angesichts der Tatsache, dass er ein gramnegatives stabförmiges aerobes Bakterium, mit einer oder mehreren polaren Geißeln beweglich, Oxidase-positiv und Katalase-positiv ist, offensichtlich zur Familie Pseudomonadaceae gehört.

Die Tatsache, dass er keinen Nährstoffbedarf, Poly-β-hydroxybutyrat als eine intrazelluläre Kohlenstoffreserve anhäuft und Arginin oder Betain als einzelne Kohlenstoffquelle verwertet, lässt erkennen, dass der Stamm relativ verwandt mit Pseudomonas pseudoalcaligenes, Pseudomonas pseudomallei, Pseudomonas mallei oder Pseudomonas caryophylli ist. Der Stamm SB-72310 unterscheidet sich jedoch von diesen Spezies in der folgenden Hinsicht: Pseudomonas pseudoalcaligenes kann nur Fructose als Kohlenstoffquelle verwerten. Die meisten Stämme von Pseudomonas pseudomallei verursachen Denitrifikation, hydrolysieren Stärke und haben eine spezifische Assimilierung von Nährstoffquellen. Pseudomonas mallei ist nicht beweglich und verursacht Denitrifikation. Pseudomonas caryophylli erzeugt ein gelbgrünes, nicht fluoreszierendes Pigment und verursacht Denitrifikation.

Der Stamm SB-72310 ist daher als neue Spezies der Gattung Pseudomonas anzusehen. Angesichts der Tatsache, dass sein pH-Wert für optimales Wachstum niedrig ist und 4,5 bis 7,0 beträgt und für Bakterien der Gattung Pseudomonas allgemein etwas niedrig liegt, wurde SB-72310 als Pseudomonas mesoacidophila SB-72310 bezeichnet.

Proben dieses Stammes SB-72310 wurden am 13. September 1978 beim Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology (FERM), 1-3, Higashi 1-chome, Yatabe-machi Tsubuka-gun, Ibaraki-ken 305, Japan, unter der Zugangsnummer FERM-P Nr. 4653, am 13. September 1978 beim Institute for Fermentation (IFO), 17-85, Jusco-honmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan, unter der Zugangsnummer IFO 13884 und am 27. September 1978 bei der American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, unter der Zugangsnummer ATCC-31433 hinterlegt.

Die für die Zwecke der Erfindung verwendeten Pseudomonas-Bakterien sind im allgemeinen sehr variabel in den Eigenschaften und unterliegen Mutationen, wenn sie künstlichen mutagenen Behandlungen, beispielsweise Bestrahlung mit UV-Licht oder Röntgenstrahlen oder einer Behandlung mit chemischen Mutagenen (z.B. Nitrosoguanidin, Äthylmethansulfonat) unterworfen werden. Alle diese Mutanten und Varianten sind jedoch für die Zwecke der Erfindung nur geeignet, wenn sie die Fähigkeit zur Bildung von SB-72310, des gewünschten Antibiotikums gemäß der Erfindung, aufweisen.

Für die Kultivierung des Stamms SB-72310 können Koh-

lenstoffquellen wie Glucose, Saccharose, Maltose, ausgebrauchte Melasse, Glycerin, Öle und Fette (z.B. Sojabohnenöl und Olivenöl), organische Säuren (z.B. Citronensäure, Bernsteinsäure und Gluconsäure) und andere verwertbare Kohlenstoffquellen verwendet werden. Als Stickstoffquellen eignen sich organische und anorganische stickstoffhaltige Verbindungen und Materialien, beispielsweise Sojabohnenmehl, Baumwollsaatmehl, Maisquellwasser, Trockenhefe, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Pepton, Harnstoff, Ammoniumsulfat, Ammoniumnitrat, Ammoniumchlorid und Ammoniumphosphat. Ferner können die für die Kultivierung von Bakterien normalerweise erforderlichen anorganischen Salze, z.B. Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Calciumcarbonat, Magnesiumsulfat, Monokaliumdihydrogenphosphat und Dinatriummonohydrogenphosphat, allein oder in geeigneter Kombination verwendet werden. Es wurde gefunden, dass die Ausbeute an gewünschtem Antibiotikum gesteigert werden kann, wenn das Nährmedium durch eine Schwefelverbindung, die der SB-72310 bildende Stamm zu verwerten vermag, nämlich anorganische Schwefelverbindungen, z.B. Sulfate (z.B. Ammoniumsulfat), Thiosulfate (z.B. Ammoniumthiosulfat), Sulfit (z.B. Ammoniumsulfid) oder organische Schwefelverbindungen, beispielsweise schwefelhaltige Aminosäuren (z.B. Cystin, Cystein, L-Thiazolidin-4-carbonsäure), Hypotaurin, schwefelhaltige Peptide (z.B. Glutathion) oder deren Gemische ergänzt wird. Die Konzentration dieser Schwefelverbindungen im Nährmedium beträgt 0,01 bis 1,0% (Gew./Vol.), vorzugsweise 0,02 bis 0,5% (Gew./Vol.). Der Zusatz einer solchen Schwefelverbindung zum Nährmedium hat erhöhte Bildung von SB-72310 zur Folge, so dass er kommerziell von erheblichem Wert ist.

Ferner können Salze von Schwermetallen, z.B. Eisen(II)-sulfat und Kupfersulfat, Vitamine, z.B. Vitamin B₁ und Biotin und andere Zusatzstoffe nach Bedarf zugesetzt werden. Schaumverhütungsmittel und oberflächenaktive Mittel, z.B. Siliconöl und Polyalkylenglykolläther, können ebenfalls zugesetzt werden. Natürlich können auch andere organische oder anorganische Stoffe, die das Wachstum des Mikroorganismus fördern und die Bildung von SB-72310 steigern, in geeigneten Mengen zugesetzt werden.

Die Kultivierung des Stamms SB-72310 kann nach ähnlichen Verfahren wie sie für die Erzeugung von Antibiotika im allgemeinen angewandt werden, unter Verwendung eines festen Kulturmediums oder in einem flüssigen Kulturmedium erfolgen. Die Flüssigkultur kann stationär, unter Rühren, Schütteln oder aerob durchgeführt werden, wobei die aerobe Kultur unter Rühren besonders zweckmässig ist. Die bevorzugte Kultivierungstemperatur liegt im Bereich von etwa 15 bis 35°C, während der pH-Wert des Nährmediums zwischen etwa 4 und 8 liegen kann. Die Kultivierung wird etwa 8 bis 168 Stunden, vorzugsweise 24 bis 144 Stunden durchgeführt. Da das gebildete Antibiotikum SB-72310 zum grössten Teil in der flüssigen Phase des Kulturmediums vorliegt, ist es zweckmässig, das Kulturmedium zu zentrifugieren oder filtrieren, um den flüssigen Überstand oder das Filtrat von der Zellmasse zu entfernen, und das Antibiotikum SB-72310 im flüssigen Überstand oder im Filtrat zu reinigen. Gegebenenfalls kann auch eine direkte Reinigung aus dem Kulturmedium vorgenommen werden.

Die Testung der Aktivität des in dieser Weise hergestellten Produkts kann gegen *Comamonas terrigena* IFO 12685 als Testmikroorganismus unter Verwendung von SB-72310 als Standard nach der Zylindermethode oder der Papierblättchenmethode unter Verwendung von TSA (Trypticase-Soja-Agar (Baltimore Biologicals, Limited, USA) erfolgen.

Das Antibiotikum SB-72310 kann mit Hilfe der verschiedenen Verfahren, die üblicherweise für die Isolierung von Metaboliten-Mikroorganismen angewandt werden, isoliert

werden. Beispielsweise werden die Zellen durch Zentrifugieren entfernt, worauf das aktive Produkt nach üblichen Methoden vom flüssigen Überstand abgetrennt und gereinigt wird. Beispielsweise können das Verfahren, bei dem die Löslichkeit oder der Löslichkeitsunterschied in einem geeigneten Lösungsmittel ausgenutzt wird, das Verfahren, bei dem die Fällung oder der Unterschied in der Fällungsgeschwindigkeit des Antibiotikums aus einer Lösung ausgenutzt wird, das Verfahren, bei dem seine charakteristische Adsorptionsaffinität zu verschiedenen Adsorptionsmitteln ausgenutzt wird, die Ionenaustauschchromatographie an Ionenaustauschern, Konzentrierung unter vermindertem Druck, Gefriertrocknung, Kristallisation, Umkristallisation, Trocknung usw. entweder allein oder in geeigneter Kombination und Reihenfolge und/oder in Wiederholung angewandt werden.

Ein typisches Verfahren wird nachstehend beschrieben. Nach beendeter Kultivierung wird das Kulturmedium filtriert, das erhaltene Filtrat durch eine Aktivkohlesäule geleitet und das adsorbierte SB-72310 mit einem hydrophilen organischen Lösungsmittel eluiert. Als hydrophile organische Lösungsmittel eignen sich beispielsweise niedere Ketone (z.B. Aceton, Methyläthylketon und Methylisobutylketon) und niedere Alkohole (z.B. Methanol, Äthanol, Isopropanol, Propanol und Butanol). Diese Lösungsmittel können allein oder als Gemisch in Kombination mit Wasser verwendet werden. Auf Grund der sauren Natur von SB-72310 können Anionenaustauschharze, z.B. Harze der Cl-Form (Amberlite IRA-400 und 402, Hersteller Amberlite Co., USA; Dowex-1, Hersteller Dow and Chemical Co., USA; Diaion SA-21A, Hersteller Mitsubishi Chemical Industries, Japan) vorteilhaft verwendet werden. Das adsorbierte aktive Produkt wird beispielsweise mit einer wässrigen Natriumchloridlösung eluiert. Um das Eluat zu entsalzen, wird die Säulenchromatographie erneut mit Aktivkohle durchgeführt. Das erhaltene Eluat wird dann eingengt und beispielsweise mit Aceton versetzt. Die hierbei gebildete Fällung wird abfiltriert, mit Aceton und Diäthyläther gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet, wobei ein hellbraunes Pulver gewonnen wird. Zur Reinigung des Antibiotikums SB-72310 im Pulver kann die Säulenchromatographie an DEAE-Sephadex (Pharmacia, Schweden) vorteilhaft angewandt werden. Beispielsweise wird eine Säule des Produkts DEAE-Sephadex A-25 mit 0,01-molarem Phosphatpuffer (pH 6,6) gewaschen und eine wässrige Lösung des Pulvers durch die Säule geleitet, an der das Antibiotikum adsorbiert wird. Die Säule wird mit der vorstehend genannten Pufferlösung gewaschen, worauf mit dem Puffer, der 0,5% (Gew./Vol.) Natriumchlorid enthält, eluiert wird. Die aktiven Fraktionen werden zusammengossen, auf pH 3,0 eingestellt und erneut durch eine Aktivkohlesäule geleitet. Die Säule wird mit Wasser und anschliessend mit 20%igem wässrigem Methanol gewaschen. Die Elution wird dann mit wässrigem Aceton durchgeführt. Die aktiven Fraktionen werden zusammengossen und unter vermindertem Druck getrocknet. Dem Konzentrat wird Aceton zugesetzt, wobei SB-72310 erhalten wird. SB-72310 bildet Metallsalze und das Ammoniumsalz. Als Beispiele von Metallsalzen sind das Natriumsalz, Kaliumsalz und Lithiumsalz zu nennen.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften des gemäss Beispiel I hergestellten Antibiotikums SB-72310 sind nachstehend genannt.

- 1) Schmelzpunkt nicht unter 110°C
- 2) Aussehen: weisses Pulver
- 3) Elementaranalyse (nach Trocknung unter vermindertem Druck über Phosphoroxid bei 40°C für 6 Stunden) (%):

C 34,40 34,18 (34,40 ± 0,5)
 H 5,56 5,54 (5,50 ± 0,5)
 N 13,30 13,65 (13,45 ± 0,5)
 S 7,56 7,75 (7,75 ± 0,5)
 (O 38,90 ± 1,0)

4) Molekulargewicht durch Titrometrie: 400 ± 20 Ange-
 nommene Bruttoformel (auf der Grundlage der vorstehenden
 Kennzahlen)

$C_{12}H_{20}N_4SO_9 \cdot (H_2O)$

Berechnet: C 34,78; H 5,35; N 13,52; S 7,74

5) Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{23} + 0,5^\circ \pm 5^\circ$ (c = 0,93, H₂O)
 6) UV-Absorptionsspektrum: nur Endabsorptionen (über
 210 nm keine charakteristischen Absorptionen)
 7) Infrarotabsorptionsspektrum (siehe Fig. 1), Haupt-
 peaks (KBr) (cm⁻¹):

3440(s), 2920(m), 2850(m), 2600(w), 1770(s), 1650(s), 1530(s),
 1458(m), 1390(w), 1340(w), 1280(sh), 1240(s), 1210(sh),
 1180(m), 1118(w), 1043(s), 792(w), 632(s)

(s = stark; m = mittel; w = schwach; sh = Schulter).

8) Löslichkeit in Lösungsmitteln:
 Unlöslich in Petroläther, Hexan, Diäthyläther, Benzol,
 Äthylacetat und Chloroform; schwerlöslich in Äthanol,
 Pyridin und Aceton; löslich in Methanol und Dimethylsul-
 foxid; leicht löslich in Wasser.

9) Farbreaktionen:
 positiv: Ninhydrin- und Kaliumpermanganatreaktion;
 negativ: Eisen(III)-chlorid-Kaliumferricyanid-, Saka-
 guchi- und Molisch-Reaktionen; unsichere positive Reak-
 tionen: Ehrlich-Reaktion.

10) Basisch, neutral oder sauer: sauer.

11) Kernmagnetisches Resonanzspektrum (in Dimethyl-
 sulfoxid, 100 MHz) δ 3,31 ppm (s, chemische Verschiebung,
 die O-CH₃ zuzuschreiben ist).

12) Stabilität: in wässriger Lösung im Bereich von pH 3 bis
 7 bei 60°C 10 Minuten stabil; über pH 8,5 instabil.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Natrium-
 salzes des gemäss Beispiel 2 hergestellten Antibiotikums SB-
 72310 sind nachstehend genannt.

1) Schmelzpunkt: nicht unter 110°C
 2) Aussehen: weisses Pulver
 3) Elementaranalyse (nach Trocknung unter vermin-
 dertem Druck über Phosphorpentoxid bei 40°C für 6
 Stunden) (%):

C 31,75 31,68
 H 5,19 5,11
 N 12,68 12,57
 S 7,16 7,10
 Na 5,01 4,95

4) Molekulargewicht durch Titrometrie: 438 ± 5 unter der
 Annahme, dass jedes Molekül 1 Mol Na enthält. Angenom-
 mene Bruttoformel (auf der Grundlage der vorstehenden
 Daten):

$C_{12}H_{19}N_4SO_9 \cdot Na \cdot 2H_2O$

Berechnet: C 31,72; H 5,10; N 12,33; S 7,06; Na 5,06

5) Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{23} + 8,5^\circ \pm 5^\circ$ (c = 0,91, H₂O)
 6) UV-Absorptionsspektrum: nur Endabsorptionen
 7) Infrarotabsorptionsspektrum (Fig. 2), Hauptpeaks
 (KBr) (cm⁻¹):

5 3430 (stark), 3250 (Schulter), 3000 (mittel), 1770 (stark),
 1640 (stark), 1530 (stark), 1450 (schwach), 1405 (schwach),
 1343 (schwach), 1280 (Schulter), 1245 (stark), 1180
 (schwach), 1118 (schwach), 1050 (stark), 820 (schwach), 785
 (schwach), 632 (stark).

10 8) Löslichkeit in Lösungsmitteln:

Unlöslich in Petroläther, Hexan, Diäthyläther, Benzol,
 Äthylacetat, Chloroform und Aceton; schwerlöslich in Me-
 thanol, Äthanol und Pyridin; löslich in Dimethylsulfoxid;
 leicht löslich in Wasser.

15 9) Farbreaktionen:

Positiv: Ninhydrin- und Kaliumpermanganatreaktionen;
 negativ: Eisen(III)-chlorid-Kaliumferricyanid-, Saka-
 guchi- und Molisch-Reaktionen; unsichere positive Reak-
 tionen: Ehrlich-Reaktion.

20 10) Stabilität: in wässriger Lösung im Bereich von pH 3 bis
 7 bei 60°C für 10 Minuten stabil; über pH 8,5 instabil.

Die Sakaguchi-Reaktion ist eine Farbreaktion auf eine
 Guanidinogruppen enthaltende Verbindung (z.B. Arginin).

25 Der Versuch wird unter Verwendung eines aus α -Naphthol,
 einem alkalischen Mittel und frischem Hypobromit (Saka-
 guchi-Reagens) bestehenden Reagens durchgeführt. Der
 Umschlag der Reaktionslösung in eine rote Farbe zeigt die
 Anwesenheit einer Guanidinogruppen enthaltenden Verbin-
 30 dung an.

Die Molisch-Reaktion ist eine Farbreaktion auf Kohlehy-
 drate. Die zu prüfende Lösung wird in ein Reagensglas
 gegeben, der Lösung wird eine alkoholische α -Naphthollö-
 sung zugegeben und hierauf wird konzentrierte Schwefel-
 säure langsam entlang der Reagensglasinnenfläche gegossen,
 35 so dass sich zwei Schichten bilden. Das Auftreten einer
 rötlich-violetten Zone an der Kontaktfläche der zwei
 Schichten zeigt die Gegenwart von Kohlehydraten an.

Die Ehrlich-Reaktion ist eine Farbreaktion auf eine Indol-
 40 oder eine Diazoverbindung. Der Versuch wird unter Verwen-
 dung eines aus p-Dimethylaminobenzaldehyd, Äthanol und
 konzentrierter Salzsäure (Ehrlich-Reagens) bestehenden
 Reagens durchgeführt. Der Umschlag der Reaktionslösung
 in eine rote Farbe zeigt die Anwesenheit einer Indol-
 45 oder Diazogruppe enthaltenden Verbindung an.

Die Umwandlung von SB-72310 in Form der freien Säure
 in ein Salz, beispielsweise das Natriumsalz, kann durch
 Zusatz von ungefähr einem molaren Äquivalent Natriumhy-
 droxyd zu einer wässrigen Lösung der freien Säure und
 50 anschliessende Gefriertrocknung des Systems erfolgen.

Das Salz von SB-72310 kann in die freie Säure beispiels-
 weise durch Zusatz von etwa 1n-Salzsäure zu einer wässrigen
 Lösung beispielsweise des Natriumsalzes von SB-72310 zur
 Einstellung der Lösung auf pH 3,0 und Entsalzen der Lösung
 55 mit Hilfe von Aktivkohle umgewandelt werden.

Die biologischen Merkmale von SB-72310 sind nachste-
 hend genannt. Das antibiotische Spektrum von SB-72310
 und seines Natriumsalzes gegen verschiedene Mikroorgan-
 ismen ist in Tabelle 2 angegeben. Die Ergebnisse zeigen,
 60 dass das Antibiotikum SB-72310 gegen grampositive und
 gramnegative Bakterien wirksam ist.

Die akute Toxizität des Natriumsalzes von Antibiotikum
 SB-72310 ist gering. Wenn das Salz in einer Dosis von 500
 mg/kg Mäusen intravenös verabreicht wurde, starb kein Tier.

65

Tabelle 2

Antimikrobielles Spektrum von SB-72310 (Durchmesser des
 Hemmhofes (mm) bei der Papierblättchenmethode) (25 μ l

Testlösung von 10 mg/ml wird in Papierblättchen von 8 mm Durchmesser absorbiert).

Testmikroorganismus	Durchmesser des Hemmhofes, mm
<i>Pseudomonas fluorescens</i> IFO 3081	12,5
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	14,5
<i>Serratia marcescens</i> IFO 12648	17
<i>Alcaligenes faecalis</i> IFO 13111	23
<i>Proteus mirabilis</i> IFO 3849	19
<i>Proteus vulgaris</i> IFO 3045	18
<i>Salmonella typhimurium</i> IFO 12529	18,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO 3318	12,5
<i>Comamonas terrigena</i> IFO 12685	25
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	18,5
<i>Sarcina lutea</i> IFO 3232	23
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3513	22
<i>Bacillus cereus</i> IFO 3466	14,5

Medium: Trypticase-Sojabrühre-Agar

Wie das vorstehende antibiotische Spektrum zeigt, übt das Antibiotikum SB-72310 gemäss der Erfindung eine hemmende Wirkung auf gramnegative und grampositive Bakterien aus. Es kann daher zur Behandlung von Infektionen mit den genannten Bakterien bei Säugetieren (z.B. Maus, Ratte, Hund und Mensch) und Geflügel (z.B. Huhn und Ente) verwendet werden.

Für die Verwendung als Mittel gegen Infektionen mit *Escherichia coli* wird SB-72310 beispielsweise in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und parenteral, beispielsweise subkutan oder intramuskulär, in einer Tagesdosis von 15 bis 60 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Für die orale Anwendung wird das Antibiotikum SB-72310 beispielsweise mit Lactose gemischt, in Kapseln gefüllt und in einer Dosis von 60 bis 400 mg (als SB-72310)/kg Körpergewicht täglich verabreicht.

SB-72310 kann auch als keimtötendes Mittel oder Desinfektionsmittel verwendet werden. Beispielsweise wird SB-72310 zur Herstellung einer Lösung, die 0,1 bis 1,0% (Gew./Vol.) SB-72310 enthält, in destilliertem Wasser gelöst oder mit einer Salbengrundlage, z.B. Vaseline oder Lanolin, zur Herstellung einer Salbe formuliert, die 15 bis 60 mg SB-72310/g enthält. Die Lösung bzw. Salbe wird auf Pfoten, Beine, Augen, Ohren oder andere Teile der vorstehend genannten Tiere als Desinfektionsmittel aufgebracht.

SB-72310 ist insofern eine sehr aussichtsreiche Verbindung, als sie auch als Zwischenprodukt für die Synthese neuer Medikamente wertvoll ist.

Ein Vergleich von Antibiotikum SB-72310 mit den bekannten Antibiotika hatte die folgenden Ergebnisse: Als Antibiotika, die wasserlöslich und sauer sind und Schwefel enthalten, sind Penicillin und die Cephalosporine zu nennen. SB-72310 unterscheidet sich jedoch von den Cephalosporinen darin, dass es im UV-Bereich des Spektrums nicht absorbiert. Die Tatsache, dass das kernmagnetische Resonanzspektrum eine chemische Verschiebung zeigt, die O-Methylprotonen zuzuschreiben ist, und die Tatsache, dass SB-72310 bei saurer Hydrolyse Glutaminsäure bildet, stellen Beweise dar, dass SB-72310 von allen natürlich vorkommenden Penicillinen und Cephalosporinen verschieden ist.

Es gibt zwar zahlreiche bekannte Antibiotika, die von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* gebildet werden, aber keines dieser Antibiotika ist in Wasser löslich und sauer und enthält Schwefel. Ferner unterscheidet sich SB-72310 von allen bekannten Antibiotika, die von anderen Mikroorganismen aus *Pseudomonas*-Stämmen gebildet werden, durch

seine einmaligen physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften.

Das Antibiotikum G-6302 wurde durch Kultivierung eines Mikroorganismus der Gattung *Pseudomonas* in einem Nährmedium und Isolierung aus dem Kulturmedium von der Anmelderin hergestellt. Das Antibiotikum G-6302 und das erfindungsgemässe Antibiotikum SB-72310 sind in der Molekularformel, im Infrarotabsorptionsspektrum, im kernmagnetischen Resonanzspektrum, in den Farbreaktionen, in der Stabilität usw. nicht zu unterscheiden. Sie unterscheiden sich jedoch deutlich insbesondere in der spezifischen Drehung, da der Wert von $[\alpha]_D^{25}$ der freien Form des Antibiotikums G-6302 + 94° ± 10° (c = 0,35, H₂O) beträgt, während er für die freie Form des Antibiotikums SB-72310 + 0,5° ± 5° (c = 0,93, H₂O) beträgt. Das erfindungsgemässe Antibiotikum SB-72310 ist somit vom Antibiotikum G-6302 verschieden.

Auf Grund der vorstehenden Tatsachen ist somit SB-72310 als neue Verbindung anzusehen.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert. In diesen Beispielen verstehen sich die Teile als Gewichtsteile, falls nicht anders angegeben. Gewichtsteile verhalten sich zu Raumteilen wie Gramm zu Kubikzentimeter, und die Prozentsätze basieren auf «Gew./Vol», falls nicht anders angegeben.

Beispiel 1

Die Zellen von *Pseudomonas mesoacidophila* SB-72310 (FERM-P Nr. 4653; IFO 13884; ATCC-31433), die auf Schrägagar gezüchtet worden waren, wurden zum Beimpfen von zwei Sakaguchi-Kolben verwendet, die ein Fassungsvermögen von 2000 Raumteilen hatten und je 500 Raumteile eines Mediums aus 1% Glucose, 0,5% Polypepton (Hersteller Daigo Nutritive Chemicals Co., Japan), 0,5% Fleischextrakt und 0,5% Natriumchlorid enthielten (pH 7,0). Jeder Kolben wurde auf einer hin- und hergehenden Schüttelvorrichtung 48 Stunden bei 28°C bebrütet. Die hierbei erhaltene Kultur wurde als Impfkultur verwendet.

In einen als Fermenter dienenden Tank aus nichtrostendem Stahl mit einem Fassungsvermögen von 200.000 Raumteilen wurden 120.000 Raumteile eines Mediums gegeben, das 1,5% Saccharose, 0,3% Hefextrakt, 0,2% Ammoniumsulfat, 0,6% Kaliumdihydrogenphosphat, 0,3% Dikaliumhydrogenphosphat, 0,05% Magnesiumsulfat und 0,05% NaCl enthielt und 20 Minuten mit Wasserdampf bei 120°C sterilisiert worden war. Der sterilisierte Tank wurde dann mit der vorstehend genannten Impfkultur beimpft und bei einer Temperatur von 28°C unter Belüftung mit einer Rate von 120.000 Raumteilen/Minute und einer Geschwindigkeit des Rührers von 180 UpM 78 Stunden bebrütet. Das erhaltene Kulturmedium wurde mit einem Sharples-Zentrifugalabscheider zur Entfernung der Zellen zentrifugiert, wobei 110.000 Raumteile eines flüssigen Überstandes zurückblieben. Die Flüssigkeit wurde auf pH 4,2 eingestellt und durch eine Säule aus 15.000 Raumteilen Aktivkohle (chromatographische Qualität, Shirasagi, hergestellt von der Anmelderin) geleitet, wobei die aktive Substanz an der Aktivkohle adsorbiert wurde. Die Säule wurde mit 45.000 Raumteilen Wasser gespült und dann mit 45.000 Raumteilen 50%igem wässrigem Aceton eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen von je 10.000 Raumteilen aufgefangen. Die Fraktionen wurden gegen *Comamonas terrigena* IFO 12685 getestet. Die Fraktionen Nr. 2 und 3 wurden zusammengegossen und mit 20.000 Raumteilen Wasser versetzt. Das Gemisch wurde durch eine Kolonne geleitet, die mit 10.000 Raumteilen des Harzes «Dowex-1» (Cl-Form, Hersteller Dow and Chemical Industries, USA) gefüllt war. Die Säule wurde mit 25.000 Raumteilen Wasser gespült und dann mit 50.000 Raumteilen einer 5%igen wässrigen Natriumchloridlösung eluiert. Die

aktiven Fraktionen wurden zusammengewaschen, auf pH 4,0 eingestellt und erneut durch eine Aktivkohlesäule (8000 Raumteile) geleitet. Die Säule wurde mit 24.000 Raumteilen Wasser gewaschen und mit 20%igem wässrigem Methanol eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden zusammengewaschen und unter vermindertem Druck auf 50 Raumteile eingengt. Dann wurden 200 Raumteile Aceton zugesetzt. Die hierbei gebildete Fällung wurde abfiltriert, mit 50 Raumteilen Aceton und 100 Raumteilen Diäthyläther gewaschen und dann unter vermindertem Druck getrocknet. Hierbei wurden 12 Teile rohes Produkt erhalten.

In 500 Raumteilen M/100-Phosphatpuffer (pH 6,6) wurden 10 Teile des vorstehend genannten rohen Produkts gelöst. Die Lösung wurde durch eine Säule von 200 Raumteilen DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia, Schweden) geleitet, das vorher mit der vorstehend genannten Pufferlösung gepuffert worden war. Die Säule wurde mit 400 Raumteilen der gleichen Pufferlösung gewaschen und dann mit dem gleichen Puffer, dem 0,5% Natriumchlorid zugesetzt worden waren, eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden zusammengewaschen, mit 1n-HCl auf pH 3,2 eingestellt und durch eine Säule von 60 Raumteilen Aktivkohle geleitet. Die Säule wurde mit 200 Raumteilen Wasser und 100 Raumteilen 20%igem wässrigem Methanol gewaschen und anschliessend mit 50%igem wässrigem Aceton eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden zusammengewaschen, unter vermindertem Druck eingengt und in 5 Raumteilen Methanol gelöst. Nach Zugabe von 100 Raumteilen Aceton wurde die Lösung in der Kälte stehen gelassen. Die hierbei gebildete Fällung wurde abfiltriert, mit Diäthyläther gewaschen und 6 Stunden unter vermindertem Druck bei 40°C über Phosphorpentoxid getrocknet. Hierbei wurden 3,8 Teile eines Pulvers erhalten. Das Infrarot-Absorptionsspektrum dieses Produkts ist in Fig. 1 dargestellt. Elementaranalyse: C 34,40; H 5,56; N 13,30; S 7,56 (Gew.-%).

Beispiel 2

In 45 Raumteilen Wasser wurden 2,0 Teile der gemäss Beispiel 1 hergestellten freien Säure von SB-72310 gelöst. Unter Kühlen wurden etwa 4,5 Raumteile wässriges 1n-Natriumhydroxid zugesetzt. Anschliessend wurde eine weitere Menge 1n-Natriumhydroxid zugesetzt, wobei der pH-Wert der Lösung überwacht wurde, bis er 6,5 erreichte. Die Lösung wurde gefriergetrocknet, wobei 2,1 Teile SB-72310-Monona-

triumsals als weisses Pulver erhalten wurden. Das Infrarot-Absorptionsspektrum dieses Produkts nach dem Trocknen unter vermindertem Druck für 6 Stunden bei 40°C ist in Fig. 2 dargestellt. Elementaranalyse: C 31,75; H 5,19; N 12,68; S 7,16; Na 5,01 (Gew.-%).

Beispiel 3

Mit den Zellen von auf Schrägagar gezüchteten *Pseudomonas mesoacidophila* SB-72310 (FERM-P Nr. 4653; IFO 13884; ATCC-31433) wurde ein Kolben geimpft, der ein Fassungsvermögen von 200 Raumteilen hatte und 40 Raumteile eines Mediums aus 3% Glycerin, 0,1% Glucose, 0,5% Polypepton, 0,5% Fleischextrakt und 0,5% Natriumchlorid enthielt (pH 6,5). Der geimpfte Kolben wurde zur Herstellung einer Impfkultur auf einer rotierenden Schüttelvorrichtung 48 Stunden bei 28°C bebrütet.

Dann wurden in Kolben mit einem Fassungsvermögen von 200 Raumteilen je 40 Raumteile eines Mediums gegeben, das die vorstehend genannte Zusammensetzung hatte und verschiedene Schwefelverbindungen enthielt.

Jeder Kolben wurde dann mit 1 Raumteil der vorstehend beschriebenen Impfkultur geimpft und auf einer rotierenden Schüttelvorrichtung 96 Stunden bei 28°C bebrütet. Wie die Werte in der folgenden Tabelle zeigen, wurde die Bildung von SB-72310 durch den Zusatz der Schwefelverbindungen wesentlich gesteigert.

Tabelle 3

Gebildete Menge von SB-72310

Zugesetzte Schwefelverbindung	Konzentration % (Gew./Vol.)	Gebildete Menge, µg/ml
Ohne Zusatz	–	21
Ammoniumsulfat	0,25	47
Ammoniumsulfid	0,25	68
Ammoniumthiosulfat	0,25	90
Cystein	0,25	54
Cystin	0,25	68
T-Thiazolidin-4-carbonsäure	0,25	90
Hypotaurin	0,25	47
Glutathion	0,25	38

Fig. 1

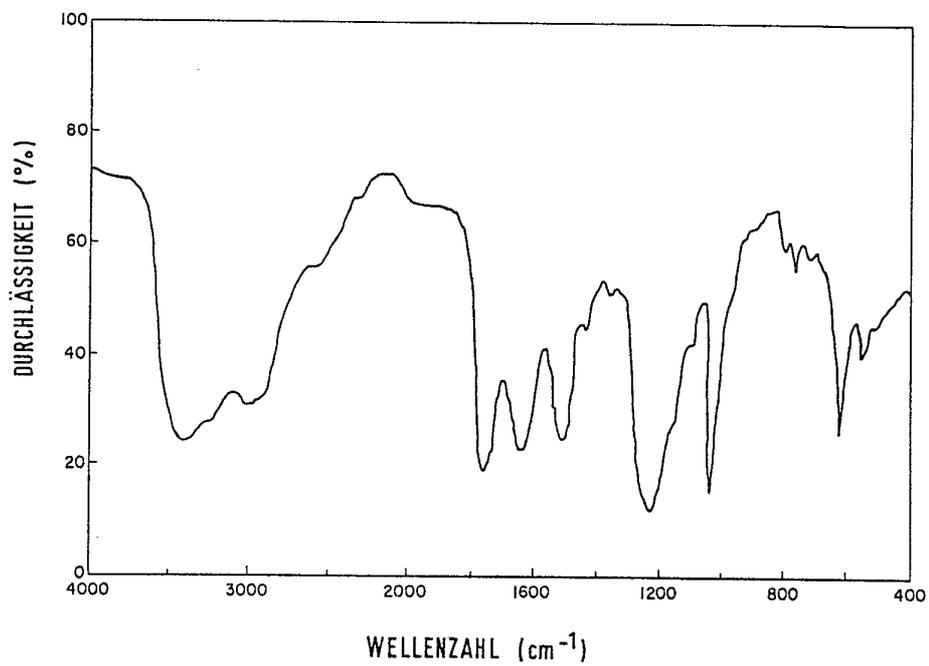


Fig. 2

