



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: C 12 P 1/06
C 07 G 11/00

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



⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑪

632 009

⑮① Gesuchsnummer: 12795/77

⑦③ Inhaber:
Sandoz AG, Basel

⑮② Anmeldungsdatum: 20.10.1977

⑮④ Patent erteilt: 15.09.1982

⑮⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 15.09.1982

⑦② Erfinder:
Dr. Camilla Keller-Juslén, Basel
Dr. Hamilton DeLisle King, Basel

⑤④ Verfahren zur Herstellung eines neuen Antibiotikums.

⑤⑦ Verfahren zur Herstellung des neuen Antibiotikums
S 53210/A-III, indem man einen Stamm von Micro-
ellobosporia brunea nov. Spez. auf oder in einem Nähr-
medium züchtet und das Antibiotikum aus der Fermen-
tationsbrühe durch extraktive und/oder adsorptive Metho-
den isoliert und hierauf chromatographisch oder durch
Gegenstromverteilung reinigt.

PATENTANSPRUCH

Verfahren zur Herstellung des neuen Antibiotikums S 53210/A-III, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Stamm von *Microellobosporia brunea* nov. Spez. auf oder in einem Nährmedium züchtet und das Antibiotikum aus der Fermentationsbrühe durch extraktive und/oder adsorptive Methoden isoliert und hierauf chromatographisch oder durch Gegenstromverteilung reinigt.

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung des neuen Antibiotikums S 53210/A-III.

Erfindungsgemäss gelangt man zu dem neuen Antibiotikum S 53210/A-III, indem man einen Stamm von *Microellobosporia brunea* nov. Spez. auf oder in einem Nährmedium züchtet und das Antibiotikum aus der Fermentationsbrühe durch extraktive und/oder adsorptive Methoden isoliert und hierauf chromatographisch oder durch Gegenstromverteilung reinigt.

Der neue erfindungsgemäss verwendete Stamm S 53210/A wurde aus Erde isoliert, die aus einem antiken, etwa 2000 Jahre alten, 1976 bei Jama Coaque (Equador) gefundenen Tonkopf herausgekratzt worden war. Eine Probe davon wurde beim United States Department of Agriculture, Peoria, Ill., USA deponiert und steht der Öffentlichkeit unter der Kulturnummer NRRL 11,122 zur Verfügung.

Da der Stamm S 53210/A zuerst nur Substratmycel mit seitlichen Einzel- und Doppelsporen bildete, wurde seine Zugehörigkeit zur Gattung *Micromonospora* vermutet. Auf einigen Kulturmedien bildet der Stamm jedoch nach zweiwöchiger Inkubation Luftmycel und keulenförmige, 2 bis 7 µm lange Sporangien, die ihrerseits ein bis sieben, kugelige bis ellipsoidische, 1,0–2,7 µm grosse, unbewegliche Sporen enthalten. Es scheint, dass die Sporen durch Septierung innerhalb kurzer, keulenförmiger Seitenzweige zu entstehen beginnen; die einzelnen Sporen vergrössern sich unterschiedlich stark, reifen als kurze Kette im Sporangium und werden durch apikales Aufreissen der Sporangienhülle befreit. Lange, streptomycetenartige Sporenketten wurden keine beobachtet.

Aufgrund der oben genannten Beschreibung stimmt der Stamm S 53210/A gut überein mit der von Cross T., Lechevalier M. & Lechevalier H., 1963, «A new genus of Actinomycetales: *Microellobosporia* gen. nov.», *Journ. Gen. Microbiology* 31, 421 (1963), errichteten Gattung *Microellobosporia*. Diese Gattung umfasst bisher nur vier Arten (vgl. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Edition (1974), Seiten 843–845), wobei *M. cinerea* und *M. violacea* violette Farbtöne im vegetativen Mycel aufweisen und die Sporangien von *M. grisea* mit kristallinen Stachelchen überzogen sind. Der Stamm S 53210/A weist diese auffallenden Merkmale nicht auf. Die vierte bisher beschriebene Art, *M. flava*, hat aufgrund der Beschreibung weisses Luftmycel und bildet strohgelbe Kolonien ohne lösliche Pigmente, so dass der Stamm S 53210/A mit weissem Luftmycel und beige bis braunen Kolonien ohne lösliche Pigmente jener letzten Art am nächsten kommt. Da aber zwischen *M. flava* und dem neuen Stamm S 53210/A bezüglich der Kohlenstoffverwertung erhebliche Unterschiede bestehen, wurde der Stamm S 53210/A als neue Art der Gattung *Microellobosporia* aufgefasst und aufgrund des braunen, vegetativen Mycels *Microellobosporia brunea*, nov. Sp. genannt.

Die Wachstumseigenschaften des Stammes S 53210/A auf normalen biologischen Medien und seine Kohlenstoffassimilation sind in den folgenden Tabellen aufgeführt:

Medium	Kultureigenschaften	Luftmycel-Form
Malz-Hefe-extrakt	W.: gut, beige bis braun	tritt nach 16 Tagen an den
5 Agar	Substratmycel aufgerissen	Kolonierändern auf, Rectus
	Unt.: beige bis braun	flexibilis
	LM.: weiss, nur an den	
	Kolonierändern*, weiss b	
	LP.: keine	
Hafermehl	W.: mittelmässig bis gut,	tritt nach 17 Tagen auf
10 Agar	farblos	Rectus flexibilis,
	Unt.: beige bis braun	einige Spira a und
	LM.: über ganze	keulenförmige
	Kolonieoberfläche, weiss	Sporangien
	*Wba	
	LP.: keine	
15 Stärke-Mineral-salz	W.: schlecht, farblos	Rectus flexibilis
Agar	Unt.: farblos bis braun	und wenige Spira a
	LM.: spärlich, alabaster weiss,	(ein bis drei
	*W13 ba	Windungen)
	LP.: keine	
Glycerin-	W.: mittelmässig, farblos	tritt nach 14 Tagen
Asparagin	Unt.: farblos bis crème	auf
25 Agar	LM.: über ganze	Rectus flexibilis,
	Kolonieoberfläche,	einige Spira a und
	Austernweiss, *Wb	keulenförmige
	LP.: keine	Sporangien

W.: = Wachstum

Unt.: = Unterseits

LM.: = Luftmycel

LP.: = Lösliche Pigmente

* Referenz mit Bezug auf das «Color-wheels System» Bachus, & Tresner, 1957

35 Physiologische Eigenschaften des Stammes S 53210/A

Nitrat-reduktion	negativ
Stärke-hydrolyse	schwach positiv
Celluloseabbau	negativ
40 Tyrosin-Reaktion	negativ
Milch-koagulation	negativ
Milch-peptonisierung	negativ
Gelatineverflüssigung	positiv
Melaninbildung	negativ

45 Kohlenstoffverwertung des Stammes S 53210/A

Wachstum	Kohlenstoffquellen
50 + + +	L(+)Rhamnose, D(–)Melibiose, D(+)Mannose, D(+)Maltose
+ +	D(+)Glucose, D(+)Galactose, D(–)Arabinose, Glycerin, Stärke, D(+)Xylose, D(–)Fructose, D(–)Mannit
55 +	D(+)Lactose, D(–)Ribose, D(–)Sorbit, Dextrin
±	D(–)Salicin, meso-Inosit, L(–)Arabinose, D(+)Melizitose, D(+)Raffinose, D(+)Saccharose

+ + + = Wachstum und Verwertung gut

60 + + = Wachstum und Verwertung mittelmässig

+ = Wachstum und Verwertung schlecht

± = Wachstum und Verwertung unsicher

Die Züchtung des Stammes S 53210/A erfolgt durch Anwendung an sich bekannter Methoden und besteht im wesentlichen darin, den genannten Stamm auf oder in einem geeigneten Medium und unter geeigneten Bedingungen zu züchten und anschliessend das im Laufe der Züchtung gebildete Antibiotikum S 53210/A-III zu isolieren.

Zu Beginn der Züchtung kann der pH-Wert des Fermentationsmediums zwischen 6,5 und 7,8 liegen. Die zur Züchtung optimale Temperatur kann zwischen 25 und 35 °C liegen. Die Belüftung der Züchtung kann in weiten Grenzwerten schwanken. Die maximale Ausbeute an Antibiotikum S 53210/A-III wird nach 4- bis 7-tägiger Züchtung erhalten. Für die Beimpfung der Fermentationsmedien kann eine sporulierende Kultur verwendet werden. Die Fermentationsmedien können hauptsächlich eine assimilierbare Kohlenstoffquelle, eine assimilierbare Stickstoffquelle und gegebenenfalls Mineralsalze und Wachstumsfaktoren enthalten, wobei alle diese Elemente in Form von gut definierten Produkten oder von komplexen Gemischen, wie man sie in biologischen Produkten verschiedenen Ursprungs antrifft, zugeführt werden können.

Weiterhin eignen sich organische und anorganische stickstoffhaltige Verbindungen, wie Pepton, Hefe- oder Fleischextrakte, Ammoniumnitrat, Ammoniumsulfat, Aminosäuren usw., als Stickstoffquelle. Spurenelemente, die für ein optimales Wachstum des Organismus, der zur Produktion des Antibiotikums S 53210/A-III verwendet wird, erforderlich sind, sollen ebenfalls in dem Kulturmedium enthalten sein. Solche Spurenelemente kommen gewöhnlich als Verunreinigungen in den anderen Bestandteilen des Mediums in Mengen vor, die für den Wachstumsbedarf des erfindungsgemäss verwendeten Stammes S 53210/A genügen.

Sobald bei der Züchtung eine maximale Menge des Antibiotikums S 53210/A-III produziert worden ist, was z. B. durch die Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* festgestellt werden kann, wird der Mycelanteil in der Kulturbrühe homogenisiert und das Antibiotikum durch Extraktion mit einem mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel wie z. B. Äthylacetat, Butylacetat, n-Butanol, gewonnen.

Aus dem erhaltenen Rohextrakt kann das Antibiotikum S 53210/A-III durch an sich bekannte chromatographische Methoden isoliert und rein dargestellt werden.

Das neue Antibiotikum S 53210/A-III zeigt folgende Eigenschaften:

Gelbes amorphes Pulver

Smp. > 300° (Zers.)

$[\alpha]_D^{20} = + 67,2^\circ$ (c = 1,444 in Chloroform)

Analyse:

Gef. C 52,0 H 5,0 N 12,0 O 20,0 S 11,0%

UV-Spektrum in Acetonitril, vgl. Fig. 1

IR-Spektrum in KBr, vgl. Fig. 2

¹H-NMR-Spektrum in DMSO, 90 MHz mit Tetramethylsilan als interner Standard, vgl. Fig. 3.

Bei der Aminosäureanalyse wurde neben unbekannten Aminosäuren eine Aminosäure gefunden, die die gleiche Retentionszeit wie Threonin aufweist.

Farbreaktion:

Ninhydrin negativ

Cl₂-Benzidin grün

Löslichkeit:

S 53210/A-III ist leicht löslich in Chloroform, Dimethylformamid, Acetonitril, Dioxan, Dimethylsulfoxid, schwerlöslich in Methanol, Äthanol und unlöslich in Wasser und Hexan.

In der Tabelle 1 sind die R_F-Werte von S 53210/A-III im Dünnschichtchromatogramm angegeben (Laufstrecke 14 cm auf Kieselgel Merck 60-Platten, Schichtdicke 0,25 mm).

Tabelle 1

Rf-Werte	
Fliessmittel	S 53210/A-III
Methylenchlorid-Methanol-Wasser (80:17,5:2)	0,68

Rf-Werte

Fliessmittel

S 53210/A-III

5 Methylenchlorid-Methanol-Wasser (80:17,5:2) + 1% Eisessig 0,63

Als Nachweisreagens kann Jod verwendet werden. Beim Ansprühen mit einer 0,2%igen Ce(SO₄)₂-Lösung in 50%iger Schwefelsäure und Erwärmen auf 130° gibt S 53210/A-III eine graue bis braune Anfärbung.

Das Antibiotikum S 53210/A-III ist antimikrobiell wirksam; insbesondere hemmt es vorwiegend das Wachstum von grampositiven Bakterien. Es zeigt eine sehr breite Aktivität gegen grampositive Bakterien, aber keine Wirkung gegen Hefen und Pilze.

Die Wirkung erstreckt sich auch auf die pathogenen Vertreter der grampositiven Bakterien, wie *Staphylococcus*, *Streptokokken*, *Corynebakterien*, *Mycobakterien*. Auch gegen *Mycoplasmen* und *Neisserien* ist das neue Antibiotikum wirksam.

Im Reihenverdünnungstest wurden folgende Mindesthemmkonzentrationen erhalten (mcg/ml):

Organismus	MIC
S. aureus	0,01
30 S. aureus res. Penicillin	0,01
S. aureus res. Tetracyclin	0,1
S. aureus res. Rifamycin	0,01
S. aureus 6538P	0,03
Streptococcus faecalis res. Aminoglykoside	0,3
35 Streptococcus pyogenes	0,3
Streptococcus faecalis	0,3
Streptococcus haemolyticus	0,01
Diplococcus pneumoniae	0,3
Corynebacterium equi	0,3
40 Sarcina lutea res. Erythromycin	0,3
Bacillus subtilis	1,0
Clostridium sphenoides	1,0
Clostridium pasteurianum	0,03
Mycobacterium thamnophes	0,3
45 Mycobacterium smegmatis	0,3
Mycoplasma laidlawii	3,2
Mycobacterium gallisepticum	3,0
Neisseria catharalis	0,3
Neisseria pharyngis	0,1

50

Medium Brain Heart Infusion Broth, Inoculumdichte 10⁵ Keime/ml, Inkubationstemperatur 37°, Inkubationszeit 24 Stunden.

55 Das neue Antibiotikum S 53210/A-III kann für humanmedizinische Zwecke als Arzneimittel allein, und zwar in reiner Form oder in den entsprechenden Arzneiformen für topische, enterale oder parenterale Verabreichung verwendet werden.

In den nachfolgenden Beispielen, welche die Ausführung des Verfahrens erläutern, den Umfang der Erfindung aber in keiner Weise einschränken sollen, erfolgen alle Temperaturangaben in Celsiusgraden.

Beispiel 1: Züchtung des Stammes S 53210/A in einer Schüttelkultur

65 a) Agar-Ausgangskultur

Die als Ausgangsmaterial verwendete Agarkultur des Stammes S 53210/A erhält man, indem man ein Kulturmedium (I) folgender Zusammensetzung

	g/Liter
Cerelose (Glucose)	4,0
Malz-Extrakt	10,0
Hefe-Extrakt	4,0
Agar (Bacto)	20,0
destilliertes Wasser	1 Liter

mit einer auf an sich bekannten Weise hergestellten Sporen suspension des ursprünglich isolierten Stammes S 53210/A beimpft. Das Medium wird vor der Sterilisation mit NaOH auf pH 8,3 bis 8,6 eingestellt und beträgt nach der Sterilisation (20 Minuten bei 120°) 6,9 bis 7,3.

b) Sporensuspension

Eine gut sporulierende Agar-Ausgangskultur des Stammes S 53210/A wird mit 5 ml steriler, 0,9%iger Kochsalzlösung versetzt, was eine dichte Sporen- und Mycelsuspension ergibt.

c) Vorkulturen

Von dieser Sporensuspension wird 1 ml zur Beimpfung eines 200-ml-Erlenmeyer-Kolbens verwendet, der 50 ml des folgenden Vorkulturmediums (II) enthält:

	g/Liter
Dextrin	10,0
Glucose	10,0
Pepton	5,0
Hefeextrakt	5,0
CaCO ₃	1,0
destilliertes Wasser	1 Liter

Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,2 eingestellt. Das Vorkulturmedium wird in einem Autoklav bei 120° während 20 Minuten sterilisiert, worauf der pH-Wert 7,0 bis 7,2 beträgt.

Die so angesetzte Vorkultur wird während drei Tagen bei 27° auf einer Rundsüttelmaschine (220 U/Min.) aerob inkubiert und wird zur Beimpfung einer zweiten Vorkultur verwendet, indem 5 ml der ersten Vorkultur in einem 500-ml-Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml des folgenden Mediums (III) geimpft werden:

	g/Liter
Fleischextrakt	3,0
Trypton	5,0
Glucose	1,0
Stärke löslich	24,0
Hefeextrakt	5,0
CaCO ₃	2,0
destilliertes Wasser	1 Liter

Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,2 eingestellt und das Medium in einem Autoklav bei 120° während 20 Minuten sterilisiert, worauf der pH-Wert 7,0 bis 7,2 beträgt.

d) Hauptkultur

Die zweite Vorkultur wird während 3 Tagen bei 27° auf einer Rundsüttelmaschine (220 U/Min.) aerob inkubiert und wird dann direkt zur Beimpfung einer Hauptkultur verwendet, indem 5 ml der zweiten Vorkultur in einem 500-ml-Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml des folgenden Mediums (IV) geimpft werden:

	g/Liter
Malzextrakt	30,0
Blutpepton	7,5
destilliertes Wasser	1 Liter

Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,0 eingestellt und das Medium in einem Autoklav bei 120° während 20 Minuten sterilisiert, worauf der pH-Wert 6,8 bis 7,0 beträgt. Die so ange-

setzte Hauptkultur wird während 5 Tagen bei 27° auf einer Rundsüttelmaschine (220 U/Min.) inkubiert.

Beispiel 2: Züchtung des Stammes S 53210/A in einem Fermenter

Die Ausgangskultur für die Züchtung eines 500-Liter-Fermentationsansatzes ist eine Standkultur (Erlenmeyerkolben zu 500 ml mit 100 ml Agar) des ursprünglich isolierten Stammes S 53210/A. Diese Kultur mit dem Agarmedium, das pro Liter 20 g Agar, 20 g Malzextrakt, 4 g Hefeextrakt und entmineralisiertes Wasser enthält, wird 14 Tage bei 33° bebrütet. Mit 200 ml Sporen- und Mycelsuspension aus 2 Standkulturen wird 1 Glasfermenter mit 10 Liter Nährlösung der folgenden Zusammensetzung angeimpft: 20 g Glukose, 5 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 1 g CaCO₃ und entmineralisiertes Wasser ad 1 Liter. Diese Vorkultur wird 4 Tage bei 30° mit einer Lufrate von 0,7 Liter V/V/Min. und einer Rührerdrehzahl von 250 UPM inkubiert. Die Zwischenkultur im 75-Liter-Stahlfermenter (50 Liter Gärvolumen) wird mit 7 Liter aus der Vorkultur angeimpft, das Medium hat die gleiche Zusammensetzung wie die Vorkultur: 20 g Glucose, 5 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 1 g CaCO₃ und entmineralisiertes Wasser ad 1 Liter. Die Inkubation erfolgt 3 Tage bei 30° mit einer Lufrate von 0,7 Liter V/V/Min. bei 0,5 bar Druck und einer Rührerdrehzahl von 200 UPM.

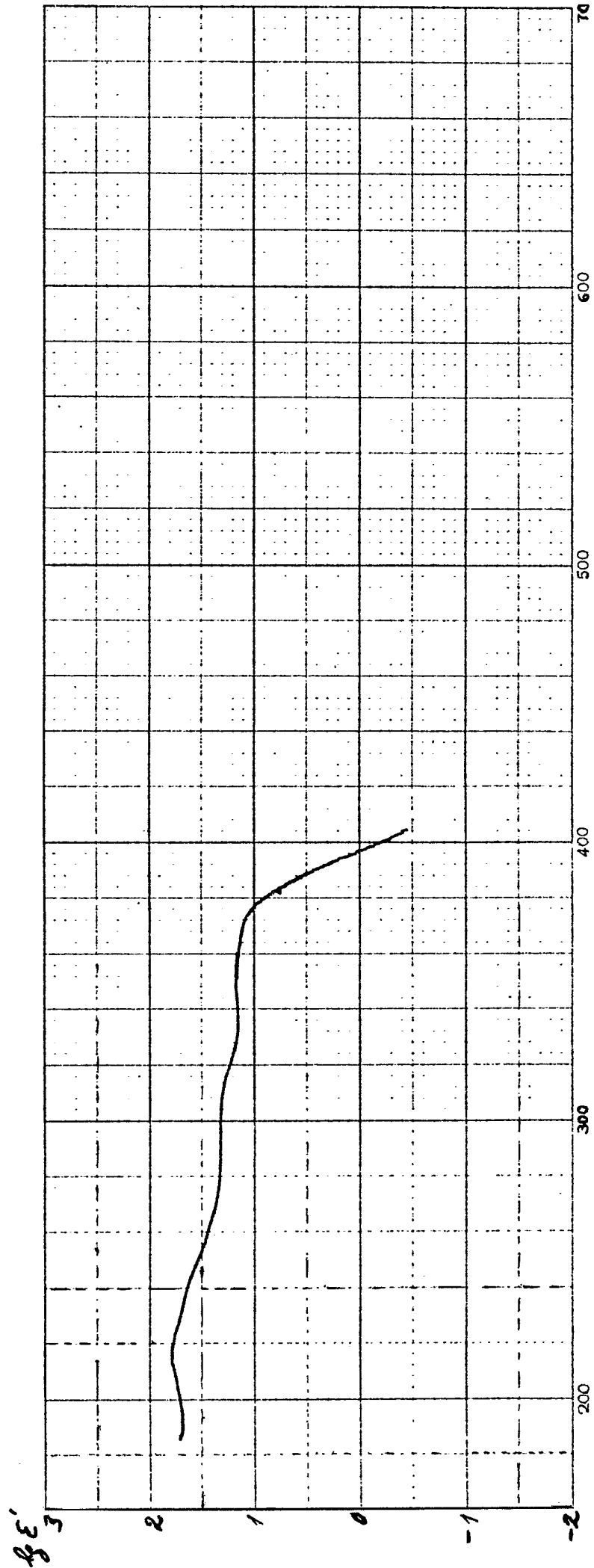
Die Hauptstufen-Fermentation im 750-Liter-Gärtank (500 Liter Gärvolumen) erfolgt bei 30° mit einer Nährlösung folgender Zusammensetzung: pro Liter 30 g Malzextrakt, 7,5 g Blutpepton, 1 mg FeSO₄ · 7 H₂O, 1 mg MnCl₂ · 4 H₂O, 1 mg ZnSO₄ · 7 H₂O und entmineralisiertes Wasser. Die Inkubation dauert 4 Tage bei einer Rührerdrehzahl von 130 UPM und einer Lufrate von 0,7 Liter V/V/Min. und bei 0,5 bar Druck. Der pH-Endwert liegt bei 7,8.

Beispiel 3: Isolierung von S 53210/A-III

500 Liter Kulturbrühe werden mit 2N Schwefelsäure auf pH 7 gestellt, mit 500 Liter Essigester versetzt und 90 Minuten mit einem Dispax-Reaktor homogenisiert. Die Abtrennung der organischen Phase erfolgt mit einem Westfalia-Trennseparator. Der Extrakt wird nach Waschen mit 100 Liter Wasser im Vakuum bei 20 bis 40° Konzentrattemperatur zur Trockene eingeeengt (146 g Rohextrakt). Die Wiederholung der Extraktion ergab nochmals 51 g Rohextrakt.

Die 197 g vereinigten Extrakte werden unter Rühren zu 2 Liter Hexan gegeben. Die überstehende Lösung wird abdekantiert und der ölige Rückstand im Vakuum bei 50° vom Lösungsmittel befreit, wobei 80,2 g Fällungsprodukt mit Aktivität gegen Staphylococcus aureus anfallen. Dieses Material wird in Chloroform-Methanol (1:1) gelöst und die Lösung auf eine mit Chloroform-Methanol (1:1) bereitete Säule von 1 kg Sephadex LH₂₀ gebracht. Die Elution mit Chloroform-Methanol (1:1) liefert 14,5 g Fraktionen, die S 53210/A-III enthalten. Diese werden in Methylenchlorid + 3% Methanol gelöst und die Lösung auf eine mit Methylenchlorid + 3% Methanol bereitete Säule von 250 g Kieselgel Merck (Korngröße 0,063–0,2 mm) aufgegeben. Die Elution erfolgt zuerst mit Methylenchlorid unter Zusatz von 3 bis 5% Methanol, dann mit Methylenchlorid + 10% Methanol. Man erhält 4,8 g angereicherte Fraktionen von S 53210/A-III. Die Fraktionen werden in 25 ml Methylenchlorid gelöst und nach Zugabe von 50 ml Methanol bei Raumtemperatur eingeeengt, wobei S 53210/A-III ausfällt. Die Substanz wird abfiltriert und mit Methanol und Äther gewaschen. Man erhält S 53210/A-III als amorphes gelbes Pulver. Smp. >300° nach 15 Stunden Trocknen im Hochvakuum bei Raumtemperatur.

Die Reinheitsprüfung der gegen Staphylococcus aureus aktiven Chromatographiefraktionen erfolgt dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel mit Methylenchlorid-Methanol-Wasser (88:11:1) und Methylenchlorid-Methanol-Wasser (92:7,5:0,5) als Fließmittel.



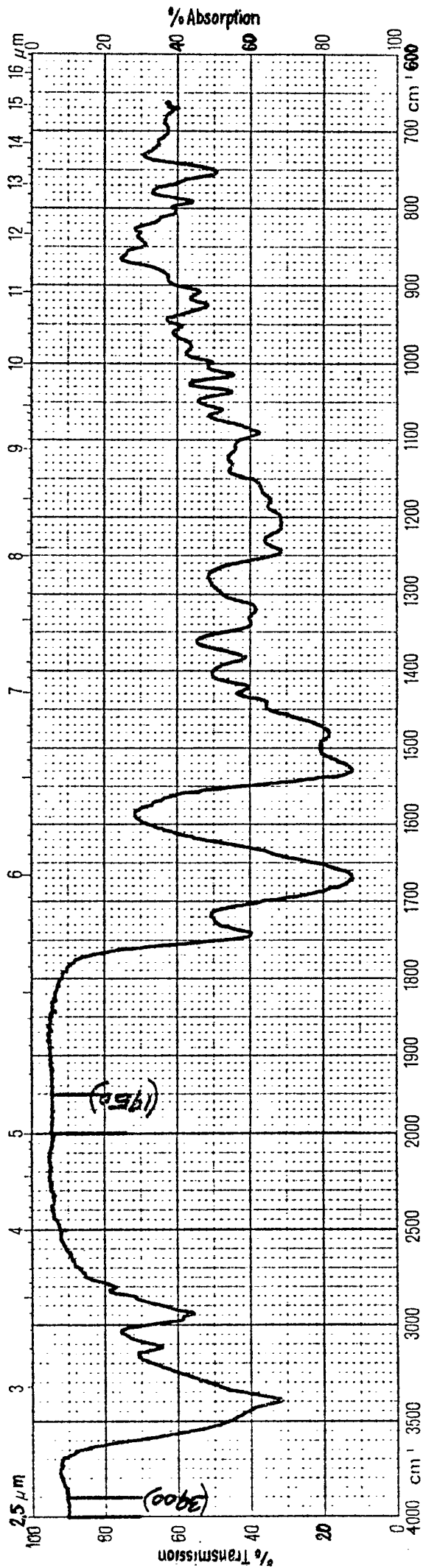


Fig. 2

Case 100-4906

Case 100-4906

Fig. 3

