



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑪ CH 650 785 A5

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein

Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

 ⑤① Int. Cl. 4: C 07 D 487/04
 C 12 P 17/10
 A 61 K 31/395

// (C 12 P 17/10, C 12 R 1:465)

⑫ FASCICULE DU BREVET A5

⑲ Numéro de la demande: 5331/81

⑳ Date de dépôt: 18.08.1981

 ③① Priorité(s): 19.08.1980 JP 55-112996
 11.11.1980 JP 55-157631

㉔ Brevet délivré le: 15.08.1985

 ④⑤ Fascicule du brevet
 publié le: 15.08.1985

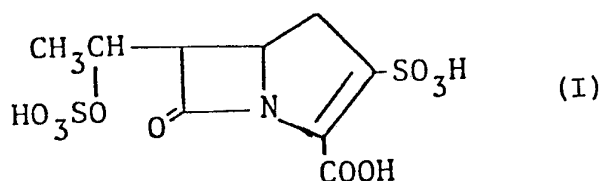
 ⑦③ Titulaire(s):
 Meiji Seika Kaisha Limited, Chuo-ku/Tokyo (JP)

 ⑦② Inventeur(s):
 Ito, Tatsuo, Isehara-shi/Kanagawa (JP)
 Shomura, Takashi, Yokohama-shi/Kanagawa (JP)
 Kojima, Michio, Sibuya-ku/Tokyo (JP)
 Ezaki, Norio, Yokohama-shi/Kanagawa (JP)
 Sezaki, Masaji, Setagaya-ku/Tokyo (JP)
 Niwa, Tomizo, Yokohama-shi/Kanagawa (JP)

 ⑦④ Mandataire:
 Micheli & Cie, ingénieurs-conseils, Genève

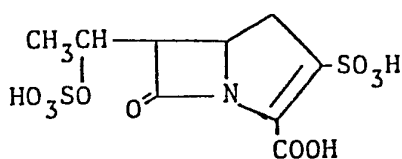
⑤④ Substance antibiotique et procédé pour sa production.

⑤⑦ La substance antibiotique SF-2103A représentée par la formule I, ainsi que les sels de cette substance, présente une activité antibactérienne contre différentes bactéries gram-positive et gram-négative, y compris contre les bactéries qui sont résistantes aux antibiotiques connus. Cet antibiotique et les sels de celui-ci, peuvent être obtenus par culture d'une souche appartenant au genre Streptomyces, notamment d'une souche de Streptomyces sp. SF-2103 ATCC 31892, dans un milieu nutritif et récupération à partir du bouillon de culture.



REVENDECATIONS

1. Composé chimique représenté par la formule (I),



ou un sel de celui-ci.

2. Composé selon la revendication 1 sous la forme de son sel de frisdium.

3. Procédé pour la production du composé de formule (I) selon la revendication 1 ou d'un sel de celui-ci, caractérisé par le fait qu'il comprend la culture d'une souche de production appartenant au genre *Streptomyces* dans un milieu nutritif, et la récupération du composé désiré ou du sel de celui-ci à partir du bouillon de culture.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé par le fait que la souche de production est une souche *Streptomyces* sp. SF-2103 ayant la désignation ATCC 31892.

5. Composition antibiotique comprenant un composé de formule (I) ou un sel de celui-ci selon la revendication 1 ou la revendication 2.

6. Composition antibiotique selon la revendication 5, caractérisée par le fait qu'elle comprend en outre un produit antibiotique pénicilline ou céphalosporine.

7. Souche de *Streptomyces* sp. SF-2103 ayant la désignation ATCC No 31 892 en tant que moyen de mise en œuvre du procédé selon la revendication 3.

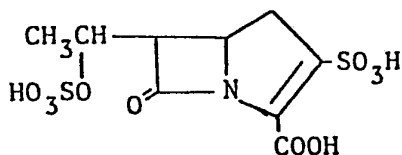
La présente invention se rapporte à une nouvelle substance antibiotique et aux sels de celle-ci, ainsi qu'à un procédé pour sa production.

On connaît différents micro-organismes qui peuvent produire des substances antibiotiques par culture dans un milieu nutritif contenant des sources de carbone et d'azote assimilables. Toutefois, un besoin constant existe pour des substances antibiotiques nouvelles et utiles.

Comme résultat d'études poussées en vue de trouver des antibiotiques nouveaux et utiles ayant une activité antibactérienne contre les bactéries gram-positives et gram-négatives, y compris contre les bactéries qui sont résistantes aux antibiotiques connus, il a été mis en évidence qu'un nouvel antibiotique, ci-après désigné par «substance SF-2103A», peut être obtenu par culture d'une souche appartenant au genre *Streptomyces* dans un milieu nutritif.

La substance antibiotique SF-2103A a été isolée, et les propriétés physiques et chimiques ainsi que les caractéristiques biochimiques de celle-ci ont été confirmées.

La nouvelle substance antibiotique SF-2103A objet de cette invention est représentée par la formule suivante (I)



(I)

Les figures annexées 1, 2 et 3 représentent les spectres respectivement d'absorption ultra-violet, d'absorption infra-rouge et de résonnance magnétique nucléaire de la substance antibiotique SF-2103A (sel de sodium).

5 Comme exemple de souches utilisables pour la production de la substance antibiotique SF-2103A on peut mentionner la souche *Actinomyces* SF-2103 isolée à partir de terre recueillie du sol de Katsuura, Préfecture de Wakayama au Japon.

10 Quatre grammes de terre ont été suspendus dans 40 ml d'eau stérilisée dans un flacon Erlenmeyer de 100 ml, agités sur un agitateur rotatif pendant 10 minutes, puis laissés au repos pendant 15 minutes. A la fin de cette durée, 4 ml de la partie surnageant ont été dilués 10 000 fois avec de l'eau stérilisée. Puis, 0,5 ml du liquide ainsi dilué ont été placés sur un vase de Petri, stérilisé à l'avance, mélangés de façon complète avec 20 ml d'un milieu agar en vue de la séparation telle que décrite ci-après, maintenus à 45-50 °C, puis solidifiés.

Le vase de Petri a été cultivé à 28 °C pendant 10 jours, et 20 des colonies de la souche SF-2103 croissantes sur le milieu agar ont été transférées à un «slant» levure - agar d'amidon (extrait de levure : 0,2%; amidon soluble : 1,0%; agar : 2,0%; pH : 7,0).

La composition du milieu agar pour la séparation était la 25 suivante : extrait de levure : 0,05%; amidon soluble : 0,25%; agar : 2,0%; reste : eau; pH 7,0.

Les caractéristiques de la souche *Actinomyces* SF-2103 sont les suivantes:

(I) Caractéristiques morphologiques:

30 Le mycélium et les spores sont formés dans un milieu de culture tel que agar d'amidon, agar de farine d'avoine, et levure-agar de malt. L'embranchement du mycélium aérien est monopodial, et aucun embranchement en troubillon n'a été trouvé. A l'extrémité supérieure du mycélium aérien, les spores sont reliées en chaîne presque linéaire. Aucune structure spéciale telle que sclérotium et sporangium n'ont été observées.

L'observation microscopique montre que les spores ont une surface lisse, une forme ovale ou ovoïde, et une dimension 40 de 0,7 à 0,8 × 1,0 à 1,5 microns, et qu'ils forment généralement une chaîne de 10 spores ou plus.

(II) Caractéristiques de culture:

Les caractéristiques de cultures de la souche SF-2103 sur différents milieux de culture sont présentées dans le tableau 1 45 ci-après. L'observation a été effectuée après culture à 28 °C pendant 14 à 21 jours. La couleur mentionnée dans le tableau 1 a été identifiée selon le standard de couleur du «Color Harmony Manual», 4ème édition, publié par Container Corporation of America, Chicago, Illinois (1958).

50 La couleur rose pâle du mycélium aérien sur les milieux agar d'amidon, agar de farine d'avoine et levure-agar de malt disparaît facilement avec la diminution de la faculté de formation de spore. En outre, le mycélium aérien présente une forte tendance à fondre et à disparaître lorsque la culture est réa- 55 lisée sur une certaine période de temps.

Tableau 1

Milieu de culture	Croissance et couleur inverse	Mycélium aérien	Pigment soluble
Agar sucrose-nitrate	Très faible croissance incolore	Aucun	Aucun
Agar Glucose-asparagine	Faible croissance incolore	Aucun	Aucun
Agar Glycérol-asparagine	Faible croissance incolore	Aucun	Aucun
Agar d'amidon	croissance modérée beige pâle	Modéré, rose pâle (5cb)	Légèrement gris rose
Agar de farine d'avoine	croissance modérée beige pâle	Modéré, rose pâle (5cb)	Aucun
Agar levure-malt	bonne croissance beige pâle	Modéré, rose pâle (5cb)	Aucun
Agar de tyrosine	faible croissance incolore	Aucun	Aucun
Agar nutritif	faible croissance incolore	Aucun	Aucun
Agar de malte de calcium	faible croissance incolore	Aucun	Aucun
Agar de Bennett	Bonne croissance ridé	Aucun	Aucun

(III) Caractéristiques physiologiques:

(1) Domaine de température de croissance : la croissance a lieu sur agar d'amidon dans un domaine compris entre 15 et 45 °C; la température optimale étant comprise entre 25 et 35 °C.

(2) Liquéfaction de la gélatine : positif

(3) Hydrolyse de l'amidon : positif

(4) Coagulation du lait écrémé : négatif

Peptonisation du lait écrémé : positif

(5) Réduction du nitrate : négatif

(6) tolérance du NaCl : la croissance a lieu sur un milieu de culture avec une addition de 3% de NaCl, mais non avec une addition de 5% de NaCl.

(7) Production de pigment mélanoidé : négatif

(IV) Utilisation de sources de carbone (milieu agar de Pridham et Gottlieb à 28 °C)

(1) Utilisable : D-Glucose, L-Rhamnose, D-Fructose, D-Xylose, L-Arabinose, D-Mannitol, Sucrose

(2) Non utilisable : Raffinose, I-Inositol

(V) Composition de la paroi cellulaire:

L'analyse selon la méthode proposée par Becker et al. dans *Applied Microbiology*, vol 13, page 236 (1965) montre que l'acide diaminopimélique contenu dans la composition de la paroi cellulaire est du type LL.

Pour résumer les caractéristiques précitées, la souche SF-2103 appartient au genre *Streptomyces*, l'extrémité supérieure du mycélium aérien est linéaire et la structure de la surface de des spores est lisse.

La couleur du mycélium aérien vieilli appartient à la série de couleur rouge selon H.D. Tresner et E.J. Backus, *Applied Microbiology*, Vol 11, p. 335 (1963), et la couleur inverse est beige pâle. La formation de pigment mélanoidé n'a pas été observée.

Par comparaison des caractéristiques taxonomiques précitées de la souche SF-2103 avec celle des souches connues appartenant au genre *Streptomyces*, la nouvelle souche SF-2103 a ainsi été identifiée.

Il a été trouvé que bien que l'on ne connaisse pas de souche ayant des propriétés identiques à la souche SF-2103, le *Streptomyces alborubidus* (*International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol 22, p. 271-273 (1972) est quelque peu similaire à celle-ci.

Ainsi, la souche standard de *Streptomyces alborubidus*, ISP No 5464 (ISP: International Streptomyces Project (*International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol 18, p. 69, 1968)), et la souche SF-2103 ont été comparées.

Les deux souches comparées se sont révélées être clairement différentes l'une de l'autre en ce qui concerne la croissance sur différents milieux agar, bien qu'ils soient par contre relativement similaires en ce qui concerne la couleur du mycélium aérien et l'utilisation du sucre. Ainsi, la croissance du *Streptomyces alborubidus* sur les milieux agar sucrose nitrate et agar glucose asparagine était bonne, de même que la formation du mycélium aérien, alors que la croissance de la souche SF-2103 sur les milieux précités était très faible et qu'aucune formation de mycélium aérien n'ait été observée. Au contraire, sur le milieu agar de farine d'avoine, la souche SF-2103 croît bien et la formation de mycélium aérien se produit, alors que la croissance de *Streptomyces alborubidus* est faible sur ce même milieu. En outre, l'extrémité supérieure du mycélium aérien du *Streptomyces alborubidus* a été souvent observée comme ayant une forme de boucle ou de crochet, alors que celle de la souche SF-2103 était toujours linéaire. De plus, il n'y a aucune souche connue qui présente la couleur du mycélium aérien, la série de couleur rouge, la forme linéaire du mycélium aérien et la surface lisse des spores, qui ont été observées pour la souche SF-2103.

Ainsi, on peut conclure que la souche SF-2103 diffère de toutes les souches appartenant au genre *Streptomyces* qui ont été divulguées jusqu'à présent, et qu'elle est par conséquent nouvelle, cette souche SF-2103 ayant été dénommée *Streptomyces sulfonofaciens* sp. nov.

Cette souche a été déposée comme *Streptomyces* sp. SF-2103 au Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry, 1-3, Higashi 1-chome, Yatabe-machi Isubuka-gun, Ibaraki-Ken 305, Japan, sous le numéro d'identification FERM-P No. 5636 (21 juin 1980) (actuellement la souche est identifiée par FERM-BP No. 5 (1er mai 1981), selon le traité de Budapest sur la reconnaissance internationale du dépôt des micro-organismes aux fins de la procédure en matière de brevet), ainsi qu'à la American Type Culture Collection 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852,

USA, sous le numéro d'identification ATCC 31892 (9 mai 1981).

La souche SF-2103 varie facilement dans ses propriétés, comme cela est le cas des autres souches appartenant au genre *Streptomyces*. De telles variations peuvent être produites par irradiation, par exemple avec des rayons ultra-violet, des rayons X, des rayons radio-actifs et des produits chimiques. C'est pourquoi, toutes ces variantes et mutantes peuvent être utilisées dans le procédé selon l'invention, pour autant qu'elles aient la possibilité de produire la substance SF-2103A.

Conformément au procédé selon l'invention, la souche décrite ci-dessus est cultivée dans un milieu contenant des éléments nutritifs qui sont assimilables par des micro-organismes connus. De tels éléments nutritifs peuvent être des produits connus conventionnellement utilisés dans la culture des souches *Actinomyces*. Des exemples de souches de carbone qui peuvent être utilisées comprennent le glucose, le glycérol, l'amidon, la dextrine, le sirop de maltose, les mélasses et l'huile de soya. Les exemples de source d'azote qui peuvent être utilisés comprennent la farine de soya, les germes de blé, la farine de graines de coton, des extraits de viande, la peptone, les extraits de levure, de la liqueur infusée de blé, du sulfate d'ammonium, et du nitrate de sodium. En outre, si désiré, des sels inorganiques tels que carbonate de calcium, chlorure de sodium, sulfate de magnésium, sulfate de sodium, chlorure de cobalt, sulfate ferreux et des phosphates (plus particulièrement de préférence du sulfate de sodium et du chlorure de cobalt), ainsi que ceux des produits organiques et inorganiques qui favorisent la croissance microbienne et la production de la substance désirée SF-2103A peut être ajoutée. En outre, si désiré, un agent démoissant (par exemple Silicon KM68-2F, produit par Shin-Etsu Chemical Industry Co., Ltd, Tokyo) peut être ajouté.

Pour la culture du *Streptomyces* sp. SF-2103, la méthode de culture liquide, et plus particulièrement la méthode de culture par submersion dans des conditions aérées, est la plus appropriée, comme cela est le cas pour la production des antibiotiques connus. Le domaine de température adéquat pour la culture est compris entre 20 et 35 °C. Dans de nombreux cas, il est préféré d'effectuer la culture dans un domaine de température compris entre 23 et 30 °C. La production de la substance SF-2103A atteint un maximum généralement en 1 à 10 jours dans les deux cas de la culture sous agitation et de la culture en cuve (culture submergée), bien que le temps optimum dépende du milieu et de la méthode de culture utilisée.

La substance SF-2103A peut être déterminée de façon quantitative par mesure de l'activité anti-bactérienne de celle-ci au moyen d'une technique d'essai biologique, en utilisant une souche appropriée comme organisme test, comme dans le cas des antibiotiques conventionnels, étant donné qu'il s'agit d'une substance antibactérienne et qu'elle présente une activité antibactérienne contre les bactéries gram-positives et gram-négatives. Toutefois, étant donné que la substance SF-2103A est caractérisée par le fait qu'elle présente une forte activité inhibitrice β -lactamase de même qu'une activité antibactérienne, une nouvelle technique appelée essai d'activité inhibitrice β -lactamase comme décrit ci-après peut également être employé pour sa détermination rapide et sûre.

Selon cette technique d'essai nouvellement conçue, l'endo- β -lactamase produit par *Proteus vulgaris* M-8243 est employé comme β -lactamase. L'endo- β -lactamase est inoculé dans une solution de bouillon Kyokuto 2% (pH = 7 avant stérilisation) et incubé à 32 °C. Immédiatement après le début de l'incubation, puis après 2 et 4 heures à compter du début de cette incubation, un sel de potassium de benzyl-pénicilline a été ajouté comme substance d'induction de β -lactamase de telle sorte que sa concentration soit de 250 μ g/ml, puis l'incubation est poursuivie pendant 7 à 8 heures à compter du début de

l'incubation. A la fin de cette durée, l'incubation est arrêtée, et la souche est recueillie par séparation centrifuge. La masse de cellules mouillées ainsi obtenue est suspendue dans une solution tampon phosphate 0,1M (pH = 7,0) dont le volume est deux fois celui des cellules, et est placée dans un broyeur de cellules (par exemple un «French pressure cell») où les cellules sont disloquées. La suspension obtenue est soumise à la séparation centrifuge (10 000 tours par minute pendant 10 minutes) et les fragments de cellules précipités sont éliminés. La portion surnageant ainsi obtenue est dialysée pendant une nuit avec une solution tampon phosphate 0,1M (pH = 7,0) à 5 °C et la solution de dialysat est obtenue sous la forme d'une solution d'enzyme β -lactamase brut. La solution de dialysat a une activité comme β -lactamase de 5 000 à 6 000 unités (μ /ml) comme déterminé par une méthode modifiée de la méthode de Sergeant pour la mesure de l'activité enzymatique décrite ci-après.

La β -lactamase ainsi préparée est utilisée pour préparer une plaque d'essai. Une solution à 2,3% d'agar nutritif (produit par Difco Corp.) est stérilisée dans un autoclave et est refroidi à 45 °C. A 250 ml de la solution sont ajoutés 0,5 ml d'un germe de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 qui a été préalablement cultivé pour germination, et une quantité de 125 unités de la solution de β -lactamase précitée, qui sont alors mélangées. Le mélange obtenu est versé dans un plateau ordinaire de 250 mm $\times$ 320 mm et y est solidifié.

Pour réaliser l'essai, 20 μ l de la solution à examiner sont placés sur un disque de papier (8 mm de diamètre) qui a été muni de 20 μ l d'une solution aqueuse d'acétone à 50% de sel de sodium de Cefalotine à une concentration de 50 μ g/ml, et a été ensuite séché à l'air. Le disque de papier ainsi préparé est placé dans un plateau d'essai, et lorsqu'il est maintenu à 37 °C pendant 15 à 17 heures, la zone inhibitrice apparaît dans une mesure dépendant de la concentration de la substance SF-2103A.

Dans cette technique d'essai, le logarithme de la concentration de la substance SF-2103A et le diamètre de la zone inhibitrice présente une relation linéaire dans le domaine de 0,03 μ g/ml de la concentration de la substance SF-2103A. Ainsi, cette substance SF-2103A peut être déterminée quantitativement de façon sûre.

La substance SF-2103A est accumulée principalement dans un filtrat de bouillon de culture. La substance SF-2103A contenue dans le bouillon de culture peut être extraite et purifiée selon les caractéristiques physiques et chimiques de celle-ci comme décrit ci-après. Pour une telle extraction et purification, la méthode suivante est efficace.

Un bouillon de culture contenant les substances désirées est filtré pour éliminer les produits solides, et le filtrat obtenu est adsorbé sur du carbone actif, puis est élué avec une solution aqueuse à 50% d'acétone. Les fractions contenant les substances désirées sont recueillies et concentrées. Après élimination par distillation de l'acétone, les substances désirées sont extraites avec un haloalcane, par exemple du dichlorométhane, contenant un sel ammonium quaternaire tel que le chlorure d'ammonium benzyldiméthylcétyle ou chlorure d'ammonium benzyldiméthyltétradécyle et sont ensuite réextraites avec de l'eau contenant du iodure de sodium et séché par congélation pour obtenir comme produit brut la substance SF-2103A.

Pour une purification subséquente de la substance brute SF-2103A, la chromatographie utilisant des supports d'échange d'anion tels que DEAE-Sephalex A-25, QAE-Sephalex A-25, DEAE-cellulose et Dowex 1 $\times$ 2, est répétée. En outre, un milieu filtrant de type gel, tel que Biogel P-2, des résines poreuses, telles que Amberlite XAD, des colonnes de cellulose, etc. peuvent être utilisées pour des purifications subséquentes de la substance brute SF-2103A.

L'analyse de la substance SF-2103A ainsi purifiée sous forme de poudre par chromatographie en couche mince en utilisant divers solvants et autres méthodes analytiques (par exemple électrophorèse sur papier à haut voltage et chromatographie liquide à vitesse élevée) confirme qu'il s'agit bien d'une seule substance.

Cette substance SF-2103A est extrêmement instable aux températures supérieures à la température ambiante, ou dans un état acide ou alcalin tel que décrit ci-après. En isolant la substance SF-2103A du bouillon de culture, il convient de faire attention à ce que la solution ne devienne pas acide ou alcaline, et toutes les opérations doivent être effectuées rapidement à basses températures.

En outre, il est difficile d'isoler la substance SF-2103A sous la forme de l'acide libre, à cause du fait que, comme décrit ci-dessus, celle-ci est très instable à l'état acide. La substance SF-2103A est par conséquent obtenue comme sel de celle-ci sous la forme d'une poudre amorphe jaune pâle ou blanche par séchage par congélation de la solution aqueuse neutre de celle-ci. La pureté de la substance SF-2103A obtenue varie selon le pouvoir du bouillon de culture.

Le type de sel est déterminé par le cation utilisé dans la purification. Par exemple, lorsque la purification a été effectuée par chromatographie en utilisant du DEAE Sephadex A-25 et avec de l'eau NaCl comme éluat, la substance SF-2103A est obtenue comme un sel de sodium. Des sels acceptables du point de vue pharmaceutique autres que le sel de sodium comprennent les sels de métaux alcalins (par exemple potassium), des sels de métaux alcalino terreux (par exemple calcium), des sels inorganiques (par exemple sels d'aluminium et d'ammonium), et des sels organiques (par exemple sels d'ammonium substitués) qui peuvent être préparés de la même manière que ceux utilisés pour la préparation du sel de sodium. En outre, la transformation du sel de sodium en un autre sel peut être réalisée en faisant passer la solution du sel de sodium aqueux à travers une résine échangeuse de cation, telle que Dowex 50W, qui a été préalablement munie des cations désirés.

Les propriétés physiques et chimiques du sel de sodium de la substance SF-2103A, qui sont considérées comme étant celles du produit le plus pur ainsi obtenu, sont décrites ci-après. Il convient de noter, toutefois, que le sel de sodium de la substance SF-2103A peut contenir de l'eau ou d'autres impuretés à cause du fait qu'il est obtenu comme poudre séchée par congélation.

Les caractéristiques de la nouvelle substance antibiotique SF-2103A et des sels de celle-ci sont présentées ci-dessous. Les caractéristiques du sel de sodium de la substance SF-2103A sont les suivantes:

(1) Couleur et forme: obtenues sous la forme d'une poudre blanche par séchage par congélation («freeze-drying»)

(2) Point de fusion: pas de point de fusion net. La décoloration vers le brun et la décomposition avec formation de bulles a lieu à 168 °C.

(3) Rotation spécifique: $[\alpha]_D^{20} = -16,3$ (c 1, eau)

(4) Analyse élémentaire et formules moléculaires (l'échantillon est séché sous vide sur du pentoxyde de phosphore à température ambiante pendant 27 heures, puis la mesure est effectuée):

Calculé pour	Trouvé
$C_9H_8NO_{10}S_2Na_3 \cdot 2H_2O$	
(%)	
C 23.53	23.62
H 2.61	2.44
N 3.05	3.00

O	41.83
S	13.94
Na	15.03

42.16
(balance)
13.81
14.97
(déterminé par spectroscopie d'absorption atomique)

Le poids moléculaire est estimé à environ 450 selon les valeurs de l'analyse élémentaire et le spectre de résonance magnétique nucléaire.

(5) Spectre d'absorption ultra-violet: le spectre d'absorption ultra-violet comme déterminé dans un tampon phosphate 0,02M (pH = 7,2) présente des absorptions maximum de 266 à 267 nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 126$) et 230 nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 118$), comme montré dans la figure 1).

(6) Spectre d'absorption infra-rouge: Le spectre d'absorption infra-rouge comme déterminé par la méthode de la tablette de bromure de potassium est présenté dans la figure 2, avec des bandes d'absorption à 3450, 1755, 1610, 1390, 1220, 1080, 1040, 940, 900, 780 cm^{-1} .

(7) Spectre de résonance magnétique nucléaire: Le spectre de résonance magnétique nucléaire à 100 MHz déterminé dans l'eau lourde avec du tétraméthyl silane comme standard externe est représenté sur la figure 3, et comporte des signaux à δ 1,55 (d, 3H), δ 2,99 (dd, 1H), δ 3,44 (dd, 1H), δ 3,94 (dd, 1H), δ 4,48 (m, 1H), et δ 4,94 (m, 1H).

(8) Chromatographie en couche mince:

(a) Les valeurs R_f déterminées sur une couche mince de cellulose (cellulose F₂₅₄, produite par Merck & Co.) avec les solvants respectifs mentionnés ci-dessous à 5 °C sont les suivantes:

Solvant	Valeur R_f
n-butanol/isopropanol/eau (7/7/6 en volume)	0,30
solution aqueuse de n-propanol (60% en vol)	0,52
Solution aqueuse d'éthanol (70% en vol.)	0,62
Solution aqueuse d'acéto-nitrile (80% en vol.)	0,37

(b) Par détermination sur de la cellulose DEAE (polygram CEL 300 DEAE, produit Merck & Co.) avec un tampon phosphate 0,02M (pH = 7,2) contenant du chlorure de sodium 0,1M à 5 °C, la substance MC 696-SY2-A comme contrôle (substance décrite dans The Journal of Antibiotics, Vol. 30, p. 770, 1970) et est la même que la substance MM 4550 (décrite dans The Journal Of Antibiotics, Vol. 32, p. 295, 1979) présente une valeur R_f de 0,31, alors que la valeur R_f de la substance SF-2103A selon l'invention est de 0,14.

(9) Electrophorèse sur papier à haute tension:

Lorsque l'électrophorèse est réalisée sur un papier filtre «Toyo Filter Paper No 51» (produit par Toyo Roshi Co., Ltd.) ayant une largeur de 15 cm, avec le tampon décrit ci-après, à une tension constante de 2 800 volts pendant 15 minutes, dans un appareillage d'électrophorèse sur papier à haute tension (produit par Servant Instrument Corp.), avec une source électrique de haute tension HV 5000 A; et une cuve d'électrophorèse modèle LT 48A, la substance MC 696-SY2-A comme contrôle (décrite dans la demande de brevet japonaise publiée 14594/79) se déplace du côté de l'anode de 9,3 cm, alors que la substance SF-2103A selon l'invention se déplace vers l'anode de 15,3 cm. La solution tampon est

préparée par addition d'eau à 200 ml de pyridine et 8 ml d'acide acétique de telle sorte que le volume total soit de 3 litres et que le pH soit de 6,4.

(10) Chromatographie liquide à haute vitesse:

Comme déterminé par chromatographie liquide à haute vitesse dans les conditions décrites ci-après, le temps de rétention de la substance MC 696-SY2-A (telle que décrite précédemment) est de 5 minutes et 40 secondes, alors que la substance SF-2103A selon l'invention a un temps de rétention d'environ 20 minutes.

Conditions: chromatographie liquide à haute vitesse
Appareillage: ALC/GPC modèle 244 (produit par Waters Corp.,)

Colonne: ZIPAX SAX (produit par Du Pont Co.; diamètre interne 7,9 mm, longueur: 50 cm)

Eluat: Préparé par dissolution de nitrate de sodium dans un tampon phosphate 0,05M (pH = 7,2) à la concentration de 0,05M.

Débit: 3 ml par minute

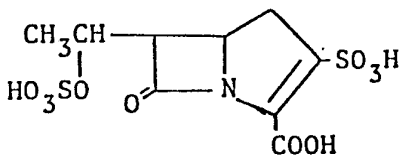
Longueur d'onde de détection de l'absorption ultra-violet: 313 nm et 254 nm

Température: Température ambiante (environ 20 °C)

(11) Solubilité: facilement soluble dans l'eau, soluble dans le méthanol et insoluble dans l'acétate d'éthyle, le chloroforme et le benzène.

(12) Réactions colorées: positives par rapport aux réactifs de Lemieux et Ehrlich, et négatives par rapport aux réactifs Ninhydrin.

Sur la base des propriétés physiques et chimiques décrites ci-dessus, il a été conclu que la substance (sous la forme du sel de trisodium de celle-ci), présente la structure suivante (I')



La substance SF-2103A exerce des effets synergétiques lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec des antibiotiques pénicilline et céphalosporine, qui sont inefficaces vis-à-vis des bactéries résistantes produisant la β -lactamase, étant donné qu'elle présente une activité inhibitrice de la β -lactamase qui est considérée comme étant la caractéristique principale de la substance SF-2103A, de même qu'une activité antibactérienne.

Ci-après, plusieurs résultats expérimentaux sont présentés pour illustrer de telles activités de la substance SF-2103A.

L'activité antibactérienne du sel de sodium de la substance SF-2103A a été déterminée par la méthode de dilution agar en accord avec la méthode standard recommandée par la Japanese Chemotherapy Association (voir Chemotherapy, vol. 22, p. 1126-1128, 1974) et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2 ci-après.

Tableau 2

Organisme test	Concentration inhibitrice minimum (μ g/ml)
Staphylococcus aureus 209P	25
Staphylococcus aureus Smith	25
Bacillus subtilis ATCC 6633	50
Escherichia coli No. 29	3,13
Escherichia coli NIHJ JC-2	12,5
Klebsiella pneumoniae PCI 602	50
Proteus mirabilis GN 310	50
Proteus vulgaris GN 76/C-1	25

Proteus morganii kono	25
Shigella dysenteriae Shigae	3,13
Citrobacter freundii GN 346	6,25
Serratia marcescens No. 1	50
5 pseudomonas aeruginosa E-2	> 100

Le milieu utilisé pour cette détermination était le «Heart Infusion Agar» (produit par Eiken Chemical Co., Ltd).

La détermination de l'activité inhibitrice β -lactamase de la substance SF-2103A par la méthode de Sargent (voir M.G. Sargent, Journal of Bacteriology, Vol. 95, p. 1493, 1968) a révélé que cette substance présente une activité inhibitrice β -lactamase puissante.

15 Test de l'activité β -lactamase par la méthode de Sargent:

La méthode de Sargent a été partiellement modifiée comme suit:

Réactifs

20 Réactif A: solution d'enzyme convenablement diluée avec un tampon phosphate 0,1M (pH = 7,0) de manière à présenter une densité optique de 0,6 de la consommation d'iode à 490 nm lorsque la mesure est effectuée dans les conditions mentionnées ci-dessous

25 Réactif B: Solution aqueuse du sel de potassium de pénicilline G 1,3% pour essai de pénicillinase.

Solution aqueuse du sel de sodium de Céphalosporine 1,3% pour essai de céphalosporinase (β -lactamase de Proteus vulgaris M-8243 ou Citrobacter freundii GN 346).

30 Réactif C: tampon phosphate 0,1M (pH = 7,0)

Réactif D: Solution de tampon d'acétate de iode préparée par addition de 5 ml de solution d'iode de réserve (la solution d'iode de réserve contient 0,32N de iode et 1,2M de iodure de potassium, préparée par dissolution de 20,3 g de iode et de 100 g de KI dans 500 ml d'eau distillée) à 95 ml de tampon acétate pH 4,0 (80 g d'acétate de sodium anhydre ajustés au pH 4,0 avec de l'acide acétique et complétés à 2 litres avec de l'eau distillée).

40 Technique d'essai

Un mélange réactionnel consistant en 0,5 ml du réactif B et 2 ml du réactif C est préincubé pendant 5 minutes à 30 °C, et 0,5 ml du réactif A est ajouté à ce mélange et est maintenu pendant 30 minutes à 30 °C. A la fin de la réaction, 5 ml du réactif D est ajouté avec un mélange rapide et maintenu pendant 10 minutes à 30 °C, puis la densité optique à 490 nm est mesurée.

Comme blanc test, un mélange d'incubation contenant 0,5 ml de réactif B et 2 ml du réactif C est maintenu à 30 °C pendant 30 minutes, après que 5 ml du réactif D et 0,5 ml du réactif A aient été ajoutés à celui-ci. Puis la densité optique est mesurée de la même manière.

Test de l'activité inhibitrice β -lactamase

55 La détermination de l'activité inhibitrice de β -lactamase est effectuée de la même manière que pour la détermination de l'activité β -lactamase comme décrit ci-dessus, excepté en ce que la solution préparée par dilution d'une substance inhibitrice avec le réactif C comme décrit ci-dessus est employé comme réactif C.

Le blanc test est réalisé de la même manière que dans le cas du test d'activité β -lactamase en utilisant le réactif C contenant l'inhibiteur. Ainsi, la concentration de la substance SF-2103A requise pour provoquer 50% d'inhibition de la pénicillinase a été déterminée.

65 Afin d'examiner l'activité inhibitrice de la substance antibiotique SF-2103A contre d'autres β -lactamases par exemple un enzyme produit par Proteus vulgaris M-8243 et un enzyme

produit par *Citrobacter freundii* GN 346 (tous deux étant préparés par la méthode de préparation décrite précédemment), la même technique que pour la pénicillinase a été utilisée, excepté en ce que les β -lactamases précitées ont été utilisées à la place de la pénicillinase dans le réactif A, et qu'un sel de sodium de Céfalo-tine a été utilisé à la place du sel de potassium de Pénicilline G dans la solution B. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3 ci-après.

Une unité d'activité β -lactamase selon la méthode de Sar-

gent telle qu'utilisée ici est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour décomposer un μ mol d'un sel de potassium de Pénicilline G ou de sel de sodium de Céfalo-tine en 60 minutes dans les conditions utilisées pour la présente méthode de détermination.

Tableau 3

Activité inhibitrice β -lactamase de la substance SF-2103A

β -lactamase	Substrat	Taux d'inhibition
Pénicillinase	Sel de potassium de la Pénicilline G	34,4% à 10 μ g/ml
<i>Proteus vulgaris</i> M-8243	Sel de sodium de la Céfalo-tine	concentration (I_{50}) pour 50% d'inhibition: 0,013 μ g/ml
<i>Citrobacter freundii</i> GN 346	do	concentration (I_{50}) pour 50% d'inhibition: 0,18 μ g/ml

L'effet de la substance SF-2103A comme agent inhibiteur de β -lactamase contre les souches bactériennes produisant la β -lactamase a été examiné par rapport à l'Ampicilline, la Carbénicilline, la Céfalo-tine, la Céfalo-ridine. Comme souche de production de β -lactamase, *Proteus vulgaris* M-8243 (produisant un large domaine de Céphalosporinase), *Proteus rettgeri* GN 624 (produisant des Céphalosporinases typiques) et *Citrobacter freundii* GN 346 (produisant des Céphalosporinases typiques) ont été utilisés. Des plaques d'agar d'essai inoculées avec ces souches ont été préparées par une technique conventionnelle. 10 μ g d'Ampicilline, 2 μ g de Carbénicilline,

2 μ g de Céphalo-tine et 5 μ g de Céfalo-ridine ont été respectivement placés chacun sur un disque de papier d'un diamètre de 8 mm et, en outre, la substance SF-2103A a été ajoutée en une quantité de 1 μ g, 0,2 μ g et 0,04 μ g comme indiqué dans le tableau 4 ci-après.

Les disques de papier ont été placés sur les plaques d'agar des souches de production de β -lactamase, et l'incubation a été réalisée à 37 °C pendant 16 heures en vue d'examiner la présence de la zone d'inhibition. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4 ci-après.

Tableau 4

Effets synergétiques de la substance SF-2103A en combinaison avec des Antibiotiques β -lactam

		Diamètre de la zone d'Inhibition (mm)		
Antibiotiques		<i>Proteus vulgaris</i> M-8243	<i>Proteus rettgeri</i> GN 624	<i>Citrobacter freundii</i> GN 346
Ampicilline (10 μ g)		0	0	0
do.	+ SF-2103A (1 μ g)	20.9	14.6	19.7
do.	+ SF-2103A (0.2 μ g)	20.0	10.0	11.3
do.	+ SF-2103A (0.04 μ g)	18.0	0	0
Carbénicilline (2 μ g)		0	0	0
do.	+ SF-2103A (1 μ g)	15.2	16.7	13.6
do.	+ SF-2103A (0.2 μ g)	13.3	11.1	11.7
do.	+ SF-2103A (0.04 μ g)	12.1	0	10.0
Céfalo-tine (2 μ g)		0	0	0
do.	+ SF-2103A (1 μ g)	15.3	11.5	16.6
do.	+ SF-2103A (0.2 μ g)	14.8	0	11.0
do.	+ SF-2103A (0.04 μ g)	14.1	0	9.0

Tableau 4 (suite)

Antibiotiques	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)		
	Proteus vulgaris M-8243	Proteus rettgeri GN 624	Citrobacter freundii GN 346
Céfalaridine (5 µg)	0	0	0
do. + SF-2103A (1 µg)	16.2	14.3	17.3
do. + SF-2103A (0.2 µg)	16.2	9.0	12.0
do. + SF-2103A (0.04 µg)	14.2	0	0
SF-2103A (1 µg)	0	0	0

En ce qui concerne les disques de papier ne contenant pas de substance SF-2103A, aucune zone d'inhibition n'a été observée, alors que pour les disques de papier contenant la substance SF-2103A en combinaison avec les antibiotiques β -lactam, la zone d'inhibition a été observée, variant selon la concentration de cette substance SF-2103A. Ceci indique que la substance SF-2103A inhibe la production de β -lactamase par l'organisme test, et comme résultat, que l'antibiotique β -lactam peut présenter l'activité antibactérienne de celle-ci. La substance SF-2103A lorsqu'elle est utilisée seule ne présente pas de zone d'inhibition pour les organismes tests même dans la concentration maximum 61 µg).

Il est par conséquent clair que la substance SF-2103A a une activité antibactérienne et en même temps exerce des effets cynergétiques en combinaison avec les antibiotiques β -lactam.

L'activité antibactérienne de la substance SF-2103A a été examinée par le test de protection de souris en utilisant des souris, comme décrit ci-après, et il a été trouvé que cette substance SF-2103A est un antibiotique présentant une efficacité suffisante pour un usage pratique comme un agent traitant l'infection lorsqu'il est utilisé seul ou en combinaison avec chacun des agents anti-microbiens appropriés (par exemple antibiotiques β -lactam).

Des souris mâles âgées de quatre semaines de la race ICR-JCL (poids moyen: 20,6 g) ont été utilisées en groupes de cinq.

Escherichia coli GN206 ou *Proteus vulgaris* GN76/C-1 ont été inoculés sur une plaque de «Heart Infusion Agar» (produit par Eiken Chemicals Co., Ltd.) et cultivés à 37 °C pendant 20 heures. Les cellules ainsi formées ont été recueillies et suspendues dans une solution saline physiologique pour préparer une suspension de cellule contenant un nombre prédéterminé de cellules. Des volumes égaux de la suspension cellulaire et d'une solution à 5% de mucine (produit par Nakarai Chemicals Co., Ltd) ont été mélangés pour préparer une solution de cellule ayant une concentration cellulaire de $7,1 \times 10^7$ CFU/ml (CFU = «colony forming unit»).

Ensuite, 0,5 ml de la solution cellulaire telle que préparée ci-dessus a été injectée intrapéritonéalement dans les souris. Une fois après une heure, ou deux fois à une et deux heures après l'infection, l'antibiotique test a été administré de façon subcutanée. Puis les souris ont été observées pendant 7 jours.

Expérience I

Escherichia coli GN206 a été utilisé comme bactérie infectieuse, et une dose de 2 mg par souris de la substance SF-2103A dissoute dans un tampon phosphate 1/75 M (pH = 7,0, contenant 0,85% de chlorure de sodium) a été admi-

nistrée une fois après l'infection par les bactéries, et une dose de 1 mg par souris de la substance SF-2103A a été administrée deux fois une heure et deux heures après l'infection. Dans le premier cas, deux des cinq souris ont survécu et quatre des cinq souris ont survécu dans le dernier cas. D'autre part, dans le cas du groupe de contrôle dans lequel seul 0,2 ml du tampon phosphate a été administré de la même manière que ci-dessus, aucune souris n'a survécu.

Expérience II

Proteus vulgaris GN-76/C-1 a été utilisé comme bactérie infectieuse, et un médicament constitué par un mélange 1:1 de la substance SF-2103A et de Céfaloine (produit par Shionogi & Co., Ltd) a été administrée. Le médicament mélangé a été administré deux fois (une heure et deux heures après l'infection par les bactéries) chaque fois à une dose de 0,5 mg par souris ou deux fois (une heure et deux heures après l'infection) chaque fois à une dose de 1 mg par souris. Dans le premier cas, trois des cinq souris ont survécu, et dans le dernier cas toutes les souris ont survécu. D'autre part, dans le cas du groupe de contrôle dans lequel seul le tampon phosphate a été administré, aucune souris n'a survécu.

La toxicité du sel de sodium de la substance SF-2103A a été mesurée par administration orale, injection intramusculaire ou injection intraveineuse chez la souris ou le rat. Les valeurs LD₅₀ par administration orale, injection intramusculaire et injection intraveineuse étaient toutes supérieures à 2 000 mg/kg.

La substance SF-2103A est un antibiotique de valeur qui présente non seulement des activités antimicrobiennes contre différentes bactéries gram-positive et gram-négative, mais également qui est efficace contre les bactéries résistantes produisant les β -lactamases. C'est pourquoi elle peut être utilisée comme un médicament pour les êtres humains et les animaux domestiques, et en outre comme un agent de stérilisation pour le stockage des aliments et des instruments ou dispositifs médicaux.

La substance SF-2103A et les sels de celle-ci peuvent être administrés oralement, topiquement ou parentéralement sous la forme d'une préparation, par exemple de tablettes, de capsules, de crème, de sirop, de suspensions, de préparations liquides, de poudre, ou d'injections, ainsi que sous la forme d'injections appropriées pour la stérilisation.

Bien que la substance SF-2103A puisse être utilisée seule, elle est efficace lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec d'autres antibiotiques, plus particulièrement des antibiotiques β -lactame, à cause du fait qu'elle exerce avec ceux-ci des effets cynergétiques.

Lorsque la substance SF-2103A ou les sels de celle-ci sont

utilisés en combinaison avec les antibiotiques β -lactame, la proportion en poids de la substance SF-2103A ou les sels de celle-ci par rapport aux antibiotiques β -lactames peut varier entre environ 20:1 et environ 1:12, de préférence entre 10:1 et 1:10 et plus particulièrement entre 3:1 et 1:3.

La substance SF-2103A ou les sels de celle-ci peuvent être administrés à des doses de 50 à 6 000 mg, généralement de 500 à 3 000 mg par jour.

Par comparaison des propriétés physiques et chimiques ainsi que des caractéristiques biochimiques telles que décrites précédemment avec celles des antibiotiques connus, on peut en déduire que la substance SF-2103A est un nouvel antibiotique.

Les exemples suivants sont destinés à illustrer l'invention plus en détail. Les valeurs en % dans les exemples sont en % poids, sauf indication contraire.

Exemple 1

Un milieu liquide contenant 1% de glucose, 1% d'amidon, 2% de poudre de soya, 0,5 d'un gâteau de graines de coton, 0,2% de sulfate de sodium, 0,2% de carbonate de calcium et 0,0001% de chlorure de cobalt a été ajusté au pH 7. Ensuite, des portions de 80 ml du milieu liquide ont été introduites séparément dans cent flacons Erlenmeyer de 500 ml, chacun étant bouché avec un tampon de coton et stérilisé sous pression à 120 °C pendant 10 minutes. On a fait complètement croître la substance SF-2103A (FERM-P-No. 5636) dans un milieu de précultivation contenant 1% de glucose, 1% d'amidon, 0,2% de poudre de soya, 0,5% de peptone, 0,3% d'extrait de levure, 0,2% d'extrait de viande et 0,2% de carbonate de calcium afin de préparer une culture d'ensemencement. Ensuite, des portions de 1,5% de la culture d'ensemencement ainsi préparée ont été chacune inoculées dans le milieu liquide et incubées sur un agitateur à 28 °C pendant 3 jours afin d'obtenir 7 l d'un milieu contenant 3,5 µg/ml de la substance SF-2103A.

Exemple 2

Un milieu liquide contenant 1% de glucose, 1% d'amidon soluble, 0,2% de poudre de soya, 0,5% de peptone, 0,3% d'extrait de levure, 0,2% d'extrait de viande, et 0,2% de carbonate de calcium a été préparé et ajusté au pH 7,0. Ensuite, des portions de 80 ml du milieu liquide ont été introduites séparément dans trois flacons Erlenmeyer de 500 ml, chacun étant bouché avec un tampon de coton et stérilisé dans un autoclave à 120 °C pendant 15 minutes. Une boucle de platine de la substance SF-2103A (FERM-P No. 5636) a été inoculée dans chacun des milieux liquides et incubée sur un agitateur à 28 °C pendant deux jours pour préparer une culture d'ensemencement. Ensuite, des portions de 600 ml du même milieu que ci-dessus ont été introduites séparément dans trois récipients Erlenmeyer de 5 l, chacun étant bouché avec un tampon de coton et stérilisé dans un autoclave. Chacune des cultures d'ensemencement préparées dans un des flacons de 500 ml ci-dessus a été inoculée dans chacun des flacons de 5 l. Après incubation sur un agitateur à 28 °C pendant 2 jours, une croissance suffisante a été observée.

Puis, 200 l d'un milieu de culture contenant 2,0% de sirop d'amidon, 1,2% de poudre de soya, 1,2% de germe de blé, 0,3% d'huile de soya, 0,02% de sulfate de sodium, 0,0005% de sulfate ferreux, 0,00005% de chlorure de cobalt, et 0,1% de carbonate de calcium ont été préparés dans une cuve de fermentation de 300 l (produite par Marubishi Co., Ltd.) (pH avant stérilisation: 7,0), et a été stérilisé sous pression à 120 °C pendant 30 minutes. Après refroidissement du milieu de culture, la culture préparée ci-dessus (les trois flacons Erlenmeyer de 5 l) a été inoculée dans le milieu de culture et la culture a été réalisée sous aération et agitation à 28 °C. La vitesse

de rotation était de 100-tours par minute au début et a été augmentée jusqu'à 150 tours par minute après 40 heures. L'aération était de 200 l par minute tout au long de la période totale de culture. Après 68 heures, la culture a été arrêtée, et la culture obtenue contenait 4,1 µg/ml de la substance SF-2103A.

Exemple 3

(i) La même technique que dans l'exemple 2 a été répétée en utilisant trois cuves de fermentation de 300 l pour obtenir 450 l d'un filtrat de culture de la substance SF-2103A (FERM-P No. 5636). L'unité moyenne de la substance SF-2103A était de 2,1 µg/ml.

(ii) La substance SF-2103A a été isolée de la façon suivante:

Après ajustement de 425 l du filtrat de culture obtenu ci-dessus à un pH de 5,0 avec de l'acide chlorhydrique 6N, 12,7 kg de carbone actif (produit par Wako Pure Chemical Industries Ltd.) ont été ajoutés et le mélange a été agité pendant 30 minutes dans une cuve d'agitation pour permettre l'adsorption sur le charbon des ingrédients actifs. Le charbon actif a été éliminé par filtration et après lavage avec 50 l d'eau, 100 l de solution aqueuse d'acétone ont été ajoutés. Le mélange obtenu a été ajusté à un pH de 8,0 avec une solution d'hydroxyde de sodium 5N et le mélange a été agité pendant 30 minutes pour éluer les ingrédients actifs. Après séparation et élimination du charbon actif, 100 l de la solution ainsi élue ont été concentrés jusqu'à 45 l par élimination par distillation de l'acétone. Ensuite, 30 l de dichlorométhane contenant 0,2% (poids/volume) de chlorure d'ammonium benzyldiméthylcétyle ont été ajoutés à la solution concentrée ci-dessus et le mélange a été agité pour extraire les ingrédients actifs. A l'extrait ainsi obtenu ont été ajoutés 4 l d'une solution aqueuse contenant 1% (poids/volume) de iodure de sodium pour transférer les ingrédients actifs dans la phase aqueuse. Cette phase aqueuse a été passée à travers une colonne remplie par 1,5 l de DEAE-Sephalex A-25 (produit par Pharmacia Co.) qui avait été tamponnée avec un tampon phosphate au pH de 7,4 pour permettre l'adsorption sur la colonne des ingrédients actifs. Après lavage préliminaire au moyen de 15 l d'une solution aqueuse 0,1M de NaCl dissoute dans un tampon phosphate 20 mM (pH 7,4), les ingrédients actifs ont été élués avec une solution aqueuse 0,2M de NaCl dissoute dans le même tampon que celui utilisé ci-dessus. L'éluat a été divisé en fraction de 100 ml, et les fractions 108 à 132 ont été obtenues comme fractions actives. Ensuite, 24 l des fractions actives ont été passés à travers une colonne remplie avec 240 ml de charbon actif pour permettre à celui-ci d'adsorber les ingrédients actifs. Après lavage de la colonne avec 400 ml d'eau, les ingrédients actifs ont été élués avec 1 l de solution aqueuse à 50% d'acétone. L'éluat a été concentré sous pression réduite. Par séchage par congélation («freeze-drying») du liquide concentré, 709 mg de poudre de substance SF-2103A brute (pureté d'environ 24%) ont été obtenus.

(iii) La même technique qu'au point (i) ci-dessus a été répétée, en utilisant 2 cuves de fermentation de 300 l pour obtenir 285 l (2,6 µg/ml) d'un filtrat de culture. Ce filtrat de culture a été ajusté à un pH de 6,2 avec de l'acide chlorhydrique 6N. Au filtrat ont été ajoutés 95 l de dichlorométhane contenant 0,2% (poids/volume) de chlorure d'ammonium benzyldiméthyltétradécyle, et le mélange obtenu a été agité pendant 1 heure pour extraire les ingrédients actifs. A l'extrait ainsi obtenu ont été ajoutés 8,5 l d'une solution aqueuse de iodure de sodium à 0,7% (poids/volume), et le mélange obtenu a été agité pendant 20 minutes pour transférer les ingrédients actifs dans la phase aqueuse. Cette phase aqueuse a été concentrée sous pression réduite en éliminant par distillation le dichlorométhane. Le liquide ainsi concentré a été passé à travers une colonne remplie avec 400 ml de charbon actif (produit par

Wako Pure Chemical Industries Ltd.) qui a été chargé avec de l'eau, puis le charbon actif a été lavé avec 300 ml d'eau. Le liquide et l'eau de lavage ayant passé à travers le charbon actif ont été combinés, et 8,3 l du liquide combiné a été passé à travers une colonne remplie avec 1 l de DEAE-Sephalex A-25 (produit par Pharmacia Co.) qui a été tamponnée avec un tampon phosphate d'un pH de 7,4 pour permettre d'adsorption des ingrédients actifs. Après lavage préliminaire avec 10 l d'une solution aqueuse de NaCl 0,2M dissoute dans un tampon phosphate 20 mM (pH = 7,4) les ingrédients actifs ont été élués avec une solution aqueuse de NaCl 0,3M dissoute dans le même tampon que ci-dessus. L'éluat a été divisé en fractions de 150 ml, et les fractions 17 à 53 ont été confirmées comme étant actives. Ces fractions actives ont été combinées, et 5,5 l des fractions actives combinées ont été passées à travers une colonne remplie avec 1,2 l de charbon actif (produit par Wako Pure Chemical Industries Ltd.), qui a été chargée avec de l'eau, pour permettre d'adsorption des ingrédients actifs. Après lavage de la colonne avec 2,3 l d'eau, les ingrédients actifs ont été élués avec 5,5 l d'acétone aqueux à 50%. L'éluat ainsi obtenu a été concentré sous pression réduite. Par séchage par congélation du liquide concentré, 540 mg d'une poudre de la substance SF-2103A brute (pureté d'environ 40%) ont été obtenus.

(iv) La poudre de la substance SF-2103A brute obtenue au point (iii) ci-dessus en une quantité de 540 mg a été dissoute dans 40 ml d'eau. La solution obtenue a été passée à travers une colonne remplie avec 100 ml de DEAE-Sephadex A-25 qui a été tamponnée avec un tampon phosphate ayant un pH de 7,2 pour permettre d'adsorption des ingrédients actifs. Après lavage avec 200 ml d'un tampon phosphate 20 mM (pH = 7,2), les ingrédients actifs ont été élués avec une solution aqueuse de NaCl 0,2M dissoute dans le même tampon que ci-dessus.

L'éluat a été divisé en fractions de 20 ml, et les fractions 110 à 165 ont été confirmées comme étant actives. Ces fractions actives ont été combinées et passées à travers une colonne remplie avec 175 ml de charbon actif pour permettre d'adsorption des ingrédients actifs. Après lavage du charbon actif avec 300 ml d'eau, les ingrédients actifs ont été élués avec 800 ml d'acétone aqueux à 50%.

Lorsque l'éluat a été concentré sous pression réduite et séché par congélation, le sel de sodium de la substance SF-2103A a été obtenu en une quantité de 206 mg (pureté d'environ 64%) sous la forme d'une poudre jaune pâle.

Ensuite, 200 mg de cette poudre ont été dissous dans 2 ml d'eau, et la solution obtenue a été passée à travers une colonne remplie avec 250 ml de Diaion HP-20Ag (produite par Mitsubishi Chemical Industries Ltd.). Après élution avec de l'eau, l'éluat a été divisé en fractions de 7 ml, et les fractions 18 à 26 ont été confirmées comme contenant les ingrédients actifs. Parmi ces fractions actives, les fractions 22 à 24 ont été choisies et combinées, concentrées sous pression réduite et séchées par congélation, et ainsi 60 mg du sel de sodium de la substance SF-2103A (pureté d'environ 77%) ont été obtenus sous la forme d'une poudre légèrement jaune.

(v) Dans 1 ml d'eau ont été dissous 60 mg de la poudre légèrement jaune obtenue au point (iv) ci-dessus. La solution obtenue a été passée à travers une colonne remplie avec 200 ml de Sephadex G-10 (produit par Pharmacia Corp.) et éluee avec de l'eau. L'éluat a été divisé en fractions de 7 ml, et les fractions 11 à 16 ont été confirmées comme étant actives. Les fractions 12 et 13 ont été combinées, concentrées sous pression réduite et séchées par congélation, et ainsi 32 mg d'un sel de sodium de substance SF-2103A pure ont été obtenus sous la forme d'une poudre blanche.

Les opérations précédentes (ii) à (v) ont été réalisées dans des conditions de basses températures (environ 4 °C).

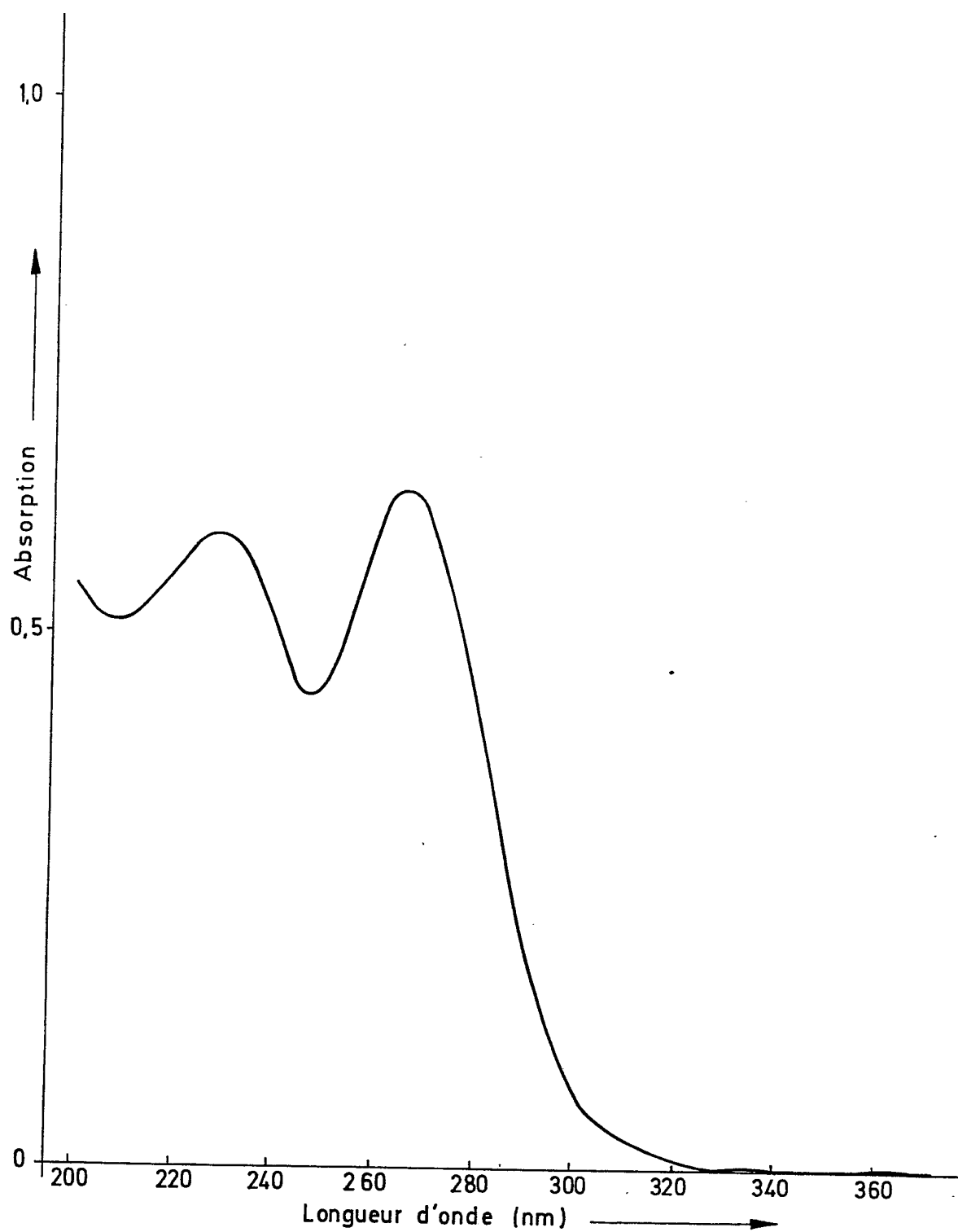


FIG. 1

FIG. 2

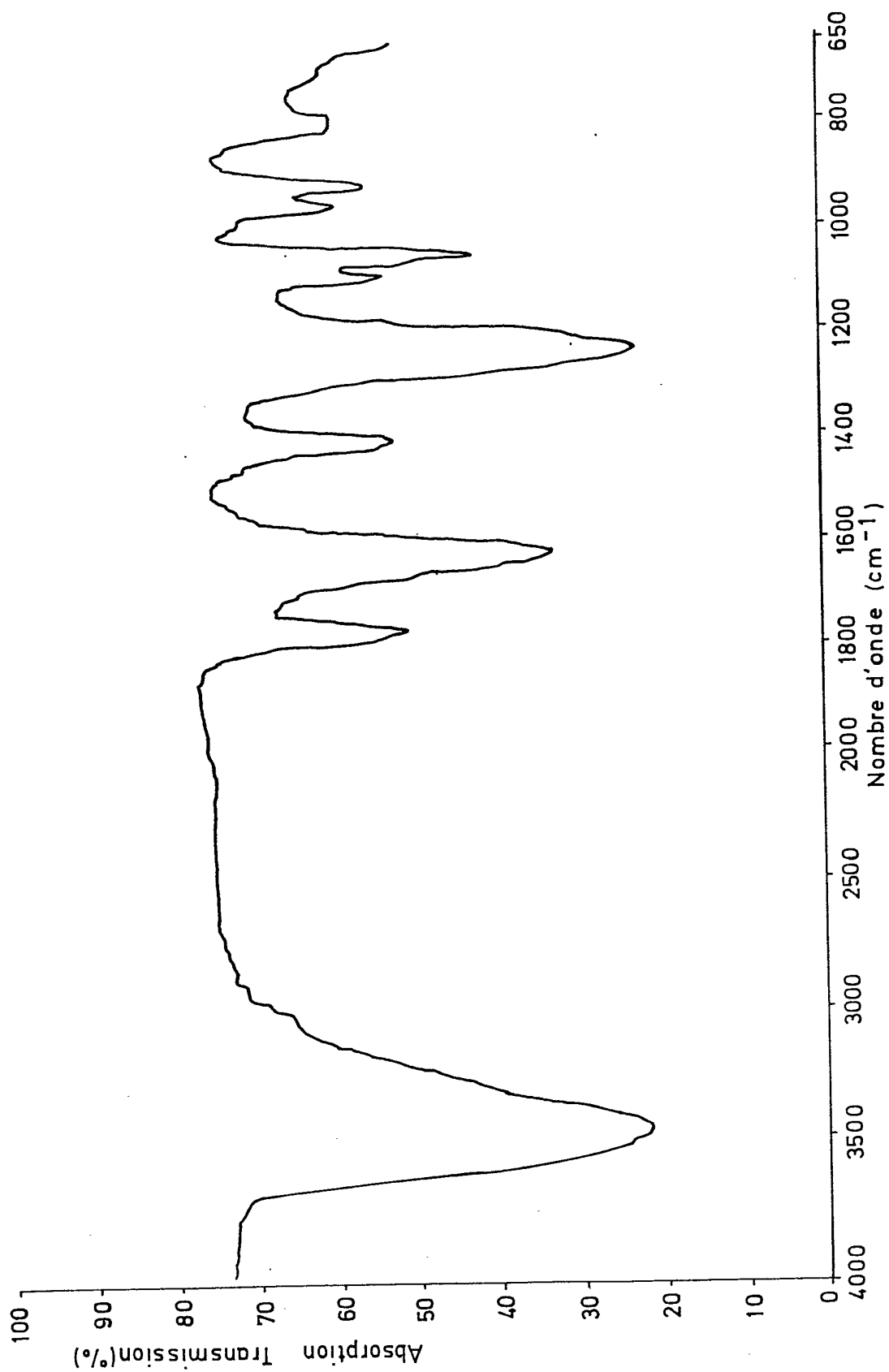


FIG. 3

