



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 648 855 A5

⑤① Int. Cl.4: C 07 H 15/236
C 12 P 19/48

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

// A 61 K 31/70 (C 12 P 19/48,
C 12 R 1:045)

⑫ PATENTSCHRIFT A5

<p>⑳ Gesuchsnummer: 5618/80</p> <p>㉒ Anmeldungsdatum: 23.07.1980</p> <p>㉔ Patent erteilt: 15.04.1985</p> <p>④⑤ Patentschrift veröffentlicht: 15.04.1985</p>	<p>⑦③ Inhaber: Toyo Jozo Kabushiki Kaisha, Tagata-gun/Shizuoka-ken (JP)</p> <p>⑦② Erfinder: Fujii, Tadashi, Mishima-shi/Shizuoka-ken (JP) Satoi, Shuzo, Tagata-gun/Shizuoka-ken (JP) Muto, Naoki, Tagata-gun/Shizuoka-ken (JP) Hayashi, Mitsuo, Tagata-gun/Shizuoka-ken (JP) Kodama, Akira, Tagata-gun/Shizuoka-ken (JP) Otani, Masaru, Tagata-gun/Shizuoka-ken (JP)</p> <p>⑦④ Vertreter: Patentanwalts-Bureau Isler AG, Zürich</p>
---	---

⑤④ Aminoglycosid-Antibiotika sowie Verfahren zu ihrer Herstellung.

⑤⑦ Die neuen Aminoglycosid-Antibiotika G-367-1 und G-367-2 sowie ihre nicht-toxischen Säureadditionssalze sind stark antibakteriell wirksam gegen gramnegative Bakterien. Sie werden durch Züchtung eines Mikroorganismus vom Stamme *Dactylosporangium thailandense* G-367 (FERM P No. 4840) in einem Nährboden und Isolierung der entstandenen Antibiotika erhalten.

Die beiden Antibiotika weisen die in Patentanspruch 1 angegebenen spezifischen Eigenschaften auf.

PATENTANSPRÜCHE

1. Aminoglycosid-Antibiotikum G-367-1 gekennzeichnet durch die folgenden Parameter:

Schmelzpunkt: 130 bis 133°C;
 $[\alpha]_D^{24}$: +188,9°, c = 1,0, H₂O;
 Elementaranalyse:
 gefunden: C 50,14 H 7,60 N 14,42
 berechnet: C 50,51 H 7,84 N 14,73
 Molekulargewicht: 475, bestimmt durch Massenspektrometrie;

Summenformel: C₂₀H₃₇N₅O₈;
 Ultraviolett-Absorptionsspektrum:
 kein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 220 bis 360 nm, zeigt nur Endabsorption;

IR-Absorptionsspektrum: wie in Fig. 1 dargestellt;
 NMR-Spektrum: wie in Fig. 2 dargestellt;

Löslichkeit:
 löslich in Wasser und Methanol; unlöslich in Aceton, Benzol, Äthylacetat und Chloroform;

Farbreaktionen:
 positiv: Ninhydrin, Entfärbung von Kaliumpermanganat;
 negativ: Elson-Morgan, Biuret;

Farbe: weiss
 Beschaffenheit: basisch
 sowie dessen nicht-toxischen Säureadditionssalze und
 Aminoglycosid-Antibiotikum G-367-2, gekennzeichnet durch folgenden Parameter:

Schmelzpunkt: 151 bis 155°C;
 $[\alpha]_D^{24}$: +159,8°, c = 1,0, H₂O;
 Elementaranalyse:
 gefunden: C 50,41 H 7,92 N 15,16
 berechnet: C 50,99 H 8,33 N 15,64
 Molekulargewicht: 447, bestimmt durch Massenspektrometrie;

Summenformel: C₁₉H₃₇N₅O₇;
 Ultraviolett-Absorptionsspektrum:
 kein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 220 bis 360 nm, zeigt nur Endabsorption;

IR-Absorptionsspektrum: wie in Fig. 3 dargestellt;
 NMR-Spektrum: wie in Fig. 4 dargestellt;

Löslichkeit:
 löslich in Wasser und Methanol; unlöslich in Aceton, Benzol, Äthylacetat und Chloroform;

Farbreaktionen:
 positiv: Ninhydrin, Entfärbung einer Kaliumpermanganatlösung;
 negativ: Elson-Morgan, Biuret;

Farbe: weiss
 Beschaffenheit: basisch
 sowie dessen nicht-toxischen Säureadditionssalze.

2. Verfahren zur Herstellung von Aminoglycosid-Antibiotika G-367-1 oder G-367-2 nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Mikroorganismus vom Stamm Dactylosporantium thailandense G-367, FERM-P. No. 4840, in einem Nährboden kultiviert und die gebildeten Antibiotika daraus isoliert.

Die Erfindung betrifft die neuen Aminoglycosid-Antibiotika G-367-1 und G-367-2 und ihre nicht-toxischen Salze sowie ein Verfahren zu ihrer Herstellung.

Das neue Aminoglycosid-Antibiotikum G-367-1 (nachstehend als G-367-1 bezeichnet) und das neue Aminoglycosid-Antibiotikum G-367-2 (nachfolgend als G-367-2 bezeichnet) haben die folgenden physikalisch-chemischen Eigenschaften:

1. G-367-1:

Schmelzpunkt: 130 bis 133°C,
 $[\alpha]_D^{24}$: +188,9°, c = 1,0, H₂O

Elementaranalyse:
 gefunden: C 50,14 H 7,60 N 14,42
 berechnet: C 50,51 H 7,84 N 14,73
 Molekulargewicht: 475, (bestimmt durch Massenspektrum)
 Summenformel: C₂₀H₃₇N₅O₈;

UV-Absorptionsspektrum: kein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 220 bis 360 nm, zeigt nur Endabsorption
 IR-Absorptionsspektrum (KBr): wie in Fig. 1 dargestellt, Absorptionsbanden bei 3350, 2920, 1660, 1590, 1380, 1140, 1100, 1050, 1000, 950 cm⁻¹

NMR-Spektrum (Wasserstoff): wie in Fig. 2 gezeigt
 (D₂O, 100 MHz, innerer Standard: DSS)

NMR-Spektrum (Kohlenstoff): (D₂O, 25 MHz, innerer Standard: Dioxan)

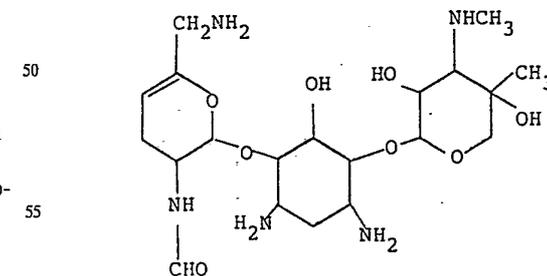
Nr.	ppm	Nr.	ppm
20			
1	164,8	11	68,6
2	150,6	12	67,4 (Dioxan)
3	101,4	13	64,2
4	98,1	14	51,7
25			
5	96,3	15	50,1
6	87,8	16	45,5
7	85,3	17	43,3
8	75,3	18	37,8
9	73,2	19	36,3
30			
10	70,2	20	23,4
		21	22,5

Löslichkeit: löslich in Wasser und Methanol; unlöslich in
 35 Aceton, Benzol, Äthylacetat und Chloroform

Farbreaktion:
 positiv: Ninhydrin, Entfärbung von Kaliumpermanganat;
 negativ: Elson-Morgan, Biuret;

Farbe: weisses Pulver
 Beschaffenheit: basisch
 Dünnschichtchromatographie (Silikagel): untere Schicht eines Chloroform:Methanol:28%ig wässrigem Ammoniak (1:1:1):
 R_f = 0,36; 10%iges Ammoniumacetat:Methanol (1:1):
 R_f = 0,13.

45 Aufgrund der oben angegebenen physikalisch-chemischen Eigenschaften ist G-367-1 eine neue Aminoglycosid-Verbindung, für die folgende planare Struktur vermutet wird:



2. G-367-2:

Schmelzpunkt: 151 bis 155°C,
 $[\alpha]_D^{24}$: +159,8°, c = 1,0, H₂O

Elementaranalyse:
 gefunden: C 50,41 H 7,92 N 15,16
 berechnet: C 50,99 H 8,33 N 15,64

65 Molekulargewicht: 447, (bestimmt durch Massenspektrum)
 Summenformel: C₁₉H₃₇N₅O₇;
 UV-Absorptionsspektrum: kein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 220 bis 360 nm, zeigt nur Endabsorption

IR-Absorptionsspektrum (KBr): wie in Fig. 3 dargestellt, Absorptionsbanden bei 3350, 2920, 1650, 1540, 1470, 1350, 1140, 1100, 1050, 1020, 950 cm^{-1}

NMR-Spektrum (Wasserstoff): wie in Fig. 4 dargestellt (D_2O , 100 MHz, innerer Standard: DSS)

NMR-Spektrum (Kohlenstoff): (D_2O , 25 MHz, innerer Standard: Dioxan)

Nr.	ppm	Nr.	ppm
1	149,5	11	67,4 (Dioxan)
2	101,4	12	64,2
3	98,7	13	51,6
4	97,5	14	50,1
5	87,9	15	47,2
6	85,1	16	43,0
7	75,2	17	37,7
8	73,1	18	36,2
9	70,0	19	23,9
10	68,6	20	22,5

Löslichkeit: löslich in Wasser und Methanol; unlöslich in Aceton, Benzol, Äthylacetat und Chloroform

Farbreaktion:

positiv: Ninhydrin, Entfärbung von Kaliumpermanganat;

negativ: Elson-Morgan, Biuret;

Farbe: weisses Pulver

Beschaffenheit: basisch

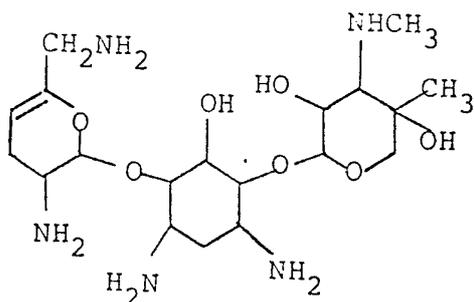
Dünnschichtchromatographie (Silikagel): untere Schicht von

Chloroform:Methanol:28%ig wässrigem Ammoniak (1:1:1):

Rf = 0,28; 10%iges Ammoniumacetat:Methanol (1:1):

Rf = 0,10.

Die oben angegebenen physikalisch-chemischen Eigenschaften von G-367-2 wie die Elementaranalyse, das Molekulargewicht und die Summenformel sind ähnlich dem bekannten Antibiotikum Sisomicin. Der Rf-Wert von Sisomicin bei Dünnschichtchromatographie mit Chloroform:Methanol:28%ig wässrigem Ammoniak (1:1:1) ist aber 0,38, also von dem des G-367-2 verschieden. Andere physikalisch-chemische Eigenschaften von G-367-2 zeigen an, dass es sich um ein neues Aminoglykosid-Antibiotikum handelt, für das die folgende planare Struktur angenommen wird, wobei es sich vermutlich um ein Stereoisomeres von Sisomicin handelt.



Das antimikrobielle Wirkungsspektrum (minimale Hemmkonzentration, MIC) von G-367-1 und G-367-2, bestimmt nach der Agar-Verdünnungsmethode, zeigt die folgende Tabelle:

Testorganismus	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	G-367-1	G-367-2
Staphylococcus aureus ATCC 6538P	6,3	12,5
Staphylococcus aureus MS27	6,3	12,5
Staphylococcus aureus 0119	12,5	12,5
Staphylococcus epidermidis sp-al-1	1,6	1,6
Streptococcus pyogenes N.Y.5	6,3	6,3

Testorganismus	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	G-367-1	G-367-2
5 Bacillus subtilis ATCC 6633	0,8	1,6
Escherichia coli NIHJ-JC2	1,6	3,1
Escherichia coli NIHJ-W3630	1,6	1,6
Escherichia coli NIHJ-W3630 RGN14	1,6	1,6
Citrobacter freundii GN346	1,6	3,1
10 Klebsiella pneumonia ATCC 10031	1,6	1,6
Salmonella enteritidis Gärtner	1,6	3,1
Shigella sonnei E33	1,6	3,1
Proteus morgani 0239	3,1	6,3
Proteus rettgeri ACR	3,1	3,1
15 Enterobacter aerogenes 0655	1,6	1,6
Enterobacter cloacae GN336	1,6	1,6
Serratia marcescens	25	50
Pseudomonas aeruginosa IAM1095	25	25
Pseudomonas aeruginosa ML4561	25	125
20 Pseudomonas aeruginosa ML4561 Rms 166	> 100	> 100
Pseudomonas aeruginosa ML4561 Rms 164-1	50	50
25 Pseudomonas aeruginosa ML4561 Rms RP4	12,5	12,5
Pseudomonas aeruginosa 1946	> 100	> 100
Pseudomonas aeruginosa 2512	> 100	> 100
Pseudomonas putida 1842	> 100	> 100
Pseudomonas maltophilia 1850	> 100	> 100
30		

Die Antibiotika G-367-1 und G-367-2 der vorliegenden Erfindung haben einen starken antibakteriellen Effekt gegen Gram-negative Bakterien, und können in Form ihrer nicht-toxischen Säureadditionssalze von organischen oder anorganischen Säuren, wie z. B. als Hydrochlorid, Hydrobromid, Sulfat, Phosphat, Carbonat, Acetat, Fumarat, Malat, Citrat, Mandelat, Succinat, Ascorbat, Aspartat oder Glutamat, verwendet werden.

Die Antibiotika G-367-1 und G-367-2 oder ihre nicht-toxischen Säureadditionssalze können als injizierbare Zubereitungen, z. B. in Form von 20- bis 40-mg-Fläschchen oder -Ampullen, verwendet werden.

Der G-367-1 und G-367-2 produzierende Actinomycetes-Stamm G-367 wurde aus einer Bodenprobe in Fuji-shi, Shizuoka-ken, Japan isoliert, und mit Dactylosporantium thailandense G-367 bezeichnet. Dieser Stamm wurde im Fementation Research Institute 8-1 Inage-Jagashi s-chrome, Chiba City, Japan, als FERM-P- Nr. 4840 am 28. Februar 1979 hinterlegt.

Die taxonomischen Eigenschaften (taxonomical properties) des Stammes sind die folgenden:

I Morphologische Eigenschaften:

Auf Calciummalat-Agar (Bact. Rev. 21, 1 (1957) wurden bei 30°C, und einer Kultivierung von 3 bis 7 Tagen folgende Beobachtungen gemacht:

Das Substrat-Mycel ist gekrümmt oder webartig, von verzweigtem Wuchs, und ohne Fragmentierung, 0,5-0,8 μm im Durchmesser und zeigt keine Bildung von «Luft-Hyphae» (aerial hyphae).

Auf dem Substrat-Mycel wird, eingebettet im Agar, ein kugelförmiger oder ellipsoider Körper mit den Dimensionen 1,5 bis 2,0 \times 2,0 bis 2,5 μm festgestellt.

Auf dem Substrat-Mycel erheben sich kurze Sporangioophoren, und fingerartiges Sporangium zeigt sich einzeln oder gebüschelt an der Oberfläche des Agar-Mediums. Die Grösse des Sporangia ist 1,0 bis 1,5 \times 4,0 bis 6,5 μm . Jedes Sporangium enthält eine vertikale, einzelne Reihe von drei bis vier Sporen. Die kugelförmigen, ellipsoiden oder birnenförmigen Sporen mit einer Grösse

von 1,0 bis $1,5 \times 1,5$ bis $2,5 \mu$ sind in Wasser beweglich durch polytrichose, polare Fäden.

II Verhalten mit Diaminopimelinsäure (Zusammensetzung von Diaminopimelinsäure):

Durch Mycel-Analyse (mycelial analysis) wurde ein Rm-Wert vom Meso-Typ (meso-type Rm value) und ein niedrigerer Rm-Wert als der des Meso-Typs (langsam wandernde Diaminopimelinsäure) festgestellt.

III Wachstum auf verschiedenen Medien:

Die an verschiedenen Medien bei 30°C nach 14 Tagen festgestellten Beobachtungen sind in der folgenden Tabelle veranschaulicht. «Luft-Mycel» (aerial mycelium) wird, ausser auf Hafermehl-Agar in einer rudimentären Form, nicht gebildet. Die Bildung von Sporangia ist auf Calciummalat-Agar gut, mässig auf Boden-Agar (J. gen. Microbiol. 50, 295 (1968), und gering oder überhaupt nicht auftretend auf den anderen Medien.

¹⁰ Die Farbbezeichnung basiert auf dem «Color Harmony Manual, 4. Ausgabe 1958» (Container Corporation of America).

Wachstum auf verschiedenen Medien

Medium	Wachstum	Farbe des Substrat-Myceles	Lösliches Pigment
Saccharose-Nitrat-Agar (Waksmann medium No. 1)*	mässig bis schwach	aprikosenfarbig (4ia) bis staubig-orange (4lc) (dusty orange)	keines
Glucose-asparagin-Agar (Waksmann medium No. 2)*	schwach	melonengelb (3ia) bis staubig-aprikosenfarbig (4ia)	keines
Glycerin-asparagin-Agar (ISP medium No. 5)**	gering bis schwach	farblos bis hellmelonengelb (3ea)	keines
Stärke-Anorganischer Agar (ISP medium No. 4)**	mässig bis gut	orangebraun (4nc) bis orange (4lc) (dusty orange)	keines
Tyrosin-Agar (ISP medium No. 7)**	gering bis schwach	aprikosenfarbig (4ga) bis blass-pastellorange (4ic)	keines
Hafermehl-Agar (ISP medium No. 3)**	mässig bis gut	rostorange (4pe) bis orangebraun (4pc)	keines
Hefeextrakt-Malzextrakt-Agar (ISP medium No. 2)**	mässig bis gut	ahornfarbig (4le) bis lohfarben (4ne)	ahornfarbig (4le) bis hellbraun (4ng)
Calciummalat-Agar	schwach	farblos	keines
Nähr-Agar (Waksmann medium No. 14)*	gering	farblos	keines
Benett-Agar (Waksmann medium No. 30)*	mässig bis gut	ahornfarbig (4le) bis lohfarben (4ne)	ahornfarbig (4le) bis hellbraun (4ng)
Emerson-Agar (Waksmann medium No. 28)*	mässig	pastellorange (4ic) bis arhornfarbig (4le)	ahornfarbig (4le)
Hickey and Tresner-Agar (Waksmann medium No. 32)*	mässig bis gut	zimtfarbig (3le) bis ahornfarbig (4le)	ahornfarbig (4le) bis hellgewürzbraun (4lg)
Glucose-Hefeextrakt-Agar (Waksmann medium No. 29)*	mässig	melonengelb (3ga)	keines
Pepton-Hefeextrakt-eisenhaltiger Agar (IPS medium No. 6)**	gering	farblos	keines
Boden-Agar	gering bis schwach	farblos	keines
Kartoffelstab (potato stabb) (Waksmann medium No. 40)*	mässig	ziegelrot (5ne) bis kupferfarbig (5lc)	keines
Kartoffelacker (potato stabb) + Calciumcarbonat	mässig	ziegelrot (5ne) bis kupferfarbig (5lc)	keines
Rübenacker (Carrot stabb)	gering	farblos	keines

* Waksman, S. A. ' The Actinomycetes Vo 12, 1961, P. 327-334, Williams & Wilkins Co.

** Inter. J. Syst. Bact. 16, 313-340 (1966)

*** Antimicrob. Agents and Chemother., 1963, P. 116-124.

1. Verwertung von Kohlenstoffquellen

Kohlenstoffquelle	P & G*	Lm**
D-Arabinose	±	+
L-Arabinose	+	+
D-Fructose	+	+
D-Galactose	+	+
D-Glucose	+	+
Glycerin	—	—
i-Inosit	—	—
D-Mannose	+	+
D-Mannit	+	+
α-Melibiose	+	+
β-Lactose	+	±
Dulcitol	—	—
D-Toreharose	+	+
D-Cellobiose	+	+
Melezitose	+	+
Raffinose	+	—
L-Rhamnose	+	+
D-Ribose	—	—
L-Sorbose	—	—
D-Sorbit	—	—
Sucrose	+	+
D-Xylose	+	+
Adonit	—	—
Salicin	± — +	± — +
Stärke	+	+
Maltose	+	+
Dextrin	+	+
Inulin	—	—

+: positiv ±: schwach positiv -: negativ

* Pridham-Gotlieb anorganisches Medium

** Intern. J. Syst. Bact., 21, 240–247 (1971)

2. Wachstumstemperatur: 20 bis 40°C
3. Peptonisierung und Koagulation von entrahmter Milch: positiv
4. Bildung von Melanin-artigem Pigment: negativ auf Tyrosin und Pepton-Hefeextrakt-eisenhaltigem Agar
5. Stärkehydrolyse: positiv
6. Cellulosezerersetzung: negativ
7. Kaseinzerersetzung: positiv
8. Tyrosinzerersetzung: negativ
9. Gelatinverflüssigung: positiv
10. H₂S-Bildung: schwach positiv
11. Nitratreduktion: positiv
12. Wachstums-ph-Wert: 5,5 bis 9,0.

Wie oben veranschaulicht, sind die Charakteristika des G-367-Stammes ein auf dem Substrat-Mycel gewachsenes, fingerartiges Sporangium, welches vertikale einzelne Reihen von Sporen enthält, und polytrichose, polare Fäden an den Sporen.

Ein gebildetes Sporangium, welches polytrichose Fäden enthält, ist für den Genus Actinoplanaceae charakteristisch, und unter diesen sind fingerartige Sporangia und vertikale, einzelne Reihen von Sporen für den Genus Dactylosporangium charakteristisch.

Da der Stamm G-367 weiterhin ein orange-braunes bis braunes Substrat-Mycel und ein braunes lösliches Pigment aufweist, wurde der Stamm zu *Dactylosporangium thailandense* (Arch. Microbiol. 58, 42–52, 1967) zugeordnet. Der Stamm wird deshalb als *Dactylosporangium thailandense* G-367 bezeichnet.

Die Herstellung der neuen Antibiotika G-367-1 und G-367-2 kann durch aerobe Kultivierung eines G-367-1 oder G-367-2

produzierenden Stammes vom Genus *Dactylosporangium* in einem herkömmlichen Medium bewirkt werden. Es kann ein festes oder flüssiges Medium verwendet werden, wobei für eine Herstellung in grossem Massstab ein flüssiges Medium bevorzugt ist.

Herkömmliche Nährmedien für Mikroorganismen können verwendet werden. Assimilierbare Kohlenstoffquellen wie z. B. Glukose, Sucrose, Maltose, Stärke, Dextrin und Melasse können verwendet werden. Assimilierbare Stickstoffquellen wie z. B. die bei der Stärkeerzeugung anfallende «Kornaufschlusslaug» (corn steep liquor), Sojabohnenpulver, Baumwollsaamenpulver, Weizenkleber, Pepton, Fleischextrakt, Hefeextrakt, Kaseinhydrolysat, Ammoniumsalze und Nitrate können verwendet werden. Wenn notwendig, können auch Phosphate und Salze von Magnesium, Calcium, Kalium, Natrium, Kobalt, Eisen oder Mangan verwendet werden.

Die Temperatur der Kultivierung hängt vom Wachstum der Mikroorganismen und von der Produktion von Antibiotika ab und beträgt vorzugsweise 25 bis 35°C. Die Zeit der Kultivierung hängt ab von den Bedingungen und beträgt gewöhnlich 100 bis 200 h, wobei die Kultivierung bei der maximalen Wirksamkeit der Antibiotika im Medium beendet wird.

Die Antibiotika werden aus dem Filtrat der Kulturen gewonnen.

Die Isolierung von G-367-1 und G-367-2 kann durch herkömmliche Isolierungsmethoden für wasserlösliche, basische Aminozyucker-Antibiotika erfolgen.

G-367-1 und G-367-2 können auf einer Agarplatte mit Hilfe von *Bacillus subtilis* als Testorganismus untersucht werden.

Die Ausführungsform der Isolierung und Reinigungsmethode von G-367-1 und G-367-2 wird wie folgt beschrieben.

Das Kulturfiltrat wird erhalten, indem man das Kulturmedium auf einen sauren pH-Wert einstellt, neutralisiert und dann filtriert. Das Kulturfiltrat wird auf eine Kationenaustauschersäule, wie z. B. Amberlite IRC-50 (vom Ammonium-Typ) gebracht, um aktive Substanzen zu adsorbieren, die aktiven Substanzen werden durch wässrige 2 N-Ammoniaklösung eluiert, konzentriert, und dann der pH-Wert des Eluats auf 1 eingestellt. Das Konzentrat wird auf eine Kationenaustauschersäule wie z. B. CM-Sephadex C-25 (vom Ammoniumtyp) aufgebracht, mit wässrigem Ammoniak (Konzentrationsgradient 0 bis 0,35 N) eluiert, um die aktiven Fraktionen zu erhalten, welche konzentriert und gefriergetrocknet werden. Man erhält G-367-1 und G-367-2 als gereinigtes weisses Pulver in Form der freien Base. Das so erhaltene G-367-1 und G-367-2 zeigt einen einzelnen Fleck im Dünnschichtchromatogramm.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher.

50 Beispiel 1:

Ein Medium (pH-Wert 7,0, 100 ml), welches 1% Dextrin, 1% Glukose, 0,5% Kaseinhydrolysat, 0,5% Hefeextrakt und 0,1% Calciumcarbonat enthält, wurde in einem 500-ml-Erlenmeyer-Kolben bei 120°C 20 min lang sterilisiert.

Dactylosporangium thailandense G-367 wurde aus einem geeigneten Agar-Medium (agar slant medium) mit Hilfe einer Öse eingepflegt und die Kultur bei 30°C 120 h lang geschüttelt (shake cultured). Diese Samenkultur wurde einem sterilisierten Medium der gleichen Zusammensetzung (20 l) in einen 30-l-Fermentergefäß eingepflegt und 72 h lang bei 30°C kultiviert (Rührgeschwindigkeit 300 UpM, Luftbegasung 20 l/min). Dieses kultivierte Medium (10 l) wurde in einem 250-l-Tank einem sterilisierten Medium eingepflegt, das 5% Dextrin, 0,5% Glukose, 3% entfettetes Sojabohnenpulver, 0,7% Calciumcarbonat und 1,3 ppm Kobaltchlorid enthält (pH-Wert 7,2, 200 l) und bei 30°C 120 h lang kultiviert (Umdrehungsgeschwindigkeit 250 UpM, Luftbegasung 100 l/min). Man erhält 190 l des kultivierten Mediums.

Beispiel 2:

Das nach Beispiel 1 erhaltene kultivierte Medium wurde durch Zugabe von 12 N Schwefelsäure auf einen pH-Wert von 2 eingestellt. 30 min lang gerührt, dann durch Zugabe von konzentriertem wässrigem Ammoniak auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt, und nach Zugabe des Filterhilfsmittels «Perlite» (4 kg, Handelsname) filtriert. Das Filtrat wird auf eine Amberlite IRC-50-Säule (Rohm & Haas Co., Ammoniumtyp, 10 l) aufgebracht und nach dem Waschen mit Wasser mit 2 N wässriger Ammoniaklösung (20 l) eluiert. Das Eluat wurde im Vakuum auf ein Volumen von 100 ml konzentriert.

Das Konzentrat wurde durch Zugabe von 6 N Schwefelsäure auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und auf eine Säule von CM-Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemical Corporation, Ammoniumtyp, 500 ml, 4 cm Durchmesser) aufgebracht. Nach dem Waschen mit Wasser wurde die aktive Substanz durch Gradientenelution mit wässrigem Ammoniak (5 l, Konzentrationsgradient 0 bis 0,35 N) eluiert. Jede Fraktion wurde durch Dünnschichtchromatographie geprüft (unter Phase eines Ge-

misches aus Chloroform:Methanol:28%ig wässrigem Ammoniak im Verhältnis 1:1:1), und die aktive Substanz durch Ninhydrin-Farbreaktion festgestellt. G-367-1 wurde in den Fraktionen 175 bis 185 gefunden. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, im Vakuum konzentriert und nach Gefriertrocknung ein weisses Pulver erhalten. Das Pulver wurde bei 40° C 48 h lang über Phosphorpentoxid bei reduziertem Druck getrocknet und ergab das gereinigte G-367-1 als weisses Pulver (freie Base, 750 mg).

G-367-2 wurde in den Fraktionen Nr. 190–205 gefunden. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, im Vakuum konzentriert und nach dem Gefriertrocknen das weisse Pulver erhalten. Das Pulver wurde bei 40° C 48 h lang unter reduziertem Druck getrocknet und das gereinigte G-367-2 als weisses Pulver erhalten (freie Base, 680 mg).

15 In den nachstehenden Zeichnungen bedeuten:

Figur 1: IR-Spektrum von G-367-1

Figur 2: NMR-Spektrum (Wasserstoff) von G-367-1

Figur 3: IR-Spektrum von G-367-2

Figur 4: NMR-Spektrum (Wasserstoff) von G-367-2

FIG. 3

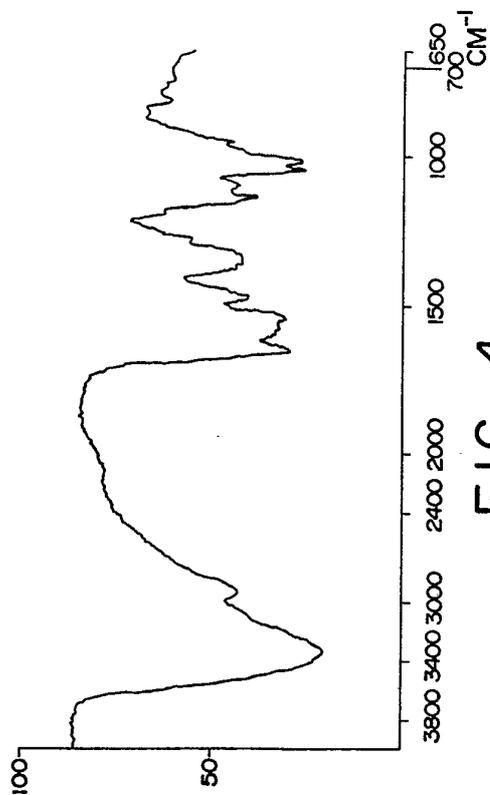


FIG. 4

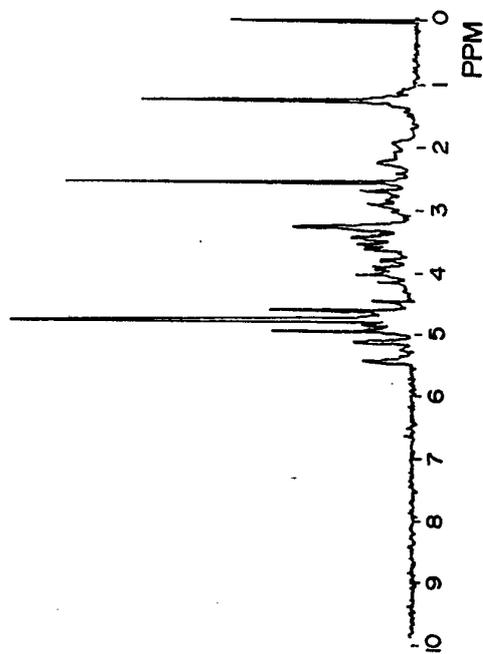


FIG. 1

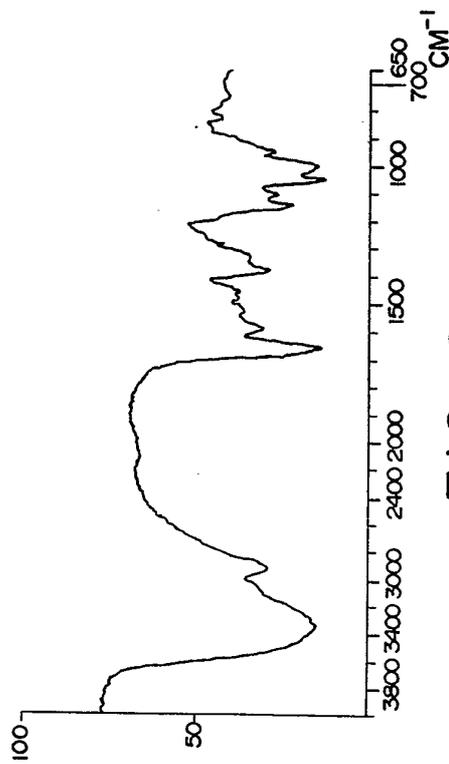


FIG. 2

