



NORGE
[NO]

STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN

[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 139864

(51) Int. Cl.² C 12 D 9/14, C 07 H 15/22

(21) Patentsøknad nr. 741300

(22) Inngitt 08.04.74

(23) Løpedag 08.04.74

(41) Alment tilgjengelig fra 18.10.74

(44) Søknaden utlagt, utlegningsskrift utgitt 12.02.79

(30) Prioritet begjært 17.04.73, Japan, 42696/73

(54) Oppfinnelsens benevnelse Fremgangsmåte til fremstilling av antibiotikum fortimicin B.

(71)(73) Søker/Patenthaver KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,
Ohtemachi Bldg.,
Ohtemachi, Chiyoda-ku, Tokyo,
Japan.

(72) Oppfinner TAKASHI NARA, Tokyo,
SEIGO TAKASAWA, Tama-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa-ken,
RYO OKACHI, Tokyo,
ISAO KAWAMOTO, Tokyo,
MITSUYOSHI YAMAMOTO, Tokyo,
Japan.

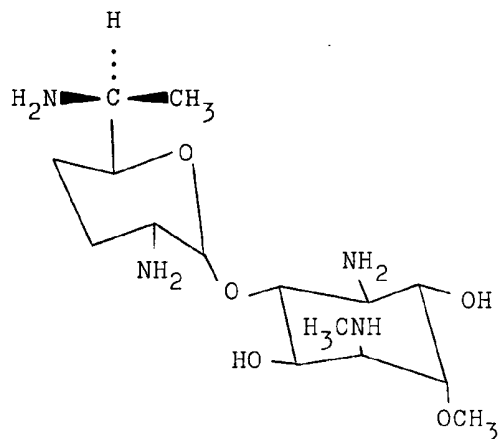
(74) Fullmektig Bryns Patentkontor A/S, Oslo.

(56) Anførte publikasjoner Ingen.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte til fremstilling av et nytt antibiotikum betegnet fortimicin B som kan anvendes som et legemiddel.

Det er alltid behov for antibiotika som utviser aktivitet overfor et bredt spektrum av bakterier. Til dette formål er en hittil ukjent mikroorganismeart blitt isolert fra jorden på en rismark i utkanten av byen Hiroshima i Hiroshima-provinsen, Japan. Denne hittil ukjente art produserer ved dyrking det hittil ukjente antibiotikum fortimicin B, som utviser antibakteriell aktivitet overfor forskjellige gram-positive og gram-negative bakterier. Det hittil ukjente antibiotikum kan benyttes til en lang rekke formål og er spesielt nyttig som et overflatedesinfeksjonsmiddel for bekjempelse av populasjoner av *Staphylococcus*, *Escherichia* og andre bakterier.

Det hittil ukjente antibiotikum som fremstilles ifølge oppfinnelsen ble opprinnelig identifisert som XK-70-A, men er nå blitt betegnet fortimicin B, og har den kjemiske strukturformel:



Ifølge foreliggende oppfinnelse fremstilles fortimicin B ved at en mikroorganisme tilhørende arten *Micromonospora olivoasterospora* dyrkes i et næringsmedium hvoretter fortimicin B isoleres fra dette medium.

Mikroorganismens typiske stamme ble opprinnelig identifisert som stamme MK-70, og denne er blitt deponert i the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, og er tildelt tilvekstnummeret ATCC 21819. Stammen MK-70 har følgende egenskaper:

I. Morfologi:

Stammen MK-70 er gram-positiv. På konvensjonelt agar-medium danner MK-70 aldri et virkelig luftmycelium som kan iakttas med *Streptomyces* osv. På overflaten av et agarmedium hvor det er god sporedannelse, iakttas et olivengrønt, vokslignende og skinnende lag av sporer. Når stammen dyrkes i et flytende medium, viser dyrkningsvæsken en lys hvete farge i første stadier av dyrkingen, men i de avsluttede stadier av dyrkingen viser dyrkningsvæsken en mørk olivengrønn farge, og det kan iakttas et stort antall sporer i kulturen. Ved mikroskopisk studium av cellene av stammen MK-70 dyrket i et flytende medium, har det vist seg at myceliet er omkring 0,5 μm i diameter og er velutviklet og ikke-tverrdelt. En enkelt spore dannes ved enden av hver sporofor (omkring 0,3-1,0 μm lang) forgrenet fra substratmyceliet, og sporene dannes over hele det relativt lange substratmycelium. De modne sporer er kuleformede og omkring 1,0 μm i diameter. Ved iakttagelse av sporenes overflater med et elektronmikroskop ser sporene ut som en stjerne, da det er et stort antall utvekster hvis endespisser er noe runde.

II. Dyrkningsegenskaper

Vekstgraden, kolonienes overflatetilstand og produksjonen av oppløselige pigmenter som iakttas når stammen MK-70 dyrkes på forskjellige medier, er vist i tabell 1. Fargebestemmelsene er angitt ifølge klassifikasjonene i the Color Harmony Manual (Container Corporation of America). Med hensyn til tyrosinmediet anvendes det medium som er beskrevet av Gordon & Smith: J. Bact. 69, 147, (1955).

Tabell 1

Medium	Vekst	Farge på substrat-mycelium	Oppløselig pigment
Czapek's agar	Moderat Flat	Støvet oliven (1 lg)	Intet
Glukoseasparagin-agar	Moderat Flat, voksahtig	Oliven (1 pl)	Intet
Næringsagar	God Hevet, furet	Oliven (1 pl)	Intet
Eggalbuminagar	Moderat Flat, voksahtig	Lys oliven sandfarget (1 li)	Intet
Stivelsesagar	God Flat	Svart oliven grønnblå (1 po)	Intet
Maltekstrakt-gjærekstrakt-agar	God Hevet, furet	Mørk oliven (1 pn)	Mørk oliven (1-1/2 pn)
Havremel-agar	God Foldet, voksahtig	Ravkaramell (3 lc) mørkebrun (2 pn)	Støvet oliven (1 pg)
Dekstrose (1%)-NZ amin (3%)-agar	Moderat Flat, voksahtig	Lys hvete (2 ea)	Intet
Bennet's agar	God Hevet, furet	Mørk oliven (1 pn)	Intet
Emerson's agar	Moderat Hevet, furet, voksahtig	Oliven (1 ni)	Intet
Glukose-gjærekstrakt-agar	God Hevet, furet, voksahtig	Mørk oliven (1 pn)	Intet
Pepton-jernagar	Moderat Flat, voksahtig	Mørk oliven (1 nl)	Intet
Tyrosinagar	Moderat Flat, voksahtig	Oliven (1 ni)	Intet

III. Fysiologiske egenskaper

De fysiologiske egenskaper til stammen MK-70 er vist i tabell 2. Med prøvene, unntatt de for optimal-temperatur og virkninger på melk og cellulose, dyrkes stammen ved 27°C i 2 uker. Optimal-temperaturen bestemmes etter 5 dagers dyrkning og virkningene på melk og cellulose iakttas etter 1 måneds dyrkning.

139864

Tabell 2

1) Utnyttelse av karbonkilder:

<u>Karbonkilder:</u>	<u>Utnyttelse:</u>
D-arabinose	-
D-galaktose	-
D-glukose	++
Glycerol	-
D-laktose	-
D-fruktose	-
L-inositol	-
D-mannitol	-
D-raffinose	-
L-ramnose	-
Sakkarose	++
Stivelse	++
D-xylose	-
2) Smelting av gelatin	svak
3) Virkning på melk	peptonisert
4) Nedbrytning av cellulose	svakt positiv
5) Hydrolyse av stivelse	positiv
6) Optimum-pH for vekst	6,8 - 7,5
7) Optimum-temperatur for vekst	30 - 38°C
8) Reduksjon av nitrat	positiv
9) Dannelse av tyrosinase	negativ
10) Dannelse av melanoidpigmenter	negativ

Stammen MK-70 er en mesofil, som aldri danner et virkelig luftmycelium når den dyrkes på et agarmedium, men danner en enkelt spore på substratmyceliet, og det har ved analyse vist seg at celleveggene i denne stamme inneholder mesodiaminopimelinsyre. MK-70 betraktes således som en stamme av slekten *Micromonospora*.

Pålitelig grunnlag til systematisk klassifikasjon av arter tilhørende slekten *Micromonospora* er ikke blitt fastlagt. Derfor er klassifikasjonen av mikroorganismene innen denne slekt hittil blitt utført ved en samlet sammenligning av morfologiske og fysiologiske egenskaper osv. Ifølge denne klassifikasjonsmetode er det blitt rapportert tre stammer tilhørende slekten *Micromonospora*,

nemlig *Micromonospora echinospora* subsp. *echinospora* NRRL-2985 (ATCC 15837), *Micromonospora echinospora* subsp. *pallida* NRRL-2996 (ATCC 15838) og *Micromonospora echinospora* subsp. *ferruginea* NRRL-2995 (ATCC 15836), som utviser runde utvekster på sporenes overflate. Imidlertid danner disse tre stammer av *M. echinospora* sporer av mørke brun til sort farge når de dyrkes på et konvensjonelt agar-medium, men viser aldri en slik olivenfarge som stammen MK-70. De tre stammer av *M. echinospora* kan utnytte L-ramnose, men stammen MK-70 kan ikke dette. Dessuten kan de tre stammer produsere to aktive stoffer; et som kun har aktivitet overfor gram-positive bakterier og har en R_f -verdi på 0,4-0,5 ved papirkromatografi under anvendelse av vannmettet n-butanol som utviklingsmiddel, og antibiotikumet Gentamicin som har en R_f -verdi på 0,00. På den annen side kan stammen MK-70 produsere tre slags aktive stoffer, nemlig et stoff som kun har aktivitet overfor gram-positive bakterier og har en R_f -verdi på 0,05-0,1 ved papirkromatografi under anvendelse av det ovennevnte utviklingsmiddel; et stoff som kun har aktivitet på gram-positive bakterier og har en R_f -verdi på 0,00, og fortimicin B som har aktivitet overfor gram-positive og gram-negative bakterier og har en R_f -verdi på 0,00. Det fremgår klart av det ovenstående at stammen MK-70 er forskjellig fra de tre stammer av *M. echinospora*.

Stammen MK-70 viser en oliven til mørk oliven farge når den dyrkes under anvendelse av et medium som er egnet for sporedannelse, og produserer et oppløselig olivenfarget pigment i andre medier. Blant stammene av slekten *Micromonospora* er det noen stammer som er i stand til å danne olivenfargede sporer, nemlig *Micromonospora chalcea*, *Micromonospora fusca* osc., men disse adskiller seg ved sporenes overflatetilstand og fargen av oppløselige pigmenter med mere.

En annen art av *Micromonospora*, nemlig *Micromonospora coerulea*, utviser vanligvis en grønnblå farge og produserer blå-grønne oppløselige pigmenter. Pigmentene fungerer som en syre-baseindikator og er derfor forskjellige fra pigmentet hos stammen MK-70. Videre er sporene hos *M. coerulea* tilbøyelige til å dannes i klyngeform, og sporeoverflatene er glatte. Således atskilles *M. coerulea* fra stammen MK-70.

Som beskrevet ovenfor er det ingen stammer som tilsvarende stammen MK-70 blant de hittil rapporterte stammer av slekten

Micromonospora. Derfor betraktes stammen MK-70 som en hittil ukjent art av slekten Micromonospora og er blitt tildelt navnet Micromonospora olivoasterospora. Navnet på denne art skriver seg fra dannelsen av olivenfargede kuleformede sporer med utvekster. Som anført ovenfor er stammen MK-70 blitt deponert i the American Type Culture Collection som Micromonospora sp. MK-70 under nr. ATCC 21819. Stammen MK-70 er også blitt deponert i the Fermentation Research Institute, Tokyo, Japan, og er blitt tildelt registreringsnummeret FERMP nr. 1560.

Det er også blitt isolert to variantstammer av Micromonospora olivoasterospora som har evnen til å produsere fortimicin B. Disse varianter adskiller seg fra typestammen ved at de har evne til å utnytte D-galaktose, D-fruktose og D-xylose. Variantene utviser ytterligere en lys hvete farge når de dyrkes på forskjellige medier ettersom de mangler evnen til å danne sporer på myceliet. I andre henseender ligger variantene tett ved typestammen. Disse to varianter som dermed kan anvendes i foreliggende fremgangsmåte, er også blitt deponert i the American Type Culture Collection og er blitt tildelt tilvekstnumrene ATCC 31009 og ATCC 31010. Disse varianter såvel som typestammen, er fritt tilgjengelige for offentligheten.

Vanligvis kan konvensjonelle metoder for dyrking av mikroorganismen tilhørende aktinomycetene anvendes ved foreliggende fremgangsmåte. Således kan det benyttes forskjellige næringskilder til dyrkningsmediet. Egnede karbonkilder inkluderer glukose, stivelse, mannose, fruktose, sakkarose, melasse osv., enten alene eller i kombinasjon. Dessuten kan hydrokarboner, alkoholer, organiske syrer osv. benyttes avhengig av den bestemte mikroorganismes utnyttelsesevne. Uorganiske og organiske nitrogenkilder slik som ammoniumklorid, ammoniumsulfat, urea, ammoniumnitrat, natriumnitrat osv., og naturlige nitrogenkilder slik som pepton, kjøttekstrakt, gjærekstrakt, tørrgjær, maisstøpevann, soya-bønnemel, kasaminosyre, oppløselig vegetabilsk protein osv., kan anvendes alene eller i kombinasjon. Dessuten kan slike uorganiske salter som natriumklorid, kaliumklorid, kalsiumkarbonat, fosfater osv. om nødvendig tilsettes til mediet. Ennvidere kan mediet hensiktsmessig tilsettes organiske eller uorganiske materialer som er i stand til å fremme veksten av mikroorganismen og produksjonen av fortimicin B.

En væskedyrkningsmetode, spesielt submers omrørt dyrking, er mest velegnet for utførelse av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Det er ønskelig å utføre dyrkingen ved en temperatur på 25-40°C og ved en tilnærmelsesvis nøytral pH-verdi. Det ønskede antibiotikum dannes og oppsamles i dyrkingsvæsken, vanligvis etter 4-15 dager dyrking. Når utbyttet av fortimicin B i dyrkingsvæsken når et maksimum, stanses dyrkingen og antibiotikumet isoleres fra den oppnådde dyrkingsvæske etter at mikrobecellene er blitt fjernet, f.eks. ved filtrering, og renses.

Isolering og rensing av fortimicin B fra filtratet utføres ved de metoder som vanligvis benyttes til isolering og rensing av mikrobielle metaboliske produkter fra dyrkningsvæsker.

Ettersom fortimicin B er basisk og er oppløselig i vann, men tungt oppløselig i de alminnelige organiske oppløsningsmidler, kan antibiotikumet renses ved de metoder som vanligvis benyttes til rensing av såkalt vannoppløselige basiske antibiotika. Mere spesielt kan fortimicin B renses ved en riktig kombinasjon av adsorpsjon og desorpsjon fra kationutvekslerharpikser; kolonne-kromatografi under anvendelse av cellulose; adsorpsjon og desorpsjon fra "Sephadex LH-20"; silisiumdioksydgel-kromatografi og lignende metoder.

For eksempel innstilles det cellefrie dyrkningsfiltrat først til en pH-verdi på 7,5 og underkastes deretter adsorpsjon på en kationutvekslerharpiks, "Amberlite IRC-50" (NH_4^+ -form). Etter vasking med vann utføres elueringen med 1N vandig ammoniakk. Den aktive fraksjon konsentreres under forminsket trykk og sendes deretter gjennom en kolonne av anionutvekslerharpiks, slik som "Dowex 1 x 2" (OH^- -form). De adsorberte stoffer elueres med vann og de eluerte aktive fraksjoner oppsamles og konsentreres under forminsket trykk, hvorved det oppnås et urent pulver inneholdende fortimicin B og andre aktive komponenter.

Silisiumdioksydgel-kromatografi kan for eksempel anvendes for isolering av fortimicin B fra det urene pulver. Som utviklingsmiddel benyttes det nedre lag av en blanding av kloroform, isopropanol og 17% vandig ammoniakk (2:1:1). Mer spesielt oppløses det urene pulver i utviklingsmediet, innføres i en kolonne av silisiumdioksydgel og utvikles med det samme oppløsningsmiddel. Den første aktive fraksjon inneholder fortimicin B. Andre aktive komponenter slik som et stoff som foreløpig identifiseres som XK-70-1, inneholdes i

senere eluerte fraksjoner. Fraksjonene inneholdende fortimicin B oppsamles og konsentreres under forminsket trykk. Etter frysetørking av konsentratet oppnås et hvitt pulver bestående av basen av anti-biotikumet.

De aktive fraksjoner inneholdende fortimicin B bestemmes ved stigende papirkromatografi under anvendelse av "Whatman nr. 1" filterpapir. Utviklingen utføres ved romtemperatur i 10-15 timer under anvendelse av det nedre lag av en blanding av kloroform, metanol og 17% vandig ammoniakk (2:1:1). R_F -verdien for fortimicin B på papirkromatogrammet er omkring 0,65.

Fortimicin B er et hvitt basisk pulver med en molekylvekt på 348 og et smeltepunkt på 101-103°C. Elementanalysen finnes å være C=51,72%, H=9,20%, N=16,16% og O=22,92%. Molekylformen antas å være $C_{15}H_{32}N_4O_5$.

Den optiske rotasjon av den frie base av fortimicin B er $(\alpha)_D^{24} = +22,2^\circ$ (C = 1,01, H_2O).

På tegningen viser

figur 1 det ultraviolette absorpsjonsspektrum av en vandig oppløsning av fortimicin B;

figur 2 det infrarøde absorpsjonsspektrum av antibiotikumet (KBr-tablett);

figur 3 det magnetiske kjerneresonansspektrum (NMR) av fortimicin B;

figur 4 NMR-spektret av amonicyklitol-delen av fortimicin B; og

figur 5 NMR-spektret av N-acetylderivatet av aminocyklitol-delen.

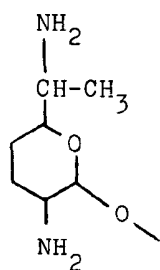
Figur 1 viser det ultraviolette absorpsjonsspektrum av en vandig oppløsning av fortimicin B. Spektret avslører intet karakteristisk ultraviolet absorpsjonsmaksimum mellom 220 og 360 μm og viser simpelthen en terminal absorpsjon.

Figur 2 viser det infrarøde absorpsjonsspektrum av antibiotikumet (KBr-tablett). Det fremgår klart fra figuren at fortimicin B viser maksima ved de følgende bølgelengder (cm^{-1}):

523, 561, 650, 702, 755, 815, 879, 917, 993, 1034,
1034, 1066, 1093, 1150, 1250, 1336, 1370, 1470,
1578, 2100, 2930 og 3355.

Det magnetiske kjerneresonansspektrum (NMR) av fortimicin B er vist i figur 3. Det sees klart av spektret at absorpsjonen ved

5,62 ppm basert på et anomer proton antyder tilstedeværelsen av et monoglykosid i antibiotikumet. Spektret viser ytterligere en metyldublet ved 1,59 ppm, et metylenmaksimum ved 2,0-2,5 ppm og en absorpsjon ved 3,3 ppm opptil et anomer proton. Når fortimicin B hydrolyseres med 6N HCl og underkastes tynnsjiktskromatografi, iakttas en flekk ved den samme posisjon hvor purporosamin B danner en flekk ved tynnsjiktskromatografi av hydrolysate av et annet antibiotikum, nemlig gentamicin C₂. Således antas det ut fra det ovenstående og massespektret, som omtales nedenfor, at monoglykosid-delen av fortimicin B er purpurosamin B med den følgende formel:



Figur 4 viser NMR-spektret av en aminocyklitol-del oppnådd ved hydrolyse av fortimicin B. Det fremgår fra figuren at spektret har singlet-maksima ved 3,17 ppm og 3,95 ppm, som viser tilstedeværelsen av henholdsvis en N-metylgruppe og en O-metylgruppe.

Figur 5 viser NMR-spektret av N-acetylderivatet av aminocyklitol-delen. Det enkelte maksimum ved 2,48 ppm viser tilstedeværelsen av en N-acetylgruppe, dvs. tilstedeværelsen av nitrogen i aminocyklitol-delen.

Resultatene av massespektrometri av fortimicin B er som følger:

m/e 349,2442; 331,2099; 286,1762; 235,1297; 207,1338;
 143,1184; 126,0916; 100,0768; 97,0890; 88,0752;
 87,0669; 86,0596; 82,0642; 72,0440; 70,0646;
 56,0497; 44,0499.

Det antas at de ovenstående verdier tyder på M^{+1} -tilstanden. Det vil si at den induserte positive ladning på molekylet er resultatet av tilføyselsen av hydrogenkjerne snarere enn det mer alminnelige tap av et elektron. Derfor er hver verdi høyere med en faktor på 1 enn den samme verdi. Av disse data fremgår det at verdien av det molekylære ion M^{+1} er m/e 349, og at verdien av M^{+1} -

H₂O er m/e 331. Dessuten viser verdien m/e 143 tilstedeværelsen av purpurosamin B.

Det N-acetylderivat av aminocyklitol-delen som oppnås ved hydrolyse av fortimicin B, har et molekylært ion av M⁺ på m/e 249, og også M⁺ - H₂O på m/e 231, M⁺ - 2H₂O på m/e 213 og M⁺ - CH₃OH på m/e 217. I overensstemmelse med dette bestemmes det således å ha molekylformelen C₁₀H₂₀N₂O₅.

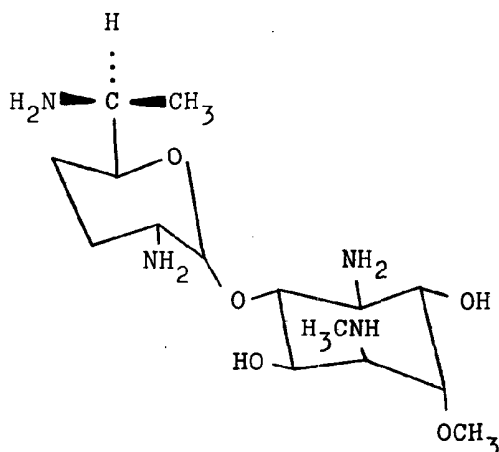
Ut fra NMR-spektret og massespektret av aminocyklitol-delen antas fortimicin B å ha en O-metylgruppe, en N-metylgruppe og 2 OH-grupper. Denne analyse understøttes av den erkjennelse at når fortimicin B oksyderes med periodsyre, forbrukes to mol periodsyre pr. molekyl fortimicin B. Dessuten er N-acetylmolekylets forbruk av periodsyre når antibiotikumet acetyleres med eddiksyreanhydrid og derpå behandles med periodsyre, lik 0.

Resultatene fra enkelt krystall-røntgenanalyse av fortimicin B (fri base) er som følger:

Krystalldata: romgruppe P2₁2₁2₁, a = 13,966 (2), b = 16,472 (2), c = 9,522 (1) Å, z = 4.

Intensitetene for 2201 uavhengige refleksjoner ble samlet på et 4-sirkel-automatisert diffraktometer med Moka-stråling. Strukturen ble løst ved direkte metoder (MULTAN) og deretter detaljert ved hjelp av "block-diagonal least squares"-metoden til en sluttlig R-verdi på 0,078.

Ut fra det ovenstående er det funnet at fortimicin B har følgende strukturformel:



Den frie base av fortimicin B er meget oppløselig i vann, også oppløselig i metanol og tungt oppløselig i etanol, men uoppløselig i slike organiske oppløsningsmidler som kloroform, benzen, etylacetat, butylacetat, etyleter, petroleumseter, n-heksan osv.

Ved fargeprøvinger gir fortimicin B positive reaksjoner ved ninhydrin-testen og kaliumpermanganat-testen og negative reaksjoner ved Sakaguchi-testen, Elson-Morgan's test og biuret-testen.

R_F -verdiene for fortimicin B oppnådd ved papirkromatografi og tynnsjiktskromatografi under anvendelse av forskjellige utviklingsmidler, er vist i de følgende tabeller 3, 4 og 5. Disse verdier er sammenlignet med R_F -verdiene av forskjellige lignende antibiotika utviklet på samme måte.

Tabell 3

R_F -verdier for fortimicin B ved stigende papirkromatografi (ved 28°C)

Utviklingsmiddel	R_F -verdi	Utviklingsperiode (timer)
20% (vekt/vol) ammoniumklorid	0,85	3
Vannmettet n-butanol	0,00	15
n-butanol-eddiksyre-vann (3:1:1)	0,09	15
Vannmettet etylacetat	0,00	4
Vannmettet n-butanol inneholdende		
2% (vekt-vol) p-toluen-svovelsyre og		
2% (vol/vol) piperidin	0,07	15

Tabell 4

R_f-verdier for fortimicin B og gentamicin C kompleks ved silisiumdioksydgel-tynnsjikt-skromatografi (utviklet ved romtemperatur i 3 timer).

Utviklingsmiddel *	Antibiotikum	R _f -verdi
I	fortimicin B	0,80
I	gentamicin C kompleks	0,71
II	fortimicin B	0,62
II	gentamicin C kompleks	0,06-0,16

* I: Det øvre lag av en blanding av kloroform, metanol og 17% vandig ammoniakk (2:1:1 etter volumene)

II: 10% ammoniumacetat og metanol (1:1 etter volumene).

Tabell 5

R_f-verdier for kjente antibiotika ved stigende papirkromatografi under anvendelse av metanol og 17% vandig ammoniakk (2:1:1) (utviklet ved romtemperatur i 12 timer)

Antitiotikum	R _f -verdi
Streptomycin A	0,02
Streptomycin B	0,00
Bluensomycin	0,01
Ribostamycin	0,00
Lividomycin A	0,00
Lividomycin B	0,03
Lividomycin D	0,02
Spectinomycin D	0,02
Spectinomycin	0,45
Kasugamycin	0,01
Butirosine A	0,00
Butirosine B	0,01
Hygromycin B	0,02

Tabell 5 (forts.)

Antibiotikum	R _F -verdi
Destomycin A	0,03
Gentamicin A	0,00
Gentamicin B	0,00
Gentamicin C _{1a}	0,18
Gentamicin C ₁	0,59
Gentamicin C ₂	0,38
Sisomicin	0,18
Neomycin A	0,00
Neomycin B	0,03
Neomycin C	0,00
Antibiotik Nr. 460	0,01
Kanamycin A	0,02
Kanamycin B	0,01
Kanamycin C	0,02
Paromomycin	0,00
Nebramycin kompleks	0,01
Tobramycin	0,02
Apramycin	0,02
XK-62-2*	0,49
Fortimicin B	0,65

* Et hittil ukjent antibiotikum angitt i US-patentsøknad Serial nr. 364.058; inngitt 25. mai 1973.

De antibakterielle spektra for fortimicin B overfor forskjellige mikroorganismer med agar-fortynningsmetoden er vist i følgende tabell 6.

Tabell 6

Mikroorganisme	Minimal inhiberende konsentrasjon (µg/ml)
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 10541	416,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	6,6
<i>Staphylococcus aureus</i> KY 8942 (resistent overfor kanamycin, paromomycin og streptomycin)	104,2
<i>Staphylococcus aureus</i> KY 8950 (resistent overfor streptomycin, tetracyklin, penicillin og sulfonamid)	52,1
<i>Staphylococcus aureus</i> KY 8953 (resistent overfor streptomycin, kanamycin, paromomycin, tetracyklin, neomycin, kanamycin B og erytromycin)	26,1
<i>Staphylococcus aureus</i> KY 8956 (resistent overfor streptomycin, paromomycin, tetracyklin, erytromycin og oleandomycin)	0,83
<i>Staphylococcus aureus</i> KL 8957 (resistent overfor kloramfenikol, streptomycin, kanamycin B, tetracyklin og paromomycin)	1,65
<i>Bacillus subtilis</i> Nr. 10707; KY 4273	104,2
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634	104,2
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> ATCC 9463	104,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	26,1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 26	13,1
<i>Escherichia coli</i> KY 8302 (resistent overfor kloramfenikol, streptomycin, kanamycin, paromomycin, tetracyklin og spektinomycin)	208,3
<i>Escherichia coli</i> KY 8310 (resistent overfor kloramfenikol, streptomycin, kanamycin, gentamicin, kanamycin B, paromomycin, tetracyklin og spektinomycin)	52,1
<i>Escherichia coli</i> KY 8314 (resistent overfor streptomycin)	26,1
<i>Escherichia coli</i> KY 8315 (resistent overfor streptomycin, kanamycin, paromomycin og neomycin)	26,1
<i>Escherichia coli</i> KY 8327 (resistent overfor kanamycin, gentamicin, sisomicin og tobramycin)	13,1
<i>Escherichia coli</i> KY 8331 (resistent overfor kanamycin, robostamycin, neomycin, paromomycin og lividomycin)	1,65

Tabell 6 (forts.)

Mikroorganisme	Minimal inhiberende konsentrasjon (µg/ml)
Escherichia coli KY 8332 (resistent overfor kanamycin og tobramycin)	3,3
Pseudomonas aeruginosa BMH Nr. 1	208,3
Proteus vulgaris ATCC 6897	26,1
Shigella sonnei ATCC 9290	52,1
Salmonella typhosa ATCC 9992	13,1

Det fremgår klart av det ovenstående at fortimicin B har en antibakteriell aktivitet overfor forskjellige gram-positive og gram-negative bakterier og også har antibakteriell aktivitet overfor Staphylococcus aureus og Escherichia coli, som er resistente overfor forskjellige kjente antibiotika. I betraktning av det brede antibakterielle spektrum og den karakteristiske struktur er fortimicin B et nyttig overflatedesinfiserende antibiotikum. Fortimicin B antas også å være nyttig som utgangsmateriale for syntesen av forskjellige derivater ved kjemisk modifikasjon.

En sammenligning av fortimicin B med andre antibiotika viser dets nyhet. Som vannoppløselige basiske antibiotika produsert av mikroorganismer tilhørende slekten Micromonospora og med et bredt antibakterielt spektrum kjennes f.eks. gentamicin (M.J. Weinstein et al: Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1963, 1 og D.J. Cooper et al: J. Infect. Dis., 119, 342 (1969)); antibiotikum nr. 460 (japansk utlegningsskrift nr. 16153/71); sisomicin (M.J. Weinstein et al: J. Antibiotics, 23, 551, 555, 559 (1970)); XK-62-2 (US-patentsøknad Serial nr. 364.058, inngitt 25. mai 1973). Imidlertid fremgår det fra tabell 4 og 5 at R_f -verdiene for fortimicin B ved silisiumdioksydgel-tynnsljikt-kromatografi og papirkromatografi klart adskiller seg fra verdiene for A-, B-, C_{1a} -, C_2 - og C_1 -komponentene av gentamicin, antibiotikum nr. 460, sisomicin og XK-62-2. Selv ved sammenligning av vannoppløselige basiske aminoglykosid-antibiotika med lignende egenskaper som fortimicin B eller dets bestanddeler, som neomycin A (neamin), paromomycin, gentamicin osv., har de sistnevnte antibiotika desoksystreptamin som bestanddel, mens fortimicin B ikke inneholder desoksystreptamin og således adskiller seg klart

fra disse antibiotika. Videre adskiller den kjemiske struktur av fortimicin B klart dette antibiotikum fra de andre kjente antibiotika.

Foreliggende fremgangsmåte belyses nærmere ved de følgende representative eksempler.

Eksempel 1

I dette eksempel anvendes *Micromonospora olivoasterospora* (ATCC 21819) (FERM-P Nr. 1560) som podestamme og dyrkes først i et første podemedium inneholdende 2% glukose, 0,5% pepton, 0,5% gjær-ekstrakt og 0,1% kalsiumkarbonat (pH 7,2 før sterilisering) ved innpodning av et øye av podestammen i 10 ml av podemediet i et stort 50 ml reagensglass. Dyrkingen utføres ved 30°C i 5 dager under rysting. 10 ml av podedyrkningsvæsken innpodes deretter i 30 ml av et annet podemedium i en 250 ml Erlenmeyer-kolbe. Sammensetningen av det annet podemedium er den samme som av det første podemedium. Den annen podedyrkning utføres ved 30°C i 2 dager med rystning.

Deretter innpodes 30 ml av den andre podedyrkningsvæske i 300 ml av et tredje podemedium i en 2 liters Erlenmeyer-kolbe forsynt med skvulpeplater. Sammensetningen av det tredje podemedium er den samme som av det første podemedium. Den tredje podedyrkning utføres ved 30°C i 2 dager med rysting. Deretter innpodes 1,5 liter av den tredje podedyrkningsvæske (tilsvarende innholdet av 5 kolber) i 15 liter av et fjerde podemedium i et 30 liters glassgjæringskar. Sammensetningen av det fjerde podemedium er den samme som av det første podemedium. Dyrkingen i gjæringskaret utføres ved 30°C i 2 dager med lufting og omrøring (omrøring 350 omdr./min.; lufting 15 l/min.). Endelig innpodes 15 liter av den fjerde podedyrkningsvæske i 150 liter av et hovedgjæringsmedium i et 300 liters rust-fast stål-gjæringskar. Hovedgjæringsmediet består av: 4% stivelse, 2% soyabønneemel, 1% maisstøpevann, 0,05% K_2HPO_4 , 0,05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,03% KCl og 0,1% $CaCO_3$ (pH 7,5 før sterilisering). Dyrkingen i gjæringskaret utføres ved 30°C i 4 dager med lufting og omrøring (omrøring 150 omdr./min.; lufting 80 l/min.).

Den resulterende gjæringsvæske innstilles til en pH-verdi på 2,5 med konsentrert svovelsyre og omrøres i 30 minutter. Deretter tilsettes omkring 7 kg av et filterhjelpemiddel, "Radiolite nr. 600", og mikrobecellene fjernes ved filtrering. Filtratet innstilles til en pH-verdi på 7,5 med 6N natriumhydroksydoppløsning og sendes gjennom en kolonne pakket med omkring 20 liter av en kationutveksler-

harpiks, "Amberlite IRC-50" (ammoniakkform), og gjennomløpet kasseres. Aktive stoffer adsorberes på harpiksen. Etter vasking av harpiksen med vann elueres de adsorberte aktive stoffer med 1N vandig ammoniakk. Eluatets aktivitet bestemmes ved en papirplatemetode under anvendelse av en agarplate av *Bacillus subtilis* nr. 10707. De aktive fraksjoner oppsamles, og blandingen konsentreres til omkring 1 liter under forminsket trykk. Konsentratet sendes gjennom en kolonne pakket med 500 ml av en anionutvekslerharpiks, "Dowex 1 x 2" (OH^- -form), og deretter vaskes kolonnen med omkring 2 liter vann, hvorved urenheter fjernes. De aktive stoffer elueres med vann. De således oppnådde aktive fraksjoner oppsamles og konsentreres til omkring 100 ml under forminsket trykk og sendes deretter gjennom en kolonne pakket med omkring 50 ml aktivt kullpulver, hvorved de aktive stoffer adsorberes på kullpulveret. Kolonnen vaskes med vann og gjennomløpet og vaskevannet kasseres. Deretter elueres de adsorberte aktive stoffer med 0,2N svovelsyre. Eluatets aktivitet bestemmes ved papirplate-metoden under anvendelse av *Bacillus subtilis*, og de aktive fraksjoner oppsamles. De således oppnådde fraksjoner sendes gjennom en kolonne av "Dowex 44" (OH^- -form). De aktive stoffer elueres deretter med vann og oppsamles og konsentreres til omkring 50 ml. Det således oppnådde konsentrat lyofiliseres hvorved det oppnås et urent pulver inneholdende fortimicin B. Utbyttet av det urene pulver er omkring 32 g. Det urene pulver utviser en aktivitet på 680 enh./mg (aktiviteten av 1 mg rent produkt tilsvarer 1000 enheter).

Det således oppnådde urene pulver inneholdende fortimicin B anbringes ensartet på den øvre ende av en glasskolonne tett pakket med omkring 1 liter silisiumdioksydgel. Silisiumdioksydgel-kolonnen fremstilles ved først å suspendere silisiumdioksydgelen i et oppløsningsmiddel bestående av kloroform, isopropanol og 17% vandig ammoniakk (2:1:1 etter volumene). Suspensjonen pakkes i kolonnen som et ensartet lag og vaskes deretter grundig med det samme oppløsningsmiddel. Etter anbringelse av det urene pulver ved toppen av kolonnen utføres elueringen med det samme oppløsningsmiddel som gradvis helles i kolonnen fra toppen, og deretter utføres elueringen med en strømningshastighet på omkring 50 ml/time. Eluatet oppsamles i fraksjoner på hver 20 ml og aktiviteten av hver fraksjon bestemmes ved papirplate-metoden. De aktive fraksjoner underkastes papirkromatografi, og fraksjonene inneholdende fortimicin B oppsamles. Fortimicin B er den aktive komponent som først elueres

fra kolonnen. Mens elueringen fortsettes, elueres andre biprodukter omfattende det tidligere nevnte aktive stoff XK-70-1, som inneholdes i det urene pulver. Fraksjonene inneholdende fortimicin B oppsamles og konsentreres under forminsket trykk til fullstendig fjerning av oppløsningsmidlet. Konsentratet oppløses deretter i en liten mengde vann og etter frysetørking av oppløsningen oppnås ca. 1,5 g rensset preparat av fortimicin B (fri base). Preparatets aktivitet er omkring 965 enh./mg.

Eksempel 2

I dette eksempel anvendes stammen fra eksempel 1 som podestamme, og det anvendes et medium inneholdende 1% glukose, 1% oppløselig stivelse, 0,1% gjærekstrakt, 0,5% pepton og 0,1% kalsiumkarbonat som podemedium i 4 podedyrkningstrinn. De fire podedyrkinger utføres på samme måte som i eksempel 1.

Deretter innpodes 15 liter av den fjerde podedyrkningsvæske i 150 liter av et femte podemedium av samme sammensetning som de foregående podemedier i et 300 liters rustfritt stål-gjæringskar. Dyrkingen i gjæringskaret utføres ved 30°C i 2 dager med lufting og omrøring. Deretter innpodes 150 liter av den femte podedyrkningsvæske i 1200 liter av et hovedgjæringsmedium i en 2000 liters gjæringstank. Hovedgjæringsmediet omfatter 4% oppløselig stivelse, 3% "Ebios" (tørket gjærpulver), 0,05% K_2HPO_4 , 0,05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,03% KCl og 0,1% $CaCO_3$.

Hovedgjæringen utføres ved 37°C i 4 dager med lufting og omrøring. Produksjonen av aktive stoffer når nesten maksimum 96 timer etter dyrkningens start.

Etter fullførelsen av dyrkingen utføres isoleringen og rensingen av fortimicin B på samme måte som i eksempel 1, hvorved det oppnås 34 g rensset preparat med en aktivitet på omkring 950 enh./mg.

Eksempel 3

I dette eksempel anvendes *Micromonospora olivoasterospora* Mm 744, KY 10067, ATCC 31009 (FERM-P Nr. 2193) som podestamme. Et medium inneholdende 2% glukose, 0,5% pepton, 0,3% gjærekstrakt og 0,1% kalsiumkarbonat (pH 7,2 før sterilisering) anvendes som podemedium for den første til fjerde podedyrkning, utført på samme måte som i eksempel 1.

Deretter innpodes 15 liter av den fjerde podedyrkningsvæske i 150 liter av et hovedgjæringsmedium i et 300 liters rustfritt

stålgjæringskar. Hovedgjæringsmediet omfatter: 2% oppløselig stivelse, 0,5% soyabønneemel, 2% glukose, 1% maisstøpevann, 1% gjær-ekstrakt, 0,05% K_2HPO_4 , 0,05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,03% KCl og 0,1% $CaCO_3$ (pH 7,0 før sterilisering). Dyrkingen utføres ved 30°C i 4 dager med lufting og omrøring (omrøring 150 omdr./min.; lufting 80 liter/min.).

Etter fullføring av dyrkingen utføres isoleringen og rensingen av fortimicin B på samme måte som i eksempel 1, hvorved det oppnås omkring 1,3 g rensset preparat med en aktivitet på omkring 962 enh./mg.

Eksempel 4

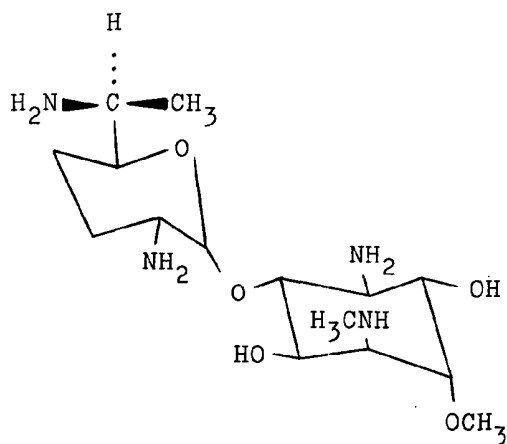
I dette eksempel anvendes *Micromonospora olivoasterospora* MK-80, KY 11055, ATCC 31010 (FERM-P nr. 2192) som podestamme. Et medium inneholdende 1% glukose, 1% oppløselig stivelse, 0,5% gjær-ekstrakt, 0,5% pepton og 0,1% kalsiumkarbonat (pH 7,0 før sterilisering) anvendes som podemedium for den første til femte podedyrking, utført på samme måte som i eksempel 2.

Deretter innpodes 150 liter av den femte podedyrkningsvæske i 1200 liter av et hoveddyrkningsmedium i en 2000 liters gjæringstank. Hovedgjæringsmediet har samme sammensetning som i eksempel 1. Hoveddyrkingen utføres ved 30°C i 4 dager med lufting og omrøring.

Etter fullføring av dyrkingen utføres isoleringen og rensningen av fortimicin B på samme måte som i eksempel 1, hvorved det oppnås omkring 38 g rensset preparat med en aktivitet på omkring 972 enh./mg.

P a t e n t k r a v

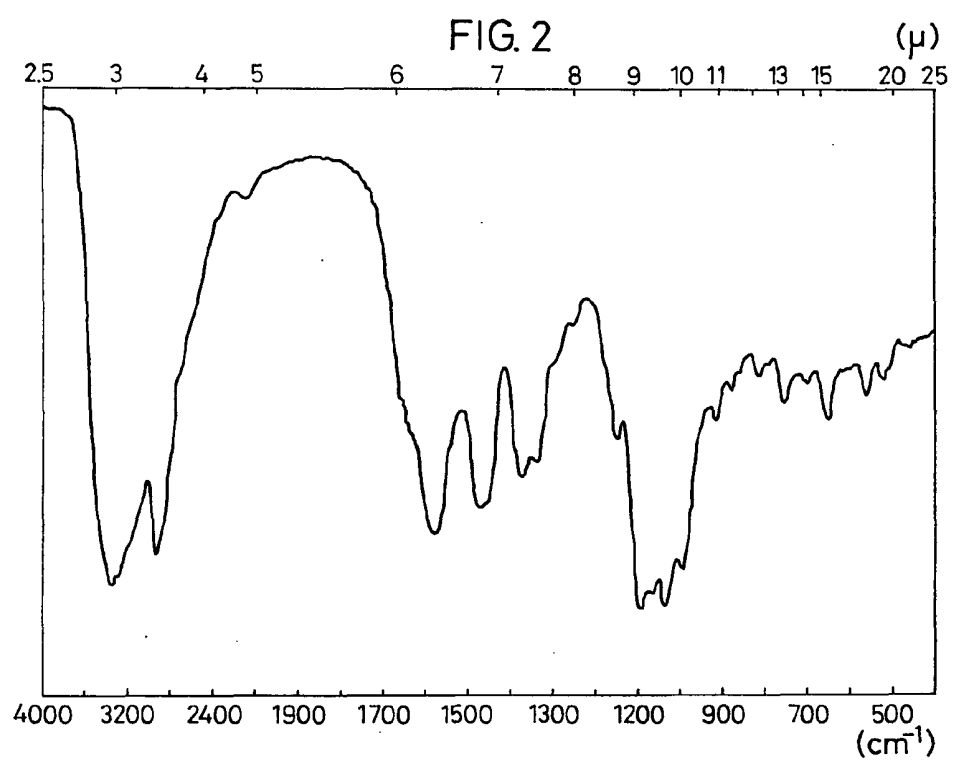
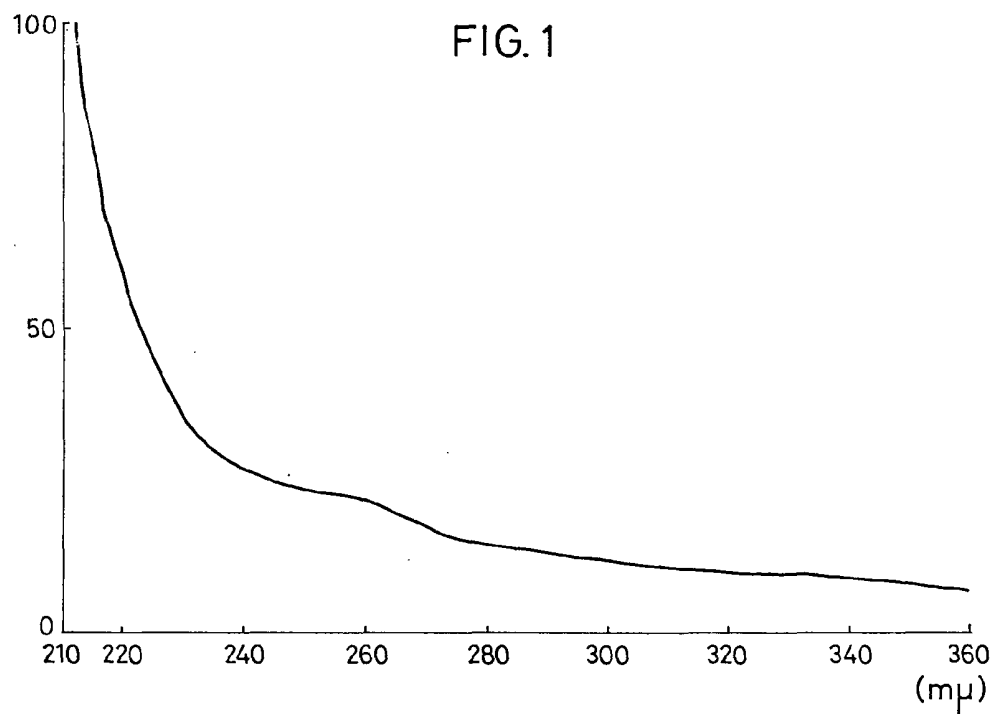
1. Fremgangsmåte til fremstilling av et antibiotikum betegnet fortimicin B og med den kjemiske strukturformelen:



k a r a k t e r i s e r t v e d at en mikroorganisme tilhørende arten *Micromonospora olivoasterospora* dyrkes i et næringsmedium, hvorefter fortimicin B isoleres fra dette medium.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det anvendes en mikroorganisme som er valgt blandt
Micromonospora olivoasterospora ATCC 21819, *Micromonospora*
olivoasterospora ATCC 31009 og *Micromonospora olivoasterospora*
ATCC 31010.

139864



139864

FIG. 3

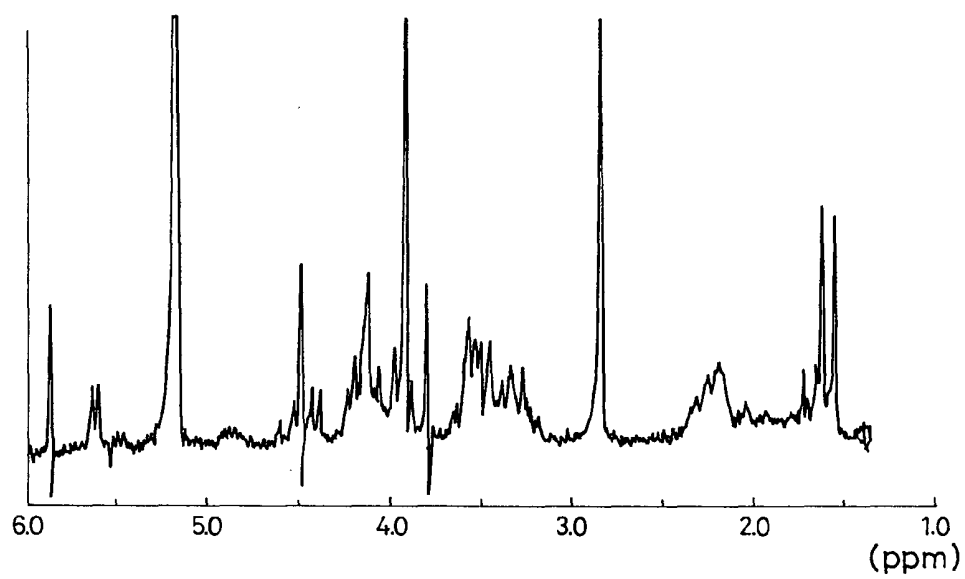
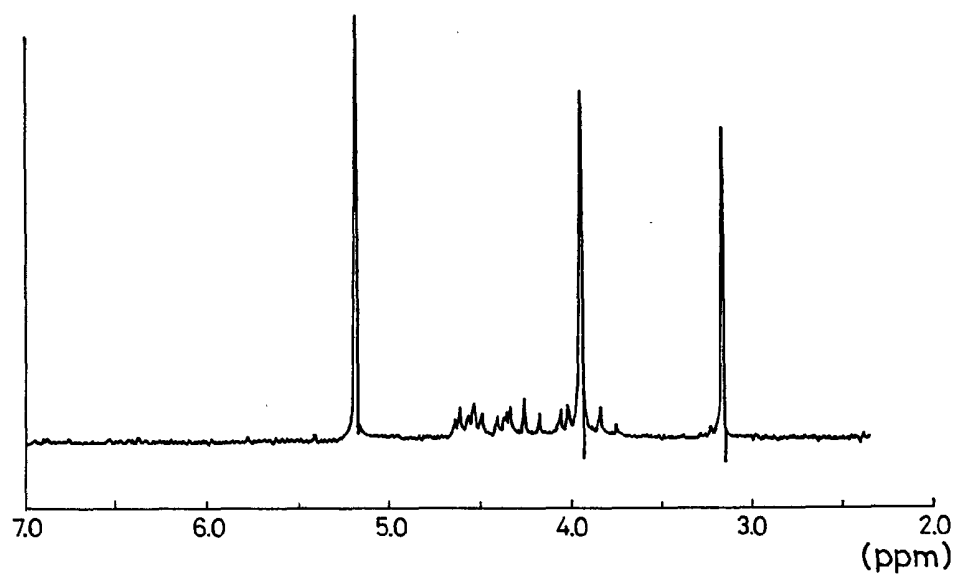


FIG. 4



139864

FIG. 5

