

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 145893 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

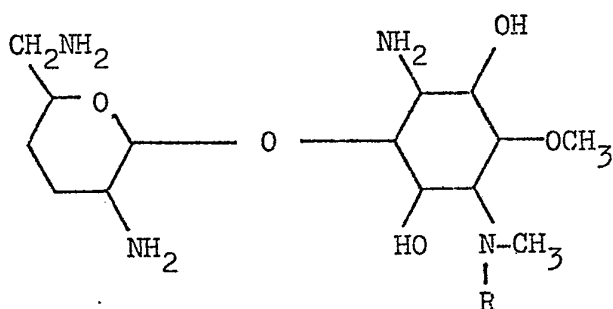
- (21) Ansøgning nr. 4780/77 (51) Int.Cl.³ C 07 H 15/22
(22) Indleveringsdag 27. okt. 1977 A 01 N 43/16
(24) Løbedag 27. okt. 1977 C 12 P 19/48
(41) Alm. tilgængelig 29. apr. 1978
(44) Fremlagt 5. apr. 1983
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 28. okt. 1976, 128837/76, JP 14. jan. 1977, 2338/77, JP

(71) Ansøger KYOWA HAKKO KOGYO CO. LTD., Tokyo, JP.

(72) Opfinder Takao Iida, JP: Kunikatsu Shirahata, JP: Isao Matsubara,
JP: Masahiro Sugimoto, JP: Shinzo Ishii, JP: m. fl.
(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Hofman-Bang & Boutard.

- (54) Fortimiciner til anvendelse som
desinfektionsmidler og fremgangs=
måde til fremstilling af disse
fortimiciner, kaldet fortimicin
KE og D.

Opfindelsen angår hidtil ukendte fortimiciner til anvendelse
som desinfektionsmidler, som er ejendommelige ved, at de er
fortimiciner kaldet fortimicin KE og D med den almene formel:



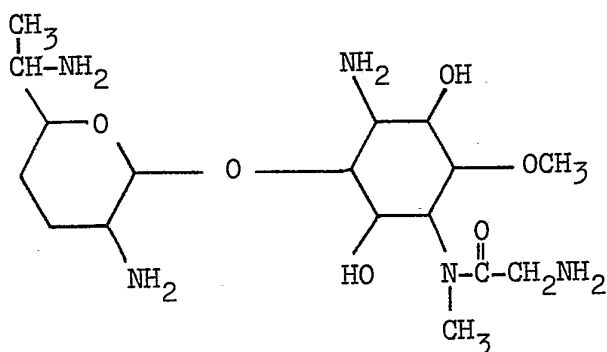
I

hvor R betyder H (fortimicin KE) eller $\text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CCH}_2\text{NH}_2$ (fortimicin D).

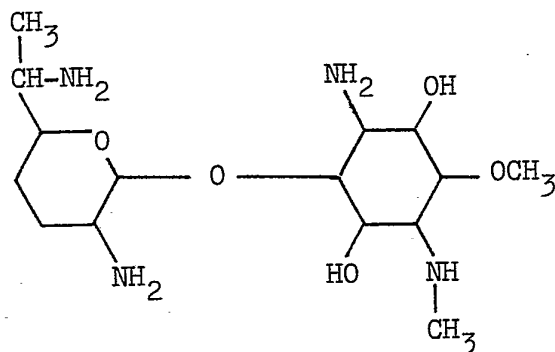
Opfindelsen angår også en fremgangsmåde til fremstilling af disse fortimiciner, som er ejendommelig ved, at en mikroorganisme tilhørende arten Micromonospora olivoasterospora dyrkes i et næringsmedium, hvorefter mindst en af de aktive forbindelser isoleres fra dyrkningsvæsken, om ønsket i form af et salt, og om ønsket vundet fortimicin D omdannes til fortimicin KE ved opvarmning i alkalisk vandig opløsning.

Det er kendt, se US patentskrifterne nr. 3 931 400, 3 976 768 og 4 048 015 og de tilsvarende danske fremlæggelsesskrifter nr. 137 864, 137 960 og 140 152, at visse stammer af arten Micromonospora olivoasterospora ved dyrkning danner antibiotiske stoffer kaldet fortimicin A, B og C, som har de følgende struktureformler:

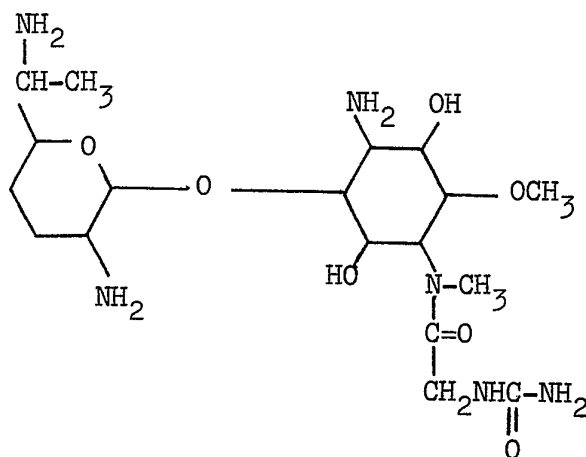
Fortimicin A



Fortimicin B



Fortimicin C



Det har nu vist sig, at stammer af *Micromonospora olivoasterospora* når de dyrkes, frigiver to yderligere aktive stoffer ud over fortimicin A, fortimicin B og fortimicin C. Et studium af disse aktive stoffers kemiske, fysiske og biologiske egenskaber viser, at stofferne er hidtil ukendte antibiotiske forbindelser, som nu er blevet navngivet fortimicin D og fortimicin KE.

Fortimicin D og KE udviser bred antibakteriel aktivitet og er derfor bl.a. nyttige til at rense og sterilisere laboratorieglasudstyr og kirurgiske instrumenter og kan også anvendes i kombination med sæber, detergenser og vaskeopløsninger til rengøringsformål. Mod *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P har fortimicin D i forhold til det nærbeslægtede fortimicin A, og fortimicin KE i forhold til det hermed nærbeslægtede fortimicin B overraskende bedre aktivitet. Endvidere forventes fortimicin D at kunne anvendes som terapeutisk forbindelse over for forskellige infektioner (hos mennesker og dyr) fremkaldt af forskellige bakterier.

De farmaceutisk acceptable ikke-toxiske syreadditionssalte af fortimicin D og fortimicin KE er f.eks. mineralsyreadditionssaltene, såsom hydrochloridet, hydrobromidet, hydroiodidet, sulfatet, sulfamatet og phosphatet, og de organiske syreadditionssalte, såsom maleatet, acetatet, citratet, oxalatet, succinatet, benzoatet, tartratet, fumaratet, malatet, mandelatatet og ascorbatet.

De fysiske-kemiske egenskaber af den frie base af fortimicin D er som følger:

(1) Et basisk hvidt pulver

(2) Elementanalyse:

C= 44,15%, H= 8,77%, N= 15,86%

(3) Smeltepunkt: 109-114°C

(4) Ultraviolet absorptionsspektrum:

Det ultraviolette absorptionsspektrum af en vandig opløsning af stoffet viser ikke noget karakteristisk maximum mellem 220 nm og 360 nm, men viser kun terminal absorption.

(5) Specifik drejning: $[\alpha]_D^{25} = +121^\circ$ (C= 0,5, H₂O).

(6) Infrarødt absorptionsspektrum:

Det infrarøde absorptionsspektrum måles i KBr-tablet. Den frie base af fortimicin D viser maxima ved følgende bølgetal (cm⁻¹): 3400, 2900, 1625, 1570, 1470, 1350, 1315, 1020.

(7) Farvereaktioner:

Ninhydrin-reaktion: positiv

Kaliumpermanganat-reaktion: positiv

Elson-Morgan's reaktion: negativ

Biuret-reaktion: negativ

(8) PMR-spektret af fortimicin D måles i en deuteriumoxid-opløsning (pD= 10,1) ved anvendelse af JEOL JNM-PS-100.

Resultaterne er som følger:

δ 1,10-1,90 (4H, m), 2,50-3,06 (4H, m), 3,07 (3H, s), 3,45 (3H, s), 3,53 (2H, s), 3,70-4,25 (4H, m), 4,36 (1H, t, J= 3,0), 4,88 (1H, d, J= 4,0), 4,92 (1H, d, d, J= 3,0, 9,0).

- (9) CMR-spektret af fortimicin D måles i en deuteriumoxid-opløsning (pD= 11,1) ved anvendelse af JEOL-PFT-100A.

Resultaterne er som følger:

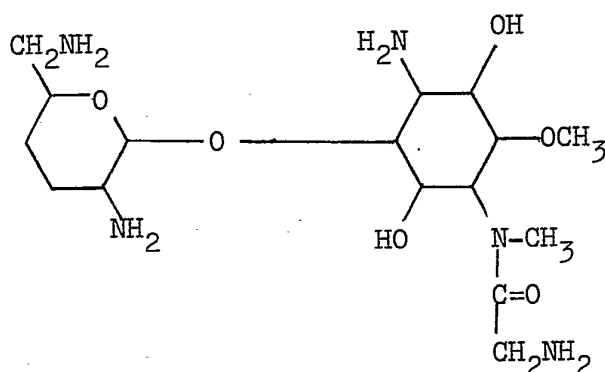
δ 176,5, 100,1, 78,5, 73,6, 73,0, 71,3, 71,1, 56,4, 55,5, 52,5, 50,2, 45,7, 43,4, 32,2, 32,2, 28,3, 26,8.

- (10) Massespektret af stoffet afslører den følgende M + 1 ion og fragmentioner. Formlerne i parenteser betyder sammensætningsformlerne opnået ved højopløsningsmassespektrometri.

m/e 392 M + 1 (C ₁₆ H ₃₄ N ₅ O ₆)	
374 (C ₁₆ H ₃₀ N ₄ O ₆)	292 (C ₁₁ H ₂₂ N ₃ O ₆)
274 (C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₅)	264 (C ₁₀ H ₂₂ N ₃ O ₅)
246 (C ₁₀ H ₂₀ N ₃ O ₄)	235 (C ₉ H ₁₉ N ₂ O ₅)
207 (C ₈ H ₁₉ N ₂ O ₄)	129 (C ₆ H ₁₃ N ₂ O)

Ud fra resultatet af massespektrometrien bestemmes stoffets molekylvægt til at være 391, og molekylformlen bestemmes til at være C₁₆H₃₃N₅O₆. Elementanalysen for stoffet (hydratiseret med 2,5 mol H₂O) beregnet ud fra molekylformlen er C= 44,01%, H= 8,79% og N= 16,04%.

- (11) Baseret på de ovenstående fysisk-kemiske data antages strukturformlen af fortimicin D at være som følger:



- (12) Den frie base af fortimicin D er let opløselig i vand, opløselig i methanol og tungt opløselig i ethanol og acetone, men er uopløselig i organiske opløsningsmidler, såsom chloroform, benzen, ethylacetat, butylacetat, diethylether, butanol, petroleumsether og n-hexan.

De fysisk-kemiske egenskaber af den frie base af fortimicin KE er som følger:

- (1) Et basisk hvidt pulver

- (2) Elementanalyse fundet: C= 48,18%, H= 9,29%, N= 15,84%.

- (3) Smeltepunkt: 72-77°C

- (4) Ultraviolet absorptionsspektrum:

Det ultraviolette absorptionsspektrum af en vandig opløsning af stoffet viser ikke noget karakteristisk maximum mellem 220 nm og 360 nm, men viser kun terminal absorption.

- (5) Specifik drejning: $[\alpha]_D^{25} = + 28,5^\circ$ (C= 0,5, H₂O)

- (6) Infrarødt absorptionsspektrum:

Det infrarøde absorptionsspektrum måles i KBr-tablet. Den frie base af fortimicin KE viser maxima ved de følgende bølgetal (cm⁻¹): 3350, 2920, 1580, 1470, 1370, 1330, 1090, 1035

- (7) Farvereaktioner:

Ninhydrin-reaktion: positiv

Kaliumpermanganat-reaktion: positiv

Elson-Morgan's reaktion: negativ

Biuret-reaktion: negativ

- (8) PMR-spektret af fortimicin KE måles i deuteriumoxid-opløsning (pD= 11,1) ved anvendelse af JEOL JNM-PS-100.

Resultaterne er som følger:

δ 1,10-1,90 (4H, m), 2,40 (3H, s), 2,66 (2H, d, J= 6,0), 2,69-3,20 (3H, m), 3,48 (3H, s), 3,49 (1H, t, J= 9,5), 3,59-4,10 (3H, m), 3,92 (1H, d, d, J= 4,5, 9,5), 5,04 (1H, d, J= 4,0).

- (9) CMR-spektret af fortimicin KE måles i en deuteriumoxid-opløsning (pD= 11,0) ved anvendelse af JEOL PFT-100A.

Resultaterne er som følger:

δ 102,3, 83,7, 79,9, 71,3, 71,3, 60,9, 59,3, 53,8, 50,4, 45,8, 35,4, 28,3, 27,0.

- (10) Stoffets massespektrum afslører den følgende M + 1 ion og fragmentationer. Formlerne i parenteser betyder sammensætningsformlerne opnået ved højopløsningsspektrometri.

m/e 335 M + 1 ($C_{14}H_{31}N_4O_5$)

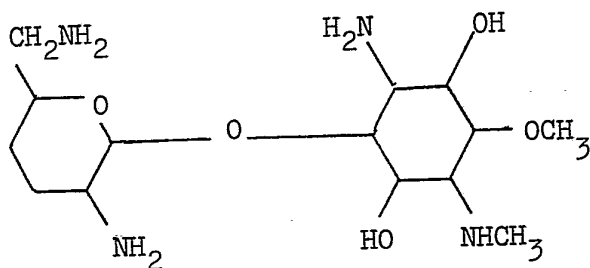
317 ($C_{14}H_{27}N_3O_5$) 235 ($C_9H_{19}N_2O_5$)

207 ($C_8H_{19}N_2O_4$) 189 ($C_8H_{17}N_2O_3$)

129 ($C_6H_{13}N_2O$)

Ud fra resultatet af massespektrometrien bestemmes stoffets molekylvægt til at være 334, og molekylformlen bestemmes til at være $C_{14}H_{30}N_4O_5$. Stoffets elementanalyse (hydratiseret med 1 mol H_2O) beregnet ud fra molekylformlen er C= 47,71%, H= 9,15%, og N= 15,89%.

- (11) Baseret på de ovenstående fysisk-kemiske data antages strukturformlen af fortimicin KE at være som følger:



- (12) Den frie base af fortimicin KE er let opløselig i vand, opløselig i methanol og tungt opløselig i ethanol og acetone, men er uopløselig i uorganiske opløsningsmidler, såsom chlorform, benzen, ethylacetat, butylacetat, diethylether, butanol, petroleumsether og n-hexan.

Rf-værdierne for fortimicin D og fortimicin KE ved papirchromatografi og tyndtlagschromatografi under anvendelse af forskellige udviklingsmidler er vist i de følgende tabeller 1-3. Til sammenligning er også anført Rf-værdierne for antibiotica, der minder om fortimicin D og KE.

Tabel 1

Rf-værdier af fortimicin D og fortimicin KE ved stigende papirchromatografi (ved 28°C)

Udviklingsmiddel	Rf-værdi D	Rf-værdi KE	Udviklingsperiode (timer)
20% ammoniumchlorid	0,96	0,96	3
vandmættet n-butanol	0,00	0,00	15
n-butanol/eddikesyre/vand (volumenforhold 3:1:1)	0,06	0,06	15
vandmættet ethylacetat	0,00	0,00	4
vandmættet n-butanol indeholdende 2% (vægt/vol) p-toluensulfonsyre og 2% (vægt/vol) piperidin	0,04	0,04	15

Tabel 2

Rf-værdier ved silicagel-tyndtlagschromatografi (ved stuetemperatur, efter 3 timers udvikling)

Udviklingsmiddel ^x	Antibioticum	RF-værdi
I	Fortimicin D	0,74
"	Fortimicin KE	0,78
"	Fortimicin A	0,74
"	Fortimicin B	0,80
"	Fortimicin C	0,75
"	Gentamicin-komplex	0,71
"	Gentamicin C _{1a}	0,71
"	Sisomicin	0,71
II	Fortimicin D	0,37
"	Fortimicin KE	0,58
"	Fortimicin A	0,37
"	Fortimicin B	0,62
"	Fortimicin C	0,40
"	Gentamicin-komplex	0,06-0,16
"	Gentamicin C _{1a}	0,16
"	Sisomicin	0,18

^x Udviklingsmiddel I: Det øvre lag af chloroform/methanol/17 vægt pct. ammoniakvand (volumenforhold 2:1:1)

Udviklingsmiddel II: 10% ammoniumacetat/methanol
(volumenforhold 1:1)

Tabel 3

Rf-værdierne for forskellige antibiotica ved stigende papir-chromatografi under anvendelse af det nedre lag af chloroform/methanol/17 vægt pct. ammoniakvand (volumenforhold 2:1:1) som udviklingsmiddel ved stuetemperatur efter 12 timers udvikling

<u>Antibioticum</u>	<u>Rf-værdi</u>
Streptomycin A	0,02
Streptomycin B	0,00
Bluensomycin	0,01
Ribostamycin	0,00
Lividomycin A	0,00
Lividomycin B	0,03
Hygromycin B	0,02
Lividomycin D	0,02
Spectinomycin	0,45
Kasugamycin	0,01
Butirosine A	0,00
Butirosine B	0,01
Gentamicin A	0,00
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
Antibioticum nr. 460	0,01
Neomycin C	0,00
Kanamycin A	0,02
Kanamycin B	0,01
Kanamycin C	0,02
Paromomycin	0,00
Nebramycin-komplex	0,01
Tobramycin	0,02
Apramycin	0,02

<u>Antibioticum</u>	<u>Rf-værdi</u>
Nebramycin-faktor 4	0,01
Nebramycin-faktor 5	0,00
Myomycin	0,00
XK-62-2 ^x	0,49
Fortimicin B	0,65
Fortimicin A	0,37
Fortimicin C	0,18
Fortimicin D	0,18
Fortimicin KE	0,59

^x et antibioticum angivet i USA patentskrift nr. 4 045 298.

Tabel 4 illustrerer de antibakterielle spektre af fortimicin D og fortimicin KE over for forskellige mikroorganismer.

Tabel 4

(Minimal inhiberende koncentration, $\mu\text{g/ml}$ målt ved agar-fortyndingsmetoden ved pH 8,0)

<u>Mikroorganisme</u>	<u>Fortimicin D</u> <u>$\mu\text{g/ml}$</u>	<u>Fortimicin KE</u> <u>$\mu\text{g/ml}$</u>
<u>Bacillus subtilis</u> nr. 10707	0,02	104,2
<u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 6538P	0,02	1,65
<u>Klebsiella pneumoniae</u> ATCC 10031	0,08	26,1
<u>Escherichia coli</u> ATCC 26	0,32	26,1
<u>Escherichia coli</u> KY 8315	0,13	26,1
<u>Escherichia coli</u> KY 8327	0,13	26,1
(resistent over for kanamycin, gentamicin og tobramycin)		
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> BMH nr.1 5		208,3

Tabel 4 (fortsat)

<u>Mikroorganisme</u>	<u>Fortimicin D</u> <u>/ug/ml</u>	<u>Fortimicin KE</u> <u>/ug/ml</u>
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> KY 8510 (resistent over for kanamycin, kanamycin B, tobramycin, gen- tamicin C _{1a} og ribostamycin)	5	-
<u>Shigella sonnei</u> ATCC 9290	0,3	26,1
<u>Salmonella typhosa</u> ATCC 9992	0,08	13,1

Som det fremgår af det ovenstående, har fortimicin D en stærk antimikrobiel aktivitet over for et bredt område af Gram-positive og Gram-negative bakterier. Især er det karakteristisk, at antibioticumet er effektivt over for visse stammer af *Escherichia coli*, som er resistente over for kanamycin, gentamicin og tobramycin. Endvidere forventes fortimicin D at have en terapeutisk virkning på forskellige infektioner (hos mennesker og dyr) fremkaldt af de ovennævnte forskellige bakterier. I denne henseende er LD₅₀ af fortimicin D sulfat for dd-mus, som vejede 20 ± 1 g, bestemt til at være 159 mg/kg. Med sådanne antibakterielle egenskaber er fortimicin D anvendeligt til medicinske formål. Som det også fremgår af det ovenstående, udviser fortimicin KE et bredt antibakterielt spektrum. Endvidere udmærker fortimicin KE sig ved at være stabilt i alkalisk opløsning.

En sammenligning af fortimicin-faktorerne D og KE med kendte antibiotica belyser yderligere deres nyhed. Som vandopløselige basiske antibiotica, produceret af mikroorganismer tilhørende slægten *Micromonospora* og med brede antibakterielle spektre, kendes gentamicin-komplekset (M.J. Weinstein et al.: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1963, 1; D.J. Cooper et al.: *J. Infect. Dis.* 119, 342, 1969; og J.A. Waitz et al.: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2, 464 1972),

antibioticum nr. 460 (japansk fremlæggeskrift nr. 46-16153), sisomicin (M.J. Weinstein et al.: J. Antibiotics, 23, 551, 555, 559, 1970), XK-62-2 (U.S.A. patentskrift nr. 4 045 298), fortimicin B, fortimicin A og fortimicin C. Som vist i den ovenstående tabel 3, udviser gentamicin A, B, C₂ og C₁ komponenter Rf-værdier på henholdsvis 0,00, 0,00, 0,38 og 0,59 ved papir-chromatografi. På den anden side er Rf-værdien ved den samme papir-chromatografi af fortimicin D 0,18 og af fortimicin KE 0,59. Således er fortimicin D klart forskellig fra gentamicin-komponenterne, og fortimicin KE er forskellig fra alle undtagen gentamicin C₁. Ved papir-chromatografien i tabel 3 viser fortimicin D den samme Rf-værdi (0,18) som gentamicin C_{1a} (0,18), og derfor kan fortimicin D og gentamicin C_{1a} ikke skelnes fra hinanden i denne henseende. Ved silicagel-tyndtlagschromatografien i tabel 2 under anvendelse af udviklingsmidlet II skelnes fortimicin D (Rf-værdi: 0,37) imidlertid klart fra gentamicin C_{1a} (Rf-værdi: 0,16). På samme måde viser gentamicin C₁, C₂ og C_{1a} i tabel 2 Rf-værdier på 0,06 - 0,16, medens fortimicin KE viser en Rf-værdi på 0,58. Ved sammenligning af fortimicin-faktorerne D og KE med antibioticum nr. 460, sisomicin, XK-62-6, fortimicin B, fortimicin A og fortimicin C i tabel 3 udviser antibioticum nr. 460, sisomicin, XK-62-2, fortimicin D, fortimicin A og fortimicin C Rf-værdier på henholdsvis 0,01, 0,18, 0,49, 0,65, 0,37 og 0,18. Rf-værdien for fortimicin D er 0,18 og for fortimicin KE 0,59. Fortimicin KE er således klart forskellig. Selv om Rf-værdien for fortimicin D er den samme (i tabel 3) som for sisomicin og fortimicin C, skelnes fortimicin C (Rf-værdi: 0,40) og sisomicin (Rf-værdi: 0,18) klart fra fortimicin D (Rf-værdi: 0,37) ved silicagel-tyndtlagschromatografien i tabel 2.

Desuden kan som vandopløselige basiske antibiotica, produceret af andre Actinomyceter end dem tilhørende slægten Micromonospora og med brede antibakterielle spektre, nævnes streptomycin A og B, ribostamycin, lividomycin A, B og D, spectinomycin, kasugamicin, neomycin A, B og C, kanamycin A, B og C, nebramycin-komplex, nebramycin-faktorer 4 og 5 og paromomycin. Fortimicin-faktorerne D og KE har vist sig at være stærkt forskellige fra hvert af disse antibiotica med hensyn til fysisk-kemiske egenskaber. Endvidere er fortimicin-faktorerne D og KE, som det fremgår af tabel 3, helt forskellige fra disse antibiotica med hensyn

til Rf-værdierne ved papir-chromatografien.

Ud fra det ovenstående antages fortimicin-faktorerne D og KE at være hidtil ukendte antibiotica.

Eksempler på foretrukne stammer til anvendelse ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er *Micromonospora olivoasterospora* MK-70 (FERM-P Nr. 1560) (ATCC 21819), *Micromonospora olivoasterospora* MK-80 (FERM-P Nr. 2192) (ATCC 31010) og *Micromonospora olivoasterospora* Mm 744 (FERM-P Nr. 2193) (ATCC 31009). Disse stammer er blevet deponeret i the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, U.S.A. og i the Fermentation Research Institute Agency of Industrial Science and Technology, Tokyo, Japan og er blevet tildelt de ovenfor angivne accessionsnumre.

Disse stammers mikrobiologiske egenskaber er beskrevet i U.S.A. patentskrift nr. 3 931 400. Som det er tilfældet med andre stammer af *Actinomyceter* kan de ovennævnte mikroorganismer, som er anvendelige ved udførelsen af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, muteres ved kunstige midler, såsom ultraviolet bestråling, røntgenbestråling og anvendelse af forskellige mutationsinducerende kemikalier på kendt måde til forhøjelse af produktionen af metaboliske produkter, og et eksempel på en sådan mutantstamme er *Micromonospora olivoasterospora* GS-26 (FERM-P Nr. 3567, NRRL 8178). Denne sidstnævnte mutantstamme er deponeret i the United States Department of Agriculture, Peoria, Illinois og er frit tilgængelig for offentligheden.

Alment kan konventionelle metoder til dyrkning af *Actinomyceter* anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Således kan anvendes forskellige næringskilder i dyrkningsmediet. Passende carbonkilder inkluderer f.eks. glucose, stivelse, mannose, fructose, saccharose og melasse enten alene eller i kombination. Carbonhydrider, alkoholer, organiske syrer o.s.v. kan også anvendes, afhængigt af den anvendte mikroorganismes evne til at assimilere disse. Som uorganiske og organiske nitrogenkilder kan

f.eks. anvendes ammoniumchlorid, ammoniumsulfat, urinstof, ammoniumnitrat og natriumnitrat, enten alene eller i kombination, eller naturlige nitrogenkilder, såsom pepton, kødextrakt, gær-extrakt, torgær, majsstøbevand, sojabønnepulver, "Casaminosyre" og opløseligt vegetabilsk protein. Om nødvendigt kan der tilsættes uorganiske salte, såsom natriumchlorid, kaliumchlorid, calciumcarbonat og phosphater, til mediet. Endvidere kan der tilsættes organiske og uorganiske materialer, som fremmer væksten af den bestemte stamme og produktionen af fortimicin-faktorer D og/eller KE.

En væskedyrkningsmetode, især en submers omrørt dyrkningsmetode, er mest egnet. Dyrkningstemperaturen er mest ønskeligt 25 - 40°C, og det foretrækkes at udføre dyrkningen ved omkring neutral pH. Sædvanligvis er der efter 2-15 dages væskedyrkning dannet fortimicin D og fortimicin KE i dyrkningsvæsken. Når udbyttet af antibioticaerne i dyrkningsvæsken når et maximum, standses dyrkningen, og det ønskede produkt isoleres og renses fra dyrkningsvæsken, efter at mikroorganismecellerne er blevet fjernet, f.eks. ved filtrering.

Isolering og rensning af fortimicin D og fortimicin KE udføres ved metoder, som sædvanligvis anvendes til isolering og rensning af mikrobielle metaboliske produkter fra en dyrkningsvæske.

Eftersom de antibiotiske forbindelser fortimicin D og fortimicin KE er basiske stoffer og er let opløselige i vand, men tungt opløselige i de almindelige organiske opløsningsmidler, kan forbindelserne renses ved de metoder, der sædvanligvis anvendes til rensning af såkaldte vandopløselige basiske antibiotica. Nærmere bestemt kan D- og KE-faktorerne renses ved passende kombination af adsorption og desorption fra kationbytterharpiks, cellulose-søjlechromatografi, adsorption og desorption under anvendelse af en søjle af "Sephadex[®] LH-20", silicagel-søjlechromatografi osv. Som eksempel er en egnet metode til rensning af fortimicin D fra dyrkningsvæsken, når der anvendes en stamme, som er i stand til at producere fortimicin-komplekset (en blanding indeholdende fortimicin A, B, C, D og KE og biprodukter med antimikrobiel

aktivitet), som følger: Det cellefrie kulturfiltrat indstilles til pH 7,5 og sendes derpå igennem en kationbytterharpiks, såsom "Amberlite[®] IRC-50" (ammonium form). Efter at harpiksen er vasket med vand, gennemføres eluering med 0,5N ammoniakvand. De aktive fraktioner kombineres og koncentrerer under formindsket tryk. Koncentratet behandles derpå med en anionbytterharpiks, "Dowex[®] 1 x 2" (OH form). De aktive fraktioner, som opnås ved elueringen, kombineres og koncentrerer under formindsket tryk til opnåelse af et råt pulver af fortimicin-komplex. Det rå pulver opløses i vand, og opløsningen indstilles derpå til en pH-værdi på 5,0 med 2N svovlsyre og sendes derpå igennem en kolonne pakket med aktivkul for at adsorbere de aktive principper. Søjlen af aktivkul vaskes derpå med vand for at fjerne urenheder. Derefter gennemføres eluering med 0,2N svovlsyre for at eluere de aktive principper. De aktive fraktioner kombineres, og efter neutralisering med en anionbytterharpiks, såsom "Dowex[®] 44" (OH form) frysetørres blandingen til opnåelse af fri base af fortimicin-komplekset.

I tilfælde af at fortimicin-komplekset indeholder fortimicin D, underkastes det ovenfor opnåede rå pulver af fortimicin-kompleks silicagel-søjlechromatografi under anvendelse af et blandet opløsningsmiddel af isopropanol, chloroform og koncentreret ammoniakvand (volumenforhold 4:2:1:) som udviklingsmiddel. Det rå pulver suspenderes i opløsningsmidlet og indføres i kolonnen. Udviklingen gennemføres med det samme opløsningsmiddel ved en strømningshastighed på omkring 30 ml/time. Først elueres fortimicin B, og efter at flere sporkomponenter er elueret, elueres fortimicin A i store aktive fraktioner. Derpå fortsættes elueringen, og efter at fortimicin C er elueret, elueres fortimicin D i de næste store aktive fraktioner. De aktive fraktioner indeholdende fortimicin D opsamles og koncentrerer under formindsket tryk. Koncentratet frysetørres til opnåelse af et hvidt stof bestående af fri base af fortimicin D. På denne måde kan en betydeligt rensset prøve af fortimicin D opnås ved silicagel-søjlechromatografi. Imidlertid er der somme tider nogle urenheder til stede i prøven. I dette tilfælde underkastes prøven yderligere cellulose-søjlechromatografi. Som udviklingsmiddel anvendes et blandet opløsningsmiddel af n-butanol, pyridin,

eddikesyre og vand (volumenforhold 6:4:2:4). De ved elueringen opnåede aktive fraktioner kombineres og koncentrerer under formindsket tryk til opnåelse af et rensset præparat af fortimicin D. Til fjernelse af urenheder, der udviser positiv reaktion med ninhydrin, er søjlechromatografi under anvendelse af carboxymethylcellulose også effektiv. Nærmere betegnet sættes i dette tilfælde en opløsning af det rå pulver igennem en kolonne pakket med carboxymethylcellulose (ammoniumform). De aktive principper adsorberes på carboxymethylcellulose. Derpå vaskes søjlen grundigt med vand til eluering af de fleste pigmenter og uorganiske salte. Derefter elueres de aktive principper med 0,2N ammoniumhydrogencarbonatopløsning. Fraktioner indeholdende fortimicin D kombineres og frysetørres til opnåelse af rensset fortimicin D.

Under de ovenfor beskrevne rensningsprocedurer kontrolleres fraktionerne ved silicagel-tyndtlagschromatografi. Som udviklingsmiddel anvendes et blandet opløsningsmiddel af isopropanol, chloroform og koncentreret ammoniakvand (volumenforhold 2:1:1), og udviklingen gennemføres ved stuetemperatur i to timer. Fortimicin D viser en R_f -værdi på omkring 0,43 på silicagel-tyndtlagschromatogrammet.

I tilfælde af at fortimicin-komplekset indeholder fortimicin KE og fortimicin D opløses det ved frysetørringen opnåede rå pulver i vand. Efter at være indstillet til pH 7,5 med 2N svovlsyre, sendes opløsningen gennem en kolonne pakket med en kationbytterharpiks, "Amberlite" [®] "CG-50" type I (ammonium form), til adsorption af fortimicin-komplekset på denne. Søjlen vaskes derpå med vand. Derefter gennemføres eluering med 0,2N ammoniakvand. Efter at flere spor-komponenter er elueret, elueres en blanding af fortimicin B og fortimicin KE i store aktive fraktioner. Derpå fortsættes elueringen, og efter eluering af flere sporkomponenter elueres fortimicin A og fortimicin D. Aktive fraktioner indeholdende fortimicin KE og fortimicin B kombineres og tørres til opnåelse af et pulver af baser af fortimicin KE og fortimicin B. Derefter underkastes pulveret silicagel-søjlechromatografi under anvendelse af et blandet opløsningsmiddel af isopropanol, chloroform og koncentreret ammoniakvand (volumenforhold 4:2:1) som udviklingsmiddel. Det ovennævnte

pulver suspenderes i det blandede opløsningsmiddel, og suspensionen indføres i en kolonne pakket med silicagel. Udviklingen gennemføres med det samme opløsningsmiddel ved en strømningshastighed på omkring 30 ml/time. De først eluerede aktive fraktioner er fortimicin B. Derefter elueres fortimicin KE. Fraktionerne indeholdende fortimicin KE kombineres og koncentrerer under formindsket tryk. Koncentratet opløses i en lille mængde vand og frysetørres til opnåelse af den frie base af fortimicin KE. På denne måde kan en betydeligt rensset prøve af fortimicin KE opnås ved silicagel-søjlechromatografi. Imidlertid er der somme tider nogle urenheder til stede i prøven. Om ønsket kan der til opnåelse af fortimicin D ud fra de aktive fraktioner indeholdende fortimicin D og fortimicin A anvendes den ovennævnte lignende procedure under anvendelse af silicagel-chromatografi.

Under de ovenfor beskrevne rensningsprocedurer kontrolleres fraktionerne ved silicagel-tyndtlagschromatografi. Som udviklingsmiddel anvendes et blandet opløsningsmiddel af isopropanol, chloroform og koncentreret ammoniakvand (volumenforhold 2:1:1), og udviklingen gennemføres ved stuetemperatur i to timer. Fortimicin KE viser en R_f -værdi på omkring 0,58 på silicagel-chromatogrammet.

Fortimicin KE kan også opnås ved opvarmning af fortimicin D i en alkalisk vandig opløsning, såsom natriumhydroxid og bariumhydroxid. Specielt opvarmes fortimicin D i en mættet vandig opløsning af bariumhydroxid ved en temperatur på 100°C i tre timer. Derpå neutraliseres reaktionsopløsningen med tør is, og det resulterende bundfald af bariumcarbonat fjernes ved filtrering. Filtratet koncentrerer og sendes igennem en kolonne pakket med "Amberlite[®] CG-50" (ammoniumform). Efter vaskning af søjlen med vand gennemføres eluering med 0,2N ammoniakvand. Først elueres en lille mængde reaktionsbiprodukter, og derpå elueres fortimicin KE. Fraktionerne indeholdende fortimicin KE kombineres og koncentrerer under formindsket tryk. Koncentratet frysetørres derpå til opnåelse af den frie base af fortimicin KE.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen belyses nærmere ved de følgende repræsentative eksempler på bestemte udførelsesformer af fremgangsmåden.

EKSEMPEL 1

A. Dyrkning af CS-26 stammen.

Som podestamme anvendes *Micromonospora olivoasterospora* CS-26 (NRRL 8178) (FERM-P No. 3567). Podestammen er en mutantstamme, afledt fra *Micromonospora olivoasterospora* MK-70 (ATCC 21819) (FERM-P No. 1560) ved hjælp af behandling med nitrosoguanidin, ultraviolet bestråling og γ -bestråling. Et medium indeholdende 2 g/dl glucose, 0,5 g/dl pepton, 0,5 g/dl gærekstrakt og 0,1 g/dl calciumcarbonat (pH 7,5 før sterilisering) anvendes som et første podemedium. Et øje af podestammen indpodes i 10 ml portioner af det første podemedium i 50 ml store reagensglas og dyrkes ved 30°C i fem dage. Derpå indpodes 10 ml af den således fremstillede første podekultur i 30 ml portioner af et andet podemedium i 250 ml Erlenmeyerkolber. Det andet podemedium har den samme sammensætning som det første podemedium. Den anden podedyrkning udføres ved rystning ved 30°C i to dage, og derefter indpodes 30 ml af den anden podekultur i 300 ml portioner af et tredje podemedium i 2 l Erlenmeyerkolber forsynet med skovle. Det tredje podemedium er af samme sammensætning som det første podemedium. Den tredje podedyrkning gennemføres ved rystning ved 30°C i to dage. Derpå indpodes 1,5 l af den tredje podekultur (svarende til 5 kolber) i 15 l af et fjerde podemedium i en 30 l krukkefermentor af rustfrit stål. Det fjerde podemedium har den samme sammensætning som det første podemedium. Den fjerde podedyrkning i krukkefermentoren gennemføres med luftning og omrøring (15 l/min; 350 omdr./min.) ved 37°C i to dage. Derpå indpodes 15 l af det fjerde podemedium i 150 l af et færingmedium i en 300 l fermentor. Færingsmediet har den følgende sammensætning:

Opløselig stivelse	4 g/dl	K_2HPO_4	0,05 g/dl	$CaCO_3$	0,1 g/dl
Sojabønneemel	2 g/dl	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 g/dl		
Majsstøbevand	1 g/dl	KCl	0,03 g/dl		

(pH 7,5 før sterilisering)

Gæringen i fermentoren gennemføres med luftning og omrøring (80 l/min; 150 omdr./min.) ved 27°C i fire dage.

B. Isolering af rått fortimicin-kompleks.

Efter fuldførelsen af gæringen indstilles dyrkningsvæsken til pH 2,5 med koncentreret svovlsyre og omrøres i 30 min. Derefter tilsættes omkring 7 kg af et filterhjälpemiddel, "Radiolite No. 600" (produkt fra Showa Kagaku Kogyo Co., Ltd.), til dyrkningsmediet, og mikroorganismeceller fjernes ved filtrering. Filtratet indstilles til pH 7,5 ved tilsætning af 6N natriumhydroxidopløsning og sendes derpå igennem en kolonne pakket med omkring 20 l af en kationbytterharpiks, "Amberlite[®] IRC-50" (ammoniumform). De aktive principper adsorberes på harpiksen, og gennemløbet smides væk. Efter at harpiksen er vasket med vand, gennemføres eluering af de aktive principper med 0,5N ammoniakvand. Eluatet underkastes bestemmelse af aktivitet ved en papirskivemetode under anvendelse af en agarplade af *Bacillus subtilis* Nr. 10707. Fraktioner, som viser aktivitet, kombineres og koncentrerer under formindsket tryk til omkring 1 liter. Koncentratet sendes derpå igennem en kolonne pakket med 500 ml af en anionbytterharpiks, "Dowex[®] 1 x 2" (OH form), og derpå sendes omkring 2 liter vand gennem søjlen. På denne måde fjernes urenheder, og de aktive principper elueres med vand. De aktive fraktioner kombineres og koncentrerer under formindsket tryk til omkring 100 ml. Koncentratet sendes igennem en kolonne pakket med omkring 50 ml aktivkulpulver, hvorved de aktive principper adsorberes. Søjlen vaskes med vand, og gennemløbet og vaskevandet smides væk. Der gennemføres eluering med 0,2N svovlsyre. Eluatet underkastes bestemmelse af aktivitet ved en papirskivemetode under anvendelse af *Bacillus subtilis* nr. 10707. De aktive fraktioner kombineres og sendes igennem en søjle af en harpiks, "Dowex[®] 44" (OH form), og eluering af det aktive princip gennemføres med vand. De aktive fraktioner kombineres og koncentrerer til omkring 50 ml. Koncentratet frysetørres til opnåelse af et rått pulver af fortimicin-kompleks. Udbyttet af det rå pulver omkring 35 g, og aktiviteten er 580 enh./mg (aktiviteten af 1 mg af det rene præparat svarer til 1 000 enheder).

C. Isolering og rensning af fortimicin D

Omkring 500 ml silicagel suspenderes i et opløsningsmiddel bestående af isopropanol, chloroform og koncentreret ammoniakvand (volumenforhold 4:2:1) og pakkes i en glaskolonne som et tæt ensartet lag. Derefter vaskes søjlen grundigt med det samme opløsningsmiddel. Derpå fyldes 10 g af det i det ovenstående trin B opnåede rå pulver over silicagelen i et ensartet tyndt lag. Efter påfyldning af det rå pulver hældes det samme opløsningsmiddel gradvist ind i søjlen fra toppen, og derefter gennemføres eluering kontinuert med en strømningshastighed på omkring 50 ml/time. Eluatet udvindes i 20 ml fraktioner, og hver af fraktionerne underkastes bestemmelse af aktivitet ved papirskivemetoden under anvendelse af *Bacillus subtilis* nr. 10707. Først elueres fortimicin B efterfulgt af fortimicin A. Derpå fortsættes elueringen, og efter at fortimicin C er elueret, elueres fortimicin D. De aktive fraktioner underkastes tyndtlagschromatografi, og fraktionerne indeholdende fortimicin D kombineres og koncentrerer under formindsket tryk til tilstrækkelig fjernelse af opløsningsmidlet. Remanensen opløses i en lille mængde vand, og opløsningen frysetørres til opnåelse af omkring 1,5 g rensat præparat af den frie base af fortimicin D. Produktet udviser en aktivitet på omkring 980 enh./mg.

D. Isolering og rensning af fortimicin KE

Til opnåelse af fortimicin KE opløses 20 g af det i det ovenstående trin B opnåede rå pulver i 30 ml vand. Opløsningen indstilles til pH 7,5 med koncentreret svovlsyre og sendes igennem en kolonne pakket med 1 liter kationbytterharpiks, "Amberlite[®] CG-50" (ammoniumform). Gennemløbet smides væk. Det aktive stof adsorberes på harpiksen. Efter vaskning af harpiksen med vand gennemføres eluering med 0,2N ammoniakvand. Eluatet udvindes i 50 ml fraktioner, og hver af fraktionerne underkastes bestemmelse af aktivitet ved papirskivemetoden og tyndtlagschromatografi.

Først elueres flere sporkomponenter. Derefter elueres fraktioner indeholdende fortimicin KE og fortimicin B. Fraktionerne kombineres og koncentrerer til 20 ml. Koncentratet frysetørres til opnåelse af 8 g af et rå pulver.

Omkring 500 ml silicagel, suspenderet i et opløsningsmiddel bestående af isopropanol, chloroform og koncentreret ammoniakvand (volumenforhold 4:2:1), pakkes i en glaskolonne som et tæt ensartet lag. Derefter vaskes søjlen grundigt med det samme opløsningsmiddel. Derpå fyldes det ovenfor opnåede rå pulver over silicagelen i et ensartet tyndt lag, og det samme opløsningsmiddel hældes gradvist ind i kolonnen fra oven, og derefter gennemføres elueringen kontinuert med en strømningshastighed på omkring 50 ml/time. Eluatet udvindes i 20 ml fraktioner, og hver af fraktionerne underkastes bestemmelse af aktivitet ved papirskivemetoden under anvendelse af *Bacillus subtilis* nr. 10707. Først elueres fortimicin B efterfulgt af fortimicin KE. De aktive fraktioner underkastes tyndtlagschromatografi, og fraktionerne indeholdende fortimicin KE kombineres og koncentrerer under formindsket tryk til fjernelse af opløsningsmidlet. Remanensen opløses i en lille mængde vand, og opløsningen frysetørres til opnåelse af omkring 2g rensat præparat af den frie base af fortimicin KE. Produktet udviser en aktivitet på omkring 970 enh./mg.

EKSEMPEL 2

I dette eksempel anvendes den stamme, som anvendtes i det ovenstående eksempel 1, som podestamme, og de i eksempel 1 anvendte podemedier (første til fjerde podemedium) anvendes også som podemedier. Det anvendte gæringsmedium har den følgende sammensætning:

Opløselig stivelse	4 g/dl
"Ebios" (tørgær-pulver)	3 g/dl
K_2HPO_4	0,05 g/dl
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 g/dl
KCl	0,03 g/dl
$CaCO_3$	0,1 g/dl

Gæringen gennemføres under de samme betingelser som beskrevet i trin A af eksempel 1, og der isoleres et rå pulver af fortimicin-kompleks på samme måde som beskrevet i trin B af eksempel 1. Der opnås omkring 71 g af det rå pulver af fortimicin-kompleks,

som udviser en aktivitet på omkring 670 enh./mg. Derpå underkastes 50 g af det rå pulver rensning ifølge den metode, der er beskrevet i trin C af eksempel 1. Der opnås omkring 15 g fortimicin D, som udviser en aktivitet på omkring 840 enh./mg.

Til yderligere rensning underkastes præparatet cellulosesøjlechromatografi. Omkring 500 ml af et cellulosepulver ("AVICEL", et produkt fra Funakoshi Seiyaku, K.K.) suspenderes i et blandet opløsningsmiddel af n-butanol, eddikesyre, pyridin og vand (volumenforhold 6:2:4:4) og pakkes i en glaskolonne til dannelse af et tæt ensartet lag. Søjlen vaskes derpå grundigt med det samme opløsningsmiddel. Præparatet fyldes over cellulosepulveret til dannelse af et ensartet tyndt lag. Efter at præparatet er fyldt på, hældes det samme opløsningsmiddel gradvist ind i søjlen fra oven, og derefter gennemføres elueringen kontinuert ved en strømningshastighed på omkring 1 ml/min. Eluatet udvindes i 10 ml fraktioner, og hver af fraktionerne underkastes bestemmelse af aktivitet ved hjælp af papirskivemetoden under anvendelse af *Bacillus subtilis* nr. 10707. De aktive fraktioner kombineres og koncentrerer under formindsket tryk for at fjerne opløsningsmidlet tilstrækkeligt. Remanensen opløses i en lille mængde vand og frysetørres. På denne måde opnås omkring 8 g af et rensat præparat af den frie base af fortimicin D, som udviser en aktivitet på 970 enh./mg.

EKSEMPEL 3

I dette eksempel gentages proceduren fra eksempel 2 til opnåelse af omkring 68 g af et rå pulver af fortimicin-kompleks. Derpå underkastes 40 g af det rå pulver rensning ifølge den metode, som er beskrevet i trin D af eksempel 1. Der opnås 7 g fortimicin KE, som udviser en aktivitet på omkring 860 enh./mg.

Til yderligere rensning underkastes præparatet cellulosesøjlechromatografi. Omkring 300 ml af et cellulosepulver ("AVICEL", et produkt fra Funakoshi Seiyaku K.K.) suspenderes i et opløsningsmiddel bestående af n-butanol, eddikesyre, pyridin og vand (volumenforhold 6:2:4:4) og pakkes i en glaskolonne til dannelse af et tæt ensartet lag. Søjlen vaskes derpå med det samme opløsningsmiddel. Præparatet fyldes oven på cellulosepulveret til

dannelse af et ensartet tyndt lag. Efter at præparatet er påfyldt, hældes det samme opløsningsmiddel gradvist ind i søjlen fra oven, og herefter gennemføres eluering kontinuert med en strømningshastighed på omkring 1 ml/min. Eluatet udvindes i 7 ml fraktioner, og hver af fraktionerne underkastes bestemmelse af aktivitet ved papirskivemetoden under anvendelse af *Bacillus subtilis* nr. 10707. De aktive fraktioner kombineres og koncentrerer under formindsket tryk til fjernelse af opløsningsmidlet. Remanensen opløses i en lille mængde vand og frysetørres. På denne måde opnås omkring 5 g af et rensset præparat af den frie base af fortimicin KE, som udviser en aktivitet på 980 enh./mg.

EKSEMPEL 4

I dette eksempel anvendes den i det ovenstående eksempel 1 anvendte stamme som podestammen, og de i eksempel 1 anvendte podemedier (første til fjerde podemedium) anvendes også som podemedier. Imidlertid anvendes et gæringsmedium med den følgende sammensætning:

Opløselig stivelse	4 g/dl
"Casaminosyre" (et syrehydrolysat af casein, produkt fra Difco Laboratories, U.S.A.)	3 g/dl
K_2HPO_4	0,05 g/dl
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 g/dl
KCl	0,03 g/dl
$CaCO_3$	0,1 g/dl

Gæringen gennemføres under de samme betingelser som beskrevet i trin A af eksempel 1, og fortimicin D isoleres og renses på samme måde som beskrevet i trin B og C af eksempel 1. Der opnås omkring 15 g rensset præparat af fortimicin D, som udviser en aktivitet på omkring 975 enh./mg.

EKSEMPEL 5

I dette eksempel gentages proceduren fra eksempel 4, undtagen at fortimicin KE isoleres og renses på samme måde som beskrevet i trin B og D af eksempel 1. Der opnås omkring 7 g rensset præparat af fortimicin KE, som udviser en aktivitet på omkring 985 enh./mg.

EKSEMPEL 6

I dette eksempel anvendes Micromonospora olivoasterospora MK-70 (ATCC 21819), Micromonospora olivoasterospora MK-80 (ATCC 31010) og Micromonospora olivoasterospora Mm 744 (ATCC 31009) som podestammerne. Podemedierne (første til fjerde podemedium) og gæringsmediet er de samme som i eksempel 1. Gæringen gennemføres under de samme betingelser som beskrevet i trin A af eksempel 1, og fortimicin D isoleres og renses på samme måde som beskrevet i trin B og C af eksempel 1. På lignende måde isoleres og renses fortimicin KE på samme måde som beskrevet i trin B og D af eksempel 1. Udbytterne og aktivitetene af de rensede præparater af fortimicin D og fortimicin KE er anført i tabel 5.

TABEL 5Fortimicin D

<u>Stamme</u>	<u>Udbytte (mg)</u>	<u>Aktivitet (enh./mg)</u>
Micromonospora olivoasterospora MK-70	450	985
Micromonospora olivoasterospora MK-80	980	975
Micromonospora olivoasterospora Mm 744	620	990

Fortimicin KE

<u>Stamme</u>	<u>Udbytte (mg)</u>	<u>Aktivitet (enh./mg)</u>
Micromonospora olivoasterospora MK-70	300	985
Micromonospora olivoasterospora MK-80	820	980
Micromonospora olivoasterospora Mm 744	650	990

EKSEMPEL 7

I dette eksempel opløses 10 g af den frie base af fortimicin D i 500 ml af en mættet vandig opløsning af bariumhydroxid. Opløsningen opvarmes til en temperatur på 100°C i 3 timer og får derpå lov at stå, indtil den er afkølet til stuetemperatur. Opløsningen neutraliseres med tør is til udfældning af bariumcarbonatet. Bundfaldet fjernes ved filtrering og vaskes med en lille mængde vand. Filtratet og vaskeopløsningerne kombineres og koncentrerer til omkring 20 ml. Koncentratet sendes igennem

en kolonne pakket med 500 ml af en kationbytterharpiks, "Amberlite[®] CG-50" (ammoniumform). Efter at harpiksen er vasket med vand, gennemføres eluering med 0,2N ammoniakvand. Eluatet udvindes i 20 ml fraktioner, og hver af fraktionerne underkastes bestemmelse af aktivitet ved papirskivemetoden. Først elueres en lille mængde reaktionsbiprodukter. Derefter elueres fortimicin KE. Aktive fraktioner underkastes tyndtlagschromatografi, og fraktionerne indeholdende fortimicin KE kombineres og koncentrerer under formindsket tryk til 20 ml. Koncentratet frysetørres, hvorved der opnås 7,8 g rensset præparat af den frie base af fortimicin KE, hvis aktivitet er omkring 970 enh./mg.

EKSEMPEL 8

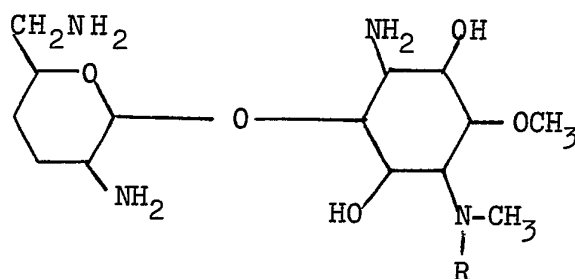
I dette eksempel opløses 1 g af den frie base af fortimicin D i 5 ml vand. Til opløsningen sættes 1,7 ml 6N svovlsyre. Derpå sættes 100 ml methanol til blandingen til dannelse af et hvidt bundfald. Bundfaldet udvindes ved filtrering og vaskes med methanol. Efter tørring af bundfaldet under formindsket tryk opnås 1,2 g af sulfatet af fortimicin D, som udviser en aktivitet på omkring 650 enh./mg.

EKSEMPEL 9

I dette eksempel opløses 1 g af den frie base af fortimicin KE i 5 ml vand. Til opløsningen sættes 2,0 ml 6N svovlsyre. Derpå sættes 100 ml methanol til blandingen til dannelse af et hvidt bundfald. Bundfaldet udvindes ved filtrering og vaskes med methanol. Efter tørring af bundfaldet under formindsket tryk opnås 1,3 g af sulfatet af fortimicin KE, som udviser en aktivitet på omkring 610 enh./mg.

P a t e n t k r a v :

1. Fortimiciner til anvendelse som desinfektionsmidler, k e n d e t e g n e t ved, at de er fortimiciner kaldet fortimicin KE og D med den almene strukturformel:



hvor R betyder H eller $\text{-C(=O)CH}_2\text{NH}_2$ og farmaceutisk acceptable ikke toksiske syreadditionssalte deraf.

2. Fremgangsmåde til fremstilling af fortimiciner ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at en mikroorganisme tilhørende arten *Micromonospora olivoasterospora* dyrkes i et næringsmedium, hvorefter mindst en af de antibiotiske forbindelser isoleres fra dyrkningsvæsken, om ønsket i form af et salt, og om ønsket vundet fortimicin D omdannes til fortimicin KE ved opvarmning i alkalisk vandig opløsning.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at mikroorganismen er udvalgt blandt stammerne *Micromonospora olivoasterospora* ATCC 21819, *Micromonospora olivoasterospora* ATCC 31009, *Micromonospora olivoasterospora* ATCC 31010 og *Micromonospora olivoasterospora* NRRL 8178.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 2 eller 3, k e n d e t e g n e t ved, at dyrkningen udføres ved 25-40°C i 2-15 dage ved omkring neutral pH-værdi.

Fremdragne publikationer: