



NORGE

[NO]

**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 142264

(51) Int. Cl.³ C 12 P 19/48, C 07 H 15/22
// (C 12 R 1/29)

(21) Patentsøknad nr. 742634
(22) Inngitt 18.07.74
(23) Løpedag 18.07.74

(41) Alment tilgjengelig fra 24.01.75
(44) Søknaden utlagt, utlegningsskrift utgitt 14.04.80
(30) Prioritet begjært 23.07.73, Japan, nr. 80866/73

(54) Oppfinnelsens benevnelse Fremgangsmåte til fremstilling av et antibiotikum betegnet fortimicin A eller syreaddisjonssalter derav.

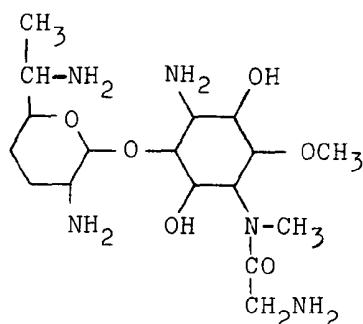
(71)(73) Søker/Patenthaver KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,
6-1, Ohtemachi Itchome, Chiyoda-ku,
Tokyo,
Japan.

(72) Oppfinner TAKASHI NARA,
RYO OKACHI,
ISAO KAWAMOTO,
MITSUYOSHI YAMAMOTO,
SEIJI SATO,
TOMOYASU SATO, alle: Tokyo og
SEIGO TAKASAWA, Hadano-shi, Kanagawa-ken,
Japan.

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

(56) Anførte publikasjoner Norsk (NO) alment tilgjengelig søknad
nr. 741300

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte til fremstilling av et antibiotikum betegnet fortimicin A med formelen:



eller syreaddisjonssalter derav, og denne fremgangsmåte er kjennetegnet ved at en mikroorganisme tilhørende arten *Micromonospora olivoasterospora* dyrkes i et næringsmedium, og at fortimicin A isoleres fra dyrkningsmediet, og, om ønsket, omdannes til et syreaddisjonssalt derav.

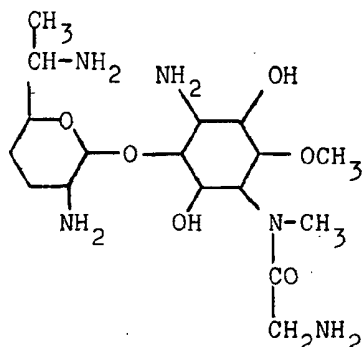
Antibiotika som utviser aktivitet overfor et bredt spektrum av bakterier er det alltid behov for. Det er nå isolert en hittil ukjent mikroorganismeart fra jorden i en rismark i forstedene til byen Hiroshima i fylket Hiroshima, Japan. Denne hittil ukjente art produserer, når den dyrkes, det hittil ukjente antibiotikum fortimicin A som utviser en antibakteriell aktivitet overfor forskjellige gram-positive og gram-negative bakterier. Som en følge herav kan det hittil ukjente antibiotikum anvendes til en rekke forskjellige formål og er spesielt nyttig som et overflate-desinfeksjonsmiddel for bekjempelse av populasjoner av *Staphylo-*

142264

2

coccus, *Escherichia* og andre bakterier.

Det hittil ukjente antibiotikum, som fremstilles ved foreliggende fremgangsmåte, ble opprinnelig identifisert som "XK-70-1", og er nå blitt gitt navnet fortimicin A. Det antas å ha følgende kjemiske strukturformel:



Som angitt produseres fortimicin A ved gjæring av en mikroorganisme tilhørende arten *Micromonospora olivoasterospora*, som er blitt bestemt til å være en hittil uidentifisert ny art. Dens typiske stamme ble opprinnelig identifisert som stamme MK-70. Denne stamme er deponert i American Type Culture Collection, Rockville, Maryland og er tildelt aksjesjonsnummeret 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 riktig luftmycelium som 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, utviser dyrkningsvæsken en lys hvetefarge i de tidlige stadier av dyrkningen, men i de senere stadier av dyrkningen viser dyrkningsvæsken en mørk, olivengrønn farge og det iakttas et stort antall sporer i kulturen. Ved mikroskopisk undersøkelse av cellene av MK-70, dyrket i et flytende medium, har det vist seg at myceliet er omkring 0,5 µm i diameter og er godt utviklet og ikke celledelt. En enkelt spore dannes ved enden av hver sporofor (omkring 0,3-1,0 µm lang) forgrenet ut fra substratet. Myceliet og sporene dannes langs det relativt lange substratmycelium. De modne sporer er kuleformede og omkring 1,0 µm i diameter. Ved iakttagelse av sporenes overflater

ved hjelp av et elektronmikroskop ser sporene ut som en stjerne siden det er et stort antall fremspring hvis ender er noe runde.

II. Dyrkningsegenskaper:

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

Tabell 1

Medium	Vekst	Farge	Oppløselig pigment
Czapek's agar	Moderat flat	Støvet oliven (1 lg)	Intet
Glukose-asparagin-agar	Moderat flat, voksaktig	Oliven (1 pl)	Intet
Næringsagar	God, hevet furet	Oliven (1 pl)	Intet
Egg-albumin-agar	Moderat flat, voksaktig	Lys oliven beige (1 li)	Intet
Stivelse-agar	God, flat	Sort oliven teak (1 po)	Intet
Maltekstrakt-gjærekstrakt-agar	God, hevet furet	Mørk oliven (1 pn)	Mørk oliven (1½ pn)
Havremel-agar	God, foldet voksaktig	Rav-karamell (3 lc) mørkebrun (2 pn)	Støvet oliven (1 pg)
Dekstrose (1%)-NZ-amin (3%)-agar	Moderat flat, voksaktig	Lys hvete-farge (2 ea)	Intet

Tabell 1 (fortsettelse)

Medium	Vekst	Farge	Oppløselig pigment
Bennet's agar	God, hevet furet	Mørk oliven	Intet
Emerson's agar	Moderat hevet, furet, voksaktig	Oliven (1 ni)	Intet
Glukose-gjærekstrakt-agar	God, hevet furet, voksaktig	Mørk oliven (1 pn)	Intet
Pepton-jernagar	Moderat, flat voksaktig	Mørk oliven (1 nl)	Intet
Tyrosin-agar	Moderat, flat voksaktig	Oliven (1 ni)	Intet

III. Fysiologiske egenskaper:

De fysiologiske egenskaper av stammen MK-70 er vist i tabell 2. Ved disse forsøk med unntagelse av den for optimal temperatur og virkninger på melk og cellulose, dyrkes stammen ved 27°C i 2 uker. Den optimale temperatur bestemmes etter 5 dagers dyrkning og virkningene på melk og cellulose iakttas etter 1 måneds dyrkning.

Tabell 21) Utnyttelse av karbonkilder:

<u>Karbonkilde:</u>	<u>Utnyttelse:</u>
D-arabinose	-
D-galaktose	-
D-glukose	++
glycerol	-
D-laktose	-
D-fruktose	-
L-inositol	-
D-mannitol	-
D-raffinose	-
L-ramnose	-
sakkarose	++

Tabell 2 (fortsettelse)

<u>Karbonkilde:</u>	<u>Utnyttelse:</u>
stivelse	++
D-xylose	-
2) Smelting av gelatin	svakt positiv
3) Virkning på melk	peptonisert
4) Nedbrydning av cellulose	svakt positiv
5) Hydrolyse av stivelse	positiv
6) Optimum pH for vekst	6,8-7,5
7) Optimum temperatur for vekst	30°C-38°C
8) Reduksjon av nitrat	positiv
9) Dannelse av tyrosinase	negativ
10) Dannelse av melanoide pigmenter	negativ

Stammen MK-70 er en mesofil som aldri danner et riktig luftmycelium når den dyrkes på et agar-medium, men danner enkelte sporer på substratmyceliet, og det har ved analyse vist seg at celleveggen i denne stamme inneholder meso-diaminopimelinsyre. Stammen MK-70 anses derfor som en stamme av slekten *Micromonospora*. En pålitelig basis for den systematiske klassifikasjon av arter av slekten *Micromonospora* er ikke blitt fastlagt. Derfor er klassifikasjonen av mikroorganismene i denne slekt hittil blitt utført ved en samlet sammenligning av morfologiske og fysiologiske egenskaper, osv. Det er 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 butte torner på sporens overflate. Imidlertid danner disse tre stammer av *M. echinospora* sporer av mørkebrun til sort farge når de dyrkes på et konvensjonelt agarmedium, og viser aldri en olivengrønn farge slik som stammen MK-70. De tre stammer av *M. echinospora* kan utnytte L-rhamnose, men MK-70 kan ikke dette. Dessuten kan de tre stammer produsere to aktive stoffer hvorav det ene kun har aktivitet overfor gram-positive bakterier og en Rf-verdi på 0,4-0,5 ved papirkromatografi under anvendelse av vannmettet n-butanol som utviklingsmiddel, og antibiotikumet gentamicin, som har en Rf-verdi på 0,00.

På den annen side kan stammen MK-70 produsere fire forskjellige aktive stoffer, dvs. et stoff med aktivitet kun overfor gram-positive bakterier og med en Rf-verdi på 0,05-0,1 ved papirkromatografi under anvendelse av det førstnevnte utviklingsmiddel; et stoff med aktivitet kun overfor gram-positive bakterier og med en Rf-verdi på 0,00; fortimicin B som har aktivitet overfor gram-positive og gram-negative bakterier og har en Rf-verdi på 0,00; og fortimicin A som også er aktiv overfor gram-positive og gram-negative bakterier og har en Rf-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 utviser en olivengrønn til mørkolivengrønn farge når den dyrkes under anvendelse av et medium som er passende til sporedannelse, og produserer et oppløselig, olivengrønt pigment i noen medier. Blant stammene av slekten *Micromonospora* er det noen stammer som er i stand til å danne olivengrønne sporer, nemlig *Micromonospora chalybeata*, *Micromonospora fusca*, osv., men disse adskiller seg fra den foreliggende ved sporenes overflatetilstand og fargen av oppløselige pigmenter m.m.

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

Som beskrevet ovenfor er det ingen stammer som tilsvarer stammen MK-70 blant de hittil rapporterte stammer av slekten *Micromonospora*. Derfor betraktes stammen MK-70 som en hittil ukjent art tilhørende slekten *Micromonospora* og er blitt gitt navnet *Micromonospora olivoasterospora*. Navnet på denne art kommer fra dannelsen av olivengrønne kuleformede sporer med frem-spring. Som angitt ovenfor er stammen MK-70 deponert i the American Type Culture Collection som *Micromonospora* sp. MK-70. Stammen MK-70 er også deponert i the Fermentation Research Institute, Tokyo, Japan og er gitt registreringsnummeret FERMP-Nr. 1560.

Det er også blitt isolert to variantstammer av *Micromonospora olivoasterospora*, hvilke har evnen til å produsere fortimicin

A. Disse varianter adskiller seg fra typestammen ved at de har evnen til å utnytte D-galaktose, D-fruktose og D-xylose. En variant utviser ytterligere en lys hvitefarge når den dyrkes på forskjellige medier ettersom den mangler evnen til å danne sporer på myceliet. I andre henseender ligner variantene nært typestammen. Disse to varianter er også deponert i the American Type Culture Collection og er tildelt aksesjonsnummerene ATCC 31009 og ATCC 31010. Disse varianter såvel som typestammen er fritt tilgjengelige for offentligheten.

Vanligvis kan konvensjonelle metoder for dyrking av mikroorganismer tilhørende actinomycetene 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 evne til utnyttelse. Uorganiske og organiske nitrogenkilder slik som ammoniumklorid, ammoniumsulfat, urea, ammoniumnitrat, natriumnitrat, osv., og naturlige nitrogenkilder slik som pepton, kjøttekstrakt, gjærekstrakt, tørrgjær, maisstøpevann, soya-bønnemel, casamiosyre, oppløselig vegetabilsk protein osv., anvendes alene eller i kombinasjon. Dessuten kan slike uorganiske salter som natriumklorid, kaliumklorid, kalsiumkarbonat, kaliumfosfater osv. om nødvendig tilsettes til mediet. Videre kan det hensiktsmessig tilsettes organiske eller uorganiske materialer som er i stand til å fremme mikroorganismens vekst og fremstillingen av fortimicin A, til mediet. Vanligvis har det vist seg at når produksjonen av fortimicin A forøkes ved endring av dyrkningsmediets bestanddeler, synker den samtidige fremstilling av andre aktive stoffer. En væskedyrkningsmetode, spesielt en submers, omrørt dyrkningsmetode, er mest egnet for utførelse av foreliggende fremgangsmåte. Det er ønskelig å utføre dyrkingen ved en temperatur på 25-40°C og ved en tilnærmelsesvis nøytral pH-verdi. Antibiotikumet dannes og akkumuleres vanligvis i dyrkningsvæsken etter 4-15 dagers dyrking. Når utbyttet av fortimicin A i dyrkningsvæsken når et maksimum, stanses dyrkingen og antibiotikumet isoleres og renses fra dyrkningsvæsken etter at mikroorganismecellene er blitt fjernet, f.eks. ved filtrering.

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

Ettersom fortimicin A er basisk og er oppløselig i vann, men tungt oppløselig i de alminnelige organiske oppløsningsmidler, kan antibiotikumet renses ved vanlige metoder for rensing av såkalte vannoppløselige basiske antibiotika. Nærmere bestemt kan fortimicin A renses ved en passende kombinasjon av adsorpsjon og desorpsjon fra kationutvekslerharpikser, kolonnekromatografi og under anvendelse av cellulose; "Sephadex"® LH-20, siliciumdioksydgel-kromatografi og lignende metoder.

F.eks. innstilles det cellefrie dyrkningsfiltrat til en pH-verdi på 7,5 og underkastes deretter adsorpsjon på en kationutvekslerharpiks, slik som "Amberlite"® IRC-50 (NH_4^+ -form). Etter vasking med vann utføres eluering med 1N vandig ammoniakk. Den aktive fraksjon konsentreres under forminsket trykk og føres deretter gjennom en kolonne av anionutvekslerharpiks, slik som "Dowex"® 1x2 (OH^- -form). De absorberte stoffer elueres med vann og de eluerte aktive fraksjoner oppsamles og konsentreres under forminsket trykk, hvorved det oppnås et rått pulver inneholdende Fortimicin A og andre aktive komponenter. Det rå pulver oppløses deretter i vann. pH-verdien av den vandige oppløsning innstilles til 5,0 med 2N svovelsyre og føres deretter gjennom en kolonne med aktivert kull. De aktive stoffer absorberes således på kullet. Etter vasking av kolonnen med vann for å fjerne urenheter utføres eluering med 0,2N svovelsyre. De eluerte aktive fraksjoner oppsamles og sendes gjennom en kolonne av en anionutvekslerharpiks, slik som "Dowex"® 44 (OH^- -form) for nøytralisering. Gjennomløpet frysetørkes deretter for oppnåelse av et rått pulver inneholdende fortimicin A i form av fri base.

Siliciumdioksydgel-kromatografi anvendes f.eks. som en metode for isolering av fortimicin A fra det rå pulver. Som utviklingsmiddel anvendes det nedre lag av en blanding av kloroform, isopropanol og vandig ammoniakk (2:1:1). Det rå pulver oppløses i utviklingsmidlet, innføres i en kolonne av siliciumdioksydgel og utvikles med det samme oppløsningsmiddel. Den første aktive fraksjon inneholder fortimicin B. Andre sporkomponenter elueres i etterfølgende fraksjoner og deretter elueres fortimicin A i fraksjoner som dekker et bredt område. Fraksjonene inneholdende

fortimicin A oppsamles og konsentreres under forminsket trykk. Etter frysetørking av konsentratet oppnås et hvitt pulver bestående av basen av antibiotikumet. Det således oppnådde preparat av fortimicin A er forholdsvis rent. Imidlertid er preparatet noen ganger forurenset med urenheter og i slike tilfeller underkastes preparatet en cellulose-kolonnekromatografi med en oppløsningsmiddelblanding av n-butanol, pyridin, eddiksyre og vann (6:4:2:4) som utviklingsmiddel. De aktive fraksjoner oppsamles og konsentreres under forminsket trykk hvorved det oppnås et rent preparat av fortimicin A. Når urenheten er et stoff som er positivt ved ninhydrin-prøven, kan fjerningen derav utføres med karboksymetylcellulose-kolonnekromatografi. En oppløsning av det rå pulver av fortimicin A sendes da gjennom en kolonne pakket med karboksymetylcellulose (ammoniumform). Aktive stoffer absorberes på karboksymetylcellulosen. Etter grundig vasking av kolonnen med vann for å fjerne de fleste pigmenter og uorganiske salter derfra, utføres elueringen med 0,2N ammoniumhydrogenkarbonat. De således rensede aktive fraksjoner av fortimicin A oppsamles og frysetørkes.

Ved de ovenstående reningsmetoder bestemmes de aktive fraksjoner av fortimicin A ved en 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). Rf-verdien av fortimicin A på papirkromatogrammet er omkring 0,37.

Fortimicin A er et hvitt, basisk pulver. De elementæranalytiske verdier finnes å være C 50,2%, H 8,67%, N 17,5% og O 23,6%. Molekylvekten er 405 (beregnet på basis av resultater oppnådd ved høyoppløsnings-massespektrometri). Som en følge av dette antas molekylformelen å være $C_{17}H_{35}N_5O_6$. De elementæranalytiske verdier beregnes herav til C 50,4%, H 8,64%, N 17,3% og O 23,7%. Smeltepunktet er høyere enn 200°C (dekomponering).

Figur 1 viser det ultraviolette absorpsjonsspektrum for en vandig oppløsning av fortimicin A. Spektret avslører ingen karakteristisk maksimumsabsorpsjon mellom 220 og 360 mμ og utviser simpelthen en terminalabsorpsjon.

Den optiske dreining av den frie base av fortimicin A er

$$[\alpha]_D^{25} = +26^{\circ} (c=0,2, H_2O).$$

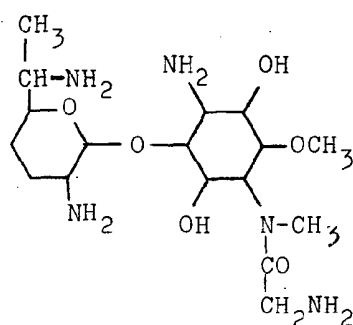
Figur 2 viser det infrarøde absorpsjonsspektrum av fortimicin A. Som det fremgår av figuren utviser fortimicin A maksima ved de følgende bølglengder (cm^{-1}):

3400, 2900, 1625, 1570, 1480, 1390, 1340, 1100, 1030.

Den frie base av fortimicin A er meget oppløselig i vann, også oppløselig i metanol og svakt oppløselig i etanol og aceton, men uoppløselig i slike organiske oppløsningsmidler som kloroform, benzen, etylacetat, butylacetat, etyleter, butanol, petroleum-eter, n-heksan osv.

Fortimicin A gir positive reaksjoner ved ninhydrin-prøven og kaliumpermanganat-prøven, og gir negative reaksjoner ved Elson-Morgan's-prøve og biuret-prøven.

På basis av undersøkelser utført på antibiotikumet antas det nå at fortimicin A har følgende kjemiske struktur:



Det må imidlertid forstås at den ovenstående kjemiske strukturformel er bekreftet. Identifikasjonen av fortimicin A ble også utført ifølge de ovenstående metoder.

Rf-verdiene av fortimicin A, oppnådd som resultat av papirkromatografi og tynnsjikt-kromatografi under anvendelse av forskjellige utviklingsmidler, er vist i de etterfølgende tabeller 3, 4 og 5. Disse verdier er sammenlignet med Rf-verdiene for forskjellige lignende antibiotika utviklet på samme måte.

Tabell 3

Rf-verdier for fortimicin A ved stigende papirkromatografi (ved 28°C)

<u>Utviklingsmiddel</u>	<u>Rf-verdi</u>	<u>Utviklingsperiode (timer)</u>
20% ammoniumklorid	0,96	3
vannmettet n-butanol	0,00	15
n-butanol-eddiksyre-vann (3:1:1)	0,06	15
vannmettet etylacetat	0,00	4
vannmettet n-butanol inneholdende 2% (vekt/vol) p-toluensulfonsyre og 2% (vol/vol) piperidin	0,04	15

Tabell 4

Rf-verdier for fortimicin A, gentamicin C kompleks og gentamicin C₂ ved siliciumdioksydgel-tynnsjikt-kromatografi (utviklet ved romtemperatur i 3 timer)

<u>Utviklingsmiddel^x</u>	<u>Antibiotikum</u>	<u>Rf-verdi</u>
I	Fortimicin A	0,74
I	Gentamicin C kompleks	0,71
I	Gentamicin C ₂	0,71
II	Fortimicin A	0,37
II	Gentamicin C kompleks	0,06-0,16
II	Gentamicin C ₂	0,08-0,14

^xUtviklingsmiddel I: Det øvre lag av en blanding av kloroform, metanol og 17% vandig ammoniakk (volumforhold 2:1:1)

Utviklingsmiddel II: 10% ammoniumacetat og metanol (volumforhold 1:1)

Tabell 5

Rf-verdier for kjente antibiotika ved stigende papirkromatografi under anvendelse som utviklingsmiddel av det nedre lag av en blanding av kloroform, metanol og 17% vandig ammoniakk (2:1:1) (utviklet ved romtemperatur i 12 timer)

<u>Antibiotikum</u>	<u>Rf-verdi</u>
Streptomycin A	0,02
Streptomycin B	0,00
Bluensomycin	0,01
Robostamycin	0,00
Lividomycin A	0,00
Lividomycin B	0,03
Lividomycin D	0,02
Spectinomycin	0,45
Kasugamycin	0,01
Butirosin A	0,00
Butirosin B	0,01
Hygromycin B	0,02
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
Antibiotic nr. 460	0,01
Neomycin C	0,00
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
Nebramycin faktor 4	0,01

Tabell 5 (fortsettelse)

Nebramycin faktor 5	0,00
Myomycin	0,00
XK-62-2 ^x	0,49
XK-70-A ^{xx} (Fortimicin B)	0,65
XK-70-1 (Fortimicin A)	0,37

^x Et hittil ukjent antibiotikum beskrevet i US-patent nr. 4.045.298.

^{xx} Et hittil ukjent antibiotikum beskrevet i norsk patent nr. 139.864.

De antibakterielle spektre for fortimicin A overfor forskjellige mikroorganismer ved agarfortynningsmetoden (pH 8,0) er vist i nedenstående tabell 6.

Tabell 6

Mikroorganisme	Minimal inhiberende konsentrasjon (µg/ml)
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 10541	10
<i>Bacillus subtilis</i> nr. 10707	0,02
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634	0,6
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> ATCC 9463	0,6
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	0,04
<i>Staphylococcus aureus</i> KY 8942 (resistent overfor kanamycin, paromomycin, streptomycin, gentamicin og nebramycin)	10
<i>Staphylococcus aureus</i> KY 8950 (resistent overfor streptomycin, tetracyclin, penicillin og sulfonamid)	1,3
<i>Staphylococcus aureus</i> KY 8953 (resistent overfor streptomycin, kanamycin, paromomycin, tetracyclin, neomycin, kanamycin B og erythromycin)	1,3
<i>Staphylococcus aureus</i> KY 8956 (resistent overfor streptomycin, paromomycin, tetracyclin, erythromycin og oleandomycin)	0,32
<i>Staphylococcus aureus</i> KY 8957 (resistent overfor kloramphenicol, streptomycin, kanamycin B, tetracyclin og paromomycin)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	0,08
<i>Escherichia coli</i> ATCC 26	0,16

Tabell 6 (fortsettelse)

Escherichia coli KY 8302 (resistent overfor kloramphenicol, streptomycin, kanamycin, paromomycin, tetracyclin og spectino- mycin)	0,26
Escherichia coli KY 8310 (resistent overfor kloramphenicol, streptomycin, kanamycin, gentamicin, kanamycin G, paromomycin, tetracyclin og spectinomycin)	0,13
Escherichia coli KY 8310 (resistent overfor streptomycin)	0,26
Escherichia coli KY 8315 (resistent overfor streptomycin, kanamycin, paromomycin og neomycin)	0,13
Escherichia coli KY 8327 (resistent overfor kanamycin, gentamicin, sisomicin og tobramycin)	0,13
Escherichia coli KY 8331 (resistent overfor kanamycin, ribostamycin, neomycin, paramomycin og lividomycin)	0,3
Escherichia coli KY 8332 (resistent overfor kanamycin og tobramycin)	0,3
Pseudomonas aeruginosa BMH Nr. 1	5
Pseudomonas aeruginosa KY 8510 (resistent overfor kanamycin, kanamycin B, tobramycin, gentamicin C _{1a} og ribostamycin)	5
Proteus vulgaris ATCC 6897	0,16
Proteus vulgaris KY 4296 (resistent overfor halidixinsyre)	0,41
Proteus vulgaris Abbott JJ, KY 4295	0,8
Proteus mirabilis Finland 9 KY 4293	0,8
Proteus mirabilis Nr. 825 KY 4292	0,41
Proteus mirabilis Nr. 39 KY 4290	0,8
Proteus morgani Jenkins KY 4298	1,6
Proteus rettgeri Booth KY 4288	0,8
Proteus rettgeri Hambrook KY 4289	0,41
Shigella sonnei ATCC 9290	0,3
Salmonella typhosa ATCC 9992	0,08

Det fremgår klart av det ovenstående at fortimicin A har et bredt aktivitetsområde overfor gram-positive og gram-negative bakterier og også en sterk antibakteriell aktivitet overfor

Staphylococcus aureus og Escherichia coli, som er resistente overfor forskjellige kjente antibiotika. Spesielt er fortimicin A kjennetegnet ved at det viser en sterk antibakteriell aktivitet overfor mikroorganismer av artene Escherichia coli og Staphylococcus aureus, som normalt er resistente overfor kanamycin, gentamicin, tobramycin og lignende, og også en tilfredsstillende antibakteriell aktivitet overfor bakterier av slekten Proteus. Det har vist seg at når det anvendes i terapien av forskjellige infeksjonssykdommer forårsaket av de ovennevnte bakterier, utviser fortimicin A bemerkelsesverdige terapeutiske virkninger. I dette henseende er det utført in vivo-forsøk på mus infisert intraperitonealt med Escherichia coli Juhl KY 4286. De således infiserte mus ble behandlet med forskjellige konsentrasjoner av fortimicin A ved subkutan injeksjon. Som resultat er ED_{50} -verdien av fortimicin A blitt bestemt til å være 6 mg/kg. I betraktning av den utmerkede antibakterielle aktivitet anses fortimicin A for å være nyttig innenfor medisinsk behandling som et antibakterielt stoff. Videre kan fortimicin A i betraktning av det ovenstående brede antibakterielle spektrum også være nyttig som et overflate-antibakterielt middel.

En sammenligning av fortimicin A med andre antibiotika illustrerer ytterligere dets nyhet. Som vannoppløselige basiske antibiotika produsert av mikroorganismer av slekten Micromonospora og med et bredt antibakterielt spektrum er det kjent slike antibiotika som gentamicin (M.J. Weinstein et al: Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1963, side 1; D.J. Cooper et al: J. Infect. Dis., 119 342 (1969); og J.A. Waitz: Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2, 464 (1972)), 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-patent nr. 4.045.298, fortimicin B (norsk patent nr. 139.864)). Imidlertid fremgår det klart av tabell 5 at Rf-verdiene for gentamicin A, B, C_{1a} og C_1 er 0,00, 0,00, 0,18 og 0,59 og Rf-verdien for fortimicin A er 0,37. Fortimicin A er derfor forskjellig fra disse gentamiciner. På den annen side er Rf-verdien for gentamicin C_2 0,38 og for fortimicin A 0,37. Disse verdier er meget nær hverandre. Imidlertid er Rf-verdiene for gentamicin C_2 og fortimicin A, målt ved hjelp av siliciumdioksydgel-tynnsjiktskromatografi

under anvendelse av utviklingsmiddel II, henholdsvis 0,08-0,14 og 0,37. Som en følge av dette er fortimicin A forskjellig fra gentamicin C₂. Videre er det klart ved sammenligning med antibiotikum nr. 460, sisomicin, XK-62-2 og fortimicin B, at fortimicin A er forskjellig fra disse antibiotika, fordi Rf-verdiene for antibiotikum nr. 460, sisomicin, XK-62-2 og fortimicin B, som vist i tabell 3, er henholdsvis 0,01, 0,18, 0,49 og 0,65, mens den tilsvarende Rf-verdi for fortimicin A er 0,37.

Som vannoppløselige, basiske antibiotika produsert av andre mikroorganismer tilhørende actinomycetene enn de av slekten Micromonospora, som har et bredt antibakterielt spektrum, er det kjent slike antibiotika som streptomycin, ribostamycin, lividomycin, spectinomycin, kasugamycin, neomycin, kanamycin, nebramycin, paramycin osv. Fortimicin A er meget forskjellig fra disse antibiotika i fysikalske og kjemiske egenskaper. Ut fra de i tabell 3 angitte Rf-verdier ved papirkromatografi er det klart at fortimicin A er forskjellig fra disse kjente antibiotika.

Ettersom fortimicin A inneholder basiske grupper, kan det eksistere i form av syreaddisjonssalter. Følgelig omfatter oppfinnelsen også fremstilling av de farmasøytisk ikke-toksiske syreaddisjonssalter av antibiotikumet, omfattende salter med mineralsyrer slik som hydrokloridet, hydrobromidet, hydrojodidet, sulfatet, sulfamatet og fosfatet og saltene med organiske syrer slik som maleatet, acetatet, citratet, oxalatet, succinatet, benzoatet, tartratet, fumaratet, malatet, mandelatet, askorbatet.

Foreliggende fremgangsmåte belyses nærmere ved hjelp av nedenstående representative eksempler.

Eksempel 1

I dette eksempel anvendes Micromonospora olivoasterospora MK-70 (ATCC 21819) (FERM-P nr. 1560) som podestamme. Et øye av denne podestamme innpodes i 10 ml av et podemedium inneholdende 2% glukose, 0,5% pepton, 0,5% gjærekstrakt og 0,1% kalsiumkarbonat (pH 7,5 før sterilisering) i et 50 ml reagensglass. Dyrkingen utføres ved 30°C i 5 dager. 10 ml av podedyrkningsvæsken innpodes deretter i 30 ml av et annet podemedium i en 250 ml Erlenmeyerkolbe. Sammensetningen av det andre podemediet er den samme som av det første podemedium. Den andre podedyrkingen utføres ved 30°C i

2 dager med rysting.

Deretter innpodes 30 ml av den andre podedyrkningsvæske i 300 ml av et tredje podemedium i en 2 liter Erlenmeyerkolbe forsynt med rører. Sammensetningen av det tredje podemedium er den samme som for det første podemedium. Den tredje podedyrkning utføres ved 30°C i 2 dager med rysting, og 1,5 liter av den tredje podedyrkningsvæske (tilsvarende innholdet av 5 kolber) innpodes 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 37°C i to dager med luftning og omrøring (350 omdr./min., lufting 15 liter/min.). Deretter innpodes 15 liter av den fjerde podedyrkningsvæske i 150 liter av et hovedgjæringsmedium i en 300 liters gjæringstank. Hoveddyrkningsmediet inneholder 4% oppløselig 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 for sterilisering). Dyrkingen i gjæringstanken utføres ved 37°C i 4 dager med lufting og omrøring (150 omdr./min., lufting 80 liter/min.).

Etter fullførelse av dyrkingen innstilles den resulterende gjæringsvæske til en pH-verdi på 2,5 med konsentrert svovelsyre og omrøres i 30 minutter. Deretter tilsettes 7 kg av et filterhjelpemiddel med varebetegnelsen "Radiolite No. 600", og mikrobecellene fjernes ved filtrering. Filtratet innstilles til en pH-verdi på 7,5 med 6N natriumhydroksyd og føres gjennom en kolonne pakket med omkring 20 liter av en kationutvekslerharpiks med varebetegnelsen "Amberlite[®] IRC-50" (ammoniumform), og gjennomløpet kasseres. Aktive stoffer absorberes på harpiksen.

Etter vasking av harpiksen med vann elueres de absorberte aktive stoffer med 1N vandig ammoniakk. Aktiviteten av eluatet bestemmes ved en papirskivemetode under anvendelse av en agarplate med *Bacillus subtilis* nr. 10707. De aktive fraksjoner oppsamles, og blandingen konsentreres til omkring 1 liter under forminsket trykk. Konsentratet føres gjennom en kolonne pakket med 500 ml av en anionutvekslerharpiks med varebetegnelsen "Dowex[®] 1 x 2" (OH⁻-form). Deretter føres omkring 2 liter vann gjennom kolonnen hvorved urenheter fjernes og aktive stoffer elueres ut. De således oppnådde aktive fraksjoner oppsamles og konsentreres til omkring 100 ml under forminsket trykk, og det

resulterende konsentrat sendes gjennom en kolonne pakket med omkring 50 ml aktiv-kull-pulver. De aktive stoffer absorberes på kull-pulveret. Deretter vaskes kolonnen med vann og gjennomløpet og vaskevannet kasseres. Deretter elueres de absorberte aktive stoffer med 0,2N svovelsyre. Eluatets aktivitet bestemmes ved papirskivemetoden under anvendelse av *Bacillus subtilis* og de aktive fraksjoner oppsamles. De således oppnådde fraksjoner sendes gjennom en kolonne av "Dowex"® 44" (OH⁻-form), og aktive stoffer elueres med vann. De aktive fraksjoner oppsamles igjen og konsentreres til omkring 50 ml. Det således oppnådde konsentrat lyofiliseres hvorved det oppnås 32 g av et rått pulver inneholdende Fortimicin A. Det rå pulver utviser en aktivitet på 575 enh./mg (aktiviteten av 1 mg rent produkt tilsvarer 1000 enheter).

Deretter anbringes 10 g av det rå pulver som et tynt og ensartet lag på 500 ml siliciumdioksydgel pakket i en glasskolonne. Glasskolonnen prepareres ved å suspendere siliciumdioksydgelen i et oppløsningsmiddel bestående av det nedre lag av en blanding av kloroform, isopropanol og 17% vandig ammoniakk (volumforhold 2:1:1) og deretter pakkes suspensjonen tett i kolonnen med et ensartet lag og vaskes etter med det samme oppløsningsmiddel. Etter anbringelse av det rå pulver på toppen av kolonnen utføres elueringen med det ovennevnte oppløsningsmiddel ved gradvis å helle det i kolonnen fra toppen og deretter utføres elueringen med en strømningshastighet på omkring 50 ml/time. Eluatet oppnås som fraksjoner hver på 20 ml og aktiviteten av hver fraksjon bestemmes ved papirskivemetoden. Fortimicin B elueres først. Deretter oppnås fraksjoner inneholdende fortimicin A. De aktive fraksjoner underkastes papirkromatografi og fraksjonene inneholdende fortimicin A samles og konsentreres under forminsket trykk til fullstendig fjerning av oppløsningsmidlet. Konsentratet oppløses deretter i en liten mengde vann. Etter frysetørking av oppløsningen oppnås omkring 1,8 kg rensset preparat av den frie base av fortimicin A. Preparatets aktivitet er omkring 970 enh./mg.

Eksempel 2

I dette eksempel anvendes den samme podestamme og gjentas den første til fjerde podedyrkning fra eksempel 1. Som hovedgjæringsmedium anvendes et medium med følgende sammensetning:

Oppløselig stivelse	4%
"Ebios" (tørket gjærpulver)	3%
K_2HPO_4	0,05%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05%
KCl	0,03%
$CaCO_3$	0,1%

Dyrkingen utføres på samme måte som i eksempel 1. Isoleringen av et rått pulver inneholdende fortimicin A utføres på samme måte som i eksempel 1, hvorved det oppnås omkring 63 g av et rått pulver med en aktivitet på omkring 650 enh./mg. Det rå pulver renses ifølge metoden i eksempel 1, hvorved det oppnås omkring 18 g rensset fortimicin A med en aktivitet på omkring 850 enh./mg. Det således oppnådde preparat renses ytterligere ved cellulosekolonnekromatografi. Preparatet anbringes som et tynt og jevnt lag på omkring 500 ml cellulosepulver ("Avicel"), pakket i en glasskolonne. Kolonnen prepareres ved å suspendere cellulosepulver i en blanding av n-butanol, eddiksyre, pyridin og vann (volumforhold 6:2:4:4). Suspensjonen pakkes deretter tett i glasskolonnen som et jevnt lag og vaskes grundig med det samme oppløsningsmiddel. Etter anbringelse av preparatet på toppen av kolonnen utføres elueringen med det samme oppløsningsmiddel ved gradvis å helle oppløsningsmidlet i kolonnen fra toppen og deretter fortsettes elueringen med en strømningshastighet på omkring 1 ml/min. Eluatet oppnås som fraksjoner hver på 10 ml og aktiviteten av hver fraksjon bestemmes ved papirskivemetoden. De aktive fraksjoner oppsamles og konsentreres under forminsket trykk til fullstendig fjerning av oppløsningsmidlet. Konsentratet oppløses i en liten mengde vann. Etter frysetørking av oppløsningen oppnås omkring 9 g av et rensset preparat av den frie base av fortimicin A. Aktiviteten av dette preparat er 980 enh./mg.

Eksempel 3

I dette eksempel benyttes samme podestamme og gjentas den første til fjerde podedyrking som i eksempel 1. Som hoveddyrkningsmedium anvendes et medium med følgende sammensetning:

Oppløselig stivelse	4%
"Casamino acid" (et hydrolysat av kasein)	3%
K_2HPO_4	0,05%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05%
KCl	0,03%
$CaCO_3$	0,1%

Dyrkningen, isoleringen og rensingen av fortimicin A utføres på samme måte som i eksempel 1, hvorved det oppnås omkring 18,5 g av et rensset preparat av fortimicin A med en aktivitet på omkring 965 enh./mg.

Eksempel 4

I dette eksempel underkastes en dyrkningsvæske oppnådd ved utførelse av en gjæring på samme måte som i eksempel 1 en papirkromatografi for å bekrefte tilstedeværelsen av fortimicin A i vesentlige mengder. Væsken behandles deretter på samme måte som i eksempel 1 for oppnåelse av et rått pulver inneholdende fortimicin A. Deretter oppløses 3 g av det resulterende rå pulver i 5 ml vann, og oppløsningen helles i en kolonne pakket med omkring 200 ml karboksymetylcellulose (ammoniumform). Deretter føres omkring 1000 ml vann gjennom kolonnen hvorved aktive stoffer absorberes på karboksymetylcellulosen og de fleste ikke-absorberte pigmenter og uorganiske salter fjernes. Elueringen utføres deretter med 0,2M sitronsyre-fosforsyre-bufferoppløsning (pH 3,0) med en strømningshastighet på omkring 50 ml/time, og eluatet oppsamles som fraksjoner hver på 10 ml. Aktiviteten av hver fraksjon bestemmes ved papirskivemetoden. De aktive fraksjoner underkastes papirkromatografi og fraksjonene inneholdende fortimicin A oppsamles. Fortimicin A fraksjonene sendes gjennom en kolonne av "Amberlite® CG-50" (H^+ -form), hvorved de aktive stoffer absorberes på harpiksen. Etter vasking av kolonnen med vann utføres elueringen med 0,5 N saltsyre. De aktive fraksjoner oppsamles og sendes deretter gjennom en kolonne av "Dowex® 44" (OH^- -form) for nøytralisering. Det resulterende gjennomløp frysetørkes hvorved det oppnås omkring 560 mg av den frie base av fortimicin A. Produktets aktivitet er omkring 985 enh./mg.

Eksempel 5

I dette eksempel anvendes *Micromonospora olivoasterospora* Mm 744, KY 11067 (FERM-P nr. 2193, ATCC 31009) som podestamme. Den første til fjerde podedyrkning utføres på samme måte som i eksempel 1 under anvendelse av et podemedium inneholdende 2% glukose, 0,5% pepton, 0,3% gjærekstrakt, 0,1% kalsiumkarbonat (pH 7,2 før sterilisering). Deretter innpodes 15 liter av den fjerde podedyrkningsvæske i 150 liter av et hovedgjæringsmedium i en 300 liters rustfri stålgjæringstank. Hovedgjæringsmediet inneholder 2% oppløselig stivelse, 0,5% soyabønneemel, 2% glukose, 1% maisstøpevann, 1% gjærekstrakt, 0,05% K_2HPO_4 , 0,05% $MgSO_2 \cdot 7H_2O$, 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 (150 omdr./min., lufting 80 liter/min.). Etter fullførelse av dyrkingen oppnås omkring 42 g av et rått pulver inneholdende fortimicin A fra gjæringsvæsken på samme måte som i eksempel 1. Aktiviteten til det rå pulver er omkring 560 enh./mg. Det således oppnåsse rå pulver underkastes deretter en rensing som i eksempel 1, hvorved det oppnås 6,8 g av den frie base av fortimicin A. Produktets aktivitet er omkring 975 enh./mg.

Eksempel 6

I dette eksempel anvendes *Micromonospora olivoasterospora* MK 80, KY 11055 (FERM-P nr. 2192, ATCC 31010) som podestamme. Podestammen podedyrkes i 4 trinn som i eksempel 1 under anvendelse av et podemedium inneholdende 1% glukose, 1% oppløselig stivelse, 0,5% gjærekstrakt, 0,5% pepton og 0,1% kalsiumkarbonat (pH 7,0 før sterilisering). Podedyrkningsvæsken fra den fjerde podedyrkning innpodes deretter i et hovedgjæringsmedium som i eksempel 1. Imidlertid anvendes i dette eksempel gjæringsmediet fra eksempel 5. Fra den resulterende hovedgjæringsvæske oppnås omkring 52 g av et rått pulver inneholdende fortimicin A ved samme metode som i eksempel 1. Aktiviteten til det rå pulver er omkring 530 enh./mg. Det således oppnådde rå pulver underkastes deretter en rensing på samme måte som i eksempel 1, hvilket gir omkring 9 g av den frie base av fortimicin A. Produktets aktivitet er omkring 980 enh./mg.

Eksempel 7

I dette eksempel blir 1 g fortimicin A fremstilt på samme måte som i eksempel 1, oppløst i 50 ml vann. Deretter tilsettes 6N svovelsyre til den resulterende oppløsning for å innstille pH-verdien til 4,5. Blandingen frysetørkes for oppnåelse av 1,6 g av sulfatet av fortimicin A som et hvitt pulver.

Analyse av sulfatet av fortimicin A gir følgende:

Oppløselighet i forskjellige oppløsningsmidler:

Oppløselig i vann. Uoppløselig i forskjellige organiske oppløsningsmidler slik som metanol, etanol, aceton, benzen og etyleter.

Smeltepunkt: $>200^{\circ}\text{C}$ (dekomp.)

Ultrafiolett absorpsjon: Endeabsorpsjon

Elementæranalyse:

Beregnet for $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_6 \cdot 2,5\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:

C 29,73%, H 6,46%, N 10,20%, S 11,65%

Funnet: C 29,81%, H 6,30%, N 10,15%, S 11,74%

Molekylvekt: 686,7

Spesifikk dreining: $[\alpha]_D^{25} + 74,2^{\circ}$ ($c=0,5$, H_2O)

Spesifikk aktivitet: 585 enheter/mg.

Eksempel 8

I dette eksempel blir 1 g fortimicin A fremstilt på samme måte som i eksempel 1, oppløst i 50 ml vann. Deretter tilsettes 6N saltsyre til den resulterende oppløsning for å innstille pH-verdien til 4,5. Blandingen frysetørkes for oppnåelse av 1,5 g av hydrokloridet av fortimicin A som et hvitt pulver.

Analyse av hydrokloridet av fortimicin A gir følgende:

Oppløselighet i forskjellige oppløsningsmidler:

Oppløselig i vann. Uoppløselig i forskjellige organiske oppløsningsmidler slik som metanol, etanol, aceton, benzen og etyleter.

Smeltepunkt: 180°C (dekomp.)

Ultrafiolett absorpsjon: Endeabsorpsjon

Elementæranalyse:

Beregnet for $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_6 \cdot 5\text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:

C 32,73%, H 7,11%, N 11,23%, Cl 28,52%

Funnet: C 32,51%, H 7,25%, N 11,10%, Cl 28,52%

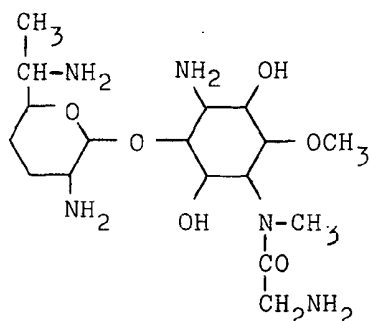
Molekylvekt: 623,8

Spesifikk dreining: $[\alpha]_D^{25} + 77,5^\circ$ ($c=0,1$, H_2O)

Spesifikk aktivitet: 645 enheter/mg.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte til fremstilling av et antibiotikum betegnet fortimicin A med formelen:

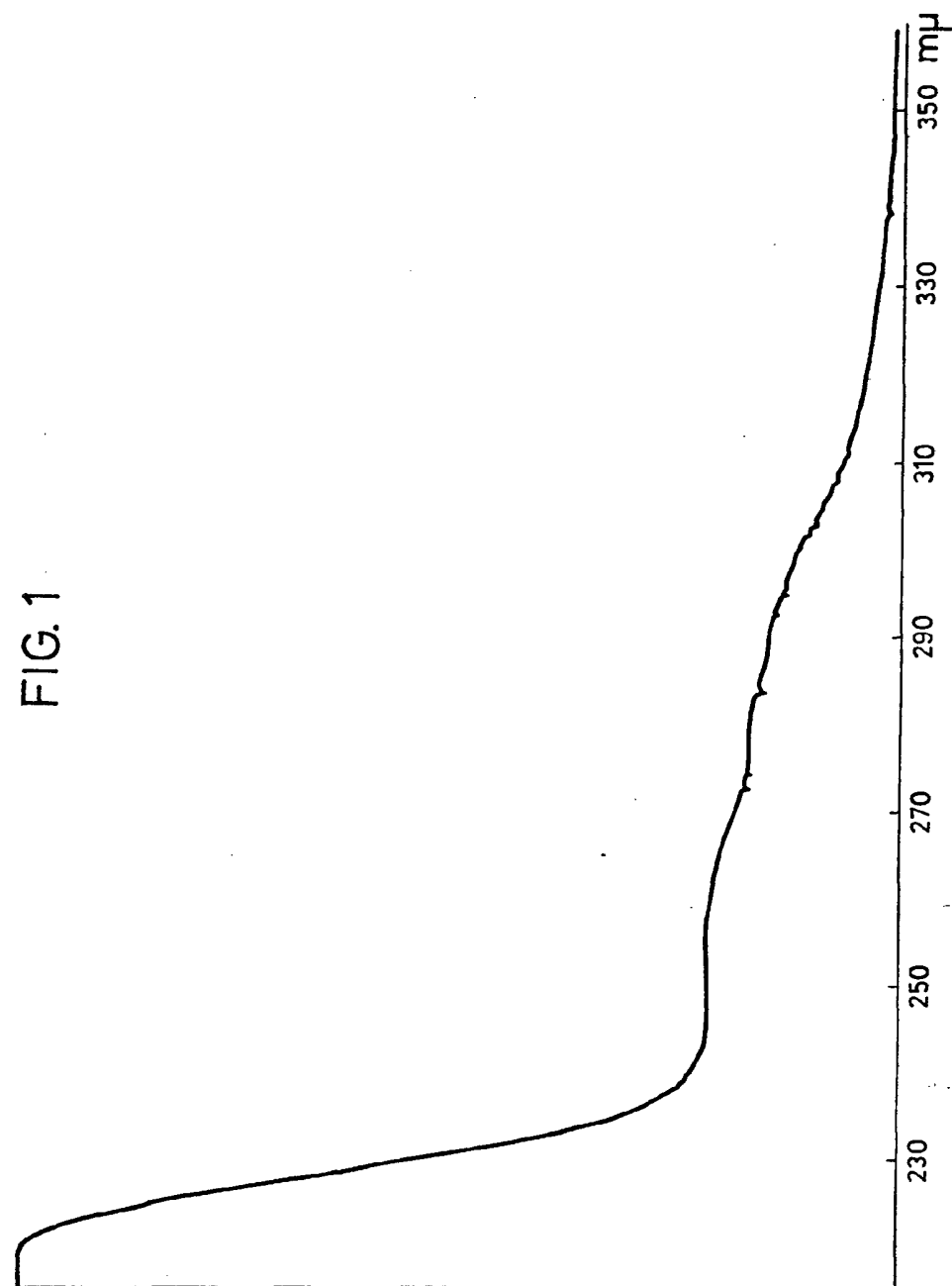


eller syreaddisjonssalter derav, k a r a k t e r i s e r t
v e d at en mikroorganisme tilhørende arten *Micromonospora*
olivoasterospora dyrkes i et næringsmedium, og at fortimicin A
isoleres fra dyrkningsmediet, og, om ønsket, omdannes til et
syreaddisjonssalt derav.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d at mikroorganismen velges blant *Micromonospora*
olivoasterospora ATCC 21819, *Micromonospora olivoasterospora*
ATCC 31009 og *Micromonospora olivoasterospora* ATCC 31010.

142264

FIG. 1



142264

