



(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 147053 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 2709/80

(51) Int.Cl.³: C 12 P 19/48

(22) Indleveringsdag: 24 jun 1980

(41) Alm. tilgængelig: 25 dec 1981

(44) Fremlagt: 26 mar 1984

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: -

(71) Ansøger: *CHINOIN GYOGYSZER ES VEGYESZETI TERMEKEK GYARA R.T.; Budapest, HU.

(72) Opfinder: Miklos *Jarai; HU, Sandor *Plukovich; HU, Sandor *Istvan; HU, Istvan *Gado; HU, Valeria

*Szell; HU, Istvan *Barta; HU.

(74) Fuldmægtig: Ingenlørfirmaet Budde, Schou & Co

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af antibiotiket sisomicin eller farmaceutisk acceptable salte deraf ved aerob fermentering

(57) Sammendrag:

2709-80

Antibiotiket sisomicin og farmaceutisk acceptable salte deraf fremstilles ved aerob fermentering på et næringsmedium indeholdende assimilerbare carbon- og nitrogenkilder samt mineralsalte.

Som mikroorganisme ved fermentering anvendes en hidtil ukendt *Micromonospora danubiensis*-stamme, *især* *Micromonospora danubiensis* MNG-00171.

Der opnås med denne mikroorganisme større udbytter af sisomicin end ved fermentering med kendte, sisomicinproducerende mikroorganismer.

0

Den foreliggende opfindelse angår en hidtil ukendt fremgangsmåde til fremstilling af antibiotiket sisomicin eller de farmaceutisk acceptable salte deraf ad mikrobiel vej, nemlig ved aerob fermentering.

5

Sisomicin (O-2,6-diamino-2,3,4,6-tetradesoxy-D-gly-cero-hex-4-enpyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O-[(3-desoxy-4-C-methyl-3-methylamino)- β -L-arabopyranosyl-(1,6)]-2-desoxy-D-streptamin er et antibiotikum med et bredt spektrum.

10

Til fremstillingen af sisomicin kendes flere mikrobiologiske metoder således fra US-patentskrift nr. 3.832.286 og 3.907.771. Ifølge disse patentskrifter producerer mikroorganismen *Micromonospora inyoensis* (NRRL 3292) det som hovedkomponent.

15

Stammen *Micromonospora grisea* (NRRL 3800) producerer desuden verdamicin (US-patentskrift nr. 3.951.746), *Micromonospora zionensis* (NRRL 5466) desuden antibiotiket G-52 (US-patentskrift nr. 3.956.068), og *Micromonospora purpurea* var. *nigrescens* (MNG 00122) desuden et gentamycinkompleks (HU-patentskrift nr. 168.778).

20

Under undersøgelsen af jordprøver fra Donaus mudder blev der isoleret en hidtil ukendt mikroorganisme, som producerede sisomicin. Denne hidtil ukendte mikroorganisme blev kaldt JMS-1. Stammen, som viste sig at være forskellig fra alle hidtil kendte mikroorganismer, blev benævnt som *Micromonospora danubiensis species nova*. Ud fra denne mikroorganisme fremkom ved forskellige behandlinger til forfinelse af stammen den stamme, som betegnes JMS-3. Under fermenteringen af denne stamme, som blev deponeret ved den nationale mikroorganismesamling i Budapest den 19. juni 1978, fremkom der et fermenteringsmedium med en meget høj sisomicinkoncentration.

30

35

Den foreliggende opfindelse angår en hidtil ukendt fremgangsmåde til fremstilling af antibiotiket sisomicin og de farmaceutisk acceptable salte deraf, hvor en stamme af slægten *Micromonospora* dyrkes under aerobe betingelser i et næringsmedium indeholdende assimilerbare carbon- og nitrogen-

0 kilder og yderligere mineralsalte, og den opnåede sisomicin-
base om ønsket omdannes til et salt, og den her omhandlede
fremgangsmåde er ejendommelig ved, at der som mikroorganisme
anvendes en stamme af *Micromonospora danubiensis*, især MNG-
5 -00171.

Den mikroorganisme, som anvendes ved fremgangsmåden
ifølge opfindelsen, har de nedenfor anførte, mikroskopiske,
makroskopiske og biokemiske egenskaber.

10 Morphologi

Makroskopiske iagttagelser: en 10 dage gammel kultur
inkuberet ved 37°C på Czapek's agar viser en rimelig til mo-
derat vækst, intet luftmycelium, kolonierne er brudt frem
med en regelmæssig rund form, og de er farvet lyst rødtligt-brunt.
15 Endvidere kan der på kolonierne ikke iagttages nogen sekre-
tion af opløselige pigmenter.

Mikroskopiske iagttagelser: Lange, forgrenede
filamenter uden skillevæg, filamentets diameter 0,5 µm,
sporene bæres ved hjælp af simple sporofoner med en diame-
20 ter på 1-1,5 µm. Sporene er ægformede til kugleformede af
form.

Biokemiske og fysiologiske egenskaber: Stammen
Micromonospora danubiensis MNG-00171 vokser rimeligt godt
ved temperaturer mellem 28°C og 37°C, men der iagttages
25 ingen vækst ved temperaturer på 44°C og derover.

Udnyttelse af carbonkilder er blevet studeret på
følgende næringsmedium: Gærekstrakt 0,5%, carbonkilde 1,0%,
CaCO₃ 0,1%, agar 1,5% i destilleret vand. Resultaterne er
vist i tabel I.

0

Tabel I

5	Carbonkilde	Micromonospora danubiensis
		MNG 00171
	Melibiose	svag (-)
	Arabinose	svag (-)
	Ribose	moderat (+)
10	Xylose	svag (-)
	Rhamnose	svag (-)
	Fructose	rimelig (+++)
	Galactose	moderat (+)
	Glucose	rimelig (+++)
15	Lactose	svag (-)
	Saccharose	rimelig (+++)
	Raffinose	svag (-)
	Dulcitol	svag (-)
	Mannitol	rimelig (+++)
20	Inositol	svag (-)
	Stivelse	rimelig (+++)

25 Udnyttelsen af nitrogenkilder er blevet studeret
 på følgende næringsmedium: glucose 1%, agar 1,5% i destil-
 leret vand. Resultaterne er vist i tabel II.

0

Tabel II

Nitrogenudnyttelse

5	Nitrogenkilde	Micromonospora danubienensis
		MNG 00171
	0,5% Gærekstrakt	rimelig (+++)
	1% N-Z-amin, type A	rimelig (+++)
	1% Asparagin	moderat-svag (+)
10	1% Glutaminsyre	svag (-)
	1% KNO ₃	svag (-)

15 En voksende koloni af *Micromonospora danubienensis* vil hydrolysere gelatine, mælk og stivelse og reducere nitrat til nitrit. Mikroorganismen tåler maksimalt 2% natriumchlorid i et vækstmedium.

Dyrkningskarakteristika

20 I tabel III er der vist dyrkningskarakteristika for *Micromonospora danubienensis* JMS-3. Ved beskrivelsen af farvedannelserne er der til disse iagttagelser anvendt følgende reference: Baumenns Farbtonkarte Atla II., Paul Baumann, Aue I-SA 87350 LAu 302, Forbundsrepublikken

25 Tyskland.

Tabel III

Dyrkningskarakteristika

5	<u>Medium</u>	Micromonospora danubienensis
		<u>MNG 00171</u>
	Bennett agar	svag vækst, levende orange farve Oc 97-98
	Czapek's agar	rimelig vækst, rødlig-brun farve O 142-145
10	Emerson's agar	ingen vækst
	Glucose-asparagin-agar	ingen vækst
	Glucose-gærekstrakt-agar	rimelig vækst, levende orange farve Oc 99
15	Næringsagar	rimelig vækst, vinrød, visse steder gul-brun farve, hhv. Ro 193 og Or 165-166
	Pepton-jern-agar	ingen vækst, eller kun spor, små kolonier, blegorange farve, Oc 97 og CO 69, intet diffunderbart pigment
20	Tyrosinagar	vækst i spor, farve kan ikke bestemmes, intet diffunderbart pigment
25	Kartoffelprop uden CaCO_3	ingen vækst
	Kartoffelprop med CaCO_3	moderat vækst, rødligbrun farve, O 136 og O 145-147

0 Micromonospora danubiensis er med hensyn til sine egenska-
ber til udnyttelse af carbonkilder forskellig fra andre Mi-
cromonosporaarter. Således er den arabinosenegativ og manni-
tolpositiv, medens Micromonospora purpurea er arabinosepo-
5 sitiv og mannitolnegativ. Det samme gælder for Micromono-
spora echinospora, som tillige afviger ved at være rhamnose-
positiv. Endvidere er afvigelser fra Micromonospora chalcea
for fire carbonkilder (raffinose, mannitol, melibiose, ara-
binose), fra Micromonospora carbonacea (arabinose, melibio-
10 se), fra Micromonospora coerulea (melibiose, raffinose) og
fra Micromonospora purpureochromogenes (melibiose, mannitol,
raffinose).

Endvidere er NaCl-toleranceintervallet for Micromono-
spora danubiensis ikke så stort som for arterne Micromonospo-
15 ra narashinoensis, megalomica, chalcea og halophytica.

Også i forhold til andre sisomicinproducerende ar-
ter er der forskelle. Dette gælder således Micromonospora
resea for raffinose og mannitol, og forskellene i forhold til
andre arter fremgår af nedenstående tabel.

20

Tabel IV

Carbonkilde	Micromonospora			
	danubiensis	inyoensis	grisea	zionensis
Arabinose	-	-	+++	+++
25 Xylose	-	+	+++	+++
Fructose	+++	-	+++	+
Galactose	+	+(?)	+++	+++
Lactose	-	+	-	+
Mannitol	+++	-	-	-

30

Disse data viser klart, at Micromonospora danubiensis
afviger fra andre sisomicinproducerende micromonosporaarter.
Faktisk må man sige, at Micromonospora danubiensis er den mest
"individuelle" eller mest "specielle" blandt disse arter. Dette
35 understøttes af de efterfølgende egenskaber ved dyrkning på
forskellige medier.

0

Tabel V

	Kultur- medium	Micromonospora			
		danubiensis	inyoensis	grisea	zionensis
5	Bennett's agar	Dårlig vækst, lyse orange- farvede kolo- nier, Oc 97-99	Rimelig vækst, kolonierne bliver mørke- re, er in- tenst brune	Kraftig vækst, gråliggrønne kolonier	Kraftig vækst, sorte kolo- nier
10	Czapek's agar	Rimelig vækst rødligbrune kolonier, Oc 142-145	Dårlig vækst	Dårlig vækst	Næppe nogen vækst
	Emerson's agar	Ingen vækst	Dårlig vækst, røde kolonier	Dårlig vækst, gulligbrune kolonier	Dårlig vækst, sorte kolonier
15	Glucose- -asparagin- -agar	Ingen vækst	Næppe nogen vækst	Meget dårlig vækst	Meget dårlig vækst
	Glucose-gær- ekstrakt- -agar	Rimelig vækst, orange koloni- er, Oc 99	God vækst, gråliggrøde kolonier	God vækst, gulligbrune kolonier	God vækst, grålige, rød- ligbrune ko- lonier
20	Næringsagar	Rimelig vækst, purpurfarvede kolonier, Ro 193, Oc 114	-	Næppe nogen vækst	Næppe nogen vækst
	Jern-pep- ton-agar	Vækst i spor, blegorange Co 69	Dårlig vækst	Dårlig vækst	Dårlig vækst
25	Tyrosinagar	Vækst i spor	Meget dårlig vækst	Meget dårlig vækst	Meget dårlig vækst
	Kartoffel- prop uden CaCO ₃	Ingen vækst	Kun vækst i spor	Kun vækst i spor	Kun vækst i spor
30	Kartoffel- prop med CaCO ₃	Rødligbrune, ik- ke særlig velud- viklede koloni- er, O 136, O 145	Kraftig vækst	-	Kraftig vækst

0

Baseret på ovenstående resultater blev det fastslået, at den Micromonosporastamme, som betegnes JMS-3, afviger fra de fra litteraturen kendte Micromonosporaarter. Når de opførte taksonomiske kendetegn sammenlignes med

5

Luedemann's Micromonosporasystem, er stammen JMS-3 kvalificeret som en ny art, som efter dens isoleringssted blev betegnet *Micromonospora danubiensis species nova*.

10

Ved en fordelagtig udførelsesform dyrkes *Micromonospora danubiensis*-stammen i dybkultur under aerobe betingelser.

15

I næringsmediet til produktionen af sisomicin kan der være adskillige carbon- og nitrogenkilder, som kan assimileres af mikroorganismen *Micromonospora danubiensis*, uorganiske salte, sporgrundstoffer og antiskummidler til stede. Som carbon-, nitrogen- og energikilder kan der f.eks. anvendes stivelse, opløselig stivelse, dextrin, glucose, saccharose, majsmeal, soyamel, hydrolysat af soyamel, hydrolysat af casein, majsstøbevæske og gærekstrakt.

20

Som uorganiske salte kan der anvendes adskillige ammonium-, jern-, zink-, mangan-, magnesium-, natrium-, kalium- og cobaltsalte. Til forøgelse af næringsmediets pufferkapacitet anvendes der med fordel calciumcarbonat, og som antiskummidler anvendes der forskellige vegetabilske olier, f.eks. palmeolie, solsikkeolie og soyaolie.

25

Anvendelsen af forskellige næringsmediumkomponenter tillader frembringelsen af forskellige næringsmedier. Næringsbehovet for produktionen af inokulet afviger fra behovet til hovedfermenteringen. Til produktionen af sisomicin har et af de fordelagtigste næringsmedier vist sig at være et næringsmedium, som indeholder soyamel, majsstøbevæske, majsmeal, stivelse, saccharose, calciumcarbonat, cobaltchlorid og palmeolie.

30

35

Fermenteringstemperaturen kan variere mellem 25°C og 37°C. Fermenteringen er fordelagtigst ved en temperatur på 28-33°C.

0

Omrøringshastigheden varierer i afhængighed af fermenteringsbeholderens geometri mellem 100 og 600 omdrejninger pr. minut. En fordelagtig gennemluftning er ca. 1/1 volumen/volumen pr. minut.

5

Aktiviteten af de antibiotika, som produceres i løbet af fermenteringen (sisomicin og "mindre" komponenter), bestemmes ved hjælp af forsøgsorganismen *Staphylococcus epidermidis* ved agar-diffusionsmetoden i forhold til et standardsisomicinprodukt.

10

Under en fermentering på 96-120 timer når summen af aktivitet i fermenteringsvæsken en værdi på 400-450 U/ml (1 U = 1 µg sisomicinbaseaktivitet). Sisomicinaktiviteten beløber sig til ca. 85% af den totale antibiotiske aktivitet i fermenteringsvæsken.

15

Isoleringen af sisomicin kan gennemføres på kendt måde. Om ønsket kan den opnåede sisomicinbase omdannes til et farmaceutisk acceptabelt salt.

20

Den mængde sisomicin, som produceres af mikroorganismen *Micromonospora danubienensis*, er flere gange den mængde, som produceres ved kendte metoder. I laboratoriebetingelser overstiger den 450 U/ml, og i fermenteringsbeholderen i pilotanlægget er den 350-400 U/ml. Fermenteringsvæsken indeholder foruden sisomicin kun 10-15% ledsagende antibiotika.

25

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres ved hjælp af de efterfølgende eksempler.

Eksempel 1

30

100 ml af et sterilt næringsmedium med nedenstående sammensætning i en 500 ml Erlenmeyerkolbe inokuleres under sterile betingelser med 1 ml af et mycelium (vegetative kim 10^7 - 10^8 /ml) af en underkølet stamme af *Micromonospora danubienensis* JMS-3 (MNG 00171):

35

0	Stivelse	25,0 g
	Majsstøbevæske	7,0 g
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,5 g
	NaCl	5,0 g
5	CaCO_3	8,0 g
	Ledningsvand	1000 ml

pH-værdien af næringsmediet indstilles på 7,5 før sterilisering, og pH-værdien vil således efter sterilisering være 7,0-7,2.

Kulturen inkuberes i 3 dage ved 28°C på en frem- og tilbagegående rystemaskine (220 omdr. pr. minut, afvigelse 7,5 cm). Med den således opnåede kultur inokuleres 6 liter af et sterilt næringsmedium (i en fermenteringsbeholder af glas for 10 liter) under sterile betingelser. Sammensætningen af næringsmediet er den samme som for det ovenfor anførte næringsmedium til inokulet.

Dyrkningen i glasfermenteringsbeholderen gennemføres ved 28°C, en roterende omrøring på 400 omdr. pr. minut og en gennemluftning på 1/l volumen/volumen pr. minut. Som antiskummiddel anvendes efter behov palmeolie. Det i løbet af 40 timer udviklede inokulum anvendes til inokuleringen af fermenteringsnæringsmediet. Mængden af inokulum er 600 ml, mængden af næringsmedium 6 liter, pH-værdien er 7,0-7,2, og fermenteringsbeholderens volumen er 10 liter. Sammensætningen af næringsmediet er følgende:

	Soyamel	50,0 g
	Majsstivelse	10,0 g
30	Saccharose	30,0 g
	CaCO_3	5,0 g
	Majsstøbevæske	5,0 g
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4,5 mg
	Ledningsvand	1000 ml

35

0

Dyrkningen gennemføres ved 31°C, roterende omrøring på 400 omdr. pr. minut, gennemluftning 6 liter pr. minut. Som antiskummiddel anvendes palmeolie.

5

Produktionen af antibiotika starter efter 28-34 timers fermentering, og den højeste værdi opnås efter 110 timers fermentering.

10

På dette tidspunkt bestemmes det totale indhold af antibiotika i fermenteringsvæsken til at være 400 U/ml sammenlignet med et standardsisomicin under anvendelse af forsøgsorganismen *Staphylococcus epidermidis* og agar-diffusionsmetoden (J.S. Simpson: Analytical Microbiology, Acad. Press, New York, side 87-124, 1963).

Eksempel 2

15

Følgende næringsmedium inokuleres med den vegetative kultur, som er produceret af stammen *Micromonospora danubiensis* JMS-3 (MNG 00171) på en frem- og tilbagegående rystemaskine ifølge eksempel 1:

20

Soyamel	10,0 g
Stivelse	10,0 g
Saccharose	10,0 g
CaCO ₃	4,0 g
Iedningsvand	1000 ml

25

pH-værdien af næringsmediet er efter sterilisation 7,0-7,2, mængden af medium er 6 liter (i en 10 liters fermenteringsbeholder af glas). Dyrkningen gennemføres ved 31°C, roterende omrøring 400 omdr. pr. minut og gennemluftning 6 liter/minut. Som antiskummiddel anvendes efter behov palmeolie.

30

600 ml af det i løbet af 36 timer udviklede inokulum anvendes til inokulering af fermenteringsnæringsmediet med følgende sammensætning:

0	Soyamel	30,0 g
	Majsmel	25,0 g
	CaCO ₃	5,0 g
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	10,0 mg
5	Ledningsvand	1000 ml

pH-værdien af næringsmediet er efter sterilisation 7,0-7,2. Dyrkningstemperaturen er 33°C, den roterende omrøring 600 omdr. pr. minut og gennemluftningen 6 liter/minut. Som antiskummiddel anvendes palmeolie.

10 Produktionen af antibiotika starter efter mellem 26 og 30 timers fermentering, og den højeste værdi opnås efter 100 timers fermentering. På dette tidspunkt er det totale antibiotikumindhold i fermenteringsvæsken 420 U/ml i forhold til en standardsisomicinprøve.

15

Eksempel 3

Følgende næringsmedium inokuleres med den vegetative kultur, som er produceret af stammen *Micromonospora danubiensis* JMS-3 (MNG 00171) på en frem- og tilbagegående rystemaskine ifølge den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde:

20	Stivelse	25,0 g
	Soyamelhydrolysat	15,0 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g
25	NaCl	3,0 g
	ZnSO ₄	0,5 g
	CaCO ₃	8,0 g
	Ledningsvand	1000 ml

30 pH-værdien af næringsmediet er efter sterilisation 7,0-7,2, mængden af medium er 6 liter (i en fermenteringsbeholder af glas på 10 liter). Hydrolysen af soyamelet gennemføres med en NOVO-bakteriel protease ved 60°C i 30 minutter ved en pH-værdi på 7,5.

35 Efter inokulering gennemføres dyrkningen ved 28°C, roterende omrøring 400 omdr. pr. minut, gennemluftning 6 liter/minut. Som antiskummiddel anvendes palmeolie.

0

600 ml af det inokulum, som udvikles i løbet af 40 timer, anvendes til inokulering af følgende fermenteringsnæringsmedium:

	Soyamelhydrolysat	50,0 g
5	Stivelse	10,0 g
	Dextrin	25,0 g
	CaCO ₃	5,0 g
	Saccharose	10,0 g
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	4,5 g
10	Ledningsvand	1000 ml

pH-værdien af næringsmediet er efter sterilisation 7,0-7,2, mængden af medium er 6 liter (i en fermenteringsbeholder af glas på 10 liter). Hydrolysen af soyamelet gennemføres med en NOVO-bakteriel protease ved 60°C i 30 minutter ved en pH-værdi på 7,5.

Efter inokuleringen blev dyrkningen gennemført ved 31°C, roterende omrøring 600 omdr. pr. minut, gennemluftning 6 liter/min. Som antiskummiddel anvendes palmeolie.

Produktionen af antibiotika starter efter mellem 26 og 30 timers fermentering, og den højeste værdi opnås efter 100 timers fermentering. På dette tidspunkt er det totale antibiotikaindhold i fermenteringsvæsken 430 U/ml i forhold til en standardsisomicinprøve.

25 Eksempel 4

Nedenstående næringsmedium i en mængde på 200 liter (volumen af forfermenteringsbeholderen bygget af rustfrit stål er 300 liter) inokuleres med den vegetative kultur, som er produceret af stammen *Micromonospora danubiensis* JMS-3 (MNG 00171) i en glasfermenteringsbeholder ifølge eksempel 2:

30

0

Soyamel	10,0 g
Stivelse	10,0 g
Saccharose	10,0 g
CaCO ₃	4,0 g

5 Ledningsvand 1000 ml

pH-værdien af næringsmediet er efter sterilisation 7,0-7,2. Som antiskummiddel anvendes palmeolie.

Dyrkningen gennemføres ved 31°C, roterende omrøring 180 omdrejninger pr. minut, gennemluftning 200 liter/min.

10

Det inokulum, som udvikles i løbet af 36 timer, anvendes til inokulering af fermenteringsnæringsmediet med følgende sammensætning (mediets volumen er 2000 liter):

Soyamel	30,0 g
---------	--------

Majsmel	25,0 g
---------	--------

15 CaCO₃ 5,0 g

CoCl ₂ ·6H ₂ O	10,0 mg
--------------------------------------	---------

Ledningsvand	1000 ml
--------------	---------

pH-værdien af næringsmediet er efter sterilisation 7,0-7,2. Dyrkningstemperaturen er 33°C, roterende omrøring

20

220 omdr. pr. minut, gennemluftning 2 m³/min., som antiskummiddel anvendes en blanding af soyaolie og palmeolie (50%-50%).

Produktionen af antibiotika starter efter mellem 26 og 30 timers fermentering, og den højeste værdi opnås

25

efter 100 timers fermentering. På dette tidspunkt er det totale indhold af antibiotika i fermenteringsvæsken 300 U/ml i forhold til en standardsisomicinprøve.

Efter fermenteringens afslutning går der frem på kendt måde og opnås 288 g rent sisomicin, som også indeholder bundet vand.

30

0

Produktets egenskaber:

Smeltepunkt: 198-201°C.

$[\alpha]_D = +188^\circ$ (c = 0,3, vand).

Elementæranalyse:

5 Beregnet på monohydrat: C = 49,80%, H = 8,2%, N = 14,95%.

Fundet: C = 49,15%, H = 8,37%, N = 15,15%.

IR-spektrum (KBr): ν OH, NH 3170-3360, ν CH=COC 1690,

ν COC 1060 cm^{-1} .

10 PMR-spektrum (D_2O): δ 1,20 (Me-4", s, 3H), δ 2,50 (Me-N-3", s, 3H),
 δ 2,56 (H-3", d, $J_{2"3"} = 10$ Hz, 1H) δ 3,17
 (H-6', bs, 2H), δ 3,30 ($\text{H}_{\text{ax}}-5"$, d, $J_{\text{gem}} =$
 = 12 Hz, 1H), δ 3,80 (H-2", dd, $J_{2"3"} =$
 = 10 Hz, $J_{1"2"} = 4$ Hz, 1H), δ 4,04
 ($\text{H}_{\text{e}}-5"$, d, $J_{\text{gem}} = 12$ Hz, 1H), δ 4,88 (H-4',
 15 bt, 1H), δ 5,09 (H-1", d, $J_{1"2"} = 4$ Hz,
 1H), δ 5,35 (H-1', d, $J_{1',2'} = 2$ Hz, 1H) ppm.

Massetal af de karakteristiske ioner (m/e): 447,
 332, 304, 160, 145, 127, 118, 110, 100.

20 Fremstilling af sisomicin-sulfat

15 g ren sisomicin-base opløses i 60 ml ionfrit vand,
 og til den fremkomne opløsning sættes der dråbevist så meget
 af en 5 N svovlsyreopløsning, at pH-værdien er 4,3. Derefter
 sættes der til opløsningen 1,5 g aktivt kul, og blandingen
 25 omrøres i 30 minutter og filtreres dernæst på et Seitz-filter.
 Filteret vaskes med 3 x 50 ml ionfrit vand, og det forenede
 filtrat sættes under kontinuerlig omrøring til 1 liter metha-
 nol. Opløsningen indeholdende udskilt bundfald får lov at
 henstå i et køleskab, hvorefter bundfaldet frafiltreres. Det
 30 frafiltrerede sisomicin-sulfat vaskes med 3 x 50 ml methanol
 og tørres i vakuum ved 50°C over P_2O_5 til konstant vægt.
 På denne måde fås 22 g sisomicin-sulfat.

0

P A T E N T K R A V.

1. Fremgangsmåde til fremstilling af antibiotiket
sisomicin eller de farmaceutisk acceptable salte deraf, hvor
en stamme af slægten Micromonospora dyrkes i et nærings-
5 medium indeholdende assimilerbare carbon- og nitrogen-
kilder og yderligere mineralsalte, og den opnåede
sisomicinbase om ønsket omdannes til et salt, k e n d e -
t e g n e t ved, at der som mikroorganisme anvendes
en stamme af Micromonospora danubiensis, især MNG-00171.
- 10 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -
n e t ved, at der anvendes et næringsmedium indeholdende
soyamel, majsstøbevæske, majsmel, stivelse, saccharose,
calciumcarbonat, cobaltchlorid og palmeolie.

Fremdragne publikationer:

DK patenter nr. 126510, 130847, 131791.