

**NORGE**



**STYRET  
FOR DET INDUSTRIELLE  
RETTSVERN**

**Utlegningskrift nr. 118905**

int. Cl. C 12 d 9/04 Kl. 6b-16/03

Patentsøknad nr. 144.784 Inngitt 19.VI 1962

Løpedag -

Søknaden alment tilgjengelig fra 1.VII 1963

Søknaden utlagt og utlegningskrift utgitt 2.III 1970

Prioritet begjært fra: 23.VI-61 Storbritannia,  
nr. 22.884/61

---

LÖVENS KEMISKE FABRIK  
ved A. Kongsted,  
Ballerup, Sverige.

Oppfinnere: Wagn Ole Godtfredsen, Bellahøj 19A, København,  
Henning Otto Bojsen Lorck, Bratskovvej 5, Vanløse,  
København og Sverre Jahnsen, Lilletofte 16,  
Skovlunde, Danmark.

Fullmektig: Dr. ing. K. O. Berg.

Fremgangsmåte for fremstilling av fusidinsyre eller salter av  
denne.

Nærværende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling  
av den antibiotiske aktive forbindelse fusidinsyre eller den-  
nes salter.

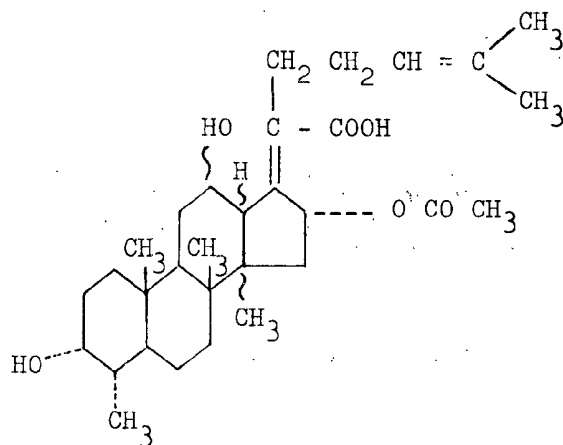
Mer spesielt vedrører oppfinnelsen en fremgangsmåte som består  
i fermentering under kontrollerte betingelser av en sopp hørende  
til slekten *Cephalosporium* inntil en vesentlig mengde fusidin-  
syre er blitt fremstilt av soppen og utvinning av det slik opp-  
nådde stoff.

Ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan fusidinsyre eller  
dens salter oppnås i form av fortynnede oppløsninger eller rå

konsentrater, såvel som i ren krystallinsk form, og for så vidt den fri fusidinsyre angår, kan den oppnås i form av et av dens krystallinske solvater med oppløsningsmidler.

Fusidinsyre er et stoff som er omtalt i norsk patent nr. 106 223 som angår en fremgangsmåte til fremstilling av fusidinsyre ved fermentering av soppen *Fusidium coccineum* Fuck K. Tubaki i et egnet dyrkningsmedium.

Nevnte forbindelse er en  $\alpha, \beta$ -umettet karboksylsyre med elementærformelen  $C_{31}H_{48}O_6$  hvis molekylstruktur antas å være:



Det fremgår av foranstående formel, i hvilken de bølgede forbindelseslinjer angir at konfigureringen er noe uviss, at fusidinsyre er et cyclopentenopolyhydrophenanthrenderivat.

Antibiotika med steroidstruktur er kjente. F.eks. har E.P. Abraham (i *Biochemistry of Some Peptide and Steroid Antibiotics*, Chapman & Hall, London, side 33) beskrevet at visse organismer av slekten *Cephalosporium* er i stand til å produsere steroidantibiotika, slik som Cephalosporin  $P_1$ , men hverken dette eller andre antibiotika med kjent eller formodet steroidstruktur har hittil oppfylt de krav som må stilles til et moderne klinisk anvendelig antibiotikum. Det ved metoden i henhold til oppfinnelsen frembrakte stoff, fusidinsyre, har i motsetning hertil vist seg å være i besittelse av meget fordelaktige egenskaper for så vidt angår en slik klinisk anvendelse.

Fusidinsyre er for øvrig karakterisert ved å være en fargeløs krystallinsk forbindelse som er svakt oppløselig i vann og heksan og oppløselig i organiske oppløsningsmidler som f.eks. etanol, aceton, metyl-isobutylketon, amylacetat eller kloroform. Den har et smeltepunkt på 192 - 193°C og en spesifikk dreining  $[\alpha]_D^{22}$  på minus 9° i en 1% oppløsning av stoffet i kloroform. Ved 220 m $\mu$  viser den en molar ekstinksjonskoeffisient på 8000 i etanol og har ingen karakteristiske absorpsjonsbånd over denne bølgelengde. Den er ytterligere karakterisert ved sitt spektrum i det infrarøde område som vist i figur 1, fra hvilken det fremgår at den oppviser karakteristiske absorpsjonsbånd ved følgende frekvenser uttrykt i resiproke centimeter: 1265, 1385, 1695, 1730 og 3450.

Ved papirkromatografi, under bruk av systemene beskrevet av Bush (Biochemical Journal 50, 370 (1952) tilsvarer bevegelsene av fusidinsyre til  $R_f$ -verdiene 0.38 og 0.73 i B(1)- henholdsvis B(5)-systemet.

Syren som har en pK-verdi på ca. 5.35 har evne til å danne en rekke salter med uorganiske og organiske baser, av hvilke noen er oppløselige i vann, som f.eks. natrium, kalium og dietanolamin-salt, mens f.eks. calciumsaltet er lite oppløselig i vann.

Fusidinsyre adskiller seg således også fra de kjente steroid-antibiotika ved sine fysiske og kjemiske data.

Fortrinnsvis anvendes natriumsaltet ved klinisk terapi, og det administreres oralt ved behandlingen av infeksjonssykdommer, særlig ved slike som forårsakes av Staphylococci, Neisseria og Corynebacteria mot hvilke fusidinsyre har vist seg å være effektiv, slik som det fremgår av tabellen nedenfor, i hvilken de mere spesifikke antifungale og antibakteriale aktiviteter av fusidinsyre er gjengitt. I nevnte tabell angir første kolonne organismene, annen kolonne det anvendte substrat, og de gjenværende kolonner angir aktiviteten uttrykt i mengden natriumsalt av fusidinsyre i mg pr. liter som forårsaker en

118905

4

50% hemning av vedkommende organisme etter den angitte tid (i timer).

Tabell 1.

| <u>Organisme</u>                                         | <u>Substrat</u>           | <u>Tid</u> | <u>Aktivitet</u> |
|----------------------------------------------------------|---------------------------|------------|------------------|
| Staphylococcus aureus, penicillin-følsom                 | Buljong                   | 24         | 0,063            |
| Staphylococcus aureus, penicillinase-produserende stamme | "                         | "          | 0,050            |
| Neisseria gonorrhoeae                                    | Blodascites-agar          | "          | 0,32             |
| Neisseria meningitides                                   | "                         | "          | 0,32             |
| Streptococcus pyogenes                                   | Buljong med 5% serum      | "          | 3,2              |
| Streptococcus faecalis                                   | "                         | "          | 5,0              |
| Pseudomonas aeruginosa,                                  |                           |            |                  |
| Vibrio comma,                                            |                           |            |                  |
| Escherichia coli,                                        |                           |            |                  |
| Klebsiella pneumoniae,                                   |                           |            |                  |
| Serratia marcescens, og                                  |                           |            |                  |
| Proteus Vulgaris                                         | Buljong                   | 24         | >30,0            |
| Salmonella typhimurium                                   | "                         | "          | >100,0           |
| Candida albicans                                         | Saborauds'                | "          | 100,0            |
| Tricophyton mentagrophytes                               | "                         | 72         | 100,0            |
| Aspergillus niger                                        | "                         | "          | 100,0            |
| Bacillus subtilis                                        | Buljong                   | 24         | 1,6              |
| Mycobacterium tuberculosis var. hum.                     | Dubos'                    | 144        | 0,79             |
| Clostridium tetani                                       | Thioglycolat-medium       | 48         | 0,02             |
| Corynebacterium pyogenes                                 | Kjøttetrakt med 10% serum | 24         | 0,05             |

Det er nu overraskende blitt funnet at sopper av slekten Cephalosporium som hører til familien Mucedinaceae

(Moniliaceae) av ordenen Hyphomycetales (Moniliales) når de dyrkes neddykket i et egnet kulturmedium under luftning, har evnen til å produsere en antibiotisk aktiv forbindelse, som i sammenligning med fusidinsyre viser egenskaper som angir at vedkommende forbindelse er identisk med nevnte syre.

Organismer av slekten *Cephalosporium* er systematisk beskrevet i L. Rabenhorst, Kryptogamenflora von den Deutschland, Österreich und der Schweiz, bind 9, (sidene 5 -8, 90 og 103 - 109).

Microorganismene nevnt under, som alle hører til slekten *Cephalosporium*, danner fusidinsyre når de dyrkes i tre til syv dager i nærings-substrater angitt ved romerske tall i tabellen:

Tabell II

| Sopp                                                  | Opprinnelsessted | Substrat |
|-------------------------------------------------------|------------------|----------|
| <i>Cephalosporium lamellaecola</i><br>F.E. Smith      | CBS              | I og II  |
| <i>Cephalosporium lefroyi</i> Horne                   | CBS              | I        |
| <i>Cephalosporium malorum</i> Kidd                    | CBS              | III      |
| <i>Cephalosporium recifei</i> Leao<br>et Lobo         | CBS              | I        |
| <i>Cephalosporium sclerotigenum</i><br>M et F. Moreau | CBS              | III      |
| <i>Cephalosporium stühmeri</i><br>Smidt et V Beyma    | CBS              | I        |
| <i>Cephalosporium niveolanosum</i> Benedek            | CBS              | I        |

Betegnelsen CBS i foranstående tabell refererer til opprinnelsessted, nemlig Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holland, hvor de nevnte kulturer er tilgjengelige under de angitte navn.

De angitte nærings-substrater er følgende:

## (I) Saborauds' medium:

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| Pepton                    | 10 g    |
| Glucose                   | 20 g    |
| Destillert vann           | 1 liter |
| pH för autoclavgehandling | 6,0     |

## (II) Staley's medium:

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| Glycerin                  | 7,5 g   |
| Måisstøpevæske 50%        | 2,5 g   |
| Magnesiumsulfat           | 50 mg   |
| Kaliumfosfat, primær      | 60 mg   |
| Natriumklorid             | 4 g     |
| Ferrosulfat               | 5 mg    |
| Cuprisulfat               | 4 mg    |
| Glucose                   | 10 g    |
| Ledningsvann              | 1 liter |
| pH för autoclavbehandling | 7,0     |

## (III) Medium av følgende sammensetning:

|                        |         |
|------------------------|---------|
| Glucose                | 60 g    |
| Asparagin              | 4,5 g   |
| Ammoniumsulfat         | 15,84 g |
| Primært kaliumfosfat   | 14,28 g |
| Sekundært kaliumfosfat | 33,36 g |
| Magnesiumfosfat        | 6 g     |
| Cuprisulfat            | 38,4 g  |
| Ferrosulfat            | 6,6 mg  |
| Mangansulfat           | 53,4 mg |
| Sinksulfat             | 9 mg    |
| Gjærekstrakt           | 30 g    |
| Maisstøpevæske 50%     | 120 ml  |
| Kalk                   | 30 g    |
| Destillert vann        | 6 liter |

Det har ennvidere vist seg at man ved bestråling av en sporesuspensjon av de fusidinsyreproduserende sopper med ioniserende eller ikke-ioniserende stråler kan frembringe stammer, som uaktet de ikke i morfologisk henseende er til å skjelne

fra moderstammen, dog er i stand til å produsere fusidinsyre i vesentlig større mengder enn denne.

Således er det ved bestråling av en sporesuspensjon av *Cephalosporium lamellaecola* F.E. Smith (CBS List of Cultures 1957 s. 33) med ultrafiolett lys til en overlevelsesprosent på 0,035 og etterfølgende utsåing blitt isolert en stamme som morfologisk ikke atskiller seg fra moderstammen, men som på et næringssubstrat som inneholder  $\alpha$ -aminosmørsyre eller isoleusin viste seg i stand til å danne fusidinsyre i et 3-4 ganger større utbytte enn moderstammen.

Ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen går man frem på den måte at en stamme av mikroorganismene *Cephalosporium lamellaecola*, *Ceph. lefroyi* Horne, *Ceph. malorum* Kidd, *Ceph. recifei* Leao et Lobo, *Ceph. sclerotigenum* M et F. Moreau, *Ceph. stühmeri* Smidt et V Beyma, og *Ceph. niveolanosum* Benedek dyrkes under aerobe betingelser i et vandig næringsmedium som inneholder en carbonkilde, slik som karbohydrater og lipoider, nitrogenkilder, uorganiske salter og mikronæringsstoffer, hvoretter den således fremstilte fusidinsyre, hvis ønskes konsentreres og isoleres i ren form eller omdannes til et av dens salter på i og for seg kjent måte.

Produksjonshastigheten for fusidinsyre bestemmes under fermenteringen ved rutinebedømmelse av aktiviteten av kulturfiltrater, for hvilket formål agar-plate-metodeprøven kan benyttes under anvendelse av f.eks. *Staphylococcus aureus* som prøveorganisme.

Det optimale utbytte av fusidinsyre oppnås i løpet av 80 til 130 timer, ved en temperatur fra 20 til 30°C og fortrinnsvis fra 24 til 28°C.

Det angitte temperaturområde er imidlertid ikke begrensende, da den nødvendige tid for å oppnå et gunstig utbytte i noen grad avhenger av formen på fermenteringskaret og typen av den anvendte agitator.

Skjønt mere velkjente kulturmedia har vist seg anvendelige ved fremstilling av fusidinsyre, inneholder de foretrukne media

**118905**

som nitrogenkilde en eller flere representanter av klassen bestående av maisstøpevæske, sojabönnemel, casein, eller andre melkeprodukter, og kjøtt og benmel.

Mengden av tilgjengelig nitrogen i kulturmediet kan fordelaktig ligge innen området 0,01 til 1,5% og er fortrinnsvis ca. 0,15% av kulturmediet.

Blandt de foretrukne carbohydrater kan nevnes saccharose og glucose. Videre er det fordelaktig å supplere næringsmidlet med fettarter eller fettsyrer for å danne en del av carbohydrat og energikilde, da de synes å utøve en fremmende effekt på produksjonen av fusidinsyre når de anvendes i mengder som beløper seg til ca. 0,1 - 5,0% av kulturmediet.

For forannevnte formål kan både fettsyre-glyceridene og de frie fettsyrene inneholdt i disse eller syntetiske estere av sistnevnte brukes ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Særlig har fettsyrene som inneholder 12 til 20 carbonatomer i carbonkjeden eller derivater av slike fettsyrer vist seg anvendelige som vekstfremmere.

Utvinningen av fusidinsyre fra kulturmediet kan utføres ved forskjellige metoder. Med fordel består det første trinn for utvinning av stoffet i å skille myceliumet fra kulturvæskan, f.eks. ved filtrering. Det neste trinn kan være en adsorpsjon på et fast adsorberende middel, slik som aktivt kull eller på ion-utvekslings-harpiks, fulgt av en elusjon fra nevnte middel som gir en mere konsentrert og rensset oppløsning av fusidinsyre, eller det kan være en ekstraksjon ved en egnet pH-verdi med et egnet oppløsningsmiddel, fortrinnsvis et oppløsningsmiddel ikke-blandbart med vann slik som methyllisobutylketon, amylacetat, butylacetat eller lignende, fra hvilket oppløsningsmiddel det mere rensede produkt kan isoleres ved fordampning av den organiske fase til et lite volum og bunnfelling av det antibiotiske stoff enten ved avkjøling eller ved at en for-

bindelse tilsettes som reduserer oppløseligheten av det anti-biotiske stoff.

Særlig i forbindelse med sistnevnte utførelsesform skal nevnes benzen som har evnen til å danne et lett krystalliserbart solvat av fusidinsyre.

Fra det organiske oppløsningsmiddel kan fusidinsyre også isoleres uten konsentrering av det organiske oppløsningsmiddel, da de sure egenskaper for stoffet vil tillate utførelsen av den efterfølgende ekstraksjon av den organiske fase med en vandig alkalisk oppløsning eller med en vandig suspensjon av en alkalisk forbindelse, ved hvilken konsentrerte vandige oppløsninger av salter av fusidinsyre kan oppnås. Ved surgjøring av slike oppløsninger kan syren bunnfelles, eller hvis ønsket, saltet av fusidinsyre kan isoleres fra den alkaliske oppløsning.

Med hensyn til rensningen av fusidinsyre er dens evne til å danne solvater med visse oppløsningsmidler et viktig trekk. Således f.eks. renses ved en egnet utførelsesform av oppfinnelsen den rå syre ved å oppløses i en liten mengde varm methanol, fra hvilken dens methanolsolvat krystalliserer ved avkjøling i en overraskende ren form, av hvilken grunn denne metode er særlig egnet for å oppnå en farmasøytisk akseptbar kvalitet av fusidinsyre. Nevnte methanolsolvat har et smeltepunkt på  $179 - 179,5^{\circ}\text{C}$ .

Hvis salter av fusidinsyre er ønsket, kan de fremstilles ved enkel nøytralisering av syren eller et av dens solvater ved at vedkommende baser tilsettes i nærvær av et egnet reaksjonsmedium, som letter reaksjonen, og fra hvilket saltet kan bunnfelles, eller hvis nødvendig, kan bunnfelles ved å tilsette en egnet komponent for å nedsette oppløseligheten av det ønskede salt, eller saltet kan isoleres ved fordampning av reaksjonsblandingen.

**118905**

Alternativt kan et salt av fusidinsyre fremstilt på forhånd bringes til å reagere med vedkommende base, eller det ønskede salt av fusidinsyre kan fremstilles ved en dobbelt spaltning av et salt av nevnte syre fremstilt på forhånd, og et annet salt som inneholder det ønskede metall-ion eller base.

Utstrakte kliniske forsøk som nylig er blitt utført har vist at fusidinsyre og visse av dens salter tilfredsstiller alle krav for farmasøytisk aksepterbare antibiotika og er en verdifull droge ved behandling av infeksjonssykdommer, slik som beskrevet f.eks. i "The Lancet", vol. I (1962), sider 928-937.

Oppfinnelsen skal nu nærmere beskrives i de følgende eksempler, fra hvilke detaljer for utførelse av oppfinnelsen vil fremgå.

Eksempel I:Fremstilling av fusidinsyre.

3 liter av et kulturmedium av følgende sammensetning uttrykt i gram pr. liter:

|                                           |       |
|-------------------------------------------|-------|
| Glycerin                                  | 7,5   |
| Glucose                                   | 10,0  |
| Sojabönnemel                              | 3,0   |
| Maisstöpevæske                            | 2,5   |
| NaCl                                      | 4,0   |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | 0,6   |
| $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  | 0,005 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,5   |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,004 |

som for sterilisering var justert til en pH-verdi 6,8, ble sterilisert i en dyrkningsbeholder ved 120°C i en halv time og ble efter avkjøling inoculert med sporer av stammen *Ceph-  
phalosporium lamellaecola* F.E. Smith-F.E. Smith fra Centraal-  
bureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holland, fra en skråagar,

og kulturen ble aerobisk inkubert ved 27°C i 40 timer i en resiproserende omryster. Det slik oppnådde podemateriale ble overført til et 700 liters karr som inneholder et kulturmedium av samme sammensetning som det i en kommersiell dyrkningsbeholder, og ble inkubert ved 26°C i 48 timer for å oppnå utvikling av vegetativ vekst av soppen for inoculering av hoveddyrkningsbeholderen.

Derpå ble 16000 liter av et kulturmedium av følgende sammensetning i gram pr. liter

|                                           |      |
|-------------------------------------------|------|
| Saccharose                                | 60,0 |
| Maisstöpevæske 50%                        | 20,0 |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | 10,0 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,5  |

som for sterilisering var justert til en pH-verdi på 6,8, sterilisert i hoveddyrkningsbeholderen ved 120°C i en halv time, og efter avkjøling inoculert med inoculumet nevnt foran. Under omrøring og tvangsinnføring av luft gjennom en luftfordeler med en egnet hastighet (i forholdet 0,5 liter luft til hver liter væske pr. minutt) ble mycelium dannet, og fermenteringen fortsatte ved 26°C i 100 timer.

Aktiviteten av prøver av kulturfiltratene ble bestemt ved agarskålmethode, ved hvilken *Staphylococcus aureus* var prøveorganismen. Når prosessen var avsluttet, tilsvarte den oppnådde aktivitet en konsentrasjon av fusidinsyre i kulturmediet på 80 microgram pr. liter.

Efter at myceliumet var blitt filtrert fra, ble den klarede suppe justert til en pH-verdi på 6,0 og ekstrahert i en Podbielniak ekstraktor med metylisobutylketon. Dette ekstrakt som inneholdt 1,1 kg fusidinsyre ble derefter ekstrahert med vandig natriumhydroxyd med en pH-verdi på 11,5. Umiddelbart efter ekstraheringen ble den vandige fase justert til en pH-verdi på 9,3 og fordampet i en vakuumfordamper til et volum på 150 liter som inneholder 0,9 kg fusidinsyre.

**118905**

Ved å tilsette benzen og å justere pH for den vandige fase til 0,5 ved hjelp av saltsyre under omrøring, ble det dannet et bunnfall bestående av benzensolvatet av fusidinsyre. Etter å være blitt rørt om i ytterligere fire timer, ble bunnfallet filtrert fra, vasket med vann og benzen og tørret.

Det rå produkt ble oppløst i metylenklorid, filtrert og oppløsningen ble dampet til tørrhet i vakuum. Residuet ble oppløst i varm methanol, og etter avkjøling til 0°C krystalliserte ut et methanolsolvat, som ble filtrert fra, vasket med iskold methanol og tørret, og ga et farveløst methanolsolvat av fusidinsyre.

Når nevnte solvat hadde vært tørret i vakuum ved 0,01 mm Hg og ved 100°C til konstant vekt, ble det oppløsningsmiddelfrie produkt oppnådd med smeltepunkt 191 - 192°C og med et infrarødt spektrum som viser sterke bånd ved 1265, 1385, 1695, 1730 og 3450 cm<sup>-1</sup> (KBr).

Eksempel 2:Fremstilling av natriumsaltet av fusidinsyre.

I en 1,5 m<sup>3</sup> fermenteringstank av rustfritt stål, utstyrt med en agitator ble 1,00 m<sup>3</sup> av et kulturmedium med følgende sammensetning fremstilt:

|                                  |            |
|----------------------------------|------------|
| Glucose                          | 20,0 kg    |
| Kjøtt og benmel                  | 20,0 kg    |
| Maisstøpevæske,<br>50% tørrstoff | 2,5 kg     |
| Talgolje                         | 20,0 kg    |
| NaCl                             | 4,0 kg     |
| MgSO <sub>4</sub>                | 0,05 kg    |
| Ledningsvann opp til             | 1000 liter |

Kulturmediet hadde en pH-verdi på 6,1, hvilken verdi ble

justert til 6,5 ved tilsetning av en fortynnet oppløsning av NaOH, hvorpå mediet ble sterilisert ved oppvarming. Etter avkjøling ble det inoculert med tre liter av en kultur av *Cephalosporium lamellaecola* F.E. Smith-F.E. Smith, dyrket i 48 timer i en rysteflaske ved 27°C. Innholdet av tanken ble omrørt og luftet med 0,6 m<sup>3</sup> luft pr. time ved 27°C i 96 timer. Under denne periode ble en pH-verdi på 7,0 opprettholdt. Etter nevnte fermenteringsperiode ble den antibiotiske aktivitet for kulturmediet, bestemt ved den vanlige agar-skålprøve på *Staphylococcus aureus*, funnet å tilsvare et innhold på 150 mg fusidinsyre pr. liter når sammenlignet med aktiviteten for det rene stoff bestemt etter samme metode.

Myceliumet ble skilt fra kulturmediet ved filtrering, og mengden av filtratet var 700 liter.

pH av filtratet ble justert til 6,0 ved tilsetning av en 25% oppløsning av H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og filtratet ble ekstrahert med 230 liter butylacetat i motstrøm i en Podbielniak ekstraktor. Butylacetatfasen oppnådd på denne måte ble ekstrahert med 77 liter vann, til hvilken en 10% oppløsning av NaOH var tilsatt inntil pH av den vandige fase var 11,0, hvorefter den vandige fase ble skilt fra butylacetatfasen. pH for den vandige fase ble justert til 9,3 ved tilsetning av en 25% oppløsning av H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, og oppløsningen ble fordampet i en vakuumbfordamper til et volum på 5 liter. Ved å tilsette benzen (0,5 liter) og å justere pH av den vandige fase til 3,0 ved hjelp av saltsyre under omrøring, ble et bunnfall dannet som består av benzensolvat av fusidinsyre. Etter å være blitt omrørt i fem timer ble det filtrert fra, vasket med vann og benzen og tørret. Rekrystallisering fra benzen gav 72 g med et smeltepunkt på 187 - 189°C.

20 gram av det slik oppnådde benzensolvat ble suspendert i 800 ml vann, og til suspensjonen ble tilsatt n/2 vandig NaOH inntil pH 9,0. Oppløsningen ble filtrert, og til filtratet ble tilsatt 2000 ml n-butanol, hvorpå vanninnholdet i oppløsningen ble fjernet ved azeotropisk destillasjon i vakuum. Fra

**118905**

14

residuet ble det ønskede natriumsalt bunnfelt ved tilsetning av eter. Det ble filtrert fra, vasket med eter og tørret. Ved rekrystallisering fra ethanol/acetone ble 14,4 g av det rene krystallinske natriumsalt erholdt.

#### P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av det antibiotiske stoff fusidinsyre eller salter av denne, k a r a k t e r i s e r t v e d at en stamme av mikroorganismene *Cephalosporium lamellaecola*, *Ceph. lefroyi* Horne, *Ceph. malorum* Kidd, *Ceph. recifei* Leao et Lobo, *Ceph. sclerotigenum* M et F. Moreau, *Ceph. stühmeri* Smidt et V Beyma og *Ceph. niveolanosum* Benedek dyrkes under aerobe betingelser i et vandig næringsmedium som inneholder en carbonkilde, slik som karbohydrater og lipoider, nitrogenkilder, uorganiske salter og mikronæringsstoffer, hvorefter den slik fremstilte fusidinsyre, hvis ønsket, konsentreres og isoleres i ren form eller omdannes til et av dens salter på i og for seg kjent måte.

2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at fett eller fettsyrer anvendes som en del av carbonkilden i næringsmediet.

3. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes et næringsmedium som inneholder en kilde for assimilerbart nitrogen i en mengde av 0,01 til 1,5% nitrogen.

#### Anførte publikasjoner:

Britisk patent nr. 748.263

Max W. Miller: The Pfizer Handbook og Microbial Metabolites, New York 1961, p. 179.180

118905

