

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

**PATENTE DE INVENCION**

ES

11

NUMERO

463.697

A1

22

FECHA DE PRESENTACION

28-10-77

A1 463.697 790716 e12D 9/14

49 PRIORIDADES: 51/128837/76 52/2338/77			50 NUMERO 28-10-76 14-1-77	52 FECHA 53 PAIS JAPON JAPON
---	--	--	----------------------------------	---------------------------------------

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL e12D; A61K	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

53 TITULO DE LA INVENCION  
 UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE NUEVOS COMPUESTOS ANTIBIOTICOS DE FORTIMICINA D Y KE.

57 SOLICITANTE (S)  
 KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE  
 6-1, Ohtemachi Itchome, Chiyoda-ku, TOKYO 100 JAPON

58 INVENTOR (ES)  
 Takao Iida; Kunikatsu Shirahata; Isao Matsubara; Masahiro Sugimoto; Shinzo Ishii; Ryo Okachi y Takashi Nara, todos ellos de nacionalidad japonesa.

59 TITULAR (ES)

62 REPRESENTANTE  
 D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

BAD ORIGINAL

RESUMEN DE LA INVENCION

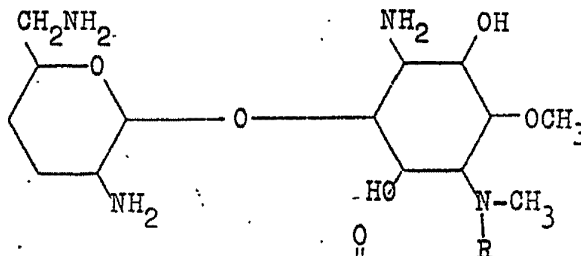
Se producen nuevos compuestos antibióticos, factores D y KE de la fortimicina, por fermentación de microorganismos pertenecientes al género Micromonospora. Los compuestos antibióticos se acumulan en el líquido de cultivo y son aislados del mismo. Se describe también un método semisintético de producción de fortimicina KE, utilizando fortimicina D.

ESTADO DE LA TECNICA ANTERIOR

Esta invención está relacionada en general con las invenciones descritas en la patente estadounidense 3.931.400, concedida el 6 de Enero de 1976 sobre Fortimicina B y Procedimiento para su Producción; patente estadounidense Nº 3.976.768, concedida el 24 de Agosto de 1976 sobre Fortimicina A y Procedimiento para su Producción y patente estadounidense 4.048.015, concedida el 13 de Septiembre de 1977 sobre Fortimicina C y Procedimiento para su Producción.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a nuevas composiciones de materia con propiedades antibacterianas, que responde a la fórmula general I:



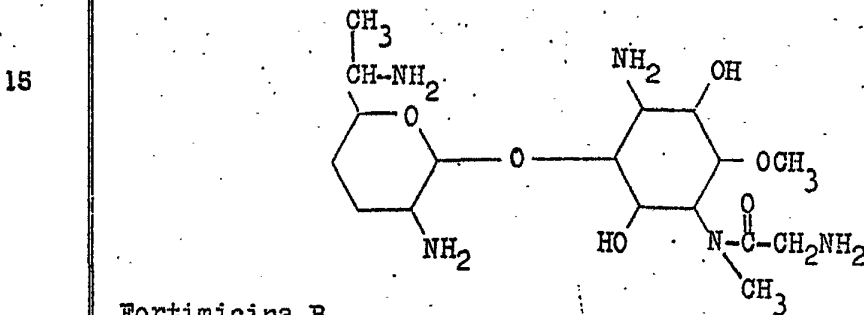
[donde R es H (Fortimicina KE) o  $\text{-C(=O)CH}_2\text{NH}_2$  (Fortimicina D)].

Esta invención también se refiere a la producción de fortimicina D y/o fortimicina KE por cultivo de un microorganismo perteneciente al género Micromonospora, que es capaz de producir una o las dos sustancias activas en un medio nutri-

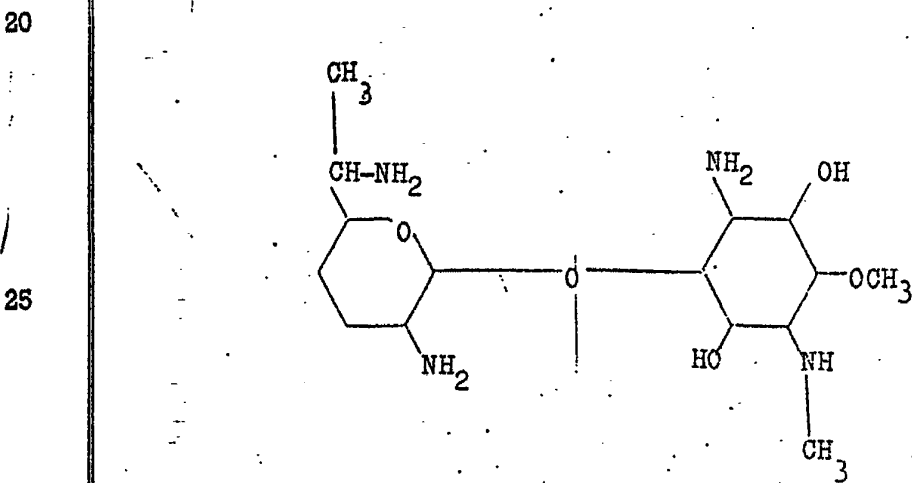
1 tivo, hasta que se detecta actividad bacteriana en el caldo  
de cultivo y después aislar por lo menos una de las sustan-  
cias activas del mismo.

5 Siempre existe demanda de antibióticos que presentan  
actividad contra un amplio espectro de bacterias. Para este  
fin, se ha encontrado que cuando se cultivan ciertas cepas  
de Micromonospora en un medio nutritivo, se producen en el  
caldo de cultivo varias sustancias antibióticas. Específica-  
mente se han aislado los factores A, B y C de la fortimicina  
10 del caldo de cultivo de Micromonospora olivoasterospora  
MK-70 (ATCC 21819) (FERM-P Nº 1560), que presentan las si-  
guientes fórmulas estructurales:

Fortimicina A



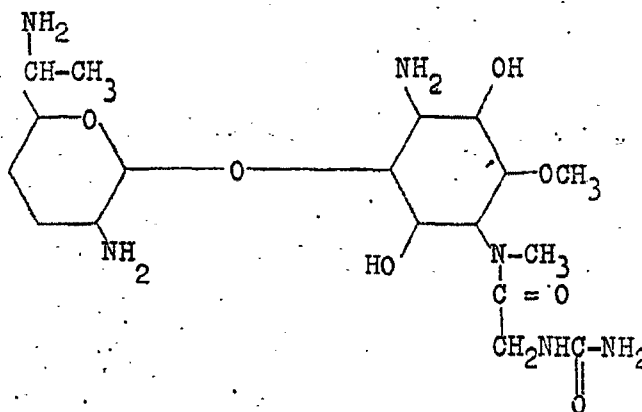
Fortimicina B



30

1 Fortimicina C

5



10

Las propiedades químicas, físicas y biológicas de estos antibióticos y los procedimientos para su producción están descritos con detalle en las memorias de las patentes estadounidenses antes mencionadas.

15

Ahora se ha encontrado que cuando se cultiva Micromonospora olivoasterospora MK-70, libera otras dos sustancias activas distintas de las fortimicinas A, B y C. Un estudio de las propiedades químicas, físicas y biológicas de estas sustancias activas indica que estas composiciones de materia son nuevos antibióticos que ahora han sido denominados fortimicina D y fortimicina KE.

20

#### COMPENDIO DE LA INVENCION

25

De acuerdo con esta invención, se producen nuevos antibióticos de fórmula general I, factores D y KE de la fortimicina, por fermentación de un microorganismo perteneciente al género Micromonospora, que es capaz de producir uno o los dos factores citados, en un medio nutritivo, hasta que se detecta en el caldo de cultivo una actividad antibacteriana sustancial. Una vez terminado el cultivo, se aíslan del caldo las fracciones activas que contienen fortimicina D o fortimicina KE por medios conocidos, como tratamiento con una

30

1 resina cambiadora de ión.

5 Las fortimicinas D y KE presentan amplia actividad anti-bacteriana y, por lo tanto, son útiles, entre otros fines, para limpiar y esterilizar el material de vidrio de labora-  
torio y los instrumentos quirúrgicos y también pueden utilizarse en combinación con jabones, detergentes y soluciones de lavado para esterilizar. Además, se espera utilizar la fortimicina D como compuesto terapéutico sobre diversas in-  
fecciones (en el hombre y en los animales) inducidas por di-  
versas bacterias.

10 En el aspecto de composición de materia de la inven-  
ción están incluidas las sales de adición de ácidos no tóxi-  
cas y farmacéuticamente aceptables de la fortimicina D y  
de la fortimicina KE, que incluyen las sales de adición de  
15 ácidos minerales, como hidrocloreuro, hidrobromuro, hidroyo-  
duro, sulfato, sulfonato y fosfato y las sales de adición  
de ácidos orgánicos como maleato, acetato, citrato, oxalato,  
succinato, benzoato, tartrato, fumarato, malato, mandelato,  
ascorbato y similares.

20 DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Las propiedades físicoquímicas de la base libre de  
fortimicina D de esta invención son las siguientes:

- 25 1) Polvo blanco básico.  
2) Análisis elemental encontrado:  
C = 44,15 %, H = 8,77 %, N = 15,86 %  
3) Punto de fusión: 109-114°C.  
4) Espectro de absorción ultravioleta:

30 El espectro de absorción ultravioleta de una solución  
acuosa de la sustancia no presenta la absorción máxima  
característica entre 220 nm y 360 nm sino que solamente

1

presenta absorción terminal.

5) Rotación específica:  $[\alpha]_D^{25} = +121^{\circ}$  (c = 0,5, H<sub>2</sub>O).

6) Espectro de absorción infrarrojo:

5

El espectro de absorción infrarrojo se mide en pastilla de KBr. La base libre de fortimicina D presenta absorción máxima a las siguientes longitudes de onda (cm<sup>-1</sup>): 3400, 2900, 1625, 1570, 1470, 1350, 1315, 1020.

7) Reacciones coloreadas:

10

Reacción con ninhidrina: positiva.

Reacción con permanganato potásico: positiva.

Reacción de Elson-Morgan: negativa.

Reacción con biuret: negativa.

15

8) El espectro RMP de la fortimicina D se midió en una solución de óxido de deuterio (pD = 10,1) empleando JEOL JNM-PS-100.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

20

$\delta$  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)

25

9) El espectro de RMC de la fortimicina D se mide en una solución de óxido de deuterio (pD = 11,1) empleando JEOL-PFT-100A.

Se obtienen los siguientes resultados:

$\delta$  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, 28,3, 26,8.

30

10) El espectro de masas de la sustancia revela los siguientes iones M + 1 y fragmentos. La fórmula entre paréntesis es la fórmula de composición obtenida por espectrometría

1

de masas de alta resolución.

m/e 392 M + 1 (C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>)

374 (C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>)

292 (C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>)

274 (C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>)

264 (C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>)

5

246 (C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)

235 (C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)

207 (C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)

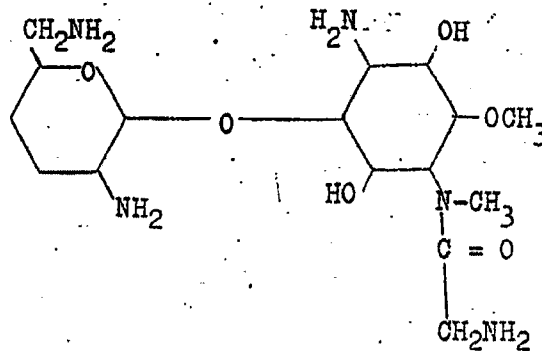
129 (C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O)

10

A partir de los resultados de la espectrometría de masas, se determina el peso molecular de la sustancia como 391 y la fórmula molecular como C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>. Los valores del análisis elemental de la sustancia (hidratada con 2,5 moles de H<sub>2</sub>O), calculados a partir de la fórmula molecular son: C = 44,01 %, H = 8,79 % y N = 16,04 %.

15

11) Basándose en los datos físicoquímicos anteriores, se considera que la fórmula estructural de la fortimicina D es la siguiente:



20

25

12) La base libre de la fortimicina D es fácilmente soluble en agua, soluble en metanol y ligeramente soluble en etanol y acetona pero es insoluble en disolventes orgánicos como el cloroformo, benceno, acetato de etilo, acetato de butilo, éter etílico, butanol, éter de petróleo, n-hexano, etc.

30

Las propiedades físicoquímicas de la base libre de fortimicina KE de esta invención son las siguientes:

1

1) Polvo blanco básico.

2) Valores del análisis elemental encontrado:

C = 48,18 %, H = 9,29 %, N = 15,84 %

3) Punto de fusión: 72-77°C.

5

4) Espectro de absorción ultravioleta:

El espectro de absorción ultravioleta de una solución acuosa de la sustancia no presenta la absorción máxima característica entre 220 nm y 360 nm sino que solamente presenta absorción terminal.

10

5) Rotación específica:  $[\alpha]_D^{25} = +28,5^\circ$  (c = 0,5, H<sub>2</sub>O).

6) Espectro de absorción infrarrojo:

El espectro de absorción infrarrojo se mide en pastilla de KBr. La base libre de fortimicina KE presenta absorción máxima a las siguientes longitudes de onda (cm<sup>-1</sup>): 3350, 2920, 1580, 1470, 1370, 1330, 1090, 1035.

15

7) Reacciones coloreadas:

Reacción con ninhidrina: positiva.

Reacción con permanganato potásico: positiva.

Reacción de Elson-Morgan: negativa.

20

Reacción del biuret: negativa.

8) El espectro de RMP de la fortimicina KE se mide en una solución de óxido de deuterio (pD = 11,1) empleando JEOL JNM-PS-100.

25

Se obtienen los siguientes resultados:

$\delta$  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).

30

9) El espectro de RMC de la sustancia se mide en una solu-

1

ción de óxido de deuterio (pD = 11,0) empleando JEOL PFT-100A.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

5

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

10) El espectro de masas de la sustancia revela los siguientes iones M + 1 y fragmentos. La fórmula entre paréntesis es la fórmula de composición obtenida por espectrometría de masas de alta resolución.

10

m/e 335 M + 1 (C<sub>14</sub>H<sub>31</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>)  
317 (C<sub>14</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>)      235 (C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)  
207 (C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)      189 (C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)  
129 (C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O)

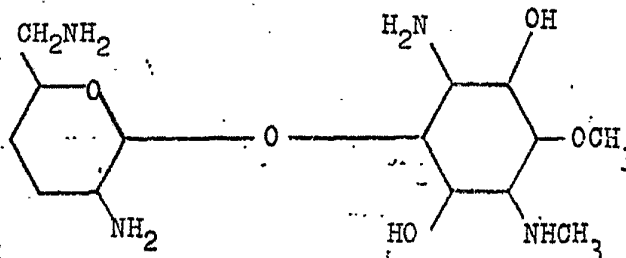
15

A partir de los resultados de la espectrometría de masas, se determina que el peso molecular de la sustancia es 334 y la fórmula molecular es C<sub>14</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>. Los valores del análisis elemental de la sustancia (hidratada con 1 mol de H<sub>2</sub>O) calculados a partir de la fórmula molecular son: C = 47,71 %, H = 9,15 % y N = 15,89 %.

20

11) Basándose en los datos fisicoquímicos anteriores, se considera que la fórmula estructural de la fortimicina KE es la siguiente:

25



30

TABLA II

Valores de la Rf en cromatografía en capa fina de gel de sílice (a la temperatura ambiente, al cabo de 3 horas de desarrollo)

Desarrollador <sup>A</sup>	Antibiótico	Rf
I	Fortimicina D	0,74
"	Fortimicina KE	0,78
"	Fortimicina A	0,74
"	Fortimicina B	0,80
"	Fortimicina C	0,75
"	Complejo de gentamicina	0,71
"	Gentamicina C <sub>1a</sub>	0,71
"	Sisomicina	0,71
II	Fortimicina D	0,37
"	Fortimicina KE	0,58
"	Fortimicina A	0,37
"	Fortimicina B	0,62
"	Fortimicina C	0,40
"	Complejo de gentamicina	0,06-0,16
"	Gentamicina C <sub>1a</sub>	0,16
"	Sisomicina	0,18

<sup>A</sup> Desarrollador I : La capa superior de cloroformo, metanol y amoníaco acuoso al 17 % en peso (2:1:1 en volumen)

Desarrollador II : Acetato amónico al 10 % y metanol (1:1 en volumen).

TABLA III

Valores de la Rf de diversos antibióticos en cromatografía ascendente de papel utilizando la capa inferior de cloroformo, metanol y amoníaco acuoso al 17 % en peso (2:1:1 en volumen) como desarrollador (a la temperatura ambiente, al cabo de 12 horas de desarrollo)

	<u>Antibióticos</u>	<u>Rf</u>
	Estreptomicina A	0,02
	Estreptomicina B	0,00
10	Bluensomicina	0,01
	Ribostamicina	0,00
	Lividomicina A	0,00
	Lividomicina B	0,03
	Higromicina B	0,02
15	Lividomicina D	0,02
	Espectinomina	0,45
	Kasugamicina	0,01
	Butirosina A	0,00
	Butirosina B	0,01
20	Gentamicina A	0,00
	Gentamicina B	0,00
	Gentamicina C <sub>1a</sub>	0,18
	Gentamicina C <sub>1</sub>	0,59
	Gentamicina C <sub>2</sub>	0,38
25	Sisomicina	0,18
	Neomicina A	0,00
	Neomicina B	0,03
	Antibiótico N <sup>o</sup> 460	0,01
	Neomicina C	0,00
30	Kanamicina A	0,02

	<u>Antibióticos</u>	<u>Rf</u>
1	Kanamicina B	0,01
	Kanamicina C	0,02
	Paromomicina	0,00
5	Complejo de Nebramicina	0,01
	Tobramicina	0,02
	Apramicina	0,02
	Nebramicina factor 4	0,01
	Nebramicina factor 5	0,00
10	Miomicina	0,00
	XK-62-2 <sup>a</sup>	0,49
	Fortimicina B	0,65
	Fortimicina A	0,37
	Fortimicina C	0,18
15	Fortimicina D	0,18
	Fortimicina KE	0,59

<sup>a</sup> antibiótico descrito en la patente estadounidense Nº 4.045.298.

La Tabla IV ilustra los espectros antibacterianos de la Fortimicina D y Fortimicina KE frente a diversos microorganismos.

TABLA IV

(Concentración mínima de inhibición,  $\gamma$ /ml medida por el método de dilución en agar a pH 8,0)

	<u>Microorganismo</u>	<u>Fortimicina D</u> <u><math>\gamma</math>/ml</u>	<u>Fortimicina</u> <u>KE, <math>\gamma</math>/ml</u>
25	<u>Bacillus subtilis</u> Nº 10707	0,02	104,2
	<u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 6538P	0,02	1,65
30	<u>Klebsiella pneumoniae</u> ATCC 10031	0,08	26,1

TABLA IV (continuación)

Microorganismo	Fortimicina D γ/ml	Fortimicina KE γ/ml
<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 (resistente a la kanamicina, gentamicina y tobramicina)	0,13	26,1
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> BMH Nº 1	5	208,3
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> KY 8510 (resistente a la kanamicina, kanamicina B, tobramicina, gen- tamicina C <sub>1a</sub> y ribostamicina)	5	
<u>Shigella sonnei</u> ATCC 9290	0,3	26,1
<u>Salmonella typhosa</u> ATCC 9992	0,08	13,1

Como se deduce de lo anterior, la fortimicina D presenta una intensa actividad antibacteriana frente a una amplia gama de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Especialmente, es característico que el antibiótico sea eficaz contra ciertas cepas de Escherichia coli que son resistentes a la kanamicina, a la gentamicina y a la tobramicina. Además, se espera que la fortimicina D ejerza efecto terapéutico sobre diversas infecciones (en el hombre y en los animales) inducidos por las diversas bacterias antes mencionadas. En este aspecto, se ha determinado que la DL<sub>50</sub> del sulfato de fortimicina D para ratones dd con un peso de 20 ± 1 g es de 159 mg/kg. Con estas propiedades antibacterianas, la fortimicina D es aplicable a fines medicinales. Como también se deduce de lo anterior, la fortimicina KE presenta un amplio espectro antibacteriano. Además, la fortimicina KE tiene el mérito de ser estable en solución alcalina.

Una comparación de los factores D y KE de la fortimi-

1 cina con antibióticos conocidos ilustra mejor esta novedad.  
Como antibióticos básicos solubles en agua producidos por  
5 microorganismos del género Micromonospora y con un amplio es-  
pectro antibacteriano, se encuentran el complejo de gentami-  
cina (M.J. Weinstein y colaboradores: Antimicrobial Agents  
and Chemotherapy, 1963, 1; D.J. Cooper y colaboradores: J.  
Infect. Dis. 119, 342, 1969 y J.A. Waitz y colaboradores:  
10 Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2, 464, 1972); el an-  
tibiótico N° 460 (patente japonesa publicada 46-16153); la  
sisomicina (M.J. Weinstein y colaboradores: J. Antibiotics,  
23, 551, 555, 559, 1970); el XK-62-2 (patente estadounidense  
4.045.298; fortimicina B, fortimicina A y fortimicina C. Co-  
mo se indica en la Tabla III anterior, los componentes gen-  
tamicina A, B, C<sub>2</sub> y C<sub>1</sub> presentan unos valores de la Rf de  
15 0,00, 0,00, 0,38 y 0,59, respectivamente, en cromatografía  
de papel. Por otra parte, en la misma cromatografía de papel  
la Rf de la fortimicina D es 0,18 y la de la fortimicina KE  
es 0,59. Por lo tanto, la fortimicina D es claramente dife-  
rente de los componentes de la gentamicina y la fortimicina  
20 KE es diferente de todos excepto la gentamicina C<sub>1</sub>. En la  
cromatografía de papel de la Tabla III, la fortimicina D pre-  
senta el mismo valor de la Rf (0,18) que la gentamicina C<sub>1a</sub>  
(0,18) y por lo tanto la fortimicina D y la gentamicina C<sub>1a</sub>  
no pueden distinguirse entre sí en este aspecto. Sin embar-  
go, en la cromatografía en capa fina de gel de sílice de la  
25 Tabla II, utilizando el desarrollador II, la fortimicina D (Rf:  
0,37) se distingue claramente de la gentamicina C<sub>1a</sub> (Rf:  
0,16). Análogamente en la Tabla II, la gentamicina C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y  
C<sub>1a</sub> presentan unos valores de Rf de 0,06 y 0,16 mientras que  
30 la fortimicina KE presenta un valor de Rf de 0,58. Comparan-

1 do los factores D y KE de la fortimicina con el antibiótico  
Nº 460, la sisomicina, el XK-62-2, la fortimicina B, la for-  
5 timicina A y la fortimicina C, como es evidente en la Ta-  
bla III, el antibiótico Nº 460, la sisomicina, el XK-62-2,  
la fortimicina B, la fortimicina A y la fortimicina C pre-  
sentan unos valores de Rf de 0,01, 0,18, 0,49, 0,65, 0,37 y  
0,18 respectivamente. La Rf de la fortimicina D es 0,18 y de  
la fortimicina KE es 0,59. Por lo tanto, la fortimicina KE  
es claramente diferente. Aunque la Rf de la fortimicina D  
10 es igual a la de la sisomicina y a la de la fortimicina C  
(en la Tabla III), en la cromatografía en capa fina de gel de  
sílice de la Tabla II utilizando el desarrollador II, la forti-  
micina C (Rf: 0,40) y la sisomicina (Rf: 0,18) se distinguen  
claramente de la fortimicina D (Rf: 0,37).

15 Además, como antibióticos básicos solubles en agua  
producidos por Actinomycetes distintos de los del género Mi-  
cromonospora y con un amplio espectro antibacteriano, pode-  
mos mencionar las estreptomycinas A y B, la ribostamicina,  
20 las lividomicinas A, B y D, la espectinomicina, la kasuga-  
micina, las neomicinas A, B y C, las kanamicinas A, B y C,  
el complejo de nebramicina, los factores 4 y 5 de nebramici-  
na y la paromomicina. Se ha encontrado que los factores D y  
KE de la fortimicina difieren considerablemente de cualquiera  
de estos antibióticos en propiedades fisicoquímicas. Además,  
25 como se observa en la Tabla III, los valores de la Rf de los  
factores D y KE de la fortimicina son bastante diferentes de  
los de estos antibióticos en cromatografía de papel.

30 Por todo lo que antecede, los factores D y KE de for-  
timicina pueden considerarse nuevos antibióticos.

1            Los factores D y KE de la fortimicina se obtienen por  
fermentación de un microorganismo perteneciente al género Mi-  
cromonospora. Puede utilizarse cualquier cepa perteneciente  
al género Micromonospora capaz de formar fortimicina D y/o  
5            fortimicina KE en el caldo de cultivo. Son ejemplos de las  
cepas preferidas la Micromonospora olivoasterospora MK-70  
(FERM-P Nº 1560) (ATCC 21819), Micromonospora olivoasteros-  
pora MK-80 (FERM-P Nº 2192) (ATCC 31010) y Micromonospora  
olivoasterospora Mm 744 (FERM-P Nº 2193) (ATCC 31009); Estas  
10            cepas han sido depositadas en la American Type Culture  
Collection, Rockville, Maryland, Estados Unidos y en el Fer-  
mentation Research Institute, Agency of Industrial Science  
and Technology, Tokyo, Japón y han recibido los números de  
accesión antes indicados.

15            Las propiedades microbiológicas de estas cepas están  
descritas en la patente estadounidense 3.931.400, cuya des-  
cripción se incorpora aquí expresamente por referencia.

20            Como en el caso de otras cepas de Actinomycetes, los  
microorganismos útiles en la puesta en práctica de esta in-  
vención pueden ser mutados por medios artificiales como irra-  
diación ultravioleta, irradiación con rayos X y uso de di-  
versos métodos de mutación incluidos los productos químicos,  
de forma conocida, para aumentar la producción de productos  
metabólicos, de los que es un ejemplo la Micromonospora olivo-  
25            asterospora CS-26 (FERM-P Nº 3567, NRRL 8178). Este último  
mutante ha sido depositado en el Ministerio de Agricultura  
de Estados Unidos, Peoria, Illinois, y está a disposición  
del público.

30            En general, en el procedimiento de esta invención pue-  
den emplearse los métodos convencionales de cultivo de

1 Actinomycetes. Así, pueden emplearse diversas fuentes nutri-  
tivas para el medio de cultivo. Las fuentes apropiadas de car-  
bono son glucosa, almidón, mannososa, fructosa, sacarosa, me-  
lazas, etc., solas o en combinación. También pueden emplearse  
5 hidrocarburos, alcoholes, ácidos orgánicos, etc., de acuerdo  
con la asimilabilidad del microorganismo utilizado. Como fuen-  
tes orgánicas e inorgánicas de nitrógeno podemos citar el clo-  
ruro amónico, sulfato amónico, urea, nitrato amónico, nitra-  
to sódico, solos o en combinación o fuentes naturales de ni-  
10 trógeno, como peptona, extracto de carne, extracto de leva-  
dura, levadura seca, licor de infusión de maíz, soja en pol-  
vo, casaminoácido, proteínas vegetales solubles, etc. Si es  
necesario, pueden agregarse sales inorgánicas como cloruro  
sódico, cloruro potásico, carbonato cálcico, fosfatos, etc.  
15 al medio. Además, pueden agregarse materias orgánicas e inor-  
gánicas que provocan el desarrollo de la cepa particular y  
la producción de fortimicina D y/o KE.

Lo más adecuado es un método de cultivo líquido, es-  
pecialmente un método de cultivo sumergido y agitado. La tem-  
20 peratura de cultivo es convenientemente de 25 a 40°C y se  
prefiere efectuar el cultivo a pH aproximadamente neutro.  
Habitualmente, al cabo de 2 a 15 días de cultivo en medio lí-  
quido se forma fortimicina D y fortimicina KE que se acumu-  
lan en el medio de cultivo. Cuando el rendimiento de los an-  
25 tibióticos en el caldo de cultivo alcanza un valor máximo,  
se interrumpe el cultivo, se aísla el producto deseado del  
caldo de cultivo y se purifica después de haber separado las  
células microbianas, por ejemplo por filtración.

El aislamiento y purificación de la fortimicina D y  
30 fortimicina KE se lleva a cabo por los métodos habituales.

1 te empleados para el aislamiento y purificación de productos metabólicos microbianos de un caldo de cultivo.

5 Como los antibióticos fortimicina D y fortimicina KE son sustancias básicas y son fácilmente solubles en agua pero poco solubles en los disolventes orgánicos habituales; los antibióticos pueden ser purificados por los métodos habitualmente empleados para la purificación de los llamados antibióticos básicos solubles en agua. Más específicamente, los factores D y KE pueden ser purificados mediante una combinación apropiada de absorción y desorción de resinas cambiadoras de catión, cromatografía en columna de celulosa, adsorción y desorción empleando una columna de Sephadex LH-20, cromatografía en columna de gel de sílice, etc. Como ejemplo, un método adecuado de purificación de la fortimicina D a partir del caldo de cultivo, cuando se emplea una cepa capaz de producir el complejo fortimicina (una mezcla que contiene fortimicina A, B, C, D y KE y subproductos con actividad antibacteriana) es el siguiente. El filtrado del caldo de cultivo libre de células se ajusta a pH 7,5 y después se hace pasar por una resina cambiadora de catión como Amberlite IRC-50 (forma amónica) (Rohm & Haas Co., Estados Unidos). Después la resina se lava con agua y se eluye con amoníaco acuoso 0,5 N. Se combinan las fracciones activas y se concentran a presión reducida. Después el concentrado se trata con una resina cambiadora de anión, Dowex 1 x 2 (forma OH) (The Dow Chemical Co., Estados Unidos). Se combinan las fracciones activas obtenidas en la elución y se concentran a presión reducida para obtener un polvo crudo de complejo de fortimicina. El polvo crudo se disuelve en agua y después la

1

5

10

15

20

25

30

1 solución se ajusta a pH 5,0 con ácido sulfúrico 2 N y a con-  
tinuación se pasa por una columna rellena de carbón activo  
para adsorber los principios activos. Después la columna de  
carbón activo se lava con agua para separar las impurezas.  
5 A continuación se eluye con ácido sulfúrico 0,2 N para eluir  
los principios activos. Se combinan las fracciones activas  
y, después de neutralizar con una resina cambiadora de anión  
como Dowex 44 (forma OH) (The Dow Chemical Co., Estados Uni-  
dos), se liofilizan para obtener la base libre del complejo  
10 de fortimicina.

En el caso del complejo de fortimicina que contiene  
fortimicina D, el polvo crudo del complejo de fortimicina  
obtenido antes se somete a cromatografía en columna de gel  
de sílice empleando una mezcla disolvente de isopropanol,  
15 cloroformo y amoníaco acuoso concentrado (4:2:1 en volumen)  
como desarrollador. El polvo crudo se suspende en el disol-  
vente y se introduce en la columna. El desarrollo se realiza  
con el mismo disolvente a un caudal de unos 30 ml/hora. Pri-  
mero se eluye la fortimicina B y, después de eluir algunos  
20 componentes traza, eluye la fortimicina A en grandes fraccio-  
nes activas. Después se prosigue la elución y eluye la forti-  
micina C; la fortimicina D es eluída en las próximas grandes  
fracciones activas. Se recogen las fracciones activas que  
contienen fortimicina D y se concentran a presión reducida.  
25 El concentrado se liofiliza para obtener la fortimicina D  
en forma de base libre de color blanco. De esta forma, puede  
obtenerse una muestra de fortimicina D considerablemente pu-  
rificada por cromatografía en columna de gel de sílice. Sin  
embargo, algunas veces hay algunas impurezas en la muestra.  
30 En este caso, la muestra se somete a cromatografía en co-

1 columna de celulosa. Como desarrollador, se emplea una mezcla  
disolvente de n-butanol, piridina, ácido acético y agua  
(6:4:2:4 en volumen). Las fracciones activas obtenidas por  
5 elución se combinan y concentran a presión reducida para ob-  
tener un preparado purificado de fortimicina D. Para la sepa-  
ración de las impurezas que presentan reacción positiva con  
la ninhidrina, también es eficaz la cromatografía en columna  
con carboximetilcelulosa. Más específicamente, en este caso,  
se hace pasar una solución del polvo crudo a través de una  
10 columna rellena de carboximetilcelulosa (forma amónica). Los  
principios activos son adsorbidos en la carboximetilcelulosa.  
Después la columna se lava bien con agua para eluir la ma-  
yoría de los pigmentos y las sales inorgánicas. A continua-  
ción se eluye con bicarbonato amónico 0,2 N para eluir los  
15 principios activos. Se combinan las fracciones que contienen  
la fortimicina D y se liofilizan para obtener fortimicina D  
purificada.

Durante los procesos de purificación antes descritos,  
se comprueban las fracciones por cromatografía en capa fina  
20 de gel de sílice. Como desarrollador se emplea una mezcla  
disolvente de isopropanol, cloroformo y amoniaco acuoso con-  
centrado (2:1:1 en volumen) y se desarrolla a la temperatura  
ambiente durante 2 horas. La fortimicina D presenta un valor  
de la Rf de 0,43 aproximadamente, en el cromatograma de capa  
25 fina de gel de sílice.

En el caso del complejo de fortimicina que contiene  
fortimicina KE y fortimicina D, el polvo crudo obtenido por  
liofilización se disuelve en agua. Después de ajustar a pH  
7,5 con ácido sulfúrico 2 N, la solución se pasa por una co-  
30 lumna rellena de una resina cambiadora de catión, Amberlite

1 CG-50 tipo I (forma amónica) (producida por Rohm & Haas Co.,  
Estados Unidos) para adsorber el complejo de fortimicina.  
Después la columna se lava con agua. A continuación se eluye  
5 con amoniaco acuoso 0,2 N. Después de eluir algunos componen-  
tes traza, se obtiene una mezcla de fortimicina B y fortimi-  
cina KE en grandes fracciones activas. A continuación des-  
pués de eluir algunos componentes traza, eluyen la fortimici-  
na A y la fortimicina D. Se combinan las fracciones activas  
que contienen fortimicina KE y fortimicina B y se secan para  
10 obtener un polvo de las bases libres de fortimicina KE y for-  
timicina B. Después el polvo se somete a cromatografía en  
columna de gel de sílice empleando una mezcla disolvente de  
isopropanol, cloroformo y amoniaco acuoso concentrado.  
(4:2:1 en volumen) como desarrollador. El polvo antes mencio-  
15 nado se suspende en la mezcla disolvente y la suspensión se  
introduce en una columna rellena de gel de sílice. El desa-  
rrollo se realiza con el mismo disolvente a un caudal de unos  
30 ml/hora. Las primeras fracciones activas eluidas contie-  
nen fortimicina B. Después se eluye la fortimicina KE. Se  
20 combinan las fracciones que contienen fortimicina KE y se con-  
centran a presión reducida. El concentrado se disuelve en una  
pequeña cantidad de agua y se liofiliza para obtener la base  
libre de fortimicina KE. De esta forma puede obtenerse una  
muestra de fortimicina KE considerablemente purificada por  
25 cromatografía en columna de gel de sílice. Sin embargo, al-  
gunas veces hay algunas impurezas en la muestra. Si se desea  
obtener fortimicina D a partir de las fracciones activas que  
contienen fortimicina D y fortimicina A, puede utilizarse el  
procedimiento similar antes mencionado utilizando cromatogra-  
30 fía en gel de sílice.

1 Durante los procesos de purificación antes descritos,  
se comprueban las fracciones por cromatografía en capa fina  
de gel de sílice. Como desarrollador, se utiliza una mezcla  
5 disolvente de isopropanol, cloroformo y amoníaco acuoso con-  
centrado (2:1:1 en volumen) y el desarrollo se realiza a la  
temperatura ambiente durante 2 horas. La fortimicina KE pre-  
senta un valor Rf de 0,58 aproximadamente en el cromatograma  
de capa fina de gel de sílice.

10 La fortimicina KE también puede obtenerse calentando  
la fortimicina D en una solución acuosa alcalina como hidró-  
xido sódico e hidróxido bórico. Específicamente, se calienta  
la fortimicina D en una solución acuosa saturada de hidróxi-  
do bórico a una temperatura de 100°C, durante 3 horas. Des-  
pués la solución reaccionante se neutraliza con hielo seco  
15 y el precipitado resultante de carbonato bórico se separa  
por filtración. Se concentra el filtrado y se pasa por una  
columna rellena de Amberlite CG-50 (forma amónica). Después  
de lavar la columna con agua, se eluye con amoníaco acuoso  
0,2 N. Primero eluye una pequeña cantidad de subproductos de  
20 reacción y posteriormente eluye la fortimicina KE. Las frac-  
ciones que contienen fortimicina KE se combinan y concentran  
a presión reducida. Después se liofiliza el concentrado para  
obtener la base libre de fortimicina KE.

25 Los siguientes ejemplos representativos ilustran cier-  
tas realizaciones específicas de esta invención.

EJEMPLO 1

A. Cultivo de la cepa CS-26

30 Como cepa de siembra se utiliza Micromonospora olivo-  
asterospora CS-26 (NRRL 8178) (FERM-P Nº 3567). La cepa de  
siembra es una cepa mutante derivada de Micromonospora olivo-

1 asterospora MK-70 (ATCC 21819) (FERM-P N° 1560) por trata-  
miento con nitrosoguanidina, irradiación ultravioleta e irra-  
diación con rayos gamma. Como primer medio de siembra se uti-  
liza un medio que contiene 2 g/dl de glucosa, 0,5 g/dl de  
5 peptona, 0,5 g/dl de extracto de levadura y 0,1 g/dl de car-  
bonato cálcico (pH 7,5 antes de esterilizar). Se inoculan  
4 ml de la cepa de siembra en partes alícuotas de 10 ml del  
primer medio de siembra en grandes tubos de ensayo de 50 ml  
y se cultiva a 30°C durante 5 días. Después se inoculan 10 ml  
10 del primer cultivo de siembra así preparado en partes alícuo-  
tas de 30 ml de un segundo medio de siembra en Erlenmeyers  
de 250 ml. El segundo medio de siembra tiene la misma compo-  
sición que el primero. El segundo cultivo de siembra se rea-  
liza con sacudidas a 30°C durante 2 días y después se inocu-  
lan 30 ml del segundo cultivo de siembra en partes alícuotas  
15 de 300 ml de un tercer medio de siembra en Erlenmeyers de  
2 litros provistos de tabiques. El tercer medio de siembra  
tiene la misma composición que el primero. El tercer cultivo  
de siembra se realiza con sacudidas a 30°C durante 2 días.  
20 Después se inoculan 1,5 l del tercer cultivo de siembra  
(correspondiente a 5 matraces) en 15 litros de un cuarto me-  
dio de siembra en un fermentador vibratorio de acero inoxidable  
de 30 litros. El cuarto medio de siembra tiene la misma  
composición que el primero. El cuarto cultivo de siembra del  
25 fermentador vibratorio se realiza con aireación y agitación  
(350 rpm; aireación: 15 l/minuto) a 37°C, durante 2 días. Des-  
pués se inoculan 15 litros del cuarto cultivo de siembra en  
150 l de un medio de fermentación contenido en un fermentador  
de 300 l. El medio de fermentación tiene la siguiente compo-  
30

1

sición:

Almidón soluble	4 g/dl
Harina de soja	2 g/dl
Licor de infusión de maíz	1 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

(pH 7,5 antes de esterilizar).

5

10

La fermentación en el fermentador se realiza con aireación y agitación (150 rpm; aireación: 80 l/minuto) a 37°C, durante 4 días.

B. Aislamiento del complejo crudo de fortimicina

15

20

25

30

Una vez completada la fermentación, el caldo de cultivo se ajusta a pH 2,5 con ácido sulfúrico concentrado y se agita durante 30 minutos. Después se agregan al caldo de cultivo alrededor de 7 kg de un auxiliar de filtración, Radialite nº 600 (producto de Showa Kagaku Kogyo Co., Ltd.) y se separan las células microbianas por filtración. El filtrado se ajusta a pH 7,5 por adición de hidróxido sódico 6 N y después se pasa por una columna rellena con unos 20 litros de una resina cambiadora de catión, Amberlite IRC-50 (forma amónica). Los principios activos se adsorben en la resina y el efluente se desprecia. Después de lavar la resina con agua, se realiza la elución de los principios activos con amoniac acuoso 0,5 N. El eluato se somete a una determinación de la actividad por un método de disco de papel utilizando una placa de agar de Bacillus subtilis Nº 10707. Se combinan las fracciones que presentan actividad y se concentran a presión

1 reducida hasta 1 litro aproximadamente. Después el concen-  
trado se pasa por una columna rellena con 500 ml de una resi-  
na cambiadora de anión, Dowex 1 x 2 (forma OH) y después se  
5 pasan por la columna alrededor de 2 litros de agua. De esta  
forma se separan las impurezas y los principios activos, se  
eluyen con agua. Se combinan las fracciones activas y se con-  
centran a presión reducida hasta unos 100 ml. El concentrado  
se pasa por una columna rellena con unos 50 ml de carbón ac-  
tivo en polvo para adsorber los principios activos. La co-  
10 lumna se lava con agua y el efluente y las aguas de lavado  
se desprecian. La elución se realiza con ácido sulfúrico  
0,2 N. El eluato se somete a determinación de la actividad  
por un método de disco de papel empleando Bacillus subtilis  
Nº 10707. Se combinan las fracciones activas y se pasan por  
15 una columna de resina Dowex 44 (forma OH) y se eluyen los  
principios activos con agua. Se combinan las fracciones ac-  
tivas y se concentran hasta unos 50 ml. El concentrado se  
liofiliza para obtener un polvo crudo de complejo de forti-  
micina. El rendimiento de polvo crudo es alrededor de 35 g  
20 y la actividad es de 580 unidades/mg (la actividad de 1 mg  
del preparado puro corresponde a 1000 unidades).

C. Aislamiento y purificación de la fortimicina D

25 Se suspenden alrededor de 500 ml de gel de sílice en  
un disolvente que comprende isopropanol, cloroformo y amonia-  
co acuoso concentrado (4:2:1 en volumen) y se introduce en  
una columna de vidrio en forma de capa apretada y uniforme.  
Después la columna se lava bien con el mismo disolvente. Des-  
pués se cargan 10 g del polvo crudo obtenido en la etapa B  
anterior sobre el gel de sílice para formar una capa delgada  
30 y uniforme. Después de haber cargado el polvo crudo, se vier-

1 te gradualmente el mismo disolvente en la columna desde la  
parte superior y después se eluye continuamente a un caudal  
de unos 50 ml/h. El eluato se recupera en fracciones de 20 ml  
y cada una de las fracciones se somete a una determinación  
5 de la actividad por el método de disco de papel utilizando  
Bacillus subtilis Nº 10707. Primero es eluída la fortimicina  
B seguida de la fortimicina A. Después se prosigue la elu-  
ción y una vez eluída la fortimicina C, se eluye la fortimi-  
cina D. Las fracciones activas se someten a cromatografía  
10 en capa fina y las fracciones que contienen fortimicina D  
se combinan y concentran a presión reducida para separar su-  
ficientemente el disolvente. El residuo se disuelve en una  
pequeña cantidad de agua y la solución se liofiliza para ob-  
tener alrededor de 1,5 g de un preparado purificado de la  
15 base libre de fortimicina D. El producto presenta una activi-  
dad de alrededor de 980 unidades/mg.

D. Aislamiento y purificación de la fortimicina KE

Para obtener fortimicina KE, se disuelven 20 g del  
polvo crudo obtenido en la etapa B anterior en 30 ml de agua.  
20 La solución se ajusta a pH 7,5 con ácido sulfúrico concentra-  
do y se pasa por una columna rellena con 1 litro de resina  
cambiadora de catión Amberlite CG-50 (forma amónica). Se de-  
precia el efluente. La sustancia activa se adsorbe sobre la  
resina. Después de lavar la resina con agua, se eluye con  
25 amoníaco acuoso 0,2 N. El eluato se recupera en fracciones  
de 50 ml y cada una de las fracciones se somete a una deter-  
minación de la actividad por el método de disco de papel y  
cromatografía en capa fina.

30 En primer lugar se eluyen varios componentes traza.  
Después se eluyen las fracciones que contienen fortimicina

1 KE y fortimicina B. Las fracciones se combinan y concentran hasta 20 ml. El concentrado se liofiliza para obtener 8 g de un polvo crudo.

5 En una columna de vidrio se introducen unos 500 ml de gel de sílice, suspendidos en un disolvente formado por isopropanol, cloroformo y amoníaco acuoso concentrado 4:2:1 en volumen, en forma de capa apretada uniforme. Después la columna se lava bien con el mismo disolvente. A continuación se carga sobre el gel de sílice el polvo crudo obtenido anteriormente en forma de capa fina uniforme y se vierte el mismo disolvente gradualmente sobre la columna desde la parte superior y después se realiza la elución continuamente a un caudal de unos 50 ml/h. El eluato se recupera en fracciones de 20 ml y cada una de las fracciones se somete a una  
10 determinación de la actividad por el método del disco de papel utilizando Bacillus subtilis N° 10707. Primero eluye la fortimicina B seguida de la fortimicina KE. Las fracciones activas se someten a cromatografía en capa fina y las fracciones que contienen fortimicina KE se combinan y concentran a presión reducida para separar el disolvente. El residuo se disuelve en una pequeña cantidad de agua y la solución se liofiliza para obtener alrededor de 2 g de un preparado  
15 purificado de la base libre de fortimicina KE. El producto presenta una actividad de unas 970 unidades/mg.

25 EJEMPLO 2

En este ejemplo se emplea la cepa utilizada en el Ejemplo 1 anterior como cepa de siembra y también se utilizan los medios de siembra (del primero al cuarto) del Ejemplo 1. El medio de fermentación utilizado tiene la siguiente  
30

1	Almidón soluble	4 g/dl
	Ebios (levadura seca en polvo)	3 g/dl
	$K_2HPO_4$	0,05 g/dl
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 g/dl
5	KCl	0,03 g/dl
	$CaCO_3$	0,1 g/dl

La fermentación se realiza en las condiciones descritas en la etapa A del Ejemplo 1 y se aísla un polvo crudo de complejo de fortimicina de la misma forma que en la etapa B del Ejemplo 1. Como resultado de esta operación se obtiene alrededor de 71 g de polvo crudo de complejo de fortimicina que presenta una actividad de unas 670 unidades/mg. Después se someten 50 g del polvo crudo a purificación por el método descrito en la etapa C del Ejemplo 1. Así se obtienen unos 15 g de fortimicina D con una actividad de unas 840 unidades/mg.

Para proseguir la purificación, el preparado se somete a cromatografía en columna de celulosa. Se suspenden alrededor de 500 ml de un polvo de celulosa (AVICEL, producto de la Funakoshi Seiyaku, K.K.) en una mezcla disolvente de n-butanol, ácido acético, piridina y agua (6:2:4:4 en volumen) y se introduce en una columna de vidrio para formar una capa apretada y uniforme. Después la columna se lava bien con el mismo disolvente. El preparado se carga sobre el polvo de celulosa para formar una capa delgada y uniforme. Después de cargar el preparado, se vierte gradualmente en la columna el mismo disolvente desde la parte superior y después se eluye continuamente a un caudal de 1 ml/minuto aproximadamente. El eluato se recupera en fracciones de 10 ml

1 y cada una de las fracciones se somete a una determinación  
de la actividad por el método de disco de papel empleando  
Bacillus subtilis N° 10707. Se combinan las fracciones ac-  
5 tivas y se concentran a presión reducida para separar sufi-  
cientemente el disolvente. El residuo se disuelve en una  
pequeña cantidad de agua y se liofiliza. De esta forma se  
obtienen alrededor de 8 g de un preparado purificado de la  
base libre de fortimicina D que presenta una actividad de  
10 970 unidades/mg.

EJEMPLO 3

En este ejemplo se repite el procedimiento del Ejem-  
plo 2 para obtener alrededor de 68 g de un polvo crudo del  
complejo de fortimicina. Después se someten 40 g del polvo  
15 crudo a purificación por el método descrito en la etapa I  
del Ejemplo 1. Así se obtienen 7 g de fortimicina KE que  
presenta una actividad de unas 860 unidades/mg.

Para purificarlo más, el preparado se somete a cromatografía en columna de celulosa. Se suspenden unos 300 ml  
20 de una celulosa en polvo (AVICEL, producto de la Funakoshi  
Seiyaku K.K.) en una mezcla disolvente de n-butanol, ácido  
acético, piridina y agua (6:2:4:4 en volumen) y se introduce  
en una columna de vidrio para formar una capa apretada y  
uniforme. Después la columna se lava bien con el mismo di-  
solvente. El preparado se carga sobre la celulosa en polvo  
25 para formar una capa delgada y uniforme. Después de cargar  
el preparado, se vierte gradualmente el mismo disolvente en  
la columna desde la parte superior y después se eluye conti-  
nuamente a un caudal de 1 ml/minuto aproximadamente. El  
30 eluato se recupera en fracciones de 7 ml y cada una de las

1 fracciones se somete a una determinación de la actividad por  
el método de disco de papel empleando Bacillus subtilis  
Nº 10707. Se combinan las fracciones activas y se concentran  
5 a presión reducida para separar el disolvente. El residuo se  
disuelve en una pequeña cantidad de agua y se liofiliza. De  
esta forma se obtienen alrededor de 5 g de un preparado pu-  
rificado de la base libre de fortimicina KE que presenta una  
actividad de 980 unidades/mg.

EJEMPLO 4

10 En este ejemplo se emplea la misma cepa que en el  
Ejemplo 1 como siembra y también se utilizan los mismos me-  
dios de siembra (del primero al cuarto) del Ejemplo 1. Sin  
embargo, se emplea un medio de fermentación con la siguiente  
composición:

15	Almidón soluble	4 g/dl
	Casaminoácido (un hidrolizado ácido de caseína, producto de Difco Laboratories, Estados Unidos)	3 g/dl
	$K_2HPO_4$	0,05 g/dl
20	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 g/dl
	KCl	0,03 g/dl
	$CaCO_3$	0,1 g/dl

25 La fermentación se realiza en las condiciones descri-  
tas en la etapa A del Ejemplo 1 y la fortimicina D se aísla  
y purifica en la forma descrita en las etapas B y C de Ejem-  
plo 1. Así se obtienen alrededor de 15 g de preparado puri-  
ficado de fortimicina D que presenta una actividad de unas  
975 unidades/mg.

1

EJEMPLO 5

5

Se repite el procedimiento del Ejemplo 4 a excepción de que la fortimicina KE se aísla y purifica en la forma descrita en las etapas B y D del Ejemplo 1. Así se obtienen alrededor de 7 g de un preparado purificado de fortimicina KE que presenta una actividad de unas 985 unidades/mg.

EJEMPLO 6

10

15

20

En este ejemplo se utilizan como cepas de siembra Micromonospora olivoasterospora MK-70 (ATCC 21819), Micromonospora olivoasterospora MK-80 (ATCC 31010) y Micromonospora olivoasterospora Mm 744 (ATCC 31009). Los medios de siembra (del primero al cuarto) y el medio de fermentación utilizados son los del Ejemplo 1. La fermentación se realiza en las condiciones descritas en la etapa A del Ejemplo 1 y la fortimicina D se aísla y purifica en la forma descrita en las etapas B y C de dicho Ejemplo 1. Análogamente, la fortimicina KE se aísla y purifica en la forma descrita en las etapas B y D del Ejemplo 1. Los rendimientos y actividades de los preparados purificados de fortimicina D y fortimicina KE se encuentran en la Tabla V.

TABLA V.

25

30

	<u>Fortimicina D</u>	
<u>Cepa</u>	<u>Rendimiento (mg)</u>	<u>Actividad (unidades/mg)</u>
<u>Micromonospora olivoasterospora</u> MK-70	450	985
<u>Micromonospora olivoasterospora</u> MK-80	980	975
<u>Micromonospora olivoasterospora</u> Mm-744	620	990



EJEMPLO 8

Se disuelve 1 g de la base libre de fortimicina D en 5 ml de agua. A la solución se agregan 1,7 ml de ácido sulfúrico 6 N. Después se añaden a la mezcla 100 ml de metanol para formar un precipitado blanco. El precipitado se obtiene por filtración y se lava con metanol. Después de secar el precipitado a presión reducida, se obtienen 1,2 g del sulfato de fortimicina D que presenta una actividad de unas 650 unidades/mg.

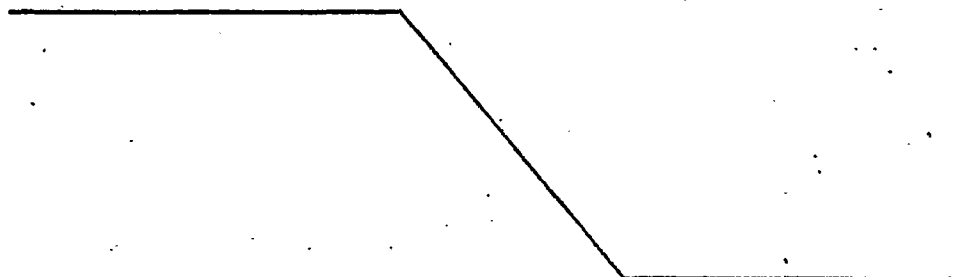
EJEMPLO 9

Se disuelve 1 g de la base libre de fortimicina KE en 5 ml de agua. A la solución se agregan 2,0 ml de ácido sulfúrico 6 N. Después se añaden a la mezcla 100 ml de metanol para formar un precipitado blanco. El precipitado se obtiene por filtración y se lava con metanol. Después de secar el precipitado a presión reducida, se obtienen 1,3 g del sulfato de fortimicina KE que presenta una actividad de unas 610 unidades/mg.

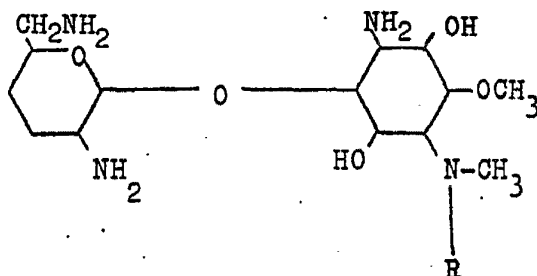
En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para la preparación de nuevos compuestos antibióticos de fortimicina D y KE de fórmula general I:



1



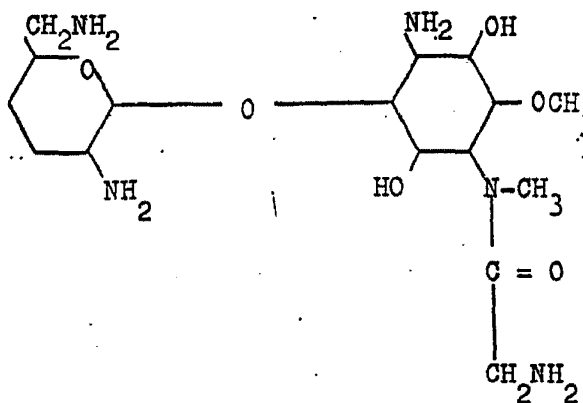
5

10

donde R es H (fortimicina KE) o  $\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CCH}_2\text{NH}_2$  (fortimicina D) que consiste en cultivar un microorganismo que es capaz de producir por lo menos uno de dichos factores en un medio nutritivo hasta que se detecta una actividad antibacteriana sustancial en el caldo de cultivo y después aislar por lo menos uno de dichos compuestos antibióticos del caldo.

15

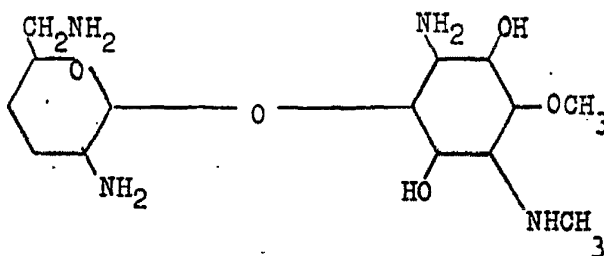
2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde se aisla del caldo de cultivo la fortimicina D de fórmula:



20

25

3. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde se aisla del caldo de cultivo la fortimicina KE de fórmula:



30

1           4.- Un procedimiento según la reivindicación 1, donde el microorganismo es un miembro del género Micromonospora.

5           5.- Un procedimiento según la reivindicación 1, donde el microorganismo es un miembro de la especie Micromonospora olivoasterospora.

10           6.- Un procedimiento según la reivindicación 1, donde el microorganismo está seleccionado entre el grupo formado por Micromonospora olivoasterospora ATCC 21819, Micromonospora olivoasterospora ATCC 31009, Micromonospora olivoasterospora ATCC 31010 y Micromonospora olivoasterospora NRRI 8178.

15           7.- Un procedimiento según la reivindicación 1, donde la etapa de cultivo se lleva a cabo entre 25 y 40°C, durante 2 a 15 días, a pH aproximadamente neutro.

20           8.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita por: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE NUEVOS COMPUESTOS ANTIBIOTICOS DE FORTIMICINA D Y KE.

25           Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva, que consta de treinta y seis páginas mecanografiadas.

Madrid, 28 Octubre 1.977

25           BERNARDO UNGRIA  
P.P.

