

192.461

P.- 8017.-
Case 129.868.-

192.461

26 FEB. 1951

24 FEB. 1951

MEMORIA DESCRIPTIVA
para solicitar
P A T E N T E D E I N V E N C I O N
e n
E S P A Ñ A
por VEINTE años

a nombre de CHAS. PFIZER & CO., INC., entidad norteamericana,
establecida en 11 Bartlett Street, Brooklyn, Nueva York, Esta-
dos Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR UN ANTIBIOTICO".

-o-

Este invento se refiere a una sustancia antibióti-
ca nueva y útil, terramicina, y a un procedimiento para su pro-
ducción por el cultivo en condiciones particulares controla-
das a partir de ciertas cepas de un micro-organismo no descrito

hasta ahora, de microorganismo, que hemos denominado Streptomyces rimosus. La descripción de este organismo, siguiendo la clave del "Manual of Determinative Bacteriology" de Bergey, sexta edición, páginas 929-933, se expone en lo que sigue.

5 Las características de cultivo de esta especie, próxima al S. albus, pero diferente en diversos particulares, basadas en el número aislado B3279, se dan abajo en forma tabulada. (Los colores, donde se escribe R, son los de "Color Standards and Nomenclature", de Ridgway). Las lecturas se basan en seis tubos o placas.

10

	Medio	Magnitud de crecimiento	Color		Observaciones
			Micelio aéreo y esporas	Pigmento soluble	
15	placas de glucosa agar asparagina	moderado a bueno, principalmente sumergido	Entre blanco y <u>Pallid Quaker Drab</u> (R)	Amarillento muy desvaído	Colonia plana; borde irregular, superficie lisa; esporulación ligera, micelio aéreo ligero, reverso próximo al <u>Yellow Ocher</u> (R) en el centro, <u>Colonial Buff</u> (R) en el borde; espirales muy numerosas, conidios en cadenas, 0,6-0,7 x 0,8-1,4, cilíndricos cortos. Placas de dilución colonias esencialmente todas similares, Colonias aisladas, escamosas, de sistemas dispersos de grandes aglomerados de espirales; olor terreo.
20					
25					
30					
35					

	Gelatina	Moderado	Blanco	Ninguna	Liquidación moderada.
5	Lechada de tornasol (28°)	Bueno, película gruesa.	Blanco grisáceo	Parte inferior del tubo más clara que el control.	Sin hidrólisis o peptonización. pH inalterado.
10	(37°)	Muy bueno	Blanco-grisáceo	Parte superior del líquido casi negra	Sin hidrólisis o peptonización. pH alterado de 6.1 a 6.6-7.02.
15	Glucosa-agar	Moderado, seco, superficie agrietada por el crecimiento continuado de hifas vegetativas.	más claro que <u>Pallid Mouse Gray</u> (R)	Pardo amarillento.	Reverso cerca del <u>Pine-Orange</u> (R) y <u>Ochraceous Orange</u> (R).
20					
25	Agar nutricional	Escaso	Sin micelio aéreo, cero.	Amarillento muy desvaído.	Reverso cerca de <u>gamuza y Honey Yellow</u> (R).
30	Masa de patata.	Moderado, arrugado.	Blancuzco a <u>Pallid Quaker Drab</u> (R)	Pardo ligeramente amarillento.	Micelio cerca de <u>Ochraceous Tawny</u> (R).
35	Malato de calcio.	Escaso, plano.	Sin micelio aéreo; colonia cerca del <u>Dark Yellow</u> (R).	Ninguno	
40	Placas de fécula.	Escaso, delgado.	Muy poco micelio aéreo; colonia cerca del <u>Light Cinamon Drab</u> (R)	Ninguno.	Ligera hidrólisis.
45					

	Agar sintético.	ninguno.			
	Celulosa	Ninguno.			
5	de Emerson	Moderado a bueno; áspero superficie hendida en muchos trocitos eventualmente.	Blanco a <u>Pallid Quaker Drab</u> (R); colonia en sa cerca del <u>Honey Yellow</u> a <u>Zinc Orange</u> u <u>Ochraceous Orange</u> (R).	Amarillento pálido (R) pardo.	Reverse cerca del <u>Zinc-Orange</u> .
10					
15					
20	Caldo de nitrato de dextrosa.	moderado con una película.		Amarillo	Reducción del nitrato de débil a fuerte en tubos diferentes.

Esta especie difiere del S. albus en lo siguiente:

S. albus (Rossi Doria emend. Krainaky Waksman y Henrici)

S. rimosus

- | | | |
|----|---|--|
| 25 | 1. Micelio aéreo abundante. | 1. Micelio aéreo escaso. |
| | 2. Micelio aéreo blanco. | 2. Micelio aéreo no blanco puro, sino cerca de <u>Quaker Drab</u> (R) <u>Pallid</u> |
| 30 | 3. No hay mención de agrietamiento de colonia | 3. Cuando ocurre un crecimiento vigoroso, las colonias se agrietan al principio circunferencialmente, luego sobre toda la superficie, de modo que la capa esporífera resulta agrietada en trocitos que se separan entre sí por crecimiento continuado hacia arriba de las hifas subyacentes. |
| 35 | | |
| 40 | 4. Leche peptonizada después de coagulación. | 4. Leche no hidrolizada o peptonizada. |
| 45 | 5. Sobre agar sintético, crecimiento abundante y extendido. | 5. No hay crecimiento sobre agar sintético. |
| | 6. Colonias sobre patata, blancas. | 5. El micelio está próximo al <u>Ochraceous Tawny</u> (R). |

El nombre específico, de rimosus, que significa agrietado, se eligió para hacer referencia al aspecto agrietado, fisurado, de algunas colorias.

5 Ha de entenderse que para la producción de nuestro nuevo antibiótico no deseamos limitarnos nosotros mismos a este organismo particular o a organismos que respondan plenamente a la anterior descripción que se da simplemente para fines ilustrativos. Deseamos especialmente incluir el uso de organismos que sean variaciones producidas a partir del organismo descrito por agentes de mutación tales como la radiación X, 10 la radiación ultra-violeta, las mostazas de nitrógeno, etc.

Los antibióticos producidos por organismos del género Streptomyces de los Actinomycetos, de los cuales son varios bien conocidos, caen generalmente en dos clases: (1) sustancias neutras que pueden extraerse desde caldos a pH ácido, 15 neutro y alcalino mediante disolventes, y (2) sustancias básicas que, en general, no pueden extraerse por disolventes orgánicos. El cloranfenicol es típico del primer grupo, y la estreptomycinina y la estreptotricina son típicos del segundo. 20 El antibiótico del presente invento es miembro del segundo grupo. Que sepamos, no se ha descrito un antibiótico de este grupo que posea estabilidad suficiente de modo que su base libre pueda extraerse a pH 9 por disolventes orgánicos, en particular, n-butanol. Esta propiedad sirve como medio sencillo, no solamente para distinguir la Terramicina de otros antibióticos, sino también como medio de purificación. 25

El nuevo antibiótico comparte con los antibióticos producidos por otros Streptomyces la propiedad de tener un am-

plio espectro antibiótico, particularmente entre las bacterias Gram-negativas.

La tabla siguiente muestra los espectros comparati-
vos de diversos preparados de estreptomina, estreptotricina,
5 cloramfenicol y aureomicina y del nuevo antibiótico del pre-
sente invento, terramicina. La potencia de los diversos pre-
parados antibióticos usados está expresada de dos modos: (1)
unidades de dilución de E. coli y/o (2) unidades de cloramfe-
nicol por milígramo. Por unidades de dilución de E. coli (CDU)
10 por milígramo, entendemos el volumen máximo de caldo nutricio
en mililitros al cual puede diluirse un milígramo del prepa-
rado antibiótico (que puede ser de grados variables de pure-
za) y, cuando se inocula con dilución 10^{-6} de un cultivo de
18 horas de E. coli cultivado en las mismas condiciones, to-
15 davía no muestra crecimiento bacteriano al final de 18 horas
de incubación a 37°. Por unidades de cloramfenicol (U.gloro.)
por milígramo queremos dar a entender el resultado de un aná-
lisis que usa como organismo de ensayo Klebsiella pneumoniae,
PCI 602 y, como medio de ensayo, caldo de ensayo de antibió-
20 ticos del Baltimore Biological Laboratory preparado de acuer-
do con la fórmula de la Food & Drug Administration para el
caldo de ensayo turbidimétrico de la estreptomina. El mé-
todo de ensayo es el de J. R. McMahan (J. Biol Chem., Vol 153,
páginas 249-258, Abril 1944) usando como patrón cloramfeni-
25 col cristalizado a 10 mgrs. por litro.

<u>E. typhosa</u> 544	1-2	6	4-10	7.5	1-5	< 5	2-6	12-20
<u>E. aeruginosa</u> 173	20-40	65	192-384	375-750	100- 1000	100	220-2200	200
<u>E. Paratyphi</u> <u>teriae</u> 131	1	4	4	7.5	< 0.5	< 5	2-6	4
<u>K. pneumoniae</u> 132	2	7	2	4	0.5-1.0	< 5	1	2
<u>E. paratyphi A.</u> 134	2-5	6-65	38-192	75-375	5-10	10	2-6	20-40
<u>E. pullorum</u> 135	2-5	6-65	38	75	10	10	6	40-200
<u>E. paratyphi</u> 139	2-5	6-65	38-192	75-375	5-10	5	22-110	20-40
<u>E. coli</u> 21	2-5	6-65	19-38	37	10	10	6	20-40
<u>A. aerogenes</u> 2	0.2-1.0	2	< 0.5	< 4	0.5	< 5	2-6	2-4
<u>Proteus Sp. 1</u>	20-40	130-190	384-3840	750- 7500	10	10	6-11	4-12
<u>Monilia al- bicans</u> 8	> 60	> 190	> 11,000	> 22,000	> 3,000	> 1,000	22-100	> 12,000
<u>E. aureus</u> 3	1-2	4-5	0.5	4	5-10	10	6-11	2-4
<u>E. albus</u> 5	1	4	38-192	75	5-10	10	6-11	2-2
<u>E. subtilis</u> 7	> 60	> 65	38-192	75-75	1-5	< 5	22-110	12
<u>E. mycoides</u> 18	0.2	0.6	< 0.5	< 4	1-5	< 5	110-220	12-20
<u>E. subtilis</u> 219	0.2-1.0	0.6-3	< 0.5	< 4	1-5	< 5	1-2	< 2

¹ Antibiótico del presente invento - Material impuro preparado como en el ejemplo II de esta solicitud, filtrándose el producto precipitado a pH 9, volviéndose a suspender en agua y secándose a partir del estado congelado.

² Aureomicina

- Hidrocloruro cristalizado.

³ Cloramfenicol

- Cristalizado

⁴ Estreptotricina

- Sulfato de estreptotricina (ex heliantato cristalizado, 800 u. de estreptomina/mgr.)

- | | | |
|---|-----------------|---|
| 1 | Aureomicina | -Hidrocloruro cristalizado. |
| 2 | Cloramfenicol | -Cristalizado. |
| 3 | Estreptotricina | -Sulfato de estreptotricina
(ex heliantato cristalizado,
800 u. de estreptomina/
mgr.) |
| 4 | Estreptomina | -Sulfato de estreptomina,
750 u. estr./mgr. |

Otro método para distinguir la Terramicina de otros antibióticos es por su acción sobre cepas de bacterias hechas resistentes a diversos antibióticos por transferencia en serie a caldos que contienen concentraciones progresivamente mayores de los antibióticos con relación a la cepa original que es sensible a todos los antibióticos. En el experimento siguiente, un disco estéril de 12 mm. de papel de filtro se sumergió en un caldo de cultivo de Terramicina y se colocó en el centro sobre la superficie de una placa de agar nutricio. Del disco se rayaron cultivos de A. aerogenes 1) sensible a cloramfenicol, estreptomina y estreptotricina, 2) resistente a estreptomina, 3) resistente a estreptotricina, 4) resistente a cloramfenicol. Después de 18 horas de incubación a 37°, se mostraron zonas de inhibición contra todos los cultivos, salvo aquél que era resistente al cloramfenicol, distinguiendo así el nuevo antibiótico de la estreptomina y la estreptotricina. El nuevo antibiótico se distinguió luego del cloramfenicol por análisis polarigráfico en el cual no se mostró la semi-onda característica del cloramfenicol (a pH 4.5, apro. -0.85 voltios contra la masa de mercurio, pero standardizada interiormente).

La toxicidad del nuevo antibiótico puede estimarse

5 con relación a otros antibióticos por las consideraciones siguientes. Un preparado del nuevo antibiótico, que dió en el análisis 255 u. de cloramfenicol/mgr. y 2.000 u. de estreptomina/mgr., resultó tener un ID_{50} de 3.5 mgrs. cuando se inyectó por vía intravenosa en un ratón de 20 grs., equivalente a 0.893 mgr. de cloramfenicol y 7 mgr. de estreptomina. Estos antibióticos tienen un ID_{50} para un ratón de 20 grs. respectivamente de 0.6 mgrs. y 2.5 mgrs..

10 La Terramicina puede distinguirse de la aureomicina por su modelo de extracción con disolvente. Una solución de aureomicina a pH de 2.0, 6.5 o 9.0 extraída mediante éter, n-butanol, acetato de etilo, metil isobutil cetona, benceno o cloroformo pierde su actividad, al paso que una solución del nuevo antibiótico puede extraerse sólo con n-butanol.

15 Análogamente, difiere la estabilidad al calor de los dos antibióticos.

Tabla II

% de actividad original.

pH	100° durante 15 minutos.		25° durante una hora	
	<u>Antibiótico del presente invento</u>	<u>Aureomicina</u>	<u>Antibiótico del presente invento.</u>	
2.0	40	80	100	
6.5	50	< 25	100	
25 9.0	80	< 25	100	

El comportamiento de diversos antibióticos sobre cromatogramas en papel, usando dos sistemas disolventes diferentes, operación a 28° durante 24 horas, se comparó usando B. subtilis como organismo de ensayo.

a 0.893 mgr. de cloramfenicol y 7 mgr. de estreptomisina. Es-
 tos antibióticos tienen un LD_0 para un ratón de 20 grs. respec-
 tivamente de 0.6 mgrs. y 2.5 mgrs. La forma cristalizada del
 nuevo antibiótico usada en vía intravenosa tiene un LD_0 de 3.0
 mgrs. por ratón de 20 grs. y un LD_{50} de 4 mgrs. por ratón de
 20 grs. En otros ensayos se ha comprobado que el LD_0 intrave-
 noso para el hidrocloreuro del nuevo antibiótico es equivalen-
 te a 103 mgrs. del compuesto anfótero cristalizado por Kg. de
 peso corporal en ratones, al paso que el LD_{50} es equivalente a
 192 mgrs. por Kgr. Es evidente que las impurezas presentes en
 el antibiótico impuro usado en lo que antecede tienen aproxi-
 madamente la misma toxicidad que el antibiótico mismo.

El nuevo antibiótico puede distinguirse de la aureo-
 micina por su método de extracción con disolvente. Una solu-
 ción de a-ureomicina a pH de 2.0, 6.5 o 9.0 extraída median-
 te éter, n-butanol, acetato de etilo, metil isobutil cetona,
 benceno o cloroformo pierde su actividad, al paso que una so-
 lución del nuevo antibiótico puede extraerse sólo con n-buta-
 nol. Análogamente, difiere la estabilidad al calor de los dos
 antibióticos.

Tabla III

% de actividad original.

pH	100° durante 15 minutos.		25° durante una hora	
	<u>Antibiótico del pre- sente invento</u>	<u>Aureomicina</u>	<u>Antibiótico del presente invento.</u>	
2.0	40	80	100	
6.5	50	< 25	100	
9.0	80	< 25	100	

El comportamiento de diversos antibióticos sobre cromatogramas en papel, usando dos sistemas disolventes diferentes, operación a 28° durante 24 horas, se comparó usando B. subtilis como organismo de ensayo.

5

Tablr. IV

Valores RF

Sistema

	<u>Agua saturada con n-butanol + 2% de ácido-p-toluenosulfónico + 2% de piperidina.</u>	<u>Agua saturada con n-butanol</u>
10	Antibiótico del presente invento extendido 0.0-0.5	extendido 0.0-0.1
	aureomicina - extendido 0.0-1.0	extendido 0.0-0.5
	cloramfenicol - 1.0	1.0
15	estreptomina A - 0.2	0.0
	Estreptotricina - 0.03	0.0

Este invento abarca un procedimiento para cultivar una nueva, y hasta ahora no descrita, especie de microorganismo, B. rinosus, con preferencia a 24-30°, en condiciones sumergidas de agitación y aireación, sobre medios consistentes en una fuente de carbohidratos, tales como azúcares, almidón, glicerol; una fuente de nitrógeno orgánico, tal como harina de habas de soja, gluten de trigo, harina de semilla de algodón, lactalbúmina, una digestión enzimática de caseína, tripton; una fuente de sustancias de crecimiento, tal como solubles de destilería, extracto de levadura; sales minerales, tales como cloruro de sodio, fosfato de potasio, sulfato de magnesio, nitrato de sodio; un agente tampón, tal como carbonato de calcio; y aceite vegetal. Una vez terminado el cultivo, el

20

25

5 micelio se separa del caldo que ahora contiene el antibiótico, y el antibiótico se recupera del caldo por extracción con disolventes orgánicos a un pH adecuado, o adsorbiendo el antibiótico desde el caldo sobre carbón activado y eluyéndolo desde el carbón por medio de disolventes orgánicos o agua a un pH adecuado, o por otros medios bien conocidos en la técnica. El nuevo antibiótico producido como se ha dicho, posee propiedades únicas y valiosas que lo distinguen de todos los antibióticos conocidos y anteriormente descritos.

10 Puede obtenerse inóculo empleando un cultivo en tubos inclinados o botellas de Roux inoculado con S. rimosus.

15 Medios sólidos adecuados para este cultivo inicial son la lactosa de buey o el agar de Emerson. Este cultivo se usa para inocular matraces agitados o depósitos de inóculo sumergido; o alternativamente, los depósitos de inóculo se inoculan desde los matraces agitados. Cualquier crecimiento en matraz agitado habrá alcanzado generalmente su máximo en 4 días, al paso que el inóculo en depósitos de inóculo sumergido estarán usualmente en el periodo más favorable en 2 días. Desde el

20 depósito de inóculo el caldo que contiene el microorganismo es forzado dentro del fermentador en condiciones completamente asepticas, y el crecimiento se continúa durante otro periodo de 2 días. En todo momento, la aireación se mantiene en los depósitos insuflando aire estéril a través de un inyector en la proporción de 1/2 - 2 volúmenes de aire libre por volumen de caldo por minuto. Si se experimentan dificultades para impedir la subida de la espuma dentro del depósito, pueden

añadirse agentes anti-espumantes tales como aceites vegetales o animales para fragmentar la espuma. Mientras el caldo es agitado a una velocidad que depende del tipo de agitador, se mantienen condiciones completamente asépticas y la temperatura del caldo agitado se conserva entre 24 y 30°.

El antibiótico puede recuperarse por diversos procedimientos diferentes del caldo de fermentación en el cual se ha formado. El micelio del caldo de fermentación debe separarse primero, y se ha comprobado que esto se realiza mejor haciendo la mezcla ácida, con preferencia por debajo de pH 4, y separando luego por filtración el micelio. Si este ajuste del pH no se hace, parte del antibiótico queda en el micelio.

El antibiótico puede recuperarse en forma purificada tratando el caldo de fermentación filtrado con carbón activado a pH cercano a la neutralidad. El antibiótico puede eluirse del adsorbente por medio de agua saturada con un alcohol parcialmente miscible con agua, tal como butanol, y ajustarse a un pH de 1.5 con un ácido, tal como el clorhídrico. Después de separar por filtración el adsorbente eluido, el pH del filtrado puede ajustarse a pH 6-9 y el antibiótico sólido puede recuperarse secando desde el estado congelado bajo vacío. Mejor que secando el filtrado, el antibiótico puede extraerse del mismo en butanol después de ajustar a un pH de 9 aproximadamente. El extracto en butanol puede ser luego concentrado para obtener antibiótico purificado o el extracto en butanol puede a su vez extraerse con un ácido acuoso, tal como clorhídrico diluido. Después de separación de la fase acuosa,

su pH puede ajustarse a 6-9 por la adición de una base o por tratamiento con un material de permutación aniónica, tal como Amberlite IR4 (un producto de la Resinous Products División de Rohm and Haas Company).

5 Mejor que adsorber el antibiótico del caldo filtrado sobre un adsorbente sólido, el antibiótico puede ser extraído del mismo en ciertos disolventes a un pH básico, con preferencia aproximadamente 9. Los disolventes que pueden usarse incluyen butanol, alcohol amílico y fenilcelulosa. Se ha comprobado también que el antibiótico puede extraerse a un pH ácido, con preferencia por debajo de 3,5. La fenilcelulosa puede usarse para esta finalidad. Después de extraer el antibiótico del caldo filtrado a pH 9 con butanol, el disolvente puede concentrarse bajo vacío a una fracción de su volumen original.

10 Al extraer el concentrado en butanol con ácido diluido, separación de las fases, y ajuste de la fase acuosa a pH 6-7, el antibiótico sólido se separa. Este producto puede filtrarse y secarse, después de lo cual tiene una potencia de aproximadamente 600 microgramos de antibiótico puro por miligramo.

15

20 A fin de medir la potencia de los productos purificados, el antibiótico puro en forma cristalizada preparado como luego se describe, se toma como patrón, con una potencia designada como 1000 microgramos por miligramo (mcgr./mgr.). El ensayo usa como organismo de prueba Klebsiella pneumoniae

25 PCI 602, y como medio de ensayo caldo de ensayo de antibióticos del Baltimore Biological Laboratory, preparado según la fórmula de la Food and Drug Administration para el caldo de ensa-

yo turbidimétrico de la estreptomocina. El método de ensayo es el de J. R. McMahan (J. Biol. Chem., Vol. 155, páginas 249-258, Abril 1944). Puede usarse también cloramfenicol cristalizado como patrón para la comparación, y se comprueba que cada miligramo de antibiótico cristalizado del invento tiene el equivalente en potencia de 3,15 mgrs. de cloramfenicol cristalizado.

El antibiótico cristalizado puede obtenerse desde el material sólido amorfo, tal como el producido por el proceso de recuperación antes detallado (potencia de unos 600-650 mgrs./mgr.). Esto se consigue ajustando el material bruto en agua a pH 2,8 con un ácido, tal como el clorhídrico, filtrando la solución resultante, y evaporando parcialmente la solución bajo vacío. Los cristales que se separan se filtran, se lavan y se secan. Dan en el análisis 850-900 mgrs./mgr.

En otro procedimiento para obtener el antibiótico cristalizado, el antibiótico bruto que da en el análisis 670 mgrs/mgr., se disuelve en ácido clorhídrico diluido a pH 2,5. La solución acuosa se filtra y trata con cloruro de sodio y poco más de la mitad de su volumen de alcohol butílico. Después de agitar la mezcla vigorosamente, el sólido que se separa se filtra. Se vuelve a disolver en metanol, y se añade un pequeño volumen de agua. Después de guardar durante la noche en una nevera, los cristales formados se filtran, se lavan y se secan. El material cristalizado obtenido de este modo da en el análisis aproximadamente 860 mgrs/mgr. y consiste en la base antibiótica combinada con cloruro de calcio.

Otro método de obtener el antibiótico cristalizado consiste en someter material amorfo que da en el análisis aproximadamente 650 mcgrs./mgr. a una distribución en contracorriente en la forma propuesta por Craig (J. Biol. Chem. 155, 519 (1946)). El sistema disolvente usado es agua ajustada a pH 3 con ácido clorhídrico y alcohol butílico. La fase acuosa de tubos seleccionados se evaporó bajo vacío para obtener cristales prismáticos blancos del antibiótico, que dieron en el análisis unos 950 mcgrs./mgr.

10 Pueden prepararse varias sales del antibiótico, la mayoría simplemente cambiando el ácido deseado, mineral u orgánico, al antibiótico en agua hasta que se obtenga una solución clara. Las sales sólidas pueden prepararse ajustando el pH de tal solución de sal del antibiótico a un punto justamente por debajo de aquél al cual el antibiótico comenzaría a separarse (aproximadamente 2,5). La solución puede secarse luego, por ejemplo, sometiendo la solución congelada a vacío.

15 Las sales ácidas cristalizadas del antibiótico se obtienen por evaporación de una solución de la sal en agua a un pH bajo.

20 Los ácidos minerales que pueden usarse son el clorhídrico, el sulfúrico y el fosfórico. Los ácidos orgánicos que pueden usarse son el cítrico, el tartárico, el glucónico, etc. Como quiera que el antibiótico es anfótero, pueden prepararse las sales de diversos elementos metálicos con el antibiótico, en particular, las sales metálicas alcalinas del antibiótico se forman tratando una suspensión acuosa del antibiótico con un hidróxido alcalino. Las sales metálicas sólidas

25

del antibiótico se obtienen por evaporación de una solución acuosa del antibiótico al pH adecuado.

5 Pueden usarse otros métodos diversos para purificar el antibiótico. Este puede extraerse del caldo de fermentación filtrado, como sal, con uno de un grupo de ácidos sulfónicos orgánicos. Puede precipitarse desde dichas soluciones acuosas ácidas del material bruto con ácido pícrico. El antibiótico puede también precipitarse de una solución diluida del material bruto por medio de un ácido arilazosulfónico a 10 un pH bajo, por ejemplo, Orange II a pH 2. El antibiótico puede recuperarse de la sal del colorante por reactivos tales como el cloruro de bario, que precipita la sal de bario del colorante dejando una solución del antibiótico, que puede secarse. Que otras sales metálicas permitirían también este efecto, es evidente. La potencia y color del antibiótico impuro 15 pueden mejorarse disolviéndolo en ácido mineral diluido y añadiendo solución de β -naftalen-sulfonato de amonio. El precipitado de color oscuro es filtrado y el pH del filtrado es elevado para obtener un precipitado del antibiótico de color 20 y potencia mejorados.

El antibiótico cristaliza en diversas formas, dependiendo del procedimiento usado en su preparación. Una de estas formas consiste en gruesas placas exagonales y una segunda forma en gruesas agujas. Los índices de refracción de 25 la primera de estas formas son $\alpha = 1,636 \pm 0,004$, $\beta = 1,648 \pm 0,004$, $\gamma =$ mayor de 1,700. La rotación óptica de una solución del compuesto cristalizado puro en metanol disminuye rápida-

mente al reposar a la temperatura ambiente. Si la rotación específica se lee poco después de preparar la solución, tiene el valor siguiente $[\alpha]_{D}^{25} = + 26^{\circ}$ (0,5% en metanol). La adición de cloruro de calcio a la solución metanólica determina un marcado cambio de la rotación específica, a un gran valor negativo. La combinación cristalizada del antibiótico y cloruro de calcio tiene también una gran rotación específica negativa en metanol. La rotación específica en ácido clorhídrico diluido es $[\alpha]_{D}^{25} = -196^{\circ}$ (0,5% en ácido clorhídrico N/10).

Cuando el espectro de absorción de ultravioleta de una muestra del antibiótico cristalizado se determina (espectrofotómetro de cuarzo de Beckman - modelo DU) en solución acuosa diluida, M/10 en fosfato dihidrogenado de potasio (pH 4,5) en células de 1 centímetro, se encuentran los siguientes máximos:

ϵ	1%	a	353,2 m μ	ν	= 277
	1 cm.	"	"	"	= 299
	"	"	247,5 "	"	= 236

Cuando el espectro de absorción de ultravioleta del antibiótico se determina en ácido fosfórico diluido a pH 1,7, los siguientes son los máximos:

ϵ	1%	a	352,5 m μ	ν	= 277
	1 cm.	"	"	"	= 379

El antibiótico es un compuesto anfótero que contiene grupos débilmente básicos y débilmente ácidos. Contiene los elementos carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno. Los análisis químicos de material cristalizado dieron en promedio 53.05% de carbono, 5.91% de hidrógeno, 5,64% de nitrógeno, y

55,4% de oxígeno (por diferencia). El material está exento de cenizas. Tiene un punto de fusión de aproximadamente 185°, con alguna descomposición que ocurre a esa temperatura. Es soluble en metanol, etanol, acetona y glicol propilénico, en agua en la medida de 0,25 grs. por ml. a 25°, y es insoluble en éter y éter de petróleo.

El antibiótico cristalizado mezclado en aceite mineral muestra muchas bandas características de absorción en el infrarrojo. Entre estas están las frecuencias siguientes (en recíprocos de centímetros): 3460, 3360, 1590, 1518, 1280, 1242, 1122, 1090, 1076, 1054, 1031, 1012, 938, 863, 839, 772, 705, 679. Esta determinación se hizo sobre una mezcla de aceite mineral con el material.

Las propiedades anteriores muestran que el nuevo antibiótico de este invento es distintamente diferente de cualquiera de los antibióticos conocidos.

Los ejemplos siguientes se dan como ilustraciones de la forma en la cual el nuevo antibiótico puede ser formado, recuperado, concentrado, purificado y, finalmente, convertido a la forma pura, cristalizada. El antibiótico cristalizado y las sales cristalizadas del antibiótico son de valor particular a causa de su gran pureza y eficacia. Los ejemplos dados lo son a título meramente ilustrativo y no han de interpretarse como limitadores del invento. Se usó en todos ellos una cepa de *Streptomyces rimosus* designada como número aislado S5279.

Ejemplo I

Formación y Recuperación del antibiótico.

Medio:

	Harina de habas de soja	10	gramos.
	Carolesa	10	"
5	Solubles de destilería	0,5	"
	Cloruro de sodio	5	"
	Agua destilada, hasta	1.000 ml.	-

El pH se ajustó a 7 con hidróxido de sodio y se añadió carbonato de calcio en proporción de 1 gr/l.

10 Porciones de 500 ml. del citado medio se enflacionaron a matraces de Fernbach que se esterilizaron luego a 121° durante 30 minutos. Al enfriar, los matraces se inocularon con una suspensión del cultivo de S. rimosus obtenido de la superficie de cultivos inclinados en agar-lactosa de busy y los matraces se agitaron durante 4 días a 28° sobre un agitador rotativo con un desplazamiento de 51 mm. a cada rpm. de 200. Al final de este período, el caldo resultó contener 640 GDU/ml. y 400 unidades de cloranfenicol/ml. El micelio se separó del caldo por filtración, y el líquido se ajustó a pH 9. El antibiótico se extrajo del caldo con n-butanol, y cuando se observó el espectro de absorción de ultravioleta sobre la solución en butanol del antibiótico, se descubrieron crestas en la curva de absorción a 385 y 270 milimicrones.

Ejemplo II

25 Formación y recuperación de antibiótico bruto.

Medio:

	Harina de habas de soja	30	grm.
	Fécula de maíz	5	"
	N-Z-amina B (digestión enzimática de caseína)	1	"
30	Nitrato de sodio	3	"
	Agua del grifo, hasta	1.000 ml.	-

El pH se ajustó a 7 gramos de carbonato de calcio se añadieron a cada litro.

5 Porciones de dos litros de tal medio se pusieron en varios jarros de vidrio de 4 litros, que tenían agitadores e inyectores para la admisión de aire estéril. Los aparatos y el medio se esterilizaron a 121° durante una hora. Después de enfriar, se inocularon con 50 ml. de una suspensión de S. rinosus. Después de 40 horas de agitación a 1800 rpm., el caldo resultó tener 1600 u. de cloranfenicol/ml. y 1230-2560 ODU/ml.

10

Siata litros de caldo preparado como arriba se describe se separaron del micelio por filtración y se ajustó a pH 7. Se añadieron setenta gramos de Norit A (un carbón activado) y el conjunto se agitó a la temperatura ambiente durante una hora. El caldo agotado se separó del carbón que ahora contiene el antibiótico, por filtración, y la torta se lavó con agua destilada. El antibiótico se eluyó del carbón activado con un litro de agua destilada saturada de n-butanol y se ajustó a pH 1,5 con ácido clorhídrico. El eluato se ajustó a pH 9 y se extrajo con un litro de n-butanol. La capa de butanol se separó de la fase acuosa y se extrajo con ácido clorhídrico normal 1/10 normal. La capa acuosa ácida se separó del butanol y se llevó de nuevo a pH 5 agitando con Amberlite IR-4 (una resina de permutación iónica). La resina de permutación iónica se separó de la solución del antibiótico por filtración, y la última se secó por congelación dando 2 grs. de un polvo amorfo pardo-amarillento. Este pre-

15

20

25

parado dió en el análisis 255 unidades de cloramfenicol/mgr.
y 2.000 unidades de estreptomisina/mgr.

Ejemplo III

Formación del antibiótico.

5

Medio del inóculo:

	N-Z-amina-B (digestión enzimática de caseína)	1 %	
	Gelosa	1 %	
	Extracto de levadura	0,5 %	%
	Cloruro de sodio	0,5 %	
10	carbonato de calcio	0,1 %	

En agua del grifo y ajustado a pH de 6,7 con KOH.

Se compusieron 1.000 litros del citado medio en un depósito de 1500 litros para inóculo y se mantuvieron a 121° durante una hora. Después de enfriamiento a 28°, el medio se inoculó con un litro de una suspensión de *S. rimosus*. El depósito se aireó y agitó durante un período de 25 horas en cuyo momento se usó para inocular el fermentador.

El medio del fermentador se compuso como sigue:

20	Harina de habas de soja	3 %	
	Fécula de maíz	0,5 %	%
	N-Z-amina-B	0,1 %	
	Nitrato de sodio	0,3 %	
	Carbonato de calcio	0,5 %	
	Acquite vegetal	0,4 %	

25 En agua de grifo, pH ajustado a 7 y esterilizado manteniéndolo a una temperatura de 121° C durante 1 hora.

Después de enfriamiento a 28°, el medio del fermentador se inoculó con el contenido del depósito de inóculo descrito antes. Al final de 47 horas, el pH había subido a 8, y el caldo resultó tener una potencia de 335 unidades de cloramfenicol o 280 ODU/ml.

30

Ejemplo IV

Recuperación de antibiótico desde el caldo por adsorción.

5 Siete litros de un caldo de fermentación del anti-
biótico, filtrado del micelio de fermentación a un pH menor de
4, y que dió en el análisis 190 mgrs./ml., se ajustaron a pH
7, y se añadieron 70 grs. de Norit A (un carbón activado fabri-
cado por la American Norit Company). Después de agitación du-
rante una hora, el carbón se filtró y se lavó con agua. El an-
tibiótico se eluyó del adsorbente por medio de agua saturada
con butanol y se ajustó a pH 1,5 con ácido clorhídrico. El e-
luato se ajustó a pH 9, y luego el antibiótico se extrajo en
10 butanol. La fase butanol se reextrajo con un pequeño volumen
de ácido clorhídrico N/10, y el pH de la solución acuosa se
ajustó a 5 por medio de Amberlite IR.4 (una resina sintética
de permutación aniónica manufacturada por la Resinous Products
Division de la Rohm and Haas Company). El antibiótico se re-
cuperó como sólido secando la solución acuosa desde el estado
15 congelado. Pesó 1,5 grs. y dió en el análisis unos 80 mgrs/
mgr.

Ejemplo V

Recuperación de antibiótico desde el caldo por extracción.

20 Ocho litros de un caldo de fermentación del anti-
biótico se ajustaron a pH 2,5 con ácido sulfúrico y el micelio
se filtró. El filtrado contenía 2.400.000 mgrs. del antibió-
tico. Se ajustó a pH 9 y se extrajo con tres litros de buta-
nol en diversas porciones y los extractos combinados contenían
25 1.600.000 mgrs. del antibiótico. Los extractos en butanol se
concentraron bajo vacío a 650 ml. cuya solución contenía 2.400
mgrs./ml. del antibiótico. La solución en butanol se extrajo

5 con un litro de ácido clorhídrico N/10 en diversas porciones, y las fases acuosas combinadas se ajustaron a pH 7,5 con hidróxido sódico diluido. El producto precipitado se filtró y se secó. Pesaba 1.69 grs. y tenía una potencia de 625 mcgrs/mgr. del antibiótico.

Ejemplo VI

Preparación de antibiótico cristalizado.

10 Se disolvió antibiótico amorfo (20 grs.) que daba 625 mcgrs/mgr. en 400 ml. de agua, añadiendo ácido clorhídrico hasta que el pH era de 2,5. La solución filtrada tenía un volumen de 480 ml. y daba 26.400 mcgrs/ml. Después de la adición de 50 grs. de cloruro de sodio y 300 ml. de butanol húmedo, la mezcla se agitó a fondo. El precipitado sólido se filtró y disolvió en 150 ml. de metanol. La solución metanólica daba 31.000 mcgrs/ml. Al añadir 5 ml. de agua, comenzó a formarse el antibiótico cristalizado. Se añadieron otros 20 ml. de agua, y la mezcla se guardó durante la noche en una nevera. El producto seco, filtrado, pesó 5,8. Dió en el análisis 860 mcgrs/mgr.

20 Ejemplo VII

Preparación de antibiótico cristalizado por distribución en contra-corriente.

25 Antibiótico amorfo que daba 640 mcgrs/mgr. se disolvió en agua ajustando el pH a 3 aproximadamente con ácido clorhídrico. La solución se saturó con butanol y luego se sometió a una distribución en contra-corriente con nueve embudos de separación, usando volúmenes iguales de butanol húmedo y ácido clorhídrico diluido (pH 3) saturado con butanol. Cada

una de las fases acuosa y butanol se comprobó en cuanto a su potencia y las fases acuosas de los embudos 6 y 7 se seleccionaron. Se combinaron éstas y se concentraron bajo vacío a un pequeño volumen. Los cristales blancos que se separaron se centrifugaron y lavaron con agua, acetona, y éter, sucesivamente. El producto seco dió 954 mgrs/mgr.

Ejemplo VIII

Preparación del hidrocioruro del antibiótico.

El antibiótico de cualquier pureza puede convertirse en el hidrocioruro tratando el material en agua con ácido clorhídrico hasta que se obtiene una solución clara. El pH de la solución se ajusta luego a un valor cercano a 2,5. La solución se congela y se seca bajo vacío para dar un polvo fácilmente soluble.

El modelo de difracción a los rayos X del hidrocioruro cristalizado pulverizado del antibiótico se ha determinado en una cámara de Philips de 57,3 mm. de radio usando radiación alfa de cobre K.

Los siguientes son los espaciamientos aproximados cristalinos en el plano (d en Å) calculados por las líneas más intensas registradas en una película fotográfica y la intensidad relativa aproximada (I) de éstas, usando la línea más intensa como 1.00.

I	$d, \text{Å}$
0,9	10,52
0,8	9,39
0,6	8,50
0,2	5,26

1,0	4,19
0,5	3,92
0,2	3,20

Ejemplo IX

5 Preparación de la sal sódica del antibiótico.

El antibiótico de cualquier pureza puede convertirse en la sal sódica tratando el material en agua con hidróxido sódico hasta que el pH está por encima de 9,5. La solución se congela luego y se seca bajo vacío para dar la sal sódica 10 seca en forma de polvo soluble en agua.

En los ejemplos que anteceden ha de entenderse que las composiciones de los medios de cultivo son meramente ilustrativas y pueden variarse dentro de límites relativamente amplios como, por ejemplo, sustituyendo la harina de habas de soja 15 por lactalbúmina, harina de linaza, harina de semillas de algodón, harina de cacahuete, proteína de maíz, gluten de trigo, etc. Análogamente, las condiciones de fermentación, tales como agitación, proporciones de aireación, temperaturas, etc., pueden variarse en medida considerable. Además, a los técnicos 20 se les ocurrirán muchos métodos y variaciones alternativas de los descritos para recuperar, concentrar y purificar el antibiótico y sus sales. Tal método alternativo de recuperación consistiría en adsorber el antibiótico directamente del caldo de fermentación sobre resinas de permutación iónica. Como 25 es el caso con la aureomicina y el cloramfenicol, el nuevo antibiótico es activo in vivo lo mismo que in vitro y muestra una marcada actividad quimioterápica contra infección expri-

5 tal en ratones, debida a Streptococcus hemolyticus, D. pneumonias, K. pneumonias, S. typhosa y otros organismos. El nuevo antibiótico posee actividad definida antirickettsial en el huevo de gallina embrionado, y en concentraciones elevadas impide la infección del embrión de pollo con la cepa PR8 del virus Influenza A.

10 Nuestro nuevo antibiótico, como puede verse por los datos que anteceden, es de gran valor en el tratamiento de diversas infecciones en hombres y animales. Puede administrarse por inyección parenteral, oralmente o tópicamente en las formas dosificadas acostumbradas.

15 Pueden hacerse modificaciones al llevar a cabo este invento sin apartarse por ello del espíritu y alcance del mismo, y la protección obtenida sólo ha de entenderse limitada por el lenguaje expreso de las reivindicaciones anejas.

20 Esta solicitud, que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 13 de Octubre de 1949, bajo el Número 121.233, y el 28 de Noviembre de 1949, bajo el Número 129.868, se recoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto Ley sobre Propiedad Industrial.

--- F O T A ---

Los puntos de invención propia y nueva que se pre-

sentan para que sean objeto de esta Patente de Invención en España, son los siguientes:

5 1º. Un procedimiento para producir un antibiótico, que comprende cultivar una cepa de Streptomyces rimosus en una solución acuosa de carbohidrato que contiene material nutritivo, en condiciones aeróbicas sumergidas, hasta que se comunique actividad antibacteriana sustancial a dicha solución, recuperar luego del caldo de fermentación el antibiótico así producido.

10 2º. Un procedimiento para producir un antibiótico, que comprende cultivar una cepa de Streptomyces rimosus en un medio acuoso de cultivo que contiene una sustancia favorecedora del crecimiento y mantenido en condiciones de crecimiento aeróbico sumergido a una temperatura de entre unos 24º a unos 30º, durante un período de desde unos 2 días a una semana, y recuperar luego del caldo de fermentación el antibiótico así producido.

15 3º. Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1º. o 2º., en el cual la recuperación del antibiótico incluye la operación de adsorción sobre carbón activado.

20 4º. Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1º. o 2º., en el cual la recuperación del antibiótico incluye la operación de extraer el antibiótico en un disolvente orgánico inmiscible con agua en condiciones ligeramente alcalinas.

25 5º. Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1º. o 2º., en el cual la recuperación del antibiótico incluye la operación de extraer el antibiótico en un disolven-

te orgánico inmiscible con agua, en condiciones fuertemente ácidas.

5 6°. Los procedimientos de producir un antibiótico, en esencia como se han descrito en lo que antecede, con referencia a los ejemplos.

7°. El nuevo antibiótico, siempre que se haya producido por un procedimiento según cualquiera de los puntos anteriores.

8°. Una sal del antibiótico según el punto 7°.

10 9°. El antibiótico según se reivindica en el punto 7°, en forma cristalizada.

10°. Sales ácidas cristalizadas del antibiótico según se reivindica en el punto 7°.

15 11°. Sales metálicas cristalizadas del antibiótico según se reivindica en el punto 7°.

12°. El nuevo antibiótico y sales del mismo, con las características expuestas en esta Memoria de un antibiótico obtenido cultivando una cepa de Streptomyces rimosus.

20 13°. El nuevo antibiótico, y sales del mismo, en esencia como se han descrito en esta Memoria.

14°. Un procedimiento para producir un antibiótico.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veintinueve hojas, y la presente escritas a máquina por una sola cara.

Madrid a

P. A. 22 1950

Alberto de Ezaburu

Por Poder

Ezaburu