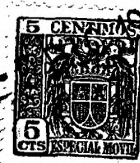


194434

P.- 8365.-

01 55.855 - Case 129868 Div.-

5 DIC. 1950



**MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL**

194434

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud
de

CERTIFICADO DE ADICION

formulada el 1º. de Septiembre de 1950, bajo el Nº 194434,

en

ESPAÑA

por: "MEJORAS INTRODUCIDAS EN EL OBJETO DE LA PATENTE PRIN-
CIPAL" número 192.461, presentada el 8 de Abril de 1950,
por: "Un procedimiento para producir un antibiótico"
a nombre de CHAS. PFIZER & CO/ INC., entidad norteamericana,
establecida en 11 Bartlett Street, Brooklyn, Nueva York, Esta-
dos Unidos de América,

Este invento se refiere a un antibiótico nuevo y
útil, denominado terrestatina, y a su producción. Más parti-
cularmente, se refiere a procedimientos para su producción por
fermentación, a métodos para su recuperación y concentración
a partir de soluciones impuras que incluyen los caldos de fer-
mentación, purificación del mismo, y la producción de sus sa-
les. El invento abarca el antibiótico y sus sales en solucio-

5



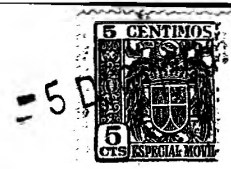
nes diluídas, como concentrados impuros, y en forma pura cristalizada.

Nuestro nuevo antibiótico es formado durante el cultivo, en condiciones controladas, de una especie, no descrita 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.

Las características de cultivo de esta especie, próxima al S. albus, pero diferente en diversos particulares, basadas en el número aislado S3279, 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.

	<u>Medio</u>	<u>Magnitud de crecimiento</u>	<u>Color</u>		<u>Observaciones</u>
			<u>Micelio aéreo y esporas</u>	<u>Pigmento soluble</u>	
20	Placas de glucosa-agar-asparagina	moderado a bueno, principalmente sumergido	Entre blanco y <u>Pallid Quaker Drab</u> (R)	Amari-llento 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 si-
25					
30					
35					

194434



milares. Colonias aisladas, escamosas, de sistemas dispersos de grandes aglomerados de espirales; olor térreo.

5	Gelatina	Moderado	Blanco	Ninguno	Liquefacci�n moderada.
10	Lechada de tor-nasol (28 ^o)	Bueno, película gruesa.	Blanco gri-s�ceo	Parte in-ferior del tubo más clara que el control	Sin hidrolisis o peptonizaci�n. pH inalterado.
15	(37 ^o)	Muy bueno	Blanco-grisáceo	Parte su-perior del l�qui-do casi negra.	Sin hidrolisis o peptonizaci�n. pH alterado de 6.1 a 6.6-7.02.
20	Glucosa-agar	Moderado, seco su-perficie agrietada por el cre-cimiento continuado de hifas vegeta-tivas.	más cla-ro que <u>Pallid mouse</u> <u>Gray</u> (R)	Pardo amari-lento.	Reverso cerca del <u>zinc-Orange</u> (R) y <u>Ochraceous Orange</u> (R).
25					
30	Agar nutri-cio.	Escaso	Sin mi-celio aéreo, muy des-ceroso.	Amari-lento muy des-vaido.	Reverso cerca de gamuza y <u>Honey Ye-llow</u> (R).
35	Masa de patata	Moderado, arrugado.	Blancuz-co a <u>Pa-llid Quaker</u> <u>Drab</u> (R)	Pardo li-geramen-te ama-rillento.	Micelio cerca de <u>Ochraceous Tawny</u> (R).
40	Malato de cal-cio.	Escaso, plano.	Sin micelio aéreo; colo-nia cer-ca del <u>Mars Ye-llow</u> (R).	Nin-guno.	
45	Placas de f�-cula.	Escaso, delgado.	Muy poco micelio aéreo; co-lonia cer-ca del <u>Light Cinnamon</u> <u>Drab</u> (R).	Ninguno.	Ligera hidrólisis.
50					

194434

-50



	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 masa cerca del <u>Honey Yellow</u> a <u>Zinc Orange</u> u <u>Ochraceous Orange</u> (R).	Amarillento pálido (R) pardo.	Reverso cerca del <u>Zinc-Orange</u> .
10					
15					
20	Caldo de nitrato de dextrosa.	moderado con una película.		Amerillo.	Reducción del nitrato de débil a fuerte en tubos diferentes.

Esta especie difiere del S. albus en lo siguiente:

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

S. rimosus

	1. Micelio aéreo abundante.	1. Micelio aéreo escaso.
25	2. Micelio aéreo blanco.	2. Micelio aéreo no blanco puro sino cerca de <u>Pallid Quaker Drab</u> (R).
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.
	5. Sobre agar sintético, crecimiento abundante y extendido.	5. No hay crecimiento sobre agar sintético.
45	6. Colonias sobre patata, blancas,	6. El micelio está próximo al <u>Ochraceous Tawny</u> (R).

194434



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

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, la radiación ultra-violeta, las mostazas de nitrógeno, etc.

10 La terrestacina comparte con los antibióticos producidos por otros Streptomyces la propiedad de tener un amplio espectro antibiótico, particularmente entre las bacterias Gram-negativas. Entre los organismos cuyo crecimiento es impedido por concentraciones muy bajas del nuevo antibiótico están los siguientes:

15 Aerobacter aerogenes, Aerobacter aerogenes resistentes a la estreptotricina, Salmonella paratyphi A, Salmonella paratyphi A resistente a la estreptomycinina, Salmonella paratyphi B, Salmonella paratyphi B resistente al cloramfenicol, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus albus, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Bacillus mycoides, Eberthella typhosa, Shigella paradysenteriae, Klebsiella pneumoniae y Salmonella pullorum.

25 La tabla siguiente muestra los espectros comparativos de diversos preparados de estreptomycinina, estreptotricina, cloramfenicol y aureomicina y del nuevo antibiótico del pre-

194434

=5 DIS



sente invento. La potencia de los diversos preparados anti-
 bióticos usados está expresada de dos modos: (1) unidades de
 dilución de E. coli y/o (2) unidades de cloranfenicol por mi-
 lígramo. Por unidades de dilución de E. coli (CDU) por mili-
 5 gramo, entendemos el volúmen máximo de caldo nutricio en mili-
 litros al cual puede diluirse un miligramo del preparado anti-
 biótico (que puede ser de grados variables de pureza) y, cuan-
 do se inocula con dilución 10^{-6} de un cultivo de 18 horas de
E. coli cultivado en las mismas condiciones, todavía no mues-
 10 tra crecimiento bacteriano al final de 18 horas de incubación
 a 37°. Por unidades de cloramfenicol (U.Cloro.) por milígra-
 mo queremos dar a entender el resultado de un análisis que use
 como organismo de ensayo Klebsiella pneumoniae, PCI 602 y, co-
 mo medio de ensayo, caldo de ensayo de antibióticos del Balti-
 15 more Biological Laboratory preparado de acuerdo con la fórmu-
 la de la Food & Drug Administration para el caldo de ensayo
 turbidimétrico de la estreptomina. El método de ensayo es
 el de J. R. McMahan (J. Biol. Chem., Vol. 153, páginas 249-258, •
 Abril 1944) usando como patrón cloramfenicol cristalizado a
 20 10 mgrs. por litro.

Tabla I

Concentraciones de preparado antibiótico por mililitro de agar
 nutricio requeridas para impedir el crecimiento bacteriano so-
 bre la superficie de discos de Petri.

	Terrestacina		1 aureomicina		2 cloramfenicol.		3 estrep- totricina		4 es- trep- tomi- cina	
	CDU	cloro	CDU	Cloro	CDU	cloro	CDU	CDU	CDU	CDU
30	mgr.	u/mgr.	mgr.	u/mgr.	mgr.	u/mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.
	20	65	3840	7500	1000	1000	2200	4000		
	CDU	Cloro u.	CDU	Cloro u.	CDU	cloro u.	CDU	CDU		

194434

=5D1



<u>E.typhosa</u> 344	1-2	6	4-10	7.5	1-5	< 5	2-6	12-20
<u>Ps.aeruginosa</u> 173	20-40	< 65	192-384	375-750	100-1000	100	220-2200	200
<u>S.Paradysen- 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>S.paratyphi A.</u> 134	2-5	6-65	38-192	75-375	5-10	10	2-6	20-40
<u>S.pullorum</u> 136	2-5	6-65	38	75	10	10	6	40-200
<u>S.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>Prcteus Sp.</u> 1	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>S.aureus</u> 3	1-2	4-5	0.5	4	5-10	10	6-11	2-4
<u>S.albus</u> 5	1	4	38-192	75	5-10	10	6-11	2-2
<u>B. subtilis</u> 7	> 60	> 65	38-192	7.5-75	1-5	< 5	22-110	12
<u>B.mycooides</u> 18	0.2	0.6	< 0.5	< 4	1-5	< 5	110-220	12-20
<u>B.subtilis</u> 219	0.2-1.0	0.6-3	< 0.5	< 4	1-5	< 5	1-2	< 2

¹Terrestacina

- 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.

²Aureomicina

- Hidrocloruro cristalizado.

³Cloramfenicol

- Cristalizado

⁴Estreptotricina

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

⁵Estreptomina

- Sulfato de estreptomina, 750 u. estr./mgr.



Es de interés adicional la actividad puesta en evidencia contra una serie de microorganismos cuando se emplea la forma cristalizada del antibiótico. La tabla siguiente da los resultados obtenidos. Se apreciará que cualquiera variaciones entre los resultados con el material impuro y el producto cristalizado pueden atribuirse a las impurezas presentes en el material bruto.

Tabla II

Peso de terrestacina en forma cristalizada que determina la inhibición completa del organismo de ensayo.

<u>Especie</u>	<u>mcgr./ml.</u>
<u>A. aerogenes</u>	1.0
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	3.0
<u>E. coli</u>	5.0
<u>E. typhosa</u>	3.0
<u>S. paratyphi A</u>	1.0
<u>S. paratyphi B</u>	1.0
<u>S. paradysenteriae</u>	1.0
<u>S. pullorum</u>	10.0
<u>B. subtilis (FDA 219)</u>	3.0
<u>S. albus</u>	1.0
<u>S. aureus</u>	1.0
<u>M. albicans</u>	1000

Otro método para distinguir la terrestacina de otros 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 sen-

194434 -5 DIC



sible 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 del antibiótico 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, estreptomycinina y estreptotricina, 2) resistente a estreptomycinina, 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 aquel que era resistente al cloramfenicol, distinguiendo así el nuevo antibiótico de la estreptomycinina 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, apr. -0.85 voltios contra la masa de mercurio, pero **standardizada** interiormente).

La toxicidad de la terrestacina puede estimarse 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 estreptomycinina/mgr., resultó tener un LD₀ 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 estreptomycinina. Estos antibióticos tienen un LD₀ para un ratón de 20 grs. respectivamente de 0.6 mgrs. y 2.5 mgrs. La forma cristalizada del nuevo antibiótico usada en vía intravenosa tiene un LD₀ de 3.0 mgrs. por ratón de 20 grs. y un LD₅₀ de 4 mgrs. por ratón de 20 grs. En otros ensayos se ha comprobado que el LD₀ intravenoso para el hidrocloreto del nuevo antibiótico es equi-

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

194434

=5D1



5 valente a 103 mgrs. del compuesto anfótero cristalizado por Kg. de peso corporal en ratones, al paso que el LD₅₀ es equivalente a 192 mgrs. por Kgr. Es evidente que las impurezas presentes en el antibiótico impuro usado en lo que antecede tienen aproximadamente la misma toxicidad que el antibiótico mismo.

10 La terrestacina 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. Análogamente, difiere la estabilidad al calor de los dos antibióticos.

15

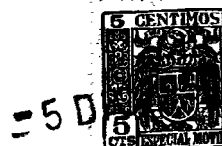
Tabla III

% de actividad original.

pH	100° durante 15 minutos.		25° durante una hora
	<u>Terrestacina</u>	<u>Aureomicina</u>	<u>Terrestacina</u>
2.0	40	80	100
20 6.5	50	< 25	100
9.0	80	< 25	100

25 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.

194434

Tabla IVValores RFSistema

5	<u>Agua saturada con n-butanol + 2% de ácido p-toluenosulfónico + 2% de piperidina.</u>	<u>Agua saturada con n-butanol</u>
	Terrestacina	
	extendida 0.0-0.5	extendido 0.0-0.1
	aureomicina - extendida 0.0-1.0	extendido 0.0-0.5
10	cloramfenicol - 1.0	1.0
	estreptomocina A - 0.2	0.0
	Estreptotricina - 0.03	0.0

15 Este invento abarca un procedimiento para cultivar una nueva, y hasta ahora no descrita, especie de microorganismo,, *S. rimosus*, 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

20 harina de habas de soja, gluten de trigo, harina de semilla de algodón, lactalbúmina, una digestión enzimática de caseína, ~~na~~triptona; 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

25 magnesio, nitrato de sodio; un agente tampón, tal como carbonato de calcio; y aceite vegetal. Una vez terminado el cultivo, el 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.

Puede obtenerse inóculo empleando un cultivo en tubos inclinados o botellas de Roux inoculado con S. rimosus. 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 depósito de inóculo el caldo que contiene el microorganismo es forzado dentro del fermentador en condiciones completamente asépticas, 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°.

194434

-5 D



La terrestacina 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.

La terrestacina 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 con 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).

Mejor que adsorber el antibiótico del caldo filtrado sobre un adsorbente sólido, el antibiótico puede ser ex-

194434

-501



5 traído 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
10 pH ácido, con preferencia por debajo de 3,5. La fenilcelulo-
sa puede usarse para esta finalidad. Después de extraer el
antibiótico del caldo filtrado a pH 9 con butanol, el disol-
vente puede concentrarse bajo vacío a una fracción de su vo-
lúmen original. Al extraer el concentrado en butanol con áci-
do diluido, separación de las fases, y ajuste de la fase acuo-
sa a pH 6-7, el antibiótico sólido se separa. Este producto
puede filtrarse y secarse, después de lo cual tiene una poten-
cia de aproximadamente 600 microgramos de antibiótico puro por
miligramo.

15 A fin de medir la potencia de los productos puri-
ficados, 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
20 PCI 602, y como medio de ensayo caldo de ensayo de antibióti-
cos del Baltimore Biological Laboratory, preparado según la fór-
mula de la Food and Drug Administration para el caldo de ensa-
yo tubidimétrico de la estreptomina. El método de ensayo es
el de J. R. McMahan (J. Biol. Chem., Vol. 153, páginas 249-258,
25 Abril 1944). Puede usarse también cloramfenicol cristalizado
como patrón para la comparación, y se comprueba que cada milí-
gramo de antibiótico cristalizado del invento tiene el equiva-
lente en potencia de 3,15 mgrs. de cloramfenicol cristalizado.



La terrestacina cristalizada puede obtenerse desde el material sólido amorfo, tal como el producido por el proceso de recuperación antes detallado (potencia de unos 600-650 mcgrs./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 mcgrs./mgr.

En otro procedimiento para obtener la terrestacina cristalizada, el antibiótico bruto que da en el análisis 670 mcgrs./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 mcgrs/mgr. y consiste en la base antibiótico combinada con cloruro de calcio.

Otro método de obtener terrestacina cristalizada 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.

Pueden prepararse varias sales de terrestacina, la mayoría simplemente añadiendo 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. Las sales ácidas cristalizadas del antibiótico se obtienen por evaporación de una solución de la sal en agua a un pH bajo. 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 del antibiótico se obtienen por evaporación de una solución acuosa del antibiótico al pH adecuado.

Pueden usarse otros métodos diversos para purificar la terrestacina. Esta puede extractarse 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 diluí-



da del material bruto por medio de un ácido arilazosulfónico a 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 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 y potencia mejorados.

La terrestacina cristaliza en diversas formas, dependiendo del procedimiento usado en su preparación. Una de estas formas consiste en gruesas placas hexagonales y una segunda forma en gruesas agujas. Los índices de refracción de 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 rápidamente 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).

194434



Cuando el espectro de absorción de ultravioleta de una muestra de la terrestacina cristalizada se determina (espectrofotómetro de cuarzo de Beckmann - modelo DU) en solución acuosa diluida, M/10 en fosfato dihidrogenado de potasio (pH 4,5) en celdas de 1 centímetro, se encuentran los siguientes máximos:

10	E 1%	a 353,2 m μ	= 277
	1 cm.	" 275,0 "	= 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:

15	E 1%	a 352,5 m μ	= 277
	1 cm.	" 267,5 "	= 379

La terrestacina 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 35,4% 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.

La terrestacina cristalizada mezclada en aceite mineral muestra muchas bandas características de absorción en el infra-rojo. Entre estas están las frecuencias siguientes (en recíprocos de centímetros): 3460, 3360, 1590, 1318, 1280, 1242,

MALA REPRODUCCION
POR USO DEL ORIGINAL

194434



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.

5 Las propiedades anteriores muestran que la terrestacina es distintamente diferente de cualquiera de los antibióticos conocidos.

10 Los ejemplos siguientes se dan como ilustraciones de la forma en la cual la terrestacina puede ser formada, recuperada, concentrada, purificada y, finalmente, convertida a la forma pura cristalizada. La terrestacina cristalizada y las sales cristalizadas de la terrestacina 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 15 una cepa de Streptomyces rimosus designada como número aislado S3279.

Ejemplo I

Formación y Recuperación de terrestacina.

Medio:

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

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

30 Por-ciones de 500 ml. del citado medio se añadieron 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



-5

superficie de cultivos inclinados en agar-lactosa de buey y los matracas 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 periodo, el caldo resultó contener 640 CDU/ml. y 400 unidades de cloramfenicol/ml. El micelio se separó del caldo por filtración, y el último 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

Formación y recuperación de terrestacina bruta.

Medio:

Harina de habas de soja	30	grs.
Fécula de maíz	5	"
N-Z-amina B (digestión enzimática de caseína	1	"
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.

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. rimosus. Después de 40 hora-s de agitación a 1800 rpm., el caldo resultó tener 1600 u. de cloramfenicol/ml. y 1280-2560 CDU/ml.

Siete 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 preparado dió en el análisis 255 unidades de cloramfenicol/mgr. y 2.000 unidades de estreptomomicina/mgr.

Ejemplo III

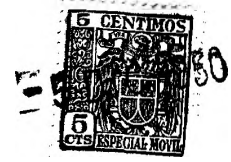
Formación de terrestacina

Medio del inóculo:

N-Z-amina-B (digestión enzimática de caseína)	1	%
Cerelesa	1	%
Extracto de levadura	0,5	%
Cloruro de sodio	0,5	%
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 de 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:

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

10 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 inculó 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 CDU/ml.

Ejemplo IV

Recuperación de terrestacina desde el caldo por adsorción.

20 Siete litros de un caldo de fermentación del antibiótico, filtrado del micelio de fermentación a un pH menor de 4, y que dió en el análisis 190 mcgrs./ml., se ajustaron a pH 7, y se añadieron 70 grs. de Norit A (un carbón activado fabricado por la American Norit Company). Después de agitación durante una hora, el carbón se filtró y se lavó con agua.

25 El antibiótico se eluyó del adsorbente por medio de agua saturada con butanol, y se ajustó a pH 1,5 con ácido clorhídrico. El eluato se ajustó a pH 9, y luego el antibiótico se extrajo en 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 Resi-

194434



nous Products Division de la Rohm and Haas Company). El anti-
biótico se recuperó como sólido secando la solución acuosa
desde el estado congelado. Pesó 1,5 grs. y dió en el análi-
sis unos 80 mcgrs/mgr.

5 Ejemplo V

Recuperación de terrestacina desde el caldo por extracción.

Ocho litros de un caldo de fermentación del anti-
biótico se ajustaron a pH 2,5 con ácido sulfúrico y el mico-
lio se filtró. El filtrado contenía 2.400.000 mcgrs. del an-
10 tibiótico. Se ajustó a pH 9 y se extrajo con tres litros de
butanol en diversas porciones y los extractos combinados con-
tenían 1,600,000 mcgrs. del antibiótico. Los extractos en bu-
tanol se concentraron bajo vacío a 650 ml. cuya solución con-
tenía 2.400 mcgrs/ml. del antibiótico. La solución en buta-
15 nol se extrajo con un litro de ácido clorhídrico N/10 en di-
versas porciones, y las fases acuosas combinadas se ajustaron
a pH 7,5 con hidróxido sódico diluido. El producto precipita-
do se filtró y se secó. Pesaba 1.69 grs. y tenía una poten-
cia de 625 mcgrs/mgr. del antibiótico.

20 Ejemplo VI

Preparación de terrestacina cristalizada.

Se disolvió terrestacina amorfa (20 grs.) que da-
ba 625 mcgrs/mgr. en 400 mls. de agua, añadiendo ácido clorhí-
drico hasta que el pH era de 2,5. La solución filtrada tenía
25 un volumen de 480 mls. y daba 26.400 mcgrs/ml. Después de la
adición de 50 grs. de cloruro de sodio y 300 mls. de butanol
húmedo, la mezcla se agitó a fondo. El precipitado sólido se
filtró y disolvió en 150 mls. de metanol. La solución metanó-

-194434

-5 DIO



lica daba 31.000 mcgrs/ml. Al añadir 5 mls. de agua, comenzó a formarse el antibiótico cristalizado. Se añadieron otros 20 mls. 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.

Ejemplo VII

Preparación de terrestacina cristalizada por distribución en contra-corriente.

Terrestacina amorfa 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 mcgrs/mgr.

Ejemplo VIII

Preparación del hidrocloreuro de terrestacina.

La terrestacina de cualquier pureza puede convertirse en el hidrocloreuro 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 hidro-

194434



cloruro 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 espaciamentos 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	$d. \text{Å}$
10	0,9	10,32
	0,8	9,39
	0,6	8,30
	0,2	5,26
	1,0	4,19
15	0,5	3,92
	0,2	3,20

Ejemplo IX

Preparación de la sal sódica de terrestacina.

La terrestacina 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 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 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 se les ocurrirán muchos métodos y variaciones alternativos 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.

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.

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

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

---- N O T A ----

Los puntos de invención propia y nueva que se pre-



sentan par-a que sean objeto de este Certificado de Adición,
en España, son los siguientes:

5 1º. Un procedimiento para producir un antibióti-
co según la Patente número 192.461, que comprende cultivar una
cepa de Streptomyces rimosus en una solución acuosa de carbohi-
drato, que contiene material nutricio, en condiciones aerobias,
hasta que se comuniqué a dicha solución una actividad antibac-
teriana sustancial, y recuperar luego el antibiótico así pro-
ducido, del caldo de fermentación, en forma purificada.

10 2º. Un procedimiento para producir un antibióti-
co según la Patente número 192.461, que comprende cultivar una
cepa de Streptomyces rimosus en un medio de cultivo acuoso que
contiene una sustancia favorecedora del crecimiento y manteni-
do en condiciones de crecimiento aeróbico sumergido a una tem-
peratura desde unos 24º C a unos 30º C durante un período des-
15 de unos 2 días a una semana, y recuperar luego el antibiótico
así producido, del caldo de fermentación, en forma purificada.

20 3º. Un procedimiento según se reivindica en los
puntos 1º. ó 2º., en el cual la recuperación del antibiótico
incluye la operación de adsorción sobre carbón activado.

25 4º. Un procedimiento según se reivindica en los
puntos 1º. ó 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 ligeramente al-
calinas.

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

194434

-5



te orgánico inmiscible con agua en condiciones fuertemente ácidas.

5 6º. Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos anteriores, que incluye la operación de convertir el antibiótico a la forma cristalizada.

7º. Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos anteriores, que incluye la operación de formar una sal metálica o ácida del antibiótico.

10 8º. Mejoras introducidas en el objeto de la Patente principal número 192.461.

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

Esta Memoria consta de veintiocho hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid a

-5 DIC. 1950

P. A.

Alberto de Elzaburu

Por Poder

M/L/L.