

200922



200922

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a

la solicitud de

una PATENTE DE INVENCION por VEINTE AÑOS en ESPAÑA

a favor de

ABBOTT LABORATORIES, residente en NORTH CHICAGO (Illinois) ESTADOS UNIDOS, 14th Street and Sheridan Road,

por

" UN NUEVO PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UN COMPUESTO DE MATERIA ANTIBIOTICA M2 ".

//////

200922



La presente invención está relacionada con compuestos bioquímicos y mas particularmente con un nuevo antibiótico y el nuevo proceso de preparar el mismo.

Nuestra invención también comprende el proceso de producir substancias efectivas en la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos incluyendo el Mycobacterium tuberculosis, siendo dichas substancias seleccionadas de un material consistente en una substancia de carácter ácido, precipitable en ácidos, y soluble en alcali acuoso, siendo dicha substancia substancialmente no difusible y estando caracterizada por un peso molecular de la magnitud de aproximadamente 10,000, exhibiendo un máximo de absorbción al espectro ultra-violeta aproximadamente a 260 m/^μ y estando además caracterizado por un E de aproximadamente 70 y exhibiendo una banda de absorbción característica en la región infrarroja del espectro al ser suspendida en un aceite hidrocarbonado a las siguientes frecuencias expresadas en centímetros recíprocos:

15	1008	1282
	1100	1739
	1121	3390

y las sales alcalinas de dicha substancia, las cuales comprende la producción de un cultivo de Streptomyces arenae en un medio nutritivo acuoso y el someter el medio a aereación y agitación.

Se sabe desde hace algún tiempo que se pueden producir substancias antibióticas cultivando ciertas especies o cepas de microorganismos en varios tipos de medios nutritivos. Bien conocidos ejemplos son la formación de las penicilinas por cultivo o fermentación del Penicillium notatum, la formación de estreptomocina por una cepa del Streptomyces griseus, y más recientemente la formación de aureomicina por una cepa del Streptomyces aureofaciens.

200022



El organismo productor del antibiótico de la presente invención
fue aislado de una muestra de tierra colectada de la región arenosa de Illinois
State Beach cerca de Zion, Illinois, Estados Unidos de América. Es una cepa
30 de una especie del género Streptomyces llamado ahora Streptomyces arenae y
sus características, cuando se cultiva en varios medios, son las siguientes:

Triptona, extracto de carne de vaca, extracto de leva-
35 dura, cerelesa agar - crecimiento moderado, micelio del
substrato castaño oscuro, micelio aéreo blanco que se
torna gris con esporos.

Peptona, extracto de carne de vaca, cerelesa, cloruro de
sodio agar - crecimiento moderado, micelio del substrato
40 castaño dorado, micelio aéreo blanco gris que se torna
gris oscuro con los esporos, pigmentos hidrosolubles castaño
claros.

Harina de avena agar - crecimiento exuberante, micelio
del substrato castaño-amarillo que se torna anaranjado-
castaño oscuro con el tiempo, esporos gris oscuro, gotitas
superficiales, pigmento hidrosoluble castaño.

45 Agar - escaso crecimiento, micelio del substrato crema,
micelio aéreo mullido, no pigmento hidrosoluble.

Malato de calcio agar - micelio del substrato color crema
que se vuelve castaño rojizo brillante con el tiempo,
micelio aéreo mullido color crema que se vuelve gris con tono
50 rosado, pigmento soluble rosado claro, disolución completa
del malato de calcio.

Dextrosa as, aragina agar - crecimiento escaso, micelio
del substrato castaño dorado que desarrolla unos pocos
agregados pequeños de micelio aéreo blanco y unas pocas

200922



55

colonias elevadas del micelio amarillo más pronunciado, pigmento hidrosoluble amarillo.

Leche tornasol - gruesa película que reduce el tornasol en siete días, leche completamente digerida en veinticinco-veintiocho días con formación de cuajaron justamente antes de completarse la digestión, pigmento soluble castaño oscuro que se torna negro en 30 días.

60

Almidón agar - el almidón se hidroliza lentamente, el margen de la zona hidrolizada no bien definido.

65

Gelatina nutritiva - gruesa película de micelio gris en la superficie, pigmento hidrosoluble rojo-castaño intenso que se disfiende hasta donde llega la licuefacción; la mitad del tube se liquida en 22 días.

70

Taco de patata - crecimiento abundante, extenso, micelio del substrato castaño dorado que se torna castaño oscuro, esporos gris muy oscuro, micelio aéreo mullido, patata gris oscura tornándose negra.

Nitrato agar - prueba de acumulación de nitrato, negativa.

75

Agar hierro de Kligler - crecimiento moderado de un micelio gris oscuro, formándose ácido sulfhídrico.

Agar sintético Czapek - crecimiento exhuberante, muy plegado y surcado, micelio del substrato amarillo que se vuleve anaranjado-castaño oscuro con el tiempo, micelio aéreo blanco grizoso, pigmento soluble amarillo-castaño claro.

80

Descripcion de la colonia - (en el primero de los medios



200022

mencionados) - colonias de tamaño mediano, micelio del aéreo gris claro, gotitas ámbar en la superficie de la colonia, pigmento soluble castaño intenso.

85 El crecimiento de la colonia toma la forma de una pequeña depresión en el centro de la colonia, con cuatro depresiones lineales radiales que dividen la colonia en 4 sectores. Según el crecimiento continúa, la colonia es dividida en 8 sectores por las mismas

90 depresiones radiales y el centro de la colonia se eleva.

Las siguientes fuentes de carbon sostienen un buen crecimiento: silosa, glucosa, manosa, galactosa, lactosa, maltosa, sucrosa, almidon, manitol, glicerol, acetato de sodio, citrato de sodio, y tartrato de sodio y potasio. No se utilizaron sorbitol o lactato de calcio como fuentes de carbón. Las

95 siguientes fuentes de nitrógeno sostuvieron el crecimiento: nitrato de sodio, orto-fosfato diamónico, urea, aspargina, triptófano, y arginina. La tirosina no sostuvo el crecimiento del Streptomyces arenae.

La esporulación de los cultivos ocurre en una variedad de medios. Se observó la esporulación más intensa en harina de avena-agar, taco de

100 patata, y malato de calcio-agar. El micelio esporulante es de color gris. Los esporos que se producen en abundancia por la fragmentación del micelio aéreo son de forma esférica u oval y son producidos en largas cadenas en espirales apretados. El micelio está caracterizado por ramificación monopódica con todos los extremos esporulantes terminados en espirales apretados.

105 El micelio aéreo no esporulante es ramificado pero no tiene espirales.

En un medio nutritivo líquido incubado en un mezclador rotatorio continuo a 24-26° C., el organismo crece como un gránulo muy pequeño o como gránulos irregulares y produce un pigmento hidrosoluble naranja-castaño oscuro. El antibiótico producido es soluble en agua e inhibe los microorganismos en

200022



110 la misma forma característica de los cultivos en placas de agar.

Puesto que el antibiótico es relativamente no difusible, se desarrolló una prueba turbidimétrica. Se empleó como norma (standard) una preparación parcialmente purificada y seca del antibiótico, a la cual se le asignó un valor en unidades de dilución de agar.

115 Al probarse con el procedimiento de la dilución de agar se obtuvieron resultados tan altos como 320 unidades de dilución, empleando Mycobacterium tuberculosis A.T.C.C. 607 como organismo de prueba.

La producción del antibiótico por crecimiento del organismo en cultivos batidos es ilustrado por el siguiente ejemplo.

120

EJEMPLO I

Un medio nutritivo que contiene:

Harina de soya	15 gms.
Cloruro de sodio	5 gms.
Cereales	15 gms.
Carbonato de calcio	1 gm.
Agua destilada	1000 ml.

125

es dispensado en volúmenes de 150 mls. en frascos de Erlenmeyer de 500 mls. Los frascos son tapados con algodón y esterilizados en un autoclave a 250° F. durante 30 minutos. Después de enfriar los frascos a temperatura ambiente,

130

cada frasco es inoculado con 1 ml. de una suspensión de esporos del Streptomyces arenae. La suspensión de esporos es obtenida suspendiendo los esporos de un cultivo inclinado de agar en 3-5 mls. de agua estéril. Los frascos son colocados en un batidor rotatorio que opera a 220-240 rpm. con un golpe o recorrido de 2 1/4 pulgadas, a una temperatura de 24-26° C.

135

Después de 48 horas se transfieren 6 mls. del cultivo a frascos con un medio fresco de la misma composición. Estos frascos son incubados en la misma forma durante 48 horas.

200922



Un medio nutritivo de la siguiente composición:

140	Levadura	2 gms.
	Licor de maiz macerado (húmedo)	10 gms.
	Cereales	25 gms.
	Harina de soya	15 gms.
	Cloruro de Sodio	3 gms.
	Nitrato de amonio	1 gm.
	Carbonato de calcio	2 gms.
145	Agua	1000 mls.

es distribuido en volúmenes de 125 mls. en frascos de Erlenmeyer de 500 mls.

Los frascos son esterilizados en el autoclave a 250° F. por 30 minutos.

Después de enfriarlos cada frasco es inoculado con 5 mls. del segundo cultivo de 48 horas, descrito anteriormente. Los frascos son colocados en el batidor rotatorio e incubados a 24-26° C. A los tres días de incubación se comienzan a obtener muestras diarias para determinar la actividad antibiótica. La actividad antibiótica es medida en términos de unidades de dilución de agar del Mycobacterium tuberculosis A.T.C.C. 607. Los resultados son mostrados en la siguiente tabla:

155

160

<u>Días de Incubación</u>	<u>Unidades por ml. de Actividad Antibiótica</u>
3	7.5
4	40
5	140
6	240
7	320

Las fermentaciones llevadas a cabo en tanques de 500 galones de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente dieron rendimientos de 500 unidades, y hasta por encima de 1000, por ml.

BUENA REPRODUCCION
POR FOTOCOPIADO DEL ORIGINAL



165

EJEMPLO II

Aislamiento del Antibiótico

170

La cerveza o licor fermentado obtenida según lo anterior de los grandes fermentadores es primero filtrada y el micelio húmedo insoluble es entonces extraído con alcohol etílico a un pH neutro. La extracción inicial puede también llevarse a cabo dentro de los pH de 4.0-10.0 usando otros solventes orgánicos, incluyendo metanol, acetona, butanol, y butanol terciario.

175

En las investigaciones iniciales, la actividad de la cerveza, después de filtración, se encontraba en el filtrado, recuperándose un solvente no miscible con agua para la extracción. Al presente, sin embargo, se ha encontrado que el 90-95% de la actividad está unida en alguna manera al micelio y la extracción es por lo tanto llevada a cabo mejor en la actualidad después de remover el filtrado. Sin embargo, si así se desea, se puede extraer la cerveza misma junto con el micelio con un solvente no miscible con agua tal como el butanol, tratando el extracto según se describe más adelante para recobrar el antibiótico.

180

El extracto del solvente acuoso-orgánico obtenido según lo anterior es concentrado a una solución acuosa la cual es a su vez extraída con cloroformo. La extracción en cloroformo en esta fase puede también ser llevada a cabo en una gran variedad de pH, aproximadamente entre 2.0 y 10.0.

185

El extracto cloroformico obtenido según lo anterior es entonces cromatografiado en un gel de sílice anhidro adsorbente, del tipo vendido por G. Frederick Smith Co. de Columbus, Ohio, E.U.A. Unos 2000 gramos en 4000 mls. de extracto cloroformico que tiene 500 unidades por miligramo por 4500 gms. de gel de sílice ha resultado satisfactorio.

200922



190 Para separar la actividad de las impurezas se lava el gel con
cloroformo que contiene crecientes cantidades de metanol. La mayor parte del
material no deseado permanece en el gel y un poco precede al antibiótico
a lo largo de las separaciones fraccionadas en cloroformo-metanol. Al remover
el solvente de las fracciones activas de cloroformo-metanol, se obtiene la
195 composición seca del antibiótico que tiene una actividad de 2000 a 5000
unidades por miligramo, medido por el método de la dilución de agar usando
los organismos anteriormente referidos Mycobacterium tuberculosis 607.
Repetiendo el tratamiento cromatográfico con un adsorbente tal como el
silicato de magnesio, se pueden obtener potencias de 5000 hasta 10,000
200 unidades de dilución de agar por ml.

En lugar del método de adsorción descrito anteriormente, se puede
usar carbón activado (tal como el que se vende bajo la marca registrada,
Darco G-60) para adsorber el antibiótico del extracto cloroformico. En este
caso el antibiótico es recobrado por levigación con una mezcla de metanol
205 (80%) - cloroformo (20%) que contenga ácido clorhídrico decinormal. Un
producto comercial de gel de sílice se ha encontrado que no es satisfactorio.
Se pueden hacer, sin embargo, pruebas preliminares para determinar que gels
tienen las propiedades adsorbtivas selectivas deseadas.

Nuestro método de extracción preferido actualmente consiste en
210 una extracción del micelio en un alcohol corto tal como el alcohol etílico,
al 50-80%. El extracto alcohólico es evaporado a un pequeño volumen. La
solución acuosa restante es entonces extraída con butanol a un pH de 2-4.
El material activo es entonces re-extraído en agua a un pH de 10. Se puede
realizar una purificación más avanzada volviendo a extraer en butanol a un
215 pH bajo y después extrayendo de nuevo en agua a un pH alto.

200922



220 Ha sido mostrado por distribución contra la corriente entre agua y butanol que hay por lo menos dos componentes separados en esta mezcla de antibióticos, uno de los cuales es más soluble en butanol a un pH neutral, y uno que es más soluble en agua. Los dos pueden ser separados por extracción en un solvente, y las pruebas muestran que ambas fracciones tienen actividad contra el Mycobacterium tuberculosis y contra el Staphylococcus aureus.

235 La composición de antibióticos obtenida según lo anterior es algo impura y parece estar hecha de una mezcla de compuestos. Ha sido obtenida, sin embargo, con una potencia de unas 5,000 y hasta 10,000 unidades de dilución de agar por miligramo, y por ejemplo, se requiere aproximadamente 0.1 microgramos por ml. en agar para inhibir el crecimiento del Mycobacterium tuberculosis, según se ha explicado anteriormente, y es adaptable para ser usada en su forma impura. Es aproximadamente de 2 a 5 veces más activa, a base de peso, que la estreptomycin, cuando se prueba por los métodos de dilución de agar o caldo.

235 La nueva composición antibiótica tiene propiedades acídicas; se disuelve en álcalis diluidos, como por ejemplo en hidróxido de sodio acuoso, para formar sales de metales alcalinos tales como la sal sódica, y se precipita por acidificación. Las sales de los metales alcalinos son solubles. Otras sales tales como las de cobre, calcio, magnesio, y plomo son insolubles y pueden ser usadas para la purificación del antibiótico. No da la prueba característica de biuret de las proteínas. El antibiótico no pasa al través de una membrana de celofano y la medida de la presión osmótica indica que tiene un peso molecular de la orden o magnitud de aproximadamente 10,000. El que el 240 antibiótico no dé zonas de inhibición cuando se prueba por el método usual disco-placa usado para la determinación de sustancias de peso molecular bajo tales como la estreptomycin, la penicilina, y las similares, es debido a su no-difusibilidad. El espectro antibacteriano es dado a continuación en forma de tabla.

200922



245	<u>Organismos</u>	<u>Unidades de antibiótico por ml. de agar requeridas para la inhibición</u>
	Staphylococcus albus	20
	Staphylococcus aureus	20
	Escherichia coli	>640
	Bacillus subtilis	40
250	Pseudomonas fluorescens	>640
	Serratia marcescens	>640
	Aerobacter aerogenes	>640
	Proteus vulgaris	>640
	Bacillus mycoides	2.5
255	Streptococcus fecalis	40
	Monilia albicans	>640
	Eberthella typhosa	>640
	Salmonella paratyphi	>640
	Salmonella schottmuelleri	>640
260	Shigella dysenteriae	>640
	Klebsiella pneumoniae	>640
	Neisseria catarrhalis	>640
	Streptococcus pyogenes	40
	Brucella abortus	640
265	Corynebacterium diphtheriae	10
	Hemophilus pertussis	>640
	Brucella bronchiseptica	>640
	Mycobacterium tuberculosis	0.63
	Mycobacterium phlei	0.63
270	Bacillus bodenheimer	>640
	Staphylococcus aureus, estreptomina resistente	10
	Staphylococcus aureus, estreptotricina resistente	20

275 El espectro de absorción ultravioleta muestra un maximum característico aproximadamente a 260 m/ μ el cual parece estar asociado con la actividad antibiotica puesto que está presente en todas las composiciones hechas según ha sido descrito anteriormente. Las composiciones antibioticas de alta potencia también muestran un E_{1%} de aproximadamente 70.

280 El espectro de absorción infrarrojo de la composición antibiotica de la presente invención es mostrado en el dibujo que se acompaña. Las bandas características de absorción en la región infrarroja del espectro al ser suspendido en un aceite hidrocarbonado aparece en las siguientes frecuencias expresadas en centímetros reciprocos.

200822



285 1008 1282
 1100 1739
 1121 3390

290 Debido a su alto peso molecular, el antibiótico no muestra un punto de fusión definitivo. Sin embargo, se comienza a oscurecer a aproximadamente 170° C. y se carboniza un poco por encima de 200° C. Debido a su naturaleza ácida es adsorbido por los agentes de intercambio aniónico y puede ser separado de los mismos. Las investigaciones muestran que las composiciones preparadas como se describen anteriormente, contienen hidrógeno, carbón, algo de nitrógeno y menos de 1% de azufre, pero no contienen fósforo.

295 La pruebas electroforéticas han demostrado que la composición antibiótica de la presente invención está cargada negativamente. La prueba de la anthrona también indica que la composición en su presente estado de pureza contiene una cantidad considerable de carbohidratos. Cuando se añade acetato de plomo acuoso a una solución acuosa del antibiótico que contenga 30,000 u/cc., se forma un precipitado que contiene aproximadamente 99.6% de la actividad. El licor residual sólo contiene 15 u/cc. La actividad puede ser regenerada añadiendo ácido sulfhídrico o ácido sulfúrico en un solvente tal como acetona, metanol, n-butanol, butanol terciario, etanol denaturado (tres-A), etc.

305 La invención puede ser adaptada fácilmente para ser usada bajo varias condiciones de servicio, empleando uno o más de las nuevas características descubiertas o sus equivalentes. Al presente, aconsejados con respecto al aparente alcance de nuestra invención, nosotros deseamos reclamar lo siguiente:



NOTA

Habiendo ahora descrito y determinado particularmente la naturaleza de nuestra mencionada invención y en qué forma la misma es ejecutada declaramos que lo que reivindicamos es:

315 1).- Un nuevo procedimiento para preparar un compuesto de materia antibiótica M2, que comprende el proceso de producir substancias efectivas para la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos incluyendo el Mycobacterium tuberculosis, siendo dichas substancias seleccionadas de un material que consiste en una substancia que es de carácter ácido, precipitable en ácidos, soluble en álcali acuoso, siendo 320 dicha substancia substancialmente no difusible y estando caracterizada por un peso molecular de la magnitud de aproximadamente 10.000, exhibiendo un máximo de absorción al espectro ultravioleta a aproximadamente 260 m/ μ , y estando además 325 caracterizada por un E 1% de cerca de 70 y exhibiendo una banda de absorción característica en la región infrarroja del espectro al ser suspendida en un aceite hidrocarbonado a las siguientes frecuencias expresadas en centímetros recíprocos:

330	1008	1282
	1100	1739
	1121	3390

y las sales alcalinas de dichas substancias lo cual comprende: introducir un cultivo de Streptomyces arenae en un medio acuoso nutritivo y someter el medio a aereación y agitación.

335 2).- Un nuevo procedimiento, según la reivindicación 1, que comprende: la inoculación de un medio nutritivo acuoso con un cultivo de Streptomyces arenae, permitiendo que la fermentación aeróbica tenga lugar a una temperatura de 24 a 26 $^{\circ}$ C. y recobrando el antibiótico de los productos de fermentación.

340 3).- Un nuevo procedimiento, según reivindicaciones 1 y 2, que comprende el proceso de acuerdo con el cual la fermentación



tación es llevada a cabo por un periodo de por lo menos 48 horas.

345 4).- Un nuevo procedimiento, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, cuyo proceso comprende el medio nutritivo conteniendo una fuente de carbón y nitrógeno utilizable por el Streptomyces arenae.

350 5).- Un nuevo procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 4, en el cual el medio contiene harina de soya y una fuente de minerales similarable por el organismo.

6).- Un nuevo procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 4, en el cual el medio nutritivo contiene harina de soya y cerelesa.

355 7).- Un nuevo procedimiento, de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, en el cual el medio nutritivo también contiene carbonato de calcio.

360 8).- Un nuevo procedimiento, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, cuyo proceso incluye la extracción de antibiótico del micelio de fermentación con un alcohol corto, tal como el etanol, seguido de extracción en agua, extracción en cloroformo o N-butanol, absorción cromatográfica y separación subsiguiente.

365 9).- Un nuevo procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 8, en el cual la absorción cromatográfica tiene lugar en un gel de sílice anhidro y la separación se hace con una mezcla de cloroformo y metanol.

370 10).- Un nuevo procedimiento, de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, en el cual el antibiótico es recobrado del micelio de fermentación por extracción con etanol 50% a 80%, el etanol primero a un pH 2 a 4 entonces reextraída con butanol primero a un pH 2 a 4 y entonces reextraída con agua a un pH de 10.

200922



11).- Se reivindica, por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:

375

"UN NUEVO PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UN COMPUESTO DE MATERIA ANTIBIOTICA M2".

Todo conforme queda descrito en la presente Memoria, que consta de quince hojas escritas a máquina y dibujos que se acompañan.

380

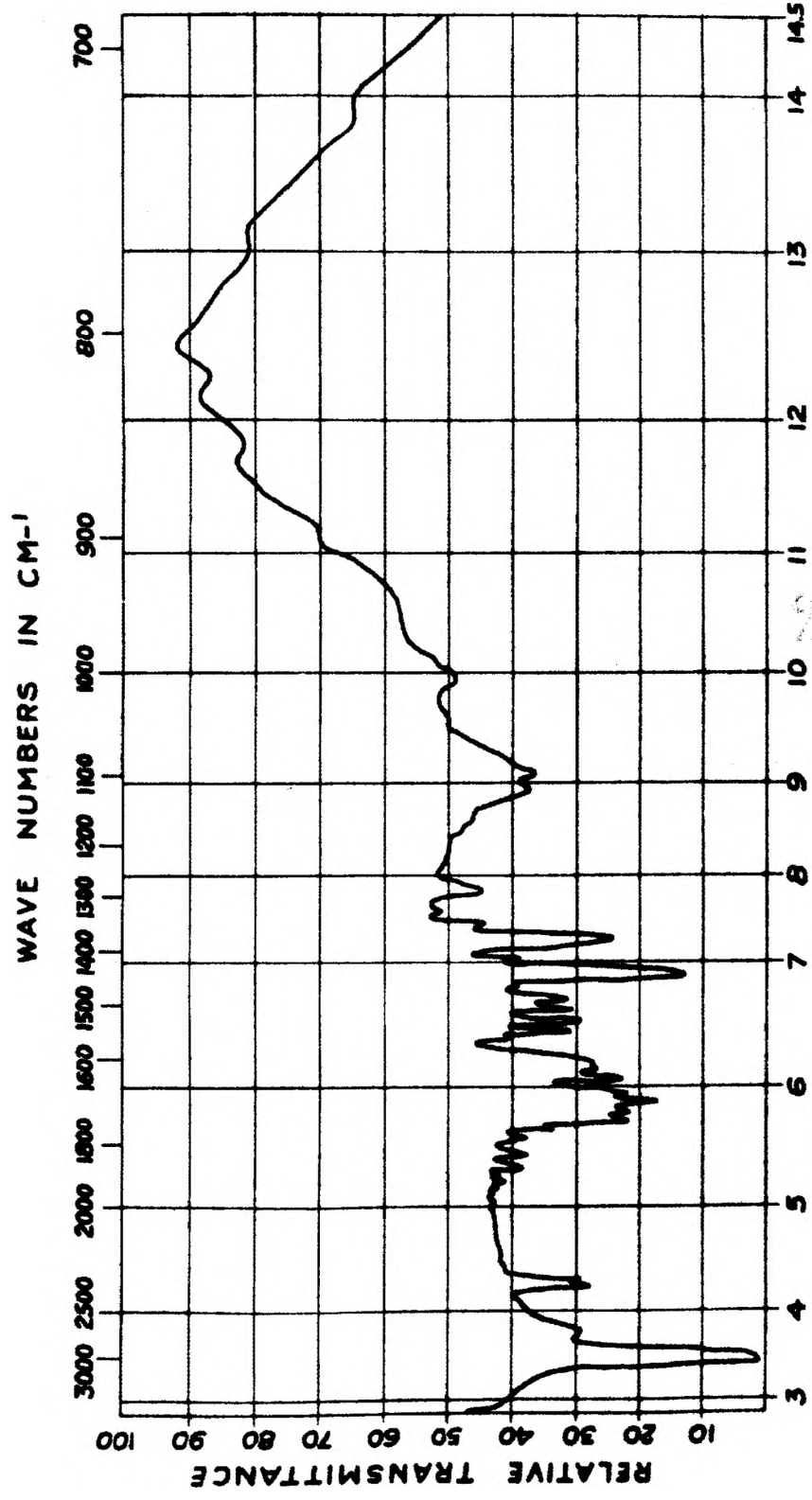
Madrid, 13 diciembre de 1952.

ALFONSO UNGRIA

Hoja única

200922

Abbott Laboratories



INFRARED SPECTRUM OF COMPOSITION OF MATTER

0922

ESCALA VARIABLE
 MADRID, 16 DE ~~diembre~~ 1951.
 ESPIONSO VINCIA
Amfura