

206514

206514

100



**MEMORIA DESCRIPTIVA**

que se acompaña a  
la solicitud de

una PATENTE de INVENCION por VEINTE AÑOS en ESPAÑA, a favor de BRISTOL LABORATORIES Inc., domiciliados en Thompson Road, SYRACUSE - N.Y. - EE.UU. por:- "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ANFOMICINA".

Prioridad:- Solicitud Ser. Nr 258.524, depositada en Estados Unidos, el 27 de noviembre 1951.

Inventores:- Bernard HEINEMANN; Murray A. KAPLAN e Irving R. HOOPER, los tres de nacionalidad norteamericana.

-----0000000-----



5.- La presente invención se refiere a un nuevo y útil antibiótico, llamado "Anfomicina", y a la producción del mismo. Más particularmente se hace referencia a los procesos empleados para su producción mediante la fermentación, métodos para su recuperación y concentración a partir de soluciones en bruto, incluyendo los caldos de fermentación, purificación de éstos y la producción de sales de sus formas ácidas y básicas. La invención se ocupa del antibiótico y sus sales en soluciones diluidas, como concentrados en bruto y en su forma sólida, más purificada.

10.- Al citar durante la presente descripción "la Anfomicina" ó "el antibiótico" se entenderá que así se refiere a una sola sustancia, o bien a un grupo de sustancias íntimamente ligadas, cuya relación entre sí se define por su análoga formación y comportamiento durante los procesos para su aislamiento y purificación según se describe a continuación.

15.- Durante los últimos pocos años han sido aislados cierto número de productos metabólicos de la recolección de bacterias y hongos, y se ha encontrado que éstos poseen importantes propiedades terapéuticas. Entre éstos se puede citar, la penicilina, estreptomina, gramicina, tirocidina, bacitracina, subtilina, estreptotricina, aureomicina y otros. Algunos de éstos han probado ser de enorme importancia a causa de su eficacia para combatir los organismos patogénicos. Otros en cambio ofrecen una utilidad limitada, en virtud de su toxicidad.

20.- La penicilina es un miembro prominente del grupo de antibióticos previamente descritos, los cuales principalmente son eficaces para combatir los organismos grampositivos. Sin embargo, la penicilina exhibe varios aspectos de debilidad. Así pues, la penicilina resulta tóxica para ciertos enfermos, es relativamente inactiva oralmente, inestable en la presencia del agua, inactivada por la penicilinasas, y tiende a perder sus propiedades por el desarrollo de especies del organismo resistente a la droga.

25.- El objeto de la presente invención es él de proveer un nuevo antibiótico de buena potencia, en especial contra



- 40.- los organismos que infectan los grampositivos, y a propósito para su uso terapéutico. Otro objeto de la presente invención reside en proveer métodos para la preparación de las citadas sustancias antibióticas, convenientes para su uso comercial.
- 45.- Se ha descubierto ahora, según la presente invención, un proceso para la producción de Anfomicina que comprende el cultivo de una especie de Streptomices BL-456786 en una solución de carbohidrato acuoso que contiene nutriente, bajo condiciones aeróbicas sumergidas hasta comunicar actividad sustancialmente antibacterial a dicha sustancia y luego recuperar la así producida Anfomicina del caldo de fermentación.
- 50.-
- 55.- Dentro del alcance de la invención, y como otra realización de la misma, se han descubierto en el referido proceso, las etapas, de decolorización de soluciones de Anfomicina mediante carbón vegetal activado; de extraer el antibiótico dentro de un disolvente orgánico inmiscible con el agua, bajo condiciones fuertemente ácidas; de precipitar la Anfomicina a partir de solución acuosa por el ajuste del pH a un punto dentro del valor pH 3.0 a 4.0; de separar las impurezas de una solución acuosa, fuertemente ácida de Anfomicina por la extracción de las impurezas con metil-isobutil-cetona y acetato amílico; de extraer la Anfomicina a partir de una solución fuertemente ácida en butanol, utilizando agua con un pH superior a 4; de extraer la Anfomicina a partir de una solución en un disolvente orgánico inmiscible con el agua dentro de agua cuyo pH es superior a 6.0; de precipitar de Anfomicina a partir de una solución por la formación de derivados insolubles de la función básica, y de precipitar la Anfomicina a partir de una solución por la formación de derivados insolubles de la función ácida.
- 60.-
- 65.-
- 70.-
- 75.- Se ha descubierto ahora además, y según la presente invención, sustancias efectivas en inhibir la recolección de *P. micoides*, *P. aureus*, *M. tetragenus*, *Staph. aureus* y *B. subtilis* seleccionadas del grupo que consta de sustancias anfóteras capaces de formar sales con ácidos y metales, solubles en el agua, que exhiben solubilidad mínima en el agua entre pH 3.0 y 4.0, que son fácilmente



- 80.- solubles en metanol como la forma ácida y como la forma salina, solubles en alcoholes superiores solamente en la forma ácida, extractables del agua en pH 2 mediante butanol y pentanol, no extractables del agua en pH 2 mediante metil-isobutil-cetona, benceno, éter, acetato etílico y
- 85.- amílico, que producen derivados sólidos de hidróxido amónico y de sal de Reinecke, antibacterialmente activos, que absorben la luz ultravioleta solamente en la región  $\mu$  210 - 230, que exhiben respuesta negativa a la ninhidrina, las pruebas de Sakaguchi, Molisch y Ehrlich-Pauly, y que son estables durante al menos diez días en solución acuosa de pH 2 a 10, y las sales ácidas y metálicas de dichas sustancias.
- 90.- El nuevo antibiótico se forma durante el cultivo bajo condiciones controladas de una especie hasta ahora indefinida de microorganismo, la cual provisionalmente hemos llamado "Streptomices BL-456786". La descripción de este organismo se define como sigue.
- 95.- El organismo BL-456786 sp. nov. que produce la nueva sustancia antibiótica, pertenece al genus comunmente distinguido como Streptomices. Se forma un micelio que exhibe hifas ramificadas. Las hifas juvenes son grampositivas (las hifas mayores son variables). Se producen conidios en cadenas, los cuales son esferoidales hasta ovóides, midiendo  $1.0 \mu - 1.2 \mu$  por  $1.6 \mu - 1.8 \mu$ .
- 100.- La recolección sobre agar de asparraguina glucosa resulta ser moderada y hasta buena en 30° C. Producia un pigmento difusible tostado.
- 105.- La recolección sobre agar de dextrosa de patata en 24 ° C durante dos semanas resulta delgada y arrugada, sin embargo, inhibe la producción de conidios e hifas aéreas.
- 110.- Debe entenderse que para la producción de Anfomicina no se pretende limitarse a este organismo en particular, ó a organismos que integramente corresponden con la anterior descripción, dada exclusivamente a título de ilustración. En especial se desea incluir el empleo de organismos que son mutaciones producidas a partir del organismo descrito, mediante agentes de mutación, tales como la radiación X, radiación ultravioleta, mostazas de nitrógeno, etc.
- 115.-



- 120.- La Anfomicina comparte con la penicilina la propiedad de baja toxicidad y potente actividad contra las bacterias, particularmente contra las bacterias grampositivas. La Anfomicina representa un importante agente terapéutico, a saber, en la medicina humana y la veterinaria.
- 125.- La Anfomicina posee ventajas especiales sobre la penicilina en vista de que no es inactivada por la penicilinasas, sirve en ciertos casos cuando se atribuye infecciones a las especies resistentes a la penicilina, cuando la penicilina resulta ineficaz y cuando los enfermos son sensibles a la penicilina. La Anfomicina exhibe resistencia altamente útil a la degradación por el calor ó el agua.
- 130.- Se ha comprobado durante los estudios in vitro que la Anfomicina resulta eficaz para combatir las bacterias grampositivas, incluyendo, Staphylococcus aureus, Bacillus aureus, Bacillus subtilis, Bacillus mycoides y Micrococcus tetragénea. La table adjunta muestra la actividad antibiótica de dos de los sólidos preparados a partir del caldo de fermentación del cultivo.

Espectro de Placa de Anfomicina.  
(5 mg/ml. del sólido)

140.-	<u>Organismo.</u>	<u>Zona de Inhibición en mm.</u>	
		<u>Sólido No 20.</u>	<u>Sólido No 17.</u>
	Org. Bodenheimer	0	0
	Proteus X19	0	0
	Sh. sonnei	0	0
	S. enteritidis	0	0
	S. paratyphi A	0	0
145.-	S. pullorum	0	0
	A. aerogenes	0	0
	Ps. fluorescens	0	0
	Alc. fecalis	0	0
	Pr. vulgaris	0	0
	V. cholerae	0	0
	Neisseria spp.	0	0
150.-	B. mycoides	15	17
	B. cereus	15	14
	S. marcescens	0	0
	M. tetragenus	14	14
	S. flexneri	0	0
	S. dysenteriae	0	0
	C. albicans 520	0	0
	Staph. aureus	14	13
155.-	E. typhosa	0	0
	E. coli	0	0
	S. paratyphi B	0	0
	K. pneumoniae	0	0
	Ps. aeruginosa	0	0
	S. agllinarum	0	0
	B. anthracis	0	0
	B. subtilis	16	11



- 160.- El ensayo de espectro se realiza de la siguiente manera: Aproximadamente 30 ml. de caldo de infusión de corazón esterilizado (Difco), más el 2% de agar para solidificarlo, se coloca en una cubeta pétrea esterilizada (3½" Ø), y una vez endurecido se practica un surco de 8 mm x 40 mm.
- 165.- en el agar con una espátula esterilizada. El fondo del surco se sella con una ó dos gotas de agar fundido. A continuación se aplica una veta de un cultivo de caldo nutriente de 24 horas de cada bacteria de ensayo previamente incubada a 37° C. y mediante un pequeño lazo, vetando desde el borde del surco hacia la pared de la cubeta pétrea.
- 170.- El surco ahora se rellena de una solución acuosa de 5 mg/ml del antibiótico. La cubeta se somete a 37° C. durante 18 a 24 horas. Después se efectúa una medición lineal de la zona de inhibición partiendo del borde del surco hacia el punto en donde se presenta la recolección del organismo de ensayo.

Lo que sigue representa el método para el ensayo de placa de difusión para determinar la actividad de la Anfomicina:

180.- Medio de cultivo:

- Agar de ensayo para estreptomycinina (con extracto de levadura) se compró de los Baltimore Biological Laboratories, Baltimore, Maryland, utilizándolo según instrucciones sobre la etiqueta. Se puede conseguir un preparado apropiado por la suspensión en un litro de agua destilada hasta un valor final de pH 8.0, de una mezcla de 1.5 grs de extracto de buey, 3 grs. de extracto de levadura, 6.0 grs. de peptona (v.g. gelisado) y 15 grs. de agar. La suspensión se permite posar durante cinco minutos, mezclándola después hasta obtener una suspensión uniforme, que se calienta a fuego lento, agitándola continuamente. La suspensión es hervida durante uno o dos minutos, o bien hasta que se efectue la disolución. El medio de cultivo ahora se dispersa y esteriliza en 121° C. (quince libras por pulgada cuadrada de presión de vapor, calibrada, para quince minutos).

Inoculum.

El organismo de ensayo es el Bacillus subtilis A.T.C.C. 6633. Una suspensión de esporas compuesta de 50.000.000



- 200.- esporas viables por ml. se añade al agar de ensayo fundido (refrigerado a 53° C.) para dar una concentración de inoculum final del 2%.
- Preparación de las placas:
- 205.- Veintiuno ml. de agar de ensayo esterilizado se colocan dentro de placas pétreas planas esterilizadas, permitiendo su solidificación. A continuación se distribuyen uniformemente cuatro ml. de agar inoculado sobre la superficie de la capa básica. Se colocan placas de ensayo hechas de acero inoxidable sobre el medio después de que éste haya adquirido la temperatura ambiente.
- 210.- Tampón:
- Se utiliza un tampón de fosfato con pH 8.0 para efectuar las diluciones. Este último se prepara al mezcla  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , diluyendo la mezcla hasta una décima de concentración con agua destilada. El valor pH del tampón ha de precisarse mediante potenciómetro y, en caso necesario, debe ser ajustado a pH 8.0 por la adición de una u otra de las soluciones fosfáticas molares. Las variaciones en el pH, o en la concentración del tampón afectan notablemente los tamaños de las zonas de inhibición. Se ha comprobado la necesidad de esterilizar el tampón. Las soluciones de concentración molar se conservan con cloroformo y tolueno, preparándose nuevas soluciones de trabajo a diario.
- 215.- Ensayo:
- 225.- Muestras desconocidas se diluyen, si es preciso, en el tampón de fosfato de pH 8.0. Se utilizan tres depresiones sobre cada placa para recibir una sola dilución de la muestra. Después de la incubación en 32° C., se miden y equilibran los diámetros de las zonas.
- 230.- Se puede distinguir la Anfomicina de la Endomicina por la falta de actividad in vitro contra una especie del hongo patogénico, Trichophyton mentagrophytes. Esto se consigue al colocar 25 ml. de un medio nutriente esterilizado, compuesto del 2% de dextrosa, 1% de neo-peptona, 2% de agar, con el pH ajustado a 5.6 - 5.8 en una cubeta pétreas, permitiendo su endurecimiento. Una suspensión de esporas acuosa de T. Mentagrophytes, de un cultivo sesgado de agar, se extiende sobre la superficie, montando
- 235.-



- 240.- penicilíndros sobre dicha superficie, para luego incubar las placas a 30° C. durante 24 horas. Se coloca una solución acuosa que contiene 10 mg/ml. del antibiótico a examinar dentro de los cilindros, y se vuelve a incubar las placas a 32° C. durante 48 horas. A continuación se mide el diámetro de inhibición en torno a cada cilindro, y se saca un promedio de al menos tres zonas para la lectura. Obtuvieronse los siguientes resultados.

	<u>Antibiótico</u>	<u>Zona de Inhibición en mm.</u>
	Anfomicina - Lote 5	ninguno
250.-	Endomicina	24.0
	Anfomicina - Lote 1	ninguno

- Esta invención abarca un proceso para la recolección de una especie nueva, hasta ahora indefinida, de microorganismos, S. BI-456786, en aproximadamente 24 - 30° C. bajo condiciones sumergidas de agitación y aeración sobre medios constituidos por una fuente de carbón, otra de nitrógeno, otra de sustancias de recolección, sales minerales, tales como cloruro sódico, fosfato potásico, sulfato magnésico, nitrato sódico, y cuando se desea, un agente tampón, tal como el carbonato cálcico.

- 260.- Como fuente de carbón se puede utilizar en el medio nutriente:

	Almidón común	Xilosa
	almidón soluble	arabinosa
	sucrosa	ramnosa
	maltosa	lactosa
265.-	dextrosa	inulina
	glicerol	dextrinas
	galactosa	

- Estos fuentes de carbón se pueden suministrar al medio en su forma purificada, o bien en forma de concentrados. La cantidad de tales fuentes de carbón, aplicables para la obtención de la mejor producción antibiótica en el medio, puede variar considerablemente, desde aproximadamente 1/2% hasta 5% por peso del peso total del medio de fermentación.

- 270.- Fuentes apropiadas de nitrógeno, que incluyen algunas fuentes de sustancias de recolección, para el proceso de fermentación, incluyen una amplia variedad de sustancias, tales como:

275.-	Aminoácidos	licor de remojo de trigo
	caseína, hidrolizada y sin.	suero o concentrados de suero
	harina de pescado	glutén de grano ácido hidrolizado.



- 280.- harina de haba soja glutén de trigo ácido hidrolizado.  
 extractos de carne peptona  
 pan de hígado despojos  
 urea levadura de cerveza  
 nitratos harina de semilla de algodón  
 compuestos de amonio lactalbúmina  
 heces de cerveza  
 285.- licor de remojo de maiz. triptona.

No es preciso aplicar estos ingredientes proteínicos en un alta grado de pureza, pues las materias menos puras que llevan indicios de factores de recolección y cantidades considerables de nutrientes minerales, son aptas

- 290.- para ser utilizadas. desde luego, no es posible, y en virtud de la naturaleza en bruto de muchas de estas sustancias nitrogenosas, especificar proporciones exactas para la materia de adición. Una cantidad de aproximadamente el 0.1% hasta 5.0% por peso sobre una base sólida describe el alcance útil de sustancias nitrogenosas adiconables  
 295.- al medio en la mayoría de los casos.

El pH del medio de fermentación debe ser 7.0 - 7.2 al iniciar la fermentación. La temperatura preferida para el proceso de fermentación es aproximadamente 26-28° C. El rendimiento máximo del producto se obtiene por lo general dentro de 2 a 7 días, lo que depende del método de cultivo empleado para el Streptomices.

- 300.- Una vez completada la recolección, se separa el micelio del caldo que ahora contiene el antibiótico Anfomicina, y se procede a recuperar la Anfomicina del caldo mediante extracción con disolventes orgánicos, por la precipitación en el punto isoeléctrico ó mediante cualquier otro procedimiento ya bien conocido en el arte. El nuevo antibiótico, Anfomicina, producido según se ha dicho anteriormente, posee propiedades únicas e importantes que lo distinguen de todos los antibióticos ya conocidos y previamente descritos.  
 305.-  
 310.-

- 315.- Tal como ocurre con la penicilina, la Anfomicina es activa tanto in vivo como in vitro, y exhibe una notable actividad quimioterapéutica contra la infección experimental en ratones. Los resultados de tal ensayo y de determinaciones sobre toxicidad se indican en la siguiente tabla.



320.-

## Resultados del ensayo in vivá.

Anfomicina Lote Nº	Respuesta a ensayo de placa en mm.	Agudo ID <sub>50</sub> ratones i.v. mgms/kg.	CD <sub>50</sub> ratón i.p. mgm/kg.	Toxicidad cró- nica en rato- nes durante 5 sem.mgm/kg.
-----------------------	---	--	--	---

(no dil.)  
(1:4 dil)

325.-

7	26.0	23.1	-	1.8	>150
8	28.9	27.0	-	0.68	>150
17			>215	2.2	

(1:16 dil)  
(1:64 dil)

330.-

28	25.0	21.7	46-116	0.57	50-100
Penicilina			aprox. 20		

335.-

La CD<sub>50</sub> (dosis curativa - 50) representa la dosis intraperitoneal mínima de Anfomicina que curará el 50% de un grupo de ratones inyectados intraperitonealmente con 100 hasta 1000 dosis LD<sub>50</sub> de Diplococcus pneumoniae, siendo cada dosis LD<sub>50</sub>, si es administrada aisladamente, lo suficiente para matar el 50% de un grupo de ratones. La infección se aplica enseguida después de la primera dosis de la droga de ensayo. Dicha droga de ensayo es aplicada en dos dosis uniformemente divididas durante un intervalo de aproximadamente 18 horas. Los animales se observan durante cuatro días y los muertos para cada grupo se expresan como el porcentaje del total de los animales en cada grupo. El porcentaje de muertos se convierte en valores probados y éstos se sitúan frente al log. de la dosis en mgms. por kg. de peso de ratón. El punto de intersección de la línea 5 de los probados y la línea construida a través de los puntos experimentales, describe la concentración de la droga que debiera proteger a la mitad de los animales bajo las condiciones del experimento. El antilog. de este término se denomina el valor CD<sub>50</sub>.

340.-

345.-

350.-

355.-

La Anfomicina exhibe un mínimo de solubilidad en el agua entre pH 3.5 - 3.6, sin embargo resulta muy soluble por encima o por debajo de este valor. Es fácilmente soluble en metanol, bien sea en su forma ácida ó salina y en alcoholes superiores en la forma ácida. Es extractable del agua mediante butanol o alcohol amílico en pH 2, pero no es extractable del agua mediante metil-isobutil-cetona o acetato amílico. A partir de una solución de butanol



360.- ácida es extractable dentro del agua en un pH superior a 3 ó 4.

Las soluciones ácidas de Anfomicina en butanol pueden ser decolorizadas con carbón y la forma ácida del antibiótico precipitado por la adición de disolventes no polares, tales como acetato etílico, éter, etc.

365.-

Una solución acuosa (5 - 20%) de la Anfomicina ácida en el agua da un precipitado abundante al ajustar el pH a 3.4 - 3.5 con alcalí. El precipitado se vuelve a disolver según se eleva o baja el valor pH.

370.-

Han sido obtenidos derivados insolubles de la función básica. El tratamiento de la sal sódica en el agua con la sal de Reinecke no da precipitación, no obstante al bajar el pH a 2 - 3 da un buen rendimiento de sal reineckada activa. El antibiótico se regenera fácilmente por la disolución de la sal reineckada en acetona y al agregar hidróxido máónico para preipitar la sal amónica activa de la Anfomicina. Hasta ahora no se ha cristalizado el reineckado. Un picrato oleoso ha sido preparado de manera análoga.

375.-

380.-

La Anfomicina es estable en el agua, soluciones acuosas en pH 2, 7 ó 10 y no presenta pérdida después de su almacenaje a temperatura ambiente durante 10 días. La Anfomicina sólida resulta estable a temperatura ambiente.

385.-

La materia más pura que ha sido preparado hasta la fecha exhibe la absorción de la luz ultravioleta solamente en la región  $\mu$  210 - 230 y da respuesta negativa a la ninhidrina, las pruebas de Sakaguchi, Molisch, y Ehrlich-Pauly. El producto contiene carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Las muestras actuales son polvos no

390.-

cristalinos blancos o casi blancos. Exhiben una reacción del biuret positiva y después de su hidrólisis con 6N HCl durante 24 horas a 100° C., la prueba de ninhidrina asimismo resulta positiva. La cromatografía al papel comprueba la presencia de varias sustancias diferentes reactivas de ninhidrina dentro del hidrolizado.

395.-

Las propiedades de la Anfomicina sirven para distinguirla de otros antibióticos producidos a partir de actinomicetos.

De aquellos antibióticos actinomicéticos que exhiben



- 400.- propiedades ácidas, la antimicina, actinorodina, y los antibióticos del Streptomices X-206, X-464 y X-537, son sustancias libres de nitrógeno, sin propiedades básicas. El ácido libre de estas sustancias es soluble en un disolvente no polar (éter, benceno, etc.), en tanto que la Anfomicina no lo es.

405.- La litmocidina y la rodomicetina, son pigmentos, en tanto que los preparados de Anfomicina, de elevada potencia, son polvos blancos.

- 410.- De los antibióticos ácidos que contienen nitrógeno ó actinomicetos anfóteros, la borrelidina es extractable dentro de benceno en pH ácido, en tanto que la Anfomicina no lo es. La borrelidina posee además un espectro antibacterial muy limitado. Las formas libres de ácido, de la endomicina y musarina, son insolubles en el agua, en tanto que la Anfomicina exhibe una solubilidad superior al 5% en el agua en pH 2. La Anfomicina difiere de la aureomicina y terramicina por su falta de absorción de la luz ultravioleta en la significativa región mu 220 a 400.

420.- EJEMPLO 1.

Preparación de la Actividad en Botellas Agitadoras.

- 425.- Para producir pequeñas cantidades de Anfomicina, se efectúa la fermentación en botellas agitadoras abiertas al aire, y protegidas de contaminación mediante tapones de algodón. La recolección del Streptomices BL-456786 se realiza en un medio nutriente conveniente por el método de cultivo sumergido, practicándose la agitación y aeración de la mezcla de cultivo al colocar las botellas sobre un vibrador del tipo de movimiento alternativo, el cual asegura el rociado, chapoteo o derrame de la masa por una atmósfera saturada de oxígeno. Como un caso típico se introducen, 500 ml. de un medio de cultivo compuesto de:

- 435.-  
1% de harina de haba de soja  
1% de cerelosa  
0.5% de NaCl  
0.05% Curbay BG (una clase de heces solubles)  
0.1% de CaCO<sub>3</sub>

en botellas de 4 litros y se esteriliza. Terminada la operación en el autoclave, se inocula el medio con apro-



- 440.- ximadamente el 1%, por volumen, de una suspensión de esporas acuosa turbida, del Streptomices a partir de un cultivo sesgado de agar. El pH es 7.0 - 7.2 al iniciar la fermentación. El contenido de la botella se incuba a continuación a 26 - 28° C. durante 120 horas, agitándola con 130 vibraciones, de 1¼" de magnitud, por minuto.
- 445.- Después del periodo de incubación, el licor contiene la siguiente actividad, dada como el diámetro, en milímetros, de la zona de inhibición en la dilución indicada: (x) 29.2; (#x) 26.2 (determinado por el procedimiento de ensayo de placa de difusión, descrito en otra parte). El pH al final de la fermentación señalaba 7.8.
- 450.-

EJEMPLO 2.

Preparación de Inoculum por Planta Piloto.

- 455.- Para la producción en mayor escala de Anfomicina, se prepara un inoculum en un medio de fermentación, que contiene por peso:

- 1% de harina de haba de soja
- 1% de cerelesa
- 0.5% de NaCl
- 0.05% de Curbay BG (una clase de heces solubles)
- 0.1% de CaCO<sub>3</sub>

- 460.- elaborado en un volumen de 2500 ml. e introducido en una botella de 2½ galones. El medio se esteriliza con vapor a 118 - 120° C. durante 1 hora. Una vez enfriado, el medio se inocular con aproximadamente el 0.5%, por volumen, de una suspensión de esporas acuosa turbida, del Streptomices BL-456786 a partir de un cultivo sesgado de agar. El contenido de la botella se incuba a continuación a 26 - 28° C. durante 72 - 96 horas sobre un vibrador del tipo de movimiento alternativo. Desde la botella de inoculum se hace pasar el caldo que contiene el Streptomices BL-456786 dentro del depósito de fermentación bajo condiciones integramente asépticas.
- 465.-
- 470.-

EJEMPLO 3.

Producción en gran escala de Anfomicina.

- 475.- Se puede preparar la Anfomicina en gran escala mediante cultivo sumergido ó profundo del organismo. Cubas de fermentación estacionarias, provistas de dispositivos de agitación y aeración, han dado buen resultado. Un medio nutriente, constituido por 57.000 grs. de harina de



- 480.- haba de soja, 57,000 grs. de cerelesa, 28,000 grs. de  $\text{CaCO}_3$  y agua para completar los 1500 galones, con una concentración de hidrón post-esterlización de pH 6.98, se prepara en un fermentador para 2000 galones, tipo cuba vertical, de acero revestido de vidrio, provisto de
- 485.- camisa de agua para el control de la temperatura, propulsor de tipo ancla de acero inoxidable, y un rociador de placa de dos brazos perforados de acero inoxidable. El medio se esteriliza, calentándolo con vapor bajo presión, enfriándolo después. El medio nutriente se inocula con
- 490.- el 15%, por volumen, de un cultivo vegetativo de 48 horas producido en un fermentador de tipo análogo previamente inoculado con el inoculum descrito en el Ejemplo 2. El cultivo en el fermentador de 2000 galones se inocula a
- 495.- 83° F. durante 50 horas. Durante la incubación, el propulsor gira a 90 r.p.m., en tanto que se hace pasar aire esterilizado dentro del medio a la velocidad de 100 pies cúbicos por minuto. El análisis de una porción del líquido de cultivo al final del periodo de incubación exhibe el pH en 7.68 y la actividad, determinada por el ensayo de placa de difusión descrito en otra parte, como sigue:
- 500.- (x) 18.7; (4x) 14.

La actividad se dá como el diámetro en milímetros, de la zona de inhibición en la dilución indicada, o sea (x) indica no diluido, y (4x) indica diluido hasta cuatro veces el volumen original.

- 505.- El aislamiento de la Anfomicina sólida a partir de este caldo se describe en los Ejemplos 5 y 6 a continuación.

#### EJEMPLO 4.

- 510.- Aislamiento y Purificación.

Extracción del caldo. Se ensayan materiales empleando la respuesta del ensayo de cilindro-placa, medidos en milímetros. Se ensayan soluciones en distintas diluciones, efectuándose una comparación de esta manera.

- 515.- Un lote de 30 litros de caldo filtrado se acidificó a pH 1.95 con HCl, filtrándolo luego por un paño filtrante de infusorios para conseguir una solución clara. El filtrado claro se removi6 con 15 litros de n-butanol durante 15 minutos, separando entonces las dos fases. Este pro-



- 520.- ceso se repitió con una adición de 48 litros de caldo, combinando y lavándose los extractos de butanol (40 litros) con 10 litros de agua acidificada a pH 2 con HCl. A continuación se removió el butanol con 10 litros de agua, ajustándose la mezcla a pH 6.4. El extracto acuoso
- 525.- se removió durante 30 minutos, separándolo para su concentración in vacuo, y secado mediante sublimación a partir del estado helado. Rendimiento: 20.2 grs. de polvo color pardo. Otro extracto acuoso del butanol rindió después de un tratamiento análogo, otros 6.6 grs. de polvo color pardo.
- 530.-

Los resultados de los ensayos eran los siguientes:

Material	Respuesta al ensayo de placa de difusión.	
	Sin dilución:	1:4 dilución.
Caldo inicial	: 24.2 mm	: 20.0 mm
535.- Caldo clarificado	: 25.2 mm	: 20.4 mm
Caldo extractado	:	:
1º 30 litros	: 14.8 mm	: ninguna(sin
2º 48 litros	: 10.4 mm	: inhibición)
Lavado de agua ácida	:: ninguna	:
1º extracto acuoso (10 litros):	: 30.0 mm	: 28.2 mm
2º extracto acuoso	: 26.0 mm	: 23.1 mm
540.- Sólidos del 1º extracto a la concentración de 1/mg/ml.-	:	:
Este es sólido # 7.	: 26.0 mm	: 23.1 mm
Sólidos del 2º extracto a la concentración de 1/mg/ml.-	:	: 27.0 mm
Este es sólido # 8	: 28.9 mm	:

545.-

EJEMPLO 5.

Aislamiento.

- Durante una prueba posterior, ajustáronse 775 galones de caldo sin filtrar a pH 2.3, extractándolos con 310 gal. de n-butanol. El extracto de butanol se separó y se lavó
- 550.- con 40 gal. de agua a pH 2., extractándolo sucesivamente con 40 y 20 gal. de agua, ajustándose la mezcla en cada caso a pH 7.3 - 7.4 con hidróxido sódico. Los extractos acuosos se combinaron y llevaron por una segunda serie de extracciones en butanol ácido y agua alcalina, produciendo un rico extracto acuoso final de 12.1 litros que se
- 555.- secó por rocío para dar 420 grs. de productos.

EJEMPLO 6.

Clarificación al carbón y precipitación del disolvente de material en bruto.



- 560.- Veinte gramos de la sal sódica cruda de la Anfomicina, preparada de acuerdo con el Ejemplo 5, se disolvieron en 500 ml. de agua, ajustados a pH 2 con ácido fosfórico y extractados con 300 ml. de n-butanol para dar un extracto de color pardo oscuro. La capa de butanol separada, se filtró por un paño filtrante de infusorios para separar los indicios de agua sin disolver, y luego fué agitada con 20 grs. de carbón vegetal activado (Darco KB) durante 30 minutos. El carbón se separó por filtración, concentrándose in vacuo la solución de butanol ligeramente amarillente hasta un volumen de 100 ml. Este concentrado se agregó a 2000 ml. de acetato etílico, consiguiéndose una precipitación abundante de Anfomicina que fué separada por filtración, lavada con acetona y secada.
- 565.-
- 570.- Rendimiento: 3.4 grs de sólidos de un pálido color crema.

575.- Los ensayos mostraron lo siguiente:

Material	Respuesta al ensayo de placa de difusión.		
	Sin dil.†	1:4 dil.†	1:16 dil.-
20 g. material inicial de 1/mg/ml.	: 23.1 mm	: 21.1 mm	: 15.8 mm
3.4 g. producto purificado de 1/mg/ml.	: 32.0 mm	: 27.0 mm	: 18.0 mm

#### EJEMPLO 7.

##### Precipitación isoeléctrica.

- 585.- Una muestra de 10 grs. de Anfomicina preparada mediante extracción en butanol y purificación por el tratamiento al carbón y precipitación de acetato etílico según se describió anteriormente, se disolvieron en 100 ml. de agua para conseguir una solución clara a pH 2.2. La solución se ajustó a pH 3.4 con hidróxido sódico diluido, dando un precipitado oleoso viscoso. Las aguas madres se separaron por decantación, ajustando a pH 6.6 con hidróxido sódico y liofilización para producir 4.55 grs. de sólidos (A). El precipitado se disolvió en agua, ajustando a pH 6.8 y liofilización, dando 5.68 grs de sólidos (B).
- 590.-

Material	Difusión Respuesta placa ens.		
	1:4 dil.†	1:16 dil.†	1:64 dil.-
Material inicial, 1/mg/ml.	: 29.0 mm	: 23.7 mm	: 14.7 mm
Sólidos no precipitados (A)	: 26.7 mm	: 21.0 mm	: 11.0 mm
Sólidos precipitados (B)	: 29.0 mm	: 24.0 mm	: 17.0 mm



600.-

EJEMPLO 8.Purificación con Sal de Reinecke.

605.-

Veinticinco gramos de la sal sódica de Anfomicina se disolvieron en 100 ml. de agua, acidificando con ácido fosfórico a pH 2. Esta solución fué extractada con 250 ml. de n-butanol. El extracto húmedo de butanol se trató con 25 grs. de carbón vegetal activado (Darco G-60) durante media hora y se filtró. El filtrado fué extractado con 500 ml. de agua a pH 7.0. La capa de agua se concentró ligeramente in vacuo para separar el butanol, ajustando a pH 1.9 con ácido fosfórico. Veinticinco gramos de sal de Reinecke en 200 ml. de agua se ajustaron a pH 1.9 que se agregaron a la solución de Anfomicina. El precipitado resultante se separó por filtración después de pasar durante la noche en el refrigerador. El precipitado se volvió a disolver en agua ajustando a pH 7.0, precipitándolo por el ajuste a pH 2.0. El material precipitado, separado por filtración, fué lavado con agua, disuelto en 150 ml. de acetona y filtrado. Se agregó 1 litro de acetona y se concentró con hidróxido amónico a pH 7.5, precipitando la sal amónica de la Anfomicina. El material se lavó y se secó. Rendimiento: 12.4 gramos.

610.-

615.-

620.-

Los Ensayos de Placa de Difusión dieron los siguientes datos:

Material	1:16 dil. +	1:64 dil. +	1:256 dil. -
Material inicial, l/mg/ml.	25.3 mm	20.7 mm	16.0 mm.
Producto final, l/mg/ml.	26.0 mm	21.8 mm	17.5 mm.

625.-

EJEMPLO 9.

Una muestra con el número 28 del producto, fué preparada según se describió en el Ejemplo 8.

630.-

Hecha la descripción que antecede, es preciso añadir que los detalles de realización de la idea expuesta pueden variar, sin que por ello cambie la esencia de la invención que es la que se desprende de los párrafos que anteceden y la que se reivindica en la siguiente

N O T A.

635.-

En resumen: la PATENTE de INVENCION que se solicita recaerá sobre las reivindicaciones siguientes:-

1).- Un procedimiento para la producción de Anfomicina, que comprende el cultivo de una especie de Streptomices BL-456786 en una solución de carbohidrato acuosa



- 640.- que contiene nutriente, bajo condiciones aeróbicas sumergidas hasta comunicar actividad sustancialmente antibacterial a dicha solución y luego recuperar la así producida Anfomicina del caldo de fermentación.
- 645.- 2).- Un procedimiento para la producción de Anfomicina, que comprende el cultivo de una especie de Streptomyces BL-456786 en una solución de carbohidrato acuosa que contiene nutriente, bajo condiciones aeróbicas sumergidas a una temperatura de aproximadamente 24° C. a aproximadamente 30° C. durante un periodo de aproximadamente dos días a siete días, hasta comunicar actividad sustancialmente antibacterial a dicha solución y luego recuperar la así producida Anfomicina del caldo de fermentación.
- 650.- 3).- Un procedimiento, según la reivindicación 1, en el cual la recuperación de la Anfomicina incluye la etapa de decolorización de soluciones de Anfomicina mediante carbón vegetal activado.
- 655.- 4).- Un procedimiento, según la reivindicación 1, en el cual la recuperación de la Anfomicina incluye la etapa de extraer el antibiótico dentro de un disolvente orgánico inmiscible con el agua, bajo condiciones fuertemente ácidas.
- 660.- 5).- Un procedimiento, según la reivindicación 1, en el cual la recuperación de la Anfomicina incluye la etapa de precipitar la Anfomicina a partir de una solución acuosa por el ajuste del pH a un punto dentro del valor pH 3.0 - 4.0.
- 665.- 6).- Un procedimiento, según la reivindicación 1, en el cual la recuperación de la Anfomicina incluye la etapa de precipitar la Anfomicina a partir de una solución acuosa mediante el ajuste del pH a un punto dentro del valor pH 3.4 - 3.5.
- 670.- 7).- Un procedimiento, según la reivindicación 1, en el cual la recuperación de la Anfomicina incluye la etapa de separar las impurezas de una solución acuosa fuertemente ácida de Anfomicina por la extracción de las impurezas con un miembro seleccionado del grupo consistente de metil-isobutil-cetona y acetato amílico.
- 675.- 8).- Un procedimiento, según la reivindicación 1, en el cual la recuperación de Anfomicina incluye la etapa



- 680.- de extraer la Anfomicina a partir de una solución fuertemente ácida en butanol, utilizando agua con un pH superior a 4.
- 685.- 9).- Un procedimiento, según la reivindicación 1, en el cual la recuperación de la Anfomicina incluye la etapa de precipitar la Anfomicina a partir de una solución por la formación de derivados insolubles de la función básica.
- 690.- 10).- Un procedimiento, según la reivindicación 1, en el cual la recuperación de la Anfomicina incluye la etapa de precipitar la Anfomicina a partir de una solución por la formación de derivados insolubles de la función ácida.
- 695.- 11).- Un procedimiento, según la reivindicación 1, en el cual la recuperación de la Anfomicina incluye la etapa de extraer el antibiótico a partir de una solución en un disolvente orgánico inmiscible con el agua dentro de agua cuyo pH es superior a 6.0.
- 700.- 12).- Un procedimiento, según la reivindicación 1, en el cual se incluye la obtención de sustancias efectivas en inhibir la recolección de *B. mycoides*, *B. aureus*, *M. tetragenus*, *Staph. aureus*, y *B. subtilis*, seleccionadas del grupo que consta de sustancias anfóteras capaces de formar sales con ácidos y metales, solubles en el agua, que exhiben solubilidad mínima en el agua entre pH 3.0 y 4.0, que son fácilmente solubles en metanol como la forma ácida y como la forma salina, que son solubles en alcoholes superiores solamente en la forma ácida, extractables del agua en pH 2 mediante butanol y pentanol, que no son extractables del agua en pH 2 mediante metil-isobutil-cetona, benceno, éter, acetato etílico y amílico, que producen derivados sólidos de hidróxido amónico y de sal de Reinecke, antibacteriamente activos, que absorben la luz ultravioleta solamente en la región  $\mu$  210-230, que exhiben respuesta negativa a la ninhidrina, las pruebas de Sakaguchi, Molisch y Ehrlich-Pauly, y que son estables durante al menos 10 días en solución acuosa de pH 2 a 10, y las sales ácidas y metálicas de dichas sustancias.
- 705.-
- 710.-
- 715.- 13).- Un procedimiento, según la reivindicación 1, que incluye la obtención de sustancias anfóteras efectivas en inhibir la recolección de *B. mycoides*, *B. aureus*, *M. tetragenus*, *Staph. aureus*, y *B. subtilis* y que son capaces



- 720.- de formar sales con ácidos y metales, solubles en el agua, que exhiben solubilidad mínima en el agua entre pH 3.0 y 4.0, que son fácilmente solubles en metanol en su forma ácida y forma salina, solubles en alcoholes superiores solamente en la forma ácida, que son extractables del agua
- 725.- en pH 2 mediante butanol y pentanol, que no son extractables del agua en pH 2 mediante metil-isobutil-cetona, benceno, éter, acetato etílico y amílico, que producen derivados sólidos de hidróxido amónico y de sal de Reincke, antibacterially activos, que absorben la luz ultravioleta solamente en la región  $\mu$  210-230, que exhiben respuesta negativa a la ninhidrina, las pruebas de Sakaguchi, Molisch y Ehrlich-Pauly, y que son estables durante al menos 10 días en solución acuosa de pH 2 a 10.
- 730.-
- 735.- 14).- Un procedimiento, según la reivindicación 1, que incluye la obtención de sales de la forma ácida de las sustancias anfóteras definidas en la reivindicación 13.
- 15).- Un procedimiento, según la reivindicación 1, que incluye la obtención de sales de la forma básica de las sustancias anfóteras definidas en la reivindicación 13.
- 740.- 16).- Un procedimiento, según la reivindicación 1, que incluye la producción de un caldo de fermentación de Anfomicina, que comprende el cultivo de una especie de Streptomices BI-456786 en una solución acuosa que contiene nutriente de carbohidrato, bajo condiciones aeróbicas, hasta comunicar actividad sustancialmente antibacterial a dicha solución.
- 745.-
- 750.- 17).- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la PATENTE de INVENCION que se solicita: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE ANFOMICINA".  
Todo conforme queda descrito en la presente Memoria que consta de veinte páginas escritas a máquina..

Madrid, a 27 de noviembre de 1952.

ALFONSO UNGRIA.