

226833

20 FEB. 1956 226833



MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de ELI LILLY AND COMPANY., entidad norteamericana, establecida en 740 South Alabama Street, Indianapolis, Indiana, Estados Unidos de América, por:

"UN METODO PARA LA PRODUCCION DE
UN AGENTE ANTIBIOTICO"

=====

Este invento se refiere a nuevos compuestos antibióticos y más en particular a nuevos agentes antibióticos elaborados por un microorganismo no descrito previamente, y a los procedimientos para su preparación.



226833

Hemos aislado del suelo obtenido de las Indias Orientales, un microorganismo, cuyas características morfológicas y de cultivo corresponden a la descripción del género Streptomyces del orden Actinomycetales, según se define en el Manual of Determinative Bacteriology de Bergey (Sexta edición), pag. 938. El nuevo microorganismo es afín en su morfología microscópica, características de cultivo y fisiología a ciertos microorganismos incluidos en los grupos S. albus y S. flavus, pero no corresponde a las descripciones de ninguna de las especies conocidas.

Por esto, al nuevo microorganismo se le ha dado el nombre de Streptomyces orientalis. Diversas cepas del organismo que se han designado como S. orientalis M43-05865, M5-18215 y M5-18260, se ha encontrado que producen las sustancias antibióticas de este invento; y estas cepas han sido depositadas en la colección de cultivos de los Northern Regional Research Laboratories en Peoria, Illinois, donde se les han asignado los números de cultivo NRRL 2450, NRRL 2451, y NRRL 2452, respectivamente, y han sido añadidos a la colección permanente de microorganismos.

El microorganismo se aisló de una muestra de tierra obtenida en Tengeng, Indonesia, y el método de aislamiento fué el siguiente: Una muestra del suelo se suspendió en agua destilada estéril, la suspensión se diluyó mucho y una pequeña muestra se colocó en una



226833

lámina sobre agar nutricio. La lámina se incubó a unos 30°C. durante una semana. Las pequeñas colonias esparcidas y separadas de S. orientalis se separaron con un bucle de platino y fueron utilizadas para inocular cultivos de agar inclinados para proporcionar cantidades mayores del microorganismo. Una de las cepas de este microorganismo, obtenida como se describió antes, ha sido designada S. orientalis, cepa M43-05865, y el invento se describirá refiriéndose en particular a esta cepa del organismo. Debe entenderse, sin embargo, que los procesos fermentativos de este invento abarcan el uso de otras cepas de S. orientalis productoras del antibiótico, siendo producidas y aisladas fácilmente tales cepas mediante los métodos usados ordinariamente en el aislamiento y modificación de cepas, que incluyen la selección de los organismos cultivados, y exposición de los organismos a la acción de medios de modificación como los rayos X, luz ultravioleta y agentes químicos, por ejemplo, las "mostazas nitrogenadas".

20 Hemos encontrado que cuando el S. orientalis se desarrolla en medios de cultivo nutricios artificiales, que contengan una fuente de nitrógeno, una fuente de hidratos de carbono y sales inorgánicas adecuadas, del tipo conocido como necesario para el desarrollo de microorganismos y como amortiguador del medio nutricio, se elabora una nueva sustancia antibiótica (aquí denominada "vancomicina"), que se caracteriza por su amplio



226833

espectro de actividad contra los organismos Gram-positivos.

5 Según esto, el presente invento proporciona una sustancia antibiótica que comprende la vancomicina y las sales producidas ácidas de adición, estando caracterizada la citada vancomicina como sigue: una
10 sustancia blanca, amorfa que es soluble en agua, insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos, estable en solución acuosa en un intervalo de pH de 2,5 a
15 9 aproximadamente, teniendo un peso molecular en el intervalo de 3.000 a 3.200 aproximadamente; que contiene aproximadamente 7,17% de nitrógeno y una papilla en aceite mineral de la cual presenta máximos de absorción en el espectro, en la región infrarroja, a las siguientes longitudes de onda expresadas en micrones: 3.10,
3.41, 6.05, 6.30, 6.72, 6.84, 7.26, 7.64, 8.13, 8.50, 8.66,
8.87, 9.42, 9.76, 10.10, 10.34, y 11.24.

 El presente invento proporciona además un método de producción de un agente antibiótico que
20 comprende el cultivo en condiciones aerobias de una cepa de Streptomyces orientalis productora de vancomicina en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de hidratos de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas hasta que se produzca una actividad antibiótica considerable por el citado microorganismo en el medio de cultivo mencionado.
25

El término "medio de cultivo nutritivo ar-



226833

tificial", aquí utilizado, designa un medio de cultivo que se prepara combinando fuentes de nitrógeno, hidratos de carbono, sales minerales y agua, comparable a los sustratos que se encuentran en la naturaleza.

5 Ejemplos de fuentes de nitrógeno que son adecuadas para la preparación de medios de cultivo nutricios artificiales, para su utilización en la producción del nuevo antibiótico vancomicina, son harina de soja, caseína, harina de cacahuete, sólidos de maceración de
10 maiz, líquido de maceración de maiz, soluble de destilería, amino-ácidos, peptonas y similares. Ejemplos de los hidratos de carbono que son fuentes de carbono utilizadas por el S. orientalis para el desarrollo del microorganismo, especialmente cuando se emplea en un medio
15 de cultivo inclinado del tipo agar, son, glucosa, adonita, arabinosa, xilosa, trealosa, manita, i-inosita, cellobiosa, lactosa y similares. Las sales que se incorporan en el medio nutricio artificial de este invento son las sales minerales ordinarias que se sabe se requieren
20 para el desarrollo de microorganismos y/o para regular la acidez de los medios como por ejemplo, cloruro sódico, nitrato sódico, sulfato amónico, carbonato cálcico, fosfato monosódico y similares. Las pequeñas cantidades de los llamados elementos traza necesarios para el tejido vivo se suministran por adición de las señales anteriores en las que estos elementos existen como impurezas.

El S. orientalis está caracterizado por



226833

los numerosos ensayos físicos, de cultivo y fisiológicos expuestos en los párrafos siguientes. Se ha empleado el sistema de Ridgway, Color Standards and Nomenclature (1912), para nombrar algunos colores y, cuando se ha usado este sistema, la letra inicial del color aparece en mayúsculas.

Morfología microscópica

Agar sintético (Agar de Czapek, modificado por Waksman) (1919) : Micelio en el substrato típico inclinado, muy ramificado, micelio aéreo ramificado, erguido que soporta cadenas, rectas o ramificadas irregularmente, de conidios de forma cilíndrica a ovoidea, que miden 0,7-1,0 x 1,4-1,8 micras. No presenta cadenas de conidios en espirales distintas. Los conidios se esparcen al cabo de catorce días de incubación a 30°C. A los 28 días una cepa presentó esporas medianamente abundantes; otras dos cepas produjeron muy pocas esporas.

Agar glucosa-asparaguina: morfología microscópica similar a la observada en agar sintético.

Morfología de la colonia

Agar sintético (catorce días a 30°C): Colonias de 6 a 8 mm de diámetro, elevadas o ligeramente convexas, con una cubierta muy delgada de micelio aéreo blanquecino. El reverso es incoloro.

Agar glucosa-asparaguina: (catorce días a 30°C): colonias de 6 a 8 mm de diámetro, papilas



226833

centrales asparógenas o con esporulación escasa. Micelio aéreo polvoriento, de color blanquecino. El reverso de color crema amarillo intenso.

Características de cultivo

5 Agar sintético: cantidad escasa o moderada de micelio en el substrato, crema pálido por el reverso. Trazas de micelio aéreo blanquecino. No tiene pigmento soluble. Otras cepas producen algo más de micelio aéreo. Cuando el almidón sustituye a la sacarosa como
10 fuente de carbono, todas las cepas presentan buen desarrollo vegetativo y aéreo y todas producen una opalescencia característica en el agar alrededor de los bordes de crecimiento. El micelio del substrato por el reverso varía de color del crema pálido al crema intenso (Cream Buff o Sayal Brown). El micelio aéreo es generalmente
15 blanquecino o débilmente grisáceo y se forma un pigmento soluble de color pardo-amarillo pálido a ligeramente pardo.

Agar glucosa-asparaguina: Desarrollo moderado o bueno del micelio del substrato, el color crema se hace Light Ochraceus Buff por el reverso. Cantidad moderada de micelio aéreo polvoriento, de color crema pálido que se vuleve Pale Ochraceous Buff a los ventiocho días de incubación. Trazas de pigmento soluble verde-amarillo pálido. Otras cepas parecen idénticas al tipo de
25 cultivó de este medio.



226833

Agar de almidón (Waksman (1919), pag. 82, medio 15 con almidón soluble): Cantidad moderada de micelio del substrato, por el reverso varía del color crema, cuando es joven, al Cream Buff hasta el Buckthorn Brown al final de la observación. Cantidad moderada de micelio aéreo liso empolvado, blanco en cultivos jóvenes, volviéndose crema pálido y finalmente ligeramente gris durante la maduración. Trazas de pigmento soluble crema amarillos pálido en cultivos jóvenes, oscureciéndose a pardo pálido a los veintiocho días. Hidrólisis de almidón escasa en las placas (1-3 mm del borde de crecimiento) a los catorce días; inalterado a los veintiocho días. Otras cepas presentan variaciones débiles en la cantidad y color del micelio aéreo y del pigmento soluble formado. Las diferencias parecen ser cuantitativas.

Agar malato cálcico-glicerina: Cantidades moderadas de micelio en el substrato, que por el reverso varía del color crema pálido cuando es joven, al crema-amarillo intenso a los veintiocho días. Cantidades moderadas de micelio aéreo liso empolvado, de color blanquecino débil. No hay pigmento soluble. El crecimiento está restringido a la línea de inoculación. El malato insoluble clarea en el agar alrededor del crecimiento.

Agar nutricio de Waksman: Cantidad moderada de micelio en el sustrato, de color crema en el re-



226833

verso. Trazas de micelio aéreo blanco, No hay pigmento soluble. El desarrollo, restringido a la línea de inoculación.

5 Agar de Emerson: Abundante micelio del substrato, por el reverso de color crema-parduzco (próximo al Mars Yellow) que se vuelve Buckthorn Brown a los veintiocho días. Cantidad moderada de micelio aéreo empolvado, blanquecino que se vuelve Cartridge Buff pálido al madurar. Superficie de crecimiento áspera y
10 profundamente agrietada; gotitas pasajeras claras de transpiración cerca de los extremos. Trazas de pigmento soluble pardo claro, que aumenta gradualmente en cantidad con la incubación continuada. La cantidad de micelio aéreo producido por cepas distintas varía ampliamente,
15 siendo en un moteado con sectores diminutos que tiene un color azul muy pálido. La cantidad de pigmento pardo soluble varía también; en un cultivo se formó un pigmento pardo-verdoso.

20 Cultivo en patata: Micelio del substrato y aéreo en cantidad moderada, superficie ligeramente áspera (pero no agrietada). Micelio aéreo blanco. Débil o moderada decoloración del pardo en el taco.

25 Gelatina: Una cantidad moderada de superficie de crecimiento floculenta sin formar una película intacta. Escaso micelio aéreo blanco. Desarrollo sumergido escaso. No hay pigmento soluble. Licuefacción moderada gradual; ninguna en siete días, alrededor



226833

de la mitad (25-35 mm) en catorce días y completa en catorce a diecisiete días dependiendo de la cepa.

5 Caldo sintético (fórmula nutricia del agar sintético): Desarrollo escaso de la película floculenta sin micelio aéreo. Muchas colonias sumergidas pegadas a las paredes del tubo. No hay pigmento soluble.

Caldo de tirosina: No hay desarrollo.

10 Caldo nutricio de glucosa: Película gruesa arrugada con escaso micelio aéreo blanco. Cantidad moderada de desarrollo membranoso sumergido. Pequeña cantidad de pigmento soluble pardo debajo de la película.

15 Leche con tornasol (30°C): Buen desarrollo de todas las cepas en forma de película arrugada espesa con micelio aéreo débil de color gris. No hay coagulación. Hidrólisis parcial en once a catorce días completa en catorce a veintiun días, dependiendo de la cepa. Un pigmento soluble muy oscuro oscurece el color del tornasol a los catorce días; pero antes de este tiempo, la
20 reacción neutra se hace alcalina. El pH final es (a los veintiocho días muestras reunidas): 7,80 a 8,00. No hay diferencias significativas de cepa.

25 Leche con tornasol (37°C): los cambios son análogos a los descritos a 30°C. El pH final: 7,46.

En líneas generales, un método preferido de producción de vancomicina es como sigue: Un cultivo inclinado de agar nutricio estéril se inocula con esporas



226833

ción durante el cual se ha producido una considerable cantidad de antibiótico, el micelio se separa del caldo fermentado por un método adecuado, como filtración o centrifugación, y las sustancias antibióticas se recuperan del caldo por un procedimiento adecuado como, por ejemplo, procesos de adsorción utilizando adsorbentes adecuados, por ejemplo, carbón, resinas cambiadoras de ion o similares. De este modo la vancomicina, sus complejos con reactivos orgánicos o sus sales se utilizan para su recuperación. La purificación puede efectuarse por extracción en contracorriente empleando sistemas que contienen disolventes orgánicos o similares.

Los ejemplos siguientes aclaran la preparación y propiedades de la vancomicina:

15

Ejemplo 1.

Se prepara un cultivo inclinado de agar, que contiene los siguientes ingredientes:

	Almidón	20 g.
	Asparraguina	1 g.
20	Extracto de carne	3 g.
	Agar	20 g.
	Agua	1 litro

El cultivo inclinado se inocula con esporas de S. orientalis cepa M43-05865, y se incuba durante unos 10 días a 30°C. El medio se cubre entonces

25



228833

con agua destilada estéril y se rasca para desprender las esporas. La suspensión de esporas resultantes se resguarda para su uso posterior en el proceso.

Un medio líquido de cultivo nutricio se prepara como sigue:

5

Glucosa	15 g.
Harina de soja	15 g.
Sólidos de maceración de maiz	5 g.
cloruro sódico	2 g.
10 carbonato cálcico	2 g.
Agua	1 litro

El medio se esteriliza a 120°C. durante unos 30 minutos en un recipiente adecuado y se enfria. Para inocular el medio se utilizan diez centímetros cúbicos de una suspensión de esporas, preparada como se explicó anteriormente. El medio inoculado se agita durante 48 horas a 26°C. en un agitador de vaivén que tenga 5 cm de recorrido, a 110 RPM. El medio de cultivo fermentado, que contiene un medio de inoculación vegetativo, se utiliza para inocular un cultivo nutricio que contenga los siguientes ingredientes:

15

20

Melazas finales ("Blackstrap")	20 g.
Peptona de soja	5 g.
Glucosa	10 g.
25 sacarosa	20 g.
Carbonato cálcico	2,5 g.
Agua	1 litro

20



226833

El medio se coloca en un recipiente que tenga un exceso de capacidad adecuado, con objeto de asegurar la presencia de oxígeno suficiente, y se esteriliza a 120°C. durante unos 30 minutos. Una vez frío el medio se inocula con unos 25 cm³ de un medio de inoculación vegetativo, como el descrito anteriormente, y el cultivo se agita entonces durante unas 80 horas a 26°C. El pH del medio al comienzo de la fermentación oscila de 6,5 a 7,0 aproximadamente, y el pH final es aproximadamente de 7,0 a 8,0. Un caldo de fermentación así obtenido, contiene alrededor de 180 mcg. de vancomicina por cm³.

Un medio de cultivo adicional, adecuado para la producción en gran escala de vancomicina se prepara como sigue:

Se mezclan los siguientes ingredientes:

Almidón	30 partes
Melazas	20 partes
peptona de soja	7,5 partes
Hidrolizado ácido de proteínas vegetales (Sta-Mino Type A, Staley)	2,5 partes
Agua	1.000 partes

El pH del medio se ajusta de 7-7,2 aprox., y la solución se mantiene durante 30 minutos en autoclave con una presión del vapor de 1.05 Cgs/cm².

Otro medio de cultivo, adecuado para fines de producción, se prepara mezclando los siguientes



20

226833

ingredientes:

	Almidón	30 partes
	Harina de soja hidrolizada	15 partes
5	Productos solubles de la fermentación de maiz con <u>Clostridium acetobutylicum</u>	5 partes
	Agua	1.000 partes

10 El medio se ajusta a pH 7,0-7,2 y se mantiene en autoclave a 1.05 a 1.20 Cgs/cm² de presión durante 30 minutos antes de su empleo.

15 Para la producción de la vancomicina, utilizando los medios de cultivo antes descritos, los medios se colocan en tanques, con un sistema de introducción de aire a presión, se inoculan con un cultivo vegetativo del microorganismo S. orientalis, y se fermentan durante unos 4-6 días a temperaturas en el intervalo de 30-33°C. mientras se agitan y se introducen 0,4 volúmenes de aire por volumen de caldo de cultivo, por minuto. A continuación, se separa el micelio del medio
20 del cultivo y el caldo claro se trata para la recuperación de vancomicina según se expone en los ejemplos siguientes.

Ejemplo 2.

25 Un caldo para inoculación se prepara con la siguiente composición:

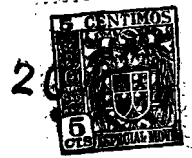


226833

	Glucosa	600 g
	Triptona	200 g
5	Basaminbact (Aminoácidos producidos por conversión enzimática de levaduras primarias)	100 g
	Agua	40 litros

Veinte litros del medio se colocan en un fermentador de 40 litros de capacidad y se esterilizan por calefacción con vapor a presión a unos 120°C., durante 20 minutos. El caldo esterilizado se enfría y se inocular asépticamente con esporas de S. orientalis, NRRL 2450, obtenidas raspando un cultivo en agar de este organismo, según se describió anteriormente. El organismo se desarrolla en el caldo a unos 32°C durante un periodo de unas veinticuatro horas. Durante el período de crecimiento, el caldo se agita a unas 225 RPM y se airea con aire estéril en una cantidad de unos 0,4 volúmenes de aire por volumen de caldo de cultivo por minuto. Después de que la fermentación es completa, este caldo se emplea para inocular el medio de producción descrito a continuación.

En un fermentador de hierro de 1.325 l. se coloca un medio de fermentación adecuado para la producción de vancomicina en gran escala, que tiene la siguiente composición.



226833

	Dextrina, blanca	18,9 kg
	Glucosa	14,2 kg
	Hidrolizado ácido de proteínas vegetales (Sta-mino Type A, Staley)	2,36 kg
5	Peptona de carne (Wilson's Peptone N ^o . 159, húmeda)	14,2 kg
10	Solubles obtenidos por fermentación de maiz con <u>Clostridium acetobutylicum</u> (solubles fermentables B-Y)	4,73 kg
	Agente anti-espuma de silicona (Dow-corning Antifoam A)	lo necesario
	Agua para completar 950 litros	

15 El pH del medio de cultivo se ajusta alrededor de un pH 6,7, utilizando hidróxido sódico acuoso al 40%, y el medio de cultivo se esteriliza entonces calentándolo con vapor a presión a unos 120°C. durante 20 minutos. El caldo se enfría y se añaden asépticamente 16 litros de medio de inoculación vegetativo, obtenido como se describió anteriormente. El organismo se desarrolla en el medio durante unas 96 horas a una temperatura de 28°-30°C. Durante el período de crecimiento el caldo se agita a unas 150 RPM y se introduce aire estéril en el caldo a una velocidad de 0'34 m³ por minuto o 25 alrededor de 0,4 volúmenes de aire por volumen de caldo de cultivo por minuto. De vez en cuando, se añaden cantidades de agente anti-espuma según sea necesario. Al final del período de crecimiento, ensayos microbiológicos del caldo indicaron que tenía una potencia antibió-



226833

1
tica de alrededor de 200 mcg. de actividad de vancomicina por cm^3 de caldo. El pH del caldo después de la fermentación es próximo a 7,6. El caldo se filtra para separar el micelio y el filtrado claro se somete a los procedimientos descritos a continuación para separar de él la vancomicina.

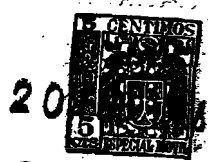
5
Sesenta y seis litros de caldo de cultivo filtrado, se ajustaron a un pH 7 con ácido clorhídrico concentrado y se pasaron sobre 2 litros de una suspensión acuosa de "Permutit" DR (un cambiador de ion decolorante vendido por The Permutit Company, New York) con un pH 8,5, contenidos en una columna de vidrio de 10 cm (La resina había sido previamente regenerada a la forma hidroxílica, de la forma de sulfato, pasando a través de la columna un volumen de NaOH al 4% a una velocidad de 3 cm^3/cm^2 de área de la sección transversal /minuto. La resina se lavó durante una hora aprox. con agua destilada a una velocidad de unos 6 cm^3/cm^2 de área de la sección transversal/minuto. La resina se lavó entonces con agua destilada a una velocidad de unos 0,5 cm^3/cm^2 de área de sección transversal/ minuto, hasta que el pH del efluente cae por debajo de pH 9.). El efluente se deshecha y la resina que contiene la sustancia antibiótica absorbida se lava con 10 litros de agua y las aguas de lavado se deshechan. La sustancia antibiótica se eluyó de la resina con 20 litros de una mezcla compuesta de una parte de ácido acético glacial, 30 partes de acetona y



1950

226833

69 partes de agua. El efluente, que contiene aproximadamente un 85% de la actividad antibiótica original del caldo, se concentró en vacío a un volumen de 15 litros para separar la acetona. La solución acuosa, se ajustó a un pH 7 con solución de NaOH y se agitó 80 minutos con 860 g de carbón activo ("Norit" SG, vendido por la American Norit Company, Jacksonville, Florida). El carbón se separó por filtración en vacío con papel de filtro Nº. 4 Whatman, usando para ayudar a la filtración "Hyflo Super-Cel" (tierra de diatomáceas vendida por Johns-Manville Company). El filtrado se deshechó y el carbón se lavó con 10 litros de agua y se filtró de nuevo. El agua de lavado se deshechó. La sustancia antibiótica se eluyó del carbón con tres porciones de 10 litros de acetona acuosa al 30%, acidulada a pH 2 con ácido sulfúrico concentrado. Los eluatos combinados, que contienen alrededor del 75% de la actividad original del caldo se concentraron en vacío a un volumen de unos 10 litros y el concentrado se neutralizó a pH 7 con solución de hidróxido sódico. La solución acuosa neutralizada se concentró después a unos 730 cm³ por evaporación en vacío, con adificación gradual a un pH 2,1 aproximadamente por adición de ácido sulfúrico. La sustancia antibiótica se precipitó de la solución ácida por adición de un volumen igual de una solución saturada de ácido pícrico, seguida de enfriamiento a unos 5°C. durante unas 16 horas. La suspensión fría se centrifugó y el líquido que



20
226833

sobrenada se separó. El sólido húmedo se lavó con 500 cm³ de agua helada, desechando las aguas de lavado, y el sólido se disolvió en una mezcla de 100 cm³ de metanol y 20 cm³ de ácido clorhídrico acuoso al 10%. La solución ácida se añadió a dos litros de acetona, con lo que precipitó un sólido de color ligeramente tostado. Después de dejar estar con refrigeración durante unas dos horas, la suspensión se separó por centrifugación y el líquido que sobrenada se desechó. El sólido que queda se lavó con 2,8 litros de acetona y 200 cm³ de éter dietílico. Los líquidos de lavado se separaron por decantación y el sólido se secó en vacío durante la noche. El clorhidrato de vancomicina así obtenido era un polvo amorfo de color tostado blanquecino, que pesó 10,88 g y dió un ensayo de 900 mcg/mg.

Ejemplo 3.

16,25 litros de caldo de cultivo filtrado, obtenido por el procedimiento del ejemplo 2, se ajustaron a un pH 8,5, con hidróxido sódico acuoso al 10% y se hicieron pasar sobre unos 6,5 litros de resina cambiadora de catión ("IRC"-50, una resina cambiadora de catión del tipo ácido carboxílico, vendida por Rohm and Haas Company) en el ciclo del sodio a un pH de 8,5 aproximadamente. La resina había sido regenerada previamente del ciclo del hidrógeno con hidróxido sódico acuoso al 4% a un pH por encima de 8,5 aproximadamente, y lavada después a pH 8,5 con agua. Después de pasar el fil-



226833

trado de caldo, la resina se lavó con agua hasta que el efluente se hace incoloro. La actividad antibiótica absorbida sobre la resina, se eluyó pasando ácido sulfúrico 0,1 N sobre la resina, recogién dose el efluente hasta que el pH del mismo asciende a pH 2. (En este procedimiento de elución, puede emplearse también como método alternativo para separar el agente antibiótico de la resina, una solución diluida de hidróxido amónico.) El efluente se neutralizó a pH 7 con solución acuosa de hidróxido bórico caliente, se separó por filtración el sulfato bórico precipitado y el filtrado se concentró a un volumen de unos 2,25 litros, por evaporación en vacío. Este residuo se agitó durante unos 60 minutos con 250 g de carbón activo ("Morit" SG) lavado con ácido acético. La suspensión de carbón se filtró y se desechó el filtrado. La torta se lavó con dos litros de agua, se desecharon las aguas de lavado y el material antibiótico se eluyó del carbón tres veces con porciones de 3 litros de etanol al 50%, acidulado con ácido clorhídrico a un pH de 2 aproximadamente. Los efluentes combinados se concentraron en vacío a un volumen de unos 20 cm³ y se trataron con un volumen igual de una solución saturada de ácido pícrico. El precipitado resultante de material antibiótico se separó por centrifugación. El líquido que sobrenada se desechó y el sólido se disolvió en 20 cm³ de metanol saturado de cloruro de hidrógeno. Se añadieron unos 200 cm³ de éter, con



226833

1
5 lo que se formó un precipitado que contiene la sal de vancomicina con ácido clorhídrico en forma bruta. El precipitado se recuperó por centrifugación. El líquido que sobrenada se desechó, y el residuo de clorhidrato bruto se disolvió en metanol y se precipitó por adición de acetona. El clorhidrato de vancomicina, así preparado, era un polvo amorfo blanco que pesó unos 440 mg y tenía una actividad antibiótica de 900 mcg/mg.

Ejemplo 4.

10 19 litros de un filtrado de caldo de cultivo, obtenido por el procedimiento del ejemplo 2, se ajustó aproximadamente a un pH de 7 con hidróxido sódico acuoso al 10%, y la mezcla neutra se filtró. El filtrado se pasó a través de una columna que contenía
15 una cepa de resina cambiadora de ion (Permutit[®] DR) de 5 cm de diámetro y 32 cm de espesor, que había sido convertida al ciclo hidroxílico, de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 2, Después que todo el filtrado ha pasado a través de la columna, la resina
20 cambiadora de ion se lavó con agua hasta que el efluente esra prácticamente incoloro. La sustancia antibiótica, que quedó retenida en la columna, se eluyó de la resina usando 5 litros de una mezcla consistente en una parte de ácido acético glacial, 30 partes de acetona y
25 69 partes de agua. El eluato se concentró a unos 800 cm³ por evaporación en vacío. El residuo acuoso algo turbio resultante se ajustó a un pH de 7,0 por adición



226833

de hidróxido sódico acuoso al 10%, con lo cual se formó una solución clara. A la solución neutralizada se le añadieron 2.200 g de carbón activa ("Norit" SG). Después de mezclado completamente, se separó el carbón por filtración y se lavó a fondo con agua. El filtrado y las aguas de lavado se desecharon, y la vancomicina presente en el carbón se eluyó con 6 litros de etanol al 50%, previamente ajustado a pH 2 con ácido sulfúrico. El eluato se concentró por evaporación en vacío a un volumen de unos 500 cm³ y el residuo se filtró. El filtrado se ajustó aproximadamente a pH 3 por adición de una solución caliente de hidróxido bórico acuoso y se concentró después a un volumen de unos 80 cm³. A la solución concentrada, se añadieron 150 cm³ de una solución acuosa saturada de ácido pícrico. Se formó un precipitado de picrato de vancomicina y se separó por centrifugación. El líquido que sobrenada se desechó y al residuo sólido se le añadió una mezcla que contenía 10 cm³ de ácido sulfúrico 6N. en 100 cm³ de acetona acuosa, con lo cual el picrato de vancomicina se disolvió y convirtió en sulfato de vancomicina, que quedó en solución. A la solución de acetona acuosa se le añadieron 800 cm³ de acetona, con lo que precipitó el sulfato de vancomicina. El precipitado se separó por filtración, se lavó con acetona y se secó. El sulfato de vancomicina así obtenido pesó unos 1.125 g y era un polvo amorfo, prácticamente blanco que en los ensayos microbiológicos con-



20 FEB 1968

226833

tenía 900 mcg/mg.

Ejemplo 5.

5 64 g de un preparado bruto de clorhidra-
to de vancomicina, obtenido por el método del ejemplo
2, que dan un ensayo de 820 mcg/mg y que contienen consi-
derable cantidad de pigmento pardo, se disolvieron en 13
litros de agua. La solución se ajustó aproximadamente
a un pH 7,0 con hidróxido sódico sólido y se enturbió al
neutralizarse. La solución turbia se aciduló a un pH al-
rededor de 5,0 con ácido clorhídrico concentrado, con lo
10 que la solución se volvió clara. La solución ácida cla-
ra se agitó durante una hora con 1.420 g de carbón acti-
vo ("Norit" SG que había sido lavado previa y sucesiva-
mente con ácido acético y agua y secado en estufa). El
15 carbón se separó por filtración y se lavó a fondo con
agua. La torta de carbón lavada se eluyó con tres por-
ciones sucesivas de etanol al 50% ajustadas a un pH 3
con ácido clorhídrico, siendo el volumen del primer lí-
quido eluyente 17,5 litros y el de los dos eluyentes su-
cesivos 12,5 litros. Los eluatos combinados se concen-
20 traron en vacío a unos 300 cm³, manteniéndose el pH en 3
aproximadamente. La solución concentrada se vertió en
4 litros de acetona fría, con lo que se produjo un preci-
pitado blanco de clorhidrato de vancomicina. La acetona,
25 que contiene el precipitado de clorhidrato de vancomicina,
se refrigeró durante unos dos días y se filtró entonces.
La torta filtrada se lavó con acetona y con éter y se se-



226833

1
5
c6 en vacio durante unas dos horas. La desecacion del
s6lido se complet6 dej6ndolo estar durante la noche a
temperatura ambiente. Se obtuvo una cantidad total de
39 g de clorhidrato de vancomicina amorfo blanco, que
en el ensayo microbiol6gico se encontr6 que tenia una ac-
tividad antibi6tica de unos 900 mcg/mg.

Ejemplo 6.

10
15
Un gramo de clorhidrato de vancomicina
(preparado de acuerdo con el procedimiento del ejemplo
5) se disolvi6 en 20 cm³ de metanol acuoso al 75% y el
pH de la soluci6n se ajust6 aproximadamente a pH 7, por
adici6n de hidr6xido s6dico acuoso diluido. Se form6
un precipitado de vancomicina no combinada que se dej6
estar durante unas 18 horas a 5°C. La suspensi6n blan-
ca resultante se centrifug6 y el s6lido se lav6 con por-
ciones sucesivas de metanol y 6ter frios y se sec6 en va-
c6o.

20
La vancomicina as6 preparada pes6 unos
815 mg y era un polvo amorfo de color blanquecino que
di6 un ensayo de 950 mcg/mg.

25
La valoraci6n electrom6trica de vancomi-
cina en una soluci6n de dimetilformamida-agua (2:1, par-
tes en volumen), cuyo pH de partida era 7,75, indic6 la
presencia de grupos ionizables de pK' α en 5,2, 6.1, 7.5,
9.3, 10.1 y 11.5.

Ejemplo 7.

Se prepar6 una soluci6n que contenia 43 g



226833

de sulfato de vancomicina, que daba un ensayo de 880
mcg/mg, en un litro de agua. La solución clara que te-
nia un pH de unos 2,2, se ajustó a un pH 6,1 aprox. por
edición de una resina cambiadora de anión (IR-45) en for-
5 ma básica o hidroxílica. El líquido turbio que sobrena-
da se separó por decantación y la resina se lavó con 500
cm³ de agua. El agua de lavado se añadió al líquido que
sobrenada y el pH de la solución se rebajó a 1,8 aprox.
por adición de una resina cambiadora de catión (IR-120)
10 en forma ácida, La resina se separó del líquido claro
por filtración y el filtrado se trató de nuevo con resi-
na básica cambiadora de anión (IR-45) hasta que el pH fué
de 7,2. El líquido que sobrenada se decantó de nuevo, se
aciduló a un pH 1,8 con la resina ácida cambiadora de ca-
15 tión y se filtró. El filtrado se neutralizó entonces con
resina básica cambiadora de anión/^aun pH de 7,0, se decan-
tó el líquido que sobrenada y se ajustó a un pH 2,5 con
ácido clorhídrico acuoso al 10%. La solución resultante,
que contiene clorhidrato de vancomicina, se concentró a
20 presión reducida a un volumen de unos 150 cm³ y la solu-
ción concentrada se añadió a dos litros de acetona fría.
La mezcla se refrigeró durante unos 4 días, y después de
esto el precipitado blanco clorhidrato de vancomicina que
se había formado, se separó por filtración y se lavó con
25 porciones sucesivas de acetona y éter. El sólido húmedo
se sometió a desecación a presión reducida durante dos
días y se dejó estar entonces al aire para completar el



20

226833

secado. Se obtuvo un rendimiento total de 39,4 g de clorhidrato de vancomicina blanco amorfo, que en el ensayo biológico contenía 925 mcg/mg.

5 La acción inhibidora del antibiótico clorhidrato de vancomicina contra microorganismos representativos se indica en la Tabla I. La actividad antibacteriana se determinó por el método del ensayo de dilución del caldo. En este método, los organismos ensayados se desarrollaron en un caldo nutritivo que contenía varias concentraciones de vancomicina. 10 Las concentraciones dadas en la tabla son las concentraciones mínimas de vancomicina en mcg/cm³ de sustrato, que inhiben el crecimiento de los organismos ensayados en períodos de incubación de 24 y 48 horas respectivamente, a 37°C. 15

TABLA I

Organismo ensayado	Concentración inhibidora mcg/cm ³	
	24 horas	48 horas
20 <u>Bacillus brevis</u>	3.13	3.13
<u>Bacillus cereus</u>	3.13	3.13
<u>Bacillus licheniformis</u>	0.78	0.78
<u>Bacillus megatherium</u>	0.2	0.2
<u>Bacillus polymyxa</u>	0.39	0.39
25 <u>Bacillus subtilis</u>	0.39	0.39
<u>Corynebacterium diphtheriae</u>		0.78
<u>Micrococcus pyogenes</u> var. <u>aureus</u>	0.78	0.78

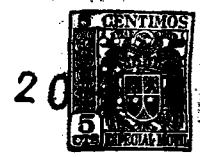
20



226833

TABLA I (continuación)

	Organismo ensayado	Concentración inhibidora mcg/cm ³	
		24 horas	48 horas
5	<u>M. pyogenes var. aureus</u> (eritromicina-resistente)	1.56	1.56
	<u>M. pyogenes var. aureus</u> (penicilino-resistente)	0.78	0.78
10	<u>M. pyogenes var. aureus</u> (estrep-tomicino-resistente)	1.56	1.56
	<u>M. pyogenes var. aureus</u> H	1.56	1.56
	<u>Mycobacterium phlei</u>	12.5	25
	<u>Mycobacterium smegmatis</u>	^	3.13
15	<u>Sarcina lutea</u>	0.78	0.78
	<u>Achromobacter fischeri</u>)100)100
	<u>Aerobacter aerogene</u>)100)100
	<u>Brucella bronchiseptica</u>)100)100
	<u>Escherichia coli</u>)100)100
20	<u>Klebsiella pneumoniae</u>)100)100
	<u>Mycobacterium avium</u>	100	100
	<u>Proteus vulgaris</u>)100)100
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>)100)100
	<u>Shigella paradysenteriae</u>)100)100
25	<u>Candida albicans</u>)100)100
	<u>Saccharomyces carlsbergensis</u>)100)100
	<u>Aspergillus niger</u>)100)100
	<u>Trichophyton rubrum</u>)100)100
30	^Crecimiento insuficiente para permitir apreciar la inhi- (bición)		



226833

De la tabla anterior, se deducirá que la vancomicina es activa principalmente contra bacterias Gram-positivas, tiene una actividad limitada contra las mycobacterias y parece no tener actividad contra las bacterias Gram-negativas empleadas en los ensayos. Es significativo que cepas de M. pyogenes var. aureus, que se sabe que son altamente resistentes a ciertos antibióticos utilizados extensamente, aparecen ser aquí tan susceptibles a la acción inhibitoria de la vancomicina como su cultivo madre, sensible a los antibióticos.

La vancomicina libre es una sustancia amorfa, anfótera, que es soluble en agua en intervalos de pH ácidos y básicos y menos soluble a neutralidad. Es estable en forma sólida y en solución acuosa en un intervalo de pH de 2,5 a 9 aproximadamente. Es débilmente soluble en los alcoholes inferiores e insoluble en la mayoría de los demás disolventes orgánicos. El análisis elemental revela que la vancomicina contiene alrededor de 7,17% de nitrógeno. Determinaciones del peso molecular de la vancomicina por métodos que emplean la ultracentrifuga, indican que el nuevo antibiótico tiene un peso molecular en el intervalo de unos 3.000 a 3.200. Datos de valoraciones electrométricas parecen indicar que existe un cierto número de grupos funcionales en la molécula. A causa del bajo porcentaje de nitrógeno y del peso molecular relativamente bajo de la vancomicina es evidente que la sustancia no es una proteína o un polipeptido. Una

20

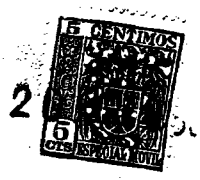


226833

5 papilla en aceite mineral de vancomicina tiene máximos de absorción espectral en la región infrarroja en las siguientes longitudes de onda, expresadas en micrones: 3.10, 3.41, 6.05, 6.30, 6.72, 6.84, 7.26, 7.64, 8.13, 8.50, 8.66, 8.87, 9.42, 9.76, 10.10, 10.34, y 11.24. La absorción en 3,41, 6.84 y 7.26 micrones parece ser debida por lo menos en parte al aceite mineral empleado como vehículo. Debido a su naturaleza anfótera, la vancomicina reacciona con ácidos inorgánicos, por ejemplo, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico y similares y, por conveniencia, a los compuestos resultantes se les ha atribuido aquí el nombre de sales, aunque pueden no ser sales normales verdaderas.

15 Cuando se aísla como clorhidrato de vancomicina es una sustancia blanca amorfa, que es soluble en agua y débilmente soluble en metanol y etanol. Es relativamente insoluble en otros disolventes orgánicos, como cloroformo, éter, acetato de etilo y butanol. Su solubilidad en agua a un pH 7.0 es aproximadamente 1mg/cm³ y es más soluble en agua a valores de pH más bajos y a valores de pH por encima de 8,5-9. El clorhidrato de vancomicina es estable en forma sólida y en soluciones acuosas a temperaturas hasta 70°C. en el intervalo de pH de 2,5 a 9 aproximadamente.

25 Cuando se inyecta por vía intravenosa en ratas blancas, de acuerdo con los procedimientos de ensayos farmacológicos normales, la toxicidad aguda del



226833

clorhidrato de vancomicina expresada como LD₅₀ (dosis necesaria para matar el 50% de los animales) se ha encontrado que es 453.7 ± 42.2 mg/kg.

5 La vancomicina se diferencia claramente de los antibióticos conocidos, con los que puede ser comparado sobre la base de sus características físicas, como se indica a continuación. Las características de los siguientes antibióticos conocidos se han tomado de Waksman et al. Actinomycetes and Their Antibiotics, Baltimore 10 ee 1953, Williams and Wilkins Company. Las características físicas de la vancomicina indican que se asemeja muy estrechamente a estas sustancias conocidas, según el sistema de clasificación de Waksman, pero la comparación indica que la vancomicina puede distinguirse claramente 15 de los otros antibióticos.

20 **Netropsina:** activa frente a bacterias Gram-negativas y es tóxica, teniendo una toxicidad aguda LD₅₀ cuando se inyecta por vía intravenosa en ratas blancas de 17 mg/kg; el clorhidrato de vancomicina 453,7 mg/kg.

25 **Amicetina:** puede extraerse por disolventes y tiene mayor actividad frente a las mycobacterias que frente a bacterias Gram-positivas; la vancomicina no se puede extraer por disolventes y es activa frente a bacterias Gram-positivas.

Griseoflavina: soluble en acetato de etilo; la vancomicina es insoluble en acetato de etilo.



20

226233

Sulfactina: soluble en cloroformo; la vancomicina es insoluble en cloroformo.

5 Vinacetina: soluble en disolventes orgánicos, como el cloroformo, acetato de etilo, acetato de butilo y acetona; la vancomicina es insoluble en estos disolventes.

Cinamicina: inactiva frente a bacterias Gram-positivas en forma de bastón; la vancomicina es activa frente a estas bacterias.

10 Viomicina: principalmente activa frente a las mycobacterias; la vancomicina es activa frente a bacterias Gram-positivas.

Nocardina: activa frente al E. coli; la vancomicina no es activa frente al E. coli.

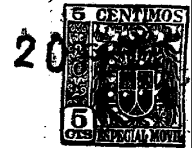
15 Erytromicina: soluble en acetato de etilo; la vancomicina es insoluble en acetato de etilo.

Carbomicina: soluble en acetato de etilo; la vancomicina es insoluble en acetato de etilo.

20 Micromonosporina: es una proteína; la vancomicina no es una proteína.

Neonocardina: activa contra el E. coli; la vancomicina es inactiva frente a este microorganismo.

25 Cardicina: soluble en butanol y activa frente a hongos y bacteriófagos; la vancomicina es insoluble en butanol y activa frente a microorganismos Gram-positivos.



226833

Proactinomicina: soluble en acetato de etilo; la vancomicina es insoluble en acetato de etilo.

Picromicina: puede extraerse con éter; la vancomicina es insoluble en éter.

5 Los dibujos adjuntos representan cromatogramas de papel obtenidos cromatografiando, con diferentes sistemas de disolventes, la vancomicina y otros agentes antibióticos representativos. En ambos dibujos, la línea base del cromatograma de papel se indica por una línea recta corta para cada antibiótico.

10 La figura 1 representa el cromatograma obtenido cuando vancomicina, viomicina, estreptotricina, cinamicina, neomicina, dihidroestreptomomicina, hidroxiestreptomomicina, mannosidestreptomomicina y catenulina se depositan sobre papel de filtro Whatman N^o. 4 y se revelan con un disolvente acuoso compuesto de 80% de etanol y 1,5% de cloruro sódico, amortiguado con sulfato sódico 0,95 M y sulfato ácido de sodio mono hidrato 0,05 M.

15 La figura 2 representa el cromatograma obtenido cuando las sustancias antibióticas arriba relacionadas se depositan sobre papel de filtro Whatman N^o. 1 y se revelan con un disolvente que consiste en una mezcla de 2 partes de n-butanol, 1 parte de ácido acético y 1 parte de agua.

20 La vancomicina es útil para el tratamiento de enfermedades ocasionadas por bacterias Gram-positivas y ha sido usado con éxito para el tratamiento de en-



226833

fermedades de garganta estreptocócicas, erisipelas, y
pneumonia en los seres humanos. Para tratar enfermeda-
des de este carácter, la vancomicina se proporciona con-
venientemente en forma de soluciones acuosas tamponadas
5 o soluciones prácticamente acuosas, que contienen unos
100 mg/cm³ de antibiótico, y esta solución es preferi-
ble diluirla antes de su uso con soluciones salinas nor-
males estériles o soluciones de glucosa estériles, en
una concentración de 100 mg de vancomicina en 10 cm³ de
10 disolvente. La solución se administra generalmente por
inyección intravenosa en una cantidad de unos 10 cm³,
repetiéndose de preferencia la administración cada 6 a
8 horas durante tanto tiempo como esté indicada la tera-
péutica antibiótica.

15 La presente solicitud, que corresponde
a la presentada en Estados Unidos de América con fecha
16 de Septiembre de 1955, bajo el número 534.666, se a-
coge a los beneficios establecidos por el artículo 51
del vigente Estatuto-Ley sobre Propiedad Industrial.

- N O T A -

20



226833

5^o.— Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 ó 3, caracterizado porque el microorganismo es Streptomyces orientalis NRRL 2451.

5 6^o.— Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 ó 3, caracterizado porque el microorganismo es el Streptomyces orientalis NRRL 2452.

10 7^o.— Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque se hace reaccionar el agente antibiótico con un ácido para formar una sal ácida de adición.

8^o.— Un método para la producción de un agente antibiótico.

15 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representada por los dibujos que se acompañan y para los fines que se han especificado.

La presente Memoria consta de treintaseis hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 20 FEB. 1951

P. A.

Alberto G. ...
Artz

ELI LILLY AND COMPANY.

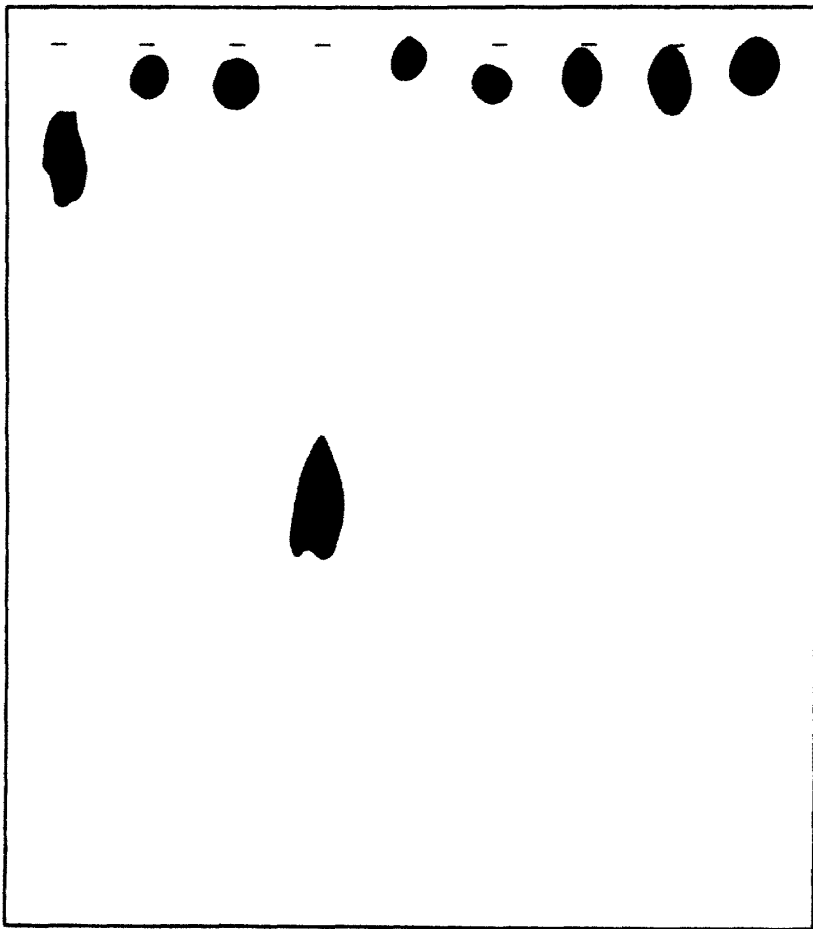
ESQUELETO VERIFICADO

1/11

20



226833



AIDORO DE FIZHER
For Post

FIG. 1

20



226833

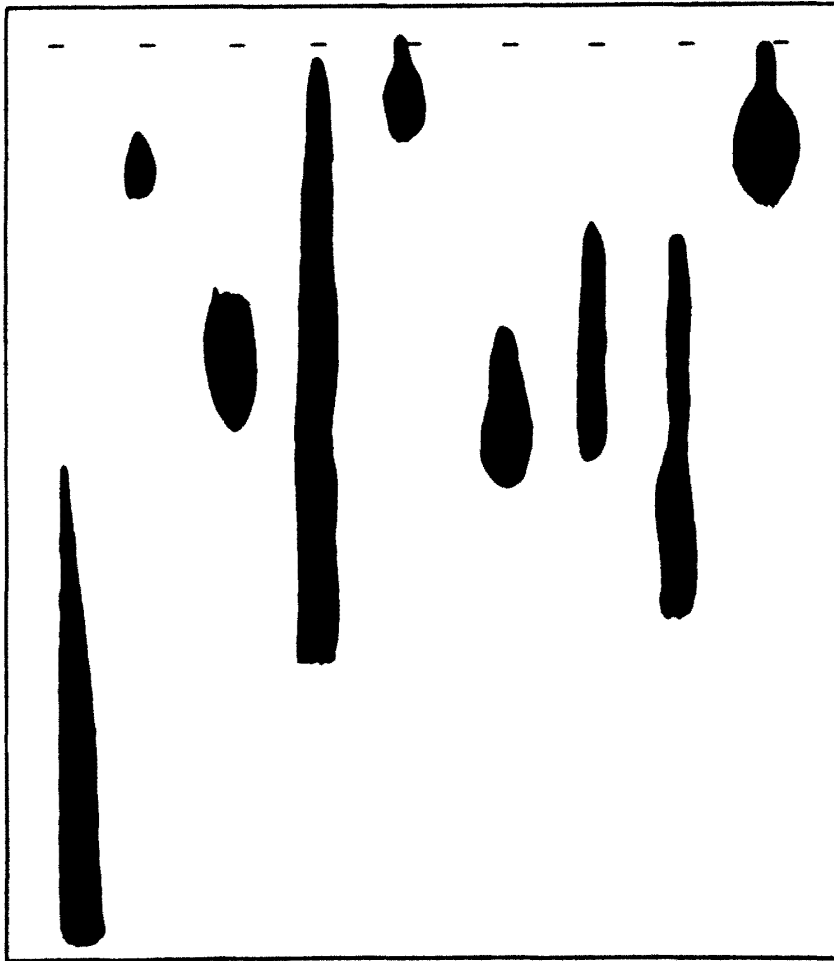


FIG. 2

Alberto de Elzabara
Pat. Fed.