

228089

P.- 14.523

Núm A.16857. Case 15500  
L J R.

228089



22

22 MAY 1956

MEMORIA DESCRIPTIVA  
para solicitar

P A T E N T E D E I N V E N C I O N  
e n  
E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de AMERICAN CYANAMID COMPANY, entidad norteamericana,  
establecida en 30, Rockefeller, Plaza, Nueva York, N Y.  
Estados Unidos de América, por:

"UN METODO DE PRODUCCION DE UN ANTIBIOTICO"

-----

Esta invención se refiere a un nuevo antibiótico y a procedimientos de obtención del mismo. Más particularmente, la invención se refiere a una sustancia antibiótica producida por cepas de microorganismos de una especie de Streptomyces no descrita hasta ahora. Este nuevo antibiótico y sus sales son eficaces contra tripanosomas, amebas y bacterias gram-positivas. La invención incluye el antibiótico, sus sales y los métodos de producción y de aislamiento de los mismos.

5



# 228089

El nuevo antibiótico en su estado purificado es un material cristalino blanco que posee propiedades débilmente básicas. Una muestra analítica preparada como se describirá más adelante dió los resultados siguientes por análisis elemental:

5  
  
  
  
  
10

Carbono.....	34,03
Hidrógeno.....	4,05
Nitrógeno.....	21,60
Azufre.....	8,30
Oxígeno.....	32,02, por diferencia.

El compuesto es de peso molecular relativamente bajo. Su fórmula empírica, basada en el análisis anterior, corresponde estrechamente a  $C_{11}H_{15-16}N_6O_8S$ .

15

El nuevo antibiótico es casi completamente estable en el agua a la temperatura ambiente durante 24 horas a concentraciones de iones hidrógeno de p H 3, p H 7, y p H 9. A temperaturas elevadas muestra una cierta inestabilidad, particularmente a 100° C. y más.

20

Los espectros de adsorción de infrarrojo del antibiótico se representan en la Figura 1. La curva se determinó en una muestra del material que se había mezclado con cristales de KBr y se prensó hasta obtener un disco. El espectro de adsorción de ultravioleta a p H 7,0 se representa en la Figura 2.

25

La rotación óptica de una muestra del antibiótico purificada era  $[\alpha]_D^{24,5} = 33,3$  (1,052 gramos en 100 ml. de 50 por ciento de etanol y 50 por



228089

ciento de ácido clorhídrico 0, 1 N. Rotación observada corregida = 0,352 en un tubo de 1 dm.

El nuevo antibiótico es soluble en los disolventes siguientes, a la temperatura ambiente, en las proporciones aproximadas que se indican y que se expresan en miligramos por mililitro de disolvente:

	Agua -	pH 3,5 .....	5,8 (a)
	Agua -	pH 6,5 .....	1,9 (a)
	Agua -	pH 9,25 .....	26,8 (a)
10	Metanol.....		14,2 (a)
	Acetona.....		4,8
	n-butanol.....		0,25
	Acetato de etilo.....		0,36
	Benceno.....		0,137
15	Eter.....		0,031

(a) Estas cifras se obtuvieron gravimétricamente.

El nuevo antibiótico de la presente invención es fuertemente adsorbido sobre carbón vegetal en una amplia gama de concentraciones de ión hidrógeno que se extiende desde pH 3 hasta pH 9. Es débilmente adsorbido en adsorbentes comunes tales como silicato de magnesio activado, alúmina, alfa-celulosa y tierra de batán en condiciones de pH ácido, neutro y alcalino. Puede ser adsorbido por resinas de cambio catiónicas de soluciones neutras o ligeramente alcalinas y puede ser eluido de ellas con una solución ácida o básica.

El nuevo antibiótico es muy activo contra

22



228089

tripanosomas tales como Trypanosoma equiperdum y amebas tales como Amoeba histolytica y es, pues, valioso en el tratamiento de la enfermedad ocasionada por éstos microorganismos en los seres humanos y en los animales empleado en las cantidades y la manera prescrita por el médico o el veterinario asistente. Es asimismo activo contra varias bacterias según se muestra en la tabla siguiente, en la cual se pone de manifiesto su espectro bacteriano utilizando una solución de 200 microgramos por mililitro del antibiótico en metanol acuoso en el procedimiento de difusión en agar al 20 por ciento tipo:

	<u>Organismo</u>	<u>Anchura de la zona en mm.</u>
	B. cereus Waksman.....	8,0
15	K. Pneumoniae (Friedlander's).....	2,9
	Salmonella gallinarum pH 7,8.....	7,0
	Salmonella gallinarum pH 6,0.....	6,1
	Alcaligenes sp. ATCC 10153.....	ligera
	Staph. aureus nº (1209).....	6,0
20	B. subtilis pH 7,8.....	8,9
	B. subtilis pH 6,0.....	9,4
	B. subtilis, resistente a la streptotricina.....	3,0
	M. ranae.....	0
	M. tuberculosis pH 7,8.....	2,9
25	M. tuberculosis pH 6,0.....	7,1
	Staph. albus.....	8,0
	K. pneumoniae.....	7,5



228089

Organismo

Anchura de la zona en mm.

- E. coli.....7,0
- Streptococcus haemolyticus NY5.....16,1
- Corynebacterium xerose..... 7,0

5

El nuevo antibiótico es producido por una especie Streptomyces a la cual hemos asignado nuestro número T3018, y que al parecer, no ha sido descrita anteriormente. Una descripción general de esta nueva especie es como sigue:

10

Los colores escritos con mayúscula son los de Ridgeway.

Micelio aéreo: ausente en numerosos medios; presente en algunos medios y entonces limitado en cantidad, blanco a gris parecido al (Gris Gaviota Pálido a Gris Gaviota claro).

15

Micelio vegetativo: desarrollo apretado; blancuzco a amarillo (parecido al Amarillo marfil a Ante a Amarillo Miel).

Coloración del reverso: blancuzca a amarilla (parecida al Amarillo marfil a Amarillo Miel a Ante Canela); en ciertos medios se presentan zonas oscurecidas (parecidas a Gris pardusco) mezcladas con zonas amarillas.

20

Pigmento soluble: ninguno en la mayoría de los medios; amarillo claro en agar de manitol Czapek-Dox a 32° y 37° C.

25

Morfología: las hifas aéreas en agar de almidón de Waksman están ramificadas; las hifas esporíferas se presentan principalmente en forma de racimos de ramas laterales que terminan en cortos arrollamientos de varias vueltas.



228089

Las esporas son casi esféricas a alargadas

(0,57 - 1,14 por 0,57 - 1,71  $\mu$  ).

Las características de cultivo en medios de agar usuales en placas petri se describen en la tabla I:

En la Tabla II se describen más características de cultivo:

Evidentemente, con las diferente cepas de ésta nueva especie y en respuesta a diferentes condiciones de medio ambiente se presentan variaciones en las anteriores características del tipo de las que se presentan al tratar con hongos.

Tabla 1. Características de cultivo de la especie *Streptomyces* de incubación en placas Petri a 28° C.

Medio	Desarrollo	Micelio aéreo	micelio vegetativo
	Bueno	Ligero; blanco	Amarillo (ante-crema a ante)
5	Bueno	Muy ligero; blanco a gris claro (casi gris mineral claro)	Crema claro a amarillo (casi ante)
10	Regular	Ninguno	Crema ligeramente blancuzco
	Regular	Ninguno	Amarillo blancuzco
15	Moderado	Escaso a moderado gris azulado (Gris Gaviota Pálido a Gris Gaviota Claro)	Blancuzco a amarillo (casi Ante)
20			

22 MA

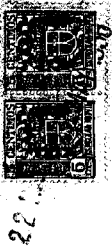


T-3018 , después de 14 dias

Reverso	Pigmento soluble	Observaciones
---------	------------------	---------------

228089

Amarillo (casi ante)	Ninguno	Desarrollo diseminado
Amarillo (ante a amarillo miel)	ninguno	Diseminado
Blancuzco a amarillo claro (casi color crema)	Ninguno	---
Crema blancuzco	Ninguno	---
Blancuzco a amarillo (casi Ante); zonas oscuras casi gris parduzco	Ninguno	Desarrollo apretado; agar no completamente claro



22

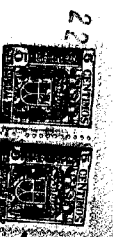
228089

Tabla 1. Características de cultivo de la especie *Streptomyces* 3018, después de 14 días de incubación en placas Petri a 26° C.

Medio	Des-arroyo	Micelio aéreo	Micelio vegetativo.	Reverso	Pigmento soluble	Observaciones.
Agar almidón Czapek-Dox	Moderado	Blanco a gris (casi gris violeta pálido) escaso a moderado	Blancuzco a amarillo (casi Ante)	Blanco a amarillo (Ante claro a color crema)	Ninguno	Agar no completamente claro
Agar malato cálcico	Moderado	Ninguno a blanco	Blanco a amarillo (Ante Crema a Amarillo miel)	Blancuzco a ama rillo (casi Ama rillo miel)	Ninguno	Aclareamiento del agar
Dextrosa patata	Moderado	Ninguno a claro; blanco a gris (casi Gris Gaviota claro)	Blancuzco a amarillo (Ante Crema a Ante Crema claro)	Blancuzco a ama rillo (Amarillo marfil a Ante Crema)	Ninguno	---
Agar de Bennett	Escaso	Escaso a abundante; blanco	Blancuzco a amarillo	Amarillo (casi Ante Canela)	Ninguno	---
Agar licor de maceración de maíz	Moderado	Escaso a moderado; blanco claro	Escaso a moderado-amarillo	Amarillo (casi Ante a Amarillo Miel)	Ninguno	---
Agar de dextrosa de Krainsky	Regular	Ninguno	Amarillo (casi Amarillo marfil)	Amarillo (Ante rillo Marfil a Ante Crema)	Ninguno	---

Tabla I. Características de cultivo de la especie *Streptomyces* de incubación en placas Petri a 28° C.

Medio	Des-arrollo	Micelio aéreo	Micelio vegetal- fijo	Reverso	Pigmento soluble	Observaciones.
Agar nutritivo	Moderado	Ninguno	Amarillo claro mate	Amarillo (casi Arte Crema)	Ninguno	
Agar de maltosa	Regular	Ninguno	Blancozco a Arte Crema	Blancozco a amarillo (casi amarillo Miel)	Ninguno	
Agar de glucosa	Moderado	Ninguno a li- gero; blanco	Amarillo blan- cozco a ceniza amarillo claro mate	Amarillo blan- cozco a amarillo (Arte a Amarillo Miel)	Ninguno	
Agar de Emerson	Moderado	Ligero; blanco	Amarillo claro mate	Amarillo (casi Amarillo Miel)	Ninguno	



228089

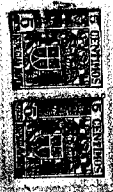
Tabla II.-Características de cultivo de la especie Streptomyces de incubación a 28° C.

Medio	Desarrollo	Micelio aéreo	Micelio vegetativo
Trozos de zanahoria	Malo	Ninguno	Muy ligero; blanco y a amarillo claro
Trozos de patata	Moderado	Ligero; blanco	Amarillo (casi negro rosado) a amarillo naranja (casi verde ante)
Gelatina	Moderado	Ninguno	Blancuzco a amarillo
Leche coloreada con tornasol	Ligero a bueno	Ninguno	Amarillo Blancuzco
Saldo de nitrato de dextrosa	Ligero a bueno	Ninguno	Blancuzco a amarillo claro
Gelulosa (papel de filtro en solución de Czapek)	Ligero	Ninguno	Amarillo claro

T-3018, después de 14 días

Pigmento soluble	Otros
-	-
-	Trozo no de colorado
Ninguno	Licuefacción
Ninguno	Clarificación ninguna a completa
Ninguno	Reducción de nitrato
Ninguno	Papel no decolorado compuesto a los 21 días.

228089





El proceso de fermentación.

228089

El proceso por el cual se produce el nuevo antibiótico es una fermentación aerobia de un medio nutritivo acuoso inoculado con el nuevo organismo descrito antes.

5 Los constituyentes del medio de fermentación y las condiciones de la fermentación son generalmente los de otros procesos de fermentación en los que se emplean hongos para producir antibióticos.

10 Las fuentes de carbono incluyen: almidón, almidón hidrolizado, azúcares tales como lactosa, maltosa, dextrosa, sacarosa, o fuentes azucaradas tales como melazas; alcoholes, tales como glicerina y manitol; ácidos orgánicos, tales como ácido cítrico y ácido acético; y diversos productos naturales que pueden contener además de sustancias carbonosas otros varios materiales nutritivos. Las fuentes de  
15 nitrógeno incluyen proteínas, tales como caseína, zeína, lactalbúmina; hidrolizados de proteínas, proteosas, peptonas, péptidos y materiales comerciales, tales como M-Z Amine que, se cree, es un hidrolizado de caseína; también líquido de  
20 maceración de maíz, harina de soja, gluten, harina de semilla de algodón, harina de pescado, extractos de carne, "stick liquor", torta de hígado, extractos de levadura, solubles de destilerías y análogos; aminoácidos, urea, sales de amonio y nitratos, etc. Los cationes inorgánicos, tales  
25 como sodio, potasio, calcio, magnesio, etc.; y los aniones, tales como el cloruro, sulfato, fosfato y varias combinaciones de éstos aniones y cationes en forma de sales minerales se emplean ventajosamente en la fermentación. Los llamados



228089

5 elementos traza, tales como boro, cobalto, hierro, cobre, cinc, manganeso, cromo, molibdeno y otros más se pueden usar con ventaja. Generalmente, el azufre del antibiótico y los elementos traza se presentan en cantidades suficientes en los constituyentes carbonados y nitrogenados del medio, particularmente si proceden de fuentes naturales, o en el agua de la cañería, y la adición de más cantidades de los mismos puede ser innecesaria.

10 La fermentación se airea de la manera corriente haciendo pasar aire estéril a través de la mezcla fermentante, usualmente en la proporción de aproximadamente 1 volumen de aire por volumen de medio de fermentación por minuto. Para reducir al mínimo la contaminación por microorganismos extraños, las vasijas de fermentación deben estar cerradas y debe mantenerse una presión de 0,14061 - 1,05461 Kg. superior a la atmosférica en la vasija. Es generalmente conveniente la agitación mecánica además de la agitación proporcionada por la aireación. De vez en cuando se pueden añadir agentes anti-espumantes, tal como octadecanol al 1 % en aceite de manteca de cerdo, a medida que sea preciso para impedir una excesiva formación de espuma.

25 La fermentación se efectúa a una temperatura preferiblemente del orden de 26 a 30° C., pero puede ser tan solo de 17° C. o tan alta como de 42° C.

El tiempo requerido para la producción máxima de antibióticos suele variar considerablemente, según

22



228089

5 las otras condiciones de la fermentación. En general, se necesitan unas 48 horas para descubrir cantidades apreciables del antibiótico en el medio. La producción de antibiótico aumenta con el tiempo y la fermentación puede durar hasta 120 horas. Las condiciones de ión hidrógeno varían normalmente desde pH 6 a pH 8,0, si bien son permisibles las desviaciones de éstos valores.

#### Ejemplo I.

10 Se preparó un inóculo adecuado para comenzar una fermentación en gran escala de la manera siguiente:

15 Se usan 5 a 10 ml. de agua estéril para suspender el crecimiento superficial de un cultivo inclinado en tubo de ensayo en agar. La suspensión resultante de esporas y trocitos de micelio se emplea para inocular dos lotes de 100 ml. de medio estéril en frascos Erlenmeyer de 500 ml. Los dos frascos, después de la inoculación, se incuban en un agitador de movimiento alternativo a unos 28° C. durante unos 2 días, después de lo cual los 200 ml. de inóculo primario se utilizan para inocular 6 litros de medio estéril en una botella de vidrio de 9 litros, 20 que a su vez se incuba, con aireación, generalmente durante un día poco más o menos, a unos 28° C. Los 6 litros de cultivo de la botella se usan luego para inocular 100-200 litros o más de medio estéril en un tanque fermentador. 25 Para lotes mayores, de 500 litros o más, se obtienen ordinariamente inóculos mayores juntando dos o más inóculos de botellas de 6 litros.

un medio de fermentación de la composición siguien-



228089

te:

	Licor de remojo de maiz.....	12,5	gramos
	Monitol.....	10,0	"
	Cloruro sódico.....	2,0	"
5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2,0	"
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,5	"
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	0,25	"
	Solución de elementos traza Wiscon- sin A-Z .....	1,0	"

10 se completó hasta 1.000 mililitros con agua y se ajustó a pH 7 - 7,2 con hidróxido sódico acuoso.

15 Se colocaron 1.500 litros de este medio en un tanque fermentador de 2.272 litros; se esterilizó durante unos 60 minutos a 1,05 kg. de presión de vapor (120° C.) y se inoculó con 12 litros de cultivo de botella de 23 horas como se ha descrito antes. El pH era de 6,96 antes de la esterilización y de 6,68 después de la esterilización. La mezcla se fermentó durante 112,5 horas a 26-29° C. (la mayor parte del tiempo 27-28° C.).

20 Además de la fermentación anterior, se efectuaron varias fermentaciones análogas en condiciones diversas, según se ilustra en la tabla siguiente. Los resultados del ensayo se obtuvieron usando el organismo Streptococcus haemolyticus cepa C-203 como organismo de  
25 ensayo con Infusión Difco-Bacto de cerebro y corazón reconstituída con agua y 1 1/2 por ciento de agar como medio de desarrollo.

Ex.	Capacidad del tanque en litros	Litros de medio	Inóculo		Temp °C.
			Litros de cultivo en botella	Edad del cul- tivo en bo- tella en horas	
I	2.272	1.500	12	23	26 - 29
II	454	200	6	28,5	28
III	454	200	6	26	28
IV	909	400	6	30,5	27 - 29

\* Antes de la esterilización. Sin el asterisco "0" indica después de la este



Relación de aireación:

Vol de aire

a Vol de medio

Tiempo en horas de

fermen

tación

pH

Anchuras

de la

zona de ensayo

228089

Vol de medio	Tiempo en horas de fermentación	pH	Anchuras de la zona de ensayo
0,85	0*	6,96	-
	0	6,68	-
	96	6,22	29,0
	112,5	6,54	31,2
0,95	0*	7,02	-
	0	6,72	-
	48	6,52	23,3
	72	7,13	27,7
	89	7,22	31,3
0,95	0*	7,26	-
	0	6,72	-
	74,5	6,43	31,3
	91,5	6,70	32,7
1,00	0*	7,18	-
	0	6,55	-
	72,5	6,80	29,2
	89	7,24	30,6

rilización

22



228089

Procedimientos de aislamiento.

Se han ideado varios métodos de recuperación del antibiótico del licor de fermentación, que se basan en las propiedades físicas y químicas del antibiótico. En general, es preferible filtrar el licor de fermentación para separar los micelios y otros componentes insolubles de la fermentación por filtración al pH de la recogida. Se emplea un auxiliar de la filtración, tal como tierra de diatomáceas. El antibiótico puede ser adsorbido luego en un adsorbente y eluido de él. Los procedimientos de extracción por disolventes, cromatográficos y de salificación se emplean también, según se verá en los ejemplos específicos que siguen.

Un procedimiento de aislamiento preferido comprende las operaciones de adsorber el antibiótico del licor de fermentación filtrado sobre carbón vegetal activo y eluir después la actividad con un disolvente polar. La actividad se adsorbe en el carbón vegetal al pH natural del licor de fermentación que puede ser de pH 6,5 a 8,0. El eluyente es, preferiblemente, un disolvente polar miscible con el agua, tal como una mezcla de 95 por ciento de acetona y 5 por ciento de agua. No es necesario ningún ajuste particular de la concentración del ión hidrógeno del eluyente. En lugar de acetona acuosa, podemos usar metanol acidificado hasta un pH de 2 a 3 o a un pH tal alto como 9. Otros alcoholes tales como el alcohol etílico, los propanoles, los butanoles y análogos, se pueden usar también como eluyentes. Estos pueden rebajarse

<u>Ex.</u>	Capacity of tank in <u>Gallons</u>	Liters of <u>Medium</u>	<u>Inoculum</u>		<u>Temp.</u> °C.
			Liters of <u>Bottle Culture</u>	Age of Bottle culture <u>in hours</u>	
I	500	1.500	12	23	26 - 29
II	100	200	6	28,5	28
III	100	200	6	26	28
IV	200	400	6	30,5	27 - 29

\*Before sterilization. Without the asterisk, "0" indicates after ste

22



228089

Aeration- Ratio:Vol. of Air to Vol. Medium	Time in Hours of Fermen- tation	pH	Assay Zone Widths
0,85	0*	6,96	-
	0	6,68	-
	96	6,22	29,0
0.95	112.5	6.54	31.2
	0*	7.02	-
	0	6.72	-
	48	6.52	23.3
	72	7.13	27.7
0.95	89*	7.22	31.3
	0	7.26	-
	0	6.72	-
	74.5	6.43	31.3
	91.5	6.70	32.7
1.00	0*	7.18	-
	0	6.55	-
	72.5	6.80	29.2
	89	7.24	30.6

rilization.



228089

5 con agua hasta 50 por ciento o más cuando se desee. Otros  
disolventes polares hidroxilados, miscibles con el agua,  
son los "Cellosolves", tales como el éter etílico del eti-  
lenoglicol y análogos. Los ácidos diluidos tales como el  
10 ácido clorhídrico veinte-normal y el ácido acético se pue-  
den utilizar también como eluyente para recuperar el anti-  
biótico adsorbido del carbón vegetal. Otros disolventes  
polares que pueden usarse para recuperar la actividad del  
carbón vegetal son la piridina, las soluciones acuosas de  
15 fenol y otros más de tipo semejante.

La adsorción y la elución se pueden realizar de  
diversos modos familiares a todos aquéllos impuestos en  
el arte. El licor de fermentación filtrado puede simplemen-  
te agitarse con el carbón vegetal y luego se puede filtrar  
15 y la actividad se puede recuperar de la torta de filtración  
pasando el eluyente a través de la torta o agitándola con  
el eluyente. Otro procedimiento corriente consiste en pa-  
sar el licor de fermentación por una columna rellena de  
carbón vegetal y pasar luego el eluyente por ésta columna.  
20 La elución puede ser precedida por un lavado con agua para  
quitar las impurezas solubles en el agua que no son fuer-  
temente adsorbidas en el carbón vegetal.

Después de recuperar la actividad del carbón ve-  
getal adsorbente, es generalmente conveniente concentrar  
25 el eluyente. Si se desea, la concentración puede efectuar-  
se hasta sequedad y el material se puede almacenar hasta  
que esté listo para ulterior purificación. Debido a la ele-

22



228089

5 vadisima actividad antitripanosómica del material, puede ser apropiado para su uso en el tratamiento de animales en este estado del procedimiento. En realidad, el antibiótico es tan altamente activo que el mismo licor de fermentación ha resultado eficaz in vivo contra Trypanosoma equiperdum.

10 Una purificación más avanzada se puede realizar mediante cromatografía con carbón activo. En éste procedimiento se prepara una columna de carbón activo y el antibiótico concentrado se disuelve en un disolvente adecuado tal como 50 por ciento de acetona y 50 por ciento de agua y se pasa a través de la columna. La columna se desarrolla o revela luego por el paso continuo de un disolvente semejante hasta que las impurezas débilmente adsorbidas de la columna son eluidas y separadas. Cuando la actividad antibiótica comienza a salir bien de la columna, lo cual se determina por simples ensayos de actividad del tipo que se describe aquí en otro lugar, se hace pasar un eluyente más fuerte del tipo descrito antes a través del lecho de carbón y se recupera así la actividad.

20 El eluyente puede concentrarse o secarse por liofilización. Frecuentemente se recuperan cristales del antibiótico como resultado de la operación de concentración.

25 Una purificación aun más avanzada del antibiótico se puede lograr por diversos métodos, algunos de los cuales se describirán más adelante. Un método preferido



22 MAR 6

228089

es el empleo de butanol normal y una columna de reparto formada de tierra de diatomeas y se describe en el Ejemplo 9. Se sobrentenderá, por supuesto, que éstos procedimientos son meramente ejemplares y no deben considerarse como limitadores de la presente invención a ningún método particular de purificación.

Ejemplo V

Purificación preliminar -Columna de adsorción.

El licor fermentado de varios tanques como se ha descrito antes se reunió para obtener un volumen de mosto de 1.450 litros a pH 7,1. El mosto se filtró con ayuda de "Hyflo Super-Cel" (tierra de diatomeas) para obtener 1.300 litros de filtrado. El ensayo indicó un total de 5,64 gramos de antibiótico puro en los 1.300 litros de solución. Se añadieron 1.950 gramos de "Darco G-60" (carbón vegetal activo) y la mezcla se agitó durante media hora. Se agregaron 5.850 gramos de "Celite 545" (tierra de diatomeas) y, después de dejar que la mezcla alcanzase la homogeneidad durante la agitación, se filtró. La torta filtrante de "Darc-celite" se echó en 40 litros de agua, para formar una papilla, durante 5 minutos y se filtró. La torta de filtrado lavada se mezcló con 20 litros de agua para formar una papilla homogénea espesa que se introdujo en una columna de vidrio de 22,86 cm. de diámetro interno. La columna resultante tenía unos 60,9599 cm. de alto. Esta columna se desarrolló con una solución de 95 por ciento de acetona y 5 por ciento de agua. para el



228089

desarrollo de la columna se usó un total de 68,5 litros de esta solución.

Se recogieron los primeros 65 litros de percolado (filtrado), los 10 primeros litros en un corte y los restantes 55 litros en un segundo corte. Estos cortes contenían respectivamente 17 por ciento y 46 por ciento de los 5,64 gramos de actividad originales. El primer corte se concentró a presión reducida hasta obtener una solución acuosa de 2 litros y el segundo corte se concentró análogamente hasta obtener 3,5 litros de solución acuosa. Cada concentrado se liofilizó luego separadamente, dando lo siguiente:

corte núm. 1: 46 gramos que, según ensayo pertinente, contenían el equivalente de 0,94 gramos de antibiótico cristalino.

corte núm. 2: 59,5 gramos que, según ensayo pertinente, contenían el equivalente de 1,92 gramos de antibiótico cristalino.



228689

Ejemplo VI.

Purificación preliminar- Procedimiento de adsorción-elución

Se filtraron 320 litros de mosto a pH 7,4 con ayuda de "Hyflo Super-Cel" para obtener 300 litros de filtrado. El pH se ajustó a 6-7 y se añadieron 600 gramos de "Darco G-60". La mezcla se agitó durante media hora, se agregaron unos 1.200 gramos de "Hyflo Super-Cel" y la papilla se agitó hasta homogeneidad y se filtró. La torta de filtración se convirtió en papilla en 10 litros de agua durante 5 minutos y se filtró. La torta lavada se transformó en papilla en una solución de 5.700 ml. de acetona y 300 ml. de agua durante 20 minutos y se filtró. El volumen de este primer eluato fué de 5,5 litros. La torta de filtración residual se volvió a eluir dos veces de la misma manera dando un segundo y un tercer eluato de 5,4 litros y 4,6 litros respectivamente.

Los tres eluatos se juntaron para dar una solución de 15,5 litros. El pH se ajustó a 6-6,5 y la solución se concentró en el vacío hasta una solución acuosa de 1,5 litros. El pH del concentrado se ajustó a pH 6,5 y la solución se liofilizó. El rendimiento fué de 25,5 gramos.

Ejemplo VII.

Purificación preliminar - extracción con disolventes.

El mosto de fermentación del tanque 60 (preparado sustancialmente como en los ejemplos I - IV), se trató tal como se ha descrito en el ejemplo VI, excepto que el concentrado acuoso final no se liofilizó. El volumen del



228089

5 concentrado era de 2 litros y ésta solución se ajustó a pH 2 (con ácido clorhídrico) y se extrajo dos veces con 1 litro cada vez de butanol normal. El residuo acuoso se ajustó a pH 7 con hidróxido sódico acuoso y se saturó con unos 1.200 gramos de sulfato amónico. La mezcla resultante se extrajo tres veces con 1 litro cada vez de butanol. una cierta cantidad de material insoluble que se depositó en la intercara durante la extracción se mantuvo apartada de los extractos. La tabla siguiente indica los resultados de éstas extracciones:

	<u>Solución</u>	<u>Total de sólido en gramos</u>	<u>Total de mgm. de antibiótico puro (calculado)</u>
	Concentrado original	57,4	976
15	Primér lavado con butanol pH 2.....	29,1	46
	Segundo lavado con butanol pH2.....	7,5	45
	Residuo acuoso.....	23,5	876
	Primér extracto de butanol pH 7.....	7,26	497
	Segundo extracto de butanol pH 7.....	3,9	208
20	Tercer extracto de butanol pH 7.....	1,43	80

Los extractos primero y segundo se combinaron, se des-solventizaron, se concentraron y se liofilizaron para dar un material que acusó 60/1 de actividad por mgm.



Ejemplo VIII

228089

Purificación más avanzada - Columna de adsorción.

Se preparó una columna de adsorción como sigue:  
se mezclaron 3.000 gramos de "Celite 545" y 1.000 gramos de  
5 "Darco G-60" íntimamente en un tambor de cubo. A ésto se  
añadieron 2.000 ml. de una solución de 50 por ciento de  
acetona y 50 por ciento de agua y el todo se mezcló bien.  
La mezcla homogénea final se atacó en una botella de 20  
litros invertida, cuyo fondo había sido cortado para for-  
10 mar una columna de 28 cm. de diámetro y 33- 35,50 cm. de  
alto.

Muestras preparadas por el proceso de los Ejemplos  
V y VI se combinaron para dar aproximadamente 125 gramos  
de antibiótico bruto. Este material, que contenía un total  
15 de aproximadamente  $126 \times 10^6$  unidades de actividad, o  
1.000 unidades por mgm., se disolvió en 1 litro de solu-  
ción de 50 por ciento de acetona y 50 por ciento de agua y  
la solución resultante se añadió a la parte superior de la  
columna. La columna se desarrolló con 46 litros de solución  
20 de 50 por ciento de acetona y 50 por ciento de agua. El per-  
colado (filtrado) se fraccionó como sigue:



Fracción	volúmen en litros	Total de sólidos en gramos	Total de unidades de actividad.
A	8,5	7,56	.....
B	6,9	10,6	19,4 x 10 <sup>6</sup>
C	10,2	7,7	79,8 x 10 <sup>6</sup>
5 D	9,4	3,8	31,2 x 10 <sup>6</sup>
		29,66	130 x 10 <sup>6</sup>

Las tres últimas fracciones se des-solventizaron a presión reducida y se liofilizaron con los resultados siguientes:

Fracción	Peso en gramos	unidades por mgrm.
B	10,3	1,500
C	7,7	8,640
D	3,6	8,500
		21,6

La recuperación total de unidades de actividad en las tres muestras secas fué de aproximadamente 112 x 10<sup>6</sup> unidades. (1 mg de antibiótico cristalino = 45 unidades de actividad).

Ejemplo IX

20 Purificación más avanzada - columna de reparto.

Se agitaron juntos butanol normal y agua en un embudo separador y se separaron para obtener un par de soluciones mutuamente saturadas. Se añadieron aproximadamente 500 ml. de butanol normal a unos 15 litros de butanol saturado con agua, de forma que la fase disolvente empleada en ésta columna era butanol no completamente saturado con agua.

Se mezcló íntimamente un kilogramo de "Celite 545"



228089

lavado con ácido con 500 ml. de fase acuosa y la mezcla se apretó para formar una columna de 42 cm.<sup>2</sup> de sección transversal y unos 83 cm. de alto.

5 Muestras de los ejemplos V y VI que pesaban 3,6 gramos y que contenían aproximadamente 8.850 unidades de actividad por mgm., o un total de unos 14,9 gramos de antibiótico parcialmente purificado que contenía unas 129 x 10<sup>6</sup> unidades de actividad se juntaron y se añadieron a unos 153 ml. de fase acuosa y la mezcla se agitó  
10 constantemente a la temperatura ambiente al tiempo que el pH se fijaba en 2,0. Después de agitar más, la mezcla se filtró para quitar una pequeña cantidad de material insoluble. Del filtrado se apartaron 3 ml. para ensayo y determinaciones de sólidos totales y los restantes 150  
15 ml. se mezclaron con 300 de "Celite 545" lavado con ácido. La mezcla resultante se introdujo, apretadamente, en la parte superior de la columna, añadiendo a ella otros 25 cm. para obtener una altura total de 108 cm. La columna se desarrolló luego con fase disolvente y el percolado  
20 (filtrado) se fraccionó como sigue:



228089

	<u>Fracción</u>	<u>Volumen en ml.</u>	<u>Volumen acumulado</u>	<u>Total de sólidos en mgm./ml.</u>
	F1	1.120		4,3
	F2	1.070	2.190	0,52
5	F3	675	2.865	0,48
	F4	800	3.665	0,38
	F5	900	4.565	0,40
	F6	1.070	5.635	0,22
	F7	1.020	6.655	0,23
10	F8	1.040	7.695	0,21
	F9	1.200	8.895	0,14
	F10	1.060	9.955	0,45
	F11	640	10.595	1,21
	F12	4.000	14.595	0,56
15	F13			0,94

Se juntaron las fracciones F10, F11 y F12, se concentraron a presión reducida para des-solventizarlas y se liofilizaron para obtener 3,34 gramos de producto.

Ejemplo X

20

Cristalización del nuevo antibiótico

25

Se disolvieron 3,34 gramos de antibiótico parcialmente purificado en 80 ml. de agua a 65°C. y el pH de la solución se ajustó a 1,5 con ácido clorhídrico diluido. La mezcla se filtró para quitarle una cierta cantidad de goma insoluble. El pH del filtrado se ajustó a 4,0 con hidróxido sódico acuoso diluido, se añadió un cristal de siembra y la mezcla se dejó reposar por la noche a 4-5°C.



22 M

228089

A la mañana siguiente los cristales se filtraron, se lavaron con agua fría y se secaron en un desecador de vacío sobre "Drierite" a  $< 1$  mm. de presión durante unas 24 horas. Rendimiento: 1,19 gramos

5

Ejemplo XI

Cristalización del nuevo antibiótico después de la extracción con butanol de las impurezas.

10

Varias muestras purificadas por la primera adsorción, tales como las muestras del Ejemplo VI, se reunieron y se hicieron pasar por la segunda purificación en columna de adsorción como se describe en el Ejemplo VIII. La porción rica en antibiótico del percolado (filtrado) se concentró a presión reducida hasta obtener un pequeño volumen acuoso y se liofilizó como en el Ejemplo VIII. una muestra que pesaba 1,67 gramos y que contenía un total de unas  $12,8 \times 10^6$  unidades de actividad se disolvió en 80 ml. de agua y la solución se hizo 0,1 N con respecto a ácido clorhídrico añadiendo ácido. Esta solución se extrajo dos veces con 80 ml. cada vez de butanol normal, con lo cual se separó un total de 1,07 gramos de sólidos, pero solamente alrededor de 9 por ciento de la actividad. El pH del residuo se ajustó a 6,5 y la solución resultante se des-solventizó a presión reducida y después se concentró a 5-10 ml. y se mantuvo fría. El producto cristalino se filtró, se redisolvió en unos 10 ml. de agua a pH 3-4 calentando ligeramente y se filtró. El filtrado se enfrió y los cristales resul-

15

20

25

22



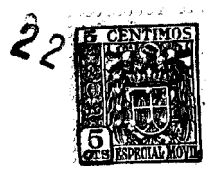
228089

tantes se filtraron, se lavaron con agua fria y se seca-  
ron. Rendimiento: 145mgm. de cristales blancos.

Ejemplo XII.

Recristalización del nuevo antibiótico- Preparación  
de las muestras analíticas.

5  
10  
15  
20  
Se disolvieron 4,522 gramos de varios lotes  
reunidos de antibiótico cristalino (preparado como se ha  
descrito en el Ejemplo X) en 200 ml. de agua a 60° C., y  
el pH de la solución se ajustó a 2,5. La solución se fil-  
tró y el filtrado se ajustó a pH 4 y se dejó reposar por  
la noche a 4-5° C. Los cristales se filtraron y se repi-  
tió el mismo procedimiento de recristalización cuatro  
veces. La recristalización final incluía una operación  
de decoloración con una pequeña cantidad de carbón vege-  
tal. El producto final era 1,89 gramos (después de secado  
a 2 mm. de presión) de muestra analítica. De ésta mues-  
tra, 1,25 gramos se secaron más aun durante 2 horas en  
una pistola Abderhalden al punto de ebullición del clo-  
roformo. El producto obtenido consistía en apelonamien-  
tos de cristales filiformes. Las direcciones de vibra-  
ción principales y sus correspondientes índices de re-  
fracción principales fueron difíciles de determinar y no  
se dan en vista de la posibilidad de error



228089

Ejemplo XIII

- 5 Dextrina.....1 por ciento
- N-Z Amine, A.....1 " "
- NaCl.....0,2 " "
- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .....0,2 " "
- K H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 0,15 por ciento
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 0,05 " "
- MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O ..... 0,025 " "
- 10 Solución Wisc. A-Z ..... 0,1 por ciento (en volumen)
- Agua de la cañería hasta 100 %

cien mililitros del medio anterior en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. se esterilizaron durante 20 minutos a 1,05 kg./cm<sup>2</sup> de presión de vapor y se inocularon con 3 ml. de inóculo pre-formado. El matraz se incubó en un agitador de movimiento alternativo a 28° C. durante 72 horas. El mosto fermentado resultó ser activo contra trypanosoma equiperdum.

Ejemplo XIV

20 Volúmenes iguales de butanol normal y del mosto anterior se agitaron juntos a los valores de pH indicados y luego se separaron. La tabla siguiente muestra las actividades en los extractos de butanol y los residuos acuosos junto con los coeficientes de extracción.

	<u>Butanol</u>	<u>Agua</u>	<u>K</u>
25 pH 2	8	135	0,06
pH 5	51	100	0,5
pH 7	49	88	0,6
pH 9	23	123	0,2



Ejemplo XV.

228089

una cantidad del mosto anterior se saturó con sulfato amónico. Cinco litros de esta solución se extrajeron dos veces con 2,5 litros cada vez de butanol normal. Otro lote de 5 litros se extrajo dos veces con 2,5 litros cada vez de acetona.

Los dos extractos de butanol se reunieron viéndose que contenían sustancialmente toda la actividad del mosto. Los dos extractos de acetona se reunieron viéndose igualmente que contenían toda la actividad del mosto.

Ejemplo XVI

Se agitaron 11,9 litros de un mosto semejante a pH de recogida con 55 mg. de "Darco G-60" durante media hora. La suspensión se filtró con ayuda de una pequeña cantidad de "Celite" y se lavó en un embudo Buchner con 500 ml. de agua.

La torta lavada se convirtió luego en papilla en unos 20 minutos con 300 ml. de acetona y se filtró. La torta residual se volvió a eluir dos veces con 300 ml. cada vez de 95 por ciento de acetona. Los tres eluatos de acetona se reunieron y se ensayaron, mostrando los resultados una recuperación de 35 por ciento de la actividad del mosto. La solución reunida se concentró en el vacío hasta obtener un concentrado acuoso que se liofilizó dando 3,64 gramos de sólidos, que según se determinó por ensayos representaban material purificado once veces en comparación con el antibiótico contenido en el mosto.



228089

El beta-metoxietanol o el beta-etoxietanol pueden sustituir al butanol o a la acetona en la extracción anterior.

Ejemplo XVII

5 Se disolvieron 50 mg. del antibiótico del Ejemplo III, de base libre, en unos 5 ml. de agua por la adición de ácido clorhídrico 0,1N y se añadieron 5 ml. de un solución de ácido pícrico acuosa, saturada. El precipitado cristalino resultante se centrifugó y se lavó con unos 5 ml. de agua fría.

10 El producto se recristalizó tres veces de agua con una filtración en caliente (60 - 75° c.) en la fase final y secó durante 24 horas a 1 mm. y finalmente sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a 1 mm. y 110° C. durante 4 horas. Rendimiento: 35 mg. de cristales amarillos brillantes de la sal de picrato.

15 Alálisis: Calculado para C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O<sub>15</sub>N<sub>9</sub>S: C, 32,9; H, 2,91; N, 20,3;

S, 5,17; O (por diferencial), 38,1:

20 Encontrado: C, 33,19; H, 3,13; N, 20,19; S, 5,70; O (por diferencial), 37,79.

Punto de fusión 143-144° C. (sin corregir) con ligera descomposición.

λ ultravioleta máx. (m<sub>μ</sub>) 253,356 (20 γ/ml. EtOH).

25 Ejemplo XVIII

Se disolvieron 150 mg. del antibiótico, de base libre, en 5 ml. de ácido acético glacial y se trataron con 5 ml. de ácido acético glacial saturado con cloruro

22



228 89

de hidrógeno.

El precipitado blanco de la sal clorhidrato que se formó se separó por filtración, se lavó con 10 ml. de ácido acético glacial y 10 ml. de eter etílico anhidro y se secó durante 24 horas sobre "Drierite" a 1 mm. y temperatura ambiente.

Ejemplo XIX

Una solución de 150 mg. de la base libre en unos 10 ml. de etanol absoluto se trató con una mezcla de 5 ml. de etanol absoluto y unas cuatro gotas de ácido sulfúrico concentrado. El precipitado resultante de la sal de sulfato se filtró, se lavó con eter etílico absoluto y se secó a 1 mm. durante 24 horas. El producto era amorfo.

Ejemplo XX

Una solución acuosa saturada que contenía unos 150 mg. de la base libre se trató con una solución acuosa saturada de naranja de metilo para dar un precipitado cristalino coloreado de la sal de heliantato.

Esta solicitud, que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América, el 27 de Abril de 1955, bajo el número 504.311, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto Ley sobre Propiedad Industrial.

22



-----  
-----NOTA-----  
-----

228089

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de ésta Patente de invención en España, son los siguiente:

5           1º.- Un método de producción de un antibiótico caracterizado porque se fermenta **aerobiamente** un medio nutritivo acuoso con un microorganismo de la especie Streptomyces T-3018 como se ha descrito.

10           2º.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la fermentación se efectúa dentro de la zona de temperatura comprendida entre 17º C. y 42º C.

15           3º.- un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la fermentación se efectúa durante un periodo de por lo menos 40 horas.

          4º.- un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la fermentación se efectúa a una concentración de iones hidrógeno comprendida aproximadamente entre pH 6 y pH 8.

20           5º.- Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque se ponen en contacto los componentes solubles en el agua del líquido de fermentación con un adsorbente, se separa el adsorbente del líquido y se recupera el antibiótico de dicho adsorbente por elución con un disolvente polar.

25           6º.- un método de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado por el hecho de que el disolvente es una



228089

mezcla de acetona y agua.

7º.- un método de acuerdo con las reivindicaciones 5 ó 6 caracterizado por el hecho de que el adsorbente es carbón vegetal en una columna, y el disolvente eluyente atraviesa la columna.

8º.-Un método de acuerdo con las reivindicaciones 5 ó 6, caracterizado porque se pone en contacto una solución de los componentes solubles en el agua del líquido de fermentación con carbón vegetal activo, se separa el carbón vegetal con el antibiótico adsorbido de la solución, se eluye el antibiótico de dicho carbón vegetal con un disolvente polar miscible con el agua, se pasa una solución del antibiótico eluido por una columna de carbón vegetal activo, se desarrolla la columna por paso continuo de disolvente a través de dicha columna hasta que las impurezas débilmente adsorbidas son eluidas y separadas, y se continúa la elución con un eluyente más fuerte hasta que se separa la actividad del adsorbente, y se concentra la fase disolvente que contiene la actividad hasta que el antibiótico se separa de ella.

9º.- Un método de producción de un antibiótico.

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

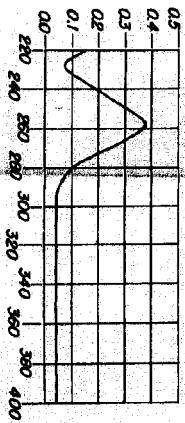
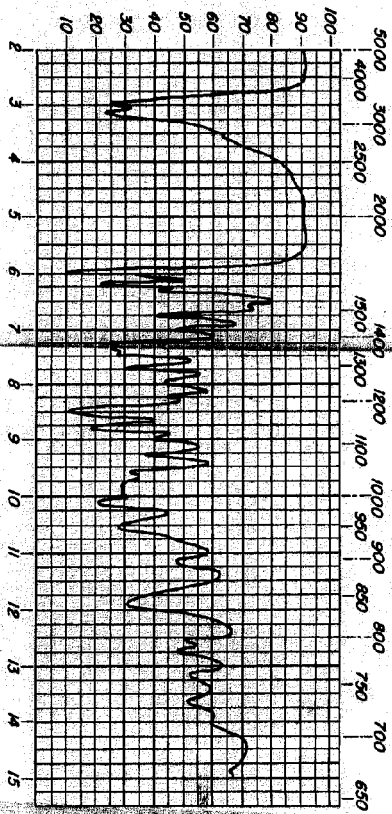
Esta Memoria consta de treinta y tres hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

22 MAY 1956

Alberto de Ezaburu  
Por Poder

228089



*[Handwritten signature]*