

mc/

Caso 5644.

228443

21 AB



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

a favor de

MERCK & Co., INC. - de nacionalidad norteamericana - do-
miciliada en RAHWAY (New Jersey E.U.) 126 East Lincoln Avenue,

por:

" Procedimiento de fabricación de un antibiótico ácido "

-----:oOo:-----

M e m o r i a D e s c r i p t i v a

Este invento se refiere a la fabricación de nuevos
agentes antibióticos y a los procedimientos para prepararlos.
Más concretamente afecta a la fabricación de una nueva subs-



tancia antibiótica que en el primer momento se designó con el nombre de cathomycina pero que definitivamente ha recibido el nombre de novobiocina, y a procedimientos para su producción.

5

El descubrimiento de las notables propiedades antibióticas de la penicilina suscitó en este campo un gran interés, que ha conducido al hallazgo de muchas otras sustancias antibióticas valiosas, tales como estreptomycina, estreptotricina, gramicidina, subtilina, bacitracina, clorotetraciclina, oxitetraciclina, terramicina, etc. En general, tales antibióticos son particularmente activos contra ciertas bacterias gramnegativas; otros lo son contra bacterias grampositivas, y los hay dotados de actividad tanto contra las bacterias grampositivas como contra las gramnegativas. Sin embargo, la actividad de estos conocidos antibióticos se limita usualmente a unos pocos microorganismos patógenos, y se ha continuado trabajando en este dominio con propósito de encontrar otros antibióticos eficaces contra gérmenes patógenos distintos.

10

15

20

Aunque algunos de estos antibióticos han resultado ser sumamente útiles en el tratamiento de diversas dolencias, se ha comprobado que ciertas cepas de algunos gérmenes patógenos adquieren resistencia a un determinado antibiótico, que por ello deja de ser activo contra tales cepas o razas resistentes.

25

Por consiguiente, las deficiencias de los antibióticos conocidos han estimulado nuevas investigaciones para hallar otros antibióticos activos contra una escala más amplia de agentes patógenos y de cepas resistentes de determinados microorganismos.

30

Un objeto del presente invento es proporcionar un

228443

21 AB



5 nuevo y útil antibiótico, muy eficaz para detener el desarrollo de bacterias patógenas, en particular de microorganismos grampositivos. Otra finalidad es la de habilitar un procedimiento para preparar esta nueva sustancia, por fermentación de medios nutritivos con cepas apropiadas de un microorganismo desconocido hasta ahora. Otros objetos se deducirán de la siguiente descripción detallada.

10 La nueva sustancia antibiótica del presente invento se obtiene cultivando, en condiciones vigiladas, una especie antes desconocida de microorganismo, que se ha denominado Streptomyces spheroides. Este microorganismo se ha aislado de una muestra de tierra de una antigua dehesa de Vermont, y ha sido inscrito con el nombre de Streptomyces spheroides MA-319 en la colección de cultivos de MERCK & Co., Inc., Rahway, Nueva Jersey. Un cultivo del mismo se ha depositado en la Sección de Fermentación del Departamento de Investigaciones Utilitarias del Norte, Ministerio de Agricultura de EUA., Peoria, Illinois, y agregado a su colección permanente de cultivos con la contraseña NRRL 2449.

20 Las características morfológicas y evolutivas del Streptomyces spheroides se exponen en la tabla siguiente:

STREPTOMYCES SPHEROIDES

25	Morfología:	(Estudiada sobre YED, sacarosa de Czapek, y agar glucosa-asparagina)
		Esporas ovales, de 0,7 a 1,1 μ de ancho por 1,5 a 2 μ de largo. Algunas espirales están abiertas, pero la mayoría están cerradas y compactas. En algunas zonas, las espirales se ven apelonadas.
30	Sacarosa de Czapek	Vegetación rápida y sin incidentes. Micio aéreo blanco profuso, teñido de color crema a gris oliváceo. No profundiza en el medio, ni hay pigmento soluble. Reverso blanco, que se torna pajizo. Vegetación superficial brillante.

228443

21 ABR



- Gelatina

La licuación comienza a los dos o tres días, y queda terminada en diez u once días. No hay pigmento soluble. Color crema, sedimento coposo.
- 5 Agar glucosa-asperagina

Micelio aéreo blanco abundante, que se vuelve gris. No hay pigmento soluble.
- 5 Agar glucosa-peptona

Vegetación amarilla moderada. Micelio aéreo blanco grisáceo. Reverso pajizo. Sin pigmento soluble.
- Caldo glucosado

Película. Al agitar, cae al fondo del tubo. No hay pigmento soluble. Película superficial en cultivo antiguo.
- 10 Leche

A 28°C, siete días, no hay variación; catorce días, pH 7 en el anillo marginal; 15-23 días, coagulación y peptonización incipiente; 23 días, pH 6,5. Coagulación completa en 45 días.

A 37°C, no hay vegetación.
- 15 Cuña de patata.

Lenta. Vegetación blanca exigua en siete días; a los 14 días, vegetación gris densa. Micelio aéreo gris. La patata toma color pardo oscuro.
- 15 Agar almidón

Almidón soluble: cuatro días, almidón hidrolizado. Vegetación densa; micelio aéreo blanco; reverso crema a pajizo. Fécula de patata: cuatro días, fécula hidrolizada. Vegetación densa; vegetación transparente, incolora, que vira a gris hasta blanco grisáceo; micelio aéreo blanco.
- 20 Agar nitrato

Dos días: débil reducción a nitrito. Cuatro días: débil reducción a nitrito.
- 20 Agar glucosa nutritivo.

Vegetación incolora moderada. Micelio aéreo blanco abundante; reverso pajizo pálido. No profundiza en el medio.
- 25 Agar leche

Hidrólisis de caseína solamente debajo de las colonias.
- 25 Zanahoria

Vegetación blanca muy densa.
- 25 Citratos

Vegetación muy escasa.
- 25 Temperatura óptima

20 a 26°C: Buena vegetación.
28°C: Vegetación excelente.
37°C: No hay vegetación.
50°C: No hay vegetación.
- 30 Indol

Negativa.
- 30 Agar tirosina

Micelio aéreo blanco abundante; sin pigmento. Dieciocho días: pigmento pajizo; sesenta días: pigmento soluble pardo oscuro.

228443

21 ABR



- Agar nutritivo-glicerina. Micelio aéreo blanco abundante; pigmento soluble pajizo a ambarino. Sin profundizar en el medio. Reverso de color crema.
- 5 Sacarosa de Czapec. Vegetación blanca abundante en forma de película. Sedimento blanco en el fondo del tubo, adherido a las paredes, por encima y debajo del nivel de líquido. Reverso de color pajizo.
- Celulosa No hay vegetación.
- Malato cálcico Micelio aéreo blanco en cantidad moderada, como la profundización en el medio. No hay pigmento soluble. Reverso incoloro.
- 10 Carbohidratos Reacción alcalina; no dan gases adonita, arabinosa, celobiosa, dextrina, dextrosa, galactosa, lactosa, levulosa, maltosa, manita, manosa, rafinosa, ramnosa, salicina, sacarosa y xilosa.

La precedente descripción del microorganismo productor de novobiocina se ofrece como ilustración de cepas adecuadas de Streptomyces spheroides que pueden servir para obtener novobiocina; pero ha de entenderse que el presente invento no se limita a microorganismos ajustados a esta descripción particular. El invento comprende igualmente el empleo de otras cepas de Streptomyces spheroides que son mutantes de los microorganismos descritos, como las obtenidas por selección natural, o con ayuda de agentes mutantes, por ejemplo, aplicación de rayos X o de rayos ultravioleta, mostazas nitrogenadas, y otros análogos.

Teniendo en cuenta que el Streptomyces spheroides es saprófito, y es psicrófilo a mesófilo, que no produce pigmento soluble en ningún medio orgánico, exceptuando uno especial que contiene abundante pirocina, y que el micelio aéreo es abundante, blanco o incoloro, la especie más afín descrita en el "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 6ª edición, es Streptomyces albus.

Descripciones más recientes de cultivos afines, aparecidas desde la publicación del Bergey's Manual, comprenden

21 ABR 1953



Streptomyces globisporus, Streptomyces farinosus, Streptomyces longisporus y Streptomyces annulatus, especies reseñadas en la obra "Actinomycetes and Their Antibiotics", de Waksman y Lechevalier.

5

El Streptomyces spheroides puede distinguirse del S.gloglobisporus y del S.farinosus porque produce cadenas espirales apretadas de conidios, mientras que las otras dos especies no dan espirales. La formación de espirales, o su ausencia, constituyen una característica distintiva esencial entre especies de Streptomyces.

10

El S.spheroides puede distinguirse del S.longisporus por el hecho de que no presente las esporas cilíndricas de extremos bien definidos que caracterizan al S.longisporus.

15

El S.spheroides puede distinguirse del S.annulatus a base de que no produce los anillos concéntricos de vegetación que caracterizan al S.annulatus.

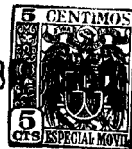
20

El S.spheroides difiere del S.albus en dos caracteres fisiológicos. El S.albus reduce nitrato a nitrito, y apenas se encuentran nitritos después de cultivar S.speheroides. Las características de vegetación de los dos cultivos difieren también de modo apreciable en cuña de patata; y, sobre todo, el S.spheroides produce conidios en espirales apretadas, a veces tanto que parecen esferas compactas de esporas empaquetadas. Este carácter se puede reproducir en cultivos sucesivos de S.spheroides, y es tan notable que distingue claramente su cultivo de cualquiera de los muchos de S.albus examinados.

25

30

La novobiocina reacciona como un compuesto orgánico ácido, y se disuelve fácilmente en soluciones alcalinas tales como soluciones acuosas de hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos de metales alcalinos, y también en metanol, etanol,



butanol normal, butanol secundario, acetato de etilo, ácido acético, dioxano, acetona y metiletilacetona. Es insoluble o escasamente soluble en éter, benceno, cloroformo, tetracloruro de carbono, dicloruro de etileno, agua y ácido clorhídrico. La novobiocina se puede precipitar de una solución alcalina por acidificación.

La novobiocina se ha obtenido en dos formas cristalinas, por los métodos descritos a continuación. Una forma cristalina de novobiocina que se presenta en forma de rosetas tiene un punto de fusión de unos 152 a 154°C; otra forma que cristaliza en agujas planas fundió a unos 170 a 172°C. A veces se obtienen ambas formas juntas, y pueden separarse mecánicamente.

La novobiocina es ópticamente activa, con un poder rotatorio de $[\alpha]_D^{25} = -27^\circ$ (C, 1 en hidróxido sódico N), y de $[\alpha]_D^{25} = -44^\circ$ (C, 1 en piridina).

Una solución de novobiocina en hidróxido sódico N/10 presenta una absorción ultravioleta característica, con pico alrededor de 307 mu ($E_{1\text{Cm}}^{1\%} 600$). Una solución de novobiocina en ácido clorhídrico N/10 en metanol acuoso, muestra así mismo una absorción ultravioleta característica con pico alrededor de 324 mu ($E_{1\text{Cm}}^{1\%} 390$). Una solución de novobiocina en amortiguador de fosfato para pH 7 tenía un máximo principal en el espectro de absorción ultravioleta a 304 mu ($E_{1\text{Cm}}^{1\%} 350$).

El espectro de absorción infrarroja de una muestra substancialmente pura de novobiocina amorfa o submicrocristalina, suspendida en un aceite mineral (Nujol), se tomó en un espectrofotómetro Baird Associates Model 12B para rayos infrarrojos, empleando un prisma de cloruro sódico, y dió varios picos o máximos característicos, de los cuales los más importantes corresponden a las siguientes longitu-



des de onda, expresadas en micras: 5,8-6 (ancho), 6,10, 6,21, 6,30, 6,49, 6,63, 7,4-7,6 (ancho resaltado), 7,78, 7,96, 8,27 (débil), 8,60 (resalto), 8,7 (resalto), 9,13, 9,40, 10-10,1 (ancho), 10,28, 10,60 (ancho), 12-12,30 (ancho), 12,60-12,75 (ancho), 13,07 y 13,39. El espectro infrarrojo se representa en la gráfica de la figura 1 de los planos adjuntos. La muestra de novobiocina amorfa empleada para determinar este espectro se preparó de otra muestra de novobiocina cristalizada, valiéndose del siguiente método de "normalización":

10 A una solución de 1 g de novobiocina cristalina en 100 ml. de acetona se añadió con rapidez 1 litro de éter de petróleo, y luego se separó de la solución novobiocina amorfa. El producto precipitado se recuperó por filtración, se lavó con éter de petróleo, y se secó finalmente a 100°C y presión reducida.

15 Las muestras de novobiocina substancialmente pura, normalizadas de acuerdo con el anterior procedimiento, presentan el espectro de absorción infrarrojo expuesto en la figura 1. Las figuras 2 y 3 de los dibujos adjuntos muestran el espectro infrarrojo de las agujas y las rosetas de novobiocina, respectivamente. En estas tres figuras, las ordenadas representan la transmisividad, en tanto por ciento, y las abscisas representan la longitud de onda en micras. Aunque las distintas formas cristalinas de novobiocina den diferentes espectros de absorción, según indican las figuras 20 2 y 3, cuando esas formas se "normalizan" conforme queda explicado, los productos amorfos o submicrocristalinos tienen el espectro de absorción representado en la figura 1.

30 La novobiocina contiene los elementos carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno. He aquí un análisis elemental obtenido a base de una muestra de novobiocina cristalina:



Carbono	60,24-60,26%
Hidrógeno	6,56-6,49%
Nitrógeno	4,86%
Oxígeno	29,3%

5

Según los datos microanalíticos, la composición de la novobiocina está comprendido en el margen $C_{30-32}H_{34-42}N_2O_{10-12}$.

10

La novobiocina es una sustancia ácida, que forma sales al reaccionar con bases. Poniendo en reacción novobiocina con un equivalente de hidróxido sódico, se obtiene la sal sódica de novobiocina. La reacción con dos equivalentes de hidróxido sódico dá la sal disódica de novobiocina. De manera análoga, al reaccionar novobiocina con otras bases inorgánicas, pueden obtenerse las correspondientes sales metálicas. La reacción de novobiocina con una base orgánica, como una amina, proporciona las correspondientes sales amínicas; si se trata de la metilamina, se obtiene la sal metilamínica de novobiocina.

15

20

El carácter ácido de la novobiocina es también un atributo distintivo de este nuevo antibiótico. Valorando una muestra de novobiocina con hidróxido sódico, se observan dos grupos básicos de combinación. La primera combinación para formar la sal monosódica se produce a un pH aproximado de 7, y tiene un pK aproximado de 3,8; la segunda ocurre a un pH de 11, poco más o menos, y tiene un pK próximo a 9,4. La valoración potenciométrica en una mezcla de agua y acetona (3:4) mostró dos grupos funcionales ácidos, pH_1 1/2 aprox. 4,7, pesó equivalente 653, y pH_2 1/2 aprox. 10, pesó equivalente 660-680. La determinación de grupos ácidos por el método de absorción ultravioleta dió para pH_1 1/2, 3,8, y para pH_2 1/2, 9,4. Una determinación

25

30



ebulloscópica del peso molecular de novobiocina en una mezcla azeotrópica de isopropanol y agua dió un valor de 592 ± 25 .

5 La novobiocina cristalina desarrolla una actividad microbiológica aproximada de 5000 unidades por miligramo, determinada por métodos normales de difusión en placa, empleando Bacillus megatherium ATCC 9885, y con una forma substancialmente pura de novobiocina como patrón.

10 La novobiocina detiene en principio el desarrollo de microorganismos grampositivos, aunque también muestra alguna actividad contra microorganismos gramnegativos. Entre los gérmenes cuyo crecimiento inhiben la novobiocina o sus sales a concentraciones muy débiles pueden mencionarse: Micrococcus pyogenes var. albus, M.pyogenes var. aureus, Streptococcus pyogenes, Proteus vulgaris, Pasteurella multocida, Hemophilus pertusis, Pasteurella avicida, Diplococcus pneumoniae, Corynebacterium diphtheriae tipo intermedius, Corynebacterium diphtheriae tipo mitis, Corynebacterium xerose, Corynebacterium renale, Neisseria meningitidis, Sarcina lutea (VD), M.pyogenes var. aureus resistente a la aureomicina, M.pyogenes var. aureus resistente a la estreptomycin-estreptotricina, y M.pyogenes var. aureus resistente a la penicilina.

15

20

Por ejemplo, la sal sódica de novobiocina, ensayada por la prueba de dilución sobre agar en estrías, detuvo el desarrollo de varias cepas de M.pyogenes var. aureus, M.pyogenes var. albus, Neisseria meningitidis (núm 274) y Sarcina lutea (VD), a concentraciones menores de 0,5 microg. por mililitro. La novobiocina y sus sales afectan asimismo en diversos grados a otros microorganismos.

25

30 Toleran bien la novobiocina ratones, ratas y perros, después de administración peroral simple o repetida. En ra-

21 ABR



tones, la DL_{50} es de unos 2 g/KG. No se ha demostrado toxicidad en ratas o perros tratados con 0,2 g. de novomicina por kilo al día, durante 90 a 140 días.

5 La novobiocina se produce durante la fermentación aeróbica de medios acuosos adecuados, en las condiciones que seguidamente se describen, por la acción de cepas de Streptomyces spheroides. Para la producción de novobiocina sirven medios acuosos como los empleados para obtener otros antibióticos. Tales medios contienen fuentes o reservas de carbono y nitrógeno asimilables por los microorganismos, y sales inorgánicas; además, los medios de fermentación muestran indicios de metales necesarios para la vegetación de los microorganismos, y habitualmente presente en reservas complejas de carbono y nitrógeno del medio.

10 En general, son fuentes adecuadas de carbón asimilable en los medios nutritivos algunos carbohidratos, tales como azúcares, por ejemplo, dextrosa, sacarosa, maltosa, lactosa, dextrina y sus análogos, así como almidones o féculas. La cantidad exacta del manantial de carbono que se utilice en el medio dependerá en parte de los otros ingredientes que éste contenga, pero resulta habitualmente satisfactoria una proporción aproximada de carbohidrato de 1 a 6% en peso del medio. Estas fuentes de carbono pueden emplearse individualmente, o varias en combinación.

25 Diversas fuentes de nitrógeno, tales como hidrolizados de caseína, digestiones papaicas de harina de soya o soja, harina de cacahuete, harina de aceite de cacahuete, solubles de destilería, líquidos de macerar maíz, nitrato sódico, cloruro amónico, sulfato amónico y sus análogos, son fácilmente asimiladas por el Streptomyces spheroides, y pueden emplearse en medios de fermentación para producir el nue-

30

228448

21 ABR



5 vo antibiótico. En general, encontramos que son muy satisfactorias para producir novobiocina fuentes orgánicas de nitrógeno, particularmente harina de soya y solubles de destilería. Las diversas reservas orgánicas e inorgánicas de nitrógeno se pueden utilizar separadas o combinadas, en cantidades de 0,2 a 6% en peso del medio acuoso.

10 También hemos visto que la adición a un medio que contenga fuentes adecuadas de carbono y nitrógeno, de cloruro sódico en cantidades comprendidas entre 0,1 y 1%, es conveniente para producir el nuevo antibiótico. En general, encontramos muy satisfactoria una proporción de cloruro sódico equivalente a 0,25% en peso del medio nutritivo.

15 A continuación se indican ejemplos de medios apropiados para el cultivo de Streptomyces spheroides y la producción de novobiocina:

	1º - Harina de soya	2%
	Cloruro sódico	0,25%
	Dextrosa	1-3%
	Solubles de destilerías	0,75%
	2º - Líquido de macerar maíz	2-6%
	Dextrosa	2-4%
20	3º - Solubles de destilerías	3-6%
	Dextrosa	1-6%
	4º - Solubles de destilerías	3-6%

25 La fermentación por medio del microorganismo productor de novobiocina puede efectuarse a temperaturas comprendidas entre 20 y 37°C. Encontramos muy conveniente, para obtener resultados óptimos, realizar esas fermentaciones a temperaturas entre 24 y 28°C. El pH de los medios nutritivos adecuado para cultivar Streptomyces spheroides y producir el antibiótico puede variar aproximadamente entre 5,5 y 9.

30

Aunque la novobiocina se produce tanto mediante cul-



tivo en superficie como cultivo sumergido, es preferible para efectuar la fermentación este segundo método. Se practican convenientemente fermentaciones en pequeña escala poniendo cantidades adecuadas de medio nutritivo en frascos, esterilizando éstos con su contenido por calentamiento a 120°; inoculando el material con esporas o con un cultivo celular vegetativo de una cepa de Streptomyces spheroides que produzca novobiocina, tapando flojamente las frascos con algodón, y dejando fermentar en un local de temperatura constante a unos 25°C; en sacudidor, durante dos a siete días. Para producción en mayor escala, es preferible efectuar la fermentación en depósitos adecuados provistos de agitador y dispositivo para airear el medio de fermentación. En este método, el medio nutritivo se prepara en el depósito, y se esteriliza calentando a 120°C durante un lapso apropiado. Después de enfriar, el medio esterilizante se inocula con una porción adecuada de cultivo celular vegetativo de una cepa de Streptomyces spheroides, productora de novobiocina, y la fermentación se mantiene durante dos a siete días, agitando y/o aireando el medio nutritivo, a una temperatura constante aproximada de 24 a 27°C. Este método de producir novobiocina es particularmente apropiado para preparar grandes cantidades de este nuevo antibiótico.

Al realizar la producción de novobiocina por cultivo sumergido, puede añadirse al caldo de fermentación, para evitar que se forme demasiada espuma durante la fermentación, una pequeña cantidad de un antiespumoso adecuado, como aceite de soya, aceite de ricino, aceite de grasa, octadecanol al 1% en aceite mineral o una oxazolina sustituida que con el nombre registrado de "Alkaterge C" expende la Commercial Solvents Corporation, o sustancias aná-

228443



logas.

Los ejemplos que siguen se ofrecen con el fin de ilustrar métodos de fermentación adecuados para producir novobiocina.

5 EJEMPLO 1º.-

En agua corriente se preparó un medio que contenía 2% de harina de soya, 1% de dextrosa, 0,25% de cloruro sódico, y 0,75% de solubles de destilerías. Se pusieron unos 25 ml. de este medio en un frasquito de 75 ml., y se esterilizó éste con su contenido calentando a 120°C durante veinte minutos. Luego se inoculó el medio esterilizado con un cultivo vegetativo de Streptomyces spheroides Ma-319 (NRRL 2449), se tapó el frasquito con algodón, sin apretar, y se puso en una sacudidora, con una amplitud de 1,5 pulgadas a 28°C, durante seis días. Al final de este lapso de fermentación, se valoró el caldo fermentado por el método de difusión con Bacillus megatherium ATCC 9885 como germen de contraste, y se vio que tenía una actividad de 600 u/ml. o 30 mcg/ml. de novobiocina.

20 Efectuando otra fermentación como queda explicado, empleando un medio compuesto de 2% de harina de soya, 3% de dextrosa, 0,25% de cloruro sódico y 0,75% de solubles de destilería, el caldo fermentado resultante dió una potencia de 256 mcg/ml.

25 Siguiendo los métodos expuestos en el ejemplo 1º, pero con el tiempo de fermentación prolongado hasta siete días, se comprobó que tres medios que contenían, el 1º, 4% de solubles de destilerías y 5% de dextrosa; el 2º, 2% de líquido de macerar maíz, 5% de solubles de destilería y 5% de dextrosa; y el 3º, 2% de centeno molido, 5% de solubles de destilerías y 5% de dextrosa, habían producido 511 mcg/ml., 720 mcg/ml. y 740 mcg/ml. de novobiocina, respectivamente.



228443

EJEMPLO 2º.-

La producción de cantidades mayores de novobiocina mediante fermentación sumergida en depósitos apropiados, se realiza como sigue:

5 Se inoculó un frasco de Blake, que contenía 25 ml. de medio de agar acuoso esterilizado, compuesto de

1% de extracto de levadura,

1% de dextrosa,

0,12% de Na_2HPO_4 ,

10 0,075% de KH_2PO_4 ,

0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

2% de agar,

15 disuelto en agua, con tierra de un cultivo en suelo de Streptomyces spheroides MA-319 (NRRL 2449), y se incubó a 26°C durante cuatro a cinco días, hasta esporulación suficiente.

20 A continuación se añadieron 20 ml. de agua esterilizada al contenido del frasco, y se rasparon las esporas para ponerlas en suspensión. Unos 5 ml. de la suspensión de esporas resultante se agregaron a un matraz Erlenmeyer de 2 litros, con tabique de dirección, que contenía 750 ml. de un medio acuoso esterilizado, compuesto de

0,3% de extracto de carne de buey,

1% de hidrolizado de caseína (NZ amina),

25 10% de dextrosa,

0,5% de cloruro sódico,

y con pH aproximado de 7,2. Luego se tapó el matraz con algodón, y se incubó a 26°C en un sacudidor giratorio, durante 48 horas.

30 El cultivo vegetativo así preparado se llevó luego a una vasija de fermentación de acero inoxidable, de 50 ga-



lones de capacidad, que contenía 25-30 galones de un medio de extracto de carne de buey esterilizado de la composición mencionada. Después de añadir una pequeña cantidad de una solución de octadecanol al 1% en aceite mineral, como agente antiespumoso; se incubó el medio a 26°C durante 48 horas. En el curso de este periodo de incubación, se agitó el medio, y se hizo pasar a través del mismo aire esterilizado, a razón de unos 3 piés cúbicos por minuto.

Luego se cargó una vasija de fermentación de acero inoxidable de 200 galones de capacidad con unos 100 galones de un medio acuoso que contenía los siguientes materiales:

3% de harina de soya (nutritiva especial 4-S de Staley

2% de dextrosa

0,75% de solubles de destilerías

0,25% de cloruro sódico,

con un pH 7,1 aproximadamente. Después de esterilizar el medio con vapor a unos 120°C durante treinta minutos, y de enfriar, el contenido de la vasija se inoculó con un 8,4% del material vegetativo de siembra preparado en la vasija de fermentación de 50 galones ya citada. La carga se incubó entonces a 26°C, con agitación y aireación, al ritmo de 12 piés cúbicos por minuto. Al cabo de 96 horas, el caldo fermentado que contenía el antibiótico novobiocina tenía una actividad aproximada de 82 mcg/ml.

La concentración de las nuevas sustancias antibióticas en los medios de fermentación descritos suele oscilar entre 30 y 400 mcg. por mililitro, y los sólidos del caldo de fermentación tienen una actividad del orden de 1 a 2 mcg/mg. de sólido. Las sustancias activas se pueden purificar y recuperar en forma más pura por diversos procedimientos. Uno de éstos comprende la extracción de las subs-



tancias antibióticas del medio de fermentación alcalino con butanol normal o secundario. Otros métodos de purificación que se describen con detalle en la solicitud de patente de los Estados Unidos, Serial N^o. 503.030 de Edward A. Kaczka, pueden utilizarse para obtener novobiocina en forma cristalina. Por ejemplo, el antibiótico crudo se puede purificar en gran medida mediante reprecipitación de soluciones alcalinas con ácido, cromatografía sobre alúmina, o adsorción en resinas interiónicas adecuadas, o combinaciones de tales métodos. Un procedimiento para preparar novobiocina cristalizada es el siguiente:

Después de filtrar todo el caldo a un pH 9, se añadieron 9 lbs. de tierra de diatomeas filtrante (Hyflo Supercel) por 100 gal. de caldo filtrado. El caldo se aciduló a un pH 2 con ácido clorhídrico. Después de diez minutos de agitación, la carga se filtró, y la torta se lavó con agua. En el filtrado ácido no se descubre antibiótico alguno. Los sólidos precipitados, sin contar el filtrante, dieron una pureza de 0,2 a 0,3%.

La torta del filtro resultante de la precipitación con ácido se extractó dos veces con metanol acuoso al 85%, a un pH 9, empleando aproximadamente 1/10 del volumen de caldo primitivo por cada extracción. Lo recuperado en total mediante esta extracción fué un 80% de la bioactividad total presente en el caldo. Los sólidos en solución tenían una pureza de 1 a 1,5%.

La solución de metanol acuoso se concentró hasta una solución acuosa de alrededor de 1/10 del volumen de la solución de metanol primitivo. Se ajustó el pH a 9 con sosa cáustica, y la solución se extractó dos veces con volúmenes iguales de n-butanol. La relación aparente de dis-



tribución a un pH 9 es de un 40:1. La pureza de los sólidos contenidos en el extracto butanólico era de 4 a 6%.

5 El extracto butanólico se concentró a 1/10 del volumen primitivo, y se añadió a 15 volúmenes de agua a un pH 9. Se agregó filtrante (Hyflo Supercel), alrededor de 0,5 g/gal., a base del volumen primitivo del caldo, y el pH se ajustó despacio a 2, mediante adición de ácido clorhídrico. Toda la bioactividad precipita en el filtro, y se separa por filtración. La pureza de los sólidos, sin el filtrante, era de 10 a 12%, aproximadamente.

10 La torta se secó en vacío a 40°C, se desmenuzó y trituró con éter de petróleo (unos 180 a 400 ml. para los sólidos derivados de cada galón de caldo de fermentación), hasta que el filtrado salía incoloro. Esto elimina 20 a 15 25% de los sólidos presentes, y retira productos oleosos inactivos de fermentación que restan de las operaciones anteriores. No se perdió bioactividad con esta trituración, y los sólidos remanentes dieron una pureza de 12 a 15%.

20 La torta se extractó con etanol anhidro, hasta que los extractos etanólicos presentaron un color amarillo muy débil. Estos extractos se reunieron y concentraron hasta obtener una solución con 15 a 20% de sólidos, con un índice biológico de alrededor de 40000 mcg/c.c. La pureza de este material sólido era de 20 a 30%, con un índice biológico de 25 200 a 300 mcg/mg.

30 La solución etanólica concentrada se sometió a cromatografía sobre alúmina lavada con ácido. Para obtener una purificación satisfactoria hay que emplear una relación de alúmina de 50:1, a base del total de sólidos presentes en la solución de carga. El material activo pasa por la columna, mientras que queda en ella una gran cantidad del mate-



rial sólido extraño presente. La columna de alúmina se lavó con etanol, para recuperar la novobiocina. Aproximadamente 95% de la bioactividad estaba en 2,5 a 3 huecos de columna.

5

TABLA I.

	Volumen c.c.	Ensayo bio- lógico mog/c.c.	mg/c.c.	mog/mg.	Unidades (total)	
10	Carga de la col.	1000	44,000	265	166	220 x 106
	Fracción I *	1000	92	2.5	37	0.46 x 106
	Fracción II	1000	8,400	19.6	428	42 x 106
	Fracción III	1000	15,200	31.3	484	76 x 106
	Fracción IV	1000	12,400	22.3	556	62 x 106
15	Fracción V	1000	7,400	13.4	552	37 x 106
	Fracción VI	1000	2,600	4.5	604	13 x 106
	Fracción VII	1000	900	1.3	690	4.5 x 106
	Promedio	7000	6,700	13.2	504	

Volumen de alúmina = 8,000 c.c.

20 Volumen de huecos de columna = 2,600 c.c.

* (Primer color).

25 Los lavados con metanol procedentes de la columna de alúmina se concentraron hasta un 5% de sólidos. Se añadió agua hasta enturbiamiento, empleando poco más de un volumen igual y se dejó cristalizar el antibiótico. La cristalización fué muy lenta. Al cabo de cinco días, quedaba aún en los líquidos sobrenadantes hasta 15% de la bioactividad primitiva. La agitación y/o los cambios de temperatura parecen 30 influir poco en la rapidez de cristalización. Esta novobiocina cristalina tiene un índice biológico aproximado de 500



228443

a 600 mcg/miligramo.

5 El material cristalino se disolvió en acetona anhidra para obtener una solución al 30%. Esta solución se trató con una cantidad de carbón vegetal activado (Darco G-60) igual al doble del peso del material cristalino disuelto. El Darco se separó por filtración y se lavó repetidamente con acetona, para diluir la solución hasta una concentración aproximada de 5% de sólidos. Se añadió éter de petróleo hasta enturbiamiento, y se dejó cristalizar la novobiocina. Se recuperó 90 a 95% de la bioactividad, y la novobiocina cristalizada obtenida dió un índice de 900 a 1000 mcg/mg.

10 Se producen fácilmente sales de novobiocina por reacción de esta substancia con bases. Los siguientes ejemplos muestran la preparación de algunas sales, a título de ilustración.

EJEMPLO 3º.-

Sal monosódica de novobiocina.

20 Se disolvieron unos 40 g. de novobiocina en 800 ml. de acetato de etilo, a unos 80°C. Después de enfriar la solución resultante a unos 25°C, se añadió una solución de 3,43 g. de metóxido sódico en 34 ml. de metanol, en un periodo de veinte a treinta minutos. La sal monosódica precipitada se recuperó por filtración, y se lavó con unos 200 ml. de acetato de etilo. El producto filtrado se secó luego a 25 70°C. durante seis horas, a presión reducida, y finalmente a 55°C durante 24 horas, también a baja presión.

30 La sal monosódica de novobiocina así obtenida se preparó en forma cristalina disolviendo 1,1 g. en 3 ml. de metanol, diluyendo la solución clara resultante con 55 ml. de acetona, para obtener una solución turbia, cebando ésta



con unos pocos cristales de novobiocina sódica, y haciendo
agitar la solución a temperatura ordinaria durante unas cua-
tro horas, o hasta completa cristalización de la sal sódica.
Los cristales precipitados de novobiocina monosódica resul-
tantes se lavaron con acetona y se secaron a presión redu-
cida.

EJEMPLO 4º.-

Sal de novobiocina-espiramicina.

A una solución de 5 g. de la sal monosódica de novo-
biocina en 50 ml. de agua se añadió, agitando, una solución
de 4,5 g. de sulfato de espiramicina en 40 ml. de agua ajus-
tados a un pH 7. La sal resultante de novobiocina-espirami-
cina formada precipitó de la solución, se separó por filtra-
ción y se secó a presión reducida. El producto sólido así
obtenido era soluble en metanol, acetato de amilo, acetona,
y parcialmente soluble en dicloruro de etileno.

EJEMPLO 5º.-

Sal de novobiocina-neomicina.

A una solución de 5 g. de sulfato de neomicina en
50 ml. de agua se añadieron, agitando, 250 ml. de una solu-
ción de novobiocina al 10% en agua, a un pH 7. La sal pre-
cipitada de novobiocina-neomicina se recuperó por filtración,
y se secó a presión reducida.

EJEMPLO 6º.-

Sal de novobiocina-dihidrostreptomycinina.

A una solución de 5 g. de sulfato de dihidrostrepto-
micina en 50 ml. de agua a un pH se agregaron, con agitación,
145 ml. de una solución acuosa al 10% de la sal monosódica de
novobiocina. La sal precipitada de novobiocina-dihidrostrep-
tomycinina sólida se separó por filtración y se secó a presión
reducida.



EJEMPLO 7º.-

Sal de novobiocina-estreptomicina.

Se filtró una solución de 100 g. de sal monosódica de novobiocina en 1 litro de agua. A la solución filtrada resultante se agregó, agitando, una solución de 40 g. de sulfato de estreptomicina en 40 ml. de agua, ajustados a un pH 7 con hidróxido sódico. El precipitado resultante se filtró, se lavó con agua y se secó a presión reducida, para obtener la sal de novobiocina-estreptomicina en forma sólida.

5

EJEMPLO 8º.-

Sal cálcica de novobiocina.

A una solución de 10 g. de la sal monosódica de novobiocina en 200 ml. de agua se añadieron, agitando, 20 ml. de una solución de cloruro cálcico al 10%, ajustado a un pH 10. La solución turbia resultante se agitó durante otros treinta minutos. El precipitado se separó luego por filtración, se lavó con agua, y se secó.

15

De la sal sódica de novobiocina así obtenida se disolvieron 4 g. en 40 ml. de metanol; se añadieron 25 ml. de agua, y la solución resultante se agitó durante la noche a la temperatura ambiente. La sal cálcica cristalizada de novobiocina que precipitó, se separó por filtración y se secó. El producto así obtenido contenía 2,6% de calcio, daba un peso equivalente de 669 por filtración (pH 1/2, 10,8 en acetona y agua), y tenía un $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 528 a 307 mu, en solución decinormal de hidróxido sódico.

20

25

La sal magnésica de novobiocina se preparó del mismo modo que la de calcio descrita en el ejemplo anterior, haciendo reaccionar cloruro magnésico con novobiocina sódica.

30

Siguiendo los procedimientos descritos en los ejemplos 4º a 7º precedentes, y empleando cantidades adecuadas de una



sal ácida de benciltrimetilamonio, quinina, procaína, guanidina, noformacina, N-bencil- β -feniletilamina y N,N-debencil-etilendiamina, se produjeron las correspondientes sales de novobiocina.

5 Se preparan sales de novobiocina también por otros métodos. Por ejemplo, se obtienen sales amínicas haciendo reaccionar novobiocina con un equivalente aproximado de la amina en solución de acetato de etilo. La sal amínica de novobiocina precipita de la solución, se filtra, se lava con acetato de etilo, y se seca. Empleando este procedimiento, se han preparado las sales novobiocínicas de ciclohexilamina, 10 quinina, N-etilpiperidina, trietilamina, dicitclohexilamina, etilendiamina e isobutilamina.

15 Otro método para preparar sales de novobiocina consiste en hacer reaccionar novobiocina con una cantidad equimolar de una amina en solución metánolica acuosa, y en evaporar luego el disolvente a presión reducida. Por este método se han preparado las sales novobiocínicas de arginina, histidina y lisina.

20 La novobiocina y sus sales son agentes antimicrobianos útiles. Por ejemplo, se pueden utilizar para eliminar microorganismos sensibles de material farmacéutico y sus análogos, o para separar ciertos microorganismos de soluciones que contengan mezclas de varios gérmenes. También 25 son eficaces la novobiocina y sus sales en el tratamiento de animales infectados por microorganismos sensibles a la acción de este nuevo antibiótico. Por ejemplo, se ha comprobado que la novobiocina es muy útil en el tratamiento de la mastitis en vacas. Para este objeto sirven pomadas antimastíticas con 20 a 100 mg. de novobiocina sódica por 7,5 30 gramos.

228443

21 ABR. 1953



5 La novobiocina y sus sales son activas, por tanto, contra estafilococos resistentes a la penicilina, y también contra estreptococos y neumococos. Como estos microorganismos son causantes de la mayoría de las infecciones respiratorias bacterianas, la novobiocina se puede aplicar al tratamiento de tales infecciones en el hombre. Para ello, la sal sódica de novobiocina se administra por la boca en forma de cápsulas que contienen, por ejemplo, alrededor de 100 a 500 mg. del antibiótico, a una dosis diaria de 1 a 2 gramos. Así se prepara una forma posológica adecuada encerrando 250 mg. de la sal monosódica en una cápsula de gelatina blanda núm. 1. Igualmente es posible administrar novobiocina y sus sales en forma de tabletas. Estas se pueden preparar mezclando novobiocina sódica en polvo con una pequeña cantidad de una solución hidroftálica de acetato de celulosa en metanol-acetona (50-50), granulando el material a través de un tamiz núm. 8, secando los gránulos resultantes, pasando los gránulos secos por un tamiz núm. 12, y comprimiendo los gránulos resultantes, con adición de una pequeña cantidad de estearato magnésico, para hacer tabletas con 250 mg. de novobiocina sódica.

15 La novobiocina es también eficaz en el tratamiento y represión de enfermedades de plantas. Así, se puede emplear para combatir la roña o grasa de la habichuela producida por el Xanthomonas phaseoli. Para ello, se riegan las plantas con una solución acuosa que contiene unas 100 partes por millón de la sal sódica de novobiocina. Tales aspersiones pueden contener diversos humectantes o difusores y/u otros factores activos, y se pueden preparar de conformidad con métodos bien conocidos en la especialidad.

30 El antibiótico novobiocina descrito aquí es conocido



también por "Catomicina", nombre registrado por la Casa MERCK & Co., Inc.

5 Las unidades de novobiocina guardan relación con la actividad microbiológica de la novobiocina cristalizada substancialmente pura; la actividad microbiológica de esta substancia se ha fijado arbitrariamente en 5.000 unidades por mg., determinada por métodos normales de difusión en placas, empleando Bacillus megatherium ATTC 9885, o mejor Bacillus subtilis ATTC 12.432, como microorganismo de contraste. Cuando se emplea esta cepa de B. subtilis con tal objeto, el procedimiento puede realizarse como sigue:

10 Una vegetación de B. subtilis ATTC 12.432 se cultiva en tubos de agar inclinado con infusión de cerebro y corazón (Difco Manual, 9ª edición, págs. 90 y 91) durante 24 horas, a 37°C, y se guarda luego a 5°C durante periodos no más largos de un mes. Para preparar esporas, se dispone un material de siembra agregando 5 ml. de agua destilada esterilizada a un cultivo inclinado reciente de B. subtilis. Las células se raspan asépticamente del medio inclinado, se mezclan bien, y se trasladan a 50 ml. de agua destilada esterilizada en un matraz de Erlenmeyer. Se añaden 2 ml. de la suspensión bacteriana, en concepto de resembrado, a un frasco de Roux que contiene un medio compuesto de 3% de harina de soya, 0,2% de NaCl, 0,4% de solubles de destilerías, 0,8% de dextrosa y 0,2% de agar. Después de incubar durante siete días a 37°C, la vegetación bacteriana obtenida se suspende en 50 ml. de agua destilada esterilizada, y se pasteuriza a 65°C durante treinta minutos. Se emplean 4 ml. de una dilución 1:50 de esta suspensión de esporas por litro de medio de valoración, que contiene 0,5% de peptona, 0,3% de extracto de carne de buey, 0,3% de extracto de levadura y 1,5% de agar,

15

20

25

30

228443 27 AB



a un pH de 5,9-6,1. Porciones de 15 ml. de medio cebado se distribuyen entre platillos Petri profundos de fondo plano.

5 Sobre el agar cebado se colocan seis probetas de acero inoxidable. Tres de estas probetas se llenan de solución tipo de 4 microgramos de novobiocina por ml. (equivalentes a 20 unidades de novobiocina/ml.), y tres, de la solución problema diluída aproximadamente a la misma potencia con amortiguador de fosfato M/20, a un pH de 6. Se prepara una curva tipo diaria con novobiocina pura diluída a 10 varias concentraciones, desde 2 a 16 microg./mililitro.

15 Después de 18 horas de incubación a 28°C, se miden diámetros de las zonas de inhibición de las soluciones problema y patrón en cada placa. La potencia de la solución problema se determina por un nomograma basado en el grado de respuesta a varias concentraciones, deducido de la curva tipo diaria.

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

20

Se reivindica como objeto de esta patente:

1.- Procedimiento de fabricación de un antibiótico ácido, que comprende cultivar Streptomyces spheroides NRRL 2449 en un medio nutritivo acuoso, en condiciones aeróbicas, hasta comunicar al medio una actividad antimicrobiana substancial.

25

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el antibiótico se recupera del caldo fermentado.

30

3.- Procedimiento de fabricación de un antibiótico ácido, denominada novobiocina, que comprende cultivar Streptomyces spheroides NRRL 2449 en un medio nutritivo acuoso



que contiene reservas asimilables de carbono y nitrógeno, y sales inorgánicas, en condiciones aeróbicas, a una temperatura comprendida entre 24 y 28°C, durante un periodo aproximado de uno a siete días.

5

4.- Procedimiento de fabricación de un antibiótico ácido.

Esta memoria consta de veintisiete páginas, escritas por una sola cara.

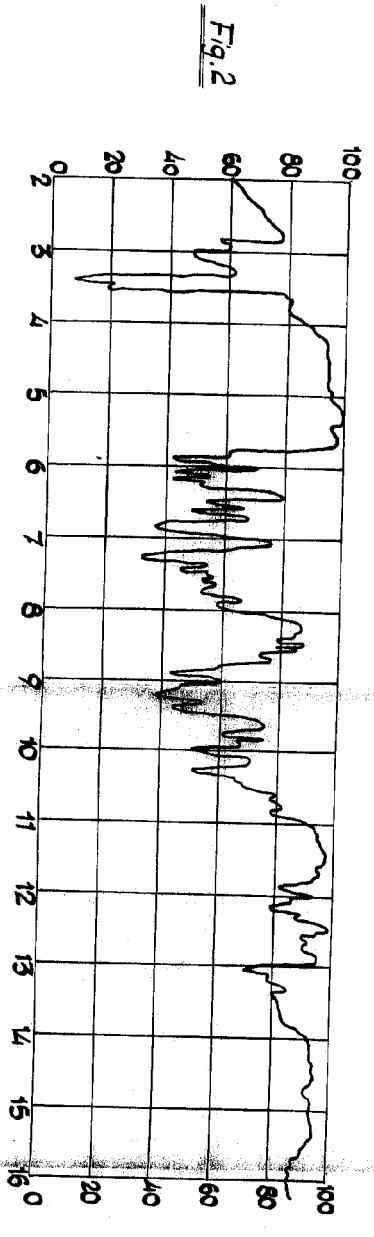
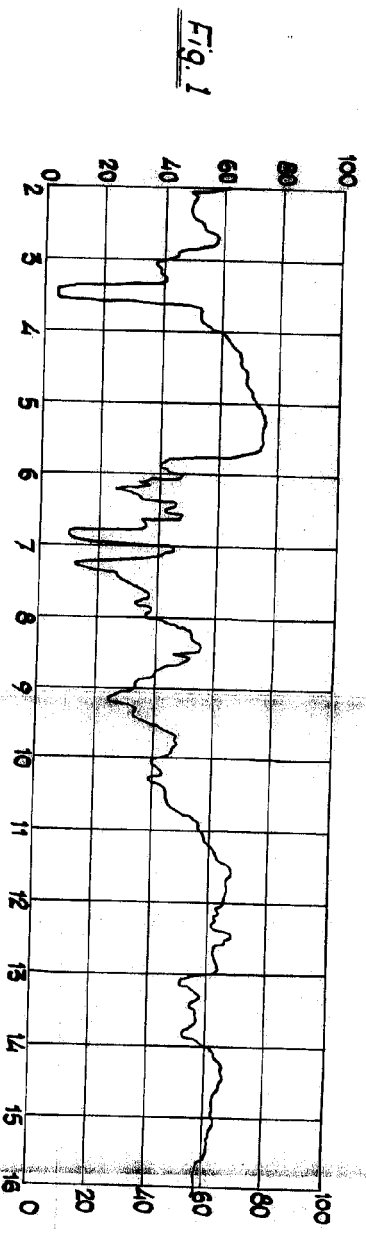
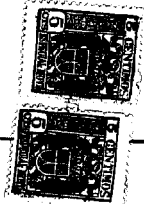
BARCELONA, 21 ABR. 1956

P.A.

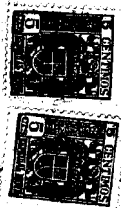
2 Hojar

Hoja 1.

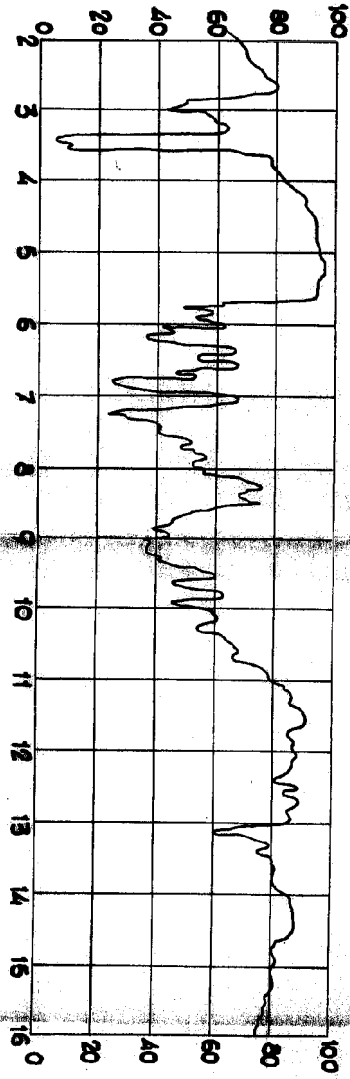
228443



[Handwritten signature]
P.A.
JOSE M. B. C. 1973



228443



J.A.
 JOSE M. SOLÍS
 P. P.

