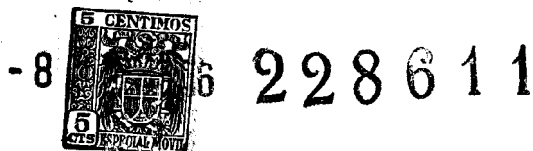


228 611

P.- 14.521.-

Case 41843.-



MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

P Á 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 PARKE, DAVIS & COMPANY, entidad norteamericana, establecida en Detroit, Michigan. Estados Unidos de América, por;

"PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE PAROMOMICINA"

5 Este invento se refiere a un nuevo compuesto químico que tiene valiosas propiedades antibióticas. Más en particular, el invento se refiere a un nuevo y útil antibiótico llamado paromomicina y a los métodos para su producción. El invento incluye el antibiótico y sus sales, tanto en forma pura como de concentrados brutos.

La paromomicina es una sustancia blanca amorfa estable, que es muy soluble en agua, moderadamente soluble en metanol y débilmente soluble en etanol absoluto. Es ópti-

228611



camente activa y tiene una rotación óptica  $[\alpha]_D^{25}$  de unos  $+64^\circ$  (al 1 % en agua).

5 La paromomicina contiene solamente los elementos carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno. Según el análisis contiene 45,17 % de carbono, 7,44 % de hidrógeno y 10,35 % de nitrógeno. Tiene la fórmula empírica probable  $(C_5H_9-11NO_3)_x$ .

10 La paromomicina da un ensayo de ninhidrina positivo, ensayo de El son-Morgan para amino-azúcares positivo, ensayo negativo del maltol después de calefacción con álcali y un ensayo de Sakaguchi de guanidinas negativo.

15 El espectro de absorción infrarrojo de la paromomicina, empleando una pasta de aceite mineral, compuesta del material pulverizado y aceite mineral, se caracteriza por vértices de absorción en las longitudes de onda de 2,93 y 6,25 micras. La figura 1 representa el espectro de absorción infrarrojo de la paromomicina. La paromomicina forma sales de adición con los ácidos minerales como el ácido clorhídrico ácido sulfúrico y similares.

20 La paromomicina forma un clorhidrato que tiene una rotación óptica  $[\alpha]_D^{25}$  de unos  $+56,5^\circ$  (al 1 % en agua). Según el análisis el clorhidrato de paromomicina contiene 35,71 % de carbono, 6,95 % de hidrógeno, 8,42 % de nitrógeno y 21,5 % de cloro. Tiene la fórmula empírica probable  $(C_5H_9-11NO_3.HCl)_x$ . El pk es igual a 6,3 y 8,35. El clorhidrato es más soluble en etanol frío que en etanol caliente.

228 611



5 El espectro de absorción infrarrojo del clorhidrato de la paromomicina, empleando una pasta de aceite mineral, se caracteriza por vértices de absorción en las longitudes de onda 6,23, 6,61, 6,66, 8,72, 9,53, y 9,70 micras y una inflexión en 2,95 micras. La figura 2 representa el espectro de absorción infrarrojo del clorhidrato de paromomicina.

10 La paromomicina forma un sulfato que tiene una rotación óptica  $[\alpha]_D^{25}$  de unos + 50,5° (al 1,5 % en agua). Según el análisis, tiene la fórmula empírica probable  $(C_{10}H_{18-22}N_2O_6 \cdot H_2SO_4)_x$ . El espectro de absorción infrarrojo del sulfato de paromomicina, empleando una pasta de aceite mineral, se caracteriza por vértices de absorción pronunciados en las longitudes de onda de 6,17 y 6,55 micras y una inflexión en 3,1 micras. La figura 3 representa el espectro de absorción infrarrojo del sulfato de paromomicina.

15 La paromomicina puede prepararse de acuerdo con el invento por métodos sintéticos microbiológicos, que suponen el cultivo de un microorganismo llamado Streptomyces rimosus forma paramomycinus en condiciones artificiales en un medio nutricio adecuado. La producción de paromomicina por medios microbiológicos se describe a continuación.

20 El Streptomyces rimosus forma paramomycinus es un microorganismo hasta ahora desconocido que se encuentra en los suelos. Se aisló por primera vez de una muestra del suelo recogida en Hacienda Tierradura,

228611



5 Miranda, Colombia, América del Sur. Cultivos de éste microorganismo pueden obtenerse preparando una suspensión en agua estéril de una muestra de suelo que la contenga, dejando sedimentar las partículas más pesadas, colocando la suspensión de suelo que sobrenada en diluciones en serie sobre placas de agar nutritivo, incubando las placas a 24-28° C. para obtener un desarrollo del microorganismo y transplantando desarrollos individuales seleccionados que se asemejen al Streptomyces rimosus forma paromomycinus a 10 nuevas placas de agar nutritivo. Mediante selección y transplatación repetida de desarrollos característicos, sin contaminar, a nuevas placas de agar nutritivo, se obtienen talos que constituyen cultivos puros del microorganismo deseado.

15 El Streptomyces rimosus forma paromomycinus tiene las características siguientes: cuando se desarrolla en un medio de agar glicerina-asparaguina, el micelio del substrato es de color amarillo pálido a pardo, el micelio aéreo es blanco; en un medio agar sintético-almidón el micelio del substrato es pardo claro y el micelio aéreo es 20 blanco; en un medio de agar malato calcico, el micelio del substrato es pardo amarillo claro y el micelio aéreo es blanco; en un medio de agar nutricio el micelio del substrato es amarillo-naranja-pardo claro y existe poco o ningún micelio aéreo; en un medio de agar de glucosa-triptona, 25 el micelio del substrato es de amarillo claro a pardo claro, el micelio aéreo es blanco y aparece una coloración parva débil en el medio de agar. Las colonias superficiales están

228611



5 levantadas, lisas, arrugadas o plegadas y agrietadas en áreas de crecimiento denso; frecuentemente, el agar está también agrietado. Microscópicamente, las hifas aéreas están ramificadas irregularmente; las ramas laterales son cortas y enrolladas. Las espirales son numerosas en la mayoría de los medios y aparecen a menudo en racimos densos. Las porciones distantes de las hifas aéreas se subdividen en cadenas de esporas.

10 El Streptomyces rimosus forma paramycinus vuelve líquida la gelatina con formación de poco o ningún color en el medio y generalmente no peptoniza la leche tornasol. En un medio de agar sintético [Pridham y Gottlieb, J. Bact., 56, 108 (1948)], el organismo utiliza numerosas fuentes de carbono, incluyendo adonita, celobiosa, dextrina, dextrosa, D-galactosa, glicerina, i-inosita, lactosa, levulosa, maltosa, D-manita, D-mannosa, melibiosa, sorbita, almidón y trealosa; utiliza con menor apetencia L-arabinosa, rafinosa, y xilosa; y no utiliza la esculina, dulcita, inulina, melecitosa, ramnosa, salicina, y sacarosa. El organismo utiliza numerosas fuentes de nitrógeno, incluyendo DL-alanina, L-arginina, ácido DL-aspártico, L-cistina, L-cisteína, ácido L-glutámico, glicil-glicina, L-histidina, L-leucina, L-lisina, L-fenilalanina, L-prolina, DL-serina, DL-treonina, DL-valina, sulfato amónico, y nitrato sódico; y utiliza con menor apetencia L-hidroxiprolina, DL-isoleucina, DL-metionina, L-triptofano, L-tirosina. DL-norleucina, urea, y carbonato

15  
20  
25



228611

amónico.

Morfológicamente, el Streptomyces rimosus forma paromomycinus se asemeja estrechamente al Streptomyces rimosus (descrito por Sobin y col. en United States Patent No. 2,516,080 y conservado como NRRL-2234 en la colección permanente de cultivos de la Northern Utilization Research Branch en Peoria, Illinois). Estos dos microorganismos poseen análoga coloración del micelio del sustrato y aéreo, como se indica en la tabla I. S. rimosus es algo más oscuro y frecuentemente colorea más el agar de lo que lo hace el Streptomyces rimosus forma paromomycinus. En los ensayos de utilización de carbono, el Streptomyces rimosus forma paromomycinus y el S. rimosus utilizan las mismas fuentes de carbono, excepto la L-arabinosa que el Streptomyces rimosus forma paromomycinus lo utiliza débilmente o de ninguna manera y el S. rimosus lo utiliza bien. (Tabla II). Con respecto a la utilización de nitrógeno, los dos organismos son análogos (Tabla III). Microscópicamente, el Streptomyces rimosus forma paromomycinus se asemeja estrechamente al S. rimosus. Ambos organismos forman densos racimos de espirales en medios de agar glicerina asparaguina, almidón sintético, malato calcico y glucosa triptona. En un medio de agar nutritivo, ambos organismos forman, sin embargo, poco micelio aéreo y microscópicamente sus hifas aéreas son en su mayor parte cortas y rectas, con espirales solo

78



228611

ocasionalmente. Con ambos microorganismos el desarrollo superficial y el agar se agrietan en áreas de crecimiento denso, en diversos medios de agar.

5 Puesto que el Streptomyces rimosus forma paromomycinus se asemeja estrechamente al S. rimosus NRRL 2234, morfológicamente y en muchos aspectos fisiológicamente, se deduce que el Streptomyces rimosus forma paromomycinus representa una forma nueva y distinta del Streptomyces rimosus. Un cultivo del Streptomyces rimosus forma paromomycinus se conserva en la colección de cultivos de  
10 Parke, Davis & Company Culture Bureau, Detroit, Michigan, con el No. 04998 y en la Culture Collection of the Fermentation Division, Northern Utilization Research Branch, U.S, Department of Agriculture, Peoria, Illinois, con el No. NRRL 2455.

15 La producción de paromomicina de acuerdo con el invento se lleva a cabo inoculando un medio acuoso nutritivo estéril con el Streptomyces rimosus forma paromomycinus, incubando el medio inoculado en condiciones aerobias asépticas a una temperatura de unos  
20 20 a 35°C., separando el material sólido presente en la mezcla de cultivo y aislando la paromomicina deseada del líquido de cultivo acuoso.

25 Para la inoculación, pueden utilizarse esporas o conidios del Streptomyces rimosus forma paromomycinus. También puede utilizarse suspensiones acuosas de los mismos que contengan una pequeña proporción de jabón u

TABLA I

228611

Comparación de coloración del Streptomyces rimosus NRRL

Streptomyces rimosus forma paranomycelinus y el 2234 cultivado en varios medios de agar

Medio de agar	Carácter	<u>Streptomyces rimosus</u> forma <u>paranomycelinus</u>	<u>S. rimosus</u> NRRL 2234
Glicerina	Micelio del sustrato	amarillo claro a pardo claro	Amarillo a pardo claro
Asparagina	Micelio aéreo	blanco	Blanco
	Sustrato	ninguno	pardo claro débil
Almidón	Micelio del sustrato	pardo claro	pardo claro
	Micelio aéreo	blanco (aéreo escaso)	blanco
	Sustrato	ninguno	ninguno
Melato	Micelio del sustrato	amarillo-pardo	amarillo-pardo
	Micelio aéreo	blanco	blanco
	Sustrato	ninguno	pardo claro débil
Nutricio	Micelio del sustrato	amarillo claro-pardo naranja (no hay aéreo)	amarillo-pardo claro
	Micelio aéreo	ninguno	blanco (aéreo débil)
	Sustrato	ninguno	ninguno
Glucosa	Micelio del sustrato	amarillo claro a pardo claro	pardo-amarillo a pardo naranja
tryptona	Micelio aéreo	blanco	blanco
	Sustrato	pardo claro débil	pardo claro

-8 J



Comparación de la utilización de carbono del STREPTOMYCES RIMOSUS FORMA PAROMOMYCINUS Y EL S. RIMOSUS NRRL 2234

Fuentes de carbono *	<u>Streptomyces rimosus</u> forma paromomicinus	<u>S. rimosus</u> NRRL 2234
<u>Monosacáridos</u>		
<u>Pentosas</u>		
L-arabinosa	0 a -	---
D-ribose	0 a 0	0
D-xilosa	0 a -	0 a -
<u>Hexosas</u>		
Dextrosa	- - - -	- - - -
D-galactosa	- - - -	- - - -
Levulosa	- - - -	- - - -
D-mannosa	- - - -	- - - -
<u>Disacáridos</u>		
Celobiosa	- - - -	- - - -
Lactosa	- - a -	- - - -
Maltosa	- - - -	- - - -
Melibiosa	- - - -	- - - -
Sacarosa	0	0
Trealosa	- - - -	- - - -
<u>Trisacáridos</u>		
Melécitosa	0	0
Rafinosa	- a - -	- a - -
<u>Polisacáridos</u>		
Dextrina	- - - -	- - - -
Inulina	0	0
Almidón	- - - -	- - - -
<u>Alcoholes polihidróxicos</u>		
Adonita	- - - -	- - - -
Dulcita	0	0
Glicerina	- - - -	- - - -
i-inosita	- - - -	- - - -
D-mannita	- - - -	- - - -
D-sorbita	- - - -	- - - -
<u>Diversos</u>		
Esculina	0	0
Salicina	0	0

0 = no hay desarrollo  
 - = escaso desarrollo  
 - - = desarrollo mediano  
 --- = buen desarrollo  
 - - - = muy buen desarrollo

\* Cada fuente de carbono se ensayó en una concentración de 1,0 por ciento en peso en el medio de agar sintético descrito por Pridham y Gottlieb, J. Bact., 56, 108, 1948.



Comparación de la utilización de nitrógeno del Streptomyces rimosus forma paromomycinus y el S. rimosus NRRL 2234

Fuentes de nitrógeno * *	<u>Streptomyces rimosus</u> forma <u>paromomycinus</u>	<u>S. rimosus</u> NRRL 2234
<u>Inorgánico</u>		
Nitrato sódico	---	---
Sulfato amónico	---	---
Amonio	--	--
<u>Orgánico</u>		
DL-Alanina	---	---
L-Arginina	---	---
ácido DL-aspartico	---	---
L-cisteina	---	---
L-cistina	---	---
ácido L-glutámico	---	---
glicil-glicina	---	---
L-histidina	---	---
L-hidroxi-prolina	-	-
DL-isoleucina	--	--
L-leucina	---	---
L-lisina	---	---
DL-metionina	-	-
L-fenilalanina	---	---
L-prolina	---	---
DL-serina	---	---
DL-treonina	---	---
L-triptofano	-	-
L-tirosina	-	-
DL-norleucina	--	--
DL-valina	---	---
Urea	--	--

\* \* Cada fuente de nitrógeno se ensayó en una concentración 0,01 M de nitrógeno equivalente en el medio de agar sintético descrito por Pridham y Gottlieb, J. Bact., 56, 108, 1948, modificado por la omisión del sulfato amónico y la adición de 1,0 por ciento en peso de dextrosa.

228611 - 8



otro agente humectante. Para fermentaciones en gran escala es preferible utilizar cultivos jóvenes, potentes, del microorganismo.

5 Medios nutritivos acuosos apropiados son aquéllos que tienen un pH entre 6 y 8,5 y contienen una fuente de carbono asimilable y una fuente de nitrógeno y sales minerales. Como fuentes de carbono asimilable pueden utilizarse tanto los hidratos de carbono puros o las mezclas de hidratos de carbono disponibles comercialmente .

10 Algunos ejemplos de materiales que son apropiados con éste objeto incluyen la glucosa, d-manosa, d-galactosa, jarabe de maiz, almidón, almidón soluble, líquidos de maceración de malta, melazas finales ("black-strap"), almidones hidrolizados, glicerina y similares. La cantidad de hidrato de carbono presente en el medio nutri-

15 tivo no es especialmente crítica y puede variar desde un 0,5 % a un 5 % en peso del peso total del medio.

La fuente de nitrógeno en el medio nutritivo puede ser de naturaleza orgánica, inorgánica o mixta

20 orgánica-inorgánica. Algunos ejemplos de sustancias nitrogenadas que pueden emplearse en el medio nutritivo son los aminoácidos, peptonas, proteínas hidrolizadas y sin hidrolizar, harina de pescado, harina de soja, líquido de maceración de maiz, extractos de carne,

25 harina de cacahuetes, nitratos inorgánicos, urea, sales amónicas y similares. Debido a la naturaleza en bruto de la mayor parte de las sustancias nitrogenadas

228611



fácilmente asequibles, la cantidad a añadir al medio nutritivo varia algo de acuerdo con la pureza. Sin embargo, puede decirse para su aplicación práctica que los materiales nitrogenados necesarios no deben exceder del 6 % en peso del peso total del medio de fermentación.

Para obtener los mejores rendimientos de paromomicina es necesaria una cierta cantidad de sales minerales. En general, muchos materiales en bruto, como el líquido de maceración de maíz, residuos de fermentación butanol-acetona, preparaciones de levadura, harina de soja, etc. contienen sales minerales en cantidades suficientes. Sin embargo, con objeto de asegurar la presencia de cantidades adecuadas de componentes minerales del medio, generalmente es conveniente añadir una pequeña cantidad de sales inorgánicas, como el cloruro sódico, bicarbonato sódico, carbonato cálcico, acetato sódico y similares. La concentración preferida de sales minerales está entre 0,1 y 1 % del medio nutritivo.

El cultivo del Streptomyces rimosus forma paromomycinus en el medio acuoso nutritivo puede llevarse a cabo por diferentes caminos. Por ejemplo, el microorganismo puede cultivarse en condiciones aerobias en la superficie del medio o puede cultivarse por debajo de la superficie del medio, esto es, en forma sumergida, si se suministra simultáneamente oxígeno.

El método preferido de producción de paromomi-

228611



5 cina en gran escala supone el empleo de cultivos su-  
mergidos o profundos de Streptomyces rimosus forma  
paromomycinus. De acuerdo con esta forma de llevar a ca-  
bo el invento, un medio nutritivo acuoso, esteril, se  
10 inocula con Streptomyces rimosus forma paromomycinus  
y se incuba con agitación y aireación a una temperatura  
entre unos 20 y 35º U., de preferencia en las proximida-  
des de 23-30º C., hasta que se ha producido una concen-  
tración máxima de paromomicina en el líquido de cultivo.  
15 La duración del tiempo necesario para la producción má-  
xima de paromomicina varía con el tamaño y tipo de ins-  
talación empleada. Por ejemplo, en fermentaciones co-  
merciales en gran escala, como las que se llevan a cabo  
en fermentadores tipo tanque, la producción máxima de  
20 paromomicina se alcanza en unos tres a seis días. La  
incubación puede limitarse a periodos de tiempo más cor-  
tos, pero los rendimientos son generalmente inferiores.  
Periodos de incubación mayores no parece que disminuyan  
la cantidad de paromomicina presente en el líquido de  
25 cultivo. Cuando se utilizan frascos de agitación para  
la incubación, el tiempo de producción máxima puede ser  
ligeramente superior que el necesario para los tanques  
de fermentación en gran escala. En las condiciones del  
cultivo sumergido, el microorganismo se desarrolla como  
partículas mas o menos discretas dispersas a través del  
medio nutritivo en contraste con la película más o me-  
nos continua presente en la superficie del medio en el

228611



5 método de cultivo superficial. En virtud de esta distribución del organismo en el medio, pueden cultivarse de una vez, en los grandes tanques y recipientes empleados ordinariamente en la industria de fermentación, grandes volúmenes de medio nutritivo inoculado. En relación con esto, se ha encontrado que son particularmente útiles tanques de fermentación estacionarios provistos con sistemas adecuados de agitación y aireación, así como fermentadores de tambor rotatorio horizontal. Sin embargo, para la preparación de cantidades menores de anti-  
10 biótico, o de cultivos del microorganismo, el método de cultivo sumergido puede llevarse a cabo en pequeños frascos o tarros que se sacuden o agitan por procedimientos mecánicos adecuados.

15 La agitación y aireación de la mezcla de cultivo puede conseguirse por diferentes métodos. La agitación puede realizarse por turbinas, paletas, propulsores u otros artificios mecánicos de agitación, girando o agitando el propio fermentador, por diversos sistemas de aspiración o pasando aire a través del medio. La  
20 aireación puede efectuarse inyectando aire en la mezcla de fermentación a través de tubos abiertos, tubos perforados, medios porosos de difusión como trozos de carbón, carborundo, vidrio poroso y similares, o puede conseguirse por pulverización, rociamiento o desparramando  
25 la masa en o a través de una atmósfera que contenga oxígeno.

228611



5 El método de cultivo superficial de producción  
de paromomicina supone la inoculación de una capa poco  
profunda, generalmente menor de 2 cm, de un medio acuoso  
nutritivo estéril, con el Streptomyces rimosus forma  
10 paromomicinus y la incubación de la mezcla en condicio-  
nes aerobias a una temperatura entre unos 20 y 35° C.  
Generalmente es necesario un periodo de incubación más  
largo, que el empleado en el método de cultivo profundo,  
para obtener la producción máxima de paromomicina. En  
15 general, el periodo de incubación se halla en las pro-  
ximidades de diez a quince días. Una vez que la fase de  
incubación del proceso es completa, se separa el micelio  
del líquido que contiene la paromomicina deseada y el  
producto se aísla del líquido de cultivo por los méto-  
dos que se describirán en lo que sigue.

20 Después de completa la fase de fermentación del  
proceso, el material sólido presente en la mezcla de  
cultivo se separa por un método adecuado como filtración,  
centrifugación, etc., y la paromomicina deseada se ais-  
la del líquido de cultivo residual. El aislamiento se  
consigue de modo conveniente por métodos de cambio  
iónico, preferentemente por adsorción y elución de la  
paromomicina empleando un cambiador de cation en forma  
de sal. La paromomicina contenida en el eluato puede  
25 aislarse por concentración a sequedad o, si se desea,  
antes de aislarla puede purificarse más por adsorción  
y elución repetida.

228611



Uno de los métodos preferidos de aislar la paromomicina de la mezcla de cultivo consiste en someter el líquido de cultivo residual a la adsorción y elución de una resina cambiadora de cation en forma de sal, concentración del eluato, adsorción del eluato concentrado sobre carbón activo, extracción de la paromomicina del carbón y recuperación de la paromomicina libre, o de su sal de adición con ácidos minerales, del extracto. De acuerdo con éste método, el líquido de cultivo, obtenido por separación de los materiales sólidos de la mezcla de cultivo de fermentación, se ajusta a un pH de aproximadamente 6, 8 a 7,5 y se hace pasar a través de una columna de adsorción que contiene una resina de ácido carboxílico en forma de sal, como la sal sódica, potásica o amónica. La resina que contiene la paromomicina adsorbida se lava con agua y se eluye entonces con un ácido mineral acuoso diluido como el ácido clorhídrico o una base como el hidróxido amónico. El eluato se concentra, se mezcla carbón activo con el concentrado, se separa de la mezcla el carbón que contiene adsorbida la paromomicina y la paromomicina se extrae entonces del carbón con un disolvente orgánico adecuado como por ej. un alcohol o cetona alifáticos inferiores acuosos o anhidra. La paromomicina puede aislarse del extracto eliminando el disolvente en vacío o por precipitación como sal insoluble ácida de adición.

En algunos casos, a continuación de la elución

228611



de la paromomicina del cambiador de catión, es conveniente, especialmente cuando están presentes cantidades importantes de sales minerales, elevar el pH del eluato por adición de una base antes de la adsorción sobre carbón activo. En éstos casos, el eluato se ajusta a un PH de 9 a 9,7, se mezcla carbón activo con el eluato, se separa de la mezcla el carbón que contiene adsorbida la paromomicina, se lava con agua y la paromomicina se eluye entonces con ácido mineral diluido. La paromomicina contenida en el eluato resultante se aísla convenientemente haciendo pasar el eluato a través de un cambiador que contenga una resina aniónica en la forma hidroxílica, recogiendo y neutralizando el líquido que sale y operando después sobre este en forma neutra mediante cambio con una resina cambiadora de catión, elución con hidróxido amónico y liofilización del eluato.

De acuerdo con otro de los métodos preferidos de aislar la paromomicina, el líquido de cultivo de la fermentación se adsorbe y eluye en la forma antes indicada empleando una resina cambiadora de catión, el pH del eluato resultante se ajusta, si fuese necesario, alrededor de pH 4,5-7 y se hace pasar a través de una columna que contenga una mezcla de cantidades aproximadamente iguales de carbón activo y tierra de diatomeceas. La paromomicina, que está retenida en la columna se eluye convenientemente lavando con agua. Cantidades adicionales de paromomicina que quedan en la columna después

228611



5 del lavado con agua pueden recuperarse por lavado posterior con disolventes orgánicos acuosos diluidos o ácidos minerales acuosos diluidos. La paromomicina puede obtenerse a partir de los líquidos de lavado separando el disolvente en vacío o por precipitación en forma de sal insoluble de adición de un ácido mineral.

10 La paromomicina puede degradarse por hidrólisis con ácidos minerales como el ácido clorhídrico dando un producto salino cristalino que contiene según el análisis elemental alrededor de 32-33 % de carbono, 7 % de hidrógeno, 9-10 % de nitrógeno y 23-24 % de cloro. Los productos de una hidrólisis por ácido mineral como ésta no tienen actividad antibacteriana apreciable. En particular, el producto de hidrólisis obtenido del siguiente modo es inactivo contra el B. subtilis:

15 una solución de 2,81 gr. de clorhidrato de paromomicina en 280 ml de metanol anhidro se refluje durante dos horas y media con 60 ml de cloruro de hidrógeno 1,8 N en metanol, tiempo durante el cual se deposita un precipitado cristalino. Después de refrigerar durante la noche, el precipitado, que consiste en la sal del ácido clorhídrico del producto de hidrólisis, se recoge por filtración y se purifica por recristalización de etanol acuoso.

20 La base libre, que corresponde a la sal de ácido clorhídrico del producto de hidrólisis, tiene una fórmula empírica probable  $C_{12}H_{25}O_7N_3$  y contiene según el análisis elemental un 44-45 % de carbono, 8 % de hidrógeno,

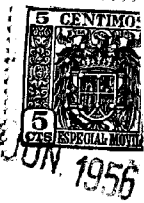
25

228611



y 13 % de nitrógeno.

5 La paromomicina es muy activa bacteriostaticamente contra una amplia variedad de organismos patógenos. En particular, la paromomicina es completamente activa in vitro contra razas de staphylococcus que son resistentes a la oxitetraciclina, eritromicina o carbomicina. La tabla IV ilustra el espectro antibacteriano de la paromomicina empleada como sulfato in vitro.



228611

TABLA IV.

Espectro antibacteriano del sulfato de paromomicina

<u>Cultivo</u>	Concentración inhibitoria mínima de sulfato de paromomicina.* * en g/ml.
<i>Clostridium perfringens</i>	100.0
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0.39
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	100.0
<i>Micrococcus pyogenes</i> var. aureus	0.78
<i>Streptococcus pyogenes</i>	25.0
<i>Streptococcus salivarius</i>	50.0
<i>Aerobacter aerogenes</i>	6.25
<i>Brucella suis</i>	3.13
<i>Escherichia coli</i>	12.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.56
<i>Neisseria catarrhalis</i>	0.78
<i>Pasteurella multocida</i>	6.25
<i>Proteus vulgaris</i>	3.13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50.0
<i>Salmonella paratyphi</i>	1.56
<i>Salmonella schottmuelleri</i>	12.5
<i>Salmonella typhosa</i>	6.25
<i>Shigella dysenteriae</i>	12.5
<i>Shigella paradysenteriae</i>	12.5
<i>Shigella sonnei</i>	12.5
<i>Vibrio comma</i>	25.0
<i>Mycobacterium phlei</i>	0.19
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> var. hominis	0.19

\* Determinados en series dobles de ensayos de dilución de caldo.  
 \* \* Pureza estimada 60-70 %.

228611



La paromomicina es un agente útil para prevenir la infección potencial por microorganismos patógenos . La paromomicina posee importantes propiedades **antiparasitarias** y es particularmente útil para combatir la Endamoeba histolítica, el agente causante de la amebiasis. La paromomicina es también útil para el tratamiento de infecciones superficiales locales causadas por varios agentes patógenos y es aplicable particularmente al tratamiento de la infección causada por razas staphylococcus, que son resistentes a diversos antibióticos comunmente empleados, por ej. oxitetraciclina, eritromicina, carbomicina y similares. Para éstas aplicaciones, la paromomicina puede emplearse como base libre o como sal de adición de ácido mineral, por ej., clorhidrato, sulfato, etc. Puede aplicarse en varias formas adecuadas, por ej., como polvo mezclado con un diluyente inerte, como talco, almidón, etc. como unguento que comprende un excipiente de unguento inerte y una proporción menor de paromomicina, o como solución diluida en agua que contenga, si se desea, un agente actividad superficial compatible. En éstas formas, la paromomicina puede emplearse convenientemente en una concentración de unos 5 mg por centímetro cúbico en el caso de soluciones y de unos 5 mg por gramo en el caso de polvos y ungüentos. La paromomicina tiene la ventaja de ser relativamente no toxica y estable en diversas condiciones de empleo. En su empleo como bacteriostático, la paromomici-

228611

-8



na se aplica directamente en el sitio de la infección, y se aplica posteriormente de manera periódica según se precise. Si se desea, la paromomicina puede emplearse en combinación con otros agentes bacteriostáticos.

5 El invento se aclara en los ejemplos siguientes:

Ejemplo 1

Doce litros de un medio nutriente que tiene la siguiente composición:

	Glucosa, monohidrato	0,5
10	Glicerina	0,5
	Caseína hidrolizada con ácido	0,3
	Peptona	0,25
	Levadura de cerveza	0,1
	Sólidos de maceración de maíz	0,25
15	Harina de soja	0,25
	Residuos de fermentación acetona-butanol.....	0,25
	Cloruro sódico	0,5
	Carbonato cálcico	0,1
20	Agua suficiente para hacer	100,0

se coloca en un fermentador de 30 litros provisto de herrajes en acero inoxidable que incluyen inyector, agitador obstáculos y conductos de toma de muestras y el medio se esteriliza por calefacción a 121°C. durante dos horas.

25 El medio se enfría y se inocula con 20 ml de una suspensión de las esporas de dos cultivos inclinados de esporulación en agar de Moyer de Streptomyces rimosus forma

228611



paromomycinus en una solución estéril al 0,1 % de heptadecilsulfato sódico. La mezcla de cultivo inoculada se incuba a 26°C. durante 60 horas, y durante éste tiempo se agita la mezcla a 200 r.p.m. y se pasa a 5 aire estéril por el medio a través del inyector a la velocidad de 12 litros por minuto. Una porción de la mezcla de cultivo incubada resultante se emplea para la inoculación de dieciseis litros de un medio nutritivo que tenga la siguiente composición:

	<u>tanto por ciento</u>
10	Glucosa, monohidrato 1,0
	Harina de soja 1,0
	Cloruro sódico 0,5
	Carbonato cálcico 0,1
15	Cloruro amónico 0,167
	Residuo de estómago de cerdo, extracto salino..... 0,5
	Agua suficiente para hacer.....100,0

El pH del último medio nutritivo se ajusta a 7,5 con 20 solución de hidróxido sódico 10 N y se coloca en un fermentador de vidrio de 30 litros provisto de inyector, agitador, obstáculos conducto de toma de muestra. El medio se esteriliza por calefacción a 121°C. durante 25 dos horas, se deja enfriar y se inocula entonces con 800 ml de la mezcla de cultivo obtenida según se describió anteriormente. La mezcla de cultivo resultante se incuba a 26°C. durante noventa y cuatro horas y durante

228611



este tiempo la mezcla se agita a 200 r.p.m. y se pasa  
aire estéril en el medio a través del inyector a la  
velocidad de 16 litros por minuto. Durante la incuba-  
ción, se evita la formación de espuma por adición,  
5 según se necesite, de manteca de cerdo cruda y aceites  
minerales que contengan mono- y di-glicéridos.

Al final del periodo de incubación, la mezcla  
de cultivo de fermentación se ajusta a pH 2 con ácido  
clorhídrico concentrado, se separa por filtración el  
10 material sólido presente y la torta del filtro se lava  
con agua. Las aguas de lavado se combinan con el filtra-  
do principal, se ajusta a pH 7,0 y 15,5 litros del líqui-  
do de cultivo filtrado se introducen en un cambiador en  
columna (3,8 cm diam. int.) relleno con 380 ml. de resina  
15 de ácido carboxílico que ha sido previamente lavada su-  
cesivamente con dos litros de una solución acuosa de  
37,5 g de hidróxido sódico y con dos litros de agua. La  
columna que contiene la paromomicina se lava con dos vo-  
lúmenes de agua y se eluye con ácido clorhídrico 0,5 N.  
20 Los primeros 19,4 litros de percolado contienen poca o  
ninguna paromomicina y su pH varía de 6 a 7,3. Cuando  
el pH del eluato empieza a caer por debajo de 6,0 , se  
recogen dos litros de eluato.

La porción de dos litros de eluato, recogida  
25 según se indicó, se neutraliza a pH 6 con solución de  
hidróxido sódico 10 N y se filtra. El filtrado se concen-  
tra por evaporación a vacío hasta un volúmen de un litro

228611



aproximadamente.

5 Se prepara una columna de adsorción por adición  
de una mezcla acuosa pastosa de 65 g. de carbón activo  
lavado con ácido (Darco G-60) y 50 g de tierra de diato-  
maceas en una columna de 3,8 cm y se añaden 300 ml del  
filtrado concentrado. La columna se lava con 400 ml de  
10 agua y se eluye sucesivamente con 325 ml de agua, 425 ml  
de acetona acuosa al 1 % y 400 ml de acetona acuosa al  
10 % . Los eluatos de agua y acetona se concentran y  
liofilizan para dar clorhidrato de paromomicina en forma  
de polvo. El producto se purifica recogiendo el polvo en  
metanol, añadiendo un gran exceso de acetona a la solu-  
ción, recuperando el precipitado que se forma, por fil-  
tración. El producto, clorhidrato de paromomicina tiene  
15 una rotación óptica  $[\alpha]_D^{25} = + 56,5^\circ$  (al 1 % en agua).

Con objeto de obtener la paromomicina en forma de  
base libre, el clorhidrato se disuelve en agua en solución  
al 3 %, la solución se vierte en una columna de adsorción  
que contenga una resina cambiadora de a-nión (Amberlite  
20 IR-45 o de preferencia IRA 411 ó IRA 400) en la forma  
hidroxflica y la columna se lava con una pequeña cantidad  
de agua. El percolato acuoso se concentra a sequedad por  
liofilización y el producto sólido obtenido se purifica  
recogiendolo en etanol absoluto hirviente, enfriamiento  
25 y recuperación de la paromomicina sólida ;  $[\alpha]_D^{25} = + 64^\circ$  (al  
1 % en agua).

228611



Ejemplo 2

Para la preparación de un medio de inoculación reciente para la producción en gran escala de paromomicina descrita en lo que sigue, 80 litros de un medio nutritivo que tiene la composición siguiente:

5

Tanto por ciento

	Glucosa, monohidrato	1.0
	Harina de soja	1.0
	Residuo de estómago de cerdo, ex- tracto salino.....	0,5
10	Cloruro amónico	0,167
	Cloruro sódico	0,5
	Carbonato cálcico	0,5
	Agua suficiente para hacer	100,0

15

se colocan en un fermentador de 200 litros de acero inoxidable y se ajusta el pH a 7,5 con solución de hidróxido sódico 6 N. El medio se esteriliza por calefacción a 121°C. durante una hora. El medio se enfría y se inocula con 40 ml de una suspensión de esporas de Streptomyces rimosus forma paromomycinus en una solución estéril al 0,1 % de heptadecil sulfato sódico, preparada de la misma forma que se describió en el ejemplo 1. La mezcla de cultivo se incuba a 26°C. durante 64 horas, durante cuyo tiempo se suministra aire estéril a través de un inyector a la velocidad de 0,28 m<sup>3</sup> por minuto. Durante la incubación se añade una mezcla esterilizada de manteca de cerdo en bruto y aceites minerales que contengan mono- y di-glicéridos, según se requiera para controlar la formación de espuma.

20

25

228611



El cultivo incubado así obtenido se utiliza para inocular el cultivo principal preparado de la siguiente manera: Se preparan seiscientos litros de un medio que tiene la composición:

5	<u>Tanto por ciento</u>
Glucosa, monohidrato	1,0
Harina de soja	1,0
Residuo de estómago de cerdo, extracto salino	0,5
10	Cloruro amónico
	0,167
	Cloruro sódico
	0,5
	Carbonato cálcico
	0,5
	Agua suficiente para hacer
	100,0

en un fermentador de acero inoxidable de 800 litros y el pH se ajustó a 7,5 con solución de hidróxido sódico de 6 N. El medio se esterilizó por calefacción a 121°C. durante una hora y se dejó enfriar. El medio estéril se inoculó con cuarenta litros del cultivo preparado como se describió anteriormente y se incubó a 26°C. se-  
 15  
 20  
 25  
 tenta y dos horas, durante cuyo tiempo se suministró aire estéril a través de un inyector a una velocidad de 0,95 m<sup>3</sup> por minuto y la mezcla de cultivo se agitó con un motor de revolución a la velocidad de 230 r.p.m.. Para evitar la excesiva formación de espuma durante la incubación se añaden 8,1 l. de una mezcla estéril de manteca de cerdo y aceites minerales, según se precise.

228611



5 Al final del periodo de incubación, la mezcla de cultivo se ajusta a pH 2 con ácido clorhídrico concentrado, se filtra, y la torta del filtro se lava con agua. El filtrado y lavados combinados (600 l.) se neutralizan y se añaden a una columna de adsorción (15 cm. de diámetro interior) rellena con 13 l. de una resina de ácido carboxílico (amberlite IRC- 50) que ha sido neutralizada previamente por percolación con una solución de 1,265 gr. de hidróxido sódico en 60 l. de agua. La columna, que contiene la paromomicina, se lava con unos 40 l. de agua y se eluye con ácido clorhídrico 0,5 N. Cuando el pH del efluente de la columna cae por debajo de 6, se recogen 88,5 l. de eluato, se neutralizan con solución de hidróxido sódico 6 N. y se concentran por evaporación en vacío hasta aproximadamente un décimo de su volumen.

10

15

Un cuarto de litro del eluato concentrado se añade a una columna de adsorción preparada llenando un tubo de 3,8 cm. que tenga una capacidad de 360 ml. aproximadamente con una pasta acuosa de 80 gr. de carbón activo (Darco G-60 ) y 60 gr. de tierra de diatomeas. El clorhidrato de paromomicina contenido en la columna se recupera por elución con un litro y medio de agua. El eluato se concentra, se congela y se seca en el estado congelado, en alto vacío. El producto sólido obtenido, el clorhidrato de la paromomicina, representa un rendimiento del 64 % de la actividad de paromomicina presente originalmente en la mezcla de cultivo

20

25

228611



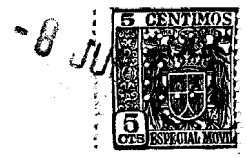
8 JUN 5

de la fermentación acabada.

5 Para convertir el clorhidrato de paromomicina en el correspondiente sulfato se disuelve 1 gramo de clorhidrato de paromomicina en 25 ml. de agua y se añaden a la solución 4,5 ml. de un ácido sulfúrico acuoso molar. El precipitado que se forma se aísla por filtración y la torta del filtro se lava con metanol y se seca. El producto resultante, sulfato de paromomicina en una forma que contiene ion cloruro se disuelve en agua y el pH de la solución se ajusta a 6,0 mezclándolo con una cantidad suficiente de resina cambiadora de anion en la forma hidroxílica. La resina se separa por filtración y el filtrado se concentra por liofilización. El producto gomoso residual se convierte en sólido blanco por trituración con acetona. El producto sólido se aísla por filtración, se lava con acetona y se seca. El producto, sulfato de paromomicina, tiene una rotación óptica  $[\alpha]_D^{25}$  de + 50,50 (1,5 % en agua).

15 Ejemplo 3.

20 Para la preparación de un medio de inoculación fresco para la producción en gran escala de paromomicina según se describe a continuación, 12 l. de un medio nutritivo que tiene la composición siguiente:



228 611

	<u>Tanto por ciento</u>
Glucosa, monohidrato	2,0
Harina de soja	1,0
5 Residuo de estómago de cer- do, extracto salino....	0,5
Cloruro amónico	0,167
Cloruro sódico	0,5
Carbonato cálcico	0,5
10 Agua suficiente para hacer	100,0

se colocan en un fermentador con agitación de 30 litros y el pH se ajusta a 7,5 con solución de hidróxido sódico 6 N. El medio se esteriliza por calefacción a 121°C. durante dos horas. El medio se deja entonces enfriar y se inocula con 20 ml de una suspensión de esporas de Streptomyces rimosus forma paromomycinus en una solución estéril al 0,1 % de heptadecil sulfato sódico, preparada de la misma forma que se describió en el ejemplo 1. La mezcla de cultivo se incuba a 26°C. setenta y una horas, durante cuyo tiempo se suministra aire estéril a través de un inyector a una velocidad de 12 litros por minuto y la mezcla se agita por medio de un agitador a la velocidad de 200 r. p. m.

El cultivo incubado así obtenido se utiliza para inocular el cultivo principal preparado del siguiente modo. 40 litros de medio que tiene la composición:

228611



Tanto por ciento

	Glucosa, monohidrato	2,0
	Harina de soja	1,0
	Residuo de estómago de cerdo, ex- tracto salino.....	0,5
5	Cloruro amónico	0,167
	Cloruro sódico	0,5
	Carbonato cálcico	0,5
	Agua suficiente para hacer	100,0

10 se preparan en un fermentador de acero inoxidable de 120 li-  
tros y el medio se esteriliza por calefacción a 121°C. durante  
una hora. El medio se deja enfriar y se inocula entonces con  
100 ml del medio de inoculación fresco preparado como se descri-  
bió antes. El medio inoculado se incuba a 26°C. veinticuatro ho-  
ras, durante cuyo tiempo se proporciona aire estéril a través de  
15 un inyector a la velocidad de 0,18 m<sup>3</sup> por minuto.

20 1.200 litros de un medio nutritivo que tiene la misma  
composición descrita anteriormente se prepararon y colocaron en  
un fermentador de acero inoxidable de 2.000 litros y el medio se  
esterilizó por calefacción a 121°C. durante una hora. El medio  
estéril se deja enfriar y se inocula con 40 litros de la mezcla  
de cultivo obtenida de la fermentación previa. El medio inoculado  
se incuba veintitres horas a 26°C. durante cuyo tiempo se propor-  
ciona aireación por medio de un inyector a la velocidad de 1,3 m<sup>3</sup>  
por minuto y el medio se agita por medio de un agitador a la ve-  
25 locidad de 84 r.p.m. Durante la incubación, se añaden 3,9 litros  
de una mezcla estéril de manteca de cerdo en bruto y aceites mi-  
nerales que contenga mono- y diglicéridos, según se precise, para

228 611



evitar la excesiva formación de espuma.

Se preparan 4.800 litros de un medio que tiene la misma composición descrita anteriormente y se colocan en un fermentador de acero inoxidable de 8.000 litros. El medio se esteriliza por calefacción a 121°C. durante una hora y se deja enfriar. El medio estéril se inocular con 800 litros de la mezcla de cultivo descrita inmediatamente antes y se incuba a 26°C. durante cuarenta y nueve horas. Durante la incubación, se suministra aire a una velocidad de 3,4 metros cúbicos por minuto y el medio se agita con un agitador a la velocidad de 125 r.p.m.

La mezcla de cultivo (8.200 litros que contienen la paromomicina en una concentración de 0,2 mg/ml) se filtra, la torta del filtro se lava con agua y los filtrados y lavados combinados se ajustan a pH 7,2. El líquido de cultivo, lavados, etc., (9.600 litros) se añaden a una columna de adsorción preparada rellenando una columna de 45 cm. con 184 litros de una resina de ácido carboxílico (Amberlite IRC-50) y neutralizando la resina por percolación con 820 litros de hidróxido sódico 0,6 N. La columna se lava entonces con 1.300 litros aprox. de agua y se eluye con 2.240 litros de ácido clorhídrico 0,5 N y 840 litros de ácido clorhídrico 0,6 N, empleándose los lavados con agua después de cada elución ácida, dando un volumen total de eluato de 3.900 litros.

Los eluatos combinados de varias operaciones como ésta (volumen total 3.200 litros) se ajustan a pH 9,5 con

228 611



5 hidróxido sódico 6 N. Se añade entonces carbón activo (Darco G-60) en una proporción de 1,5 % p/v y tierra de diatomáceas en una proporción de 1.0 % p/v y la mezcla se agita durante media hora. La mezcla se filtra en un filtro prensa y se lava con 3.980 litros de agua. La paromomicina se eluye con 980 litros de ácido sulfúrico 0,05 N y 1.336 litros de ácido sulfúrico 0,1 N. Los eluatos de ácido sulfúrico se combinan y se pasan sobre 50 Kg. de resina cambiadora de anion (Amberlite IR-45) en la forma hidroxílica. El pH del eluato se determina periódicamente y cuando cae por debajo de pH 9, la resina se regenera. El filtrado contiene la base libre paromomicina.

15 Una porción de 646 ml de percolato concentrado, que contiene 1,3-1,5 g de paromomicina se ajusta a pH 7,3 con ácido sulfúrico 1 N y se pasa a través de 5 ml de una resina de ácido carboxílico en la forma amónica. La resina se lava con agua y el lavado que contiene una pequeña cantidad de actividad se desprecia. La paromomicina se eluye con hidróxido amónico 1 N y el eluato se seca a partir del estado congelado. El rendimiento del producto deseado, paromomicina, es 1.125 g.

25 Esta solicitud, que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América, el 20 de Mayo de 1955, bajo el número 509.824, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto Ley sobre Propiedad Indus-

228611



trial.

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

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

5 1º.- Procedimiento para la producción de paromomicina, que comprende la inoculación de un medio nutritivo acuoso estéril que tenga un pH entre 6 y 8,5, y que contenga una fuente de carbono asimilable y una fuente de nitrógeno y sales minerales, con el Streptomyces rimosus forma paromomycinus la incubación del medio inoculado a una temperatura en las proximidades de 20 a 35° C. en condiciones aerobias, la separación del material sólido presente y el aislamiento de la paromomicina del medio incubado.

15 2º.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio nutritivo se agita y se introduce aire estéril en el citado medio durante la incubación.

20 3º.- Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la incubación se lleva a cabo a una temperatura entre 23 y 30º C. du-

228611



rante 3 a 6 dias.

5 4<sup>a</sup>.-Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el medio nutritivo contiene entre 0,1 y 1 % de sales minerales y por lo menos una de las siguientes sustancias: glucosa, d-manosa, d-galactosa, jarabe de maiz, almidón, almidón soluble, líquido de maceración de malta, melazas finales, almidones hidrolizados y glicerina.

10 5<sup>a</sup>.- Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la paromomicina, contenida en el medio incubado después de separar los sólidos, se adsorbe sobre una resina cambiadora de ácido carboxílico y se eluye de ella, la paromomicina contenida en el eluato resultante se adsorbe sobre carbón activo y se eluye de él y la paromomicina contenida en el eluato del carbón se aísla por separación del disolvente o por precipitación como una sal de adición de ácido insoluble.

15 20 25 6<sup>a</sup>.- Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que la paromomicina contenida en el medio incubado después de separar los sólidos se adsorbe y eluye de un cambiador de catión, el pH del eluato se ajusta a 9 - 9,7, la paromomicina contenida en él se adsorbe sobre carbón activo, se lava con agua y se eluye con ácido mineral diluido, la paromomicina contenida en el eluato resultante se adsorbe y eluye de una resina aniónica en la forma hidroxílica, el eluato

228611



resultante se neutraliza, la paromomicina contenida en el eluato neutro se adsorbe en una resina cambiadora de catión y se eluye con hidróxido amónico y la paromomicina se aísla por separación del disolvente.

5 7º.- Procedimiento para la producción de paromomicina

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.

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

Madrid, - 8 JUN. 1956

Alberto de Elzaburu  
Por Poder.

228611

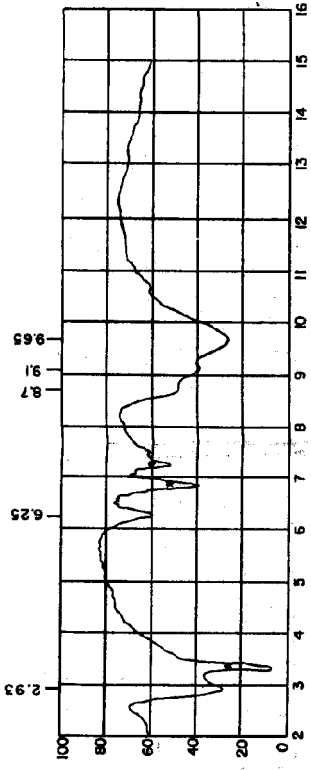


FIG. 1.

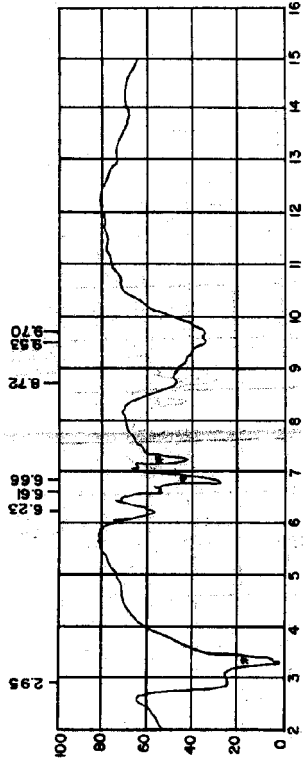


FIG. 2.

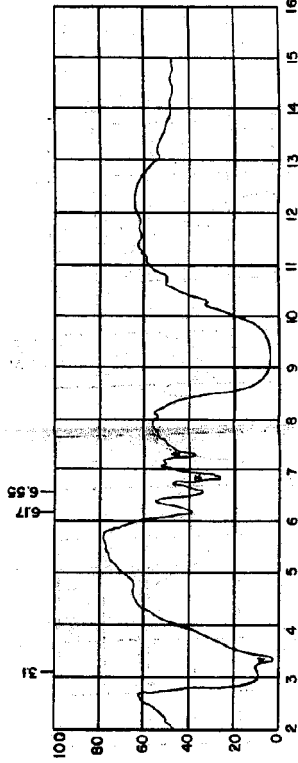


FIG. 3.

*Ant*