



229674

229674

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a  
la solicitud de

una PATENTE de INVENCION por VEINTE AÑOS en ESPAÑA, a fa-  
vor de BRISTOL LABORATORIES, de nacionalidad norteamerica-  
na, residente en SYRACUSE (N.Y. - EE.UU.), por: "UN PROCE-  
DIMIENTO PARA LA OBTENCION DE AYFACTIN".

Prioridad : Solicitud de Patente norteamericana Serial Nº  
527.361, del 9 de Agosto de 1955.

Inventores: Muray A. Kaplan e Irene A. Mydlinski, ambos de  
nacionalidad norteamericana.



229674

La presente invención se refiere a un agente fungicida terapéuticamente útil, denominado Ayfactin, y más particularmente a Ayfactin cristalino y procedimientos para su preparación.

- 5.- Existen muchas infecciones en seres humanos, animales y plantas producidas por organismos comunmente llamados levaduras y hongos, y también llamados Monilia, Saccharomyces y fungi imperfecti. Los resultados de tales infecciones varían desde una indisposición hasta la muerte, e implican grandes pérdidas económicas. Agentes satisfactorios para el control y la cura de tales infecciones no se encuentran disponibles en la actualidad en muchos casos. No se pueden conseguir tales curas por el empleo de drogas de la familia de las sulfanilamidas, o por antibióticos como la penicilina o la tetraciclina; otros agentes resultan también ineficaces o demasiado tóxicos. Por consiguiente, existe una gran necesidad de un eficaz agente fungicida terapéuticamente útil.

- 10.-
- 15.-
- 20.- Ahora se ha encontrado, según la presente invención, un compuesto cristalino denominado Ayfactin, de valor terapéutico, que presenta una potente actividad fungicida, en particular contra Candida albicans, y poca actividad antibacteriana. Las propiedades de Ayfactin se describirán a continuación.

- 25.- Según la presente invención, el procedimiento para la obtención de Ayfactin comprende conducir una fermentación aeróbica sumergida de un Streptomycete a la producción de un miembro seleccionado del grupo que consiste en tetraciclina y clorotetraciclina, separar la tetraciclina o clorotetraciclina tratando todo el caldo con ácido acuoso y a continuación separar la fase acuosa saturada de antibiótico del micelio, y finalmente extraer dicho micelio con un disolvente orgánico capaz de disolver al menos 2.0 g./l. de Ayfactin, separar el extracto líquido y recuperar del mismo
- 30.-
- 35.- Ayfactin cristalino que contiene exclusivamente los elementos carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno en las siguientes cantidades aproximadas:

Carbono	: 64.9%	Nitrógeno:	3.0%
Hidrógeno	: 7.7%	Oxígeno	: 24.4% (por diferencia)



674

40.- sobre una base libre de humedad y de cenizas; con una solubilidad en el agua de aproximadamente pH 7 de menos de 100 mcg./ml., siendo soluble en dimetilformamida, piridina, morfolina y piperidina, exhibiendo los siguientes picos de absorción y transmisión de luz ultravioleta al ser disuelto

45.- en piridina a una concentración de 0.01 mgm./ml.

Absorción

	Máxima <u>mi</u>	Mínima <u>mi</u>
	410	400
	388	376
50.-	366	354
	348	336
	330	

55.- y exhibiendo al ser pelletizado en bromuro potásico máximas de absorción de infrarroja características en las siguientes frecuencias expresadas en micrones: 3.1, 3.5, 5.9, 6.2 (enrase), 6.3, 7.2-7.3, 8.55, 9.4, 10.0-10.1, 11.85 y 13.0-13.2.

60.- El Ayfactin de la presente invención se obtiene por extracción del micelio de tetraciclina y clorotetraciclina produciendo especies de Streptomyces tales como Streptomyces aureofaciens (v.g., especies NRRL-2209, B-1286, B-1287 y B-1288) y Streptomyces viridifaciens (v.g., especie ATCC-11989). Esta extracción de micelio producido durante la fermentación aeróbica sumergida se facilita separando primeramente la tetraciclina y clorotetraciclina por acidulación de todo el caldo (v.g., a pH 2) para disolver estos antibióticos y luego recoger el micelio (mat) por filtración. Alternativamente, se puede precipitar la tetraciclina y clorotetraciclina en aproximadamente el pH neutro o alcalino sobre el mat y recogéndo las. La tetraciclina y clorotetraciclina se separan a continuación del mat disolviéndolas en ácido (v.g., ácido clorhídrico acuoso) a pH 2, recogéndo se el mat gastado por filtración y procediendo a recuperar Ayfactin. El micelio ácido y húmedo se ajusta a

65.-

70.-

75.- aproximadamente pH 9.0-10.0 (v.g., con hidróxido amónico) y cada kilo de micelio húmedo (incluso cualquier medio de filtración, como tierra de diatomeas) se extrae con aproximadamente 0.5 a 2.5 litros de n-butanol. El butanol se recoge por filtración, separando el mat gastado, ajustado a



2226

- 80.- un pH neutro (v.g., a pH 7 con ácido sulfúrico) y concentra-  
do al menos en un múltiplo de veinte por destilación azeo-  
trópica (preferentemente por destilación en vacío, separan-  
do así el agua y manteniendo la temperatura baja). El Ay-  
factin se precipita al enriar y reposar, y se recoge por  
85.- filtración.
- En muchos casos, el Ayfactin se obtiene así en mezcla  
oleosa con aceite de manteca de cerdo u otro agente despu-  
mador empleado durante la fermentación. El lavado con un  
disolvente orgánico no básico, como cetona de isobutilo me-  
90.- tílico, sirve para disolver el aceite de manteca de cerdo,  
pero no el Ayfactin. Después de su recogida por filtración,  
el Ayfactin sólido se lava con agua para separar las sales  
neutras presentes.
- Alternativamente, a la mezcla de aceite de manteca de  
95.- cerdo, sales neutras y Ayfactin se agregan agua y cetona de  
isobutilo metílico, formando tres capas: a) aceite de man-  
teca de cerdo en cetona de isobutilo metílico, b) sales neu-  
tras en agua y c) Ayfactin sólido. Un medio de filtración  
se agrega, y la mezcla se filtra; a continuación la torta  
100.- se extrae con piridina. El Ayfactin saturado de piridina  
se concentra y se seca por destilación, preferentemente en  
vacío, y se precipita luego el Ayfactin sólido por adición  
de un líquido precipitante para el Ayfactin, como tolueno.
- Una ulterior purificación, si se desea, puede efectuar  
105.- se disolviendo este Ayfactin en formamida dimetílica, piri-  
dina, morfolina o piperidina, filtrando para separar las  
impurezas insolubles e inactivas y precipitando el Ayfactin  
purificado por la adición al filtrado de otros disolventes  
orgánicos comunes, v.g., tolueno, hidrocarbomos alifáticos  
110.- (Skellysolves), alcohol isopropílico.
- En otro método de purificación, el Ayfactin así obte-  
nido de n-butanol se lava con ácido acuoso (v.g., ácido acé-  
tico o ácido clorhídrico en pH 1.5) para separar impurezas  
solubles en agua-ácido. Alternativamente, el Ayfactin só-  
115.- lido se lava con formamida, metanol, acetona o mezclas de  
estas, disolviendo así impurezas adicionales pero muy poco  
Ayfactin.
- El Ayfactin cristalino posee las propiedades precita-  
das. El espectro de absorción infrarrojo se muestra en el



120.-

dibujo.

125.-

130.-

135.-

140.-

145.-

150.-

155.-

El Ayfactin exhibe poca o ninguna actividad contra la mayoría de las bacterias grampositivas y gramnegativas, pero resulta altamente eficaz contra los hongos como el dermatofito M. audouini, que aparecen en tinea capitis clínica. El hongo vegetal no patogénico, el dermatofito A. solani, el dermatofito E. floccosum y en particular contra Candida albicans, el organismo de levadura que prolifera en el conducto intestinal en seres humanos durante la terapia antibiótica, especialmente con los antibióticos de espectro ancho cloranfenicol, tetraciclina, clorotetraciclina y óxitetraclina. En esta descripción y en mucha literatura de medicina general, se hace referencia a las levaduras (Saccharomycetes) y fungi imperfecti genéricamente como Monilia, y a las infecciones producidas por ellos como moniliasis o infecciones fungosas. Los demás organismos de interés aquí se indican simplemente como "otros hongos patogénicos". Ha sido comprobado que el Ayfactin es eficaz in vivo contra el Candida albicans patogénico en ratones al ser inyectado intraperitonealmente en una suspensión acuosa neutra en el momento del ataque con una inyección intraperitoneal de clorotetraciclina (para proteger contra la infección bacteriana) y suficiente Candida albicans para matar todos los ratones de control dentro de 48 horas; así pues, la dosis mínima de Ayfactin eficaz para asegurar la supervivencia de al menos la mitad de los ratones durante al menos 12 días ( $CD_{50}$ ) era de 0.04 mgm./kg. Esto demuestra la notable acción fungicida eficaz de Ayfactin en el animal vivo. En un experimento similar en el cual se administró el Ayfactin oralmente, el  $CD_{50}$  era superior a 300 mgm./kg., indicando que el Ayfactin no fué absorbido por la corriente sanguínea a través de la pared del conducto intestinal. El Ayfactin posee un elevado índice terapéutico (relación de tóxico a dosis eficaz), según ha sido demostrado por una determinación de su  $LD_{50}$  (dosis mínima necesaria para matar la mitad de los animales de ensayo) en ratones por inyección intraperitoneal, que era de aproximadamente 0.8 mgm./kg., o sea 20 veces el correspondiente  $CD_{50}$ .

El Ayfactin de la presente invención es útil para combatir muchas enfermedades producidas por infecciones fungo-



- 160.- sas en seres humanos, animales y plantas. Para tal empleo, el Ayfactin se asocia con una cantidad substancial de un vehiculo farmacéuticamente aceptable, que puede ser un material sólido o un líquido. Las composiciones pueden ser en forma de comprimidos, comprimidos efervescentes, polvos,
- 165.- granulados, cápsulas (a la vez cápsulas duras o blandas), o suspensiones en aceites comestibles, u otras formas de dosificación, útiles especialmente para ingestión oral. Los diluyentes líquidos se emplean en condición estéril para uso parenteral, es decir, para inyección. Tal formulación puede ser una solución estéril (v.g., 1-125 mgm./ml. de acetamida dimetífica) o una suspensión en agua, o un aceite inyectable, v.g., 0.5% en agua que contiene 0.5% de celulosa carboximetífica. Las composiciones pueden adquirir la forma del material activo, Ayfactin, mezclado con diluyentes sólidos y/o adyutores para comprimidos, como almidón de maíz, lactosa, talco, ácido esteárico, estearato magnésico, gomas y similares. Cualquiera de los materiales empleados en la fabricación de cápsulas o comprimidos en la práctica farmacéutica puede ser utilizado cuando no exista incompatibilidad con el Ayfactin y puedan formarse comprimidos con dicho material con o sin adyutores. Alternativamente se puede colocar el Ayfactin en la cápsula o material reabsorbible usual como una cápsula de gelatina y ser administrado en tal forma, v.g., 1 a 500 y preferentemente 10-
- 170.- 20 mgms. por cápsula o comprimido.
- 175.-
- 180.-
- 185.-

El Ayfactin de la presente invención adquiere especial valor al ser administrado por aplicación tópica, v.g., lociones, unguentos, en infecciones fungosas de la piel de seres humanos o animales, o por pulverización o mezcla con fertilizantes en el caso de plantas. En virtud de su baja absorción sistemática y baja toxicidad y elevada actividad contra Candida albicans, el Ayfactin es también particularmente útil en el tratamiento de infecciones causadas por este organismo, u otros hongos, los cuales a menudo sobrevienen tras el tratamiento con antibióticos, según se informa en J. Amer. Med. Assoc. 152:206, 1953, o A.M.A. Arch. Int. Med. 95:74-82 y 112-117, 1955, o The Practitioner 174:29-38, 1955. Tal proliferación de levaduras, y en particular Candida albicans es común en el conducto intestinal después

190.-

195.-



200.- de la terapia antibiótica, y a veces ptovoca infecciones sistemáticas fatales.

Una forma especialmente ventajosa de Ayfactin para uso clínico es una combinación con uno o varios de los antibióticos de espectro ancho, que resultan tan útiles en el tratamiento de infecciones bacterianas, pero que a veces presentan la desventaja de producir infecciones fungosas, en especial en el conducto intestinal tras la convencional administración oral. A este fin, una dosis normal de tetraciclina, clorotetraciclina, oxitetraciclina o cloroanfencol (v.g., 50-250 mgms. por cápsula) se agrega a una unidad de dosis de Ayfactin según se describió anteriormente (v.g. 1-500 mgms., y preferentemente 5-50 mgms. por cápsula). Una realización específica es una cápsula que contiene 250 mgms. de tetraciclina y 20 mgms. de Ayfactin; tal producto ofrece una terapia antibacteriana de espectro ancho y profilaxis fungicida eficaz. La falta de absorción de Ayfactin por la pared del conducto intestinal sirve para aumentar la eficacia de su acción fungicida por administración oral de este producto y permite que el Ayfactin ejerza su efecto de primera intención en el lumen del intestino. La dosis para adultos normal de este producto es de 4 a 8 cápsulas al día. Además del empleo de tal combinación en una cápsula para impedir moniliasis o pruritis ani, el empleo en trociscos es recomendable para impedir la vaharera, y el empleo en supositorios se recomienda para impedir la vaginitis o la vulvitis, y el empleo en ungüentos y lociones, para impedir correspondientes síntomas de crecimiento de hongos.

205.-

210.-

215.-

220.-

225.-

230.-

235.-

El Ayfactin se distingue fácilmente por su espectro de absorción ultravioleta y falta de actividad antibacteriana de todos los demás agentes fungicidas producidos por fermentación, a excepción de miembros del grupo trichomycin-asco sin-candididin-candidin (véase Oroschnik et al, Science, 121, 147-149, 1955, y Utahara et al, J. Antibiotics Japan, Ser. A, 7(4), 120-124, 1954, y Vinig et al, Antibiotics Annual 1954-1955, págs. 980-987). El Ayfactin se distingue del candidin por la solubilidad de este último en el agua (Vinig, Ibid., p. 982) y por cromatografía de tiras de papel, y por la actividad mucho mayor de este último contra Sporotrichum schenkii (véase Taber et al, Antibiotics and Chemo-



- 240.- therapy 4(4), 455-461, 1954). El Ayfactin se distingue de Candicidin por el más elevado contenido de nitrógeno de este último (encontrado sobre una base libre de humedad y de cenizas: C, 64.7; H, 8.34; N, 4.24; O, 22.72 por diferencia; así el Ayfactin parece contener una mitad adicional  $C_7H_7-8O_2$ )
- 245.- El Ayfactin, además, es mucho menos soluble en el agua que que el Candicidin, y es por lo menos varias veces más potente por ensayo de dilución en tubo contra Candida albicans. El Ayfactin se distingue del ascosin por la solubilidad mucho mayor en el agua del último (véase Hickey et al, Antibiotics and Chemotherapy, 2(9), 472-483, 1952).
- 250.- El Ayfactin se distingue del trichomycin por la ausencia de nitrógeno en este último y por la elevada solubilidad en el agua de este último (véase Hosoya et al, J. Antibiotics Japan 5, 564-566, 1955, y 7, 5-8, 1955). El Ayfactin se distingue además del trichomycin, ascosin, Candicidin y candidin por diferencias en sus respectivos espectros de absorción infrarroja.
- 255.- El procedimiento para un ensayo de dilución útil de Ayfactin es como sigue. Ayfactin sólido se disuelve en un mgm./ml. en metanol que contiene el 10% de ácido clorhídrico y se agrega un tampón de pH 8 acuoso para dar un pH final de 7.3-7.4. La solución se diluye a una concentración de 200 mcg./ml. Se disponen a continuación 10 tubos de ensayo, cada uno conteniendo 1 cc. de caldo micofil (caldo Sabouraud modificado; v.g., de los Baltimore Biological Laboratories) inoculado con una dilución al 1:10,000 de un cultivo de levadura (v.g., Saccharomyces #32). Un cc. de la solución de Ayfactin se mezcla ahora en el primer tubo de ensayo. Un cc. del primer tubo se transfiere luego al segundo tubo, y el mismo procedimiento se repite por toda la línea. Los tubos, a continuación, se incuban y se observan para el crecimiento o la inhibición de la manera convencional. Se encuentra que el Ayfactin posee una concentración inhibitoria mínima de menos de 0.4 mcg./ml. en este caso, y menos de 1.0 mcg./ml. contra Candida albicans.
- 260.-
- 265.-
- 270.-
- 275.- Un caldo comercial típico que contiene aproximadamente 2,500 mcg./ml. de tetraciclina contiene, para cada 10 grs. de tetraciclina, aproximadamente 1 gr. de Ayfactin ensayando 1.0 mcg./ml. en el arriba indicado ensayo de dilución en tubo.

228674



280.-

Se complementa la ilustración de esta invención por los siguientes ejemplos, dados a título no limitativo.

EJEMPLO 1

285.-

Un kg. de micelio de una fermentación aeróbica sumergida de Streptomyces aureofaciens se obtuvo por acidulación del caldo íntegro a pH 2 y recogió por filtración. El micelio se extrajo con 3 litros de n-butanol a pH 9.5, y el butanol se separó y extrajo con 1.5 litros de agua a pH 1.5, descartándose el licor de lavado acuoso. El n-butanol se concentró por destilación en vacío a 200 ml., precipitando 6.2 gr. de Ayfactin sólido que se recogió por filtración, se lavó con un hidrocarburo alifático (Skellysolve C), encontrándose que inhibe levadura en el ensayo de dilución en tubo a 1.6 mcg./ml.

290.-

EJEMPLO 2

295.-

Dieciséis kgs. de micelio de una fermentación aeróbica sumergida de S. aureofaciens se obtuvo por acidulación del caldo íntegro a aproximadamente pH 2 y recogió por filtración; este micelio se extrajo con 10 galones de acetona, y el micelio (mat) se separó por filtración y se descartó. Se agregó ácido clorhídrico para ajustar el pH de la acetona a 6.0, precipitando 140 grs. de Ayfactin crudo, que fué recogido por filtración, lavado con acetona, secado en vacío sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, encontrándolo activo contra levadura en el ensayo de dilución en tubo a 6.3 mcg./ml. El Ayfactin crudo se lavó por suspensión en 2.8 litros de agua a pH 2.0, y el Ayfactin purificado y no disuelto se recogió por filtración, se lavó con agua, se secó y se encontró que pesaba 9.0 grs., siendo activo contra la levadura en el ensayo de dilución en tubo a 1.6 mcg./ml. Lavando por suspensión una porción de este Ayfactin con una mezcla de volúmenes iguales de metanol y formamida caliente, se separaron las impurezas, que fueron recuperadas por precipitación con éter, encontrándose por ensayo que contenían muy poco Ayfactin; aproximadamente 7 grs. de Ayfactin purificado quedó sin disolver.

300.-

305.-

310.-

315.-

EJEMPLO 3

Ocho kgs. de micelio de una fermentación aeróbica sumergida de S. aureofaciens se obtuvo por acidulación del caldo íntegro a aproximadamente pH 2, y se recogió por filtración; este micelio se extrajo con 20 litros de n-butanol a pH 9.5



229674

320.- y se filtró. El butanol se extrajo con un volumen igual de agua a pH 9.5. El butanol se separó, concentró por destilación en vacío y vertió dentro de 5 volúmenes de alcanes (Skellysolve C) para precipitar Ayfactin, 8.6 grs. activos en 0.5 mcg./ml..

325.- EJEMPLO 4

Ayfactin obtenido según el Ejemplo 2 (6.9 gr.) se lavó por suspensión durante 15 minutos con una mezcla de 600 ml. de agua y 600 ml. de n-butanol ajustados a pH 10.0 con hidróxido amónico. La capa de butanol se separó y se concentró por destilación en vacío a un volumen de 30 ml.; enfriada, 1.8 grs. de Ayfactin cristalino se precipitó y se recogió por filtración, encontrándose que inhibe levadura en el ensayo de dilución en tubo a 0.2-0.4 mcg./ml.

330.- El Ayfactin cristalino exhibió las siguientes propiedades: Anal. encd: C, 63.7; H, 7.54; N, 2.96; residuo, 1.78; H<sub>2</sub>O, 8.26. Encontrado sobre base libre de humedad, libre de cenizas: C, 64.85; H, 7.68; N, 3.01. Esto indica una posible forma empírica de C<sub>25</sub>H<sub>35-36</sub>NO<sub>7</sub>. El Ayfactin es casi insoluble en el agua, altamente soluble en dimetilformamida, piridina, morfolina y piperidina.

340.- EJEMPLO 5

345.- Descientos grs. de micelio, obtenidos de una fermentación aeróbica sumergida de S. aureofaciens por acidulación del caldo íntegro a pH 2, y recogidos por filtración, se extrajeron con 1 litro de n-butanol. El butanol se separó y concentró por destilación en vacío a 50 ml. De esta solución, se agregaron 45 ml. a 500 ml. de alcanes (Skellysolve C), precipitando 500 mgm. de Ayfactin sólido que se recogió por filtración, encontrándose que inhibe el crecimiento de Candida albicans por ensayo de placa.

350.- EJEMPLO 6

355.- Tierra de diatomeas se agregó a 10 galones de caldo obtenido por fermentación aeróbica sumergida de S. viridifaciens; después de la filtración el tapón de micelio se lavó con agua y luego se extrajo con 4 litros de acetona ajustada a pH 8.0 por la adición de hidróxido amónico. La solución de acetona húmeda así obtenida se concentró por destilación en vacío con la adición de agua (rebajada en agua) para dejar 800 ml. de residuo acuoso del cual se precipitó 5.4 gr. de



360.- Ayfactin sólido con actividad fungicida por ensayo de dilución en tubo a 1.8-3.7 mcg./ml.

365.- El agua madre acuosa se concentró a 150 ml., ajustada a pH 1.5 con ácido clorhídrico, y se extrajo con 150 ml. de n-butanol. El butanol se separó, concentró y secó por destilación en vacío a un volumen de 50 ml., y se agregó a 500 ml. de alcanes (Skellysolve C), precipitando 3.5 gr. de Ayfactin sólido con actividad fungicida por ensayo de dilución en tubo a 1.8-3.7 mcg./ml.

370.- El tapón de micelio original, después de extracción alcalina con acetona, se extrajo con 4 litros de acetona ajustada a pH 2.0 por la adición de ácido clorhídrico. El extracto de acetona acídica se neutralizó a pH 7.0 con hidróxido amónico, precipitando 27 gr. de sólido con poca actividad fungicida. El agua madre de acetona se rebajó en aproximadamente en 200 ml. de agua, precipitando aproximadamente 2.0 grs. de Ayfactin oleoso con actividad antifúngica

375.- por ensayo de dilución en tubo a 0.39 mcg./ml. La liofilización del restante filtrado acuoso dió 8.0 gr. de sólidos, que no mostró actividad fungicida a 10 mcg./ml.

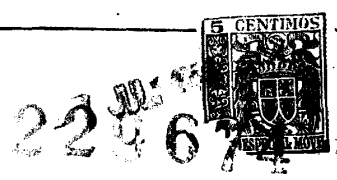
380.- EJEMPLO 7

A.- Ayfactin con actividad fungicida a 1.5 mcg./ml. por el ensayo de dilución en tubo se extrajo con acetona, dejando residuo sólido e insoluble activo a 0.39 mcg./ml. y también un sólido obtenido por evaporación de la acetona, inactivo a 50 mcg./ml.

385.- B.- Ayfactin (200 mgm.) activo en 3.7 mcg./ml. se extrajo con 20 ml. de metanol, dejando 60 mgm. de Ayfactin sólido e insoluble activo en 3.1 mcg./ml. y también 2 mgm. de sólido, obtenido por agregación del extracto de metanol a 200 ml. de éter, inactivo en 10 mcg./ml.

390.- C.- Ayfactin (200 mgm.) activo en 3.7 mcg./ml. se extrajo con 20 ml. de n-butanol, dejando 70 mgm. de Ayfactin sólido e insoluble activo en 6.3 mcg./ml.; la adición del extracto de butanol a 10 volúmenes de alcanes (Skellysolve C) no dió precipitado.

395.- D.- Ayfactin (500 mgm.) activo en 3.7 mcg./ml. se extrajo con 10 ml. de ácido clorhídrico a pH 1.0 durante 10 minutos, dejando 400 mgm. de Ayfactin sólido e insoluble activo en 0.78 mcg./ml. El extracto ácido se liofilizó pa-



400.- ra producir 80 mgm. de sólidos inactivos a 50 mcg./ml.

EJEMPLO 3

405.- Un gr. de Ayfactin activo en 0.4 mcg./ml. se suspendió en una mezcla de 100 ml. de agua y 100 ml de n-butanol. La mezcla se ajustó a pH 1.5 con ácido clorhídrico. Después de una agitación durante 10 minutos, se recuperó de la interfase 90 mgm. de sólidos parduzcos activos a 4 mcg./ml. Después de la separación de las dos fases, la capa acuosa se ajustó a pH 7.0, precipitando 80 mgm. de sólidos inactivos a 60 mcg./ml. La liofilización del filtrado acuoso dió 170 mgm. inactivos a 20 mcg./ml.

410.- La fase de butanol se extrajo con un volumen igual de agua, ajustando el pH a 7.0 con hidróxido amónico. La capa acuosa se separó y se liofilizó para producir 125 mgm. de Ayfactin sólido activo en 1.2 mcg./ml. El butanol se concentró y secó por destilación a un volumen de 50 ml., y se agregó a 500 ml. de lacanes (Skellysolve C), precipitando 200 mgm. de Ayfactin sólido activo a 4 mcg./ml.

EJEMPLO 9

420.- Un gr. de Ayfactin activo a 3.7 mcg./ml. se suspendió en una mezcla de 100 ml. de agua y 100 ml. de cetona de iso butilo metílico. La mezcla se ajustó a pH 2.0 con ácido clorhídrico. Después de una agitación, se recuperó de la interfase 150 mgm. de Ayfactin sólido activo a 0.45 mcg./ml. Todos los sólidos recuperados de las fases líquidas (en total 415 mgm.) eran inactivos por ensayo de dilución en tubo a concentraciones tan elevadas como 50 mcg./ml.

EJEMPLO 10

425.- El Ayfactin no se sublimó en un elevado vacío a temperaturas de hasta 200°C., ni tampoco eran solubles cantidades apreciables en grandes excesos de cloroformo o de acetato etílico. El Ayfactin resultó completamente soluble en piridina y se precipitó de ésta por éter, acetona o metanol. El Ayfactin era completamente soluble en piperidina, y se precipitó por la adición de éter.

EJEMPLO 11

430.- Seis grs. de Ayfactin activo a 3.2 mcg./ml. se extrajeron con 100 ml. de hidróxido amónico a pH 10.5 durante 15 minutos para dar una solución oleosa negra. El aceite se separó por extracción con alcanes (Skellysolve C); la fa-

435.-

229674

- 13 -

229674



440.- se acuosa se ajustó a pH 1.5 con ácido clorhídrico, precipitando 1 gr. de producto sólido negro activo a 1.6 mcg./ml.

EJEMPLO 12

445.- El examen de soluciones de 500 mcg./ml. de muestras comerciales de tetraciclina y clorotetraciclina en el ensayo de dilución en tubo no mostraron actividad fungicida.

N O T A

450.- En resumen: la Patente de Invención cuyo registro se solicita recaerá sobre las reivindicaciones siguientes:

455.- 1) Un procedimiento para la obtención de Ayfactin, caracterizado porque comprende conducir una fermentación aeróbica sumergida de un Streptomyces capaz de producir tetraciclina y/o clorotetraciclina, separar la tetraciclina y/o la clorotetraciclina del caldo de fermentación por medios convencionales y subsiguientemente recuperar Ayfactin del micelio, preferentemente por extracción con un disolvente orgánico capaz de disolver al menos 2.0 gr./l. de Ayfactin, y si se desea purificación ulterior del Ayfactin.

460.- 2) Un procedimiento, según la Reivindicación 1), caracterizado porque comprende tratar el caldo de fermentación con ácido acuoso, separar la fase saturada de antibiótico acuoso del micelio y extraer dicho micelio con un disolvente orgánico capaz de disolver al menos 2.0 gr./l. de Ayfactin, separando el extracto líquido y recuperar del mismo Ayfactin cristalino.

470.- 3) Un procedimiento, según la Reivindicación 1), caracterizado porque comprende tratar el caldo de fermentación con álcali, precipitando la tetraciclina y/o la clorotetraciclina, separando la fase acuosa del micelio y sólidos precipitados, separando subsiguientemente la tetraciclina y/o la clorotetraciclina por tratamiento con un ácido acuoso, separando el micelio de la fase acuosa, ajustando el micelio húmedo a un pH de aproximadamente 9.0-10.0, y finalmente extraer dicho micelio con un disolvente orgánico capaz de disolver al menos 2.0 gr./l. de Ayfactin.

475.- 4) Un procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende extraer el micelio con un disolvente orgánico seleccionado del grupo que con-



7 JUL 1956  
229674

480.-

siste en n-butanol, dimetilformamida, piridina, piperidina y morfolina.

5) Un procedimiento, según las reivindicaciones 1), 2) y 4), caracterizado porque comprende extraer el micelio a un pH de aproximadamente 9.0-10.0.

485.-

6) Se reivindica por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE AYFACTIN".

Todo conforme queda descrito en la presente Memoria, que consta de catorce páginas escritas a máquina.

Madrid, a 7 de Julio de 1956

ALFONSO UNGRIA