

AÑO 1.957

Expediente núm. _____



237387

REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

237387

PATENTE DE INVENCIÓN

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de

una PATENTE DE INVENCIÓN por VEINTE años, en España

a favor de

HAMAQ UMEZAWA, MASAHIRO UEDA y KENJI MAEDA ; de nacionalidad

japonesa domiciliado en TOKIO

calle de 23 Kita-4-Chome, Nerima-ku núm. _____

355 Seijomachi, Setagaya-ku

258-1 Gotanda, Shinagawa-ku

por:

PROCESO PARA LA PRODUCCION DE UN NUEVO ANTIBIOTICO, LA KANAMICINA

Nº 3066

Agente Sr. UNGRIA

237387

3 1 AGO.



237387

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a

la solicitud de

una PATENTE DE INVENCION por VEINTE AÑOS en ESPAÑA, a favor de HAMAO UMEZAWA, MASAHIRO UEDA y KENJI MAEDA, domiciliados en 23Kita-4-Chome, Nerima-ku - TOKIO (Japón); 355 Seijomachi, Setagaya-ku - TOKIO; y 258-1 Gotanda, Shinagawa-ku - TOKIO, respectivamente,

p o r

" UN PROCESO PARA LA PRODUCCION DE UN NUEVO ANTIBIOTICO, LA

KANAMICINA "

INVENTORES: Los solicitantes, de nacionalidad japonesa.

PRIORIDAD: Sol. Pat. japonesa SN 22911 del 5-9-56
" " " SN 22912 " "
" " " SN 8327 " 5-4-57
" " " SN 8328 " "

—ooOoo—

23 73 87

31



Este invento se relaciona con la preparación de un nuevo antibiótico, Mas particularmente se refiere a procesos para su producción por medio de fermentación y a métodos empleados para su recuperación y purificación, en su forma simple o en forma de sus sales ácidas de adición.

5.-

El nuevo antibiótico producido de acuerdo con este invento se llama kanamicina y es eficaz para inhibir el desarrollo de bacterias grampositivas, gramnegativas y ácido-resistentes, tales como Mycobacterium tuberculosis.

10.-

Conforme a este invento la kanamicina se prepara por cultivo de una cepa de Streptomyces kanamyceticus nov. spec. en una solución acuosa de — hidratos de carbono que contiene un nutriente nitrogenado en condiciones de aerobiosis hasta que se imparte a dicha solución una actividad antibacteriana considerable, después de lo cual se recupera el antibiótico y si es necesario se purifica.

15.-

El microorganismo que produce el antibiótico del presente invento fue aislado de una muestra de suelos recogida en la Prefectura Nagano, Japón, y es una nueva especie designada Streptomyces kanamyceticus, del género — Streptomyces.

20.-

Streptomyces kanamyceticus tiene las características siguientes:

1. Observación microscópica: El micelio del substrato es como de 1μ de ancho y está ramificado. El micelio aéreo se desarrolla a partir de ramas micélicas sumergidas y lleva en su extremo el esporóforo. Generalmente no se observan espirales ni verticilos.

25.-

2. Glicerina-Gelosa de Czapek (27° C.): Se desarrollan colonias incoloras al principio, amarillo limón más tarde. Del lado opuesto presentan color de heno. El micelio aéreo es blanco tendiente a amarillo, en ocasiones con un tinte verdoso o rosa pálido. Algunas veces produce un pigmento soluble de color marrón pálido.

30.-

3. Gelosa asparagina glucosa de Krainsky (27° C.): Se desarrollan colonias incoloras o con tendencia al amarillo y del lado opuesto la coloración es blanca, blanco rosado pálido, amarilla o de color de heno. El micelio



23 73 87^{31A}

aéreo es escaso, generalmente se desarrolla a partir del centro de la colonia y su color es blanco, blanco rosado pálido, amarillo verdoso pálido o amarillo. Generalmente no se encuentra pigmento soluble.

5.- 4. Gelosa malato de calcio (27° C.): Igual que con la gelosa asparagina glucosa de Krainsky, pero el desarrollo es menor. A veces no se produce — desarrollo.

5. Placa de almidón (27° C.): Casi igual que con la gelosa asparagina glucosa de Krainsky, pero el desarrollo es limitado y no hay micelio aéreo. El almidón se hidroliza.

10.- 6. Fragmentos de patata (27° C.): La superficie de desarrollo aparece a rrugada, granulosa, de color marrón amarillento débil que varía hasta el amarillo. El micelio aéreo está ausente o es escaso y de color blanco. No hay pigmento soluble. El fragmento que está abajo de las colonias es oscuro en algunas ocasiones.

15.- 7. Fragmentos de zanahoria (27° C.): Generalmente hay escaso desarrollo. Cuando éste se produce es casi igual que en los fragmentos de patata.

20.- 8. Agua peptonada con nitrato de sodio al 0,2% (27° C.): El desarrollo en la superficie es anular, incoloro o amarillo blanquecino, con formaciones blancas en el fondo. En ocasiones aparece un micelio aéreo blanco. A partir del nitrato se forma nitrito. No hay pigmento soluble.

9. Gelosa con extracto de carne y peptona (37° C.): Se desarrollan colonias de aspecto rugoso, de color blanco o amarillo. No hay micelio aéreo ni pigmento soluble.

25.- 10. Gelosa sangre (37° C.): Se desarrollan colonias rugosas, de color marrón rojizo con tinte grisáceo. No hay micelio aéreo ni pigmento soluble.

11. Leche (37° C.): Casi no hay cambio y por lo general no se observa desarrollo en la superficie.

12. Suero coagulado de Loeffler (37° C.): El desarrollo es limitado, de color blanco a amarillo limón. No hay micelio aéreo ni pigmento soluble.

23 73 873 1 AGO.



13. Medio de Inuevo (37° C.): Se desarrollan colonias rugosas. No hay micelio aéreo.
14. Gelatina: Licuación; no hay pigmento soluble.
15. Utilización de fuentes de carbono: Se utilizaron las siguientes fuentes de carbono en medio de sales básicas de Czapek: arabinosa, dextrina, fructosa, galactosa, glucosa, glicerina, maltosa, manitol, manosa, rafinosa, almidón, sacarosa, succinato. Fuentes de carbono no utilizadas: inositol, inulina, lactosa, ramosa, sorbosa, xilosa, acetato. Fuentes de carbono mal utilizadas: esculina, salicina, sorbitol, citrato.
- 10.- 16. Producción del antibiótico, kanamicina..
- Las características señaladas son suficientes para distinguir el microorganismo de las especies hasta ahora descritas de estreptomicetáceas y para demostrar que la cepa K2-J pertenece a una nueva especie. Es natural esperar que haya variaciones o mutaciones del microorganismo antes descrito, puesto que ésa es una propiedad común de los microorganismos de las estreptomicetáceas.
- 15.- Pueden resumirse las características de esta especie en la forma siguiente: Las colonias que se desarrollan son incoloras pero pueden ser hasta amarillas con un matiz rosáceo o verdoso o sin él. El lado opuesto de la colonia en gelosa sintética es incoloro, blanco, blanco rosado pálido, amarillo blanquecino o de color de heno. El micelio aéreo es blanco que puede llegar a amarillo y no se forman espirales ni verticilos. En algunas ocasiones se produce, en un medio sintético, un pigmento soluble marrón pálido. La gelatina se licúa y el almidón se hidroliza.
- 20.-
- 25.- Streptomyces kanamyceticus comprende la típica cepa No. K2-J descrita anteriormente y todas las variantes o mutaciones naturales y artificiales que de ella derivan.
- Producción de kanamicina por fermentación
- Streptomyces kanamyceticus (K2-J) se cultivó por primera vez en matraces de agitación en los medios siguientes: (a) extracto de carne, 0,75%; pepto-
- 30.-

31 AGO. 1956



23 73 87

- na, 0,75%; NaCl, 0,3%; con 1,0% de almidón, dextrina, maltosa, glucosa, -- lactosa, sacarosa o glicerina; (b) harina de frijol soja, 2,0%; KCl, 0,05%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,05%; NaCl, 0,5%; $NaNO_3$, 0,2%; con 1,0% de almidón, dextrina, maltosa, glucosa, lactosa, sacarosa o glicerina. El pH inicial de todos los
- 5.- medios se ajustó a 7,0. Después de 24 a 48 horas de agitación, en algunos casos el pH disminuyó hasta 6,0-6,8, pero a partir de 72-120 horas, el pH se elevó y llegó a ser de 7,5-8,6.
- En el medio antes señalado (b) que contiene 2,0% de almidón, después de tres días de agitación del cultivo el pH se elevó a 8,2 y se produjo 250
- 10.- mcg./ml. de kanamicina. En el cultivo en tanque, con el medio que contenía 2,0% de almidón, 0,5% de glucosa, 1,2% de harina de frijol soja, 0,05% de KCl, 0,05% de $MgSO_4$, 0,1% de K_2PO_4 , 0,3% de NaCl, 0,3% de peptona y 0,3% de $CaCO_3$, el pH disminuyó ligeramente al principio (6,6) y luego aumentó y llegó a ser de 8,0 después de 43 horas; después de 78 horas se produjeron
- 15.- 273 mcg.ml. de kanamicina.
- Para la producción de kanamicina, los materiales que pueden emplearse inicialmente son los caldos de fermentación como los anteriormente descritos o productos crudos obtenidos por el tratamiento de los caldos de fermentación.
- 20.- En términos generales, la kanamicina se produce de preferencia en medios que contienen fuentes de nitrógeno orgánico, tales como la harina de frijol soja, la harina de semilla de algodón, la harina de cacahete, el extracto de carne, la peptona, licor de maíz macerado o extracto de levadura de cerveza. Entre las fuentes de carbono que pueden emplearse están el almidón, --
- 25.- la dextrina, la maltosa, la glucosa, la sacarosa, la lactosa y la glicerina. Se encontró que la asociación de almidón y harina de frijol soja era -- una de las mejores y es la que se prefiere; la adición de licor de maíz macerado, peptona, extracto de levadura o nitrato, a esa asociación, promueve la producción de kanamicina. La adición de sulfato de magnesio, cloruro de
- 30.- manganeso o sulfato de zinc también la fomenta; se obtuvo el máximo rendi-



23 73 87 ³ AGO.

5.- niento cuando el pH del caldo de cultivo se hizo débilmente alcalino. La temperatura de los cultivos puede variar dentro de márgenes muy amplios, - 25°-35° C., en los cuales puede desarrollarse el microorganismo, pero es preferible una temperatura de 27-32° C. Generalmente continúa desarrollándose el cultivo hasta que se acumula una cantidad importante de kanamicina en el medio. En el cultivo sumergido aerado, profundo, requiere por regla general de dos a siete días, y la producción máxima generalmente se obtiene entre los 3 y los 5 días. La kanamicina se encuentra en la porción líquida del caldo de fermentación.

10.-

Métodos experimentales

Cultivo con agitación: En un frasco de 500 ml. de capacidad, esterilizado, se colocaron 150 ml. del medio. Se hizo la inoculación con los micelios y esporas del microorganismo productor de kanamicina en el medio de gelosa o con el micelio obtenido de un cultivo de 48 horas con agitación y luego se agitó el cultivo en la máquina de agitación recíproca (120 carreras por minuto y 8 cm. de amplitud) a 27-29°.

15.-

Cultivo en tanques: Se utilizó un fermentador de acero inoxidable de 400 l. de capacidad. Dentro de él se colocaron 180 ó 200 l. del medio y se esterilizó éste a 120° C durante 20 a 30 minutos. El índice de aeración fue de 200 l. de aire por minuto y el agitador se movió a 200 r.p.m. (revoluciones por minuto). Para impedir la formación de espuma se utilizó alicón, -- aceite de frijol soja o parafina líquida.

20.-

Extracción y purificación de la Kanamicina

25.-

En un método de extracción que se prefiere, la kanamicina presente en la fase líquida del caldo de fermentación puede extraerse con butanol en presencia de un vehículo como el ácido láurico o el ácido esteárico. Se transfiere el antibiótico dentro del butanol a un pH de 6-8, y de la fase de solvente a la fase acuosa a un pH de 2-4. En ausencia del vehículo, la kanamicina no se transfiere significativamente dentro de butanol, acetato de etilo, acetato de butilo, benceno, etc. Así, la extracción con estos solventes pue-

30.-

23 73 87



de utilizarse para la extracción de otras sustancias coexistentes y de impurezas.

5.- En otro método de recuperación de la kanamicina a partir de un caldo de fermentación, el caldo se concentra por evaporación al vacío o por desecación en rociado. La kanamicina puede extraerse del residuo con agua, metanol, etanol o acetona; la acidificación con HCl mejora la disolución. El antibiótico puede ser adsorbido por carbono activado a partir de una solución acuosa alcalina o neutra y subsiguientemente desorbido en seco o en alcohol acuoso o acetona acuosa, con un pH ajustado a 2,0 con ácido clorhídrico. La kanamicina también es adsorbida a un pH como de 6,0 a 9,0 por resinas de intercambio de cationes, de preferencia del tipo del ácido carboxílico, como un compuesto copolimérico del ácido metacrílico y del divinilbenceno. Cuando el antibiótico es adsorbido en una resina de intercambio de cationes, puede ser levigado con ácido clorhídrico acuoso, ácido sulfúrico acuoso o solventes orgánicos acuosos (por ejemplo, 1N HCl - 10% acetona - acuosa). También puede levigarse la kanamicina mediante el hidróxido de amonio.

10.- El levigado así obtenido puede concentrarse por medio de la evaporación al vacío o por desecación-congelación, y subsiguientemente se precipita la kanamicina de la solución concentrada agregando un solvente en el cual la kanamicina o su sal sea fundamentalmente insoluble.

15.- En otro método más de purificación puede uno emplear la cromatografía - columnar con alúmina o carbono activo. Por ejemplo, una solución acuosa de kanamicina (pH 8,0) obtenida por la repetición del proceso de resina de intercambio de cationes, puede pasarse a través de una columna que contenga carbono activo y, después de lavar la columna con agua destilada, se practica la levigación con 0,5 NpH SO₄. La fracción más activa del levigado se añade al metanol y se precipita sulfato de kanamicina cristalino.

Naturaleza de la Kanamicina

20.- La kanamicina se obtiene como sulfato o clorhidrato y la base libre de

237387



kanamicina se obtiene de estas sales, por ejemplo, extrayendo el ion sulfúrico por medio de barita de la solución de sulfato de kanamicina.

5.- El clorhidrato de kanamicina es plenamente soluble en agua, metanol, ligeramente soluble en etanol e insoluble en acetona, acetato de etilo, acetato de butilo, benceno, éter o éter de petróleo.

El sulfato de kanamicina es soluble en agua e insoluble en metanol, etanol, acetona, acetato de etilo y benceno.

La base de kanamicina es soluble en agua y considerablemente insoluble en n-butanol, acetato de etilo, acetato de butilo, éter, cloroformo y benceno.

10.- Cuando se disuelve la kanamicina en piridina y se somete a prueba, da positiva la reacción de la ninhidrina. Las reacciones de Tollens, Sakaguchi, Fehling, Molisch y de la glucosamina (Elson-Morgan) son negativas; aun después de la hidrólisis, la reacción de la glucosamina es negativa. Cuando se practicó la cromatografía con tira de papel (con papel filtro Toyo No. 50 y ácido p-tolueno-sulfónico-butanol al 0,2%, saturado con agua), el valor 15.- R_f de la kanamicina fue de 0,21-0,26.

La kanamicina presenta actividad óptica. Cuando se ensayó una solución acuosa al 1,0% de clorhidrato de kanamicina purificado, α_D^{17} fue $+103^\circ$ y cuando se ensayó una solución acuosa al 1,0% de base libre de kanamicina, 20.- α_D^{17} fue $+112^\circ$, y cuando se ensayó una solución acuosa de sulfato de kanamicina cristalino al 1,0%, α_D^{23} $+121^\circ$. Datos analíticos correspondientes a la base libre: Calculados para $C_{14}H_{29}N_3O_{11}$: C, 40,48; H, 7,04; N, 10,12; O, 42,37; encontrados: C, 43,17; H, 6,95; N, 9,82. Datos analíticos para el clorhidrato: Calculados para $C_{14}H_{29}N_3O_{11} \cdot 3HCl$: C, 32,04; 25.- H, 6,15; N, 8,01; Cl, 20,27; O, 33,54; encontrados: C, 31,31; H, 6,07; N, 8,21; Cl, 18,03. Datos analíticos para el sulfato de kanamicina (amorfo): Calculados para $C_{14}H_{29}N_3O_{11} \cdot 3/2 H_2SO_4$: C, 29,89; H, 5,73; N, 7,47; S, 8,57; O, 48,35; encontrados: C, 30,20; H, 5,88; N, 7,43. Datos analíticos para la N-acetil kanamicina: Calculados para $C_{14}H_{26}N_3O_{11} \cdot 3CH_3CO$: C, 44,36

237387



H, 6,51; N, 7,76; O, 41,36; encontrados: C, 44,39; H, 6,01; N, 7,49. Datos analíticos para el reineckato de kanamicina: Calculados para $C_{14}H_{29}N_3O_{11} \cdot 3(C_4H_8N_6S_4 \text{ Cr.})$: C, 22,68; H, 3,88; N, 21,37; S, 27,95; Cr, 11,33; O, 12,78; encontrados: C, 21,44; H, 4,31; N, 19,93; Cr. 11,40 (del contenido de las cenizas). Datos analíticos para el sulfato de kanamicina cristalino: - Calculados para $C_{14}H_{29}N_3O_{11} \cdot 1/2H_2SO_4$: C, 36,21; H, 6,51; N, 9,05; S, 3,44; O, 44,79; encontrados: C, 35,97; H, 6,51; N, 9,13; S, 3,47.

La base de kanamicina no presenta absorción de la luz ultravioleta desde 220 m μ hasta 400 m μ .

10.- En el dibujo adjunto, la figura muestra el espectro de absorción de los infrarrojos del hemisulfato de kanamicina cristalino proyectado en partículas en bromuro de potasio.

15.- El dibujo muestra evidentemente que el nuevo antibiótico tiene una configuración característica nueva. Las bandas de absorción características - que presenta la región infrarroja del espectro están en las siguientes longitudes de onda expresadas en micras: 2,85; 3,03; 3,20; 3,30; 3,43; 3,63; 3,70; 3,83; 4,70; (anaha); 6,05; 6,17; 6,27; 6,60; 6,90; 7,15; 7,35; 7,52; 7,60; 7,95; 8,18; 8,76; 8,95; 9,08; 9,40; 9,70; 10,20; 10,48; 10,75; 11,13; 11,50; 11,90; 12,35; 12,80; y 13,15.

20.- Entre los antibióticos conocidos, las neomicinas B y C, la neamina y la catemulina tienen algunas características comunes con la kanamicina. Pero las características siguientes diferencian la kanamicina manifiestamente de esos antibióticos. La reacción de la glucosamina para la neomicina, que aparece en el libro "Assay Methods of Antibiotics" por D. C. Grove y W. A. --

25.- Randall, 146 páginas (Medical Encyclopedia Inc., Nueva York) es negativa - para la kanamicina. Esta reacción es positiva para las neomicinas y la catemulina. La cromatografía en papel con una solución al 2,0% de ácido p-toluenosulfónico-butanol, saturada con agua, diferencia la kanamicina de la neamina. Cuando se utilizó el papel filtro Toyo No. 50, el valor Rf de la

30.- kanamicina fue de 0,21-0,26, y el de la neamina fue de 0,75-0,85. Por el



237387

método de dilución en caldo, la kanamicina inhibió el desarrollo de Klebsiella pneumoniae a 3 mcg./ml., la neamina a 25 mcg./ml., la neomicina B a 3 mcg./ml., la catemulina a 1,5 mcg./ml. Por el método de placa de cilindro con B. subtilis, para que se presentara una inhibición de 20 mm. de diámetro fue necesario utilizar 30 mcg./ml. de kanamicina, 25 mcg./ml. de neamina, 170 mcg./ml. de neomicina B, 250 mcg./ml. de neomicina C o 18 mcg./ml. de catemulina. Estas características, así como la propiedad de baja toxicidad y fórmulas empíricas confirman el hecho de que la kanamicina es diferente de las neomicinas, la neamina y la catemulina y que es un nuevo antibiótico.

- 5.-
- 10.-

Actividad de la kanamicina.

La kanamicina, ensayada por el método de dilución en gelosa, presentó el siguiente espectro antibacteriano:

<u>Microorganismos.</u>	<u>Contracción mínima para la inhibición completa, en mcg./ml.</u>
S. lutea PCI-1001	1,8
15.- M. pyogenes var. aureus 209-P	2,2
M. pyogenes var. aureus Terajima	0,4
Micrococcus flavus	9,0
B. subtilis PCI-219	4,5
B. subtilis NRRL-558	4,5
20.- B. subtilis Tracy	9,0
E. coli	2,2
S. paratyphi A	3,1
S. dysenteriae	1,6
Proteus vulgaris	6,2
25.- Mycobacterium 607	3,1
Mycobacterium phlei	2,2
Saccharomyces sake	300
Saccharomyces	300
Candida albicans	300
30.- Aspergillus niger	300

237387



En el medio de Kirchners inhibió la cepa H2 de *Mycobacterium tuberculosis* en 2 mgg./ml. *E. coli* resistente a la estreptomina y *Mycobacterium tuberculosis hominis*, resistente a la estreptomina, fueron sensibles a la kanamicina.

- 5.- Los ratones toleraron la inyección intravenosa de 150 mg./kg. La LD_{50} por vía intravenosa en ratones, ratas y conejos fue de 150-250 mg./kg. Los ratones toleraron la inyección subcutánea diaria de 200 mg./kg. durante 30 días. No se observaron reacciones secundarias con la inyección de 100-200 mg./kg. de kanamicina en perros durante 30 días. La inyección intraperitoneal de más de 50 mg./ ratón cada cuatro horas protegió a los ratones infectados con 10.000 DLM de *Diplococcus pneumoniae* o con 1000 DLM de *Salmonella typhosa*. La inyección subcutánea diaria de 100 mg./kg. de kanamicina mostró el efecto inhibitorio en ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis* (cepa Ravenel).
- 10.-
- 15.- A continuación se exponen ejemplos específicos que ilustran aspectos particulares del invento. Sin embargo, conforme a lo anterior quedará entendido que la presente invención no se limita a los procesos que se presentan en los ejemplos. Puesto que se descubren aquí las características de la kanamicina, es evidente que es posible introducir variaciones y modificaciones dentro de los límites de la invención.
- 20.-

Ejemplo 1

- Se agregó glucosa, glicerina, lactosa, maltosa, sacarosa, almidón o dextrina al 2,0% al medio básico que contiene extracto de carne al 0,75%, peptona al 0,75% y cloruro de sodio al 0,3%; se procedió a la esterilización y después de ésta se ajustó el pH a 7,0. El medio fue inoculado con el contenido de un asa, tomado de un cultivo inclinado de gelosa de Czapek y glicerina con *Streptomyces kanamyceticus* y se cultivó con agitación a 27-29° C. La producción de kanamicina fue determinada mediante el método de placa de cilindro con *Mycobacterium 607*, y se observaron los resultados siguientes:
- 25.-

237387

31 AG



	Fuente de carbono	Producción máxima de kanamicina.	pH final y número de días de cultivo con agitación para alcanzar la producción máxima,-	
5.-	almidón	250 meg./ml.	7,8	5 días
	dextrina	200	8,0	5
	maltosa	130	7,8	4
	glucosa	200	8,2	4
	lactosa	100	8,6	4
10.-	sacarosa	100	8,4	4
	glicerina	100	8,0	4

Quando se agregó un hidrato de carbono como los indicados al medio básico que contiene 1,0% de harina de frijol soja, 0,05% de KCl, 0,05% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0,3% de NaCl, se observaron los resultados siguientes:

	Fuente de carbono	Producción máxima de kanamicina	pH final y número de días de cultivo con agitación para alcanzar la producción máxima	
15.-	almidón	250 meg./ml.	7,6	4 días
	dextrina	250	8,0	4
	maltosa	130	7,8	4
	glucosa	100	8,2	4
	sacarosa	150	8,4	4
20.-	lactosa	100	8,4	3
	glicerina	70	8,2	4

Ejemplo 2.

El medio, que contiene 2,0% de almidón, 1,2% de harina de frijol soja, 0,05% de KCl, 0,05% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1% de K_2HPO_4 , 0,3% de NaCl, 0,3% de peptona y 0,5% de $CaCO_3$ (el pH inicial fue de 7,0), fue inoculado con el producto de un subcultivo seleccionado de S. kanamyceticus (cepa K2-J) en gelosa de Czapek y glicerina, y puesto a cultivar. Después de cuatro días de cultivo con agitación, el pH fue de 8,2 y los ensayos mediante el método

23 73 87³



de placa de cilindro tanto con B. subtilis como con Mycobacterium 607 indicaron la producción de 550 mcg./ml. de kanamicina.

Ejemplo 3

El medio (180 l.), que contenía 2,0% de almidón, 1,0% de glucosa, 1,2% de harina de frijol soja, 0,3% de NaCl, 0,05% de KCl, 0,05% de MgSO₄ · 7H₂O, 0,1% de K₂HPO₄, 0,2% de CaCO₃, 0,3% de NaNO₃, 0,002% de MnSO₄ · 7H₂O y 0,002% de ZnSO₄ · 7H₂O, fue colocado en un fermentador de 400 l. de capacidad, con un pH ajustado a 7,4, esterilizado durante 30 minutos a 120° C., inoculado con 1000 ml. de caldo de S. kanamyceticus cultivado con agitación durante 40 horas (un subcultivo seleccionado de la cepa K2-J) y cultivado en tanque a 27-29° C. Se agregó, para evitar la formación de espuma, aceite de frijol soja (0,04%) y silicón (0,04%). Los resultados fueron los siguientes:

Horas	pH	Kanamicina mcg./ml.	% de reducción de azúcar en el líquido	mg.% de NH ₃ -N en el líquido.
0	6,6	-	2,20	2,5
24	6,9	-	1,50	10,7
36	7,6	150	0,4	1,2
48	7,6	200	0,3	1,2
60	8,0	220	0,3	6,0
72	8,2	210	0,25	12,0

Ejemplo 4

El medio (200 l.), que contenía 2,0% de almidón, 1,0% de harina de frijol soja, 0,05% de KCl, 0,05% de MgSO₄ · 7H₂O, 0,3% de NaCl, 0,2% de NaNO₃, fue colocado en el fermentador de 400 litros, el pH fue ajustado a 7,5, y luego se procedió a la esterilización (el pH después de la esterilización fue de 7,0) y tratado posteriormente como en el caso del Ejemplo 3. Después de 48 horas se encontró que el caldo contenía 250 mcg./ml. de kanamicina. A partir de ese momento, la concentración de kanamicina en el caldo no cambió notablemente. Después de 65 horas de la fermentación, se filtró el caldo



23 73 87

- 5.- con lo que se obtuvo 160 l. de caldo filtrado. El caldo filtrado contenía 150 mcg./ml. de kanamicina y el pH fue de 8,2. Se pasó el filtrado por una columna de resina de intercambio de cationes. La columna era de 15 cm. de diámetro y contenía 6 l. de IRC-50 en la forma sódica (es decir, regenerada con hidróxido de sodio) con un pH de 8,0. La amberlite IRC-50 es una resina de intercambio de cationes que se encuentra en el comercio y pertenece al tipo carboxílico; es un compuesto copolimérico del ácido metacrílico y del divinil-benceno. El filtrado se hizo pasar por la columna a razón de 16 l./hora. En el líquido saliente no se descubrió, con el método de placa de cilindro, ninguna actividad antibacteriana contra Mycobacterium 607. Se lavó después la columna con unos 10 l. de agua destilada que se hizo pasar por la columna a la misma velocidad que el filtrado del caldo. Luego se hizo pasar 1N HCl a través de la columna a la velocidad de 0,8 l./hora. Se recogió el levigado en porciones de 2 l. (cortes). Después del séptimo corte
- 10.- los levigados se volvieron ácidos y la kanamicina se encontró incluso en los cortes 7º a 10º. Los cortes que contenían kanamicina se mezclaron y la solución mixta (con un volumen de 8 l.) fue ajustada a un pH de 6,0 con NaOH al 10%, y concentrada (por destilación al vacío a unos 50º C.) hasta 3000 ml. La solución concentrada fue desecada y congelada. Los 500 g. de polvo blanco tirando a moreno así obtenidos contenían 8 g. de kanamicina. Ese polvo fue disuelto en 2 l. de metanol y, después de retirar la parte insoluble, se añadió acetona (20 l.) y se obtuvo 80 g. del polvo blanco tirando a moreno. Este polvo contenía 8 g. de kanamicina. Veinte gramos de este polvo fueron disueltos en 40 ml. de agua destilada y se agregó solución acuosa saturada de reineckato de amonio. El precipitado rosáceo claro que apareció primero y que pesó 50 mg. fue retirado y se añadió más solución de reineckato de amonio hasta que no se formó más precipitado. Este precipitado rosáceo fue recogido y recristalizado de agua destilada, y se obtuvo reineckato de kanamicina rosa cristalino (300 mg.). Este producto se oscureció
- 15.- a 191-193º C. y se descompuso a 211-213º C. El precipitado rosáceo claro que
- 20.-
- 25.-
- 30.-

3 1 AGO.



primero apareció también contenía kanamicina.

23 73 87

Ejemplo 5.

5.- S. Kanamyceticus (un subcultivo seleccionado de la cepa K2-J) fue inoculado a 200 l. de medio colocado en un fermentador de acero inoxidable de 400 l. y fermentó. El medio contenía 2,0% de almidón, 1,0% de glucosa, — 1,2% de harina de frijol soja, 0,3% de NaCl, 0,05% de KCl, 0,05% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1% de K_2HPO_4 , 0,2% de $CaCO_3$ y 0,3% de peptona. El pH del medio después de la esterilización fue de 7,0. Se agregó aceite de frijol soja al medio, en proporción de 0,1%, para evitar la formación de espuma.

10.- Después de sesenta y cinco horas de un cultivo profundo aerado, el caldo contenía 220 mcg./ml. de kanamicina. El pH era de 8,0. Fue filtrado y se obtuvieron 170 l. de filtrado (210 mcg./ml.). Se hizo/pasar el filtrado a través de la torre de resina de intercambio de cationes. La torre de resina contenía 6 l. de resina IRC-50 en el ciclo de sodio con un pH de 8,0 y era de 15 cm.

15.- de diámetro. El líquido circuló a razón de 30 l. por hora, es decir, 1/12 de litro de volumen de resina por minuto. Después se hicieron pasar 30 l. de agua a través de la torre de resina a razón de 30 l./hora. La kanamicina adsorbida por la resina fue luego levigada con 1N HCl, circulando a razón de 3,0 l./hora. El primer levigado (6,5 l.) carecía de actividad; el siguiente contenía kanamicina. Noventa por ciento de la kanamicina adsorbida apareció en el levigado, cuyo pH fue superior a 2,0. El levigado activo —

20.- (16,1) fue ajustado a un pH de 7,5 con 10% de NaOH. Luego fue diluido a 80 l. Aquí el rendimiento del filtrado de caldo fue de 83%. La solución diluida fue pasada nuevamente a través de una columna de resina. La columna contaba

25.- nía 2 l. de resina IRC-50 en el ciclo de sodio con un pH de 7,5. El diámetro de la columna era de 5 cm. El líquido circuló a razón de 10 l./hora. La columna fue lavada con 20 l. de agua que circuló a razón de 10 l./hora. La kanamicina adsorbida fue luego levigada con 1N HCl. El líquido circuló a razón de 3,0 l./hora. Como en la levigación anterior, la kanamicina apareció en el levigado, cuyo pH fue superior a 2,0. El levigado activo (4,5 l.)

30.-



1954

23 73 87

fue ajustado a un pH de 6,0 mediante la adición de la resina de intercambio de aniones, IR-4B, en forma hidróxilica. La amberlita IR-4B es una resina de intercambio aniónico débilmente básica que se halla en el comercio y --
5.- tiene el tipo descrito en la Patente 2.591.573 de los EE.UU. de N.A. Fue evaporada al vacío a unos 40° C. hasta 500 ml. A esta solución concentrada se añadieron 5 litros de metanol y se extrajo la parte insoluble. El filtrado fue evaporado al vacío a unos 40° C. hasta 250 ml. y a la solución concentrada se añadieron 2,5 litros de acetona, con lo que se obtuvieron 65 g. de kanamicina en forma de polvo moreno claro. La potencia de este polvo fue
10.- de 350 mcg./mg.

Ejemplo 6.

La kanamicina blanca tirando a moreno (5 g.) obtenida en el Ejemplo 5 fue disuelta en 50 ml. de metanol acuoso al 60%, el material insoluble fue extraído y se agregó al filtrado 40 ml. de metanol acuoso al 60% que contenía 2000 mg. de sulfato de amonio; se recogió el precipitado de sulfato de kanamicina, se lavó con 50 ml. de metanol acuoso al 80% y se desecó. Así
15.- se obtuvieron 4,5 g. de sulfato de kanamicina en forma de polvo moreno claro. La potencia fue de 370 mcg./mg.

Ejemplo 7.

Diez gramos de clorhidrato de kanamicina en estado sólido, cuya potencia era de 535 mcg./mg., fueron disueltos en 100 ml. de metanol acuoso al 90% y pasados a través de una columna de alúmina. La columna contenía 140 g. de alúmina tratada con ácido sulfúrico y era de 8,5 cm. de diámetro. Fue sometida a la acción del metanol. El primer levigado de 200 ml. no contenía kanamicina. El segundo levigado (128 ml.) mostró actividad antibacteriana y fue
20.- evaporado al vacío para obtener 4,681 g. de clorhidrato de kanamicina en forma de polvo blanco. La potencia del polvo fue de 560 mcg./mg. Por el mismo procedimiento, del tercer levigado (115 ml.) se obtuvieron 2,205 g. de clorhidrato de kanamicina en forma de sólido blanco. La potencia fue de 615
25.-



237387

mcg./mg. Por este procedimiento, el pigmento amarillo fue adsorbido por la columna y el clorhidrato de kanamicina fue obtenido en forma de polvo incoloro. El pigmento amarillo adsorbido por la columna fue separado por la levigación ulterior con 50% de metanol acuoso y agua destilada.

5.-

Ejemplo 8.

10.-

15.-

Cuatro gramos de clorhidrato de kanamicina en estado sólido, cuya potencia era de 50⁰ mcg./mg., fueron disueltos en 200 ml. de metanol y después de evaporación a 80 ml. fueron pasados a través de una columna que contenía 5 g. de carbono activo y 25 g. de polvo de celulosa. La columna fue tratada con metanol. El primer levigado (50 ml.) no contenía kanamicina. El segundo levigado (60 ml.) fue evaporado para obtener 364 mg. de clorhidrato de kanamicina. La potencia de este polvo fue de 720 mcg./gm. El tercer levigado (46 ml.) dió 381 mg. de clorhidrato de kanamicina en polvo. La potencia de este polvo fue de 616 mcg./mg. Del cuarto levigado (55 ml.) se obtuvieron 1.873 mg. de clorhidrato de kanamicina, de color blanco, con una potencia de 483 mcg./mg. El primer levigado (55 ml.) dió 956,6 mg. en forma de polvo blanco con una potencia de 410 mcg./mg. Todos los sólidos aquí obtenidos fueron incoloros.

20.-

25.-

Ejemplo 9.

Se cultivó por agitación S. kanamyceticus en un medio que contenía 1,0% de almidón, 1,5% de harina de frijol soja y 0,3% de NaCl (el pH inicial fue de 7,0) a 28⁰ C. durante cuatro días. Los caldos de cultivo en 25 matraces fueron mezclados y filtrados. El pH del filtrado fue de 8,2 y el filtrado contenía 400 mcg./ml. de kanamicina. El filtrado (3.100 ml.) fue pasado por una columna de resina IRC-50. La columna contenía 100 ml. de la resina en el ciclo de sodio a un pH de 8,0. Después de la absorción, la columna fue lavada con 500 ml. de agua, y la kanamicina adsorbida fue levigada con 1N HCl, cortando el líquido de salida cada 20 ml. La actividad fue hallada en los cortes cuarto a noveno; esos cortes fueron mezclados y el pH fue ajus-

23 73 81760



tado a 6,0. Esta solución fue concentrada por evaporación al vacío hasta 12 ml. y se extrajeron las impurezas insolubles. A esta solución saturada se añadió solución de reineckato de amonio. El precipitado que primero apareció fue de color rosáceo claro, pesó 50 mg., contenía kanamicina y fue separado. Al sobrenadante se le añadió más solución de reineckato de amonio hasta que no se formaron más precipitados. El precipitado rosa fue separado y desecado para dar 544. mg. de reineckato de kanamicina; en el sobrenadante quedó como 30% de la actividad. Este precipitado fue agregado a 12 ml. de agua destilada, calentado a 60° C. y filtrado. El filtrado fue enfriado y los cristales de reineckato de kanamicina fueron separados. Al licor madre se añadió el reineckato de kanamicina que no se había redissuelto y después de volver a calentar a 60° C. y enfriar, se separó la segunda cosecha de reineckato de kanamicina cristalino. Este proceso volvió a repetirse por tres veces. Así, se aislaron 300 mg. de reineckato de kanamicina cristalino. Este reineckato cristalino (140 mg.) fueron añadido a 105 ml. de agua destilada y se agregó 2,5N HCl en piridina, gota a gota, hasta que no se formó más precipitado. El precipitado fue separado mediante centrifuga, desecado y congelado y después lavado con acetona. Así se obtuvo clorhidrato de kanamicina (60 mg.) en forma de sólido blanco higroscópico.

Ejemplo 10.

Clorhidrato de kanamicina (10 g.; 450 mcg./mg.) obtenido por un proceso similar al descrito en el Ejemplo 5, fue disuelto en un litro de agua destilada y el pH fue ajustado a 6,4. Fue hecho pasar por una columna de 75 ml. de resina IRC-50 en la forma de sodio a un pH de 6,4, a razón de 10 ml./minuto. Después que la columna fue lavada con 50 ml. de agua, la kanamicina adsorbida fue levigada mediante NH₄OH al 5%. El primer levigado (80 ml.) no tubo actividad y el levigado ulterior (130 ml.) contenía kanamicina. El pH de este levigado fue superior a 10,0. Fue evaporado al vacío a unos 40° C. hasta 22 ml. El rendimiento en esta solución concentrada fue de 97,8%. Esta solución concentrada fue pasada a través de una columna de carbono que



23 73 87 ^{3 1 A}

5.- contenía 20 g. de carbono activo de 100-250 de malla. El diámetro de la columna era de 2 cm. Después la columna fue lavada con 160 ml. de agua destilada y tratada cromatográficamente con 0,5N H₂SO₄. El líquido de salida fue cortado en porciones de unos 20 ml. El sulfato de kanamicina apareció desde el quinto corte. Los cortes 1º a 4º fueron de pH 6,2-6,4 y no contenían kanamicina. Casi toda la kanamicina fue encontrada en los cortes 5º a 8º en la forma siguiente: 5º corte, pH 8,2, 22,0 ml., 16,9 mg./ml.; 6º corte, pH 8,6, 23,0 ml., 65,3 mg./ml.; 7º corte, pH 8,6, 20,0 ml., 55,0 mg./ml. 8º corte, pH 4,6, 22,0 ml., 47,5 mg./ml.; 9º corte, pH 1,0, 22,0 ml., 4,2 mg./ml. Al 6º corte se agregaron 23,0 ml. de metanol y se precipitó sulfato de kanamicina cristalino, que se recogió y desecó. Así se obtuvieron 1,39 g. de sulfato de kanamicina cristalino, 1,2 g. de este sulfato cristalino fueron disueltos en 8 ml. de agua y calentados a 45°C.; se añadieron 6,5 ml. de metanol, con agitación y enfriamiento. Luego fue precipitado sulfato de kanamicina (1,07 g.) y obtenido en forma cristalina. Microscópicamente presentaba cristales de placas incoloras. No se fundía por debajo de los 250° C.

10.- Resultados analíticos: C, 35,97, 35,89; H, 6,51, 6,56; N, 9,13, 8,92; S, 3,47; $\left[\alpha \right]_D^{23} = -121^\circ$.

15.- Cuando se desea para fines específicos y se logra la compatibilidad farmacéutica, pueden mezclarse con los compuestos del presente invento otros medicamentos tales como antihistamínicos, sulfamidas, estimulantes, anestésicos locales, analgésicos, laxantes, sedantes, sales de penicilina y otros agentes antibióticos como la estreptomina o un antibiótico del tipo de la tetraciclina, vitaminas, hormonas y agentes antifúngicos.

20.- En el dibujo adjunto se muestra la absorción del infra-rojo del nuevo antibiótico.

25.- Las cifras a lo largo del borde superior indican el número de ondas en CM-1 y las siguiendo el borde inferior la longitud de las ondas en micrones. Las cifras laterales (por la izquierda) expresan el porcentaje de transmisión.

30.-

31 AGO.

237,387



Hecha la descripción que antecede, hemos de añadir que los detalles de realización de la idea expuesta pueden variar, sin que por ello cambie la esencia de la invención que es la que se desprende de los párrafos precedentes y la que se reivindica en la siguiente

5.-

N O T A

En resumen: La Patente de Invención que se solicita, recaerá sobre las reivindicaciones siguientes:

10.-

1ª.- Un proceso para la producción de un nuevo antibiótico, la kanamicina, caracterizado por el hecho de que una cepa de Streptomyces kanamyceticus nov. spec., del cual se describen las propiedades en las especificaciones, se cultiva en condiciones de aerobiosis en un medio nutriente adecuado hasta que se imparte una considerable actividad antibiótica a dicho medio y el antibiótico se recupera del caldo de fermentación.

15.-

2ª.- Un proceso para la producción de un nuevo antibiótico, la kanamicina, en conformidad con la reivindicación 1ª, caracterizado por el hecho de que el cultivo se lleva a cabo en condiciones de sumersión a una temperatura que oscila entre 27° y 32° C. por un período de 3 a 5 días.

20.-

3ª.- Un proceso para la producción de un nuevo antibiótico, la kanamicina, de conformidad con las reivindicaciones 1ª y 2ª, caracterizado por el hecho de que el medio nutriente contiene la mezcla de almidón y harina de frijol soja.

25.-

4ª.- Un proceso para la producción de un nuevo antibiótico, la kanamicina, de conformidad con la reivindicación 3ª, caracterizado por el hecho de que las cantidades de almidón y harina de frijol soja en el medio nutriente son de 2,0% y de 1,2%, respectivamente.

30.-

5ª.- Un proceso para la producción de un nuevo antibiótico, la kanamicina, de conformidad con las reivindicaciones 1ª a 4ª, caracterizado por el hecho de que el antibiótico se recupera del caldo de fermentación por extracción con butanol en presencia de un vehículo, tal como el ácido láurico o el ácido esteárico.



237387

- 6a.- Un proceso para la producción de un nuevo antibiótico, la kanamicina, en conformidad con las reivindicaciones 1ª a 4ª, caracterizado por el hecho de que el antibiótico se recupera del caldo de fermentación por medio de adsorción en una resina de intercambio de cationes.
- 5.- 7a.- Un proceso para la producción de un nuevo antibiótico, la kanamicina, en conformidad con las reivindicaciones 1ª a 4ª, caracterizado por el hecho de que la resina de intercambio de cationes es del tipo ácido carboxílico.
- 10.- 8a.- Un proceso para la producción de un nuevo antibiótico, la kanamicina, en conformidad con las reivindicaciones 6ª y 7ª, caracterizado por el hecho de que la resina de intercambio de cationes es un compuesto copolimérico del ácido metacrílico y del divinil-benceno.
- 15.- 9a.- Se reivindica, por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "UN PROCESO PARA LA PRODUCCION DE UN NUEVO ANTIBIOTICO, LA KANAMICINA".

Todo conforme queda descrito en la presente memoria, que consta de veintiuna páginas escritas a máquina por una sola cara, y dibujo adjunto.

Madrid, 31 agosto 1957.

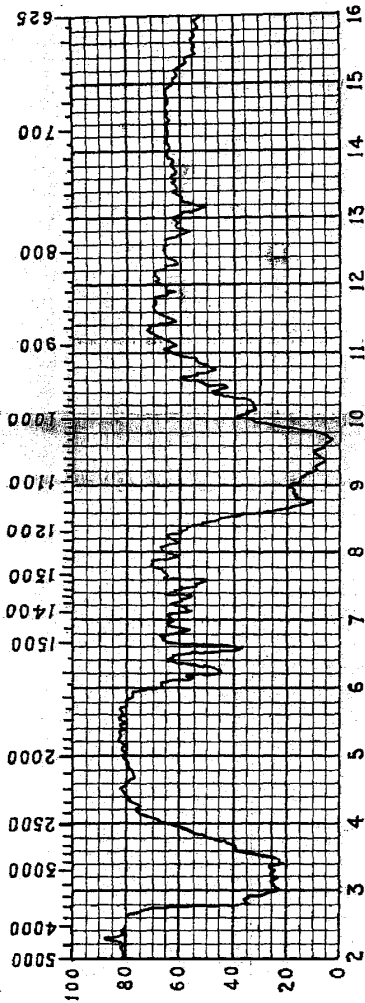
ALFONSO UNGRIA.

RAMON DEZAROLA, FRANCISCO UEDA Y ESTER HERRERA

BOZA UNICA



237387



ESCOLA A. VIZCARRALE
MADRID, 21 DE ABRIL DE 1932

[Handwritten signature]