

AÑO

Expediente núm.



241435

REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

PATENTE DE **INVENCION.** **241435**

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de

una **PATENTE DE INVENCION** por **20** años, en España

a favor de

SOCIETE DES USINES CHIMIQUES RHONE-POULENC, de nacionalidad

entidad francesa domiciliado en **21, rue Jean-Goujon,**

ciudad **PARIS, Francia.** **núm.**

por:

« **Procedimiento perfeccionado para la preparación de**
antibióticos ».

Nº 7353

Agente Sr. **Gómez-Acebo y Modet.**

SC.1517/1624
SPIRAMYCINES II & III.-
MILIEUX ACYLANTS.

PATENTE DE INVENCION



Memoria Descriptiva

241435

sobre:

"Procedimiento perfeccionado para la preparación de
"antibióticos".

=====

Solicitante: SOCIETE DES USINES CHIMIQUES RHONE POULENC, entidad
francesa, domiciliada en 21 Rue Jean Goujon, PARIS, Francia.

=====

La presente invención se refiere a un proce-
dimiento perfeccionado para la preparación de las espi-
ramicinas II y III.

Se sabe que la espiamicina, antibiótico compues-
to de tres constituyentes de propiedades muy próximas,
5. las espiamicinas I, II y III, se produce por el cultivo
de un Streptomyces: S. ambofaciens (de la que se ha
depositado una muestra en el NRL de Peoria, Illinois,
Estados Unidos de America, donde ha sido afectada del
10. indicativo NRRL 2420), o de sus "mutants" en medios



241435

de cultivo apropiados.

La constitución exacta de estas espiramicinas no se conoce todavía con certeza, pero se sabe (PAUL & TOHLITCHEFF-Bull Soc.Chim.France , p.443,1957)

5. que las espiramicinas II y III son respectivamente los derivados acetilado y propionilado de la espiramicina I. También se sabe que las espiramicinas II y III pueden cristalizarse, lo cual puede facilitar su purificación y constituye una ventaja importante para el empleo farmacéutico.

10. Una segunda ventaja de las espiramicinas II y III es la menor toxicidad de estas formas de espiramicinas, según resulta del cuadro siguiente donde figuran las dosis (expresadas en g/kg.) de las tres espiramicinas que provocan la muerte del 50% de los ratones tratados por

15. vía subcutánea (DL₅₀ g/kg. s.c.),

Productos	DL ₅₀ (g/kg.s.c.)
Espiramicina I	1,01
Espiramicina II	1,52
Espiramicina III	2,04

20. Por último, la actividad antimicrobiana en vitro y en vivo de las espiramicinas II y III es, por lo menos, igual a la de la espiramicina I.

Ya se ha demostrado que, por condiciones particulares de fermentación, particularmente por modificaciones en la composición de los medios de cultivo, se

25.



5. podía actuar sobre la proporción de las tres espiramicinas presentes en el producto elaborado por los *Streptomyces ambofaciens* NRRL 2420. Sin embargo, con los medios habituales utilizados para la preparación de la espiramicina, ya sean medios a base de sustancias complejas mal definidas o medios puramente sintéticos, la proporción en espiramicina I de la espiramicina producida, permanece bastante importante. Resulta de ello que la obtención de espiramicinas II y III exentas de espiramicina I es bastante difícil y se efectúa con un rendimiento poco satisfactorio.

10. Se ha descubierto, y este es el objeto de la presente invención, que operando en condiciones apropiadas, se podía orientar la fermentación de *S. ambofaciens* o de sus mutantes de tal modo que se obtiene un aumento considerable de la espiramicina II y/o de la espiramicina III en la espiramicina total elaborada por el microorganismo: pudiendo esta cantidad alcanzar, por ejemplo, en el caso de la espiramicina III, hasta el 75 al 80% en peso de la espiramicina total. Se ha descubierto también que esta misma *S. ambofaciens* o sus mutantes era capaz de transformar la espiramicina I en espiramicina II y en espiramicina III mediante un proceso enzimático de acetilación o de propionilación; en este caso, la transformación de la espiramicina I puede ser total en las mejores condiciones.

15. Estos resultados se obtienen esencialmente efectuando la fermentación (fermentación en medio habitual, complejo o sintético o fermentación sobre medio que contenga la espiramicina I) en presencia de un agente de

20.

25.

30.



acetilación o de propionilación según que se desée obtener la espiromicina II o la espiromicina III.

Como agentes de acetilación se pueden utilizar el ácido acético, sus sales, sus ésteres, la acetamida.

5. Tambien se puede utilizar todo compuesto capaz de generar, después de transformación por *S. ambofaciens*, un radical acetilado, como, por ejemplo, el ácido butírico y sus derivados.

10. Por razones de comodidad se emplea, de preferencia el ácido acético o el acetato de sodio a una concentración comprendida entre 0,1 y 30 g./l., en el medio de transformación.

15. Como agentes de propionilación, se pueden utilizar el ácido propiónico, sus sales, sus ésteres, la propionamida, el propanol. Tambien se puede utilizar todo compuesto capaz de generar, después de su metabolismo por *S. ambofaciens*, un radical propionilo, como el ácido valerianico o sus sales. Por razones de sencillez se emplea, por ejemplo, de preferencia, el

20. ácido propiónico o sus sales o la propionamida a una concentración comprendida entre 0,1 y 30 g/l en el medio, siendo la concentración óptima en la proximidad de 2 - 15 g/l. Según las necesidades se puede añadir el agente acilante en solución en agua o en un disolvente

25. orgánico como el metanol, el etanol, la acetona, el benceno, el éter, el dicloretano. Tambien se puede fraccionar en varias adiciones sucesivas, la cantidad de agente acilante que se haya de añadir, sin que de ello resulten modificaciones importantes de la transformación requerida.

30. En el caso de medios habituales complejos o

18 ABR



sintéticos, la fermentación no presenta dificultades y se conduce normalmente.

5. En el caso de un medio que contenga la espiramicina I ha sido necesario precisar los diferentes factores que favorecen la transformación bioquímica de la espiramicina I en espiramicina II o III y realizar esta transformación de un modo práctico. Es preciso en particular cultivar *S. ambofaciens* en condiciones que permiten a la vez su desarrollo y la elaboración del sistema enzimático. Es conveniente también utilizar la capacidad transformadora adquirida por el cultivo colocándose en las condiciones requeridas para la transformación deseada.
- 10.

15. Con este objeto, se puede cultivar *S. ambofaciens* en un medio de cultivo que encierre desde el momento de partida la espiramicina I a transformar así como todos los factores necesarios para la producción del sistema enzimático y a la transformación, por este sistema, de la espiramicina I presente en espiramicina II y III.

20. Pero se ha hallado particularmente ventajoso, para realizar la presente invención, cultivar en una primera fase *S. ambofaciens* en tales condiciones que elabora el sistema enzimático acilante. En una segunda fase, se utiliza la capacidad transformadora adquirida por el hongo poniendo su micelio en presencia de la espiramicina I y de los elementos necesarios para la transformación: substancias capaces de suministrar radicales acetilo o propionilo y los activadores.
- 25.

30. El cultivo de *S. ambofaciens* a los fines de elaboración del sistema enzimático acilante, puede



- efectuarse sobre medios muy diversos, en particular sobre los medios que se utilizan habitualmente para la preparación de la espiramicina: medios complejos o medios sintéticos. Sin embargo, la
5. cantidad y la calidad del sistema encimático acilante pueden variar en gran medida, según la composición del medio empleado. También para obtener un micelio que posea una capacidad elevada de transformación de la espiramicina I en espiramicina II y
10. III, es preferible seleccionar muy cuidadosamente los diversos productos que entran en la composición del medio.

- Se ha hallado particularmente ventajoso emplear un medio sintético que solo encierre
15. una fuente energética glucídica, una fuente de nitrógeno amoniacal y sustancias neutralizantes. Se utiliza, de preferencia, la glucosa o el almidón en dosis que varían de 1 a 100 g/l., siendo la óptima la que está comprendida entre 40 y 60 g/l.
20. Entre las sales amoniacaes se emplea el cloruro, el sulfato o el nitrato, pudiendo variar la cantidad de nitrógeno amoniacal entre 0,1 y 10 g./l, situándose la cantidad óptima entre 2 y 4 g./l.

- El pH de partida del cultivo de *S.ambofaciens*, debe ajustarse entre 5 y 9, de preferencia entre 6,5 y 7,5 para obtener una buena capacidad de transformación de la espiramicina I.
- 25.

Para evitar una evolución del pH, en el medio de cultivo, hacia valores demasiado



- bajos, que podrían ser nefastos para una buena producción del sistema encimático acilante, es conveniente añadir al medio de cultivo substancias neutralizantes en el momento oportuno y en cantidad adecuada para mantener el pH a un valor deseado.
5. Se pueden emplear para este uso, agentes alcalinos tales como los hidróxidos y los carbonatos de los metales alcalinos y alcalino-terrosos, en solución o en suspensión en agua; también se puede añadir desde el principio del cultivo, una substancia neutralizante de reserva tal como los carbonatos insolubles de metales alcalino-terrosos.
10. Se emplea, de preferencia, el carbonato de calcio a dosis comprendidas entre 1 y 50 g/l., siendo la dosis óptima, en la proximidad de 25 g./l.
15. También es conveniente cultivar *S. ambofaciens*, en condiciones de temperatura bien definidas, para obtener la elaboración máxima del sistema encimático acilante. Por ejemplo, se podrá efectuar el cultivo entre 20 y 35°, pero de preferencia a 23-27°.
20. El cultivo de *S. ambofaciens*, puede efectuarse en las condiciones habituales requeridas para llevar a cabo fermentaciones aerobias y, más especialmente en todo aparato que permita, a la vez, una buena dispersión del aire necesario para la respiración del *restreptomices*, y una buena homogeneización del cultivo.
25. Se ha descubierto que la capacidad transformadora de los cultivos de *S. ambofaciens*



- varía con la edad del cultivo. Al principio de éste, la capacidad transformadora, es prácticamente proporcional a la cantidad de micelio presente en el cultivo. Transcurrido cierto tiempo, la capacidad transformadora se fija a un valor máximo, después disminuye en seguida, mientras que el micelio continúa su crecimiento. En la práctica, se comprueba que el micelio posee la capacidad transformadora máxima después de 30 a 150 horas de cultivo, por regla general, entre 40 y 100 horas, dependiendo este tiempo óptimo, esencialmente de las condiciones generales del cultivo.
5. Después de haber preparado, según queda descrito, un cultivo de *S. ambofaciens* o de sus mutants, con objeto de la elaboración del sistema encimático acilante, que transforma la espiramicina I en espiramicina III y III, es conveniente después colocar el mismo *Streptomyces* en condiciones prudencialmente elegidas para utilizar sus capacidades transformadoras y efectuar la transformación requerida. También se puede aportar el cultivo, tal y como se ha obtenido al mismo tiempo que la espiramicina I a transformar, los elementos necesarios para esta transformación:
10. los agentes acilantes y los activadores.
15. Se puede también aislar, por cualquier medio apropiado, el micelio de *S. ambofaciens* y reemplazarle después en un medio adecuado de transformación que contenga la espiramicina I, los agentes acilantes y los activadores.
- 20.
- 25.

241435



- 9 -

- Ahora bien, se ha descubierto que la proporción de los productos de transformación de la espiramicina I varía de un modo importante según la naturaleza de los radicales acilos presentes en el medio de transformación. En efecto, los radicales acilos de 3 átomos de carbono se fijan más fácilmente sobre la espiramicina I que los radicales de 2 átomos de carbono. Cada vez que los dos tipos de radicales están presentes simultáneamente en el medio de transformación, se utilizan preferentemente radicales de 3 átomos de carbono para transformar la espiramicina I en espiramicina III. Se concibe que entonces se puede orientar específicamente la transformación de la espiramicina I en espiramicina III mediante la aportación prudencial de sustancias capaces de suministrar un exceso de radical propionilo. También se concibe que la transformación específica de la espiramicina I en espiramicina II no pueda efectuarse más que en ausencia, en el medio de transformación, de toda sustancia susceptible de suministrar el radical propionilo. Como *S. ambofaciens* elabora con gran facilidad y en los medios más diversos, las sustancias capaces de suministrar el radical propionilo, la transformación específica de la espiramicina I en espiramicina II solo puede efectuarse en condiciones muy particulares.
- Si se utilizan directamente como medio de transformación los cultivos efectuados a fines de la elaboración del sistema acilante, se obtiene entonces por la adición de agente propionilante, la espiramicina III prácticamente pura. Pero añadiendo agente acilante se transforma la espiramicina I solamente en una mezcla de
5.
10.
15.
20.
25.
30.

241435

- 10 -



espiramicina II y III, en razón a la presencia en el medio de pequeñas cantidades de agente propionilante.

5. Si se separa el micelio de *S.ambofaciens* del medio que ha servido para elaborar el sistema encimático acilante, se puede entonces orientar mucho más específicamente la transformación de la espiramicina I. En efecto es suficiente aportar al micelio además de los activadores eventuales, las substancias capaces de suministrar los radicales acilados. Según la naturaleza de estos últimos
10. se obtiene entonces la espiramicina II, la espiramicina III o una mezcla de las dos. Este procedimiento es particularmente conveniente para la producción de la espiramicina II que solo puede obtenerse en presencia de substancias capaces de suministrar el radical acetilo,
15. con exclusión de toda substancia capaz de suministrar un radical propionilo, en particular las que pueden provenir del metabolismo de *S.ambofaciens*.

20. La espiramicina I puede emplearse en estado puro, o en mezcla con las espiramicinas II y III, pudiendo obtenerse tal mezcla por los procedimientos habituales de fabricación de la espiramicina bruta.; Se puede emplear la espiramicina en estado de base o de sal y añadirla al medio de transformación en estado sólido o disuelto. Para la mayor comodidad en la manipulación, se puede
25. emplear, por ejemplo, la espiramicina en estado de base en disolución en agua, el metanol, el etanol, el éter, la acetona, el benceno, el dicloretano. También se la puede emplear en estado de sal y más especialmente de clorhidrato, de sulfato, de acetato y de propionato, en solución acuosa.

30. Es preferible que la concentración de las

241435

- 11 -



- soluciones de espiramicina añadidas en el medio de transformación sea tal que no haya una dilución demasiado importante de este último medio. La concentración final en espiramicina I en este medio de transformación puede
5. variar entre 1 y 50 g/l., pero es particularmente ventajoso emplear una concentración en espiramicina I próxima a 5-20 g/l. Esta concentración puede alcanzarse por una sola adición de espiramicina I o por varias adiciones fraccionadas, sin que resulte de ello variaciones importantes en el producto de transformación requerido.
- 10.

- Según resulta de las consideraciones precedentes, un cultivo de *S. ambofaciens* que posea el sistema enzimático acilante eventualmente adicionado de agentes acilantes, permite a él solo realizar la transformación enzimática de la espiramicina I, objeto de la presente invención.
- 15.

- La adición de numerosas sales minerales u orgánicas no introduce variaciones importantes en la cantidad de espiramicina I transformada. Sin embargo, se ha comprobado que ciertos aniones y cationes tenían un efecto favorable sobre la transformación de la espiramicina
- 20.

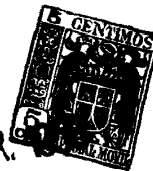
I en espiramicina II y III, ya sea acelerando la transformación, o ya sea aumentando la cantidad de espiramicina transformada.

- Entre los aniones que desempeñan el papel de activador de la reacción enzimática se halla el cloro.
- 25.

Se puede añadir éste en forma de cloruros de metales alcalinos, alcalino-terrosos u otros, con la condición de que el metal no sea un inhibidor de la transformación.

- La cantidad de cloro aportada al medio en forma de cloruro puede estar comprendida entre 0,1 y 20 g/l, la dosis
- 30.

6 ABR. 1963



óptima se sitúa en la proximidad de 1 a 3 g/l.

- Entre los cationes susceptibles de mejorar la reacción de transformación, el magnesio, el hierro y el cobalto son particularmente activos, comportándose este último metal como el activador de elección de la reacción encimática de acilación. Se pueden añadir estos metales en forma de cloruro, sulfato, nitrato o de cualquier otra sal que no perjudique la reacción encimática. Se puede emplear, por ejemplo, el magnesio y el hierro en dosis comprendidas entre 0,1 y 500 mg/l. en el medio de transformación, situándose la óptima hacia unos 5 a 10 mg./l. Se puede emplear el cobalto en dosis comprendidas entre 0,1 y 1000 mg./l, situándose la óptima entre 10 y 400 mg./l.
5. Para obtener la transformación de la espiramicina I en espiramicina II y III, en las mejores condiciones posibles, es, pues, necesario añadir al cultivo de *S. ambofaciens* que posean el sistema encimático acilante, la espiramicina I a transformar, los agentes acilantes y los activadores.
10. La adición de estos diferentes elementos, puede ser simultánea, pero puede separarse en el tiempo. En este último caso es sin embargo conveniente añadir la espiramicina I después los agentes acilantes y los activadores si se desea orientar correctamente la transformación.
15. Por último, se ha hallado conveniente en ciertos casos, añadir, al mismo tiempo que la espiramicina I, los agentes acilantes y los activadores, una fuente energética, como la glucosa o el almidón. Esto es,
- 20.
- 25.
- 30.

241435



- 13 -

importante, particularmente en el caso en que se separe el micelio de *S.ambofaciens* de su medio de cultivo y en que se le reemplaza en un medio que solo contenga la espiramicina, los agentes acilantes y los activadores.

5. Se puede tambien añadir la glucosa o el almidón en una dosis comprendida entre 1 y 50 g/l situándose la óptima hacia unos 10 g/l.

En el caso en que se utiliza como medio de transformación, el cultivo de elaboración del sistema encimático acilante, la adición de los diferentes elementos, se efectúa en un medio de cultivo de pH bien determinado comprendido, por lo general, entre 5,0 y 8,0 y, más especialmente, entre 6,0 y 7,0. Puede ser conveniente, para efectuar la transformación en las mejores condi-

10. ciones posibles, modificar, en ciertos casos, el pH del cultivo en el momento de la adición de los diversos elementos. Entonces se emplean con este objeto diversas sustancias ácidas o alcalinas cuya elección se guía principalmente por sus propiedades inhibitorias eventuales de la reacción de transformación. Se utilizan, por ejemplo, los ácidos clorhídrico, sulfúrico, nítrico, acético, propiónico, cítrico, los hidróxidos de sodio, de potasio, de amonio, de calcio, de bario.

15. En el caso en que se efectúe la transformación separando el micelio de *S.ambofaciens* del medio de elaboración del sistema encimático y reemplazando el micelio en presencia de la espiramicina, de los agentes acilantes, de los activadores y de las sustancias energéticas, es igualmente ventajoso colocarse en condiciones de pH bien definidas. De este modo se puede regular el pH de 3,0
- 20.
- 25.
- 30.

241435

- 14 -



10

a 8,0 con ayuda de agentes acidificantes o alcalinizantes anteriormente citados. Tambien se puede regular el pH con ayuda de medios tampón, como las mezclas ácido acético-acetato, ácido propiónico-propionato, ácido cítrico-citrato, ácido ftálico-ftalato.

5.

Por último, sea cual fuere el modo de transformación elegido, puede resultar conveniente corregir las variaciones eventuales de pH que se van produciendo en el curso de la transformación por adiciones apropiadas de agentes acidificantes o alcalinizantes o de mezclas-tampón.

10.

La transformación de la espiramicina I en espiramicina II y III por *S.ambofaciens* exige que se mantenga el cultivo de este organismo en condiciones perfectamente aerobias, que se utilice el cultivo de elaboración del sistema encimático o el micelio separado de este cultivo. Es preciso, pues, después que se han añadido los diferentes elementos, mantener el medio de transformación en condiciones de aereación y de agitación próximas a las que estaban para el cultivo de elaboración.

15.

20.

La temperatura a que se efectúa la transformación encimática acilante tiene, en condiciones habituales de trabajo, bastante poca importancia. Se puede colocar a una temperatura comprendida entre 15° y 40°, siendo la temperatura óptima a la proximidad de 25°.

25.

La transformación de la espiramicina I en espiramicina II y III es una transformación relativamente rápida y en 24 horas una parte importante de la spiramicina I se ha transformado ya.

30.

241435



Para la obtención de un rendimiento de transformación máximo, es conveniente sin embargo, mantener en ciertos casos un contacto suficiente entre el sistema encimático acilante, la espiramicina y los otros elementos y entonces pueden ser necesarios varios días para que tenga lugar la evolución completa del sistema.

5.

Después de haber transformado, según queda descrito, la espiramicina I en espiramicina II y III, éstas pueden separarse por métodos conocidos tales como distribución a contracorriente, cromatografía sobre alúmina u otros adsorbentes, cristalización fraccionada. Si se desea simplemente conocer las proporciones relativas de las diferentes espiramicinas en curso o ya en final de transformación, resulta cómodo

10.

aplicar el método de caracterización por cromatografía sobre papel en los medios de transformación y comparar las cromatografías obtenidas con las cromatografías testigos correspondientes a cantidades conocidas de las diferentes espiramicinas aisladas en estado puro.

15.

Los ejemplos siguientes, dados a título no limitativo, muestran el modo en que el procedimiento perfeccionado objeto de la presente invención puede ejecutarse en la práctica.

20.

EJEMPLO 1 -

Un erlenmeyer de 2 litros se cargó con 250 cm³ del medio siguiente:

25.

Corn-steep (50% extracto seco)	40 g.
Glucosa	20 g.
Cloruro de sodio	5 g.
Sulfato de magnesio	1 g.

30.

241435

- 16 -



Agua corriente 1000 cm³.

El pH se ajustó a 6,8 por sosa y la carga se completó por:

Carbonato de calcio 5 g.

5. Aceite de soja 4 cm³

Este medio se esterilizó en 45 minutos a 120°. Después de enfriamiento, se sembró con un cultivo sobre gelosa de la familia de Streptomyces ambofaciens NRRL 2420. El cultivo se agitó en una mesa sacudidora durante 48 horas.

10.

Por otra parte, unos erlenmeyers de 300 cm³ se cargaron con 50 cm³ del medio siguiente:

Corn steep (50% extracto seco) 35 g.

Glucosa 50 g.

15. Cloruro de sodio 20 g.

Fosfato monopotásico 2 g.

Sulfato de magnesio 1 g.

Agua corriente 1000 cm³.

El pH se ajustó a 6,8 con sosa. Después se añadió:

20.

Carbonato de calcio 5 g.

Luego se añade propionamida en las proporciones indicadas en la tabla que se cita a continuación que reúne los resultados obtenidos.

25.

Los erlenmeyers se esterilizan durante 20 minutos a 120° luego, después de enfriamiento, se sembraron con 4 cm³ del cultivo en erlenmeyer de 2 litros, y se pusieron a agitar a 25° sobre una máquina de sacudidas. Las dosis y el análisis del antibiótico se efectuaron

30.

a los 6, 7 y 8 días de cultivo, después de determinar la

241435

- 17 -



actividad máxima y las proporciones respectivas de las 3 espi ramicinas.

5.	Contenido del medio en propionamida g/l.	Actividad máxima mog/cm ³ .	Proporción en peso de las espi ramicinas %		
			I	II	III
	0	285	51	26	23
	1	205	27	18	55
	2	175	24	10	66
10.	4	150	15	7	78

EJEMPLO 2 -

En un fermentador de 170 litros se carga:

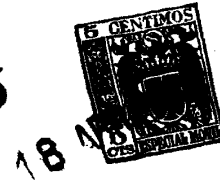
	Corn steep (50% extracto seco)	4,800 kg.
	Glucosa	2,400 "
15.	Cloruro de sodio	0,600 "
	Sulfato de magnesio	0,120 "
	Agua corriente	100 litros

El pH se ajustó a 6,8 por sosa y la carga se completó con:

20.	Carbonato de calcio	0,600 kg.
	Aceite de soja	0,480 l.

El medio se esterilizó a 120° durante 45 minutos. Después de haberse puesto a la temperatura de 20°, el medio se sembró con 250 cm³ de un cultivo erlenmeyer agitado de S.ambofaciens.

25. El cultivo en fermentador se aireó y se agitó durante 25 horas y sirvió para sembrar el cultivo productor. Este se efectuó en fermentador de 30 litros



cargado con el medio siguiente:

- Autolizado de levadura 300 g.
- Glucosa 750 g.
- Propionamida 30 g.
- 5. Cloruro de sodio 300 g.
- Sulfato de magnesio 15 g.
- Fosfato monopotásico 15 g.
- Agua corriente 16,5 litros

10. El pH se ajustó a 6,5 por medio de sosa. La carga se completó con:

- Carbonato de calcio 75 g.
- Aceite de soja 60 cm³

15. El medio se esterilizó durante 40 minutos a 120°. Después de enfriamiento el volumen es de 15 litros y el pH de 6,8.

El medio se sembró después por paso de 2 litros de cultivo inoculum en fermentación de 170 litros, después se agitó con una turbina giratoria a 550 v/min. se aireó con 1 m³/hora de aire y se mantuvo a 25°.

20. Desde el principio de la operación el pH descendió regularmente para alcanzar 5,6 hacia unas 60 horas; esta primera fase corresponde exactamente al consumo de glucosa. El pH vuelve a subir después lentamente hasta 90 horas (6,2) y después más bruscamente;

25. pasa a 7 a 100 horas. La actividad final del mosto es de 645 mcg/cm³. La proporción respectiva en peso de las tres espiramicinas producidas es la siguiente:

I : 12% II : 13% III : 75%

30. Una operación realizada paralelamente sobre el mismo medio pero sin propionamida ha dado en 120 horas

241435



una actividad de 760 cmg/cm³, con la distribución siguiente:

I : 24% II : 53 % III : 23 %.

EJEMPLO 3 -

5. El cultivo inoculum se efectuó, como en el Ejemplo II. El cultivo productor se efectuó esta vez en fermentador de 800 litros, cargado con el medio siguiente:

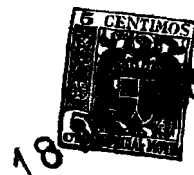
	Almidón	16 kg.
	Cloruro de amonio	1,600
10.	Propionamida	1,600
	Cloruro de potasio	1,200
	Cloruro de sodio	6,800
	Fosfato monopotásico	2
	Sulfato de magnesio	0,400
15.	Acido cítrico	0,400
	Sulfato de cinc a 7 OH ₂	40 g.
	Cloruro de cobalto a 6 OH ₂	0,12 g.
	Agua corriente	370 litros

20. El pH se ajustó a 6,7 mediante adición de 1450 cm³ de sosa a 36° Bé.

La carga se completó por:

	Carbonato de calcio	2 kg.
	Aceite de soja	1.600 cm ³ .

25. El medio se esterilizó por borboteo de vapor durante 40 minutos a 120°. Después de enfriamiento el volumen es de 400 litros y el pH de 6,7. El medio se sembró después por traspaso de 40 litros de cultivo inoculum en fermentador de 170 litros, después se agitó en una turbina giratoria a 205 v/min., se aireó con 15 m³/hora de aire y se mantuvo a 25°. Después de 150 horas de



cultivo, la actividad del mosto es la máxima: 660 mcg/cm³.
La proporción respectiva en peso de las tres espiramicinas
producidas es la siguiente:

I : 17 % II : 8% III : 75 %

5. EJEMPLO 4 -

Un erlenmeyer de 2 litros se cargó con
250 cm³ del medio siguiente:

	Corn steep (50% de extracto seco)	40 g.
	Almidón	20 g.
10.	Cloruro de sodio	5 g.
	Sulfato de magnesio	1 g.
	Fosfato monopotásico	2 g.
	Agua corriente (la necesaria)	1000 cm ³

15. El pH se ajustó a 6,8 mediante sosa y se
añadió al medio:

	Carbonato de calcio	5 g.
--	---------------------------	------

20. Este medio es esterilizado durante 45 minutos
a 120°. Después de enfriado se sembró con un cultivo
sobre gelosa de la familia de *S.ambofaciens*. El cultivo
se puso en agitación en una mesa sacudidora durante
48 horas a 25°.

Por otra parte, unos erlenmeyers de 300 cm³ se
cargaron con 40 cm³ del medio siguiente:

	Corn steep (50% de extracto seco)	45 g.
25.	Glucosa	50 g.
	Carbonato de calcio	25 g.
	Agua corriente(la necesaria)	1000 cm ³

El pH del medio se ajustó a 7,0 con sosa. El
medio se esterilizó después durante 30 minutos a 120°.

30. Después de enfriamiento, se sembró el contenido de cada

241435

- 21 -



- erlenmeyer con 4 cm³ del cultivo inoculum precedente. El cultivo se puso en agitación en una máquina sacudidora a 25°. Después de 48 horas el desarrollo del hongo es excelente. Se añaden entonces a cada erlenmeyer 20 cm³
5. de una solución acuosa estéril que contiene 12 g/l de espiramicina I pura en estado de base y 6 g/l de propionato de sodio. Se mantiene la agitación del cultivo durante 24 horas, después se mezcla el contenido de todos los erlenmeyers. El análisis cromatográfico del
10. caldo muestra que este último encierra 2,6 g/l de espiramicina I no transformada y 1,4 g/l de una mezcla que contiene 20% de espiramicina II y 80% de espiramicina III.

EJEMPLO 5 -

15. Se cargaron unos erlenmeyers de 300 cm³ con 40 cm³ del medio siguiente:
- | | |
|----------------------------|-------------------------------------|
| Extracto de levadura | 30 g. |
| Glucosa | 50 g. |
| Carbonato de calcio | 25 g. |
| 20. Agua corriente | (la necesaria) 1000 cm ³ |
- El pH del medio se ajustó a 7,0 con adición de carbonato de calcio. El medio se esterilizó después durante 30 minutos a 120°. Después de enfriamiento el contenido de cada erlenmeyer se sembró con 4 cm³ de un
25. cultivo inoculum preparado en las condiciones descritas en el ejemplo 4. El cultivo se puso en agitación en una mesa sacudidora a 25°. Después de 48 horas de desarrollo, se añadió en cada erlenmeyer 20 cm³ de una solución acuosa estéril conteniendo 12 g/l de espiramicina I pura en
30. estado de base y 6 g/l. de propionato de sodio. Se deja



- incubar el cultivo sobre la mesa sacudidora durante 3 días. Pasado este tiempo, el contenido de los erlenmeyers se ha mezclado. El análisis cromatográfico del caldo de cultivo demuestra que hay todavía 2,1 g/l de espiramicina I no transformada y 1,9 g/l de espiramicina I transformada en una mezcla que contiene 6% de espiramicina II y 94% de espiramicina III.

EJEMPLO 6 -

- Se cargaron unos erlenmeyers de 300 cm³ con 40 cm³ del medio siguiente:
- | | |
|---------------------------|--------------------------------------|
| Cloruro de amonio | 6 g. |
| Glucosa | 25 g. |
| Carbonato de calcio | 20 g. |
| Agua corriente | (la necesaria) 1000 cm ³ |

- Estos erlenmeyers se esterilizan, se siembran y se cultivan en las condiciones descritas en el ejemplo 5. Después de 48 horas de cultivo, se añaden a cada erlenmeyer 20 cm³ de una solución acuosa estéril que contenga 9 g/l de espiramicina I pura en estado de base y 21 g/l de propionamida.

- Después de 3 días de incubación el análisis cromatográfico del caldo demostró que 1,86 g/l de espiramicina I se habían transformado en una mezcla que contenía 55 % de espiramicina II y 45 % de espiramicina III. Quedó por otra parte, 1,14 g/l de espiramicina I no transformada.

EJEMPLO 7 -

- Un cultivo de *S.ambofaciens* se efectuó en las condiciones descritas en el ejemplo 6. La solución que contiene la espiramicina base encierra además 6 g/l de propionato de sodio. Se halló, según la cromatografía sobre papel



del caldo de cultivo, que quedaba 0,96 g/l de espiramicina I no transformada y que 2,04 g/l de espiramicina I se habian transformado en una mezcla que contenia 11% de espiramicina II y 89% de espiramicina III.

5. EJEMPLO 8 -

Se cargaron unos erlenmeyers de 300 cm³ con 40 cm³ del medio siguiente:

	Cloruro de amonio	10 g.
	Glucosa	50 g.
10.	Carbonato de calcio	25 g.
	Agua corriente(la necesaria)	1000 cm ³ .

Estos erlenmeyers se esterilizaron, se sembraron y se cultivaron en las condiciones descritas en el Ejemplo 5. Después de 48 horas de cultivo, se añadieron a cada

15. erlenmeyer 20 cm³ de una solución acuosa estéril que encerraba 12 g/l de espiramicina I pura en estado de base y 6 g/l de propionato de sodio. Los erlenmeyers se dividen entonces en cuatro lotes. El primer lote permanece tal cual es. A los tres otros lotes se añadieron respectivamente sulfato de magnesio, sulfato férrico y cloruro de cobalto, siendo tales las adiciones de estas sales que cada metal se encuentra a la concentración de 1 milimolécula por litro en el medio de transformación. Después de 3
20. días de incubación, los erlenmeyers de cada lote se mezclaron
25. entre sí y su contenido se analizó por cromatografía sobre papel. Los resultados del análisis son los siguientes:



241435

- 24 -

Activador	Cantidad de espiramicina I transformada g./l.	Proporción de las espiramicinas %	
		II	III
0	1,88	21	79
5. Magnesio	2,12	28	72
Hierro	2,32	30	70
Cobalto	2,80	27	73

EJEMPLO 9 -

10. Unos erlenmeyers de 300 cm³ se cargaron, se esterilizaron, se sembraron y se cultivaron en las condiciones descritas en el ejemplo 8. Después de 48 horas de cultivo los erlenmeyers se dividieron en dos lotes. Cada erlenmeyer del primer lote recibió 20 cm³ de una solución acuosa estéril que encerraba 12 g/l de espiramicina

15. I pura en estado de base y 6 g/l de propionato de sodio. Cada erlenmeyer del segundo lote recibió 20 cm³ de la misma solución a la que se añadieron 30 g/l de cloruro de sodio. Cada lote de erlenmeyer se trató como anteriormente y el resultado del análisis cromatográfico es el siguiente:

20.

ClNa g./l.	Cantidad de espiramicina I transformada g./l.	Proporción de las espiramicinas %	
		II	III
0	1,88	21	79
25. 10	2,60	23	77

EJEMPLO 10 -Unos erlenmeyers de 300 cm³ se

41435

18 ABR 6



cargaron con 50 cm³ del medio siguiente:

- Cloruro de amonio 10 g.
- Glucosa 50 g.
- Carbonato de calcio 25 g.

5. Agua corriente (la necesaria) 1000 cm³

Estos erlenmeyers se esterilizaron ,se sembraron y se cultivaron en las condiciones descritas en el ejemplo 5.

10. Después de 52 horas de cultivo, cada erlenmeyer recibió 1 cm³ de una solución a 15% de propionato de sodio, después se dividieron los erlenmeyers en dos lotes. Cada erlenmeyer del primer lote recibió 2 cm³ de una solución al 15% de espiramicina I pura, en estado de base en el metanol. Cada erlenmeyer del segundo lote recibió una

15. solución de la misma composición,pero en acetona. Se deja incubar el cultivo durante 72 horas en la mesa sacudidora. El contenido de los erlenmeyers de un mismo lote se reunió y se analizó cromatográficamente. Los resultados de la transformación son los siguientes:

Disolvente	Cantidad de espiramicina I transformada g./l.	Proporción de las espiramicinas %	
		II	III
Metanol	3,48	24	76
Acetona	3,36	27	73

25. EJEMPLO 11 -

Unos erlenmeyers de 300 cm³ se cargaron como en el ejemplo precedente, se esterilizaron en 30 minutos a 120° y se sembraron cada uno con 6 cm³ de un cultivo inoculum preparado del modo indicado en el ejemplo 4. Los



erlenmeyers se ponen en incubación sobre una mesa de sacudidas a 25°. Los erlenmeyers se dividen en 3 lotes. Después de 48 horas de cultivo, cada erlenmeyer del primer lote recibió 2 cm³ de una solución a 15% en metanol de espiramicina I pura en estado de base y 1 cm³ de una solución acuosa a 15% de propionato de sodio. Las mismas adiciones se efectuaron en cada uno de los erlenmeyers de los otros dos lotes, pero después de 72 y 96 horas respectivamente de cultivos. El cultivo se continúa, en cada caso, tres días después de la adición de espiramicina. El contenido de los erlenmeyers de un mismo lote se analizó por cromatografía sobre papel. El cuadro siguiente indica los resultados del análisis.

15. Adición de espiramicina horas	Cantidad de espiramicina I transformada g./l.	Proporción de las espiramicinas %	
		II	III
48	3,00	16	84
72	3,06	18	82
96	1,62	28	72

EJEMPLO 12 -

20. Se cargaron unos erlenmeyers de 300 cm³ con 50 cm³ del medio siguiente:

Nitrato de amonio 13 g.
 Glucosa 50 g.
 Carbonato de calcio 25 g.

25. Agua corriente(la necesaria) 1000 cm³.

Los erlenmeyers se esterilizaron durante 30 minutos a 120° se enfriaron y se sembraron con 5 cm³

241435



- 26 - bis.

de un cultivo inoculum cuya preparación se describe en el ejemplo 4. Después de tres días de cultivo a 25° en una mesa de sacudidas, se añaden a cada erlenmeyer 5 cm³ de una solución acuosa que encierre 100 g/l de espiramicina I pura en estado de base, 38 g/l de ácido propiónico, 10 g/l de cloruro de cobalto hexahidratado y cuyo pH se ha puesto a 6,5 mediante adición de sosa. Se deja continuar el cultivo tres días suplementarios y se analiza el contenido de los erlenmeyers por cromatografía sobre papel. 8,70 g/l de espiramicina I se han transformado en una mezcla que contenía 9% de espiramicina II y 91 % de espiramicina III.

EJEMPLO 13 -

Se cargaron unos erlenmeyers de 300 cm³ con 50 cm³ del medio siguiente:

15.	Nitrato de amonio	20 g.
	Almidón	60 g.
	Carbonato de calcio	25 g.
	Agua corriente (la necesaria)	1000 cm ³

Los erlenmeyers se esterilizaron ,se sembraron y se pusieron en incubación en las condiciones descritas en el ejemplo 5. Después de 96 horas de cultivo, se añade a cada erlenmeyer 5 cm³ de una solución acuosa que contenía 140 g/l de una espiramicina bruta en estado de base (compuesta de 59, 27 y 14% de espiramicina I, II y III respectivamente) 56 g/l de ácido propiónico 0,5 g/l de cloruro de cobalto hexahidratado y puesto a un pH de 6,5 con ayuda de lejía de sosa. Se deja que continúe el cultivo durante 3 días y se analiza cromatográficamente el contenido de los erlenmeyers. Sobre los 8,26 g./l. de espiramicina I añadidos, 6,30 g/l. se han transformado

241435

- 27 -



18 AB

en una mezcla que contenía 13 % de espiramicina II y 87 % de espiramicina III.

EJEMPLO 14 -

5. Dos erlenmeyers de 300 cm³ se cargaron con 50 cm³ del medio siguiente:
- | | |
|---------------------------|---|
| Cloruro de amonio | 10 g. |
| Glucosa | 50 g. |
| Carbonato de calcio | 25 g. |
| Agua corriente | (la necesaria) ... 1000 cm ³ |
10. Los erlenmeyers se esterilizaron, se sembraron y se pusieron a incubar en las condiciones que se describen en el ejemplo 5. Después de 72 horas de cultivo, el contenido de los erlenmeyers se centrifugó y se eliminó el líquido que sobrenada. La mitad del residuo de centrifugación volvió a ponerse en suspensión en 50 cm³ de una solución acuosa colocada en un erlenmeyer de 300 cm³ y que contenía 6 g/l de espiramicina I pura en estado de base, 2,3 g./l. de ácido propiónico, 1 g./l. de cloruro de cobalto hexahidratado y se puso a pH 6,5 mediante adición de lejía de sosa. La otra mitad del residuo de centrifugación se volvió a poner en suspensión en 50 cm³ de una solución acuosa de la misma composición, pero que encerraba además 10 g/l. de glucosa.
20. Los dos erlenmeyers que contenían la suspensión de micelio se pusieron a incubar a 23° en una mesa sacudidora durante 2 días. Después de este tiempo el contenido de cada uno de los erlenmeyers se analizó por cromatografía. Los resultados de la transformación son los siguientes:
- 25.

- 28 241435

18



	Cantidad de espiramicina I transformada. g./l.	Proporción de espiramicina %	
		II	III
sin glucosa	2,22	14	86
sin glucosa	3,70	14	86

5.

EJEMPLO 15.

Un erlenmeyer de 300 cm³ se cargó con 50 cm³ del medio siguiente:

- Cloruro de amonio 10 g.
- Glucosa 50 g.
- Carbonato de calcio 25 g.
- Agua corriente
(la necesaria) 1000 cm³.

10.

El erlenmeyer se esterilizó, se sembró y se puso a incubar en las condiciones que quedan descritas en el ejemplo 5. Después de 72 horas de cultivo, el contenido del erlenmeyer se centrifugó y el líquido que sobrenadaba se eliminó. El residuo de centrifugación se puso en suspensión en 50 cm³ de una solución tampón cargada en un erlenmeyer de 30^o cm³. Esta solución tampón contiene

15.

9,85 g/l de ácido acético cristalizabile y 4,9 g/l de acetato de sodio. Tiene un pH de 4. Contiene además 6,45 g/l de clorhidrato de espiramicina I pura y 1 g/l de cloruro de cobalto hexahidratado. El erlenmeyer que contiene la suspensión de micelio se pone a incubar a 25° en una mesa sacudidora durante 80 horas. Se analiza entonces por comatografía sobre papel, el contenido del erlenmeyer. Se comprueba así que 2,40 g/l. de espiramicina I se han transformado en una mezcla que contiene 90% de espiramicina

20.

25.



II y 10% de espiramicina III.

EJEMPLO 16 -

En un fermentador de 170 litros se cargan respectivamente:

- 5. Corn steep (50% de extracto seco) 4800 g.
- Almidón 2.400 g.
- Cloruro de sodio 600 g.
- Sulfato de magnesio 120 g.
- Fosfato monopotásico 240 g.
- 10. agua corriente 100 l.

El pH se ajustó a 6,7 con 750 cm³ de lejía de sosa a 400 g/l NaOH.

Después se añadió:

- Carbonato de calcio 600 g.
- 15. Aceite de soja 60 g.
- Antiespumante de silicona 60 cm³

El fermentador y su contenido se esterilizaron por borboteo de vapor en 40 minutos a 122° ,lo cual puso el volumen final a 120 litros. Después de enfriamiento

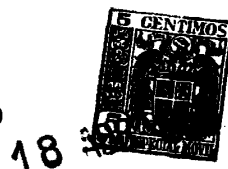
- 20. y puesta la temperatura a 25°, el fermentador se sembró con los 250 cm³ de un cultivo inoculum preparado como se ha indicado en el ejemplo 4. El medio se agitó después con una hélice giratoria a 350 v/m. y se aireó con 5 m³ de aire. Después de 25 horas de cultivo el desarrollo de
- 25. S.ambofaciens es abundante.

Por otra parte, se carga en un fermentador de 30 litros.

- Cloruro de amonio 150 g.
- Glucosa hidratada 750 g.
- 30. Agua corriente 14 l.

241435

- 30 -



18

5. El fermentador y su contenido se esterilizaron en 40 minutos a 122°. Después de enfriamiento y puestos a la temperatura de 25°, se añadieron 375 g. de carbonato de calcio en suspensión estéril en 2 litros de agua, lo cual pone el volumen del medio a 15 litros. El pH es entonces de 7,5.

10. Se siembra con 1,5 litros del cultivo inoculum en fermentador de 170 litros, descrito anteriormente y conservado durante 23 horas. Se agita el medio con una hélice giratoria a 550 v/min. y se airea a razón de un m³/h de aire. Después de 48 horas de cultivo *S.ambofaciens* presenta un buen desarrollo y el medio de cultivo tiene un pH de 6,5. Entonces se añade al medio una solución compuesta de:

15.	Espiramicina base	150 g.
	Propionato de sodio	19 g.
	Cloruro de cobalto hexahidratado	17 g.
	Solución N de ácido propiónico	300 cm ³
	Agua destilada	1000 cm ³

20. La espiramicina base empleada es un producto bruto que contiene 65, 23 y 12% de espiramicina I, II y III respectivamente.

25. Se prosigue el cultivo en las mismas condiciones de temperatura, de agitación y de aireación durante 90 horas. Se vacía después el fermentador y se obtienen 13,75 litros de caldo. La cromatografía sobre papel del caldo demostró que toda la espiramicina I había sido transformada en una mezcla de espiramicina II y III siendo sus proporciones respectivas de 29 y 71% en el producto final. La extracción del caldo permite obtener 122 g. de espiramicina

30.



base compuesta de 25% y 75% de espiramicinas II y III.

N O T A

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica,

5. debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle, en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a las solicitudes de patente presentadas en Francia: n^o 736.864 de fecha 19 de abril de 1957 y n^o 759.045 de fecha 25 de febrero de 1958, acogiéndose, por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor y siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención, por
10. 20 años en España: "Procedimiento perfeccionado para la preparación de antibióticos"; caracterizándose por lo siguiente:
- 15.

1^a.- Procedimiento perfeccionado para la preparación de antibióticos, es decir de la espiramicina II y de la espiramicina III o de sus mezclas, caracterizándose porque se realiza la fermentación de *Streptomyces ambofaciens* sobre un medio elegido en el grupo constituido por los medios habituales complejos, los medios sintéticos y los medios que contienen la espiramicina I en presencia de agentes acilantes, como los que pertenecen al grupo constituido por los derivados del ácido acético y del ácido propiónico, efectuándose la fermentación a una temperatura comprendida entre 15 y 40^o, a un pH de 5 a 8 durante un período de 1 a 6 días.

20. 2^a.- Procedimiento según la reivindicación 1^a,
- 25.
- 30.

241435 18/20



caracterizándose porque la fermentación se efectúa en presencia de un agente acetilante elegido en el grupo constituido por el ácido acético, sus sales alcalinas y la acetamida.

3º.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizándose porque la fermentación se efectúa en presencia de un agente propionilante elegido en el grupo constituido por el ácido propiónico, sus sales alcalinas y la propionamida.

4º.- Procedimiento perfeccionado para la preparación de antibióticos; tal y como queda substancialmente descrito en la presente memoria, que consta de treinta y dos hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

1958

1958

SOCIÉTÉ DES USINES CHIMIQUES RHONE-POULENC.

1958