

25 1407



C.G.

- 1 -

## *Memoria Descriptiva*

*para*

una patente de Invención  
por veinte años en España

*a favor de* la r.s.

LEPETIT S.p.A.

- de nacionalidad italiana -

*residente en*

Milano ( Italia )

Vía Roberto Lepetit 10

*por:*

" PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE UN NUEVO ANTIBIÓTICO "

=====

Con la prioridad de solicitud patente británica nº 25905 del  
día 12 de Agosto de 1958.

=====

INVENTORES: Piero Sensi y Pinhas Margalith, de nacionalidad  
italiana.

=====



# 251407

El invento se refiere a sustancias con propiedades antibióticas y a los procedimientos de su preparación.

Más particularmente, en conformidad con el presente invento se obtiene un nuevo y mejorado antibiótico que contiene rifomicina y sus componentes A, B, C, D, E.

El presente invento se refiere también a un procedimiento para la producción de rifomicina y de sus componentes, el cual comprende el cultivo de una cepa productora de rifomicina del Streptomyces mediterranei, como después se describe, o cualquier mutación de la misma producida natural o artificialmente, en un medio de cultivo conteniendo elementos asimilables de carbohidratos, nitrógeno y sales inorgánicas, hasta que se comunique al medio de cultivo una actividad antibiótica importante, y recuperando de dicho medio la rifomicina y sus componentes.

La cepa Streptomyces mediterranei se ha aislado de una muestra de tierra vegetal cerca de St. Raphael (Francia) y presenta las siguientes características, observadas en varios medios en cultivos inclinados durante veinte días a 28°C. La determinación del color se realizó según Maerz and Paul's Dictionary of Colour; Mc Graw Hill 1950.

Harina de avena agar

: Perfecto desarrollo con superficie lisa. Micelio vegetativo hialino a amarillento con reverso rosado. Micelio aéreo blancuzco con tinte rosado. Trazas de pigmento amarillo soluble.



3.-

251407

5  
Levadura-extracto-glucosa agar: Abundante desarrollo amarillento a rosado con superficie áspera. Escaso micelio aéreo. Pigmentación nula de los medios.

10  
Emerson glucosa agar : Abundante desarrollo amarillento a naranja pálido con superficie áspera. El micelio aéreo se torna rosado (2/B/8). Pigmento soluble color ambar pálido.

15  
(') Mezcla-harina de avena agar: Buen desarrollo liso, amarillento con ligero tinte naranja. Micelio aéreo blanquecino a rosado. Pigmento soluble ambarino.

20  
Agar Benett : Buen desarrollo, amarillento mudable en naranja-amarillo. El micelio aéreo se torna rosado. Pigmento ligeramente ambarino.

Agar Penassay (Difco) : Desarrollo pobre.

25  
(\*) Extracto harina de avena melaza agar : Abundante desarrollo, superficie áspera, incoloro hasta amarillento, micelio aéreo blancuzco, pigmento soluble ambarino intenso. (12/H/10)



4.-

251407

- 5 Sucrosa-dox Czapek agar : Desarrollo pobre, delgado e incoloro hasta ligeramente melón (11/A/8). Trazas de micelio aéreo blanco rojizo. Ningún pigmento soluble.
- Patata agar : Desarrollo pobre, delgado e incoloro. Trazas de micelio aéreo blancuzco. Ningún pigmento soluble.
- 10 Patata : Pobre desarrollo hialino, ningún cambio en el color de la patata.
- 15 Glucosa-asparagina agar : Desarrollo muy bueno con superficie lisa. Delgado micelio vegetativo de color rosado ligeramente naranja (10/B/12) y reverso amarillento. Ningún micelio aéreo. Algún pigmento soluble ligeramente amarillo.
- 20 Glicerol-asparagina agar : Como la glucosa-asparagina agar.

(\*) La mezcla de harina de avena agar contenía, además de la harina de avena (20 g. de avena cocida, filtrados los copos): Hidrolizado de caseína enzimática, 5g.; extracto de carne de vaca, 3 g.; sucrosa, 10 g.; agar, 40 g. en 1000 ml. de H<sub>2</sub>O destilada, corregido el pH a 6,9.



5.-

251407

(\*) Extracto de harina de avena, melaza, agar, conteniendo: glicerol, 7,5 g.; melaza, 7,5 g.; extracto de harina de avena 5 g.; NaCl 4 g.; agar agar 30 g.; H<sub>2</sub>O destilada 1000 ml.; pH corregido a 6,0.

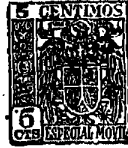
- 
- |    |                               |  |
|----|-------------------------------|--|
| 5  | Agar nutritivo                | : Desarrollo moderado con superficie lisa; rosado melón a naranja (2/B/10) con reverso naranja amarillento. Micelio aéreo blanco rosado. No existe pigmento soluble. |
| 10 | Agar Pridham                  | : Desarrollo moderado, liso, incoloro con manchas de rojo langosta (2/O/11). Micelio aéreo rosado. Ninguna pigmentación del medio.                                   |
| 15 | Fécula agar                   | : Desarrollo pobre, incoloro a rosado ligeramente naranja. Hidrolisis dudosa de la fécula. Escaso micelio aéreo blanqueado.  |
| 20 | Dextrosa-triptona agar        | : Abundante desarrollo, rosa naranja con reverso amarillo dorado a rosa naranja. Micelio aéreo rosado. Pigmento soluble ligeramente amarillo dorado (9/J/6).         |
|    | Cobalto-agar Hickey y Tresner | : Desarrollo moderado, hialino a naranja ligeramente rosado. Algún micelio aéreo. Algún pigmento soluble amarillento.  |
| 25 | Tirosina agar                 | : Pobre desarrollo.  |
|    | Ca-malato-agar                | : Buen desarrollo, incoloro. Micelio aéreo   |



6.-

251407

		: blanquecino con tinte rosado. Ningún pigmento soluble. Digestión parcial del Ca-malato.
5	Albúmina Dorset agar	: Buen desarrollo, rosado. Ningún micelio aéreo ni pigmentación del medio.
	Gelatina	: Ninguna pigmentación. Licuefacción pequeña e incompleta.
10	Nitratos	: Desarrollo superficial, con micelio aéreo sonrosado. Ninguna reducción en nitritos. El caldo se torna amarillento.
	Lechada de tornasol	: Ninguna peptonización ni coagulación. Reacción ligeramente alcalina.
15	Celulosa	: Ningún desarrollo sobre discos de papel filtrante colocados sobre agar, con base mineral, exenta de carbohidratos.
20	Temperatura	: Optima, 28°C. A 37°C. tiene lugar algún desarrollo, pero los caracteres son menos distintos.
25	Morfología de las colonias:	Sobre agar Bonette esta raza forma pequeñas colonias, (ordinariamente de diámetro no mayor de 2mm) con contornos bien definidos, superficie compacta pero áspera; recubiertas con micelio aéreo blancuzco. Un



7.-

251407

5 gran número de colonias colocadas sobre agar no desarrolla micelio aéreo, y permanece en su micelio vegetativo rojo-naranja, que se desarrolla en un espesor considerable hasta que viene a adquirir un aspecto a modo de roca.

10 Esporulación

: Ms/83 ordinariamente no esporula sobre los medios de cultivo antes señalados. Cuando tiene lugar la esporulación, las esporas aparecen en cadenas largas algo torcidas; las espirales no son comunes. Las esporas son de forma elipsoidal a oblonga (0,8-1,0 $\mu$  x 3,0-5,0 $\mu$ ).

15 Test para la utilización de fuentes de carbono

20 25 : Los cultivos sobre agar de base mineral suplementados con varias fuentes según Pridham y Gottlieb no presentan ningún desarrollo: Rafinosa, acetatos, citratos, glicina. Todas las otras fuentes de carbono examinadas mantienen un crecimiento moderado a bueno (xilosa, arabinosa, glucosa, ramnosa, fructosa, manosa, galactosa, lactosa, sucrosa, maltosa, glicerol, manitol, inositol, succinato y salicina).



8.-

251407

El *Streptomyces mediterranei* se puede caracterizar por:

- 1) Su no adherencia al grupo cromogénico de los estreptomifetos.
- 2) En muchísimos medios vegetativos el desarrollo adquiere un color amarillento a naranja ligeramente rosado pero no un rojo naranja intenso hasta carbonoso.
- 3) El micelio aéreo es blanco rosado, pero no adquiere ningún color naranja o lavanda. Esporulación pobre en la mayoría de los medios.
- 4) Los acetatos, citratos, rafinosa y glicina no se utilizan como fuentes de carbono.

Por lo que se refiere a la producción de rifomicina se ha indicado que el invento no se limita al empleo de la cepa antes descrita de *Streptomyces mediterranei* o a otras cepas correspondientes a la misma descripción, sino que comprenden también el empleo de variantes de estas cepas, como las que se obtienen, por ejemplo, mediante selección de variantes o de mutantes obtenidas por tratamiento de suspensiones de esporas con agentes autogénicos, por ejemplo de radiaciones U.V., gas mostaza etc..

Para producir rifomicina, se cultiva *Streptomyces mediterranei* o cualquier otro microorganismo productor de rifomicina a una temperatura entre 25° y 37°C y preferentemente a 28°C, en cultivo aireado sumergido en un medio de cultivo acuoso conteniendo una fuente de nitrógeno asimilable. Como fuente de carbono pueden emplearse los carbohidratos después señalados, y derivados de carbono, por ejemplo glucosa, xilosa,



9.-

251407

5 lactosa, sucrosa, maltosa, glicerol, manitol, inositol, succinato de fécula, dextrina, etc. etc. Son fuentes útiles de nitrógeno, por ejemplo los amino-ácidos y mezcla de los mismos, los péptidos y proteínas y sus hidrolizados como peptona, extracto de carne, extracto de harina de avena, harina de soja, corn steep liquor, solubilizaciones de pescado, fracciones acuosas de granos de semilla, destilados solubles etc. La fermentación puede llevarse a cabo durante 24 a 120 horas. El pH inicial se ajusta ordinariamente a unos 7 a 8, decrece en el  
10 decurso de la fermentación a 5-7. Ordinariamente los mejores resultados se obtienen después de un tiempo de fermentación de 48-72 horas; después de este tiempo se logra un excelente rendimiento en antibiótico.

15 Después de completada la fermentación puede aislarse la rifomicina por el siguiente procedimiento:

20 El medio de fermentación se filtra a un pH final de 5,0 a 7,0, o después de haberse ajustado a 7,5-8,5, a una temperatura de 26-28°C o inferior. El filtrado se ajusta rápidamente a pH ácido para asegurar la estabilización óptima de la sustancia antibiótica. La sustancia activa se extrae con disolventes insolubles en agua, como butanol, acetato de etilo, propilo, butilo o amilo, cloroformo. La relación entre el volumen del medio y el del disolvente puede variar según el disolvente elegido; de ordinario la relación es de  
25 2:1 a 10:1.

Una parte de la sustancia antibiótica es insoluble en medio ácido y por filtración puede recuperarse di-



10.-

251407

5 rectamente del medio, si se quiere, en algunos casos, el filtrado puede extraerse con disolvente orgánico para recuperar más antibiótico activo. La porción insoluble puede disolverse en el mismo disolvente y combinarse con el extracto orgánico procedente de la extracción del filtrado. El medio acuoso residual, después de extraído, contiene todavía actividad micro-  
biológica que no puede extraerse con el disolvente orgánico usual. Puede, sin embargo, adsorberse sobre carbón a un pH ligeramente ácido y recuperarse por elución con alcoholes solubles en agua, por ejemplo metanol o etanol.

10 Los micelios retienen también alguna actividad microbiológica. Esta puede extraerse del micelio por los disolventes antes citados o simplemente por algunos lavados con agua, y de la disolución acuosa acidificada la actividad  
15 biológica se transmite a los disolventes arriba citados.

Una vez que la actividad antibiótica se ha transferido al disolvente, este se destila al vacío a un pequeño volumen bajo corriente de nitrógeno a una temperatura inferior a 30°C. Por adición de éter de petróleo u otras mezclas  
20 de hidrocarburos precipita una sustancia parda que presenta una elevada actividad contra las bacterias gram-positivas y las micobacterias. Este producto impuro es un polvo amorfo de un color ligeramente pardo a pardo negro que algunas veces tiene tonalidades verdosas. Está constituido por una mezcla de  
25 sustancias con actividad antibiótica. Una cromatografía sobre papel Whatman n° 1, empleando un sistema disolvente formado



251407

5 por agua conteniendo 3 por ciento de cloruro amónico y 1 por ciento de ácido ascórbico, desarrollada sobre placa agar e inoculada con Sarcina Lútea, presenta por lo menos cinco zonas de inhibición que nosotros hemos definido con las letras mayúsculas A a E en orden creciente del valor R f desde el punto de deposición de la gota. Las manchas C y D son de ordinario más grandes que las otras. No puede excluirse la existencia de otras fracciones. La fig. 1 presenta un cromatograma obtenido como antes se ha descrito.

10 En lugar de precipitar la mezcla antibiótica del disolvente extractor, esta puede extraerse nuevamente mediante disoluciones tampon con pH 7,0 a 7,5 y luego a pH 10,0 a 10,5. Este ajuste de pH permite una separación aproximada de las diversas fracciones que forman el polvo impuro total. Con pH 7,0 a 7,5, la rifomicina B, de naturaleza marcadamente ácida, se extrae selectivamente. Las otras fracciones se extraen a un pH más elevado. Debido a la pequeña estabilidad del antibiótico en medio neutro y alcalino es necesario emplear disoluciones tampon conteniendo 0,5 a 3% de ácido ascórbico o de otras sustancias de efecto estabilizador análogo. La relación del volumen entre el disolvente y la disolución tampon alcalina varía mucho con el disolvente empleado y con el valor del pH. De una disolución en acetato de etilo conteniendo 1% de actividad, se realizan tres extracciones con 1/10 en volumen de la disolución tampon con pH 7,0-7,5 para transportar la fracción B a la fase acuosa, y tres extracciones con 1/5 en volumen de la disolución tampon con pH 10,0-10,5 con 1% de ácido ascórbico se requieren para llevar

15

20

25



12.-

251407

los otros componentes a la fase acuosa.

De la fase acuosa se obtienen los antibióticos en estado semipuro por acidificación y extracción con un disolvente como el acetato de etilo o cloroformo, por evaporación del disolvente y precipitación con éter de petróleo. Alternativamente los antibióticos pueden precipitarse de la fase acuosa por acidificación y reunirse luego.

Las purificaciones de la mezcla impura pueden realizarse por cromatografía sobre varios agentes adsorbentes, por ejemplo florisil, previamente tratado con una disolución metanólica de ácido clorhídrico. La mezcla impura se disuelve en un disolvente, por ejemplo acetato de etilo, se adsorbe sobre una columna de florisil y se eluye con el mismo disolvente o con mezcla del disolvente con polaridad creciente. Los eluatos con coeficientes microbiológicos muy elevados son los que contienen rifomicina C y D.

A continuación describimos el procedimiento para aislar los cinco componentes principales del antibiótico impuro y algunas propiedades físicas y químicas que servirán para su identificación.

Rifomicina A. Posée un coeficiente R f de 0,00-0,10 en la tira cromatográfica con el sistema antes descrito. La rifomicina A se aísla de la mezcla impura mediante división en contracorriente en un sistema de dos fases metanólico: 0,01 N ácido clorhídrico/benzeno: éter de petróleo (10:5:15:5). Después de 160 transferencias se recoge la rifomicina A en los tubos 150 160 directamente de la fase ligera. Después de concen



13.-

251407

tración y precipitación en éter de petróleo se obtiene la rifomicina A en forma de un polvo amorfo pardo oscuro.

La rifomicina A es insoluble en agua y soluble en los alcalis. Cuando se disuelve en acetato de etilo presenta en la porción visible un espectro de absorción a 460  $\mu$ . Después de agitar la disolución de acetato de etilo con una disolución ácida acuosa al 1% de cloruro estannoso, el máximo de absorción se cambia en 422  $\mu$ ; puede obtenerse el mismo efecto agitando con una disolución acuosa al 1% de ácido ascórbico. El máximo a 460  $\mu$  puede también obtenerse agitando la disolución de acetato de etilo con disolución al 0,1% de ferricianuro potásico. La rifomicina A es probablemente de naturaleza quinónica, con posibilidad de reducción oxidica reversable.

Rifomicina B- Tiene un coeficiente Rf de 0,2- 0,30 sobre la tira cromatográfica con el sistema antes descrito. La rifomicina B es de naturaleza marcadamente ácida y puede aislarse disolviendo la mezcla impura en un disolvente, como por ejemplo acetato de etilo o cloroformo, y extrayéndola de la disolución orgánica con tampón de fosfato a pH neutro (6,5-7,5). La rifomicina B pasa a la fase acuosa, y puede además precipitarse por la adición de ácidos, o extraerse nuevamente de la disolución acuosa acidificada con acetato de etilo. Después de concentrar, la fracción B de acetato de etilo precipita en un estado, semipuro. Otras cristalizaciones en acetato de etilo o benceno suministran el producto puro.



14.-

251407

La rifomicina B aparece como cristales brillantes amarillos. Se torna oscura a 165°C y no funde por bajo de 300°C. La disolución acuosa saturada posee un pH de 3,6. Es muy fácilmente soluble en agua y ácidos minerales diluidos, soluble en disoluciones de bicarbonato, con desarrollo de anhídrido carbónico. En ácido sulfúrico concentrado se disuelve con coloración roja. Es poco soluble en metanol, ligeramente en etanol, cloroformo, acetato de etilo y acetona, muy fácilmente en benzeno y prácticamente insoluble en éter de petróleo, tetracloruro de carbono, éter etílico e hidrocarburos. Decolora las disoluciones de permanganato potásico, reduce el licor de Fehling, el reactivo Tollens, absorbe el bromo, se reduce catalíticamente por hidrógeno. Por tratamiento <sup>con</sup> ácido nitroso y álcalis da una coloración roja intensa. No reacciona con ninhidrina, aunque reacciona después de fuerte hidrólisis ácida, no se disocia y no reacciona con diazoderivados aromáticos. No dá la reacción Molish y no reduce el trifeniltetrazolium. Sin embargo reacciona con cloruro férrico para dar una coloración roja.

El análisis elemental dió los siguientes resultados principales: C 61,75%; H 6,72%; N 1,88%; O 29,22%. De esto puede derivarse la siguiente fórmula condensada:

$C_{39}H_{47-53}NO_{14}$ . La rifomicina es ópticamente activa, presentando  $[\alpha]_{589}^{22} = 11^{\circ}$  (c 1, metanol, determinado en polarímetro fotoeléctrico).

Un ensayo potenciométrico en mezcla de metanol y agua presenta dos grupos funcionales ácidos:  $pH_1$  1/2



15.-

251407

unos 2,8 (peso equivalente 780),  $pH_2$  1/2 unos 6,7 (peso equivalente 765). El peso molecular determinado en ciclohexanol según Rast es de unos 750. El espectro U.V. y el visible en agua presentan un lomo a 220-230  $m\mu$  ( $E_{1cm}^{1\%} = 513$ ) y dos máximos a 305  $m\mu$  ( $E_{1cm}^{1\%} = 246$ ) y a 430  $m\mu$  ( $E_{1cm}^{1\%} = 202$ ). El máximo en el visible en acetato de etilo es a 415  $m\mu$ . El espectro U.V. y el visible de la rifomicinã B en tampon de fosfato a pH 7,3 presenta máximos a 223  $m\mu$  ( $E_{1cm}^{1\%} = 555$ ), 304  $m\mu$  ( $E_{1cm}^{1\%} = 275$ ) y a 425  $m\mu$  ( $E_{1cm}^{1\%} = 220$ ). El espectro se reproduce en la fig. 2.

El espectro infrarrojo de la rifomicina B se reproduce en la fig. 3. Presenta máximos de absorción en los siguientes valores expresados en  $cm^{-1}$ : 3465, 3330, 1742, 1730 (lomo), 1705 (lomo) 1673, 1602, 1575, 1550, 1445, 1342, 1800, 1267, 1240 (lomo), 1205, 1180, 1165, 1102, 1073, 1048, 1020, 975, 948, 915, 905, 850, 795, 760, 730, 680.

Siendo la rifomicina B de naturaleza ácida, dá sales con bases inorgánicas y orgánicas. Nosotros hemos preparado las sales mono y disódicas, de las cuales la primera es ligeramente soluble en agua y la última francamente soluble. Las disoluciones presentan un pH 5,2 y unos 7,0 respectivamente. Estas disoluciones son muy estables.

Las sales con las siguientes bases orgánicas se han preparado también: dibencilamina, quinina, 1-p-clorobenzil-2-pirrolidilmetilbenzoimidazoles, dibenziletilenodiamina, 2-metil-6-aminoheptano y otras. Todas estas sales tienen poca solubilidad en agua y presentan posibilidades de aplicación terapéutica.



16.-

251407

Rifomicinas C y D - Estas fracciones presentan en general valores idénticos  $R_f$  en la mezcla cromatográfica indicada ( $R_f=0,45 - 0,55$ ). Las zonas de inhibición son continuas y se unen por un istmo largo. Las rifomicinas C y D se aislan en estado sempuro de la mezcla impura por división en contracorriente en un sistema bifásico formado por metanol: 0,01-N ácido clorhídrico/benzeno: éter de petróleo (10:5:15:5). Con 85 transferencias el máximo de rifomicina C se forma entre el tubo 55 y el 65 y de rifomicina D entre el tubo 35 y el 45.

Extrayendo los contenidos de los tubos con benzeno o acetato de etilo o clorofomo u otros disolventes similares, concentrando los extractos y precipitando con éter de petróleo u otras mezclas de hidrocarburos, se obtienen las dos rifomicinas como polvos amorfos con un elevado grado de pureza.

Las rifomicinas C y D aparecen como polvos pardo oscuro con tonalidades verdosas. Son solubles en los disolventes orgánicos usuales, prácticamente insolubles en agua. Una disolución acuosa en tampon con pH 8,0-10,0 se obtiene agregando ácido ascórbico como agente estabilizador. Los espectros U.V. y visible de las dos rifomicinas C y D son similares. Los máximos a 385-390  $m\mu$  y 460  $m\mu$  en metanol y acetato de etilo son muy característicos. El máximo a 460  $m\mu$  en acetato de etilo se cambia en 422  $m\mu$  después de agitar la disolución en acetato de etilo de la rifomicina C o D con disolución acuosa a 0,1% de cloruro estannoso o disolución acuosa al 1% de ácido ascórbico. Agitando más con disolución acuosa al 0,1% de ferri-cianuro potásico, el espectro presenta nuevamente el máximo a



17.-

251407

460  $m\mu$ . Esto demuestra que las rifomicinas C y D son sustancias con propiedades oxido-reductoras reversibles, como las quinonas.

Propiedades de la rifomicina C.- Análisis elemental: C, 61,51%; H, 6,73%; N, 4,21%; O, 27,55% (por diferencia). La rifomicina C da reacciones positivas sobre reactivos Tollens y Fehling, con cloruro férrico, yodoformo y permanganato. La reacción con ninhidrina es negativa, pero se torna positiva después de fuerte hidrólisis ácida. El espectro visible en acetato de etilo presenta <sup>máximos</sup> a 388  $m\mu$  ( $E_{1cm}^{1\%}$  78) y a 460  $m\mu$  ( $E_{1cm}^{1\%}$  134). La rifomicina C es insoluble en agua, ácidos minerales y bicarbonato, soluble en carbonato sódico, metanol, acetato de etilo, cloroformo y acetona, e insoluble en éter etílico y éter de petróleo.

Propiedades de la rifomicina D.- Análisis elemental: C, 62.17%; H, 6.58%; N, 3.53%; O, 27.72% (por diferencia). La rifomicina D da reacciones positivas con los reactivos Tollens y Fehling, con cloruro férrico, yodoformo y permanganato. La reacción con ninhidrina es negativa antes y después de la hidrólisis. El espectro visible en acetato de etilo presenta máximos a 138  $m\mu$  ( $E_{1cm}^{1\%}$  79) y a 460  $m\mu$  ( $E_{1cm}^{1\%}$  115). Es insoluble en agua, ácidos minerales, bicarbonato, éter etílico y éter de petróleo, y soluble en carbonato sódico, metanol, acetato etílico, cloroformo y acetona.

Rifomicina E -Esta fracción presenta un coeficiente Rf de unos 0,7-0,8 sobre la tira cromatográfica. Se aísla de la mezcla impura por división en contracorriente con la mezcla metanólica: O,01-N ácido clorhídrico/benzeno; Eter de petróleo



18.-

251407

5 (10:5:15:5). Con 160 transferencias, la mayor parte de la rifomicina E se aísla en los 10 primeros tubos, por extracción de la fase acuosa ácida con acetato de etilo, concentración del extracto y precipitación con éter de petróleo. La fracción E es un polvo amorfo ligeramente pardo. El espectro visible en acetato de etilo presenta un máximo a 400 m $\mu$  que permanece inalterado después de agitar con disoluciones diluidas de ferricianuro potásico o cloruro estannoso.

10 Como antes se ha indicado, la rifomicina y sus componentes presentan un grado elevado de actividad contra las bacterias gram-positivas y las micobacterias. Tests biológicos se han efectuado separadamente con rifomicina B y con una mezcla de las rifomicinas A, C, D y E, que después se designará como «complejo de rifomicina».

15 El siguiente cuadro ilustra la actividad antibacterial in vitro de la rifomicina B y del complejo de rifomicina sobre un gran número de microorganismos gram-positivos y gram-negativos. Las cifras representan las concentraciones mínimas inhibitorias en  $\mu$ /ml.

20	Cepa	Rifomicina B	Complejo de Rifomicina
	Micrococcus pyogenes var. aureus ATCC 6538	0,025	0,01
	Micrococcus pyogenes var. aureus ATCC 13301	0,1	0,025
	Micrococcus pyogenes var. aureus ATCC 9144	0,025	0,01
	Micrococcus pyogenes var. albus ATCC 12228	0,025	0,01
25	S. pyogenes var. aureus gray Weinstein	0,1	0,05
	S. faecalis ATCC 10541	0,5	0,05
	S. hemolyticus C 203	0,025	0,0025



19.-

251407

	Cepa	Rifomicina B	Complejo de Rifomicina
	<i>S. mastitidis</i> ATCC 7077	0,5	0,05
	<i>S. bovis</i> ATCC 9809	0,25	0,025
	<i>Neisseria catarrhalis</i> ATCC 8176	0,5	0,05
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 9826	2	0,1
5	<i>Diplococcus pneumoniae</i> XXXVII L	0,05	0,01
	<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	0,5	0,025
	<i>Sarcina subflava</i> ATCC 7468	0,5	0,025
	<i>M. flavus</i> ATCC 10240	0,25	0,01
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	2,5	0,25
10	<i>B. cereus</i> ATCC 10876	5	0,25
	<i>B. anthracis</i>	1	0,05
	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 3226	0,5	0,05
	<i>klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	> 200	20
	<i>klebsiella pneumoniae capsulata</i>	> 200	100
15	<i>Escherichia coli</i> McLeod 10536	> 200	50
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Gottlieb	> 200	75
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 11251	> 200	25
	<i>Proteus vulgaris</i> X 19 H ATCC 881	> 200	50
	<i>Proteus morgani</i> ATCC 9237	> 200	50
20	<i>Protéus rettgeri</i> ATCC 9919	> 200	50
	<i>Shigella sonnei</i> ATCC 9290	> 200	75
	<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 9583	> 200	20
	<i>Salmonella typhi</i>	> 200	150
	<i>Salmonella paratyphi</i> ATCC 9150	> 200	150
25	<i>Salmonella schottmuelleri</i> ATCC 9149	> 200	150
	<i>Brucella abortus</i>	150	10
	<i>Brucella melitensis</i> ATCC 4309	75	10



20.-  
251407

	Cepa	Rifomicina B	Complejo de Rifomicina
	<i>Pasteurella pestis</i> ATCC 87 NIH	100	10
	<i>Mycobacterium ranæ</i>	50	10
	<i>Mycobacterium phlei</i> ATCC 10142	0,05	0,5
5	<i>Mycobacterium minetti</i>	100	10
	<i>Mycobacterium</i> app. 607	100	10
	<i>Nocardia asteroides</i>	> 200	50
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> var. <i>hominis</i>		
	H 37 Rv ATCC 9360	0,05	2
10	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	> 200	> 200
	<i>Tricophyton mentagrophytes</i> ATCC 8757	> 200	> 200

Por las cifras anteriores puede verse que los antibióticos son particularmente activos contra microorganismos gram-positivos, con algún grado de actividad sobre los bacillí.

15 Se ha examinado la toxicidad aguda de la rifomicina B y se ha comprobado ser extraordinariamente pequeña, particularmente si se tiene en cuenta que el antibiótico posee un grado de actividad muy elevado. El siguiente cuadro contiene los resultados obtenidos.

	Animal	vía	LM <sub>50</sub> en mg/kg
20	Ratón	Intravenosa	2040
		Intraperitoneal	> 2000
	Ratón	Subcutánea	> 2000
	Rata	Intravenosa	1680
25		Intraperitoneal	> 2000
		Subcutánea	> 2000

La toxicidad aguda del complejo de rifomicina, aunque no tan favorable, es sin embargo muy baja y asegura



21.-

251407

un amplio campo de seguridad. La administración intravenosa a los ratones dió un  $LM_{50}$  de 262 mg/kg:

5 La actividad in vivo del complejo de rifomicina y de rifomicina B se ha ensayado con resultados muy satisfactorios en ratones fuertemente inyectados con microorganismos diversos gram-positivos patógenos.

10 Todas las inyecciones aquí señaladas se han realizado por inyección intraperitoneal de 10 a 100 dosis letales de un cultivo de 15-20 horas de los microorganismos patógenos. Mientras los animales de control morían siempre dos a tres días después de la infección, la supervivencia final de los animales tratados se anotó siempre doce días después de comenzar los experimentos.

15 Algunos de los resultados así obtenidos se resumen en el siguiente cuadro.

Actividad in vivo del complejo de rifomicina y rifomicina B por administración subcutánea durante siete días.

(Ver cuadro en página siguiente)

251407



Infección	Antibiótico	Dosis diaria mg/kg	Administración por día	Supervivientes después 12 días.
<u>Streptococcus haemolyticus</u> 6203	Complejo de rifomicina	100	2	20/20 100%
		75	2	20/20 100%
		50	2	20/20 100%
		30	2	19/20 95%
		20	2	13/20 65%
		10	2	4/20 20%
<u>Staphylococcus aureus</u> Weinstein	complejo de rifomicina	100	2	20/20 100%
		75	2	20/20 100%
		30	2	19/20 95%
		20	2	9/20 45%
		10	2	2/20 10%
<u>Streptococcus haemolyticus</u> E 203	rifomicina B	400	4	20/20 100%
		300	4	20/20 100%
		200	4	16/20 80%
		200	4	6/20 30%
		400	2	20/20 100%
		300	2	19/20 95%
		300	2	13/20 65%
		200	2	4/20 20%
<u>Diplococcus pneumoniae</u> XXXVII L	rifomicina B	350	4	10/20 50%
		350	2	4/20 20%
	sal de dibenzylethylendiamina de rifomicina B	350	2	20/20 100%



23.-

251407

5 Se ve que el complejo de rifomicina presenta una actividad muy enérgica en el control de infecciones de los ratones debidas al streptococcus y Staphylococcus y en general contra las bacterias gram-positivas. Una dosis terapéutica al 100% de 50mg/kg parece ser muy baja para comprobar un antibiótico por vía intravenosa con  $LM_{50}$  del orden de 250-300 mg/kg.

10 La rifomicina B, aunque menos activa, presenta sin embargo un coeficiente terapéutico mejor, atendida su toxicidad extraordinariamente baja. En la sangre humana sana se han obtenido niveles del antibiótico con dosis diarias de 500 a 1000 mg por administración intramuscular.

15 El antibiótico ha demostrado una extraordinaria utilidad en pacientes afectados de abscesos de localización diferente, mastitis, otitis media purulenta etc. La dosis diaria aplicada fué generalmente de unos dos gramos administrados en dos inyecciones intramusculares. Siempre se observó un rápido descenso de la temperatura con resolución del proceso inflamatorio en no más de tres a cuatro días de tratamiento. La aplicación tópica sobre heridas infectadas de diferente tipo, usando disoluciones acuosas del antibiótico, tuvo también 20 éxito, produciendo un descenso rápido de la supuración y de la secreción en general, con la subsiguiente rápida curación de las heridas.

25 Estos resultados se obtuvieron muchas veces después de tratar sin resultado con otros antibióticos.

Para ilustrar mejor el objeto del invento señalamos a continuación dos ejemplos de fermentación del Streptoemy-



251407

ces mediterraneusEjemplo 1

Un cultivo de Str. mediterraneus se continuó durante 6 a 8 días sobre agar Bennet a 28°C. El organismo se lavó de la placa inclinada de agar y se inculó asepticamente en un frasco de 500 ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo sembrado con la siguiente composición.

Extracto de carne de vaca	5g
Extracto de harina de avena	5g
Peptona	5g
Hidrolizado caseína	3g
Glucosa	20g
NaCl	1,5
H <sub>2</sub> O	hasta 1 litro

El pH se ajustó con NaOH a 7,3.

Los frascos así inculados se agitaron durante 48 horas a 28°C en un agitador alternativo. Uno de los frascos de cultivo se inculó en un fermentador de 10 l. conteniendo 4 l. del medio de cultivo sembrado anterior. La fermentación se desarrolló a 28°C con 800 r.p.m. y a aireación de 1 v/v/m. Después de 24 horas de desarrollo, el micelio tenía una apariencia fuertemente fragmentada. El coeficiente de células aglomeradas fué de 3 a 5%. En la siguiente fase se empleó un fermentador de cristal de 20 litros con 10 litros del siguiente medio de fermentación:

Harina de soja	5g
----------------	----



25.-

251407

	$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	7g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1g
	Glucosa	50g
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3g
5	$\text{CaCO}_3$	9g
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	3.3 mg
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50 mg
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4 mg
10	$\text{H}_2\text{O}$ hasta	1 litro

El pH se corrigió con NaOH a 7,0. La esterilización durante 30 minutos a 120°C.

Se empleó como inóculo 10% del prefermentador.

15 La fermentación se desarrolló a 28°C con agitación a 800 r.p.m. y aireación de 0,8 v/v/m. Como antiespumante se empleó silicona A. En el decurso de la fermentación el caldo adquirió un color naranja-rojo característico. Después de 48 horas de desarrollo se obtuvo un volumen de 20-25% de células aglomeradas.

20 El pH del caldo fue de 5,6-5,4. Se obtuvo la actividad antibiótica máxima después de 40-50 horas (300-400 U/ml de la mezcla antibiótica) cuando el caldo estaba consumido.

#### Ejemplo 2

25 Un cultivo de Str. mediterraneus se preparó en un frasco agitando como se describe en el ejemplo 1. Para el precultivo se continuó en un fermentador de cristal de 10 litros con 4 litros de medio conteniendo:



26.-

251407

Lactosa	10g
Glucosa	10g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7g
Harina de soja	5g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5mg

5

Después de 24 horas de desarrollo, el volumen de células aglomeradas fué de 6-8%. Se empleó un inóculo del 10% para un fermentador de cristal de 20 litros, con 10 litros de medio de fermentación conteniendo:

10

Corn steep liquor	20 g
Harina de soja	5 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
Glucosa	50 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3 g
$\text{CaCO}_3$	9 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5 mg
$\text{H}_2\text{O}$ hasta	1 litro

15

20

El pH se corrigió con NaOH a 7,0. Esterilización durante 30 minutos a 120°C. La duración de la fermentación fué de 60 horas a 28°C. El pH del caldo fermentador al acabar fué de 5,6-5,8: La actividad antibiótica final fué de 400  $\mu$  /ml.

25



251407

N O T A.-  
=====

La presente patente de Invención comprende las siguientes reivindicaciones:

5 1.- Procedimiento para la obtención de un nuevo antibiótico, caracterizado porque comprende el cultivo de un microorganismo productor de rifomicina en un medio nutritivo acuoso en condiciones aerobias en sumersión hasta que al indicado medio se comunica una actividad antibiótica esencial, y la recuperación de la rifomicina del medio.

10 2.- Procedimiento según la reivindicación anterior, caracterizado porque comprende el cultivo de Streptomyces mediterraneus en un medio nutritivo acuoso en condiciones aerobias de sumersión hasta comunicar a dicho medio una actividad antibiótica esencial y la recuperación de la rifomicina del medio.

15 3.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la producción de rifomicina, comprende el desarrollo en condiciones aerobias de un cultivo de un microorganismo de la clase constituida por Streptomyces mediterranei, de sus mutantes y variantes, en un medio acuoso con un pH entre 4 y 8 y conteniendo una fuente de carbono soluble, una fuente de nitrógeno asimilable, y sales minerales esenciales, a una temperatura entre 25°C y 37°C durante un periodo de 24 a 120 horas, y la recuperación de la rifomicina del medio.

20 4.- Procedimiento según la reivindicación anterior, caracterizado porque la producción de rifomicina, com-



28.-

251407

5 prende el desarrollo en condiciones aerobias de sumersión de un cultivo de Streptomices mediterranei en un medio acuoso con un pH entre 4 y 8 y conteniendo una fuente de carbono soluble, una fuente de nitrógeno asimilable y sales minerales esenciales a una temperatura de unos 28°C durante un período de 48-72 -horas, la recuperación de la rifomicina del medio, y la separación, si se quiere, de la rifomicina en sus componentes A, B, C, D y E.

10 5.- Procedimiento para la obtención de un nuevo antibiótico.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva y se ilustra con los dibujos que a la misma se acompañan.

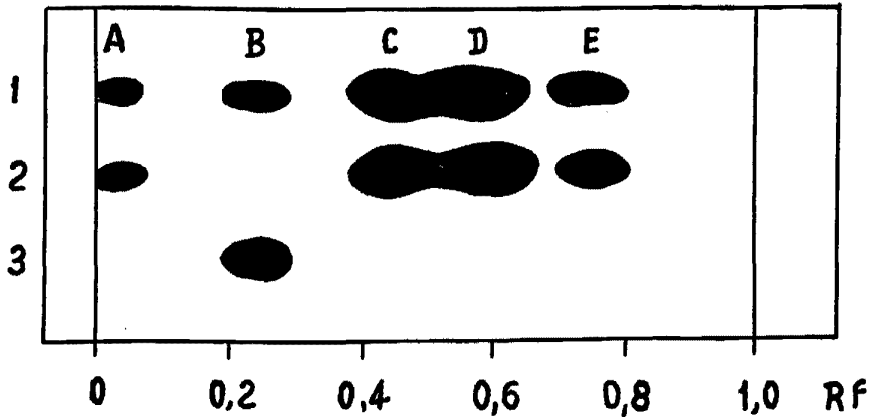
15 Consta esta memoria de veinte y ocho hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 14 de Octubre de 1959.

25 14 07



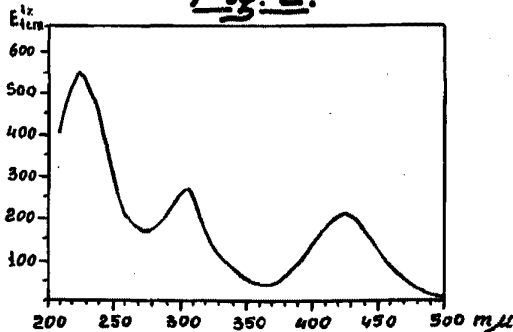
Fig. 1.



*Cromatografía de rifomicina en solución de agua  
conteniendo 3% de cloruroamínico y 1% de ácido  
ascórbico.*

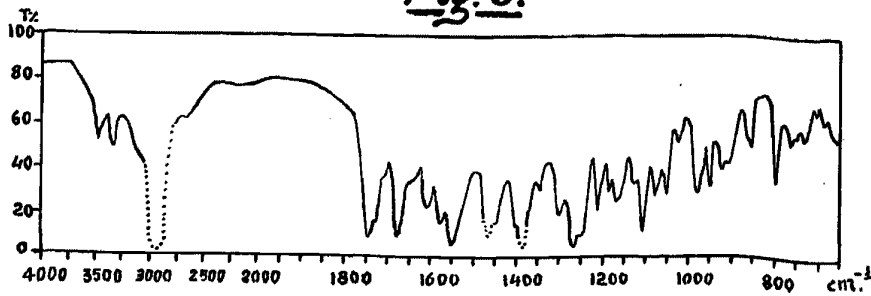
- 1.- Rifomicina cruda.
- 2.- Complejo de rifomicina después de la eliminación  
de rifomicina B.
- 3.- Rifomicina B.

Fig. 2.



*Espectro U.V. de Rifomicina en agua.*

Fig. 3.



*Espectro I.R. de Rifomicina B.*

**ESCALA VARIABLE**