



257181

257181

P A T E N T E
D E
I N V E N C I O N

por "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UN NUEVO ANTIBIOTICO",
a favor de la firma italiana SOCIETA FARMACEUTICI ITALIA, domi-
ciliada en MILAN (Italia) Via F. Turati, 18.

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a un nuevo producto antibió-
tico de espectro amplio, terapéuticamente útil, a su produc-
ción por fermentación y a un proceso para recuperarlo.

5. Hemos descubierto que, empleando una nueva especie
de streptomyces, se forma en un caldo de fermentación una
gran concentración de una substancia antibiótica diferente
de las conocidas antes, que este producto puede recuperarse
en condiciones apropiadas de operación (que se describirán
más adelante) y además que esta substancia tiene propiedades
10. que la señalan como un producto nuevo y terapéuticamente útil.

257181



- El nuevo antibiótico proporcionado por el invento que aquí se expone ha sido designado por nosotros como F.I. 1600 o aminossidina e incluimos también en esta denominación la base libre o sus sales y soluciones correspondientes. El nuevo organismo que permite la producción del antibiótico F.I. 1600 se designa ahora por nosotros como Streptomyces Krestomyceticus (n.sp.). El Streptomyces Krestomyceticus ha sido depositado en la National Collection of Industrial Bacteria (Colección Nacional de Bacterias Industriales) y ha recibido el número de orden N.C.I.B. 8995. El S. Krestomyceticus se ha depositado también en el Commonwealth Mycological Institute (Instituto Micológico de la Mancomunidad) con el número 79 589. El procedimiento de este invento, por consiguiente, es un procedimiento para producir la substancia antibiótica F.I. 1600 y comprende el cultivo del Streptomyces Krestomyceticus, N.C.I.B. 8995 y Commonwealth Mycological Institute No. 79 689, como aquí se describe, en un medio nutritivo acuoso que contiene una fuente de carbono, nitrógeno y sales minerales en condiciones aerobias, hasta que se ha impartido al medio actividad antibacteriana substancial, y la recuperación consecutiva del F.I. 1600 del medio;

- La cepa Streptomyces Krestomyceticus se ha hallado en una muestra de la tierra obtenida en Massa Maritima (Grosseto), se ha aislado y se ha desarrollado tanto en medios sintéticos como orgánicos dentro de la escala de temperaturas de 28-38°C. Bajo el microscopio electrónico, el S. Krestomyceticus muestra esporas lisas bastante regulares, de forma cilíndrica u oval, algo transparentes. Las hifas son generalmente rectas, pero se han observado algunos ganchos y espirales. La cepa del S. Krestomyceticus se ha investigado para clasificarla.



257181

La Tabla I expone sus características de cultivo

T A B L A I

	Agar-gliceringlicina	Buen desarrollo, incoloro, con abundante producción de esporas. Hifas aéreas y esporas blancas.
5.	Tierra-Extracto de Agar	Buen desarrollo incoloro, cubierto con moderada formación de micelio aéreo blancuzco.
	Agar Czapek	Desarrollo incoloro muy superficial. Buena esporulación blanca.
10.	Agar con sales YED (Extracto de levadura y sales)	Desarrollo amarillento voluminoso, no muy profundo en el substrato; moderada esporulación blanca.
15.	Peptona y sales de agar	Buen desarrollo, incoloro a amarillento, con buena esporulación blanca; hifas muy cortas.
	Glicerina-agar	Crecimiento voluminoso casi incoloro; escasa formación de micelio aéreo.
20.	Agar-dextrosa de asparagina	Pequeñas colonias amarillentas, opacas, planas y cerasas, no muy manifiestas, sin micelio aéreo.
25.	Agar-dextrosa de patata	Desarrollo incoloro no muy voluminoso, con escaso micelio aéreo blancuzco. Fracturas o grietas concéntricas típicas en el fondo de los cultivos sesgados.
30.		



257181

- | | | |
|-----|--|--|
| | Agar con hidrolizado de caseína, complementado con sales y aminoácidos | Desarrollo incoloro, escaso y pequeño. Ningún micelio aéreo. |
| 5. | Agar FYS (sales de levadura peptonizadas) | Desarrollo plano, incoloro y abundante, con escaso micelio aéreo, fracturas superficiales. |
| | Recortes de patata | Desarrollo excelente en todo el recorte, completamente cubierto con micelio aéreo abundante y bien esporulado. |
| 10. | | |
| | Agar de Emerson | Desarrollo amarillento con superficie ondulada que muestra muchas grietas o rupturas. Toda la superficie está cubierta por un micelio aéreo blancuzco y muy corto, más manifiesto en los lugares donde el crecimiento es más espeso. Crecimiento muy abundante y espeso, no muy profundo en el substrato. Fracturas manifiestas con bordes invertidos. Micelio aéreo uniformemente distribuido, corto pero manifiesto. El reverso es de un amarillo intenso. |
| 15. | | |
| | Agar con hidrolizado de caseína | Desarrollo ondulado con fracturas. Micelio vegetativo amarillento, cubierto por un mi- |
| 20. | | |
| | Agar con harina de soja | |
| 25. | | |
| | | |
| 30. | | |



25718f

- celio aéreo blancuzco y muy corto.
- Colonias parduzcas y opacas, planas, con micelio aéreo muy corto en el fondo de los cultivos sesgados.
- Semejante al agar con harina de soja.
- Desarrollo amarillento y plano, con pocas fracturas. Micelio aéreo corto, abundante, más evidente en los bordes del cultivo.
- Crecimiento amarillento, generalmente plano, que muestra fracturas evidentes en los lugares donde el agar es más espeso. Algún micelio aéreo en los pliegues.
- Semejante al medio de Anderson, pero con micelio vegetativo incoloro; micelio aéreo abundante.
- Colonias amarillas, planas, con pequeños mechones de micelio aéreo blanco.
- Colonias amarillentas planas, que están más arrugadas en los lugares donde el substrato es más espeso.
- Colonias amarillentas planas, con bordes incoloros. Micelio aéreo generalmente ausente, que tan solo aparece en ocasiones en algunos pliegues.
5.
Agar de glicerina con harina de soja
5.
Agar con maceración de grano
- Agar con grano macerado y peptona
10.
Medio de esporulación de Anderson
15.
Agar con triptona
20.
Agar con amina asparagins NZ
- Medio de Pridham con almidón y sales inorgánicas
25.
Agar con harina de avena
- 30.



257181

Agar de Sabouraud

Buen desarrollo incoloro o de color crema, cubierto por un micelio aéreo blanco y abundante.

Caldo de levadura

Desarrollo superficial amarillento y voluminoso, cubierto con micelio aéreo blanco.

5.

El S. Krestomyceticus hidroliza tanto el almidón como la gelatina y descompone la tirosina en el curso de 6 días.

10. Se producen ácidos empleando las siguientes sustancias como única fuente de carbono: inulina, trealosa, levulosa, sorbitol, manosa, galactosa, lactosa, adonitol, manitol, maltosa, glicerol, dextrosa, dextrina.

La leche se coagula solo ligeramente al cabo de 13 días. Reacción neutra, sin peptonización.

15.

Las características de cultivo de la cepa que produce el F.I. 1600 se han comparado con las especies ya descritas. Entre estas especies, el S. Virgatus y el S. flocculus difieren de nuestra cepa a causa de que su micelio vegetativo es verduzco y el primero produce también un pigmento pardo en algunos medios. Además, el S. flocculus tiene su superficie cubierta por un micelio aéreo algodonoso o aterciopelado.

20.

El S. termophilus presenta un desarrollo profundo en el medio y un micelio aéreo blancuzco. Además tiene un punto óptimo de crecimiento a 50°C. La cepa que produce el F.I. 1600 muestra un crecimiento muy bueno a 37°C, pero se producen muy pocas cantidades de antibiótico a 33°C o más.

25.

El S. Kanamyceticus muestra un desarrollo profundo en el substrato y a veces tonalidades verduzcas o rosadas en el micelio vegetativo. A veces produce también un pigmento pardo.

30.

Ninguna de las especies antes mencionadas muestra las fracturas típicas en la superficie del cultivo que son la caracterís-



257181

5. tica. más peculiar de la cepa que produce el F.I. 1600. A base de estas características, que no corresponden a las de ninguna especie conocida, se ha considerado nueva especie al S. Krestomyceticus. La producción del antibiótico F.I. 1600 se ha llevado a cabo por fermentación en cultivos aéreos sumergidos en una solución nutritiva acuosa que contiene una fuente de nitrógeno, una fuente de carbono y sales minerales.

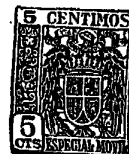
10. Como fuente de nitrógeno los mejores resultados se obtienen empleando material que contenga proteínas tal como el extracto de malta de cebada, extracto de malta de trigo, licor de trigo macerado, hidrolizado enzimático de caseína, harina de cacahuete, harina de soja, harina de algodón y extracto de carne.

15. Como fuente de nitrógeno asimilable, son adecuadas las sales de amonio inorgánico. Entre éstas se hallan el sulfato amónico y el fosfato amónico. También es posible emplear fuentes orgánicas de nitrógeno, tales como los aminoácidos y varios materiales naturales proteináceos.

20. La fuente de carbono puede ser, o bien un carbohidrato soluble, tal como la dextrosa, o un carbohidrato insoluble, tal como el almidón, por ejemplo el almidón de trigo. Se obtiene un buen rendimiento de antibiótico empleando también maltosa, dextrina, lactosa y otros azúcares. Las sales minerales necesarias para el medio de fermentación son de preferencia fosfatos, que pueden estar presentes ya sea como fosfato amónico ya sea como fosfato metálico tal como el fosfato potásico, cloruros tales como el NaCl y sulfatos tales como el sulfato amónico o magnético.

25. Agentes amortiguadores adecuados son el carbonato cálcico y las sales de ácidos orgánicos tales como los citratos

30.



257181

los acetatos y los lactatos, que son útiles para mantener el pH dentro de los límites apropiados.

5. A veces es necesario proporcionar una fuente de metales pesados que pueden estar presentes como impurezas o añadidos; entre éstos se encuentran el cobre, el zinc, el manganeso, el hierro y el cromo.

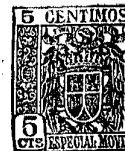
10. El empleo de un agente desespumante es deseable en los fermentadores en gran escala, aún cuando en esta fermentación la formación de espuma es un problema extremadamente difícil y se regula fácilmente por el empleo de agentes desespumantes convencionales, tales como octadecanol en aceite de lardo u otros desespumantes comerciales adecuados, tales como las siliconas.

15. La proporción relativa de los ingredientes del medio de fermentación se ha establecido cuantitativamente de la siguiente manera:

Fuente de nitrógeno	0,5-4%
Fuente de carbono	1-5%
Fosfatos	0,01-0,3%
20. Sulfatos	0,05-0,25%
CaCO ₃	0,1-0,7%
Cloruros	0,1-0,3%
Elementos en vestigios	0,0001-0,0005%

25. Las cantidades exactas de todas las sustancias están indicadas con detalle en los ejemplos. La fermentación se efectúa a temperatura de 24°C a 32°C durante un período de 2 días a una semana, a un pH de 6,3-7,8. El pH inicial que asegura el proceso de fermentación más favorable es 6,4-6,7; aumenta hasta 7,6-7,8 hacia el final de la fermentación.

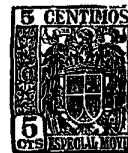
30. La aeración es también necesaria para un buen rendimiento. La relación entre la cantidad de aire que debe introdu-



257181

cirse en el depósito de fermentación y el volumen del líquido de cultivo varía en el curso de las fases de la fermentación entre 0,1 y 0,8.

- El F.I. 1600 puede recuperarse como clorhidrato así como
5. sulfato del caldo de fermentación, adoptando un procedimiento de recuperación que hemos inventado, el cual ha demostrado ser sumamente eficaz desde el punto de vista de la recuperación de un producto libre de impurezas inactivas y de otras sustancias antibioticas formadas simultáneamente en el caldo. Este
 10. ejemplo se ejemplifica más abajo. Fundamentalmente, implica las siguientes etapas:
 - a) Precipitación de Ca^{++} con ácido oxálico y filtración de micelio y oxalato cálcico después de ajustar el pH a 7-7,5.
 - b) Absorción del antibiótico en una resina cambiadora de cationes y elución con ácidos diluidos, tales como el HCl 1n
 15. c) Neutralización de la solución eluída con una resina cambiadora de aniones, en fase hidroxilada, hasta que el pH asciende a 7-7,5, y filtración subsiguiente.
 - d) Concentración de la solución filtrada, hasta sequedad,
 20. en vacío.
 - e) Disolución del antibiótico en un disolvente orgánico adecuado, tal como el metanol.
 - f) Precipitación del clorhidrato de F.I. 1600 por adición de acetona a la solución orgánica.
 25. g) El clorhidrato de F.I. 1600 filtrado se disuelve en agua y la solución acuosa filtrada, después de concentración en vacío hasta un pequeño volumen, se trata con sulfato de trietilamina. Después de filtración, se agrega la solución a metanol con agitación. Se filtra el sulfato de F.I. 1600, se
 30. le lava con metanol y se seca en vacío sobre P_2O_5 a 50°C .



257181

5. Se ha comprobado que el antibiótico F.I. 1600 puede recuperarse también por absorción y elución del carbón. Más específicamente, hemos comprobado que el F.I. 1600 puede separarse, ya sea de sus soluciones acuosas o de los caldos de cultivo por medio de carbón, de preferencia a un pH superior a 7.

El F.I. 1600 puede eluirse del carbón ya sea por medio de solución acuosa o por medio de soluciones alcohólicas de ácidos orgánicos o inorgánicos.

10. El F.I. 1600 es una sustancia básica y soluble en agua.

15. El F.I. 1600, en forma de sulfato o clorhidrato, es un polvo blanco, soluble en agua e insoluble en casi todos los disolventes orgánicos. El clorhidrato de F.I. 1600 es soluble en metanol.

El espectro ultravioleta no demuestra absorción dentro de la gama de 220-400 milimicras.

20. Para facilitar la explicación se acompaña una lámina de dibujos en la que se representa un diagrama del comportamiento del espectro infrarrojo del producto.

En el dibujo, se indica en T, la ordenada de transmisión, en F, la abscisa de frecuencias y en L la escala de longitud de onda en micras.

25. El espectro infrarrojo del sulfato de F.I. 1600 en KBr (5%), que se ilustra en el dibujo acompañante, muestra picos pronunciados a 2,94 micras, 3,41 micras, 6,15 micras, 6,55 micras, 9,00 micras y 9,52 micras; bandas débiles a 6,82 micras, 7,08 micras, 7,28 micras, 7,46 micras, 10,70 micras, 11,17 micras, 11,62 micras, 13,08 micras, e inflexiones a 3,09 micras y 10,23 micras, atribuidas a los grupos siguientes:

30.



257181

OH, NH, CH, CH₂, ion de NH₄⁺, C-O-C.

No existe evidencia de grupos carbonilo en forma ce-
to, amida o éster.

Se determinaron las rotaciones ópticas en agua del
5. clorhidrato y el sulfato de F.I. 1600 de gran pureza.

Clorhidrato (α)_D^{25°} = + 55° (c = 1% en agua)

Sulfato (α)_D^{20°} = + 51° (c = 1% en agua)

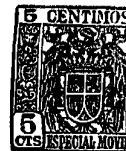
La Tabla II expone el análisis elemental de las sales
de F.I. 1600.

Sales de F.I. 1600	C%	H%	N%	S%	Cl%
Clorhidrato	33,79	6,76	8,17	-	21,05
Sulfato	30,57-	6,44-	7,19-	8,99-	-
	30,8	7,00	7,38	9,08	-
p.(p.nidroxifenilazo)- -bencen-sulfonato	58,58	5,25	10,27	7,72	-
Sal Haliantina	51,29	6,20	12,23	7,50	-

10. Por análisis del sulfato de F.I. 1600 y de sus produc-
tos de degradación se ha determinado que el F.I. 1600 tiene
la probable fórmula empírica C₂₃H₄₅N₅O₁₄ y la del sulfato de-
bería ser C₂₃H₄₅N₅O₁₄.2.5H₂SO₄.2H₂O (calculado: C 80,80,
H 6,03, N 7,81, S 8,93). El F.I. 1600 da derivados penta-

15. acilados por acilación; de esta manera se han obtenido deri-
vados pentabenzóicos y pentaacetílicos. Se ha comprobado que
un mol de F.I. 1600 pentaacetilado, en solución 0,02 M de peryodato
alcalino, consume 2,95 moles de peryodato a temperatura ambiente.

20. A base del análisis elemental, las propiedades básicas
del producto, el hecho de que todo el nitrógeno es básico, su
espectro ultravioleta y su espectro infrarrojo, excluimos cual-



287181

quier estructura de tipo polipéptido y atribuimos al F.I. 1600 una estructura semejante a la del grupo de antibióticos básicos oligosacáridos solubles en agua, tales como la estreptomina y la neomicina.

5. Cromatográficamente, el F.I. 1600 puede distinguirse de la estreptomina, la dihidroestreptomina, la neomicina, la viomicina y otras sustancias básicas glicopeptídicas tales como la estreptotricina y las geomocinas.

10. La hidrólisis ácida prolongada de neomicinas o de catenulina (J.W. Davisson y otros, *Antibiot. and Chem.* 2, 1952, página 460) da un fragmento microbiológicamente activo, identificado por cromatografía de papel como neamina.

La hidrólisis ácida del F.I. 1600 con HCl 6n no da fragmento activo.

15. La Tabla III muestra las diferencias entre el F.I. 1600 y los otros antibióticos del mismo grupo.

T A B L A III

Antibiótico	Organismos	Análisis del sulfato	(α) _D del sulfato	Otras propiedades y diferencias
Sulfato de F.I. 1600	<u>Strept. Krestomyceticus</u>	C=30,8-30,57 H= 7,00-6,44 N= 7,19-7,38 S= 8,99-9,08 Fórmula empírica: C ₂₃ H ₄₅ N ₅ O ₁₄ · 2.5.H ₂ SO ₄ ·2 H ₂ O	+ 51	Por hidrólisis ácida, no hay formación de fragmentos microbiológicamente activo.
Sulfato de neomicinas	<u>Strept. fradiae</u>	C=29,35 B H= 6,86 N= 9,21 (1)SO ₄ =28,3 C=31,18 C H= 6,14 N= 8,93 (2) S= 9,90	B = +56(2) C = +82(2)	a) Por hidrólisis ácida, formación de fragmento activo (neamina). b) El espectro infrarrojo es diferente del de F.I. 1600. c) Es cromatográficamente diferente del F.I. 1600



257182

Sulfato de estreptomina	<u>Strept. griseus</u>	C=34,62 H= 5,77 N=13,45 S=6,61	- 79°(3)	a) El espectro infrarrojo es diferente del de F.I. 1600. b) Es cromatográficamente diferente del F.I. 1600.
Sulfato de catenulina	No descrito	C= 31,53 31,58 H= 5,29 5,26 (4) N= 7,92 7,93 SO ₄ =28,11 28,13	+ 51,9(4)	a) La absorción infrarroja (no informada) es típica de un espectro polipéptido (4). b) Por hidrólisis ácida, formación de fragmento activo (neamina) (4). c) Muestra resistencia cruzada con la neomicina (6) %
Sulfato de kanamicina	<u>Strept. kanamyceticus</u>	C=37,3 37,4 H= 6,8 6,3 (5) N= 9,3 9,6 S= 5,5	+ 146°(5)	El espectro infrarrojo es diferente del de F.I. 1600.
Hidroximicina	<u>Strept. paucisporocenes</u>	N=6,2 (7) Se aduce la probable fórmula empírica (7) de la base: C ₂₅ H ₄₇ N ₅ O ₁₅	+ 51 (7)	Su pentabenzato, soluble en 5 partes de metanol caliente, funde a 233°C con descomposición y su (α) es +36: estas propiedades son diferentes de las del pentabenzato de F.I. 1600. La fórmula de la base es diferente de la del F.I. 1600.
Sulfato de paromomicina	<u>Strept. rimosus forma paromomycinus</u>	Se aduce la probable fórmula empírica (8): (C ₁₀ H ₁₈ - 22N ₂ O ₆ ·H ₂ SO ₄) x	+ 50,5 (8)	El espectro infrarrojo es diferente del de F.I. 1600 (ausencia de algunas bandas de absorción) y también es diferente la fórmula empírica.

Referencias:

- 1) Regna y otros, J. Chem. Soc. 1950, página 1045.
- 2) Ford y otros, J. Chem. Soc. 1955, página 5311.
- 3) Regna y otros, J. Biol. Chem. 165, 1946, página 621.
- 4) Davisson y otros, Antibiotic and Chem. 2, 1952, p. 460.



287181

- 5) Cron y otros, J. Chem. Soc. 80, 1958, p. 752.
- 6) Szybalsky y otros, Am. Rev. Tuberc. 69, 1954, p. 267.
- 7) G. Hagemann y otros, Pharm. Franc. 16, 1958, p. 585.
- 8) Patente inglesa No. 797 568.

5. Por consiguiente aparece que el F.I. 1600 proporcionado por el invento que aquí se expone, es un nuevo componente del grupo de antibióticos básicos de tipo oligosacárido solubles en agua.

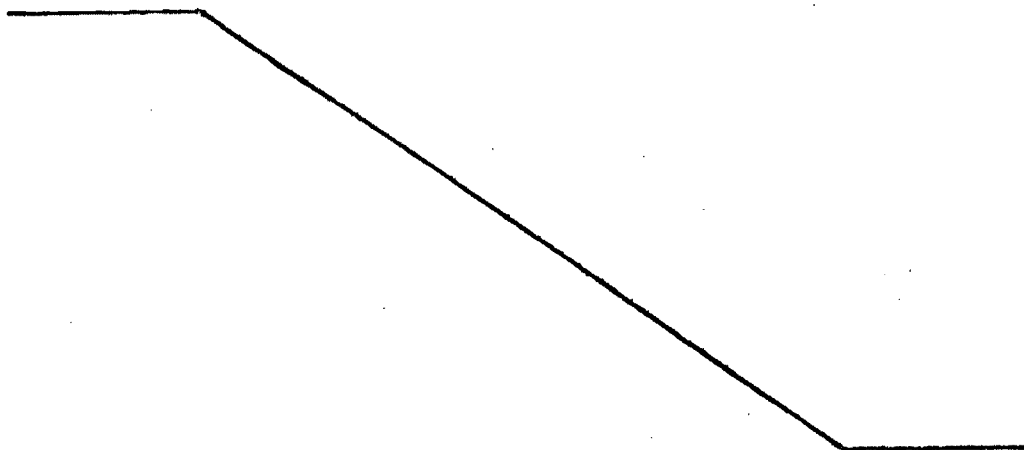
Propiedades farmacológicas.

10. El F.I. 1600 presenta las propiedades farmacológicas siguientes:

- a) Amplio espectro antibiótico, que comprende bacterias gram-positivas, grámnegativas y ácidos resistentes.
- b) Acciones inhibitoras contra los organismos antes mencionados, a concentración muy baja.
- c) Actividad contra las cepas resistentes a los antibióticos.
- d) Toxicidad muy baja.

15. La Tabla IV muestra la dosis mínima en mcg/ml (MID) de sulfato de F.I. 1600 que inhibe el desarrollo de los organismos que se mencionan a continuación en caldo de extracto de levadura.

20.





257181

T A B L A IV

Organismo del ensayo	Al cabo de 24 horas de incubación	Al cabo de 48 horas de incubación
<u>M. pyogenes aureus</u>	1	1
<u>B. subtilis</u>	1	1
<u>S. faecalis</u>	1	1
<u>Mycobacterium 607</u>	1	5
<u>M. phlei</u>	1	5
<u>A. bostromi A</u>	1	1
<u>E. coli</u>	5	5
<u>K. friedlanderii</u>	5	25
<u>P. vulgaris</u>	25	25
<u>P. aeruginosa</u>	100	>100
<u>S. flexneri Y</u>	25	25
<u>O. albicans</u>	>100	>100
<u>G. graphii</u>	>100	>100
<u>I. mentagrophytes</u>	>100	>100

Las mismas concentraciones del antibiótico inhiben el desarrollo de M. tbc o M. 607 y el de muchas cepas de la misma especie resistentes a los antibióticos - (véase la Tabla V).

T A B L A V

Organismo del ensayo	Medio líquido de Dubos MID mcg/ml
<u>M. Tuberculosis H 37 Rv</u>	1
<u>M. tbc - resistente a la isoniazida</u>	2,5
<u>Mycobacterium sp. ATCC 607</u>	2,5



237181

<u>M. 607 Strept. resistente</u>	2,5
" " <u>Chlortetracycl</u> "	2,5
" " <u>Oxytetracycl</u> "	2,5
" " <u>Neom.</u> "	5,0
" " <u>Viom.</u> "	2,5
" " <u>Oxam.</u> "	2,5
" " <u>Eritrom.</u> "	5,0
" " <u>Vancom.</u> "	5,0
<u>M. phlei</u>	0,98
<u>M. para-smegmatis</u>	0,124

La Tabla VI muestra las cantidades relativas en mcg/ml (MID) de sulfato de F.I. 1600 necesarias para inhibir un número de organismos representativos sobre diferentes cultivos.

T A B L A VI

5. En la Tabla figuran los valores de concentraciones bacterioestáticas y bactericidas de F.I. 1600 en diferentes medios de cultivo.

Organismo ensayado	MID en mcg/ml			
	Caldo de levadura	Caldo nutritivo	Caldo Difco Penassay	Infusión Difco de cerebro y corazón
	<u>Bacterioestático</u>			
<u>Staphyl. aureus 114</u>	0,35	0,6	1,6	3,8
<u>Staphyl. aureus 209 P</u>	0,62	1,05	4,0	12,0
<u>Staphyl. aureus 503 MB</u>	0,075	0,31	0,13	0,35
<u>Staphyl. aureus CAMP</u>	-	0,15	1,45	4,8
<u>Staphyl. Londres</u>	0,15	0,45	3,5	6,0

257181



Bactericida al cabo de 24 horas				
<u>Staphyl.aureus</u> 114	2,5	2,5	10	>20
<u>Staphyl.aureus</u> 209 P	10	20	20	>20
<u>Staphyl.aureus</u> 503 MB	0,3	1,25	20	5
<u>Staphyl.aureus</u> CAMP	5	20	5	10
<u>Staphyl. Londres</u>	5	5	10	20
Bactericida al cabo de 48 horas				
<u>Staphyl.aureus</u> 114	2,5	2,5	10	>20
<u>Staphyl.aureus</u> 209 P	10,0	20	20	>20
<u>Staphyl.aureus</u> 503 MB	0,3	1,25	20	5
<u>Staphyl.aureus</u> CAMP	5,0	20	5	10
<u>Staphyl. Londres</u>	5	5	10	20

Los ejemplos que siguen se dan para ilustrar la producción y recuperación de F.I. 1600 por fermentación en condiciones aeróbicas sumergidas. Los mismos medios pueden emplearse para fermentación en matraces con agitación para operar a pequeña escala, o en depósitos, para operar a mayor escala.

5.

Sin embargo, este invento no se limita en virtud de los detalles expuestos aquí. Resulta evidente para los expertos en la especialidad que pueden introducirse numerosas modificaciones en los materiales y en los métodos sin por ello separarse del espíritu del invento.

10.

E J E M P L O 1.

Unos matraces de 350 cc de capacidad que contienen 60 cc de un medio dotado de la composición siguiente:

Harina de soja	2%
15. NaCl	2,5%
Dextrosa	3%
Maceración de trigo	1,5%
CaCO ₃	0,7%



257181

se esterilizan a 120°C durante 20 minutos y se inoculan con 0,25 cc cada uno de una suspensión de esporas de S. Krestomyceticus.

5. Se incuban los matraces a 28°C en una máquina agitadora. Se obtiene un buen desarrollo al cabo de 7 a 8 días y se producen unos 500 mcg/ml de antibiótico.

E J E M P L O 2.

10. Una suspensión de esporas de S. Krestomyceticus se inoculan en matraces de Erlenmeyer de 2000 cc de capacidad que contienen 500 cc de un medio adecuado, dotado de la composición siguiente:

Dextrina	2%
Caseína	0,5%
CaCO ₃	0,4%
15. MgSO ₄	0,1%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1%
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,0002%

20. Al cabo de 48 horas de agitación a 28°C, se transfiere 0,4% del cultivo a un depósito de 10 litros que contiene el medio siguiente:

Dextrina	2%
Caseína	0,5%
CaCO ₃	0,4%
25. (NH ₄) ₂ SO ₄	0,1%
K ₂ HPO ₄	0,01%
Maceración de trigo	0,5%

(pH después de la esterilización = 6,6)

30. Al cabo de 7 horas de fermentación con agitación a 28°C en condiciones aeróbicas (1,1 lt/minuto) el cultivo alcanza su desarrollo máximo.



257181

E J E M P L O 3.

Un matraz de 2000 cc que contiene 500 cc de un medio dotado de la composición siguiente:

Hidrolizado de caseína 1%

5. NaCl 0,2%

se esteriliza a 120°C durante 20 minutos y se inocula con una suspensión de esporas de S. Krestomyceticus (cultivado en medio de agar-patata). El matraz se incuba a 28°C durante 48 horas con agitación.

10. Al cabo de 48 horas se transfiere el cultivo a un depósito de 100 litros que contiene el medio siguiente:

Harina de soja 2%

Dextrina 2,0%

CaCO₃ 0,3%

15. (pH = 6,16)

Al cabo de 36 horas de fermentación con agitación a 28°C en condiciones aeróbias, un 15% aproximadamente del cultivo se transfiere a un depósito de 100 litros que contiene un medio de la composición siguiente:

20. Harina de soja 2,5%

Dextrina 2,5%

Destiladores 0,5%

NaCl 0,25%

Aceite de soja 0,03%

25. CaCO₃ 0,03%

(pH = 6,4-6,5)

Se continua la fermentación durante 80-90 horas a 28°C con agitación y en condiciones aeróbias.

E J E M P L O 4.

30. A unos 500 litros de caldo de fermentación se agrega con



257181

agitación ácido oxálico (correspondiente al Ca^{++} contenido en el caldo), con ajuste subsiguiente del pH a 7-7,5 con NaOH. Se prosigue la agitación durante 30 minutos y se filtra la suspensión. La torta se lava con agua.

5. La solución filtrada se absorbe sobre 5 litros de IRC 50 (fase de sodio).

Por elución con HCl 1n, se obtienen varias fracciones separadas.

Las fracciones activas se neutralizan con resinas cambiadoras aniónicas, se concentra hasta sequedad en vacío y se trata el residuo, por dos o tres veces, con un litro de metanol agitando durante 30 minutos. Cada vez se filtra la suspensión. El clorhidrato de F.I. 1600 se obtiene agregando la solución metanólica a acetona (2-3 volúmenes), el producto floculado blanco se filtra, se lava con acetona y se seca; rendimiento = 80-90 g.

15.

E J E M P L O 5.

Se disuelve en agua el clorhidrato de F.I. 1600 y se filtra la solución. El filtrado se concentra hasta pequeño volumen en vacío y luego se agrega sulfato de trietilamina.

20.

Después de enfriar en un refrigerador, se elimina por filtración el sulfato cálcico aislado. La solución filtrada se agrega a metanol con agitación. Una vez terminada la adición, se prosigue la agitación durante 30 minutos y el sulfato de F.I. 1600 se filtra y se lava con metanol. Se seca el producto a 50° en vacío sobre P_2O_5 . El sulfato bruto se purifica por cromatografía sobre carbón y celita y se eluye con H_2SO_4 diluido.

25.

E J E M P L O 6.

Un gramo del sulfato, disuelto en 50 cc de agua, se trata con un ligero exceso de p.hidroxi-fenilazobencen-sulfonato

30.



267181

sódico. La sal colorante precipitada se filtra y se cristaliza varias veces en agua caliente. Esta sal es apta para preparar un sulfato muy purificado de la forma siguiente:

5. La sal colorante, suspendida en metanol, se trata con HCl seco. De la solución resultante se precipita clorhidrato con acetona (rendimiento: 0,6 g). El sulfato se obtiene disolviendo en agua el clorhidrato y agregando 3 cc de solución de sulfato de trietilamina (que contiene 0,25 g de SO_4 por cc). El producto se recoge sobre un filtro, se lava con acetona y se seca. Rendimiento: 0,65 g de sulfato de F.I. 1600 muy purificado. Por análisis, demuestra contener 80,57% de carbono, 6,44% de hidrógeno, 7,38% de nitrógeno y 9,08% de azufre. El espectro infrarrojo del sulfato de F.I. 1600 en KBr (5%) muestra intensas máximas de absorción en 2,94 micras, 3,41 micras, 6,15 micras, 6,55 micras, 9,00 micras, 9,52 micras; bandas débiles en 6,82 micras, 7,08 micras, 7,28 micras, 7,46 micras, 10,70 micras, 11,17 micras, 11,62 micras, 13,08 micras; e inflexiones en 3,09 micras y 10,23 micras.
10. Prueba del F.I. 1600
15. Un método microbiológico de prueba del F.I. 1600 se basa en la mediación de las zonas de inhibición en torno a las fuentes de agar que contienen soluciones de varias diluciones aéreas del antibiótico contra medio de agar sembrado con B. subtilis ATCC 6633. Se emplea una solución acuosa de sulfato de F.I. 1600.

20. Toxicidad - Toxicidad por ratón:
- LD 50 (administración intravenosa) = 110 mg/Kg
- LD 50 (administración subcutánea) = 1,062 g/Kg
- LD 50 (administración oral) = 25 g/Kg.
25. Toxicidad por perro: La administración de una dosis de

- 30.



257181

20 mg/kg (por vía intravenosa) a un perro sano causa solamente un ligero síndrome asténico.

Toxicidad por conejo: La administración de una dosis de 2,5 mg (por vía intracisternal) no presenta signos de toxicidad.

5.

Se ha comprobado que los ratones sobreviven a las inyecciones de 200 mg/kg (por día) durante dos meses, sin efectos perniciosos.

Las ratas no resultan afectadas por las inyecciones subcutáneas de 200 mg/kg (por día) durante dos meses.

10.

Los gatos que reciben a diario inyecciones intramusculares de 50 mg/kg no presentan síntomas neutrotóxicos.

E J E M P L O 7.

Se disuelven en 20 cc de agua 1,4 g de sulfato de F.I. 1600 y de 5 g de bicarbonato potásico. Se agregan a la solución anterior, a temperatura de 0°C, 3 cc de cloruro de benzoilo y se agita la mezcla durante 1 hora a 0°C; luego se deja reposar durante una noche a temperatura entre 0° y +5°C, y por último a la temperatura ambiente durante algunos minutos. Se filtra el precipitado, se le lava con solución acuosa de bicarbonato sódico, agua y finalmente con éter. El producto cristaliza en 40 partes de metanol caliente. Se obtienen 0,34 g de pentabenzato de F.I. 1600, en forma de cristales blancos que funden a 208-211°C sin descomposición. Después de varias cristalizaciones en metanol, el punto de fusión no asciende a 208-211°C.

20.

25.

Por análisis, el producto demuestra contener 60,60% de carbono, 6,14% de hidrógeno y 6,05% de nitrógeno. Tiene la probable fórmula empírica $C_{58}H_{65}N_5O_{19} \cdot CH_3OH$ (calculado: C 60,66; H 5,95; N 6,01). $(\alpha)_D = +26^\circ \pm 2$ (C = 0,3% en metanol).



257181

E J E M P L O 8.

Una suspensión de 0,70 g de F.I. 1600 en 80 cc de metanol y 5 cc de anhídrido acético se deja reposar durante una noche a temperatura ambiente. Se agregan tres volúmenes de acetona y se disuelve el precipitado en metanol acuoso, luego se precipita con acetona. Se obtiene 0,31 g de pentaacetato de F.I. 1600, en forma de producto amorfo que funde a 198-204°C. $(\alpha)_D = +62,6^\circ \pm 2$ (C = 1% en metanol).

Por análisis, el producto demuestra poseer 43,23% de carbono, 7,34% de hidrógeno y 7,45% de nitrógeno. Tiene la probable fórmula empírica $C_{33}H_{55}N_5O_{19.5} \cdot 5 H_2O$ (calculado: C 43,27; H 7,15; N 7,65).

Un mol de F.I. 1600 pentaacetilado, en 0,02 moles de solución peryodada, consume 2,95 moles de peryodato a temperatura ambiente (este consumo se alcanza al cabo de 18 horas y permanece constante también al cabo de 42 horas).

E J E M P L O 9.

En un caldo de cultivo que contiene 266 γ /cc del antibiótico F.I. 1600 (volumen, 4000 cc; contenido total, 1,06 g), se ajusta el pH a 8,5 y se agita la mezcla por dos veces con 40 g de carbón (Darco G 60) a temperatura ambiente durante 1 hora.

Las dos tortas de carbón filtradas se agitan durante 1 hora en 600 cc de solución acuosa al 50% ajustada a pH aproximado de 3 por la adición de HCl acuoso.

Se filtra la mezcla y el filtrado se neutraliza con NaOH acuoso y se concentra hasta 210 cc (que contiene 2100 γ /cc de F.I. 1600). Se evapora la solución hasta sequedad, se trata el residuo con metanol y se agregan a la solución metanólica filtrada 3 volúmenes de acetona. El producto se filtra y se seca. Rendimiento: 1,06 g que contienen 33% de antibiótico.



257181
257181

N O T A

Descrito el invento, se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad inglesa Nº 10.858/59 de fecha 31 de marzo de 1.959.

5. 1. Procedimiento para la obtención de un nuevo antibiótico, el cual comprende el cultivo del Streptomyces Kres-tomyceticus N.C.I.B. 8995 y Commonwealth Mycological Institute Nº 79589, tal como aquí se describe, en un medio nutritivo acuoso que contiene una fuente de carbono, nitrógeno y sales minerales en condiciones aeróbias, hasta impartir al medio
10. actividad antibacteriana substancial, y la recuperación del antibiótico del medio.
2. Procedimiento en conformidad con la reivindicación 1, en el cual se halla presente en el medio nutritivo un metal pesado.
15. 3. Procedimiento en conformidad con la reivindicación 2, en el cual el metal pesado es cobre, zinc, manganeso, hierro o cromo.
4. Procedimiento en conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, el cual el cultivo se efectúa a temperatura de 24°C a 32°C durante un período de dos
20. días a una semana, a un pH de 6,3 a 7,8.
5. Procedimiento en conformidad con la reivindicación 4, en el cual el pH inicial es de 6,4 a 6,7 y el pH final de 7,6 a 7,8.
25. 6. Procedimiento en conformidad con cualquiera de



257181

las reivindicaciones precedentes, en el cual el cultivo se efectúa por fermentación sumergida con aeración y agitación del medio.

5. 7. Procedimiento en conformidad con la reivindicación 6, en el cual la relación entre la cantidad de aire que debe introducirse en el depósito de fermentación y el volumen del líquido de cultivo varía en el curso de la fase de fermentación entre 0,1 y 0,8.
10. 8. Procedimiento en conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el antibiótico se recupera del medio por absorción sobre un absorbente sólido, del cual se eluye subsiguientemente.
15. 9. Procedimiento en conformidad con la reivindicación 8, en el cual el absorbente sólido es carbón.
20. 10. Procedimiento en conformidad con la reivindicación 8, en el cual el antibiótico se recupera por absorción sobre una resina cambiadora de iones.
25. 11. Procedimiento en conformidad con la reivindicación 10, en el cual el antibiótico se recupera de la resina por elusión, se filtra subsiguientemente y la solución filtrada se evapora hasta sequedad en vacío.
30. 12. Procedimiento en conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el cual el antibiótico se cristaliza finalmente en una mezcla de metanol y acetona.
13. Procedimiento en conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el antibiótico se convierte ulteriormente en sulfato por tratamiento de la solución del clorhidrato con sulfato de trietilamina.
14. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 13, en el cual el antibiótico obtenido, eficaz para inhibir el de-



257181

- sarrollo del microorganismo patógeno, o sus sales, que tiene caracter básico, contiene carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno y dá por acilación derivados pentaacilados, tiene un sulfato que es un polvo blanco soluble en agua e insoluble en casi todos los disolventes orgánicos, contiene 30,8-30,57% de carbono, 7,00-6,44% de hidrógeno, 7,19-7,38% de nitrógeno y 7,08-8,99% de azufre y posee absorción característica en la región infrarroja cuando está suspendido en solución de bromiato potásico, con picos pronunciados en las siguientes frecuencias (en micras): 2,94, 3,41, 6,15, 6,55, 9,00 y 9,52; bandas débiles en 6,82, 7,08, 7,28, 7,46, 10,70, 11,17, 11,62 y 13,08; e inflexiones en 8,09 y 10,23, con rotación óptica de 1%, por ejemplo soluciones de sulfato de $(\alpha)_D^{20} = +51^\circ$, un clorhidrato que es un polvo blanco insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos excepto el metanol, con rotación óptica de 1%, por ejemplo soluciones de clorhidrato de $(\alpha)_D^{25} = +55^\circ$, y por análisis contiene 33,79 de C, 6,76 de H, 8,17 de N y C-21,05%, un sulfonato p(p-hidroxi-fenilazo)-bencénico que contiene 58,58% de C, 5,25 de H, 10,27% de N y 7,72% de S, y una sal de heliantina que contiene 51,29% de C, 6,20% de H, 12,23% de N y 7,5% de S.

15. Procedimiento para la obtención de un nuevo anti-biótico.

25. Según se describe y reivindica en la presente memoria que consta de 26 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras, acompañadas de una lámina de dibujos.

Barcelona para Madrid, a 30 de marzo de 1.960.

SOCIETA FARMACEUTICI ITALIA.

p. a.

JAIME ISERN

D. P.

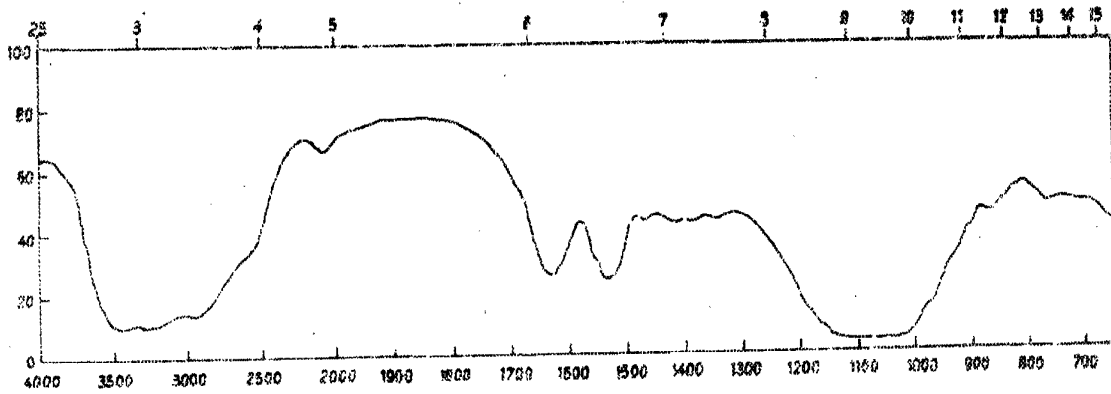
E. 135 +
E. 135/a

R/s Societá Farmaceutici Italia

Hoja única



257181



Madrid, 30 Marzo 1960
p.a. Jaime Isern
JAIME ISERN
P. B.