

258439



PATENTE DE INVENCION

Ref. Ciba Case 4287/1+2/E.

Memoria Descriptiva

sobre:

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

=====

Solicitante: CIBA SOCIETE ANONYME, entidad suiza, residente en
Basilea, Suiza.

=====

En las patentes nº (Sol. Fran-
cesa nº 771096 - Case 3829/1+2) y (Sol. Fran-
cesa nº 800203 - case 4087/E) se describe la obtención
de un nuevo antibiótico soluble en agua de *S. griseofla-*
5. *vus* A 9578 resp. *S. galilaeus* A 18822. Este antibiótico

204
258439



se denomina a continuación ferrimicina y pertenece a las sideramicinas, una clase de antibióticos ferrosos también o ligadores de hierro, entre los que se cuenta/el antibiótico griseina, albomicina y A 1787. Las sideramicinas

5. se caracterizan, porque su eficacia antibiótica es antagonizada por las ferrioxaminas [véase Bickel et al., *Experientia* 16, 129 (1960)] 7.

10. La ferrimicina y sus componentes son sustancias básicas, marrón rojizas, que se disuelven bien en ácidos y en disolventes fuertemente polares, tales como agua, metanol, formamida dimetílica, glicol, celosolve metílica, Además se disuelven en alcohol bencílico, en fenoles o en mezclas de fenoles con disolventes lipoides. Se componen de carbono, hidrógeno, 15. oxígeno y nitrógeno y contienen además hierro o poseen la capacidad de ligar hierro.

20. La ferrimicina es una mezcla de compuestos muy afines, que se compone de dos componentes principales, la ferrimicina A y la ferrimicina B. La misma ferrimicina A se puede separar, a su vez, en dos componentes: la ferrimicina A1 y la ferrimicina A2. Las propiedades de estos distintos componentes se indican más abajo.

25. Hasta ahora no se había logrado la obtención de la ferrimicina o de los componentes mencionados en forma pura. Una dificultad especial para la obtención pura de las ferrimicinas consiste, ante todo, en que se encuentran en el filtrado del cultivo en una cantidad muy reducida al lado de grandes cantidades de

258439



- substancias del caldo inactivas y productos de fermentación con propiedades físico-químicas muy similares. El filtrado del cultivo contiene, como promedio, por 1 parte de ferrimicina 10.000 - 15.000 partes en peso de
5. substancias inactivas que son hidrófilas como las ferrimicinas. Una dificultad para el enriquecimiento y obtención en forma pura de las ferrimicinas consiste también en su inestabilidad en un gran margen de pH. Una separación del antibiótico en los distintos componentes
10. se dificulta además porque éstos, aún en sistemas de disolventes cromatográficamente favorables, solo muestran una diferencia muy pequeña en los valores R_f .

- Se ha descubierto ahora que los productos obtenidos según los procedimientos de las patentes
15. nº (sol. francesa nº 771096 - Case 3829/1+2)
y nº (sol. francesa nº 800203 - case 4087/E) se pueden limpiar considerablemente más por electrofóresis y/o distribución en contracorriente empleando alcohol bencílico y, si se desea, cromatografía.

20. La electrofóresis se efectúa como electrofóresis de alta tensión \approx 500 - 4000 voltios, preferentemente 1000 - 2000 voltios, en forma de electrofóresis de zonas, especialmente de electrofóresis de contracorriente.

25. En la electrofóresis en ácido acético diluido se aumenta la actividad de la ferrimicina A a 7000 - 8000 veces la actividad del filtrado del cultivo liofilizado. Los preparados limpiados, obtenidos muestran máximas de absorción a $215 \text{ m}\mu$ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} \approx 320$), $315 \text{ m}\mu$

258439²



($E_{1cm}^{1\%} = 28,5$ y a $430 m/\mu$ ($E_{1cm}^{1\%} = 19,5$) así como una inflexión a $228 m/\mu$. Contienen 3,96 - 4,07 % de hierro.

Un incremento aún mayor de la actividad (hasta 10.000 veces) se logra en la electrofóresis de contracorriente

5. de la ferrimicina A. En esta disposición de separación se fija localmente el antibiótico, presente como catión, compensando exactamente el movimiento forzado por un campo eléctrico mediante una corriente electrolítica dirigida en dirección opuesta. Las materias con otras
10. movilidades eléctricas sales del aparato separador por ambos extremos de los electrodos.

Para la distribución de contracorriente se emplean por ejemplo los siguientes sistemas:

- Alcohol bencílico (60 partes en peso) -
15. -cetona metiloisobutílica (44 partes en peso) - solución acuosa al 15 % de cloruro sódico (50 partes en peso) - ácido clorhídrico 0.01 n (50 partes en peso);

- Alcohol bencílico (66 partes en peso) -
20. cetona metiloisobutílica (33 partes en peso) - solución acuosa al 5 % de cloruro sódico (50 partes en peso) - ácido clorhídrico 0,01-n (50 partes en peso).

- También es bien adecuado el sistema
- alcohol bencílico (200 partes en volúmen) - n- butanol (100 partes en vol.) - agua (300 partes en vol.) -
25. solución acuosa saturada de cloruro sódico (50 partes en vol.) - ácido clorhídrico 1-n (6 partes en vol.). Aquí se reparte la materia activa en los dos componentes ferrimicina A y ferrimicina B.

En la cromatografía se emplean como



258439

absorbentes preferentemente las resinas intercambiadoras de iones fuertemente ácidas, tal como por ej. Dowex 50-WX₂. Como medio de elución se emplean ventajosamente

- 5. soluciones ácidas de dispersor de concentración incrementante, tal como por ej. dispersor de acetato amónico del pH 4,6 en una concentración de 0,2 hasta 2,0 molecular.

Para la distribución en los componentes A1 y A2 es especialmente bien adecuada la cromatografía distributiva en celulosa en el sistema butanol-ácido acético glacial-agua 4:1:5.

10.

Los preparados así obtenidos poseen, con relación al filtrado de cultivo liofilizado, una actividad 10 - 20.000 veces superior, mientras que los productos empleados como material inicial solo muestran una actividad 100 - 1000 veces superior en comparación con el filtrado de cultivo liofilizado. Muestran las siguientes propiedades físicas y químicas:

15.

Microanálisis: C: 48,65 %, H: 7,09 %, N: 12,95 %, Fe: 4,56 %, Cl: 6,10 %, (C)CH₃: 1,99% (Roth-Kuhn), amino-N: 2,33 % (Van Slyke).

20.

Titración: pK_{MCS}* (Helv. 37,1872 (1954) : 4,18; 7,88 peso equivalente : 1106

25.

Espectro de absorción:

λ max	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$
228 m μ	282
" 319 m μ	28,2
" 425 m μ	22,6

"Valor de reducción" seg. G.S. Hanes, Biochem. J. 23, 99 (1929); 1,7 ml tiosulfato sódico 1/100-n.



258439

Hidroxilamina ligada seg. T. Emery y J.B. Neilands,
Nature 184, 1632 (1959): 0,83 mol.
de NH_2OH por átomo de Fe.

- El espectro infrarrojo (en bromuro potásico) está representado en la figura 1. La ferromicina A limpiada se disuelve muy bien en formamida dimetíllica, celosolve metíllica, alcohol bencílico y ácido acético glacial, difícilmente en etanol y es practicamente insoluble en piridina, propanol, butanol y los demás disolventes orgánicos usuales, especialmente disolventes pipoides. Se puede precipitar de solución acuosa con ácido picrínico, ácido picrolónico y reinecato sódico. Las soluciones acuosas teñidas de rojo naranja cambian reversiblemente su color al agregar ácido mineral a través de rojo de vino hacia amarillo claro. Con sosa cáustica se presenta asimismo descoloración. Las soluciones neutras no reaccionan con ferrocianuro potásico. Las soluciones acidificadas dan teñidos o precipitaciones de azul de Berlín. El hierro ligado completamente en estado 3-valente se libera, por lo tanto, según se reduce el valor pH.
5. 10. 15. 20.

- Con cloruro de hierro-(III) se forma un teñido rojo de vino, con cloruro de hierro -(III) + potasio-cianuro de hierro -(III) un teñido azul. Los siguientes ensayos son negativos: Molisch, Anthron, Folin-Ciocalteu, Sakaguchi. La reacción ninhidrínica en butanol-piridina se vuelve después de un largo calentamiento ligeramente positiva. La hidrólisis con ácido clorhídrico 6-n da una mezcla de unas 15 substancias demostrables
- 25.



258439

por cromatografía de papel, parcialmente ninhidrina-positivas. Entre éstas se pudieron identificar los siguientes compuestos: ácido succínico, 1-amino-5-hidroxi-lamino-pentano, ácido δ -aminovaleriánico, cadaverina, amoniac, prolina, una substancia cristalina ($C_7H_8O_3 \cdot N \cdot HCl$) con λ_{max} 227 y 323 $m\mu$ y cloruro férrico.

- 5.

La base A limpia se puede seguir descomponiendo cromatográficamente en los componentes A1 y A2. Como absorbente se emplea preferentemente celulosa, como fundente n-butanol ligeramente acidificado.

10.

Los componentes A1 y A2 se caracterizan de la siguiente manera:

15. Base A1 : El análisis elemental da (después de secar durante 72 horas a $20^\circ/10^{-4}$ mm sobre P_2O_5) : C = 47, 63 %, H = 6,72 %, Fe (color.) = 4,88 % Titulación en celosolve metílico al 80 %; Peso equivalente : 1078 ; pK = 7,87. El espectro ultravioleta muestra máximas en 229 $m\mu$ ($E_{1cm}^{1\%} = 336$, 319 $m\mu$ ($E_{1cm}^{1\%} = 37$) y 425 $m\mu$ ($E_{1cm}^{1\%} = 27,6$) El espectro infrarrojo (en bromuro potásico) está representado en la figura 2.

20.

25. Base A2 : El análisis elemental (después de secar como arriba) da : C = 48,77 %; H = 6,65 %, Fe (color.)= 4,82 %; titulación en celosolve metílico al 80 %; Peso equivalente : 984 ; pK = 7,73. El espectro ultravioleta muestra máximas en 227 $m\mu$ ($E_{1cm}^{1\%} = 332$) 319 $m\mu$ ($E_{1cm}^{1\%} = 37$) y 425 $m\mu$ ($E_{1cm}^{1\%} = 25$). El espectro infrarrojo (en bromuro potásico) está representado en la figura 3.

En la figura 5 están representados los

258439



espectros ultravioleta (en agua : $c = 5 \times 10^{-3}$) de la ferrimicina A limpiada (curva 1, extinción $E = A$) y de los componentes Base A2 (curva 2, $E = A - 0,1$) y Base A1 (curva 3, $E = A - 0,2$). Por vía de cromato-

5. grafía de papel se pueden diferenciar univocamente las ferrimicinas de la griseina [F.A.Kuehl. M.N. Bishop, L.Chalet y K.Folkers, Am.Soc.73, 1770 (1951)], la albomicina [G.F. Gause, Birt.Med.J.1955, 1177] y A 1787 [H.Thrum, Naturwiss. 44, 561 (1957)]. En el
10. sistema n-butanol-ácido acético glacial-agua 4:1:5 (véase figura 4) estos antibióticos se encuentran, después de un tiempo de marcha de 10 horas, aún casi en el punto de partida. La demostración se efectúa bioautográficamente con *Staphylococcus aureus*.
15. La ferrimicina A limpiada reacciona con 8-oxiquinolina en solución metanólica bajo separación de una precipitación cristalina teñida de negro de oxiquinolina-hierro. De la solución se puede aislar la Ferrimicina A libre de hierro como polvo de color amari-
20. llento. Posee $1/3$ de la actividad in vitro del material inicial y muestra, aparte de la falta de la banda de hierro a $425 m\mu$ el mismo espectro de absorción que la ferrimicina A. Al agregar cloruro de hierro- (III) se duplica la actividad in vitro específica y se recupera
25. el color rojo y la absorción de hierro en $425 m\mu$.

En la siguiente tabla se han recopilado las actividades in vitro de los preparados de ferrimicina limpiados. Se han indicado los diámetros de zonas de retención medidos en mm que se obtuvieron en el

258439

2 MAY 1967



ensayo con placas de agar en redondeles de papel de 6 mm de diámetro con impregnación con soluciones al 0,1 %.

O e p a	Ferrimicina A	Ferrimicina A1	Ferrimicina A2
Staph. aur.	26	27	26,5
Strepto. faec.	8	0	9,5
Esch. coli	10,5	10,5	11
Shigella sonnei	13,5	14	14
Klebs. typ. A	23*	22,5*	22,5*
Past. pestis	12	12	12
Bac. megatherium	20	20	20
Ustilago sphaerogena	28	-	-
Ustilago scabiosae	24		

* Zonas de retención veladas

Los diámetros de zonas de retención del ensayo de placas de preparados altamente purificados eran a través de un gran margen de dilución linealmente dependientes del logaritmo de la concentración del antibiótico.

Sobre las actividades in vivo obtenidas en ratones infectados de algunos preparados de ferrimicina da un resumen la siguiente tabla:

258439



Preparado	Organismos	Dosis por Kg. de ratón s.c.=subcutánea p.o.=per os			% de supervivientes	
Material de partida enriquecido	Staph.aur.	5 x	10	mg s.c.	50	
		5 x	3,3	mg s.c.	100	
		5 x	1	mg s.c.	75-83	
		5 x	0,1	mg s.c.	67	
		5 x	0,01	mg s.c.	0	
		5 x	330	mg p.o.	75	
		5 x	100	mg p.o.	50	
		5 x	33	mg p.o.	100	
		5 x	10	mg p.o.	85	
		5 x	3,3	mg p.o.	25	
		5 x	1	mg p.o.	0	
		Strept.haem.	5 x	10	mg s.c.	50
			5 x	3,3	mg s.c.	87
			5 x	1	mg s.c.	100
	5 x		0,1	mg s.c.	54	
	5 x		0,01	mg s.c.	0	
	5 x		330	mg p.o.	100	
	5 x		100	mg p.o.	100	
	5 x		33	mg p.o.	75	
	5 x		10	mg p.o.	67-75	
	5 x		3,3	mg p.o.	75	
	5 x		1	mg p.o.	17-27	
	5 x		0,1	mg p.o.	0	
	Pneumococ. Typ. III		5 x	10	mg s.c.	50
			5 x	3,3	mg s.c.	100
		5 x	1	mg s.c.	75-83	
		5 x	0,1	mg s.c.	75	
5 x		33	mg p.o.	100		
5 x		10	mg p.o.	67-100		
5 x		3,3	mg p.o.	100		
5 x		1	mg p.o.	50		
5 x		0,1	mg p.o.	0		

28MA



258439

Preparado	Organismos	Dosis por Kg. de ratón s.c. = subcutánea p.o. = per os	% de supervivientes
Ferrimicina A	Staph.aur.	5 x 0,1 mg s.c. 5 x 0,05 mg s.c.	100 80
Ferrimicina A1	Ataph.aur.	5 x 0,06 mg s.c. 5 x 0,03 mg s.c.	80 80
Ferrimicina A2	Staph.aur.	5 x 0,06 mg s.c. 5 x 0,03 mg s.c.	100 60

Los preparados de ferrimicina empleados como material inicial se obtienen de filtrados de cultivo que contienen el antibiótico mediante los métodos de elaboración y enriquecimiento usuales. Así se puede, como descrito en las patentes nº (sol. francesa nº 771096 - Case 3829) o patente nº (sol. francesa nº 800203 - Case 4087/E), separar el antibiótico en bruto del filtrado de cultivo por absorción , por ej. en carbón activo o en una resina intercambiadora de iones, o por precipitación mediante un ácido orgánico, tal como por ej. ácido picrínico. Un enriquecimiento del antibiótico se puede lograr por ej. mediante extracción

2 MAY



258439

de una solución acuosa con una mezcla de cloroformo u otros disolventes lipoides con fenol o también mediante cromatografía o distribución a contracorriente.

- Los filtrados de cultivo, que contienen
5. las ferrimicinas, se obtienen por ej. si la cepa *Streptomyces griseoflavus* A 9578 (véase Case 3829/1+2) o la cepa *Streptomyces galileus* n.sp. A 18822 (véase Case 4087/E) se cultivan, en forma, usual en un caldo.
 10. Un procedimiento ventajoso para la elaboración del filtrado de cultivo consiste en que el antibiótico se absorbe, con un pH 4, de filtrados de cultivo por el procedimiento de columna en IRC-50, después de lavar con agua y metanol se eluye a través de metanol-ácido clorhídrico 1-n (8:2) y de los eluados,
 15. ajustados a un valor pH 4, se extrae, después de expulsar el metanol en vacío, mediante fenol-cloroformo (1:1) bajo separación de todos los componentes minerales. De los extractos fenólicos aclarados con celita
 20. se le pueden precipitar por adición de disolventes lipoides sobre materiales vehículo, tal como hyflo supercel o polvo de celulosa y eluir mediante metanol. Pero las ferrimicinas se pueden precipitar también directamente de los eluados de metanol mediante la adición de fenol acuoso sobre hyflo y librarlas de las materias acompañantes orgánicas e inorgánicas por lavado. Del hyflo
 25. se pueden volver a eluir las ferrimicinas mediante metanol. De los concentrados metanólicos se obtiene el antibiótico al evaporar cuidadosamente en forma de polvo

28 MAY



258439

marrón-negro.

- Este preparado o el material precipitado sobre materias vehículo se disuelve en forma finamente pulverizada en mezclas concentradas de fenol-cloroformo y después de agregar auxiliares de filtración se mezcla lentamente bajo fuerte agitación con cloroformo hasta lograr la proporción fenol-cloroformo de 1 g : 1 ml. De la mezcla resultante total se puede recibir el anti-biótico, después de separar una precipitación inactiva,
5. en ácido clorhídrico 1/10-n, volver a extraer de éste en forma enriquecida con fenol-cloroformo (1 : 1) y finalmente precipitar del extracto fenólico nuevamente sobre celulosa o auxiliares de filtración mediante la adición de mezclas de cloroformo-éter de petróleo. Las precipitaciones se eluyen con metanol, y el eluado se evapora cuidadosamente. Los preparados obtenidos sirven como material de partida para el procedimiento de enriquecimiento y separación descrito al principio.
- 10.
- 15.

- La invención se describe en los siguientes ejemplos. Las temperaturas están indicadas en grados Celsio.
- 20.

E-jemplo 1

- Porciones de 8 g. de un preparado enriquecido de ferrimicina (componente principal A; actividad con relación al filtrado de cultivo liofilizado = 2000-3000), tal y como por ej. se obtiene según el ejemplo 10 de la patente nº (solicitud francesa nº 800203 - Case 4087/E) se someten en una columna de cristal vertical de 1 m de longitud y 6 cm de diámetro, provista
- 25.

258439



- de un envoltente de refrigeración, llenada con polvo de celulosa, a la electrofóresis de zonas seg. J. Porath [Biochimica et Biophysica Acta 22 , 151 (1956)]. Como solución de electrolito sirve ácido acético 1/3-n.
5. La substancia se disuelve en 160 ml. de agua y la solución teñida rojo-marrón se aplica sobre la columna en el extremo del ánodo superior. A una tensión de 1000 voltios y una intensidad de corriente de 100 mA se desplaza la zona del antibiótico teñida de naranja, de unos 20 cm. de ancha, con una velocidad de 3,3 cm/h hacia el cátodo. Para aumentar el efecto separador de la columna se compensa exactamente este movimiento eléctrico mediante una corriente de electrolito, dirigida en dirección contraria, de 81 ml/h y con ello se sujeta el antibiótico localmente en la columna. De esta manera se expulsan materias acompañantes inactivas, teñidas de marrón, con una velocidad de traslación eléctrica mayor o menor a la del antibiótico, hacia el recinto del cátodo resp. del ánodo y allí se evacuan continuamente o de vez en cuando. Después de una duración de la electrofóresis de 5-6 días, el antibiótico ha traspasado una columna de líquido de 4 - 5 m de longitud. La substancia, que se encuentra en la columna , se eluye con solución de electrolito y las fracciones de eluado recogidas en el colector de fracciones automático se comprueban biológicamente. Se reúnen las fracciones teñidas de rojo oscuro, biológicamente activas (1,5 litros). De la solución acética se puede extraer el antibiótico después de la adición de 75 cm³ de solución de sal común acuosa



258439

- saturada con 250 cm³ de una mezcla de fenol-cloroformo (lg : 1 cm³). Del extracto se puede precipitar el antibiótico, después de filtrar a través de celita, por adición de 1 litro de éter y 500 cm³ de petróleo sobre
5. 16 g de hyflo supercel como precipitación teñida de naranja. La mezcla de precipitación y auxiliar de filtración se lava bien con acetona y finalmente se extrae con poco metanol frío. Del extracto metanólico se puede precipitar la ferricina A con acetona como polvo teñido
10. de color rojo naranja. El preparado secado a temperatura de ambiente a 0,001 mm durante 2 días contiene aprox. 100 % de la actividad introducida en forma 4-6 veces enriquecida. Análisis: C = 50,68 % ; H = 6,99 % ; N = 13,45 %
Fe (grav.) = 3,55 % ; Fe (color.) = 3,66 % ≠ Cl = 2,75 %.

2,46 % pérdida por secado a 120°/0,01 mm.

Espectro infrarrojo en bromuro potásico

: véase fig. 1.

20. Espectro ultravioleta en agua : máxima en 318 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 47,2$) ; inflexiones en 229 m μ y en 400 m μ .

- Solubilidad: muy buena en agua, metanol y mezclas de fenol-cloroformo, soluble en formamida dimetilica, celosolve metilica, alcohol bencílico y
25. ácido acético glacial, difícilmente soluble en etanol y prácticamente insoluble en piridina, propanol, butanol y demás disolventes orgánicos usuales, especialmente disolventes lipoides.

Relaciones de precipitación : Precipitable

258439

28 MAY



de solución acuosa con ácido picrínico , ácido picrolónico y reinecato amónico.

- Reacciones de color: Las soluciones acuosas teñidas de rojo naranja varían reversiblemente su color al agregar ácido mineral a través de rojo de vino hacia amarillo claro. Con sosa cáustica se presenta asimismo una descoloración. Las soluciones neutras no reaccionan con ferrocianuro potásico. Las soluciones acidificadas dan teñidos o precipitaciones de azul de Berlin.
- 5.
- 10.

El hierro ligado complejamente en estado 3-valente se libera, por lo tanto, según se reduce el valor pH.

- Con cloruro de hierro-(III) se forma un teñido rojo de vino, con cloruro de hierro-(III)+ potasio-cianuro de hierro-(III) un teñido azul. Son negativos los siguientes ensayos: Molisch, Anthron, Folin-Ciocalteu, Sakaguchi. La reacción ninhidrínica en butanol-piridina se vuelve ligeramente positiva después de un largo calentamiento. La hidrólisis con ácido clorhídrico 6-n da una mezola de unas 15 sustancias demostrables por cromatografía de papel, parcialmente ninhidrínicamente positivas.
- 15.
- 20.

Ferrimicina A libre de hierro:

- 100 mg de ferrimicina A purificada, obtenida se disuelven en 1 ml. de metanol, se mezcla con 334 mg. de 8-oxiquinolina en 2 ml. de metanol y a temperatura de ambiente se deja reposar durante 8 horas. Después de seguir reposando durante 15 horas a 0° se
- 25.

258439



separan los cristales verde-negros precipitados de hierro 8-oxiquinolínico, La solución se diluye con poca agua y se agita bien con cloroformo y benzol para retirar la oxiquinolina en exceso. La fase acuosa amarillo-pálido restante, que contiene al antibiótico libre de hierro, se liofiliza : 90 mg. de polvo beige.

5. El antibiótico libre de hierro muestra en la zona ultravioleta el mismo espectro de absorción como el material inicial, en la zona visible falta sin embargo la banda plana a 400 - 430 m μ . Posee solo 1/3 de la actividad in vitro del material inicial. Una solución incolora del antibiótico libre de hierro se tinte, al agregar cloruro de hierro-(III), momentáneamente de rojo intenso volviendo a presentarse de nuevo la absorción de hierro en 400-430 m μ en el espectro y aumentándose la actividad específica antibiótica.
10. 15.

Ejemplo 2

800 mg. del preparado de ferrimicina A, obtenida según el ejemplo 1, se cromatografía en una columna celulósica de 3 x 65 cm. (198 g) a 12°. Como fundente sirve la fase orgánica de una mezcla equilibrada de ácido acético 0,5-n -n-butanol (1:1) después de agregar 5 % en vol. de n-butanol.

Las fracciones recogidas en el colector de fracciones automático de 30-40 ml. se comprueban biológicamente, espectroscópicamente y cromatográficamente sobre papel. Las fracciones 60-104 contienen 191 mg. de ferrimicina A1, las fracciones 105-200 92 mg. de ferrimicina A2. Las correspondientes fracciones reunidas

20. 25.

258439



se agitan con igual volúmen de éter de petróleo y con aprox. 10 % en volúmen de agua, pasándose los materiales antibióticos a las fases acuosas. De estas se elaboran según el método descrito en el ejemplo 1, con fenol-

5. cloroformo y se obtienen en forma de polvo de color naranja. Los preparados secados a 20°/0,001 mm. durante 3 días dan los siguientes datos:

Ferrimicina A1 : Análisis : C= 47,63%;

H= 6,72% ; Fe= 4,88% ; Titración en 80% de celosolve

10. metílica; peso equivalente : 1078; pK: 7,87. Espectro ultravioleta : $\lambda_{\max} 229 \text{ m}\mu$ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 336$), $319 \text{ m}\mu$ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 37$) y $425 \text{ m}\mu$ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 27,6$).

Espectro infrarrojo en bromuro potásico : véase fig. 2.

15. Ferrimicina A2: Análisis: C= 48,77 %; H= 6,65% ; Fe = 4,82 % ; titración en 80 % de celosolve metílica; peso equivalente : 984 ; pK: 7,73. Espectro ultravioleta $\lambda_{\max} 227 \text{ m}\mu$ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 332$), $319 \text{ m}\mu$ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 37$) y $425 \text{ m}\mu$ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 25$). Espectro infrarrojo
20. (en bromuro potásico) : véase fig. 3. La cromatografía de papel de distintos preparados de ferrimicina enriquecidos y limpiados sobre papel Whatman nº 1 está representada en la fig. 4. La demostración se efectúa bioautográficamente con *Staphylococcus aureus*. Significan :

25. I: El sistema butanol-ácido acético glacial-agua 4=1:5; 10 horas.

II: El sistema butanol-acetato butílico-ácido acético glacial-agua 100:30:13:143; 24 horas.

III: El sistema butanol-acetato butílico-

2.9.64
258439



-ácido acético glacial-agua 100:30:13:143; 60 horas.

- 1 : El antibiótico ferrimicina, Base A+B según patente nº (sol. francesa nº 800203 - Case 4087/E, ejemplo 7) (1 μ g)
5. 2 : El antibiótico ferrimicina B, seg. Case 4087/E (sol. francesa nº 800203, ejemplo 10 (5 μ g).
- 3 : El antibiótico Ferrimicina A según la presente invención, ejemplo 1 (0,1 μ g)
10. 4 : El antibiótico Ferrimicina A1 según la presente invención, ejemplo 2 (0,05 μ g)
- 5 : El antibiótico Ferrimicina A2, según la presente invención, ejemplo 2 (0,05 μ g)
- Ejemplo 3
15. 6 g. de un preparado de Ferrimicina que, referido al filtrado de cultivo liofilizado, tienen aprox. 1000 veces más actividad antibiótica, y que contiene tanto Ferrimicina A como también ferrimicina B, se distribuye en contracorriente según Craig a través
20. de 115 escalones. El aparato se compone de 120 unidades. Por unidad se alimenta con 100 cm³ de fase superior y 100 cm³ de fase inferior de una mezcla a, 19° equilibrada, de alcohol bencílico (200 partes en volumen (n-butanol (100 partes en volumen), ácido clorhídrico
25. 1-n (6 partes en volumen), agua(300 partes en volumen) y solución de cloruro sódico saturada a 19°, acuosa, (60 partes en volumen). Las 2 primeras unidades contienen solamente disolvente. En las siguientes 3 unidades se introducen, en cada una , 2 g. de substan-



28
258439

cia y a continuación se distribuye 115 veces a 19°. El número de movimientos de agitación por distribución es de 30, la duración de las pausas de reposo 15 minutos.

5. Terminada la distribución se recogen a -10° las 118 fracciones obtenidas.

De cada tercera fracción se toman para el ensayo 10 cm³ de la fase superior y 10 cm³ de la fase inferior y estas se agitan con 50 cm³ de éter de petróleo. La fase acuosa separada (10 cm³), que ahora contiene todo el material hidrófilo, se libera mediante brave evacuación de los disolventes orgánicos aún adheridos. Las soluciones de ensayo, así obtenidas, sirven por una parte para la valorización colorimétrica (extinción a 425 m μ en cubetas de 1 cm. véase fig. 6, curva 1) y para la reacción de color ninhidrínica. Para la ejecución de esta última se mezclan 0,5 cm³ de solución de ensayo y 0,5 cm³ de reactor ninhidrínico, preparado seg. las instrucciones de S. Moore y W.H. Stein,

10. 15. 20. 25.
- J. Biol. Chem. 211, 907 (1954), se calienta 15 minutos a 100°, se diluye con 5 cm³ de alcohol-agua (1:1) y a continuación se mide en el espectómetro a 570 m μ (curva 2). Para la comprobación biológica se diluyen las soluciones de comprobación a 1:50. En la curva 3 se han indicado las actividades in vitro contra *Staphilococcus aureus* obtenidas en el ensayo de difusión de placa en relación con un standard arbitrario. Las fracciones activas 40-70 contienen, como se puede demostrar por cromatografía de papel, la Ferrimicina A, mientras que

28 MAY



258439

la ferrimicina B se encuentra en las fracciones 75-100. Se puede lograr un enriquecimiento esencial. Las fracciones antibióticamente activadas 25-39, 40-48, 49-55, 56-70 y 71-95 se reúnen y se agitan con igual volumen de éter de petróleo. Las materias de contenido, teñidas de rojo, se impulsan aquí a las fases acuosas. Se aislan de éstas en la forma descrita más abajo con fenol-cloroformo. Las cantidades así obtenidas, así como los enriquecimientos logrados con relación al material inicial y rendimientos en actividad antibiótica, están resumidos en la siguiente tabla:

Fracción	Cantidad en mg.	Factor de enriquecimiento	Rendimiento de actividad	Ferrimicina
25-39	492	0,55	4,6 %	A
40-48	254	4,77	20,4 %	
49-55	211	9,22	32,8 %	
56-70	257	3,49	15,1 %	
71-95	938	1,72	27,2 %	

El material inicial se obtiene como sigue:

30 litros de un concentrado de eluado acuoso, que se obtiene según el ejemplo 7 de la sol. de patente francesa nº 800203-Case 4087/E por elución de

258439



- la ferrimicina de amberlita IRC 50 y ulterior eliminación del metanol en vacío, se mezclan agitando con 1 Kg de Hyflo y en el plazo de 2 horas con 1,8 litros de una mezcla de 11 partes de fenol y 1 parte de agua. A
5. continuación se deja agitar aún durante 1/2 horas filtrándose entonces en vacío. El filtrado contiene aprox, 2-5 % de la actividad y se desecha. La torta de filtrado, bien prensada, se agita dos veces, cada una con 4 litros de éter y una vez con una mezcla de 8 litros
10. de acetona y 2 litros de éter y cada vez se filtra en vacío, lavándose entonces el residuo consecutivamente en el filtro de vacío, cada vez, con 5 litros de acetona y 4 litros de cloroformo. Todas las soluciones de lavado son practicamente inactivas. La torta de filtrado húmeda de cloroformo se introduce entonces agitando en 3
15. litros de una mezcla de fenol-cloroformo (1:1) (peso/volumen) y se agita durante 1 hora. Después se agregan en el plazo de 1 hora 15 litros de cloroformo en corriente igualada. Se filtra en vacío el hyflo y se lava dos
20. veces con 2 litros de fenol-cloroformo 1:11 (peso/volumen) y una vez con 2 litros de cloroformo. El residuo contiene aún 5-10 % de la actividad.
25. Los filtrados reunidos (22 litros) se concentran a 25° a 4 litros y el concentrado se gotea en el plazo de 30 minutos a una mezcla de 4 litros de éter, 8 litros de éter de petróleo y 400 g. de hyflo. Después de otros 30 minutos se filtra en vacío. La torta de filtrado se lava con 2 litros de éter y dos veces con 1 litro de acetona. Todos los filtrados contienen

28 MAY



258439

sólo huellas de actividad.

- La torta de filtrado se agita tres veces durante 10 minutos, cada vez con 1,5 litros de metanol, se filtra en vacío y finalmente se lava aún con 0,5 litros de metanol en el filtro de vacío. El hiflo lavado ya no contiene ninguna actividad.
- 5.

- Los filtrados marrón oscuros (4-4,5 litros) se evaporan a 20-30° en el vacío al chorro de agua, cuidadosamente, hasta secar. El residuo aún pegajoso se seca en alto vacío durante 20 horas. Se obtienen 75-88 g. de un preparado de ferrimicina fuertemente activo, marrón-rojizo. El rendimiento de actividad referido al material inicial es de un 90 %.
- 10.

Ejemplo 4

15. 2 g. del preparado de Ferrimicina A, obtenida según el ejemplo 3 (fracciones 49-55), que referido al filtrado de cultivo posee una eficacia antibiótica de unas 9000 veces, se cromatografían en una columna de 70 cm x 7,14 cm³ de un intercambiador de iones fuertemente ácido Dowex 50 WX₂ (100/200 mesh). El intercambiador de iones se limpia previamente según las indicaciones de Hirs et al. J.Biol.Chem, 219, 623 (1956) y después de transformar en la forma amónica se equilibra durante 3 días con 0,2 mol. de dispersor de acetato amónico del pH 5,40 a 17° a una velocidad de paso de 100 cm³/hora. A continuación se disuelve la substancia en 20 cm³ de solución dispersora, se aplica cuidadosamente sobre la columna y a continuación se eluye con la misma solución dispersora y velocidad de paso. Después de una
- 20.
- 25.

258439



duración de la elución de 20 horas se cambia a elución de gradiente. Aquí se concentra el dispersor de acetato amónico 0,2 mol., que entra en la columna continuadamente en una cámara mezcladora de 1 litro, por la entrada

5. igual de grande de dispersor de acetato amónico 2 mol. del pH 4,50 y con ello se incrementa continuadamente su efecto de elución. El eluado se recoge en fracciones a 40 cm³ sobre un colector de fracciones automático. La valorización del cromatograma se efectúa por

10. medición de extinción a 425 m μ , cromatografía de papel y comprobación biológica. Las fracciones reunidas de acuerdo con esta valorización se elaboran con fenol-cloroformo en la forma descrita. De las fracciones 195-216 se obtienen 440 mg. de ferrimicina A que con respecto

15. al filtrado de cultivo liofilizado muestran aprox. 16000 veces más actividad antibiótica, como polvo rojo marrón.

Microanálisis: C: 48,65 %, H: 7,09 %, N: 12,95 %, Fe: 4,56 %, Cl: 6,10%, (O)CH₃: 1,99 %, (Roth-Kuhn), amino-N: 2,33 % (van Slyke).

20.

Titulación: pK*_{MCS} (Helv. 37, 1872 (1954)): 4,18; 7,88; peso equivalente : 1106

Espectro de absorción:

λ max	228 m μ	E _{1%} _{1cm}	282
"	319 m μ	"	28,2
"	425 m μ	"	22,6

25.

"Valor de reducción" seg. C.S.Hanes, Biochem. J. 23, 99(1929): 1,7 ml. tiosulfato sódico 1/100-n.

258439



Hidroxilamina ligada seg. T. Emeru y J.B. Neilands,
Nature 184, 1632 (1959) 0,83 mol.
de NH_2OH por átomo de Fe.

5. Hidrólisis con HCl 6-n durante 14 horas a 110° : Pro-
ductos demostrados resp. aislados:
 NH_3 , cadaverina, 1-amino-5-hidroxi-
amino-pentano, ácido δ -aminova-
-leriánico, prolina, ácido succínico,
10. substancia cristalina ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_3\text{N}\cdot\text{Cl}$)
con λ_{max} 227 y 323 $\text{m}\mu$, así
como huellas de otras sustancias
ninhidrin-positivas y FeCl_3 .

- De las fracciones 115-145 del cromato-
grama se pueden aislar aún 135 mg. de una mezcla de mate-
rias teñidas de rojo-violeta, que muestran la eficacia
15. de vitamina B_{12} . El resto del material empleado se en-
cuentra como bandas teñidas de marrón en el lugar de apli-
cación del cromatograma y no se eluyen bajo las condicio-
nes indicadas.

20. N O T A

- Descrita suficientemente la naturaleza
del invento así como la manera de realizarlo en la prác-
tica, debe hacerse constar que las disposiciones ante-
riormente indicadas son susceptibles de modificaciones
25. de detalle, en cuanto no alteren su principio fundamen-
tal. También se hace constar que éste invento se re-
fiere a una solicitud de patente presentada en Suiza
con fecha 29 de Mayo de 1959, n^o 73755 y fecha 18 de
marzo de 1960, n^o 3062/60, acogiéndose por lo tanto, a



258439

los beneficios que concedan 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 20 años en España: "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION

5. DE UN NUEVO ANTIBIOTICO"; caracterizándose por lo siguiente:

1ª.- Procedimiento para la obtención de un nuevo antibiótico, caracterizado porque el antibiótico obtenido, se sigue limpiando por electrofóresis y/o distribución a contracorriente bajo empleo de alcohol bencílico y, si se desea, cromatografía y, si se desea la ferrimicina A limpiada se subdivide en los componentes A1 y A2.

10.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación

15. 1ª, caracterizado porque se parte de preparados de antibióticos que, comparados con el filtrado de cultivo liofilizado, estén por lo menos 100-1000 veces más enriquecidos.

3ª.- Procedimiento según las reivindi-

20. caciones 1ª y 2ª, caracterizado porque se trabaja según el sistema de la electrofóresis de zonas.

4ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª- 3ª caracterizado porque se trabaja con electrofóresis de contracorriente.

25.

5ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª - 4ª, caracterizado porque se emplean tensiones de aprox. 500 - 4000 voltios.

6ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª-5ª, caracterizado porque en la electrofóresis

258439



se emplean polvo de celulosa como sustancia de llenado.

7^a.- Procedimiento según las reivindicaciones 1^a - 6^a, caracterizado porque como electrolito se emplea solución de ácido acético diluida.

5.

8^a.- Procedimiento según las reivindicaciones 1^a y 2^a, caracterizado porque la distribución de contracorriente se efectúa en el sistema alcohol bencílico (200 partes en vol.) - n-butanol (100 partes en vol.) - agua (300 partes en vol.) - solución de cloruro sódico acuoso, saturada (60 partes en vol.) - ácido clorhídrico 1-n (6 partes en vol.).

10.

9^a.- Procedimiento según las reivindicaciones 1^a y 2^a, caracterizado porque la distribución de contracorriente se efectúa en el sistema alcohol bencílico (60 partes en peso) - cetona metiloisobutílica (44 partes en peso) - solución de cloruro sódico al 15 % acuosa (50 partes en peso) - ácido clorhídrico 0,01-n (50 partes en peso).

15.

10^a.- Procedimiento según las reivindicaciones 1^a a 9^a, caracterizado porque en la cromatografía se emplean resinas intercambiadoras de iones fuertemente ácidas.

20.

11^a.- Procedimiento según las reivindicaciones 1^a y 10^a, caracterizado porque se eluye con soluciones de dispersor ácidas de concentración incrementante.

25.

12^a.- Procedimiento según las reivindicaciones 10^a y 11^a, caracterizado porque se eluye con dispersor de acetato amónico del pH 4,5 en una molecula-

258439

28 MAY



ridad de 0,2 hasta 2,0.

5. 13ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª - 12ª caracterizado porque el antibiótico limpiado, obtenido, se descompone cromatográficamente en polvo de celulosa en los componentes Ferrimicina A1 y Ferrimicina A2.

10. 14ª.- Procedimiento según la reivindicación 13ª, caracterizado porque como líquido de elución se emplea la fase orgánica de una mezcla de n-butanol con ácido acético acuoso diluida.

15. 15ª.- Procedimiento para la obtención de un nuevo antibiótico; tal y como queda substancialmente descrito en la presente memoria e ilustrado en los adjuntos dibujos que se acompañan.

Esta memoria consta de veintiocho hojas escritas a máquina por una sólo cara.

Madrid, 28 MAY 1960.
CIBA SOCIETE ANONYME
J. GOMEZ ALBO Y MODEI
P.P.



FIG.1

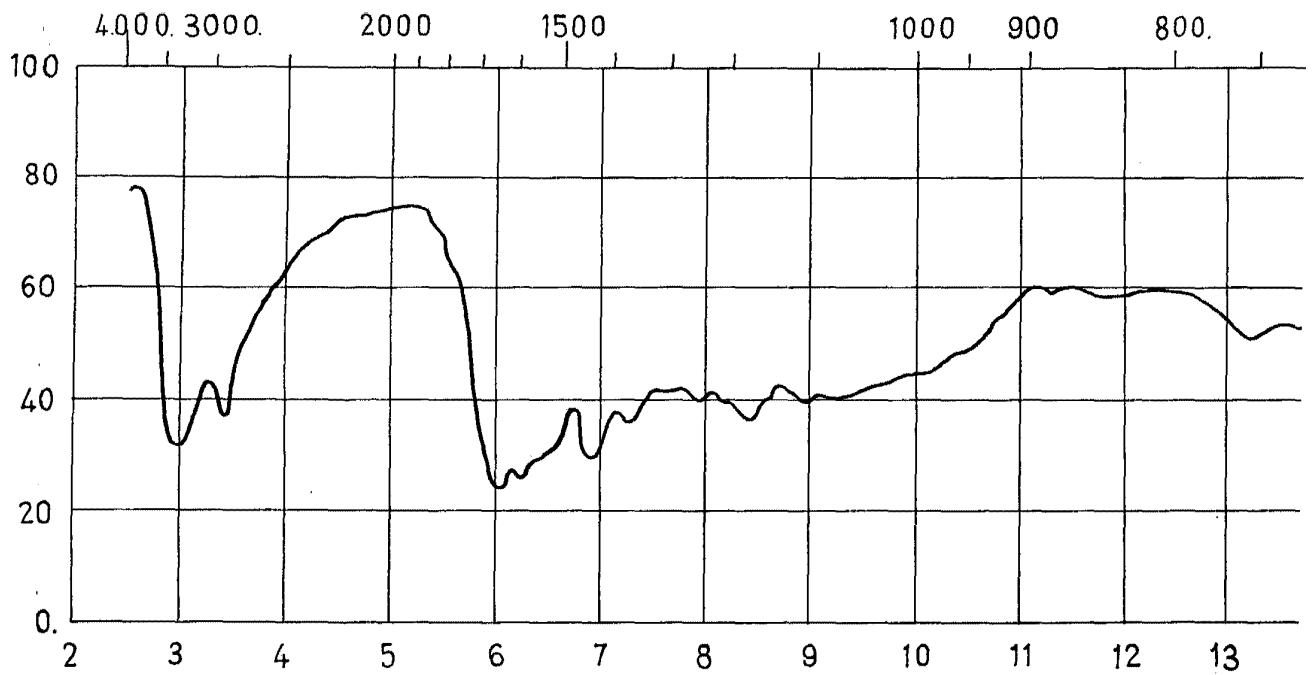


FIG.2

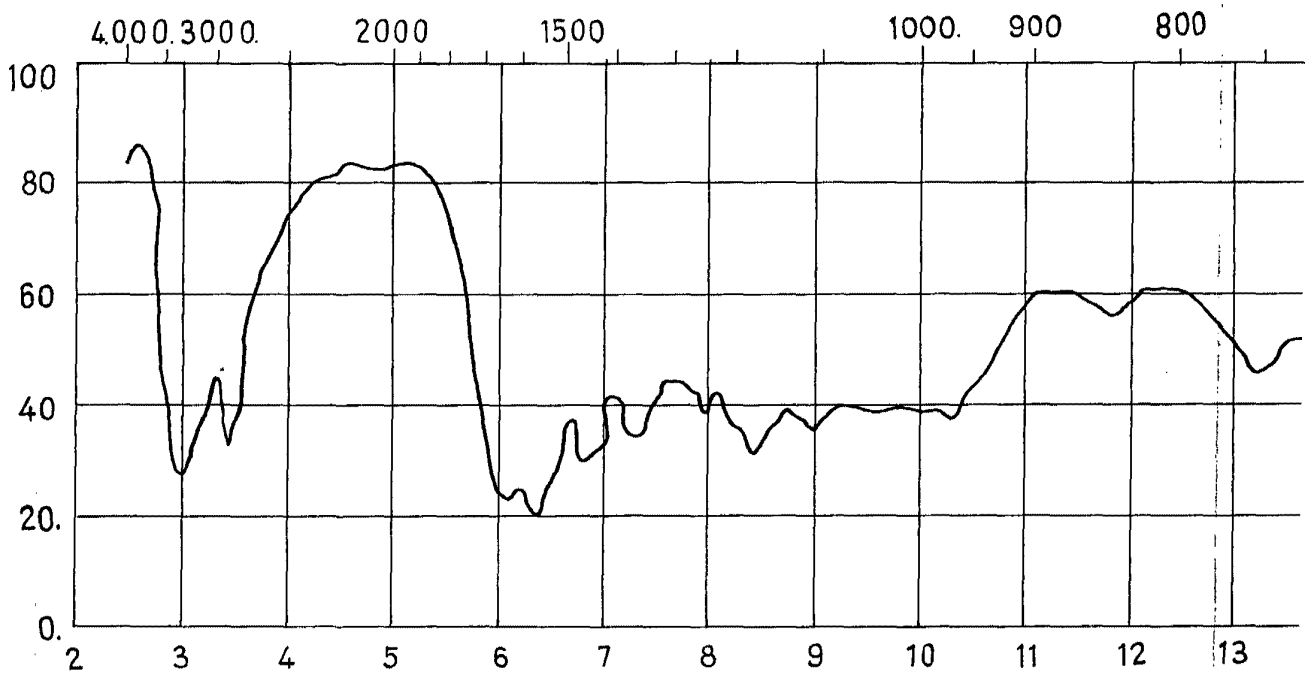
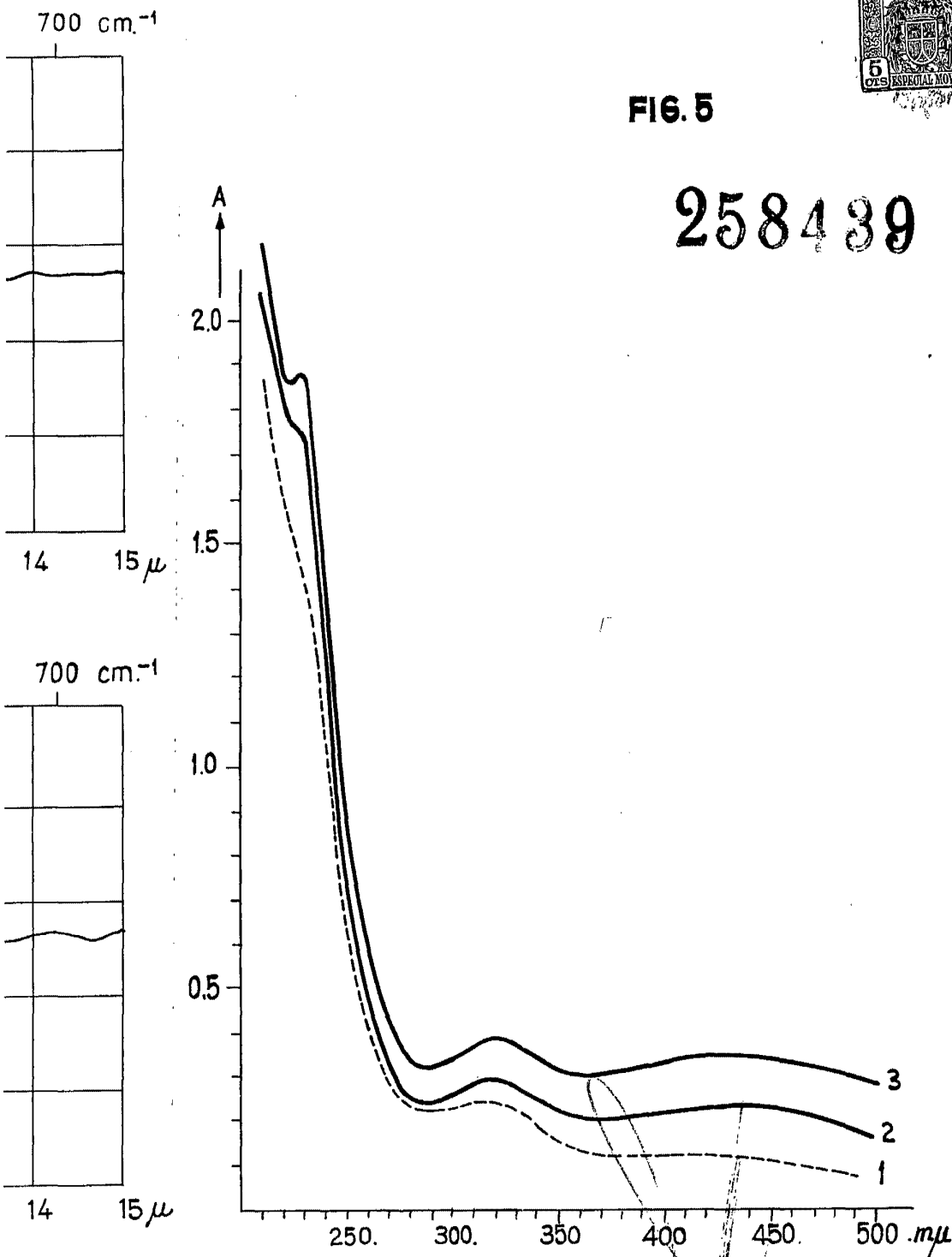




FIG. 5

258439



MADRID DE CIBA SOCIETE ANONYME. 1960.

P. P.



FIG. 3

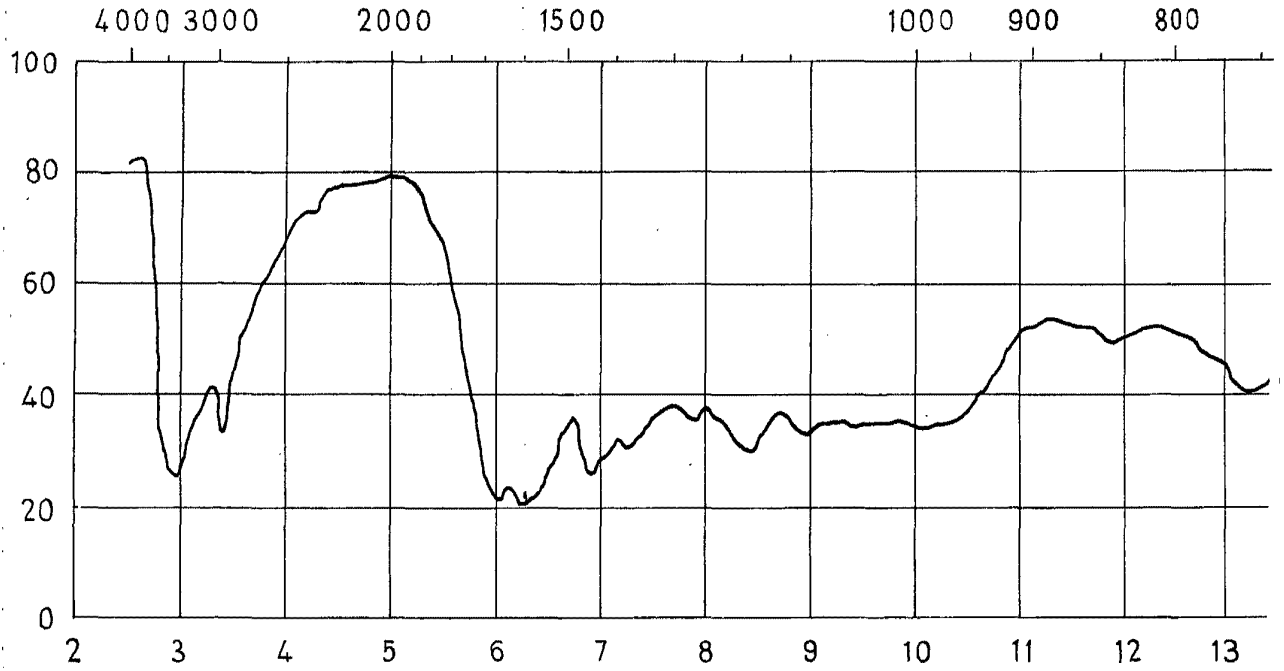
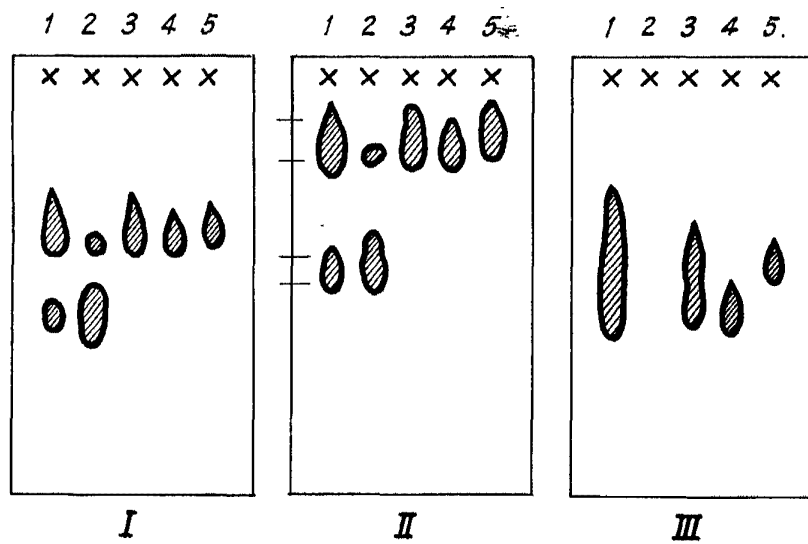


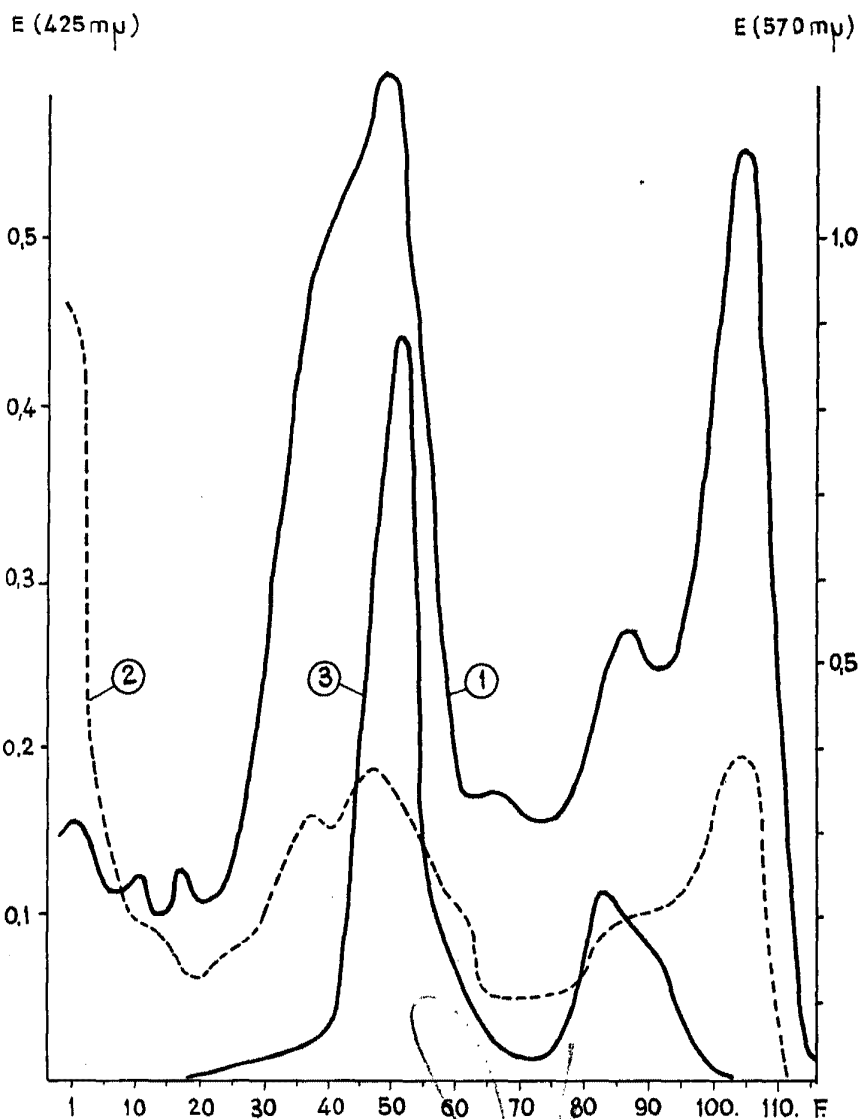
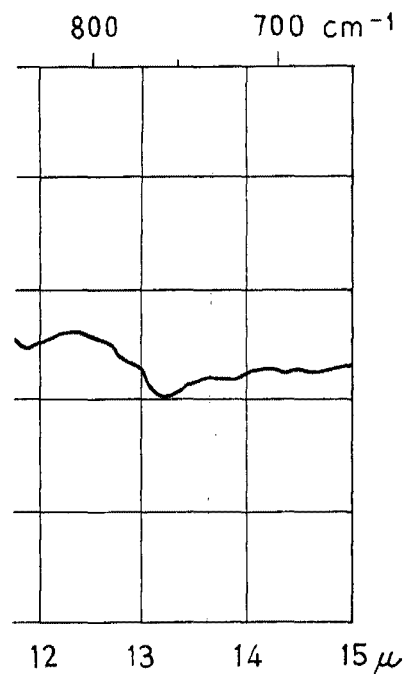
FIG. 4.



258439



FIG. 6.



5.
X

MADRID. DE 28 MAY 1960
CIBA SOCIETE ANONYME.

J. GONZALEZ
C. P.