

PATENTE DE INVENCION

CIBA Case 4377/4378/4505/E.

261237



Memoria Descriptiva

sobre:

"Procedimiento para la obtención de nuevas materias vegetativas".

=====

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

=====

De los materiales de origen biológico, especialmente del material vegetal, órganos de animales y microorganismos, ya se han aislado un gran número de materias biológicamente y fisiológicamente activas. Sobre la ampliamente extendida existencia de un grupo determinado de

5.



261237

materias vegetativas, sin embargo, no se conocía nada.

5. Se ha descubierto ahora, que de organismos vegetales, especialmente de los actinomicetenos, y sus extractos, se pueden obtener materias vegetativas en forma pura resp. enriquecida, que a continuación se denominan Ferrioxaminas.

10. Las ferrioxaminas son compuestos orgánicos nitrogenosos y ferrosos. Tienen un color marrón rojizo y se disuelven con facilidad en ácidos y disolventes fuertemente polares, tales como agua, formamida dimetílica, glicol, éter monometílico del glicol etilénico, así como alcoholes alifáticos bajos, tal como metanol. También se disuelven limitadamente en alcoholes alifáticos más elevados, así como en alcoholes aromáticos y fenoles, por ejemplo en butanol, alcohol bencílico, fenol. Los hidrolizados de las ferrioxaminas contienen sustancias ninhidrínicamente positivas. En su aspecto químico, las ferrioxaminas están emparentadas con un grupo de antibióticos que se denominan "Sideramicinas".
15. A las sideramicinas pertenecen, entre otros, los antibióticos ferrosos griseina, albomicina, las ferrimicinas, el antibiótico 1787 [H. Thrum, Naturwiss. 44, 561 (1957)] y las sustancias L.A. 5937 y L.A. 5352 [P. Sensi y M.T. Timbal, Antibiotics & Chemotherapy 9, 160 (1959)].

25. La ferrioxamina en bruto, que por ejemplo se obtiene en la fermentación de estreptomices, es generalmente una mezcla de distintos componentes. La ferrioxamina B es el producto principal de las ferrioxaminas que se forman durante la fermentación de *S. pilosus* Ettliger et. al. NRRL 2857 (ETH 21748). Además, se forman ulteriores
- 30.



- materias, que se denominan ferrioxaminas A, D, D₁, D₂, E y F. En la distribución según Graig del producto en bruto obtenido del filtrado del cultivo (2-10 días de fermentación a 27^o) por extracción con fenol-cloroformo (1 g : 1 ml) se pueden obtener 5 fracciones, cuya extinción en 425 m μ está representada en la fig. 1. De la fracción III se obtiene en la cromatografía, en la resina intercambiadora de iones Dowex 50 WX₂, el hidrocioruro de Ferrioxamina B puro como polvo marrón rojizo (fig. 2, fracciones 93 - 125).
- 5.
- 10.

- El hidrocioruro de la ferrioxamina B es soluble en agua y en disolventes orgánicos fuertemente polares. En la cromatografía de papel y en la múltiple distribución se comporta como sustancia unitaria de polaridad similar a las ferrimicinas A₁ y A₂, pero se diferencia de éstas por su estabilidad considerablemente mayor. En solución ligeramente ácido acética se traslada en la electrofóresis, con una velocidad de traslación muy poco inferior que aquéllas.
- 15.

- Para el hidrocioruro de la ferrioxamina B, en forma fuertemente enriquecida, se encontraron las siguientes propiedades: Microanálisis después de 48 horas a 20^o/0,001 mm: C 48,04%; H 7,41 %; N 11,21%; Cl 5,25 %; Fe 7,67 %; P 0%; S 0%. Titración: pK_{MCS}^{*} (Helv. 37, 1872 [1954]): 9,74; peso equivalente 704. Espectro de absorción en H₂O: λ_{max} 430 m μ con D₁^{1%} cm = 39,0. El espectro infrarrojo, en nujol, muestra, entre otras, bandas en 3230, 2900, 1640, 1573, 1461, 1377, 1260, 1225, 1185, 1132, 1028 cm⁻¹, bandas dobles: 989, 975, 935, 810, 750 cm⁻¹, véase fig. 3. Distribución múltiple, cromatografía
- 20.
- 25.
- 30.



261237

de papel y electroforesis de papel: Véase Tabla 1, fig. 4 y fig. 5.

5. En la hidrólisis con ácido clorhídrico diluido se pueden demostrar, entre otros, ácido succínico, 1-amino-5-hidroxi-amino-pentano, cadaverina e hidroxilamina.

Si para la hidrólisis se emplea ácido yodohidrogénico no se forma el 1-amino-5-hidroxi-amino-pentano ni la hidroxilamina. Con 2,4-dinitrofluorobenzol forma la ferrioxamina B un derivado de 2,4-dinitrofenílico.

10. De las fracciones secundarias II, IV y V, que se obtienen en la distribución según Craig de la mezcla de ferroxiamina en bruto (véase fig. 1), se puede aislar, por cromatografía en intercambiadores de iones, otros compuestos ferrosos, de efecto reductor, con efecto antisideramicínico (v.a.) y en el intercambiador de iones (fig. 8) las denominamos como ferrioxaminas A, C, D₁, D₂, E y F.

20. Las ferrioxaminas A, resp. C, aisladas de las fracciones II y IV (véase fig. 1) se comportan físico-químicamente en forma muy parecida a la ferrioxamina B. A demuestra ser en el cromatograma de papel y en la múltiple distribución muy poco menos polar que B. En C es a la inversa. Este resultado corresponde también a

25. la basicidad de A ligeramente incrementada en comparación con B, así como su velocidad de traslación electroforética en solución ligeramente ácido acética poco mayor, resp. la menor basicidad y movilidad eléctrica de C más pequeña en comparación con B (fig. 5). A y C muestran además espectros infrarrojos y propiedades de

30. solubilidad similares a la ferrioxamina y, como éste, solo



261237

se pudieron obtener hasta ahora como hidroclozuros en forma amorfa.

- El hidroclozuro de la ferrioxamina A es un polvo marrón rojizo que se disuelve bien en agua, metanol etanol, ácido acético glacial y formamida dimetífica.
5. Es insoluble en éter, acetona, éster acético y cloroformo. R_f es el sistema de solución I: 0,35, es el sistema de solución V: 0,21 (véase tabla 1). Coeficiente de distribución en el sistema VI: 0,111 (véase tabla 1). Electrofóresis de papel, véase fig. 5. Microanálisis: C 44,21 %, H 7,52%, N 12,63%, Fe 7,95 %, Cl 5,93 %.
10. Titración: pK_{MCS}^* :9,89; peso equiv.: 634. Espectro ultravioleta en agua λ_{max} 430 m μ ($E_{1cm}^{1\%} = 37$). El espectro infrarrojo en bromuro potásico muestra, entre
15. otras, las siguientes bandas:
(s=bandas fuertes, m=bandas medias, w=bandas ligeras):
2,92 μ (s); 3,42 μ (m); 6,10 μ (s); 6,32 μ (s); 6,88 μ (m);
7,30 μ (w); 7,92 μ (w); 8,10 μ (w); 8,49 μ (w); 8,98 μ (w);
9,55 μ (w); 10,15 μ (w); 10,67 μ (w), (véase fig. 11).
20. La ferrioxamina A dá una reacción positiva con ninhidrina. La unión ferrosa en la ferrioxamina A se retira del complejo si se trata con ácido mineral o álcalis fuertes. La ferrioxamina sin hierro es incolora. Con ferricloruro se puede volver a trans-
25. formar en la ferrioxamina A. Reacciona también con otros iones metálicos bajo formación de los complejos metálicos correspondientes, por ejemplo del complejo de cobre verde. Otras propiedades características véase la Tabla 1.
30. El hidroclozuro de la ferrioxamina C muestra



261237

- similares propiedades de solubilidad como A. R_f en el sistema de disolventes I: 0,54, en el sistema de disolventes V: 0,37 (véase tabla 1). Electroforesis de papel véase fig. 5, coeficiente de distribución en el sistema
5. VI: 0,489 (véase tabla 1). Microanálisis: C 48,33%, H 7,92 %, N 10,20%, Cl 5,15%, Fe 6,82%. Titración: pK_{MCS}*: 8,88; peso equivalente 762. Espectro ultravioleta en agua: λ_{max} . 430 μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 39$). El espectro infrarrojo, en bromuro potásico, muestra, entre otras, bandas en:
10. 2,92 μ (s), 3,43 μ (s), 5,85 μ (m), 6,10 μ (s), 6,33 μ (s), 6,87 μ (s), 7,30 μ (m), 7,95 μ (m), 8,23 μ (w), 8,52 μ (m), 9,65 μ (w), 13,23 μ (m), véase fig. 12.

- La ferrioxamina C da una reacción de color positiva con ninhidrina. La unión ferrosa en la ferrioxamina se retira del complejo cuando se trata con ácido mineral o álcalis fuertes. La ferrioxamina C libre de hierro es incolora. Con ferricloruro se puede volver a transformar en la ferrioxamina C. También reacciona con otros iones metálicos, bajo formación de los complejos metálicos correspondientes, por ejemplo del complejo de cobre verde.
- 15.
- 20.

- Las ferrioxaminas lipofiléricas, D₁, D₂ y E aisladas mediante cromatografía en intercambiadores de iones de la fracción V (véase fig. 5), que en los sistemas V y VI muestran valores R_f mayores que 0,5 y el coeficiente de distribución superior a 1, se comportan en la electroforesis y titración como compuestos neutros (véase Tabla 1, fig. 4 y fig. 5). La ferrioxamina D, que en la cromatografía de intercambio de iones se aísla, como sustancias de traslación más rápida, de una
- 25.
- 30.

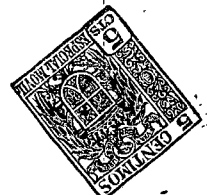


1360

261237

- banda que parece unitaria (véase fig. 8) se puede separar, mediante simple distribución entre cloroformo y agua, en la ferrioxamina D_1 lipofilérica, que cristaliza de metanol-éter en prismas alargados, y en la ferrioxamina D_2 que se obtiene en una cantidad muy reducida. La ferrioxamina D_1 se disuelve bien en agua, metanol, etanol, ácido acético glacial, celosolve metílico y cloroformo, y es de difícil solución en éter, acetona, éster acético, piridina y formamida dimetílica. De metanol-éter cristaliza en agujas rojas. P.F. después de recrystalizar 3 veces 194-200°. R_f en el sistema de disolventes I: 0,73, R_f en el sistema de disolventes V: 0,72 (véase tabla 1). Coeficiente de distribución en el sistema VI: 1,80 (véase Tabla 1). Electroforesis verde fig. 5. Microanálisis: C 49,31%, H 7,47%, N 12,37%, Cl 0%, Fe 7,66%. Titración; no se pueden apreciar funciones ácidas o básicas. Espectro ultravioleta en agua: λ_{max} . 430 μ ($E_{1cm}^{1\%} = 44$).
- El espectro infrarrojo en bromuro potásico muestra, entre otras, bandas en 2,95 μ (s), 3,06 μ (s), 3,25 μ (w), 3,43 μ (s), 6,08 μ (s), 6,35 μ (s), 6,86 μ (s), 7,30 μ (m), 7,94 μ (m), 8,20 μ (w), 8,49 μ (w), 8,83 μ (w), 9,00 μ (w), 9,65 μ (w), 10,00 μ (w), 10,31 μ (w), 10,67 μ (w), 12,20 μ (w), 13,30 μ (m), véase fig. 13.
- La ferrioxamina D_1 no dá reacción de color con ninhidrina. La unión ferrosa en la ferrioxamina D_1 se retira del complejo si se trata con un ácido mineral o álcalis fuertes. La ferrioxamina D_1 libre de hierro es incolora. Con ferricloruro se puede volver a transformar en la ferrioxamina D_1 . También reacciona con otros iones

26 37



metálicos bajo formación de los complejos metálicos correspondientes, por ejemplo el complejo de cobre verdoso.

5. Ferrioxamina D₂: El espectro infrarrojo en bromuro potásico muestra, entre otras, bandas en 2,95 μ (s), 3,43 μ (m), 6,08 μ (s), 6,36 μ (s), 6,90 μ (s), 8,49 μ (w), 8,87 μ (w), 9,65 μ (w), 10,05 μ (w), 10,70 μ (w), 13,22 μ (w), véase fig. 16.

10. R_f en el sistema de disolventes I: 0,64, R_f en el sistema de disolventes V: 0,48 (véase tabla 1). Electroforesis de papel véase fig. 5.

15. La ferrioxamina E, que posee un espectro infrarrojo diferente a las demás ferrioxaminas, (véase fig. 14), se diferencia de éstas también por su mala solubilidad en agua y metanol.

Microanálisis: C 49,80%, H 7,37%, N 12,48%, Cl 0%, Fe 8,14%.
Titración: no se pueden apreciar funciones ácidas o básicas.
Espectro ultravioleta en agua: λ max 430 m μ (E_{1cm}^{1%} = 42). El espectro infrarrojo en bromuro potásico muestra, entre
20. otras bandas en: 2,92 μ (s), 3,02 μ (s), 3,45 μ (s), 5,96 μ (s), 6,15 μ (s), 6,36 μ (s), 6,90 μ (s), 7,10 μ (m), 7,15 μ (m), 7,39 μ (m), 7,82 μ (w), 7,98 μ (m), 8,45 μ (w), 8,54 μ (w), 8,85 μ (w), 9,01 μ (w), 9,20 μ (w), 9,98 μ (m), 10,07 μ (w), 10,23 μ (w), 10,43 μ (w), 10,71 μ (w), 11,87 μ (w), 13,20 μ (m),
25. 13,66 μ (w), véase fig. 14.

30. La ferrioxamina E no da reacción de color con ninhidrina. La unión ferrosa en la ferrioxamina E se retira del complejo si se trata con ácido mineral o álcalis fuertes. La ferrioxamina libre de hierro es incolora. Con ferricloruro se puede volver a transformar en la



26 237

ferrioxamina E. Reacciona también con otros iones metálicos bajo formación de los correspondientes complejos metálicos, por ejemplo del complejo de cobre verdoso.

5. La ferrioxamina F, que, según su comportamiento en la cromatografía de papel y en la distribución de contracorriente, también pertenece al grupo lipofílico (D₁, D₂, E) muestra, sin embargo, contrario a la D₁, D₂ y E, propiedades básicas y se aísla como hidrocloreuro (véase fig. 4 y 5).
10. El hidrocloreuro de la ferrioxamina F se disuelve bien en agua, metanol, piridina, ácido acético glacial, etanol, formamida dimetílica; es poco soluble en cloroformo, insoluble en éster acético acetona y éter. Microanálisis: C 50,44%, H 7,29%, N 10,53%, Cl 4,10%, Fe 5,57%, R_F en el sistema de disolventes V: 0,80 (véase tabla 1). Coeficiente de distribución en el sistema VI: 3,12 (véase tabla 1). Electroforesis véase fig. 5. Titración: pK_{MCS} 9,75, peso equivalente 695. El espectro infrarrojo en bromuro potásico muestra, entre otras, bandas en 2,95 μ(s), 3,45 μ(m), 6,10 μ(s), 6,37 μ(s), 6,92 μ(m), 7,40 μ(w), 7,97 μ(w), 8,50 μ(w), 8,88 μ(w), 9,72 μ(w), 10,10 μ(w), 10,70 μ(w), 13,75 μ(w), véase fig. 15. Espectro ultravioleta en agua: λ_{max} 430 mμ, E_{1cm}^{1%} = 34.
15. La ferrioxamina F da una reacción positiva con ninhidrina. La unión ferrosa en la ferrioxamina F se retira del complejo si se trata con ácido mineral o álcalis fuertes. Se vuelve a transformar en la ferrioxamina F con ferricloruro. Reacciona también con otros iones metálicos bajo formación de los correspondientes complejos metálicos, por ejemplo del complejo de cobre verdoso.
20. La ferrioxamina F da una reacción positiva con ninhidrina. La unión ferrosa en la ferrioxamina F se retira del complejo si se trata con ácido mineral o álcalis fuertes. Se vuelve a transformar en la ferrioxamina F con ferricloruro. Reacciona también con otros iones metálicos bajo formación de los correspondientes complejos metálicos, por ejemplo del complejo de cobre verdoso.
25. La ferrioxamina F da una reacción positiva con ninhidrina. La unión ferrosa en la ferrioxamina F se retira del complejo si se trata con ácido mineral o álcalis fuertes. Se vuelve a transformar en la ferrioxamina F con ferricloruro. Reacciona también con otros iones metálicos bajo formación de los correspondientes complejos metálicos, por ejemplo del complejo de cobre verdoso.
30. La ferrioxamina F da una reacción positiva con ninhidrina. La unión ferrosa en la ferrioxamina F se retira del complejo si se trata con ácido mineral o álcalis fuertes. Se vuelve a transformar en la ferrioxamina F con ferricloruro. Reacciona también con otros iones metálicos bajo formación de los correspondientes complejos metálicos, por ejemplo del complejo de cobre verdoso.



261237

En la siguiente Tabla 1 sehan resumido, para su comparación los datos físicos característicos de las ferrioxaminas aisladas hasta ahora.

Tabla 1

Ferri-oxamina	Electro-fóresis de papel a)	Cromatografía de papel		Distribución múltiple	Extinción a 430 m μ	Titración	
		R _f I b)	R _f V c)	K VI d)	E _{1%} 1cm	pK _{MCS} e)	Peso equivalente
A	13,6	0,35	0,21	0,11	37	9,89	634
B	13,0	0,44	0,29	0,23	39	9,74	704
C	12,3	0,54	0,37	0,49	39	8,88	762
D ₁	3,9	0,73	0,72	1,80	44	(neutro)	
D ₂	3,9	0,64	0,48			(neutro)	
E	3,9	0,68	0,59	1,59	42	(neutro)	
F	12,5		0,80	3,12	34	9,75	695

5. a) cm de trayecto de carrera en ácido acético 0,33 N, después de 4½ horas a 220 V. Como comparación la fructosa recorre 3,9 cm.
- b) R_f I: Valor R_f en el sistema I: n-butanol-ácido acético glacial-agua (4:1:5).
10. c) R_f V: Valor R_f en el sistema V: butanol terc.-agua solución acuosa saturada de cloruro sódico - ácido clorhídrico 0,1-n (50:25:25:1),
Papel impregnado con acetona-agua-solución acuosa saturada de cloruro sódico (6:3:1).



261237

5. d) K VI: Coeficiente de distribución en el sistema VI: n-butanol-alcohol bencílico-agua-solución acuosa saturada de cloruro sódico-ácido clorhídrico 0,1-n (200:100:300:60:3). Distribución de 10 mg a través de 34 escalones de cada uno 3 cm³ de fase orgánica y acuosa a 23-25°. Valorización por medición de extinción (2 cm³ de las fracciones diluidas con alcohol a 10 cm³) a 425 m μ .

e) W.Simon et al., Helv. 37, 1872 (1954).

10. En la tabla 2 se han resumido, para su comparación, los datos químicos y físicos para la ferrioxamina B y materias vegetativas emparentadas así como algunos antibióticos sideramicínicos (Grisein A, albomycina, y ferrimicina A).



T A B L A 2

Substancia	Valores de análisis (%)					Peso molecular
	C	H	N	Cl	Fe	
Ferrimicina A 1)	48,65	7,09	12,95	6,10	4,56	1106 a)
Griseina A 2)	43,95	5,65	12,97		5,14	1034 a)
Albomicina 3)					4,16	1270- 1346 b)
Hidrocloruro de ferrioxamina B	48,04	7,41	11,21	5,25	7,67	704 a)
Ferricromo 4)	44,02	5,90	16,55		7,35	725 c)
Ferricromo A 4)	44,75	5,80	11,18		5,3	1100 c)
Coprogeno 5)	50,96	6,83	10,26		6,61	



261237

pK* MCS	d)	Absorción		Productos de hidrólisis demostrados	e)
		λ max	E _{1%} ^{1cm}		
4,18;7,88		228 282 319 28,2 425 22,6		NH ₃ , ácido succínico, 1-amino-5-hidroxilo-amino-pentano, ácido δ -amino-valeriánico, cadaverina, sustancia cristalina con λ max 227 y 323 m μ , prolina y sustancias ninhidri-positivas no identifica-das	(0,83)
		265 108 420 28,9		Uracilo metílico ácido glutamínico	
				Uracilo metílico, serina ornitina	
9,74		430 39,0		NH ₃ , ácido succínico, 1-amino-5-hidroxilamino-pentano, cadaverina, áci-do δ -aminovaleriánico, hidroxilamina, nada de glicina, ornitina o serina	(1,2)
		425 39,4		NH ₃ , glicina, ornitina	2,89
		440 33,8		Serina, glicina, ornitina	3,01
		440 36,6			



26123

- a) por titración
- b) según contenido Fe, SO_4 y NH_2
- c) determinado según dos métodos independientes
- d) W. Simon, E. Kovats, L.H. Chopard-dit-Jean & E. Heilbronner, Helv. 37, 1872 (1954)
5. e) Colorimétricamente según los "Valores Hidroxilamínicos" por átomo de Fe determinado según Csaky. Los valores indicados en paréntesis están sin corregir.
- 1) Sol. de patente nº 258.439 (Case 4287/L+2/E)
10. 2) F.A. Kuehl et al., J.Amer.Chem.Soc. 73, 1770 (1951)
- 3) G.F.Gause. Brit.Med.J. 1955, 1177
- 4) J.B.Neilands. Act.Rev.21, 101 (1957)
- 5) C.W. Hesseltine et al., J.Amer.Chem.Soc. 74, 1362 (1952)
- 6) T.Z. Csaky, Acta Chem.Scand. 2, 450 (1948).



261337

- Las sales de las ferrioxaminas básicas, A, B, C y F, se derivan de los ácidos orgánicos e inorgánicos conocidos, por ejemplo ácido clorhídrico, los ácidos sulfúricos y fosfóricos, del ácido acético, propiónico valeriánico, palmitínico u oleico, del ácido succínico, ácido cítrico, ácido tártrico, ácido amigdalico, ácido glutamínico o pantoténico. Representan sales neutras o ácidas. Su obtención se efectúa por la doble reacción de sales, por ejemplo del sulfato de la ferrioxamina con el calcio ácido pantoténico o por el intercambio de aniones en un intercambiador de iones, por ejemplo de cloruro de ferrioxamina en un intercambiador de iones básico fuerte, tal como IRA-400 en la forma de sulfato.
5. 10.

- Las ferrioxaminas poseen propiedades fomentadoras del crecimiento para un gran número de organismos. Así poseen este efecto sobre el *Bacillus subtilis*, *Micrococcus pyogenes*, var. aureus, *Saccharomyces cerevisiae*, *Ustilago sphaerogena* y *Chlamydomonas eugametos*. Como ejemplo se han resumido en la tabla 3 los resultados de ensayos con *Ustilago sphaerogena* y con *Chlamydomonas eugametos*, empleandose un preparado enriquecido de ferrioxamina B.
15. 20.



261237

TABLA 3.

	Crecimiento relativo en comparación con un control sin tratar Adición de ferrioxamina B ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)						
	0	100	10	1	0,1	0,01	0,001
Ustilago spaerogena (cultivo 24 horas)	100%		540%	405%	247%	158%	111%
Chlamydomonas eugametos (cultivo 4 dias)	100%	280%	271%	136%	98%	98%	

5. Otros organismos, por ejemplo representantes de la serie *Arthrobacter*, tal como *Arthrobacter terregens* y *Arthrobacter flavescens*, solo se llegan a desarrollar en presencia de las ferrioxaminas. En estos casos, las ferrioxaminas poseen por lo tanto un carácter vitamínico similar al que se demostró para las sustancias activas ferricromo, Terregens Factor y Coprogen [*Bact. Rev.* 21, 101 (1957)].

10. Otra propiedad biológica de las ferrioxaminas consiste en que son capaces de eliminar competitivamente, con respecto a los agentes gramopositivos, el efecto antibacterial de los antibióticos que pertenecen al grupo de las sideramicinas.

15. El efecto antisideramínico de la ferrioxaminas se presenta con relación a los antibióticos albomicina, griseina, A 1787, ferrimicina y A 22765, que también todas muestran resistencia cruzada con griseina. Sorprendente es que las ferrioxaminas suprimen el efecto de las sideramicinas, en forma de griseina, con respecto a las

20. bacterias gramo-positivas, pero no con respecto a las



261237

gramo-negativas.

El antagonismo entre las ferrioxaminas por una parte y las sideramicinas, que se denomina actividad antisideramicínica se puede demostrar tanto "in vitro"

5. como también "in vivo". El efecto antagonizante de la ferrioxamina B con respecto a distintos antibióticos se puede apreciar por la tabla siguiente. Como organismos de ensayo se emplearon: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Stafilococcus aureus*. Los antibióticos a
10. comprobar se verificaron contra la ferrioxamina B (1 mg/ml) en el ensayo modificado según Bonifas, que se describe más adelante.

TABLA 4.

Antibiótico	Desparalización de los organismos de ensayo		
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ferrimicina	Competitiva	Competitiva	∅ 1)
Griseina (40000 UI/mg)	Competitiva	Competitiva	ninguna
Albomicina	Competitiva	Competitiva	ninguna
A 1787	Competitiva	Competitiva	ninguna
A 22765 2)	Competitiva	Competitiva	∅
Neomicina	Ninguna	Ninguna	ninguna
Estreptomicina	Ninguna	Ninguna	ninguna
Estreptotricina	Ninguna	Ninguna	ninguna
Viomicina	Ninguna	Ninguna	ninguna
Penicilina	Ninguna	Ninguna	∅



261237

1) \emptyset significa que el correspondiente antibiótico no muestra casi efecto alguno contra este organismo de ensayo

2) Cepa *S.aureofaciens* Duggar A 22765

5. Otros antibióticos no mencionados en la tabla y no influenciados por las ferrioxaminas son: Acetomicina, actinomicinas C, X, I y Z, angolamicina, carbomicina, chartreusina, clorotetraciclina, cicloserina, cinerubinas, desertomicina, eritromicina, exfoliatina, granaticina, holomicina, leucomicina, megacidina, metimicina, narbomicina, novobiocina, oleandomicina, oxitetraciclina, pocromicina, rodomicina, espiramicinas, estreptogramina, tetriomicinas y tiolutina.

15. El efecto antisideramicínico "in vitro" de las ferrioxaminas es bien adecuado para un reconocimiento cualitativo y determinación cuantitativa de las ferrioxaminas, debido a que se puede emplear en forma correspondiente a la de la determinación de sustancias de efecto sinérgico según el ensayo elaborado por Bonifas
20. [V. Bonifas, *Experientia* 8, 234 (1952)]. Para ello se inyectan placas de ensayo, por ejemplo cuencos de Petri, que contienen una capa de caldo de cultivo de agar adecuado, con *Bacillus subtilis* Cohn emend. Prazmowski o *Staphylococcus aureus* Rosenbach. Sobre la capa de agar
25. se colocan tiras de papel de filtro (5 mm. de ancho), por ejemplo de Whatman N° 1, impregnados con una solución de un antibiótico sideramicínico, por ejemplo una solución de 10 μ /ml de ferrimicina en metanol. Verticalmente a éstas se colocan tiras de igual ancho que están impregnadas
30. con la solución cuyo contenido en ferrioxamina B se ha de



261237

- comprobar. Después de una incubación de 9 - 15 horas a 36°C. se puede apreciar fácilmente la influencia del efecto antibiótico de la ferrimicina; en el recinto restrictor, que se forma de las tiras con el antibiótico, se
5. forma en el cruce de ambas tiras un estrechamiento cuneiforme, cuya forma y dimensiones bajo condiciones standard, sirven para la determinación cuantitativa de las ferrioxaminas (véase fig. 10), Si una solución contiene
10. tanto ferrioxamina como también ferrimicina, se ha de calentar durante 30 minutos con pH neutro a 60°. De esta manera se destruye el efecto antibiótico de la ferrimicina mientras se mantiene el efecto ferrioxamínico y por lo tanto se puede determinar cuantitativamente.
- En el ensayo antisideromicínico demostró ser B
15. el más eficaz de todas las ferrioxaminas. Con staphylococcus aureus como organismo de ensayo muestran las demás ferrioxaminas con respecto a la B, las siguientes actividades: A 51%, C 16%, D₁ 8%, D₂ 3%, E 4% y F 30%.
- Las sustancias ferricromo, terregens factor
20. y coprogeno, ya mencionadas, igualan en su carácter vitamínico para las Arthrobacter terregens y Arthrobacter flavescens a las ferrioxaminas. Por el contrario, el efecto de crecimiento, arriba descrito, típico para las ferrioxaminas, sobre Bacillus subtilis, Micrococcus
25. pyogenes, Saccharomyces cerevisiae, Ustilago spaerogena y Chlamydomonas augametos no es conocido para las tres sustancias Ferricromo, Terregens factor y Coprogeno. Tampoco se sabe nada sobre un efecto antagonístico de estas sustancias sobre la actividad antibacterial de
30. los antibióticos sideramicínicos.



261237

- En la cromatografía de papel se diferencia el ferricromo, en la comparación directa en el sistema V (véase Tabla 1) claramente de la ferrioxaminas B - F, muestra sin embargo en este sistema un valor R_f similar
5. al de la ferrioxamina A. Por el contrario, se puede diferenciar fácilmente como sustancia neutra en la electrofóresis de papel en ácido acético 0,33-n de la ferrioxamina A fuertemente básica. El Terregens factor solo contiene huellas de hierro y por lo tanto es distinto a todas las
10. ferrioxaminas mencionadas. Por sus datos analíticos se diferencia bien el coprogeno de las ferrioxaminas A, B, D y E. La proporción $\%C/\%N$ es en coprogeno de 4,97, en las ferrioxaminas mencionadas de 3,5-4,3. En las ferrioxaminas C y F esta diferencia no es tan destacada
15. ($\%C/\%N = 4,74 - 4,78$). Las ferrioxaminas C y F son, sin embargo, bases fuertes que se aislan como hidroclozuros, mientras que el coprogeno, según los datos presentes, representa una sustancia neutra [Journ.Amer.Chem.Soc. 74, 1362 (1952)].
20. Las ferrioxaminas, sus derivados y productos de disociación, así como las sales de estos compuestos, se obtienen, si de organismos vegetales o de sus extractos se aislan las nuevas materias vegetativas según los métodos en sí ya conocidos teniendo en consideración las caracte-
25. rísticas químicas y físicas arriba indicadas y empleando el ensayo antisideramicínico, y, si se desea, se preparan las sales, derivados o productos de disociación de los nuevos compuestos.
30. Las materias iniciales para la obtención de las ferrioxaminas son por ejemplo plantas mayores, tal como



261237

- Dicotyledoneae, por ejemplo la clase de las Solanaceae, por ejemplo *solanum lycopersicum* o la clase Umbelliferae, por ejemplo *daucus carota* L. y Monocotyledoneae, por ejemplo Commelinaceae, tal como *Rhoeo discolor*, además
5. cultivos de algas, por ejemplo de *Chlamydomonas eugametos*, o ante todo cultivos de microorganismos, por ejemplo de los representantes de la clase *Streptomyces*, de bacterias, por ejemplo del *B. subtilis* o de levaduras, por ejemplo de *Saccharomyces cerevisiae*. El efecto antisideramicrobiano se puede reconocer en el extracto en bruto o en el filtrado de cultivo a base del ensayo arriba indicado.
10. Una fuente especialmente preferida son los cultivos de *Streptomyces* que según las características propuestas por Ettlenger et al. [Arch. Microbiol 3, 326 (1958)] corresponden a las siguientes clases: *Streptomyces griseoflavus* (Krainisky) Waksman et Henrici, *Streptomyces lavendulae* (Waksman et Curtis) Waksman et Henrici, *Streptomyces galilaeus* Ettlenger et al., *Streptomyces pilosus* Ettlenger et al., *Streptomyces polichromogenes*
15. Hagemann, Pénasse et Teillon, *Streptomyces viridochromogenes* (Krainisky) Waksman et Henrici, *Streptomyces aureofaciens* Duggar, *Streptomyces olivaceus* (Waksman) Waksman et Henrici, *Streptomyces griseus* (Krainisky) Waksman et Henrici, *Streptomyces glaucescens* Gause et al.
20. En la siguiente tabla se pueden apreciar las características determinadoras de las clases de las cepas de *Streptomyces* que forman las ferrioxaminas.
- 25.



T A B L A V

Características Calse	Morfología de las esporas	Color del mi- celo de aire	Morfo aire
<i>S. Griseoflavus</i> (Krainsky) Waksman et Henrici	Esporas con espi- nas cortas	Gris ceniza	Cadena les ab nudo m
<i>S. pilosus</i> Ettlenger et al.	Esporas con pe- los finos frá- giles	Gris ceniza	Cadena les re mayorí
<i>S. viridochromogenes</i> (Krainsky) Waksman et Henrici	Esporas con es- pinas cortas	Azul claro	Cadena les ab menudo
<i>S. olivaceus</i> (Waksman) Waksman et Henrici	lisas	Gris ceniza	Cadena dialme u ondu
<i>S. aureofaciens</i> Duggar	lisas	Gris Ceniza	Cadena mente les ir
<i>S. galilaeus</i> Ettlenger et al.	lisas	Gris ceniza	Cadena mente pal la regula yoria
<i>S. lavendulae</i> (Waksman et Curtis) (Waksman et Henrici)	lisas	Carmin páli- do-marrón ca- nela	Cadena les ab los ex rectos
<i>S. polychromogenes</i> Hagemann et al.	lisas	Carmin páli- do-marrón canela	Cadena ondula
<i>S. griseus</i> Waksman et Henri- ci	lisas	Amarillento- gris verdoso	Cadena haces cados



261237

mi- ire	Morfología del micelo de aire	Pigmento melanoide
za	Cadena de esporas con espira- les abiertas y regulares, a me- nudo más de 6 vueltas	falta
za	Cadenas de esporas con espira- les regulares abiertas, en la mayoría más de 6 vueltas	existe
o	Cadena de esporas con espira- les abiertas y regulares, a menudo más de 6 vueltas	existe
za	Cadenas de esporas monopo- dialmente ramificadas, rectas u onduladas	falta
za	Cadena de esporas monopodial- mente ramificadas, con espira- les irregulares abiertas	falta
a	Cadena de esporas monopodial- mente ramificadas, eje princi- pal largo y recto, espirales regulares abiertas, en la ma- yoría más de 6 vueltas	existe
li- ca-	Cadena de esporas con espira- les abiertas, irregulares en los extremos de trozos largos rectos	existe
li-	Cadenas de esporas rectas u onduladas	falta
o- so	Cadenas de esporas onduladas, haces simpoidalmente ramifi- cados sin espirales	falta

261237



- Para obtener cantidades mayores de ferrioxamias se emplean preferentemente cultivos de los mencionados organismos. Se han acreditado especialmente a este respecto las cepas de *Streptomyces* arriba indicadas, que fácilmente se pueden cultivar en mayor escala. La presente invención no se limita sin embargo al empleo de los representantes de las clases mencionadas, sino que se refiere también al empleo de cepas formadoras de ferrioxamina de otras clases y especialmente de variantes de todos estos organismos, tal y como se obtienen por ejemplo, por selección o mutación, especialmente de rayos ultravioleta o rayos X o de aceites de mostaza nitrogenados.
5. Para la obtención de las ferrioxaminas en mayor escala se cultiva aerobicamente una cepa que muestra las propiedades de las *Streptomyces* arriba indicadas, por ejemplo en caldo acuoso que contenga hidratos de carbono, compuestos nitrogenosos, así como sales inorgánicas, hasta que éste muestre un efecto esencialmente ferrioxamínico, y a continuación se aíslan las ferrioxaminas. Pero también se pueden cultivar plantas, tales como algas verdes, o bacterias, tal como *B. subtilis*, y de estos aislar las ferrioxamina en forma pura resp. enriquecida.
10. Para el cultivo de los microorganismos mencionados entran como hidratos de carbono asimilables, en consideración, por ejemplo, glucosa, sacarosa, lactosa, manita, almidón, así como glicerina. Como caldos nitrogenosos y en caso dado fomentadores del crecimiento sean mencionados:
15. los ácidos amínicos, los pepturos y proteínas así como
- 20.
- 25.
- 30.



261237

- sus productos de disociación, tales como peptona o trip-tona, además los extractos de carne, las partes solubles de los granos de trigo, tales como maiz y avena, de los residuos de destilación, de levadura, semillas, especial-
5. mente de la planta de colza o soja, de la planta del al-godón, etc. pero también las sales amónicas y los nitra-tos. Otras sales inorgánicas que puede contener el cal-do son por ejemplo cloruros, carbonatos, sulfatos de al-calis, alcalis terrosos, magnesio, hierro, cinc y manga-
10. neso.
- El cultivo se efectúa aeróbicamente, es decir por ejemplo, en cultivo de superficie en reposo o prefe-rentemente en forma submersa agitando o moviendo con ai-re u oxígeno en botella de agitación o en los fermenta-
15. dores conocidos. Como temperaturas resulta adecuada por ejemplo en los Streptomyces una entre los 18 y los 40°. Un efecto esencialmente ferrioxamínico lo demuestran los cultivos aquí ya por lo general después de 2 - 10 días. Al cultivo se le agregan 0,1% de ferricloruro y el míce-
20. lo se separa del filtrado del cultivo, encontrándose en-tonces la cantidad principal de las ferrioxaminas en el filtrado del cultivo. Sin embargo, se quedan cantidades considerables absorvidas en el micelo. Por esto resulta conveniente lavar bién este último. Para ello son ade-
25. cuados por ejemplo el agua y/o los disolventes acuosos orgánicos, tales como alcoholes, por ejemplo metanol acuo-so. En forma similar se pueden cultivar también las bac-terias, por ejemplo B. subtilis y emplear el filtrado del cultivo como fuente para el aislamiento de las ferrioxa-
30. minas.

261237



- Para el aislamiento de las ferrioxaminas de los materiales mencionados, especialmente de los filtrados del cultivo de hongos o bacterias, se puede proceder según los métodos ya conocidos y por ejemplo emplear uno de los siguientes modos de trabajo indicados a continuación o bien una combinación de los mismos.
5. 1) Se pueden emplear medios de absorción, por ejemplo, carbones activos, tales como norita, tierras activas, tales como franconita, tierra de Fuller o floridina, o absorbedores de resina, tal como asmita. La elución de los absorbatos se efectúa convenientemente con mezcla de los disolventes orgánicos miscibles con agua, en agua, por ejemplo, con mezclas de agua-metanol, agua-piridina, ácido acético diluido-metanol ó agua-metanol-ácido acético-butanol. Especialmente ventajoso para la elución de un absorbato de franconita o norita ha demostrado ser una mezcla de agua (4 partes en volumen) y piridina (1 partes en volumen).
10. 2) Un segundo método para la separación de la ferrioxamina consiste en absorberla en intercambiadores de iones, siendo adecuadas especialmente las resinas que contienen grupos de ácidos, tal como Dowex 50. Esta última se puede emplear tanto en la forma acida como también en la forma sódica, pero se ha acreditado, sin embargo, una mezcla de estas dos formas. La elución se efectúa convenientemente en agentes ácidos, por ejemplo en soluciones amortiguadoras ácidas o con ácido clorhídrico metanólico.
15. 3) Además las ferrioxaminas se pueden extraer de una solución acuosa mediante disolventes orgánicos.
- 20.
- 25.
- 30.

261237



- Para este procedimiento de extracción se han acreditado especialmente los alcoholes orgánicos altos, por ejemplo, alcohol bencílico o alcohol isopropílico. Convenientemente se adiciona aquí a la fase acuosa una sal inorgánica, por ejemplo sulfato amónico o cloruro sódico. De los extractos orgánicos obtenidos se obtienen las ferrioxaminas en forma enriquecida bien mediante evaporación del disolvente o por precipitación mediante un disolvente orgánico adecuado, por ejemplo, éter, éter de petróleo o acetato etílico.
5. 10.
- 4) Un enriquecimiento de las ferrioxaminas se logra también mezclando soluciones concentradas, acuosas o alcoholicas-acuosas de la sal con un exceso de disolventes orgánicos miscibles con agua, tal como acetona, dioxano etc. precipitándose las sales en forma sólida.
- 15.
- 5) Otro método para el enriquecimiento de las ferrioxaminas consiste en distribuir las entre una solución acuosa y una solución de fenol en cloroformo, variándose tanto el pH de la solución acuosa como también el contenido fenólico de la solución cloroformica. Si bajo coeficiente de distribución de las ferrioxaminas se entiende la proporción de la concentración en la fase orgánica con relación a la concentración en la acuosa, entonces resulta, que el coeficiente de distribución aumenta según sube el contenido de fenol de la fase orgánica y baja al reducirse el pH de la fase acuosa. Como por lo tanto es posible graduar cualquier coeficiente de distribución de ferrioxaminas en este sistema, se puede, mediante combinación de pocas operaciones de distribución de/separar una parte grande de impurezas inactivas.
20. 25. 30.



261237

6) Otro método para el enriquecimiento y/o separación de las ferrioxaminas está representado por la cromatografía, tal como la cromatografía de absorción en distintos materiales, por ejemplo, en norita, óxido de aluminio, silicatos de magnesio, silicagel, sulfato cálcico, así como cromatografía de distribución con celulosa, almidón, silicagel, celita y similares como sustancias vehículo, pero también la cromatografía en resinas intercambiadoras de iones, por ejemplo, en Dowex 50, Amberlita IRC-50 y similares.

7) Además, las ferrioxaminas se pueden enriquecer por distribución en contracorriente según Craig entre dos fases de disolventes no miscibles. Para ello se han acreditado los siguientes sistemas de disolventes:

15. a) Alcohol bencílico - Solución acuosa al 20% de sulfato amónico
- b) n-butanol (100 partes en volumen) - alcohol bencílico (200 partes en volumen) - ácido clorhídrico 1-n (6 partes en volumen) - agua (300 partes en volumen) - solución acuosa de cloruro sódico, saturada a 19° (60 partes en volumen)

8) Finalmente, para la limpieza, enriquecimiento y separación del preparado ferrioxaminico está bien adecuada la electrofóresis preparativa en una columna con material vehículo. Esta se efectúa como electrofóresis de alta tensión a 500 - 4000 Voltios. Una ulterior mejora consiste en que este procedimiento se efectúa según el principio de contracorriente. Aquí se fijan localmente las ferrioxaminas A, B, C y F, presentes como cationes, sobre la columna portadora compensando exacta-

261237



- mente su movimiento provocado, a través del campo eléctrico, mediante una corriente del electrolito que transcurra en dirección opuesta. De esta manera se logra que los materiales con otra movilidad eléctrica abandonen la
5. columna portadora en los dos extremos de electrodos. Las distintas ferrioxaminas se obtienen como sustancias puras y unitarias en forma de un polvo amorfo o como cristales. Para su obtención han demostrado ser especialmente adecuadas las siguientes medidas:
10. -Liofilización de una solución acuosa o alcohólica;
-Precipitación de una solución acuosa, alcohólica o fenólica con disolventes orgánicos liófilos, que sean miscibles con el disolvente que contiene la ferrioxamina. Especialmente adecuados para esta
15. precipitación son las cetonas alquílicas bajas, tales como acetona, cetona metil-etílica, éter, tal como éter dietílico, éter diisobutílico, y los hidrocarburos, tales como pentano, hexano, éter de petróleo;
20. -Cristalización de mezclas de disolventes adecuados, tal como alcohol-éter, por ejemplo metanol-éter dietílico, o mezclas de agua y disolventes orgánicos, que por lo menos sean parcialmente miscibles con agua, por ejemplo agua-acetona, agua-ácido acético
25. glacial, etc.
- Las ferrioxaminas, sus derivados y las sales de estos compuestos pueden emplearse como material vegetativo para los distintos organismos, bien solas o en forma de preparados especiales. Poseen además destacadas propiedades antianémicas, por ejemplo, en la anemia de desan-
- 30.



gramiento y anemia por falta de hierro y pueden, por lo tanto, emplearse en forma correspondiente como medicamentos en forma de preparados.

- Los preparados contienen las ferrioxaminas,
5. sus sales y derivados junto con un material vehículo adecuado. Como tales entran en consideración aquellos materiales que no reaccionen con los nuevos compuestos, tales como por ejemplo gelatina, lactosa, almidón, estearato de magnesio, talco, aceites vegetales, alcoholes
10. bencílicos, goma, glicoles polialquilénicos, vaselina o colessterina. Tales preparados se pueden presentar en forma sólida, por ejemplo, como polvos, o en forma líquida como soluciones, suspensiones o emulsiones. En caso dado estarán esterilizados y/o contendrán materiales auxiliares, tales como agentes de conservación, estabilización, reticulación o emulsión. También pueden contener
15. otras materias terapéuticamente valiosas.

- Figura 1 muestra una distribución de contracorriente de la ferrioxamina en bruto a través de 80 esca-
20. lones, cada uno con 100 cm^3 de fase orgánica y 100 cm^3 de fase acuosa en el sistema n-butanol-alcohol bencílico, solución de sal común acuosa saturada - ácido clorhídrico N (100:200:300:60:6) .-.-.-.-. Extinción a $425 \text{ m}\mu$ actividad antisideramincínica en mm (Test seg. Bonifas modificada).
- 25.

Figura 2, muestra en el cromatograma de la fracción III de la Figura 1 en Dowex 50-WX con amortiguador de acetato amónico como medio de emulsión.

- Figura 3, muestra el espectro infrarrojo de
30. la ferrioxamina B en nujol.

261237



Figura 4, muestra en cromatograma de papel de las ferrioxaminas en el sistema butanol terc.-agua-solución de cloruro sódico acuoso saturada - ácido clorhídrico 0,1-n(50:25:25:1) Papel impregnado con acetona-agua-solución acuosa saturada de cloruro sódico (6:3:1).

5.

Figura 5, muestra electroforesis de papel de las ferrioxaminas, en de curso en ácido acético 0,33 N después de 4 $\frac{1}{2}$ horas a 220 V.

Figura 6, muestra en cromatograma de la fracción II de la Figura 1 en Dowex 50-WX con acetato amónico como solución de amortiguación.

10.

Extinción a 425 m μ .

Figura 7 muestra un cromatograma de la fracción IV de la Figura 1 en Dowex 50-WX con amortiguador de acetato amónico como medio de elución.

15.

Extinción a 425 m μ .

Figura 8, muestra un cromatograma de las fracciones 2 - 5 que se obtienen en ambos casos en la cromatografía de la fracción V de la Figura 1 en Dowex 50-WX con amortiguador de acetato amónico como medio de elución.

20.

Extinción a 425 m μ .

Figura 9, muestra un cromatograma de las fracciones 48 - 55 que se obtiene en ambos casos en la cromatografía de las fracciones V de la Figura 1 en Dowex 50-WX con amortiguador de acetato amónico como medio de elución.

25.

Extinción a 425 m μ .

Figura 10 muestra el antagonismo entre las ferrioxaminas y la ferrimicina en el test según Bonifas modificado. Las superficies rayadas muestran la restricción

30.

261237



del crecimiento del organismo de ensayo.

Figura 11, muestra el espectro infrarrojo de la ferrioxamina A en bromuro potásico

5. Figura 12, muestra el espectro infrarrojo de la ferrioxamina C en bromuro potásico.

Figura 13, muestra el espectro infrarrojo de la ferrioxamina D en bromuro potásico.

1
Figura 14, muestra el espectro infrarrojo de la ferrioxamina E en bromuro potásico.

10. Figura 15, muestra el espectro infrarrojo de ferrioxamina F en bromuro potásico.

Figura 16, muestra el espectro infrarrojo de la ferrioxamina D en bromuro potásico.

2
15. La invención se describe en los siguientes ejemplos, sin que con ello se intente limitar el objeto de la presente invención. Las temperaturas están indicadas en grados Celsio.

EJEMPLO 1

20. El cultivo del *Streptomyces pilosus*, Cepa NRRL 2857 se efectúa según el procedimiento submerso. Se emplea un caldo, que, por litro de agua de la red, contenga 20 g de harina de soja y 20 g de manita. El caldo se esteriliza en el matríz de inyección o en los fermentadores durante 20-30 minutos a 1 atm. El caldo esterilizado muestra un pH de 7,2 - 7,6. La inyección se efectúa con hasta un 20% de un cultivo vegetativo parcialmente esporulante del organismo mencionado. Se incuba agitando bien o moviendo a 24 - 30°, ventilándose los cultivos en los fermentadores con aproximadamente 2 volúmenes de aire por volumen de solución por minuto. Después

25,

30.



261237

- de incubar de 48 - 240 horas tiene el cultivo el máximo contenido en ferrioxaminas. Se interrumpe el cultivo, se agregan 0,1% de ferricloruro, el micelo se separa, así como los otros componentes sólidos, de la solución que
5. contiene la cantidad principal de las ferrioxaminas mediante filtración o centrifugado, agregándose, en caso dado, a la solución del cultivo antes de la filtración aproximadamente 1 % de un ^{medio} auxiliar de filtración, por ejemplo Hyflo Supercel. Los residuos de filtración se la-
10. van con agua o metanol acuoso y los líquidos de lavado se reúnen con el filtrado del cultivo. El filtrado del cultivo obtenido se mezcla, agitando continuamente, con 2% de tierra de arcilla, por ejemplo, franconita. Después de mezclar a fondo se filtra y con el filtrado obtenido se repite 1 - 2 veces el proceso de absorción. Los residuos de filtración se reúnen y se lavan varias veces con agua y metanol acuoso. A continuación se eluyen los residuos del filtrado 2 - 3 veces con una mezcla de piridina-agua (1:4). El eluado aclarado por filtración se concentra por evaporación en vacío. Los concentrados obtenidos se pueden elaborar o bien directamente (vease el ejemplo 3) o mediante secado por congelación se puede obtener de ellos una mezcla de ferrioxaminas en forma en bruto.
- 20
25. Si en lugar del caldo arriba mencionado se emplean aquellos que por filtro de agua de la red contengan los siguientes materiales, entonces se obtienen, después de un cultivo análogo y elaboración, filtrados de cultivo de un contenido en ferrioxaminas similarmente e-
30. levado.

261337



	a)	Sacarosa	20 g
		Citrato sódico	0,9 g.
		Acetato amónico	3 g.
		Fosfato potásico sec.	3 g.
5.		Sulfato de magnesio	0,8 g.
		Sulfato de cobre	0,01mg.
		Cloruro de manganeso	0,07mg.
		Ferricitato	20 mg.
	b)	Glucosa en bruto	10 g.
10.		Harina de soja	10 g.
		Cornsteep Liquor	20 g.
		Sal común	5 g.
		Nitrato sódico	1 g.
		Cal	10 g.
15.	c)	Granulado de extracción de colza	20 g.
		Glucosa en bruto	10 g.
		Fosfato potásico sec.	0,2 g.
		Cal	10 g.
	d)	Harina de lino	40 g
20.		Glucosa en bruto	10 g
		Fosfato potásico sec.	0,2 g
		Cal	10 g

25. En lugar de la cepa de la clase Streptomyces pilosus mencionada se puede emplear las siguientes cepas: (Las cepas se guardan bajo los números de cepa indicados en el Instituto para Botánica especial, Escuela Técnica Federal, Zuerich) Después de cultivo análogo y elaboración se obtienen filtrados de cultivo con un contenido en ferrioxamina similarmente elevado.

30.

261237



SEP. 1960

	<u>Nº de cepa</u>	<u>Clase de Streptomyces</u>
	9578	S. griseoflavus (Krainsky) Waksman et Henrici
	15311	S. griseoflavus
	11586	S. pilosus Ettlenger et al.
5.	23258	S. pilosus
	23305	S. pilosus
	17635	S. viridochromogenes (Krainsky) Waksman et Henrici
	18055	S. viridochromogenes
	6445	S. olivaceus (Waksman) Waksman et Henrici
10.	7346	S. olivaceus
	7437	S. olivaceus
	22083	S. aureofaciens Duggar
	22765	S. aureofaciens
	18822	S. galilaeus Ettlenger et al.
15.	14677	S. lavendulae (Waksman et Curtis) Waksman et Henrici
	21510	S. lavendulae
	21837	S. polychromogenes Hagemann et al.
	23217	S. polychromogenes
20.	23310	S. polychromogenes
	10112	S. griseus Waksman et Henrici
	13495	S. griseus
	7419	S. griseus

EJEMPLO 2.

25. La cepa A 23978 de la clase Streptomyces aureofaciens (Instituto para Botánica especial, Escuela Superior Técnica Federal, Zuerich) se cultiva en forma submersa sobre un caldo que, por litro de agua de la red, contenga 20 g de extracto de malta y 20 g de distillers solubles. El cultivo y la elaboración se efectúa
- 30.



261227

túa en forma similar al ejemplo 1, obteniéndose filtrados de cultivo con un contenido en ferrioxamina similarmente elevado.

EJEMPLO 3.

5. 60 litros de cultivo se preparan en la forma indicada en el ejemplo 1 y se elabora. El eluado de piridina-agua obtenido (unos 6 litros) se concentra por evaporación en vacío a 3 litros. En este concentrado se disuelven 870 g de sulfato amónico. La solución se clarifica mediante filtración o centrifugación, en caso dado, bajo adición de 1% de Hyflo Supercel. Después de agitar 3 - 4 veces con alcohol bencílico o alcohol isopropílico las ferrioxaminas se trasladan al disolvente orgánico. Las fases orgánicas se reúnen y se secan con ayuda de sulfato sódico. Se agrega un exceso de éter o acetato etílico y las ferrioxaminas precipitadas se filtran. La adición de un medio auxiliar de filtración, por ejemplo, Hyflo Supercel, antes de la precipitación, facilita la obtención de la precipitación. De esta se pueden extraer, por lavado con metanol o agua, la ferrioxamina. Estos eluados se evaporan o liofilizan y de esta manera se obtienen las ferrioxaminas en forma enriquecida.
- 10.
- 15.
- 20.

EJEMPLO 4.

25. A un filtrado de cultivo obtenido según los ejemplos 1 ó 2 se le agrega por litro 20 g de sal común. La solución clara se extrae 3 veces con 1/10 en volumen de mezcla de cloroformo-fenol (1 parte en volumen de cloroformo, 1 parte en peso de fenol). Las fases orgánicas se reúnen, se filtran bajo adición de
- 30.

261237



Hyflo Supercel y se mezcla con un exceso en éter. Agitando varias veces con poca agua se pasan las ferrioxaminas a las partes acuosas. Las fases acuosas obtenidas se reúnen y para retirar totalmente el fenol se agitan 2 veces con éter. Mediante secado por congelación se obtiene un preparado naranja hasta marrón rojizo de las ferrioxaminas que se puede descomponer por cromatografía de papel.

EJEMPLO 5.

10. 20 litros de solución de cultivo se mezclan agitando con 400 g. de Hyflo Supercel y 200 ml de una solución acuosa al 10 de ferrisulfato y se filtra. El filtrado se extrae después de agregar 3,6 kg de sal común, en un extractor de contracorriente con 2 litros de fenol-cloroformo (1g: 1ml), el extracto se seca sobre sulfato sódico y en el plazo de 1 hora se vierte en una suspensión bien agitada de 200 g de Hyflo Supercel en 2 litros de éter y 10 litros de éter de petróleo. Después de filtrar la mezcla polvorosa de medio auxiliar de filtración y de precipitación, y lavar con unos 2 litros de éter, se eluye 5 veces, cada una con 600₃ cm de metanol. Los eluados reunidos, dan, al evaporar cuidadosamente, 10 g. de ferrioxamina en bruto en forma de un polvo marrón rojizo.
- 15.
- 20.
25. EJEMPLO 6.
30. 4 g de ferrioxamina en bruto se distribuyen en el sistema n-butanol-alcohol bencílico-agua-solución acuosa saturada de cloruro sódico ácido clorhídrico 1-n (100:200:300:60:6) a través de 80 escalones, cada uno con 100₃ cm de fase orgánica y 100₃ cm de fase acuosa.

261237



La evaluación de la distribución se efectúa mediante comprobación biológica y mediante medición de extinción a 425 m μ : de cada 4^a unidad se toman 2 cm³ de fase superior e inferior a éstas se mezclan con 32 cm³ de metanol, obteniéndose una solución homogénea cuya concentración es adecuada para ambas comprobaciones (véase figura 1). Las fracciones de distribución resumidas, de acuerdo con esta evaluación, en 4 grupos contienen, como se demuestra en la cromatografía de papel, además del producto principal la ferrioxamina B (en la fracción de distribución III) otros compuestos teñidos de rojo, de eficacia antisideramícinica, que se denominan ferrioxaminas A, C, D₁, D₂, E y F.

Fracción nº	Fracción de distribución	Ferrioxamina principal
6-18	II	A
19-32	III	B
33-62	IV	C
63-80	V	D ₁ , D ₂ , E y F

20. La fracción de distribución III se agita con 3 litros de éter de petróleo. La fase acuosa teñida de rojo oscuro se lava con cloroformo, se mezcla con sal común hasta una concentración de 10% y se extrae exhaustamente con fenol-cloroformo (lg: 1 ml) El extracto de fenol-cloroformo se lava varias veces con ácido clorhídrico 0,01-n que contenga 10% de cloruro sódico, se filtra a través de una pequeña columna de 20 g de celita y los materiales del contenido se pre-

261237



- cipitan mediante adición de 25 g. de Hyflo³ Cel,
500 cm³ de éter y 1 litro de éter de petróleo agitan-
do a 0°. La mezcla polvorosa de medio auxiliar de
filtración y precipitación se lava bien con éter y a
5. continuación se eluye con poco metanol. Del eluado
metanólico se obtienen al evaporar cuidadosamente,
982 mg de ferrioxamina B en bruto en forma de un pol-
vo marrón rojizo.

- Las fracciones de distribución II, IV y V
10. se elaboran en igual forma.

EJEMPLO 7.

- 1 g del preparado de ferrioxamina B, obteni-
do según el ejemplo 6, se someta a una electrofóresis
según J. Porath / Biochim. et Biophys. Acta 22, 151
15. (1956) en una columna de cristal de 1,5 m de altura
y 2,6 cm de diámetro, provista de un envolvente re-
frigerador y llenada con polvo de celulosa. Como so-
lución electrolítica sirve ácido acético 1/3-n. La
substancia se disuelve en 20 cm³ de agua y la solución,
20. teñida de rojo oscuro, se aplica sobre la columna en
el extremo de la anodo superior. La zona ferrioxamí-
nica de unos 10 cm de altura, teñida de rojo naranja,
se desplaza a una tensión de 1600 Voltios y una inten-
sidad de corriente de 30 mA con una velocidad de 3,9
25. cm/hora hacia el cátodo en el extremo de la columna
inferior. Para aumentar el efecto separador de la
columna se compensa este desplazamiento eléctrico me-
diante una corriente de electrólito dirigida en direc-
ción contraria, fijándose localmente en la columna el
30. material activo fácilmente reconocible por su color pro-

261237



- pio. Las materias acompañantes, que tienen una velocidad de traslación eléctrica mayor resp. menos que la materia activa, son desplazadas hacia el recinto del cátodo resp. del anodo y se retiran de la columna
5. Después de 5 - 6 días, la materia activa se ha trasladado bajo estas condiciones a través de una columna de líquido de 4 - 5 metros. Ahora se interrumpe la electrofóresis y la columna se eluye el ácido acético 1/3-n, recogiendo fracciones de cada una 15 cm³. Estas se investigan individualmente. Las fracciones biologicamente activas, fuertemente teñidas de rojo, se reúnen. Después se agrega 10 % de cloruro sódico y se extrae exhaustivamente con una mezcla de fenol-clorofor- mo (1 parte en peso, 1 parte en volumen). Los extrac- tos reunidos se lavan varias veces con ácido clorhídri- co 1/100-n, que contiene 10 % de cloruro sódico, y a continuación se filtra a través de celita. Al filtra- do anhidro, teñido de rojo oscuro, se le agregan medios auxiliares de filtración (Hyflo Supercel) y agitando se
10. mezcla con cinco veces el volumen de éter-éter de petró- leo (1:1) precipitándose el material activo sobre el medio auxiliar de filtración. Este se filtra y se la- va con mucho éter. Después se eluye la substancia ac- tiva con poco metanol y la solución roja se evapora en vacío a 20° hasta secar. Se obtiene, en comparación, con el material de partida, un preparado de la ferrioxa- mina B dos veces más enriquecido. Es un polvo amorfo rojo que se disuelve en agua, metanol, butanol, alco- hol bencílico, fenol, formamida dimetílica y ácido acé- tico y contiene carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

261237



y hierro. Por lo demás, muestra las siguientes características: pK (celosolve metílico acuoso al 66%)= 9,54; peso equivalente= 645; máximo de absorción en el espectro ultravioleta en 430 m μ (log E^{1%}_{1cm} = 1,51); espectro infrarrojo veáse en la figura 3.

5. En la hidrólisis de un preparado de esta clase en ácido clorhídrico 6-n (6 horas a 110°) se obtiene una mezcla que contiene cinco sustancias ninhidrin-positivas. Estas muestran en la cromatografía de papel los siguientes valores R :

Substancia nº	Mezcla de disolventes		
	Fenol-H ₂ O (8:2)	n-butano-ácido acético glacial agua (4:1:1)	
15.	1	0,68	0,37
	2	0,40	0,34
	3	0,35	0,10
	4	0,30	0,05
	5	0,20	0,04

20. EJEMPLO 8.

865 mg de ferrioxamina B en bruto de la fracción de distribución III (veáse ejemplo 6) se cromatografía en una columna (56 cm x 7,14 cm²) de Dowex 50-WX (100/200 mallas) a 15-17°. El intercambiador de iones se limpia primeramente según las prescripciones de Hirs et al. [J. Biol. Chem, 219, 623 (1956)] se introduce en la forma amónica por sedimentación en la columna y se equilibra con 0,2 mol. de amortiguador de acetato amónico del pH 4,60 durante 48 horas a una velocidad de paso de 200 ml/h. La substancia aplica-



261237

- 3
da en 9 cm de la mencionada solución de amortiguación sobre la columna se revela con 0,2 mol. de amortiguados del pH 4,6 durante 72 horas (100 ml/h). A continuación se concentra el medio de elución, continuamente empleando un recipiente mezclador de 1 litro con 2 mol. de amortiguador de acetato amónico del pH 4,7 y el eluado se recoge, poco antes de la salida de la primera zona, teñida, en fracciones de 40 cm³. Las fracciones resumidas según la medición de extinción a 425 m μ (véase figura 2) se extraen en la forma descrita empleando fenol-cloroformo, éter-éter de petróleo-Hyflo supercel y metanol.
- 5.
- 10.

Fracción	Cantidad en mg	Substancia
13-18	62	sin identificar
93-125	544	Hidrocloruro de la ferrioxamina B
185-197	36	sin identificar

- 15.
- 20.
- 25.
- La ferrioxamina B es soluble en agua, metanol, alcohol, fenol, formamida dimetílica y ácido acético glacial, de difícil solubilidad en butanol y prácticamente insoluble en cloroformo, acetona, éter y éster acético. Microanálisis después de 48 horas a 200/0,001 mm: C 48,04 %, H 7,41 %, N 11,21 %, Cl 5,25 %, P 0%, S 0%, Fe 7,67 %. Titración: pK_{MCS} = 9,74, peso equivalente 704. Absorción (H₂O): λ_{max} 430 m μ , E_{1%}^{1cm} = 39,0. Espectros infrarrojos véase figura 3. Valor R_f en el sistema I: 0,44, en el sistema V: 0,29 (véase Tabla I) Coeficiente de distribución en el sistema VI: 0,228 (véase Tabla I)



261237

- La ferrioxamina B da una reacción positiva con ninhidrina. SE puede oxidar fácilmente con el reactor fericloruro-ferricianuro potásico [J. M. Barton et al. Nature 170, 249 (1952)]
5. Por otra parte se puede reducir con ditionita sódica bajo descoloración. Las soluciones incoloras que se obtienen recuperan al reposar al aire rápidamente su tinte rojo original. El hierro ligado en la ferrioxamina B se extrae del complejo por los efectos de ácidos minerales, alcalis fuertes o 8-oxiquinolina.
- 10.

La ferrioxamina libre de hierro B (Desferrioxamina B) es incolora. Se puede volver a transformar con ferricloruro en la ferrioxamina. También con otros iones metálicos reacciona la desferrioxamina B bajo formación de los correspondientes complejos metálicos, por ejemplo la desferrioxamina de cobre teñida de color verdoso.

15.

EJEMPLO 9.

20. 20 mg de un preparado de ferrioxamina B, obtenida según el ejemplo 8, se disuelven en 3 cm³ de ácido clorhídrico 1,2 -n y se calienta durante 5 minutos en el baño de María hirviendo. La solución, al principio marrón rojiza, se vuelve casi incolora. Se evapora en vacío hasta secar. A continuación se disuelve el residuo en 0,2 cm³ de agua y para la ulterior comprobación papel-cromatográfica se emplean, cada vez, 0,01 cm³ de esta solución. Como medio de flujo sirve una mezcla de 7 partes en volumen de n-butanol y 3 partes en volumen de ácido clorhídrico
- 25.
30. 6-n. Se pudieron indentificar las siguientes subs-



261237

tancias:

Substancia	R f	a	b	c	d
Cadaverina * *	0,12	-	gris violeta	rojo intenso	-
Fe	0,17	amarillo pálido	-	-	-
1-amino-5-hidroxi- amino-pentano	0,25	-	gris violeta	rojo intenso	-
Amina hidroxílica	0,34	-	-	rojo pálido	rojo vio- leta
Substancia desconocida * **	0,68	-	azulada	-	-
Fe	0,84	amarillo	-	-	-
Substancia desconocida	0,93	-	-	rojo	-

En la tabla significan a) el color propio de las substancias determinado sobre el papel, b) la reacción de color con ninhidrina, c) la reacción de color con cloruro trifeniltetrazólico + sosa cáustica, d) reacción de color con el reactor seg. Ozaki (Todas las reacciones según "Manual de la cromatografía de papel de I. M. Hais y K. Macek Editorial Gustav Fischer, Jena, 1958)

- 5.
10. Si para la hidrólisis, en lugar del ácido clorhídrico, se emplea ácido yodohidrógeno del 57 % (4 horas, 110°) entonces, en el cromatograma de papel faltan la amina hidroxílica, el 1-amino-5-hidroxi-aminopentano y Fe⁺⁺. En cambio existe más cadaverina.
- 15.

Una segunda porción de ferrioxamina B se hidroliza como arriba descrito con ácido clorhídrico 1,2-n. La mezcla de hidrólisis se extrae a continuación con éter. Se seca el extracto con sulfa-



to sódico y se evapora. Del residuo se puede obtener ácido succínico en forma cristalina.

EJEMPLO 10

5. A una solución de 450 mg de un preparado de ferrioxamina B, obtenido según el ejemplo 8, 450 mg de hidrogenocarbonato sódico en agua se agrega una solución de 450 mg de 2,4-dinitrofluorobenzol en 26 cm³ de etanol. Después de reposar durante 4 horas a temperatura de ambiente se expulsa el alcohol en vacío.
10. El agente de reacción en exceso se retira mediante agitación con éter. La dinitrofenilo-ferrioxamina B, intensamente marrón rojizo, se puede agitar ahora fácilmente con n-butanol (la ferrioxamina B misma se queda bajo las mismas condiciones en la fase acuosa). El
15. extracto butanólico, lavado con agua y después secado, se evapora en vacío. El residuo se extrae con acetona y la solución acetónica se filtra del residuo marrón insoluble (114 mg). De la solución acetónica concentra-³da por evaporación a unos 5 cm³ se puede precipitar la
20. dinitrofenilo-ferrioxamina B como polvo amorfo de color rojo naranja. Rendimiento 338 mg.

25. En la electroforesis de papel con ácido acético diluido se traslada el derivado dinitrofenílico a 1000 Voltios en 2 horas 5,5 cm, mientras que la ferrioxamina B, bajo las mismas condiciones, se traslada 18,5 cm.

EJEMPLO 11.

30. Para aislar las ferrioxaminas A, C, D¹, D², E y F se cromatografian las fracciones de distribución II, IV y V (véase ejemplo 6) que se obtienen durante la distribución a contracorriente, en Dowex 50-WX



261237

- (200/400 mallas) con amortiguador de acetato amónico como medio de elución. La resina se limpia primeramente según las prescripciones de Hirs et al. [C. H. W. Hirs S. Moore. W. H. Stein. J. Bio.Chem. 219, 623 (1956)]
5. Se aplica en la forma amónica por sedimentación sobre la columna y antes de la aplicación de la sustancia se equilibra durante unas 70 horas con la solución de amortiguación empleada para la elución a una velocidad de paso de 20 ml/cm²/h. Las sustancias se introducen según la solubilidad en una solución del 1 al 10 % sobre la columna y los cromatogramas se revelan a 23 - 25° y a una velocidad de paso de 5- 15 ml/cm²/h con amortiguador de acetato amónico del pH 4,5 en concentración progresiva (Elución de gradiente). La valorización de los cromatogramas se efectúa por medición de extinción de fracciones de eluado (30 - 40 cm³) a 425 m μ . Las fracciones de eluado correspondientemente reunidas se extraen exhaustivamente, después de agregar 10% de sal común, con fenol-cloroformo (1g:1cm³). Los extractos teñidos de rojo intenso se lavan abundantemente con ácido clorhídrico 0,01-n que contiene 10 % de cloruro sódico, se filtra a través de una capa de celita y los materiales contenidos se precipitan de los filtrados claros, mediante la adición de éter y éter de petróleo sobre Hyflo Supercel. La mezcla de sustancia y material vehículo se lava con éter para retirar el fenol y a continuación se eluye con poco metanol. De los eluados metanólicos se obtienen las ferrioxaminas, mediante cuidados evaporación, en forma de polvo higros-
 - 10.
 - 15.
 - 20.
 - 25.
 - 30.



261237

cópico marrón rojizo, que, para el análisis, se secan durante 50 horas a 25^o/0,03 mm sobre pentóxido de fósforo.

- 5 g de la fracción II (véase ejemplo 6) se cromatografían según el procedimiento arriba descrito en una columna de Dowex 50-WX² de 90 cm x 22 cm (figura 6) Solución de amortiguador, al principio: 0,1-m de acetato amónico, pH 4,5, Velocidad de paso: 110 ml/h; Volumen de las fracciones de eluado: 35 - 40 cm³. Cambio a elución de gradiente con cámara de mezcla de 4 litros y 1,75 -m. Amortiguador de acetato amónico del pH 4,70 en la fracción nº 90.

Fracción nº	Peso en mg	Materias contenidas
283 - 300	302	Hidrocloruro de Ferrioxamina A
301 - 325	488	Hidrocloruro de Ferrioxamina B + A
326 - 352	393	} Materias sin caracterizar con más detalle.
353 - 385	452	
416 - 445	415	

- El hidrocloruro de la ferrioxamina A es un polvo marrón rojizo que se disuelve bien en agua, metanol, etanol, ácido acético glacial y formamida dimetánica. Es insoluble en éter, acetona, éster acético y cloroformo. R en el sistema de disolvente I: 0,35, en el sistema V: 0,214 (véase Tabla I) Coeficiente de distribución en el sistema VI: 0,111 (véase Tabla I)
20. Electrofóresis de papel véase figura 5.



261227

Microanálisis: C 44,21 %, H 7,52 %, N 12,63 %, Fe 7,95%,
Cl 5,93 %

Titulación: pK : 9,89, peso equivalente: 634.
MCS

Espectro ultravioleta en agua: λ_{max} 430 m μ (E = 37).
1%
1cm

- 5. El espectro infrarrojo en bromurompotásico muestra, entre otras, las siguientes bandas: (S = bandas fuertes, m = bandas medias, w = bandas débiles): 2,92 μ (s); 3,42 μ (m); 6,10 μ (s); 6,32 μ (s); 6,88 μ (m); 7,30 μ (w); 7,92 μ (w); 8,10 μ (w); 8,49 μ (w); 8,98 μ (w); 9,55 μ (w);
- 10. 10,15 μ (w); 10,67 μ (w) (véase figura 11)

La ferrioxamina A da una reacción positiva con ninhidrina. La unión ferrosa en la ferrioxamina A se retira del complejo cuando se trata con ácido mineral o alcalis fuertes. La ferrioxamina A libre de

- 15. hierro es incolora. Con ferrioloruro se puede volver a transformar en ferrioxamina A. Reacciona también con otros iones de metal bajo formación de los correspondientes complejos de metal, por ejemplo, el complejo de cobre verdoso.

20. EJEMPLO 12

- 25. 5 g. de fracción IV (véase el ejemplo 6) se cromatografian según el procedimiento descrito en el ejemplo 11 (véase figura 7) en una columna de Dowex 50-WX, Solución de amortiguación el comenzar: 0,1-m. de acetato amónico pH 4,5. Velocidad de paso: 110ml/
2
3
h. Volumen de las fracciones de eluado: 35-40 cm. Cambio a elución de gradiente con acetato amónico 1mol. del pH 4,6 en la fracción 720, con acetato amónico 2-mol. pH 4,7 en la fracción 963:

261237



nº de fracción	Peso en mg	Materias contenidas
34 - 46	135	} Materias sin caracterizar con más detalle
54 - 68	226	
218 - 284	---	Substancia fluorescente amarillo-verde, no aislada
780 - 830	430	Hidrocloruro de ferrioxamina B
860 - 900	194	Hidrocloruro de ferrioxamina C
1034 - 1080	360	Substancia sin caracterizar con mas detalle.

- La ferrioxamina C muestra casi las mismas propiedades de solubilidad como la A. R en el sistema de disolventes I: 0,54, en el sistema V: 0,37 (veáse Tabla I) Electrofóresis de papel veáse figura 5. Coeficiente de distribución en el sistema VI: 0,489 (veáse tabla I)
5. Microanálisis: C 48,33%, H 7,92%, N 10,20%, Cl 5,15%, Fe 6,82 %
- Titration: pK_{MCS} : 8,88; peso equivalente 762.
- Espectro ultravioleta en agua: $\lambda_{max} 430 m\mu (E_{1\%}^{1cm} = 39)$
10. El espectro infrarrojo en bromuro potásico muestra, entre otras, las siguientes bandas:
- 2,92 μ (s); 3,43 μ (s); 5,85 μ (m); 6,10 μ (s); 6,33 μ (s); 6,87 μ (s); 7,30 μ (m); 7,95 μ (m); 8,23 μ (w); 8,52 μ (m); 9,65 μ (w); 13,23 μ (m); veáse figura 12.
15. La ferrioxamina C da una reacción positiva con



261237

- ninhidrina. La unión ferrosa en la ferrioxamina C se retira del complejo tratándose con ácido mineral o alcalis fuertes. La ferrioxamina C, libre de hierro, es incolora. Se puede volver a transformar con ferriocloruro en la ferrioxamina C. También reacciona con otros iones metálicos bajo formación del correspondiente complejo de metal, por ejemplo el complejo de cobre verdoso.

EJEMPLO 13

10. 148 g. de la fracción V (veáse ejemplo 6), se fraccionan previamente en una columna de 150 cm x 79 cm². El cromatograma se revela a una velocidad de paso de 2-3 lt/ h durante cada vez 24 horas con 0,1-mol. 0,2 -mol. 0,6-mol. y durante 100 horas con 1,8-m de amortiguador de acetato amónico del pH 4,7. Se recogen fracciones de 5 litros. Las fracciones 2 - 5 reunidas contienen preferentemente las ferrioxaminas D₁, D₂ y E (44 g), las 48-55 principalmente ferrioxamina F¹ (8,4 g). Recromatografía de las fracciones 2 - 5:

20. 5 g de las fracciones 2-5 se cromatografian bajo las mismas condiciones como la fracción II, pero sin la elución de gradiente (veáse figura 8)

Nº de fracción	Peso en mg	Materias contenidas
48 - 56	980	Ferrioxamina D ₁ y D ₂
66 - 80	989	Ferrioxamina E



261237

- La mezcla de D_1 y D_2 (980 mg), aislada de la fracción 48-56 con fenol-cloroformo, se disuelve en 100 cm^3 de agua, se satura con sal común y se extrae dos veces con el mismo volumen de cloroformo. El extracto cloroformico deja, después de secar sobre sulfato sódico,
5. al evaporar, 697 mg de ferrioxamina D_1 . La fase acuosa se lava abundantemente con cloroformo y a continuación se extrae con fenol-cloroformo. Al elaborar el extracto en la forma usual se obtienen 95 mg de ferrioxamina D_2 . La
10. ferrioxamina D_1 se disuelve bien en agua, metanol, etanol, ácido acético glacial, celosolve metílico y cloroformo, es de difícil solución en éter, acetona, éster acético, piridina y formamida dimetílica. Cristaliza de metanol-éter en agujas rojas. Punto de fusión después de cristalizar tres veces 194-200°. R_f en el sistema de disolventes I: 0,73, R_f en el sistema de disolventes V: 0,72 (véase tabla 1). Coeficiente de distribución en el sistema VI: 1,80 (véase tabla 1). Electroforesis véase fig. 5.
15. Microanálisis: C 49,31%, H 7,47%, N 12,37%, Cl 0%, Fe 7,66%.
20. Titración: no se pueden comprobar ningunas funciones ácidas o básicas.
- Espectro ultravioleta en agua: λ_{max} 430 $m\mu$ ($E_{1cm}^{1\%} = 44$).
- El espectro infrarrojo en bromuro potásico muestra, entre otras, bandas en 2,95 μ (s); 3,06 μ (s); 3,25 μ (w); 3,43 μ (s); 6,08 μ (s); 6,86 μ (s); 7,30 μ (m); 7,94 μ (m); 8,20 μ (w); 8,49 μ (w); 8,83 μ (w); 9,00 μ (w); 9,65 μ (w); 10,00 μ (w); 10,31 μ (w); 10,67 μ (w); 12,20 μ (w); 13,30 μ (m), (véase fig. 13). La ferrioxamina D_1 no da ninguna reacción de color con ninhidrina. La unión ferrosa en la ferrioxamina
30. D_1 se retira del complejo si se trata con ácido mineral o

261237²⁴



alcalis fuertes. La ferrioxamina D₁ libre de hierro es incolora. Con ferricloruro se puede volver a transformar en la ferrioxamina D₁. Reacciona también con otros iones de metal bajo formación de los correspondientes complejos de metal, por ejemplo el complejo de cobre verdoso.

5.

Ferrioxamina D₂:

El espectro infrarrojo muestra entre otras bandas en 2,95 μ (s); 3,43 μ (m); 6,08 μ (s); 6,36 μ (s); 6,90 μ (s); 8,49 μ (w); 8,87 μ (w); 9,65 μ (w); 10,05 μ (w); 10,70 μ (w); 13,22 μ (w), (véase fig. 16).

10.

R_F en el sistema de disolventes I: 0,64, R_F en el sistema de disolventes V: 0,48 (véase tabla 1).

Electrofóresis de papel véase fig. 5.

Ferrioxamina E:

15.

La ferrioxamina E obtenida de la fracción 66-80 (898 mg) se disuelve en ácido acético glacial; en la mayoría de los disolventes, especialmente también en agua y metanol, se disuelve difícilmente o nada. Mediante solución y precipitación, dos veces, de mucha agua-acetona, se obtiene un polvo microcristalino.

20.

Valores R_F en el sistema I: 0,68, en el sistema V: 0,59.

Electrofóresis de papel véase fig. 5. Coeficiente de distribución en el sistema VI: 1,59 (véase tabla 1).

Microanálisis: C 49,80%, H 7,37%, N 12,48%, Cl 0%, Fe 8,14%.

25.

Titulación: no se pueden comprobar ninguna función ácida o básica.

Espectro ultravioleta en agua: λ_{max} 430 mμ (E₁^{1%}_{cm} = 42).

El espectro infrarrojo en bromuro potásico muestra, entre otras, bandas en: 2,92 μ (s); 3,02 μ (s); 3,45 μ (s); 5,96 μ (s); 6,15 μ (s); 6,36 μ (s); 6,90 μ (s); 7,10 μ (m); 7,15 μ (m); 7,39 μ (m); 7,82 μ (w); 7,98 μ (m);

30.

261237



8,45 μ (w); 8,54 μ (w); 8,85 μ (w); 9,01 μ (w); 9,20 μ (w);
9,98 μ (m); 10,07 μ (w); 10,23 μ (w); 10,43 μ (w); 10,71 μ (w);
11,87 μ (w); 13,20 μ (m); 13,66 μ (w) (véase fig. 14). La

- La ferrioxamina E no dá reacción de color con ninhidrina. La unión ferrosa en la ferrioxamina E se retira del complejo si se trata con ácido mineral o álcalis fuertes. La ferrioxamina E libre de hierro es incolora. Con ferricloruro se puede volver a transformar en la ferrioxamina E. Reacciona también con otros iones de metal bajo formación del correspondiente complejo de metal, por ejemplo del complejo de cobre verde.
5. 10.

Recromatografía de las fracciones 48-55:

- 5 g de las fracciones 48-55 se vuelven a cromatografiar bajo las mismas condiciones como las fracciones 2-5 (véase arriba). Solución de amortiguación al principio: 0,5-mol de acetato amónico pH 4,7. Cambio a elución de gradiente con cámara de mezcla de 4 litros y flujo de 2-m de amortiguador de acetato amónico del pH 4,7 en la fracción 663 (véase fig. 9). Las fracciones 821-880 contienen 1,12 g de material que preferentemente se compone de la ferrioxamina F. Para la ulterior limpieza se somete este material, en el sistema n-butanol-agua, a una distribución según Craig de contracorriente a través de 20 escalones (10/10 ml). Los contenidos de los elementos se extraen a continuación, cada uno con 80 ml de éter de petróleo, se desecha la fase de éter de petróleo y se liofilizan los refinados acuosos. Con el material obtenido de los elementos 1-4 (570 mg) se repite la distribución (30 escalones). Del elemento 5 se obtienen 64 mg de hidrocioruro de la ferrioxamina F unitaria en cromatografía
15. 20. 25. 30.

26123



- de papel, en forma de un polvo marrón rojizo. El hidroc-
loruro de la ferrioxamina F se disuelve bien en agua,
metanol, piridina, ácido acético glacial, etanol, formamida
dimetílica, es poco soluble en cloroformo, e insoluble en
éster acético, acetona y éter.
5. Microanálisis: C 50,44%, H 7,29%, N 10,53%,
Cl 4,10%, Fe 5,57%. R_f en el sistema de disolventes V:
0,80 (véase tabla 1). Coeficiente de repartición en el
sistema VI: 3,12 (véase tabla 1). Electroforesis véase
fig. 5. Titración: pK_{MCS} 9,75. Peso equivalente 695.
10. El espectro infrarrojo en bromuro potásico
contiene entre otras, bandas en 2,95 (s); 3,45 (m);
6,10 (s); 6,37 (s); 6,92 (m); 7,40 (w); 7,97 (w);
8,50 (w); 8,88 (w); 9,72 (w); 10,10 (w); 10,70 (w);
13,75 (w), (véase fig. 15).
15. Espectro ultravioleta en agua: λ_{max} 430 $m\mu$ ($E_{1cm}^{1\%} = 34$).
La ferrioxamina F da una reacción positiva con ninhidrina.
La unión ferrosa en la ferrioxamina F se retira del
complejo si se trata con ácido mineral o álcalis fuertes.
20. La ferrioxamina F libre de hierro es incolora. Con
ferricloruro se puede volver a transformar en la ferrioxamina
F. Reacciona también con otros iones metálicos bajo forma-
ción del correspondiente complejo de metal, por ejemplo
el complejo de cobre verdoso.
25. EJEMPLO 14.
100 g de levadura de panadero fresca se suspende
en 1 litro de metanol y se agita fuertemente durante 30
minutos. La suspensión se filtra y la solución metanólica
se concentra por evaporación en vacío a 200 cm³. A este
concentrado se adicionan 200 cm³ de agua y la suspensión
- 30.



261237

- se aclara por filtración o centrifugado. La solución aclarada se extrae 3 veces con una mezcla de cloroformo-fenol (1 parte en volumen de cloroformo, una parte en peso de fenol). Las fases orgánicas reunidas se mezclan con poco medio auxiliar de filtración (Hyflo Supercel) y a esta suspensión se agrega, agitando continuamente, un exceso en éter. La ferrioxamina en bruto precipitada se separa junto con el medio auxiliar de filtración, se lava con éter y se seca. Del medio auxiliar de filtración se eluyen las ferrioxaminas con metanol. La solución metanólica se evapora cuidadosamente en vacío obteniéndose así las ferrioxaminas en forma de una resina activa marrón rojiza que se puede limpiar por cromatografía de papel.
5. Preparados con contenido similarmente alto en ferrioxaminas se obtiene, si, en lugar de la levadura de panadero, se elabora en la forma descrita un extracto de levadura comercial, levadura de cervecería prensada o cultivos de levadura frescos.
- 10.
- 15.

20. EJEMPLO 15.

El alga verde *Chlamydomonas eugametos* se cultiva en forma submersa sobre un caldo de la siguiente composición a 24°:

	Sulfato de magnesio	2,5 g
25.	K_2HPO_4	1,25 g
	Urea	1,05 g
	Agua de la red	1000 ml
	Solución de elementos de huellas	10 ml



261237

Contenido de la solución de elementos de huellas por 1000 ml:

	CaCl ₂	8,35 g	H ₂ MoO ₄	0,71 g
	H ₃ BO ₃	11,42 g	CuSO ₄ 5.H ₂ O	1,57 g
	FeSO ₄ . 7H ₂ O	4,98 g	Co(NO ₃) ₂ 6 H ₂ O	0,49 g
5.	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,82 g	Complemento III	3 g
	MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,44 g		

- El caldo se esteriliza en los recipientes de cultivo durante 20-30 minutos a 1 atm. La inyección se efectúa con hasta 20% de un cultivo submerso. Los cultivos se ventilan en los recipientes de agitación de 4 litros continuamente con 1/4 volumen de aire/volumen de solución por minutos. Después de cultivar durante 4 - 12 días, bajo iluminación continua, se elaboran los cultivos fuertemente verdes. Sin filtrar se mezclan los cultivos con 2% de tierra de arcilla, por ejemplo, franconita y se mezcla intensamente. La suspensión se filtra bajo adición de medio auxiliar de filtración y la solución se mezcla nuevamente con 2 % de tierra de arcilla, se agita y se filtra. Los residuos del filtrado reunidos se lavan con metanol y agua y a continuación se eluye con una mezcla de piridina-agua. La mezcla acetotrópica se concentra por evaporación en vacío y las ferrioxaminas se aislan de los concentrados por secado por congelación. Los preparados marrón rojizos se pueden seguir enriqueciendo en la forma arriba indicada.

EJEMPLO 16.

Plantas de tomate de unos 50 cm de altura, jóvenes, se prensan en la prensa de jugos a un zumo. 1 litro de zumo de prensa se libera de la clorofila mediante triple extracción con acetato atílico. A la



261237

- fase acuosa marrón se le agregan 290 g de sulfato amónico, se filtra la solución obtenida y a continuación se la extrae tres veces con alcohol bencílico. Las fases orgánicas reunidas se secan mediante adición de sulfato sódico y se mezcla con un exceso en acetato etílico. La precipitación obtenida se lava con éter y a continuación se recibe en poca agua. Mediante secado por refrigeración se obtiene finalmente un eficaz preparado de ferrioxamina, que se puede elaborar como indicado en los ejemplos anteriores.
- 5.
- 10.
- Preparados de actividad similar se obtienen si, en lugar de plantas de tomate, se emplean hojas de Rheo discolor.
- EJEMPLO 17.
- 15.
- 20.
- 25.



261237

N O T A

- Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a las patentes presentadas en Suiza con las fechas y números siguiente:
5. 25 de septiembre de 1959, nº 78652; 25 de septiembre de 1959, nº 78653; 18 de marzo de 1960, nº 3063/60;
10. 18 de marzo de 1960, nº 3064/60 y 8 de septiembre de 1960, nº 10155/60, acogiendo por lo tanto a los beneficios que conceden los convenios internacionales en vigor, 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 obtención de nuevas materias vegetativas"; caracterizándose por lo siguiente:
15. 1º.- Procedimiento para la obtención de nuevas materias vegetativas, de las ferrioxaminas, sus derivados y productos de disociación, así como las sales de estos compuestos, caracterizado porque las nuevas materias activas se aíslan de organismos vegetales o sus extractos, según métodos en sí ya conocidos, teniendo en consideración las propiedades químicas y físicas de las ferrioxaminas y empleando el ensayo antisideramicínico y, si se desea, se preparan las sales, derivados o productos de disociación de estos compuestos.
20. 2º.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque de los extractos de Monocotyledoneae o Dicotyledoneae o cultivos de algas, levaduras, bacilos
25. 30.



- o Streptomyces se aislan las ferrioxaminas A, B, C, D₁, D₂, E, F o una mezcla de los distintos componentes mediante absorción, extracción, precipitación, cristalización, liofilización, distribución entre disolventes, cromatografía y/o electrofóresis, comprobando la presencia de las ferrioxaminas en el material de partida y en las distintas operaciones de elaboración mediante el ensayo antisideramicínico.
- 5.
- 3º.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque como material de partida se emplean cultivos de Streptomyces.
- 10.
- 4º.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque como material de partida se emplean cultivos de Streptomyces griseoflavus [(Krainsky) Waksman y Henrici] .
- 15.
- 5º.- Procedimiento, según la reivindicación 4ª, caracterizado porque como material de partida se emplean cultivos de Streptomyces griseoflavus [(Krainsky) Waksman y Henrici A 9578] .
- 20.
- 6º.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1 y 3, caracterizado porque como material de partida se emplean cultivos de Streptomyces lavendulae [(Waksman y Curtis) Waksman et Henrici] .
- 25.
- 7º.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque como material de partida se emplean cultivos de Streptomyces pilosus (NRRL 2857).
- 30.
- 8º.- Procedimiento, según la reivindicación 1-7, caracterizado porque las ferrioxaminas se aislan por absorción mediante carbón activo, tierras activadas o absorbentes de resina.



261237

- 9^o.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque las ferrioxaminas se aislan mediante absorción con franconita.
5. 10^o.- Procedimiento, según las reivindicaciones 8 y 9, caracterizado porque como líquido de elución se emplea un disolvente orgánico miscible con agua o una mezcla del mismo con agua.
10. 11^o.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque las ferrioxaminas se absorben mediante un intercambiador de iones que contengan grupos carboxílicos ligeramente ácidos y de éste se eluyen, con medios de elución ácidos.
15. 12^o.- Procedimiento, según reivindicaciones 1-8, caracterizados porque se emplea el intercambiador de iones, Dowex 50-WX₂.
20. 13^o.- Procedimiento, según la reivindicación 12, caracterizado porque se eluye con amortiguador de acetato amónico con el pH 4,5-4,6 en una molaridad de 0,2 - 2,0.
25. 14^o.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque las ferrioxaminas se extraen con soluciones de fenol en cloroformo.
30. 15^o.- Procedimiento, según la reivindicación 14, caracterizado porque se varía el contenido fenólico de la solución clorofórmica.
- 16^o.- Procedimiento, según la reivindicación 14, caracterizado porque se varía el valor pH de la solución acuosa.
- 17^o.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1-16, caracterizado porque las ferrioxaminas se distribuyen



261237

entre dos fases de disolventes no miscibles entre sí.

18^a.- Procedimiento según la reivindicación 17, caracterizado porque la fase orgánica contiene alcohol bencílico.

5. 19^a.- Procedimiento, según la reivindicación 17 y 18, caracterizado porque la distribución se efectúa entre la fase superior e inferior (1:1) en el sistema n-butanol (100)-alcohol bencílico (200) - ácido clorhídrico 1-n (6)- agua (300)- solución saturada de cloruro sódico(60).

10.

20^a.- Procedimiento, según la reivindicación 1-19, caracterizado porque las ferrioxaminas se enriquecen mediante electrofóresis de alta tensión.

15.

21^a.- Procedimiento, según la reivindicación 20^a, caracterizado porque la electrofóresis de alta tensión se efectúa según el principio de contracorriente.

20.

22^a.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1-21, caracterizado porque los métodos de aislamiento y elaboración descritos en las reivindicaciones 8-12, se combinan entre sí en forma adecuada.

25.

23^a.- Procedimiento para la obtención de nuevas materias vegetativas; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria e ilustrado en los adjuntos dibujos.

Esta memoria consta de cincuenta y nueve hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 24 de septiembre de 1960.

CIBA/ SOCIETE ANONYME.

A. GONZALEZ ACEBO Y MODESTO

ESCALA VARIABLE.

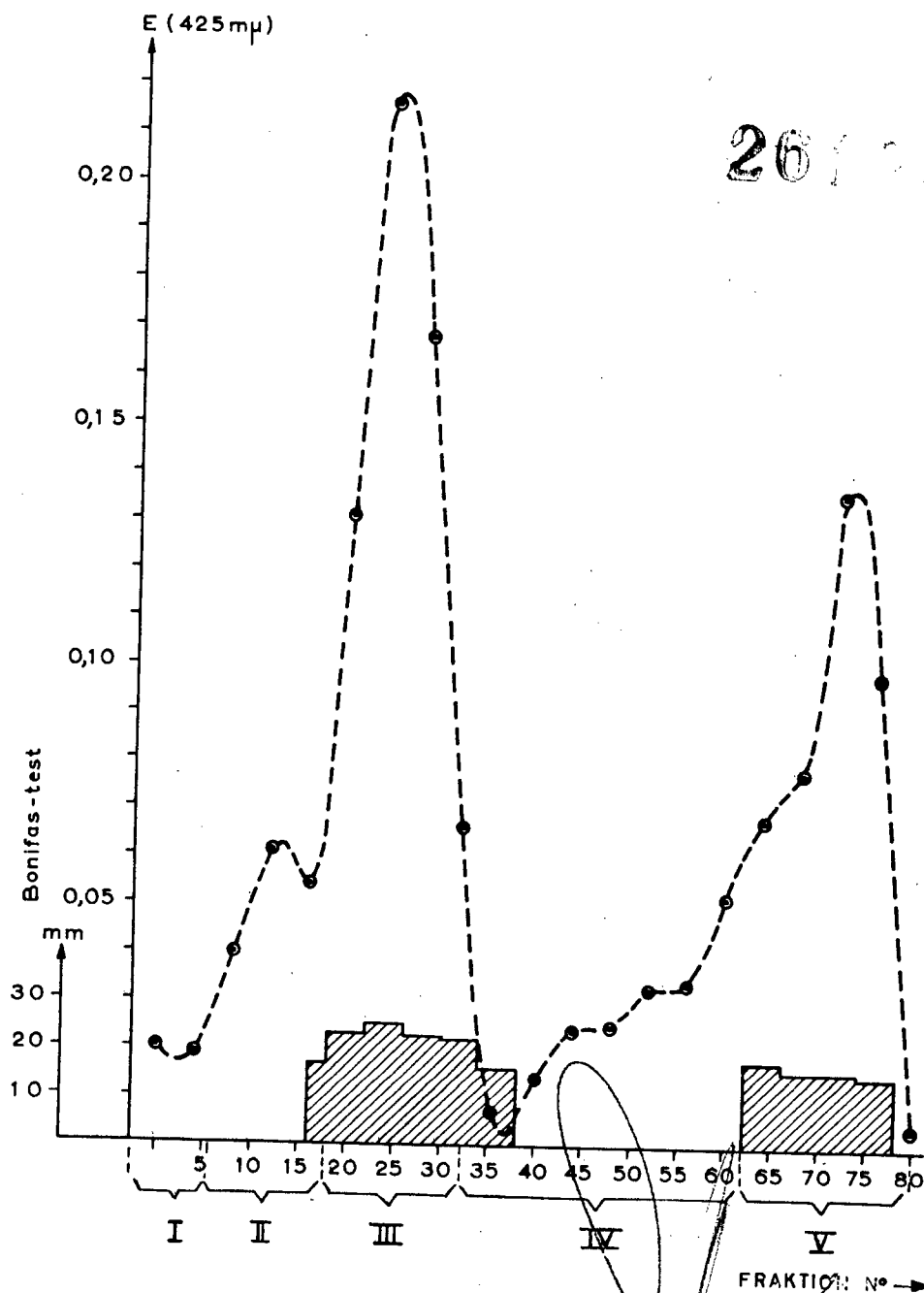
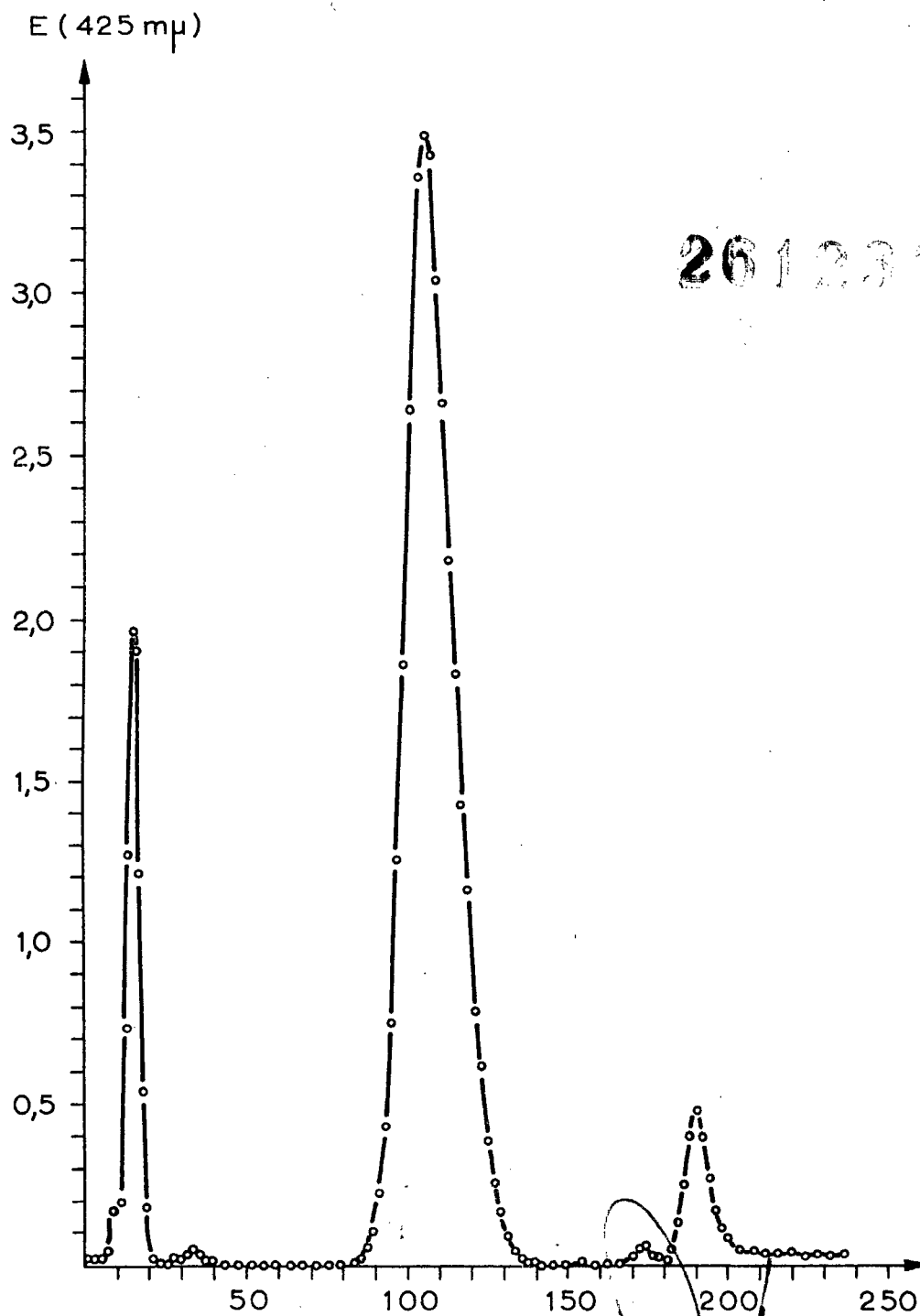


FIG. 1

FRAKTION N° →

Madrid

ESCALA VARIABLE.



261237

TRAKTIONSNUMMER

FIG. 2

Madrid,

ESCALA VARIABLE.



261237

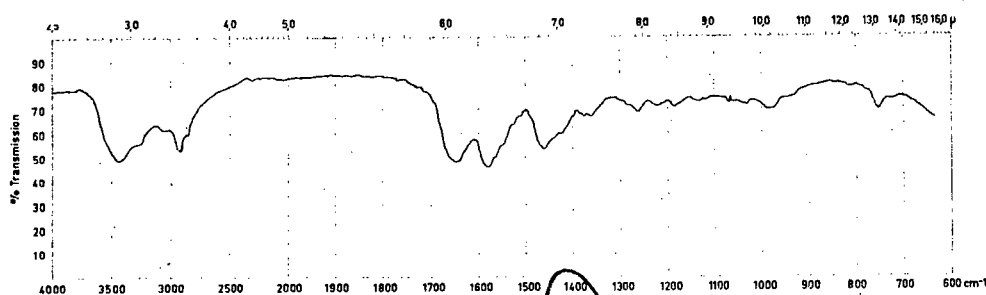


FIG. 3

Madrid

ESCALA VARIABLE.

26123

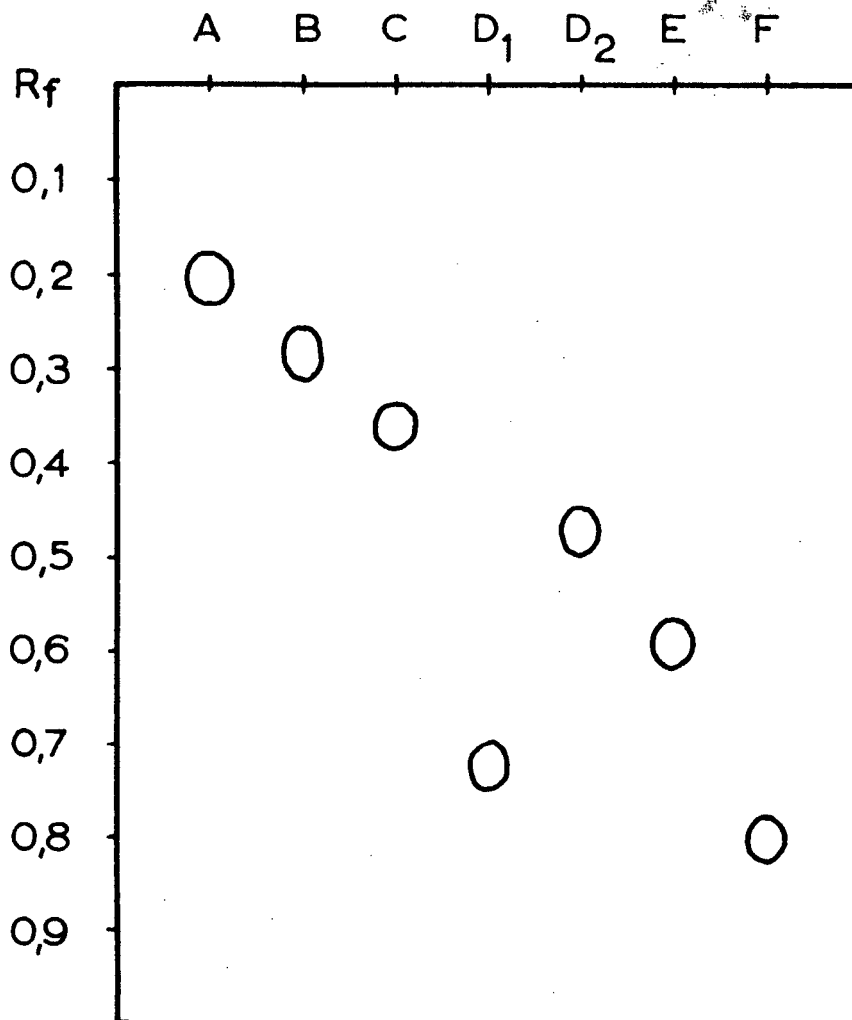
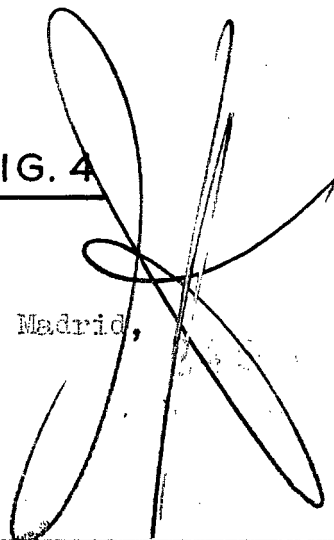


FIG. 4

Madrid,



ESCALA VARIABLE.



261237

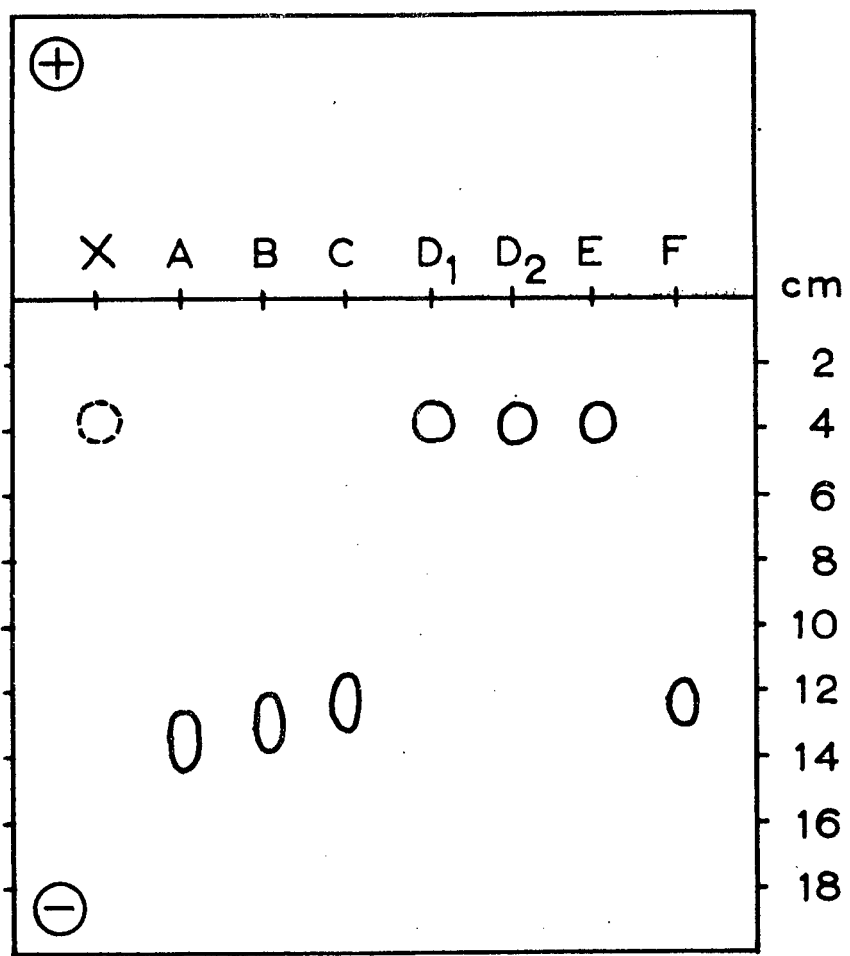


FIG. 5

Madrid,

ESCALA VARIABLE.



26

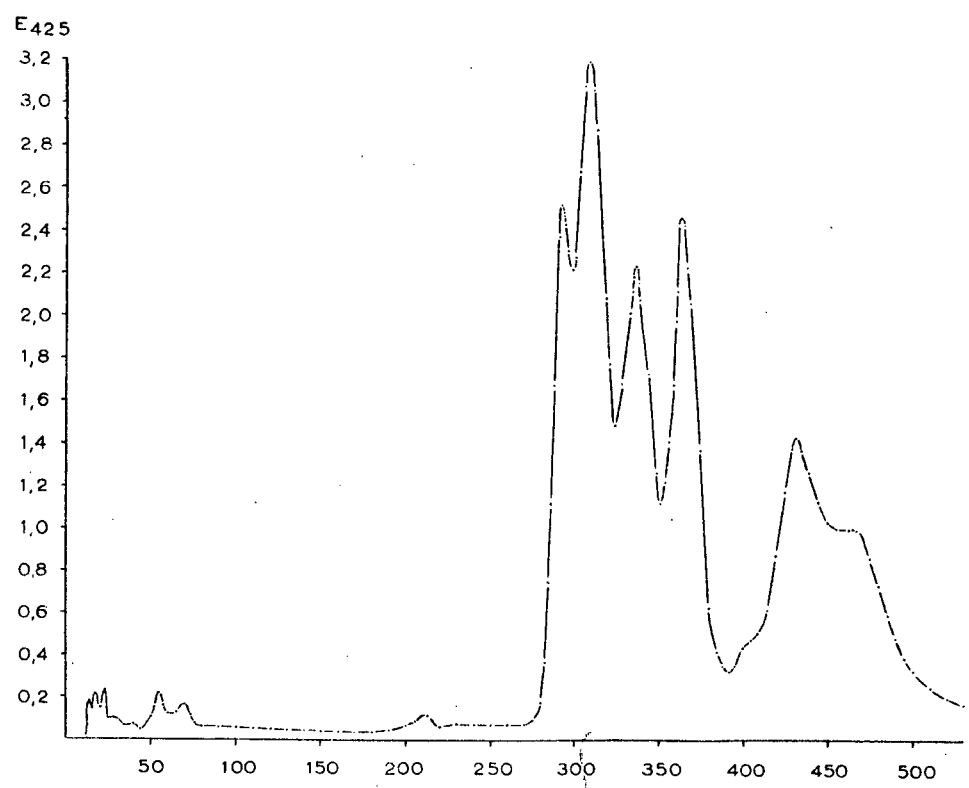


FIG. 6

Madrid,

1 600

22

ESCALA VARIABLE.

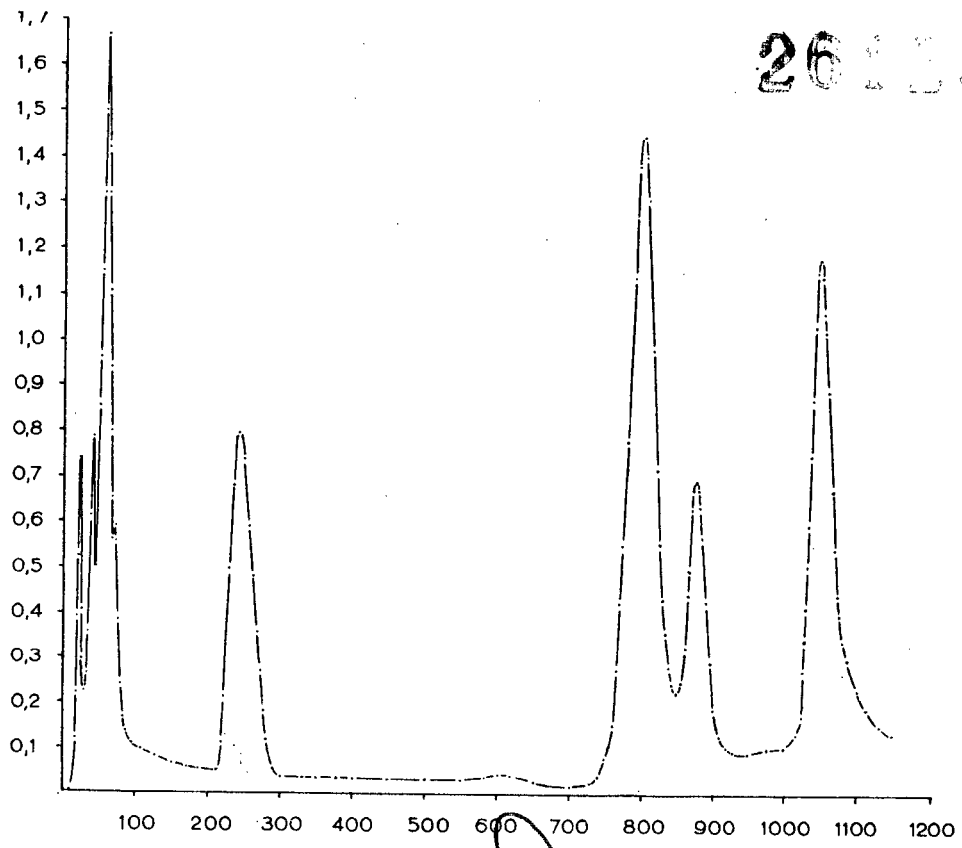


FIG. 7

Madrid

[Handwritten signature]

CIBA SOCIETE ANONYME

ESCALA VARIABLE.



261237

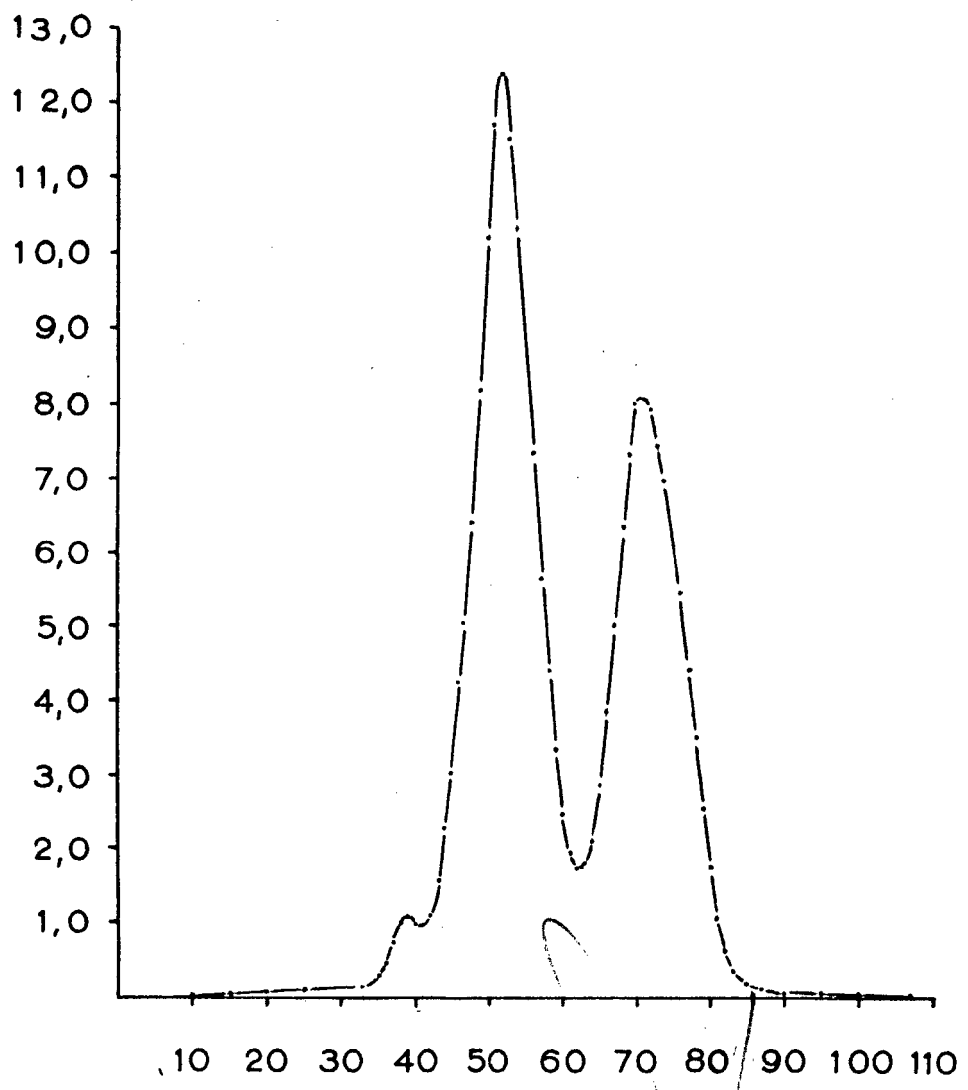


FIG. 8

Madrid,

ESCALA VARIABLE.



261237

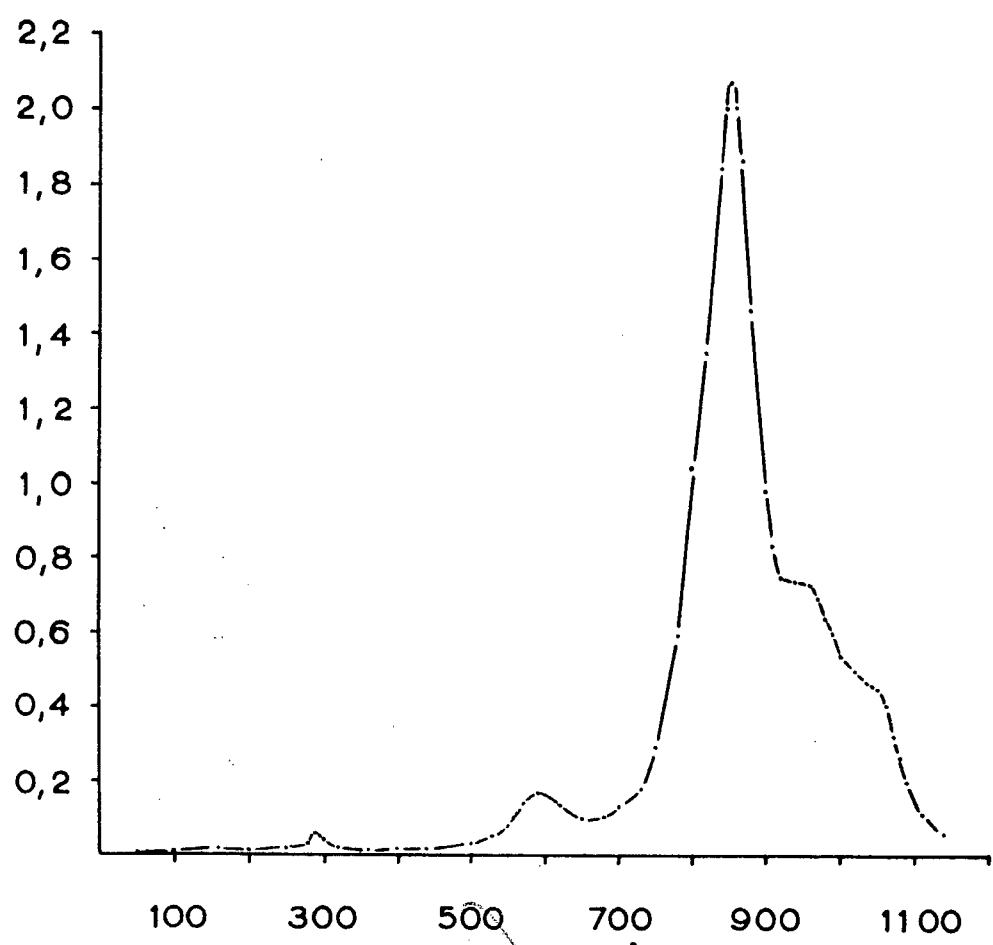


FIG. 9

Madrid,

[Handwritten signature]



ESCALA VARIABLE.

261237

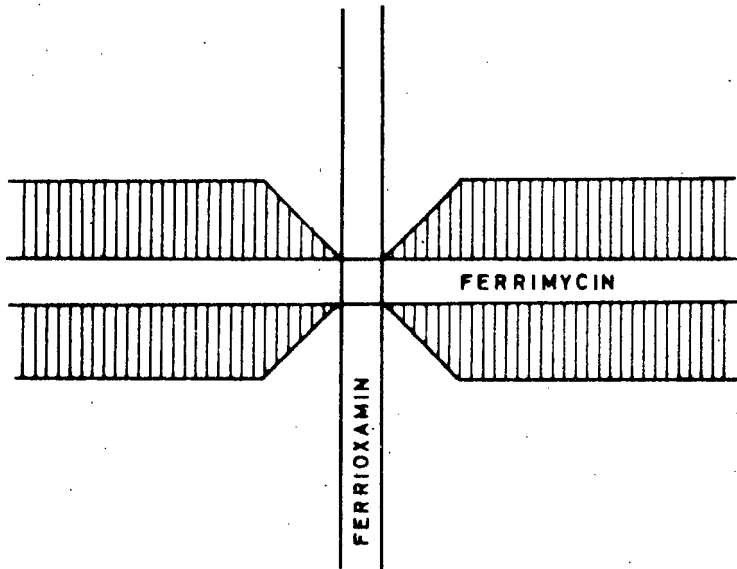


FIG.10

Madrid.

ESCALA VARIABLE.



261237

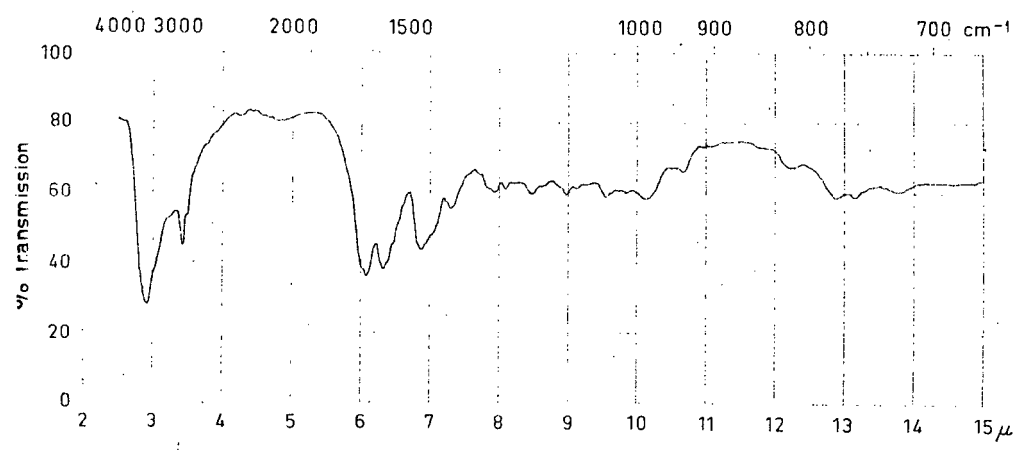
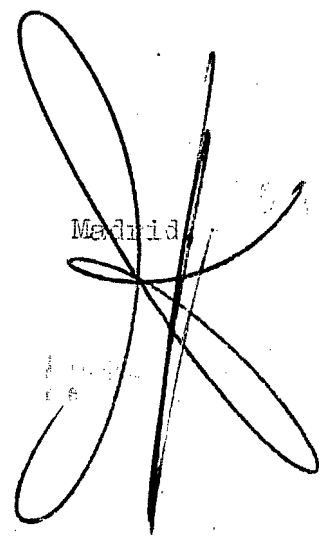


FIG II

Madrid



ESCALA VARIABLE.



261237

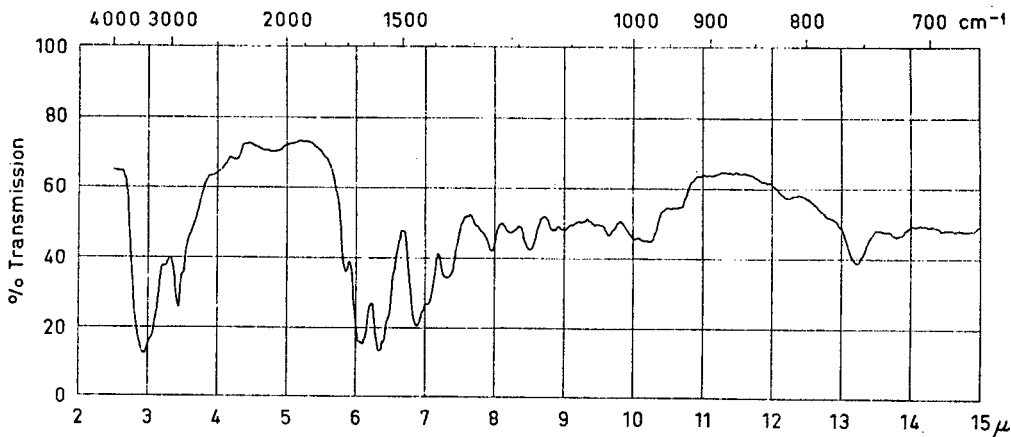


FIG. 12

Madrid

ESCALA VARIABLE.



261237

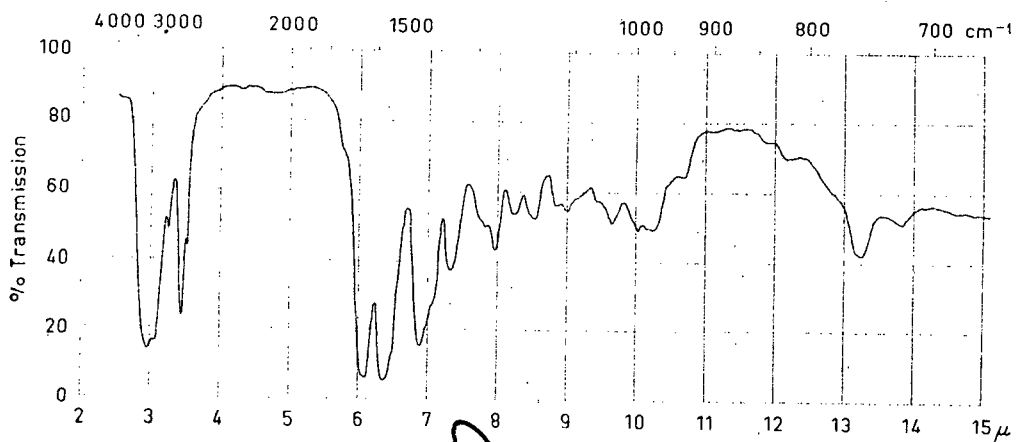


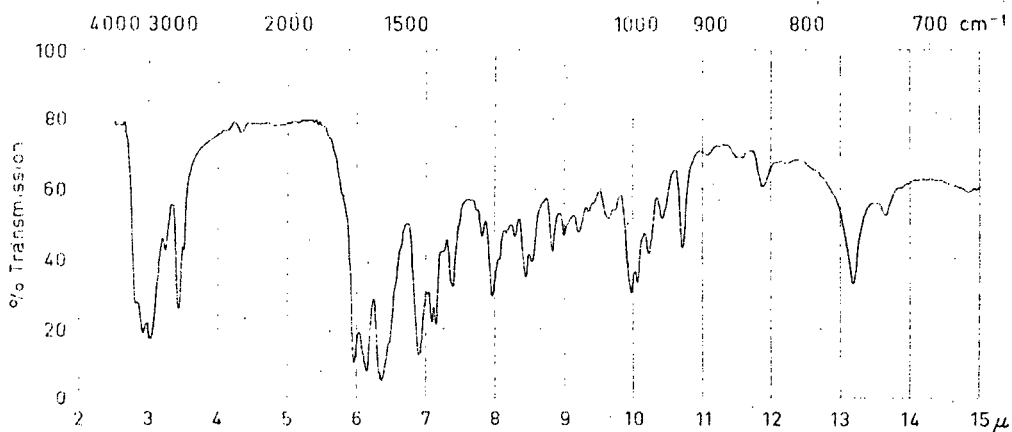
FIG 13

Madrid,

ESCALA VARIABLE.



261237



[Handwritten signature]

Madrid, 4 SEP. 1953

[Faint handwritten text]

ESCALA VARIABLE.



261237

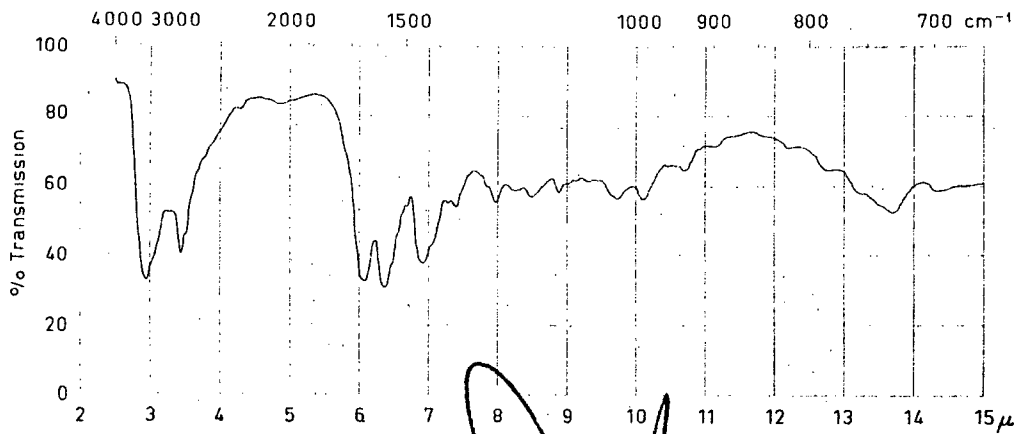


FIG 13
M. S. O. R. I. S.
A. S. T. R. O. N. O. M. O. D. E. I.

ESCALA VARIABLE.



261237

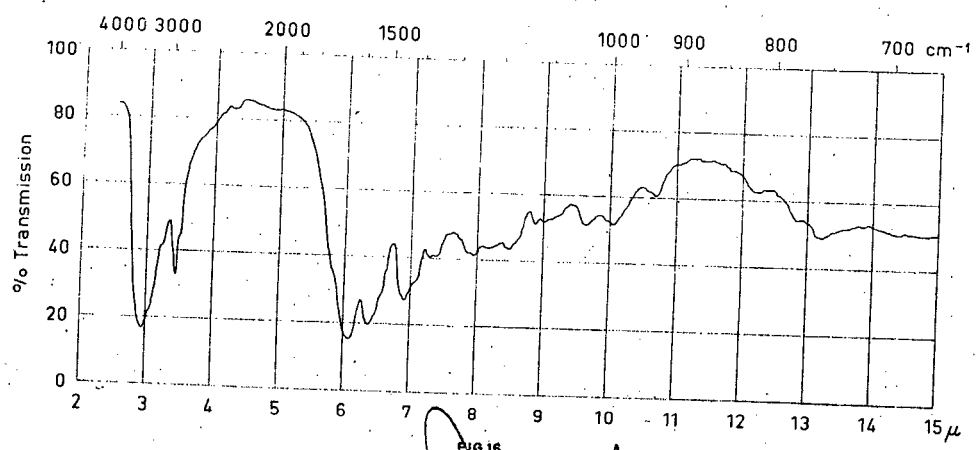
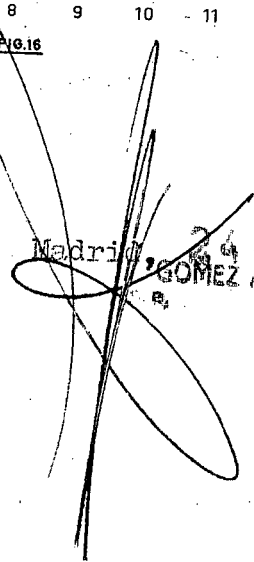


Fig. 16


 Madrid, 24 SEP. 1960
 GOMEZ ACEBO Y MOSES