

274932

SC 2004



Memoria Descriptiva

sobre:

"Procedimiento de preparación de un nuevo
antibiótico".

Solicitante: RHONE-POULENC S.A. entidad francesa, residente en
21, rue Jean Goujon, PARIS, Francia.

La presente invención se relaciona con un nuevo
antibiótico, designado en adelante por el número 9.671
R.P. Este nuevo producto presenta un interés particular
a causa de su poder antibacteriano importante sobre los
5. gérmenes grampositivos (y más especialmente estafilococos

274932



y estreptococos).

5. Este nuevo antibiótico se produce por cultivo en condiciones artificiales de un microorganismo, identificado más completamente líneas adelante, perteneciente al género streptomyces y designado por "Streptomyces 40.037" o "Streptomyces actuosus".

10. El 9.671 R.P. cristalizado es soluble en cloriformo, dioxano, piridina, dimetilformamida y dimetilsulfóxido, escasamente soluble en metanol, etanol acetato de etilo y benceno. Es insolubles en agua y éter de petróleo.

15. El 9.671 R.P. da pruebas negativas en las siguientes reacciones: reacción de biuret, reacción de Sakaguchi, reacción a la ninhidrina, reacción de Millon, reacción de Folin-Denis, reacción de cloruro férrico, reacción de Molisch, reacción al licor de Fehling, reacción de Tollens, reacción de Ehrlich, reacción de maltol férrico, reacción de Zimmermann. Da una prueba positiva a la reacción a la ninhidrina después de hidrólisis, demostrando así la existencia de una cadena polipeptida.

20. El antibiótico contiene carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre. Su composición elemental es la siguientes:

25. C % = 49,6 H % = 4,0 O % = 16,7 N % = 14,4
S % = 15,8

30. Aspecto: polvo microcristalino (agujas) amarillo
Punto de fusión: 310 - 320° (désco.) (al bloque Maquenne)
Poder rotatorio: $[\alpha]_D^{20} = + 38^\circ$ (c = 1, piridina)
Espectro ultravioleta: (determinación efectuada a partir de una solución de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ en agua conteniendo 1% de dimetilformamida)



Máximo de absorción a 242 m μ - $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 525$

Máximo de absorción a 322 m μ - $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 229$

Espectro in- (determinación a partir de comprimidos en
mezcla con BrK).
frarrojo:

Este espectro se halla representado en la

5. figura 1, en la que se han llevado como abscisas, de una parte las longitudes de onda expresadas en micras (escala inferior) y de otra parte los números de ondas en cm^{-1} (escala superior), y como ordenadas las transmisiones en %.

10. En la tabla I se indican las principales bandas de absorción infrarroja para este producto.

TABLA I

	3350 F	1101 m	tF = muy fuerte
	3125 ép	1061 m	F = fuerte
15.	2930 ép	1017 m	m = media
	1745 m	990 f	f = débil
	1655 tF	940 f	ép = espaldón
	1532 tF	918 m	
	1484 F	890 ép	
20.	1425 m	843 m	
	1385 f	822 f	
	1342 m	790 m	
	1308 m	752 F	
	1235 m		
25.	1210 m		
	1168 m		
	1150 m		
	1112 ép		

30. El 9.671 R.P. puede identificarse mediante cromatografía.



tografía sobre papel. El antibiótico ha sido cromatografiado sobre papel Arche No. 302 impregnado de tampón fosfato M/15 a un pH de 7, revelando en sentido descendente por medio de diferentes disolventes o mezclas de ellos; los cromatogramas han sido revelados por bioautografía, sobre placas de gelosa nutritiva sembradas de *S. aureus* o *B. subtilis*. Los Rf obtenidos aparecen indicados en la tabla II.

TABLA II

10.

Disolvente de revelado (Capa superior de la mezcla de los diferentes constitutivos)	Rf
Benceno + n butanol + agua (95 : 5 : 25 por volumen)	0,15
Acetato de etilo + metilisobutilcetona + agua (20 : 80 : 25 por volumen)	0,15
Acetato de etilo + metilisobutilcetona + agua (50 : 50 : 25 por volumen)	0,30
Acetato de etilo + benceno + agua (40 : 60 : 25 por volumen)	0,05
Ciclohexano + n butanol + agua (80 : 20 : 25 por volumen)	0
Acetato de etilo saturado de agua	0,50

La actividad bacterioestática del 9.671 R.P. frente a cierto número de gérmenes ha sido determinada mediante uno de los métodos de dilución corrientemente empleados a tal efecto. Para cada germen se ha determinado la menor concentración de sustancia que impide todo desarrollo visible en un caldo nutritivo apropiado.

15.

274932



Los resultados de las diversas determinaciones están agrupados en la tabla III siguiente, en la que las concentraciones bacterioestáticas mínimas están expresadas en microgramos de sustancia por cm³ de medio de ensayo.

5.

4932



TABLA III

Microorganismo ensayado	Concentración bacterioestática mínima μg/cm ³
Staphylococcus aureus, variedad 209 P - ATCC 6538 P	0,0009
Staphylococcus aureus, variedad 133 (Instituto Pasteur)	0,0019
Staphylococcus aureus, variedad B ₃ (resistente a la estreptomina y a la penicilina)	0,003
Staphylococcus aureus, variedad Hb (resistente a la tetraciclina y a la penicilina)	0,003
Staphylococcus aureus, variedad Launoy 1 (resistente a la tetraciclina, estreptomina, cloroanfenicol y penicilina)	0,0038
Staphylococcus aureus, variedad Launoy 2 (resistente a la tetraciclina, estreptomina y penicilina)	0,0021
Staphylococcus aureus, variedad Beaujon 3 (resistente a la tetraciclina, estreptomina, cloroanfenicol y penicilina)	0,003
Staphylococcus aureus, variedad 2700 R - resistente a la estreptotricina	0,0025
Staphylococcus aureus, variedad 1142 R - resistente a la congocidina	0,0005
Staphylococcus aureus, variedad 3486 R - resistente a la espiramicina	0,0009
Staphylococcus aureus, variedad resistente a la carbomicina	0,0005
Staphylococcus aureus, variedad resistente a la eritromicina	0,0033
Staphylococcus aureus, variedad resistente al cloroanfenicol	0,0012
Staphylococcus aureus, variedad resistente a la novobiocina	0,001
Staphylococcus aureus, variedad resistente a la actinomicina	0,0012
Micrococcus citreus - ATCC 8411	0,0038



TABLA III

(Continuación)

Microorganismo ensayado	Concentración bacterioestática mínima µg/cm ³
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> - ATCC 4698	0,003
<i>Gaffkya tetragena</i> (Fac. Phie)	0,0042
<i>Sarcina lutea</i> - ATCC 9341	0,0011
" <i>alba</i> (Fac. Phie)	0,0019
<i>Streptococcus faecalis</i> (Esterococo de Thiercelin Fac. Phie)	0,0106
<i>Streptococcus faecalis</i> - ATCC 9790	0,0007
<i>Streptococcus viridans</i> (Instituto Pasteur)	0,0065
" <i>pyogenes hemolyticus</i> (variedad Dig. 7 Instituto Pasteur)	0,00028
<i>Diplococcus pneumoniae</i> (variedad Til, Instituto Pasteur)	0,00015
<i>Neisseria catarrhalis</i> (Fac. Phie)	0,0017
<i>Lactobacillus casei</i> - ATCC 7469	0,0007
<i>Bacillus subtilis</i> - ATCC 6633	0,003
" " (variedad ZO 5 A, Fac. Phie)	0,01
" " (variedad 3 R 9675, Merck) - ATCC 9524	0,13
<i>Bacillus cereus</i> - ATCC 6630	0,0071
" <i>brevis</i> - ATCC 2185	>138
" <i>mycoides</i>	0,0043
<i>Mycobacterium smegmatis</i> - ATCC 607	>138
" " - ATCC 607 NR (variedad resistente a la neomicina)	5,07
<i>Mycobacterium smegmatis</i> - ATCC 607 SR (variedad resistente a la estreptomina)	>138
<i>Mycobacterium phlei</i> - (Instituto Bacteriológico de Lyon)	0,17
<i>Mycobacterium para-smegmatis</i> (A 75 - Lausana)	19,2

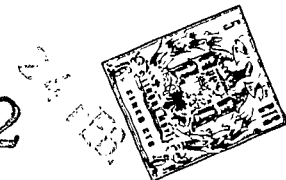
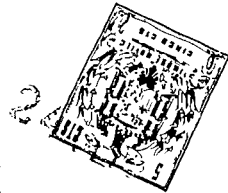


TABLA III (Continuación)

Microorganismo ensayado	Concentración bacterioestática mínima Ng/cm ³
Escherichia coli - ATCC 9637	> 138
Shigella dysenteriae - Shiga L (Instituto Pasteur)	id.
Salmonella typhimurium (Instituto Pasteur)	id.
" paratyphi A (Lacasse, Instituto Pasteur)	id.
Salmonella schottmuelleri (paratyphi B) - Fougere Instituto Pasteur)	id.
Bacillus lactis aerogenes (Fac. Phie)	id.
Aerobacter aerogenes - ATCC 8308	id.
Alcaligenes faecalis - ATCC 8740	0,0015
Proteus vulgaris (Fac. Phie)	> 138
" X 19	id.
Klebsiella pneumoniae - ATCC 10.031	> 138
Serratia marcescens (A. 476, Lausana)	id.
Pseudomonas aeruginosa (variedad Bass - Instituto Pasteur)	id.
Brucella bronchiseptica (CN 387 - Wellcome Institute)	id.
Pasteurella multocina (A.125, Instituto Pasteur)	0,0024

El conjunto de los resultados muestra que el 9.671 R.P. ejerce su actividad antibacteriana sobre todo contra las bacterias que toman la coloración de Gram. Además, el 9.671 R.P. es activo contra

5. variedades de estafilococo hechas resistentes a uno



o varios de los antibióticos siguientes: penicilina, estreptomina, tetraciclina, cloroanfenicol, eritromicina, novobiocina, actinomicina, estreptotricina, congocidina, espiramicina y carbomicina.

5. El 9.671 R.P. no posee actividad sobre los hongos levuriformes o filamentosos siguientes: *Pestalotzia palmarum*, *Saccharomyces pastorianus*, *Stemphylium radicinum*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium chrysogenum*.

10. Además, se ha demostrado en el laboratorio que el 9.671 R.P. era particularmente activo sobre las infecciones estafilocócicas del ratón cuando se le administraba in situ. La toxicidad del antibiótico ha sido estudiada principalmente sobre el ratón. La dosis máxima tolerada, es decir la dosis máxima con la que no se observa ninguna muerte entre los animales (DL_0), ha sido determinada administrando el producto por vía subcutánea, oral o intraperitoneal.

20.	Vía subcutánea	DL_0 superior o igual a 1 g/kg
	Vía oral	DL_0 superior o igual a 2,5 g/kg

	Vía intraperitoneal	DL_0 igual a 0,5 g/kg
--	---------------------	-------------------------

Poco tóxico para el ratón y bien tolerado por el conejo en aplicación sobre las mucosas, este producto es un medicamento de primera clase para el tratamiento local de las infecciones de cocos grampositivos en el hombre y los animales. Particularmente, es muy eficaz contra la mamitis de la vaca.

30. El organismo productos del antibiótico 9.671 R.P.

27493



pertenece al género streptomyces y se designa con la denominación de "Streptomyces 40.037".

- Este organismo ha sido aislado de un fragmento de tierra tomada de Corrientes (Argentina). El método de aislamiento es el siguiente: la tierra tomada se pone en suspensión en agua destilada estéril, diluyéndose luego la suspensión a diferentes concentraciones; se extiende un pequeño volumen de cada dilución sobre la superficie de las cajas de Pétri conteniendo medio nutritivo de Emerson o cualquier otro medio adecuado, Después de una incubación de algunos días a 26°, se transplantan las colonias de microorganismos que se desean aislar sobre gelosas inclinadas a fin de obtener cultivos más abundantes.
5. 10. 15. 20.
- Siguiendo la clasificación del "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 7ª edición (1957), para el género streptomyces, no se encuentra ninguna descripción de especie cuyos caracteres de cultivo y propiedades bioquímicas coincidan con los del Streptomyces 40.037. Es por esto por lo que puede considerarse este organismo como una especie nueva a la que nosotros hemos atribuído el nombre de "Streptomyces actuosus" en razón de su actividad.

Morfología microscópica

25. 30.
- Los cultivos sobre láminas en medio de Bennett examinados al microscopio muestran la formación de filamentos micelianos ramificados, así como cadenas de esporas características del género streptomyces. Los filamentos micelianos presentan numerosísimas cadenas de esporas; los filamentos esporíferos son flexuosos y

274932



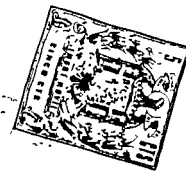
- de longitud variable. Las esporas son ovales, con una anchura aproximada de 1 micra y longitud de 1,5 micras aproximadamente. Los filamentos micelianos son más delgados que los filamentos esporíferos; tienen una anchura de 0,6 a 0,8 micra aproximadamente.
- 5.

Caracteres generales

- Sobre los medios denominados "sintéticos", el *S. actuosus* presenta en general un micelio vegetativo incoloro o anaranjado pálido y no produce pigmento soluble o pigmentos débiles de color ocre o pardo.
10. Sobre los medios denominados "orgánicos", forma un micelio vegetativo cuyo color va del pardo amarillento al pardo oscuro, y pigmentos solubles de un pardo más o menos intenso, según los medios y la edad del cultivo. El micelio aéreo no aparece en todos los medios. Cuando se produce, es siempre blanco al comienzo de su desarrollo, colorándose luego en gris medio.
- 15.

Forma de las colonias aisladas

- Los cultivos monoesporas en cajas de Pétri sobre medio de Bennett, muestran colonias redondas, de bordes no desflecados; las colonias son bastante abombadas, pudiendo presentar un botón central. El micelio vegetativo forma numerosos pliegues según los radios; es de color anaranjado pálido, como igualmente su reverso. El micelio aéreo aparece bastante pronto; en primer lugar blanco, evolucionando luego con el grado de desarrollo para tornarse gris medio cuando ha madurado. Se forma un ligero pigmento pardo en la gelosas.
- 20.
- 25.
- 30.



Carácter de los cultivos y propiedades bioquímicas.

- Los caracteres de cultivo y las propiedades bioquímicas del *Streptomyces actuosus* han sido
5. examinadas sobre las gelosas nutritivas y sobre los caldos nutritivos habitualmente utilizados para identificar las variedades de *Streptomyces*. Las observaciones efectuadas están anotadas en la siguiente Tabla IV; se refieren a cultivos incubados a 26° durante 27 días.
 10. La mayor parte de los medios de cultivo empleados han sido preparados según las fórmulas contenidas en "The Actinomycetes", de S.A. Waksman, páginas 193-197, Chronica Botanica Company, Waltham (Mass). Estados Unidos, 1950; en este caso, se indican con el número
 15. que les ha sido atribuido en "The Actinomycetes".

274932

TABLA IV

Medio de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo	Micelio aéreo	Pigmento soluble	Propiedades bioquímicas
Gelosa de Bennett (ref. A)	Bueno	Ligeramente plegado, ligeramente eflorescente	Abundante, gris medio	Pardo y de intensidad media	
Gelosa glicerina-asparaguina (3)	Moderado	Incoloro	Ligero, blanco evolucionable a gris medio	Débil y de color ocre.	
Gelosa sintética (almidón-sales minerales) (ref. J)	Moderado	Incoloro, ligeramente eflorescente	Ligero, blanco al principio, tornándose luego gris medio	Débil y de color ocre-amarillo	
Gelosa maltosa-triptona (ref. B)	Vigoroso	Espeso y fuertemente pigmentado (negro); plegado	Blanco, de aspecto gredoso, tornándose gris medio	Intenso y pardo	
Gelosa sintética (medio de Czapek)	Bueno	Incoloro, ligeramente eflorescente	Abundante; parece tornarse gris muy pronto después de su aparición, pero permanece pálido.	Bastante abundante y ocre	
Gelosa sintética glucosada (ref. C)	Bueno	Idem.	Blanco, pulverulento, tornándose gris muy pálido	Bastante abundante y ocre.	
Gelosa de Emérson (23)	Bueno	Plegado y brillante, pardo claro	Blanco grisáceo	Pardo claro	
Gelosa glucosa-asparaguina (2)	Moderado	Incoloro	Gris claro con algunos copitos blancos	Ninguno	
Gelosa nutritiva (5)	Débil	Mate, ocre pardo amarillo	Ausente	Ocre pardo amarillo	
Gelosa glucosada (7)	Bueno	Liso, brillante	Al comienzo, blanco grisáceo, de aspecto gredoso, tornándose gris pálido muy ligeramente rosa, pero con sectores claros y oscuros, predominando aquellos	Ninguno	Formación de cristales en la gelosa
Gelosa al almidón	Moderado	Incoloro o anaran-	Blanco, tornándose gris	Ocre rosa	

274932

Blanco, tornándose gris medio

Incoloro o anaranjado pálido

Gelosa al almidón (10)

Ocre rosa

Solubilización del malato de calcio.

Ninguno

Idem.

Incoloro

Moderado

Gelosa al malato de calcio (ref.D)

Sin solubilidad de la tirosina

Pardo

Ausente

Pardo claro

Moderado

Gelosa a la tirosina (ref. E)

Licuección en 1/3 de la altura en 12 días; en 2/3 de la altura en 27 días.

Pardo amarillo

Ausente

Copos en la superficie de la gelatina.

Moderado

Gelatina pura 12% (ref. F)

274932

Patata (27)

Vigoroso

Plegado

Blanco sobre los bordes; gris medio en el centro

Exudación amarilla en gotitas en la superficie del micelio aéreo pigmento soluble pardo.

Solución al almidón (19)

Moderado

Velo granuloso superficial, copos en profundidad, la mayor parte adheridos a las paredes del tubo

Ausente

Ninguno

La hidrolisis del almidón no es total en 12 días (reacción a la solución iodo-iodura da); en 27 días, sólo quedan dextrinas.

Caldo de Czapek (18)

Moderado

Copos en el fondo del tubo

Ausente

Ligero y amarillito, más intenso hacia la superficie que en profundidad.

Caldo de Czapek glucosado (ref.)

Idem.

Idem.

Idem.

Idem.

so hacia la superficie que en profundidad.

Caldo de Czapek glucosado (ref. G)	Idem.	Idem.	Idem.	Reacción positiva de los nitritos
Caldo nutritivo nitratado (ref. H)	Moderado	Velo granuloso superficial y pequeñas colonias en profundidad, adherentes a las paredes.	Ausente	Ninguno
Leche descremada (ref. K)	Bueno	Anillo pardo oscuro y velo.	Vestigios, Blanco	En el 12º día nada de coagulación; el pH es de 6,8; en el 27º día, la peptonización es total y el pH es de 7,2
				Al comienzo, parido oscuro cerca de la superficie, más claro en profundidad: El pigmento parido invade enseguida la totalidad del medio.



Referencias o constitución de los medios no descritos en "The Actinomycetes":

5. A : K.L. Jones, J. Bacteriology, 57. 142 (1949)
B : A.H. Williams, E. McCoy, App. Microbiology 1, 307 (1953).
C : Obtenida sustituyendo en la fórmula indicada por Waksman para el "Czapek's synthetic sucrose agar" (1) la sacarosa por un 3% de glucosa.
10. D : Malato de calcio 1%, $ClNH_4$, 0,05%; PO_4HK_2 , 0,05%; gelosa, 2%.
E : Peptona, 0,5%; extracto de carne, 0,3%; tirosina, 0,5%; gelosa, 2%.
F : "Plain gelatina" preparada según las indicaciones del "Manual of methods for pure Culture Study of Bacteria" de la Society of American Bacteriologists (II₅₀ - 18).
15. G : Obtenido sustituyendo en la fórmula indicada por Waksman para el "Czapek's sucrose broth" (18) la sacarosa por un 3% de glucosa.
20. H : Según la fórmula indicada en el "Manual of Methods for pure, Culture Study of Bacteria" de la Society of American Bacteriologists (II₅₀ - 18).
25. J : Grundy y col. Antibiotics and Chemotherapy, 1 309, (1961).
K : Preparada con leche descremada en polvo marca Gayelord Hauser según las indicaciones del fabricante.
30. Utilización de diversos elementos hidrocarbonados

274332

24 FEB.



(según el método de Pridham (T.G.)/Gottlieb (D) - J. Bact. 56 167 [1948]).

Los cultivos se han efectuado sobre gelosas inclinadas. La incubación se ha realizado a 26°. Entre los elementos que provocan un crecimiento rápido y completo con formación de micelio aéreo y de esporas en 10 días, se encuentran la glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa, almidón, dextrina, xilosa, rafinosa, ribosa, inulina, fructosa, mannososa, arabinosa, ramnosa, galactosa, manitol, inositol, meso-inositol, glicerol, acetato de sodio, citrato de sodio y ácido succínico.

La sorbosa, srobitol, eritritol, adonitol, dulcitol, no permiten el desarrollo o no dan lugar más que a un desarrollo extremadamente restringido. Puede decirse pues que estos elementos no son utilizados.

Comparación entre el S. actuosus y dos variedades de streptomyces descritos en "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology"

Estas dos variedades, Streptomyces fasciculus (descrita en su origen por Krassilnikov) y Streptomyces carnosus (descrita por Millard y Burr), son las que más se aproximan a la variedad productora del 9671 R.P., denominada aquí Streptomyces actuosus.

Las diferencias de caracteres de cultivo y de las propiedades bioquímicas se indican en la Tabla V.



274932

TABLA V

	S. fasciculus	S. carnosus	S. actuosus
Filamentos esporíferos	Rectos	-	Flexuosos
Forma de las esporas	Oblonga		Oval
Gelosa sintética sacarosada (1)	-	Micelio vegetativo gris ahumado pálido; exudación incolora en gotitas sobre toda la superficie.	Micelio vegetativo incoloro: sin exudación
Gelosa sintética glucosada (C)	-	Micelio vegetativo gris oliva pálido	Micelio vegetativo incoloro
Gelosa nutritiva (5)	Micelio aéreo poco desarrollado, gris.	-	Sin micelio aéreo
Gelatina (F)	Licuación media	Licuación rápida	Licuación lenta e incompleta.
Leche (K)	Coagulación y peptonización rápida.	Coagulación seguida de licuación	Sin coagulación, peptonización lenta.
Almidón (19)	Hidrolisis rápida	Hidrolisis	Hidrolisis lenta e incompleta (detenida en la fase dextrina).
Nitrato (H)	Reducción débil en nitrito	Reducción	Buena reducción

El procedimiento de preparación del antibiótico 9671 R.P. consiste esencialmente en cultivar el Streptomyces 40.037 o sus mutaciones sobre un medio y en condiciones apropiadas y en separar seguidamente el antibiótico formado en el curso del cultivo.

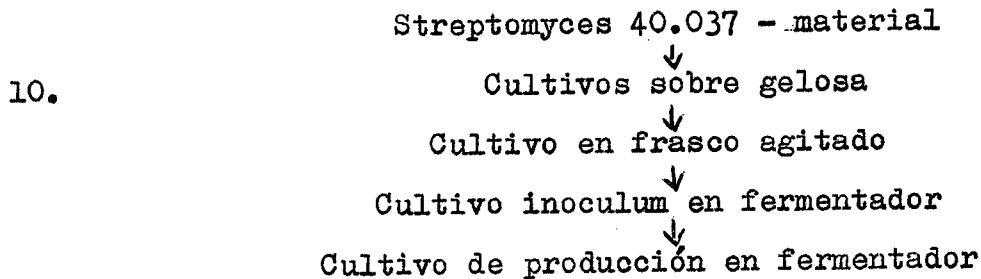
5.



El cultivo del Streptomyces 40.037 puede efectuarse por cualquier método de cultivo aeróbico en superficie o en profundidad, siendo sin embargo preferible éste último por razones de comodidad, Se utilizan a este fin los diferentes tipos de aparatos en uso actualmente en la industria de las fermentaciones.

5.

Se puede usar particularmente la siguiente marcha para la conducción de las operaciones



15.

El medio de fermentación debe contener esencialmente una fuente de carbono y otra de nitrógeno asimilables, elementos minerales y eventualmente factores de crecimiento, pudiendo ser aportados todos estos elementos en forma de productos bien definidos o por mezclas complejas, tales como las que se encuentran en productos biológicos de orígenes diversos.

20.

Como fuente de carbono asimilable se pueden utilizar hidratos de carbono tales como la glucosa, sacarosa, lactosa, dextrinas, almidón, melasas u otras sustancias hidrocarbonadas como los azúcares alcoholes: glicerol, manitol, o como ciertos ácidos orgánicos: ácidos láctico, cítrico, tartárico. Ciertos aceites animales o vegetales como el aceite de tocino o el de soja, pueden sustituir ventajosamente estas diferentes fuentes hidrocarbonadas, o adjuntárseles.

25.

30.

Las fuentes adecuadas de nitrógeno asimilable

274 932



- son extremadamente variadas. Pueden ser sustancias químicas muy simples como los nitratos, las sales minerales y orgánicas de amonio, la urea, los ácidos aminados. Pueden aportarse también por sustancias complejas que contengan principalmente el nitrógeno en forma protídica: caseína, lactalbúmina, gluten y sus hidrolisados, harinas de soja, de aráquida, de pescado, extractos de carne, de levadura, solubles de destiladores, "corn-steep", etc.
- 5.
10. Entre los elementos minerales añadidos, algunos pueden tener un efecto amortiguador neutralizando, como los fosfatos alcalinos o alcalino-térreos o los carbonatos de calcio y de magnesio.
- Otros aportan el equilibrio iónico necesario al desarrollo del Streptomyce 40.037 y a la elaboración del antibiótico, como los cloruros y sulfatos de los metales alcalinos y alcalino-térreos. Finalmente, algunos actúan más especialmente como activadores de las reacciones metabólicas del Streptomyces 40.037: tales son las sales de zinc, cobalto, hierro, cobre y manganeso.
- 15.
20. El pH del medio de fermentación al comienzo del cultivo debe estar comprendido entre 6,0 y 7,6. La temperatura óptima para la fermentación es de 26-27°, pero se obtiene una producción satisfactoria para temperaturas comprendidas entre 23 y 35°. La aeración de la fermentación puede variar entre valores bastante amplios. Se ha observado sin embargo que unas aeraciones de 0,5 a 2 litros de aire por litro de caldo y por minuto convienen particularmente bien. El rendimiento máximo en antibiótico se obtiene después de 3 a 5 días de cultivo,
- 25.
- 30.



dependiendo este tiempo esencialmente del medio utilizado.

De acuerdo con lo que antecede, se comprende que las condiciones generales del cultivo del *Streptomyces* 40.037 para la producción del antibiótico pueden variar en una medida bastante amplia y adaptarse a cada necesidad particular.

- 5.
- El 9671 R.P. puede aislarse a partir de los mostos de fermentación por diferentes métodos. El mosto de fermentación puede filtrarse a un pH comprendido entre 6 y 9, pero en este caso una parte importante de la actividad queda en la masa de filtración, que es preciso tratar igualmente para extraer el producto activo. Es pues preferible realizar la filtración en un intervalo de pH comprendido entre 1 y 6; en estas condiciones, la actividad queda en la masa de filtración, de la que puede extraerse mediante un disolvente del grupo de los alcoholes alifáticos, tal como metanol, etanol, propanoles o butanoles, del grupo de las cetonas tal como la acetona o la metilisobutilcetona, del grupo de los ésteres tal como el acetato de etilo. Se puede someter igualmente el mosto de fermentación a una extracción por un disolvente orgánico no mezclable con el agua, elegido del grupo de los alcohiles alifáticos en C_4 o C_5 , de las cetonas o de los ésteres. En este caso la actividad pasa a la fase orgánica, que es separada de la fase acuosa por filtración o centrifugación.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.

- El producto bruto puede aislarse a partir de las soluciones orgánicas indicadas anteriormente por concentración de la solución orgánica en un escaso
- 30.



- volumen. Por refrigeración o por adición de un mal disolvente del 9671 R.P., tal como el éter de petróleo o el ciclohexano, el antibiótico bruto precipita. Cuando el antibiótico se encuentra en el filtrado de los mostos de cultivo, se somete esta solución a una extracción
5. por un disolvente no mezclable con agua, tal como un alcohol alifático en C_4 o C_5 , una cetona como la metil-isobutilcetona, un éster como el acetato de etilo o el acetato de amilo o un disolvente clorado como el cloroformo o el dicloreto. Se procede entonces como se mencionó anteriormente: concentración en un escaso volumen y precipitación.
- 10.

- El 9671 R.P. puede cristalizarse entonces por disolución del precipitado así obtenido en el ácido acético bajo ligero calentamiento y refrigeración. En el caso en que el producto bruto sea demasiado impuro para ser directamente cristalizado, o si se desea obtener un producto muy puro, es ventajoso someter el antibiótico bruto a una doble purificación. La primera
15. consiste en lavar el antibiótico bruto con un disolvente orgánico en el que sea poco o nada soluble, por ejemplo metanol, etanol, benceno o éter de petróleo, filtrar y secar. La segunda consiste en someter el antibiótico ya parcialmente purificado por el lavado anteriormente descrito, a una cromatografía. Esta puede realizarse
20. utilizando una columna de alúmina sobre la que se pasa una solución del producto en un disolvente adecuado. Como disolvente se puede utilizar, por ejemplo, uno clorado, como el cloroformo o el dicloreto o una mezcla
25. de uno de estos disolventes clorados con un disolvente
- 30.



- en el que el antibiótico sea poco soluble, como por ejemplo el metanol o el etanol. El producto es sometido a elución por el mismo disolvente. El material resultante de la elución es concentrado y el antibiótico precipitado por adición de un mal disolvente como se ha indicado anteriormente.
- 5.
- Los productos así purificados son disueltos con ligero calentamiento en ácido acético glacial o acuoso. Después de la filtración de la solución y de la adición de agua, se efectúa la cristalización por refrigeración con agitación lenta.
- 10.
- Es comprensible que los diferentes métodos indicados pueden aplicarse sucesivamente en un orden variado o repetirse varias veces, según los imperativos de la fabricación, para obtener el 9671 R.P. bajo una forma conveniente a las aplicaciones consideradas.
- 15.
- Los ejemplares siguientes, ofrecidos a título no limitativo, muestran cómo puede ponerse en práctica la invención. En lo que sigue, la actividad es determinada en todos los casos por un método turbidimétrico con *Staphylococcus aureus* 209 P como germen sensible y con relación a una muestra de producto puro y cristalizado como patrón. Esta actividad se expresa pues en microgramos (μg) de producto cristalizado patrón por mg para los productos sólidos, y en μg de producto cristalizado patrón por cm^3 para las soluciones.
- 20.
- 25.
- Ejemplo 1
- Se carga en un fermentador de 75 litros: "cornsteep" (50% de extracto seco), 800 g; sacarosa, 1200 g;
30. sulfato de amonio, 80 g; agua del grifo, 35 litros.



Se ajusta el pH hacia 5,2 mediante adición de 20 cm³ de sosa (d = 1,33 seguidamente se añaden 300 g de carbonato cálcico.

5. Se esteriliza el medio a 122° durante 40 minutos por chapoteo de vapor. Después de la esterilización y refrigeración a 27°, el volumen final del caldo es de 40 litros y el pH de 7,15. Seguidamente se siembra el medio con 250 cm³ de un cultivo en erlenmeyer agitado de la variedad Streptomyces 40.037.
10. El cultivo contenido en el fermentador es aireado con aire estéril de un caudal de 3 m³/hora y agitado por una hélice girando a 400 rpm. La temperatura se mantiene a 27°. El pH del medio permanece en su valor inicial (7,15) durante 4 horas, descendiendo luego lentamente hasta alcanzar 6,85. El desarrollo del hongo corresponde a esta baja de pH y es conveniente para la siembra del cultivo productor 28 horas después de la siembra.
15. El cultivo productor se efectúa en fermentador de 350 litros cargado con las siguientes sustancias: 8 kg de harina de soja, 1 kg de solubles de destiladores, 1 kg de glucosa (hidratada), 4 litros de aceite de soja, 2 kg de carbonato de calcio, 2 kg de cloruro de sodio y 175 litros de agua.
20. El pH del medio antes de la esterilización es de 6,95. El medio se esteriliza a 122° durante 40 minutos por chapoteo de vapor. Después de la esterilización y de la refrigeración a 27°, el volumen final del caldo es de 200 litros y el pH de 7,20. El medio es entonces sembrado con 20 litros del cultivo precedente
- 25.
- 30.



274932

en fermentador de 75 litros. Se agita el medio mediante una turbina girando a 205 rpm y se airea con 10 m³/h de aire estéril y mantenido a 27°.

5. El pH desciende lentamente durante 24 horas, después de lo cual vuelve a subir. Es con esta nueva subida del pH como se inicia la producción del anti-biótico. El final de la fermentación no es indicado por ningún accidente en la curva de evolución del pH; tiene lugar al cabo de 90 horas aproximadamente. La actividad del medio es entonces de 295 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Ejemplo 2

15. Se disponen en un recipiente provisto de un dispositivo de agitación, 190 litros de mosto de fermentación (título 295 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ del ejemplo 1). Se agita el mosto durante una hora con 110 litros de butanol ajustando el pH en 5 por medio de ácido clorhídrico diluido, adicionándole luego 19 kg de coadyuvante de filtración. Se filtra la mezcla con filtro prensa y la masa es lavada con 50 litros de agua. La fase orgánica es separada y luego lavada por 11 litros de agua a un pH 9 y luego por 11 litros de agua a un pH de 5. Se separa de nuevo la capa orgánica y luego se concentra a presión reducida a 1/100 del volumen inicial del mosto, o sea a 1,9 litros. Después de 24 horas de reposo en cámara fría, se crea el precipitado obtenido, se lava y se seca. Se obtienen 25. 88 g de producto bruto de una actividad de 434 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

Ejemplo 3

30. 70 g del producto obtenido en el ejemplo 2 y de un título de 434 $\mu\text{g}/\text{mg}$, son puestos en suspensión en 1400 cm³ de metanol y agitados durante una hora a 30°.



274932

El material insoluble es oreado y secado. Se obtienen 29 g de un producto que posee una actividad de 825 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

- Se disuelve este producto en 750 cm^3 de una mezcla de cloroformo y metanol (90 : 10 por volumen). Se filtra la solución y luego se cromatografía sobre una columna que contiene 600 g de alúmina (altura de la columna, 61, cm. diámetro, 3,5 cm). Se revela el cromatograma y se efectúa su elución con 1500 cm^3 de la misma mezcla cloroformo-metanol.
- 5.
10. Se unen las fracciones ricas, se concentran a presión reducida a 40 cm^3 y se precipitan con 400 cm^3 de exano. El precipitado es oreado, lavado y secado. Se obtienen 23 g de producto de una actividad de 950 $\mu\text{g}/\text{mg}$.
15. Se calienta a 50° durante 5 minutos una suspensión de 10 g de este último producto (de un título de 950 $\mu\text{g}/\text{mg}$) en 200 cm^3 de ácido acético glacial. La solución es filtrada, adicionada con 2,5 cm^3 de agua y refrigerada lentamente. Los cristales obtenidos son oreados, lavados y secados. Se obtienen 8 g de producto puro de una actividad de 1000 $\mu\text{g}/\text{mg}$.
- 20.

Ejemplo 4

- Se colocan en un depósito provisto de un dispositivo de agitación 170 litros de mosto de fermentación de una actividad de 166 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Se lleva el pH a 5 con ácido sulfúrico diluído. Se añaden 95 litros de acetato de etilo y se agita la mezcla durante una hora. Se separa la fase orgánica por centrifugación en una centrifugadora capaz de separar un disolvente orgánico de una suspensión acuosa de materiales insolubles
- 25.
30. (Westphalia SKOG 205). Se recogen 82 litros de solución



274932

274932

orgánica, que se lava y luego se concentra a presión reducida a 1,7 litros. Después del tratamiento como en el ejemplo 2, se obtienen 61 g de producto de una actividad de 320 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

5. 35 g de este producto son puestas en suspensión en 700 cm³ de metanol y agitados durante una hora a 30°. El precipitado es oreado y secado. Se obtienen 11,1 g de producto de una actividad de 725 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

10. Por disolución de 10 g de este producto en 200 cm³ de ácido acético glacial y tratamiento como en el ejemplo 3, se obtienen 6,3 g de producto cristalizado, de una actividad de 925 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

N O T A

15. Descrita suficientemente la naturaleza del invento así como la manera de realizarlo en la práctica debe hacerse constar que la disposición anteriormente indicada es susceptible de modificaciones de detalle en cuanto no alteren sus principios fundamentales. También se hace constar que el invento corresponde a una
20. prioridad de patente presentada en Francia con fecha 24 de febrero de 1961, núm. PV 853.794, acogiéndose, por lo tanto, a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales, en vigor, y siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo
25. que se solicita Patente de invención en España por veinte años de; "PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE UN NUEVO ANTIBIOTICO"; caracterizándose por lo siguiente:

- 1ª.- Procedimiento de preparación de un nuevo antibiótico, designado por la referencia 9671 R.P.
30. caracterizado porque comprende la inoculación de un

274932 - 26 -

274932



5. medio nutritivo acuoso que contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales minerales con un cultivo del organismo designado por Streptomyces actuosus o una de sus mutaciones productoras del antibiótico, la fermentación aeróbica de este medio hasta la producción de una actividad antibiótica conveniente y el aislamiento del antibiótico a partir del medio de fermentación.

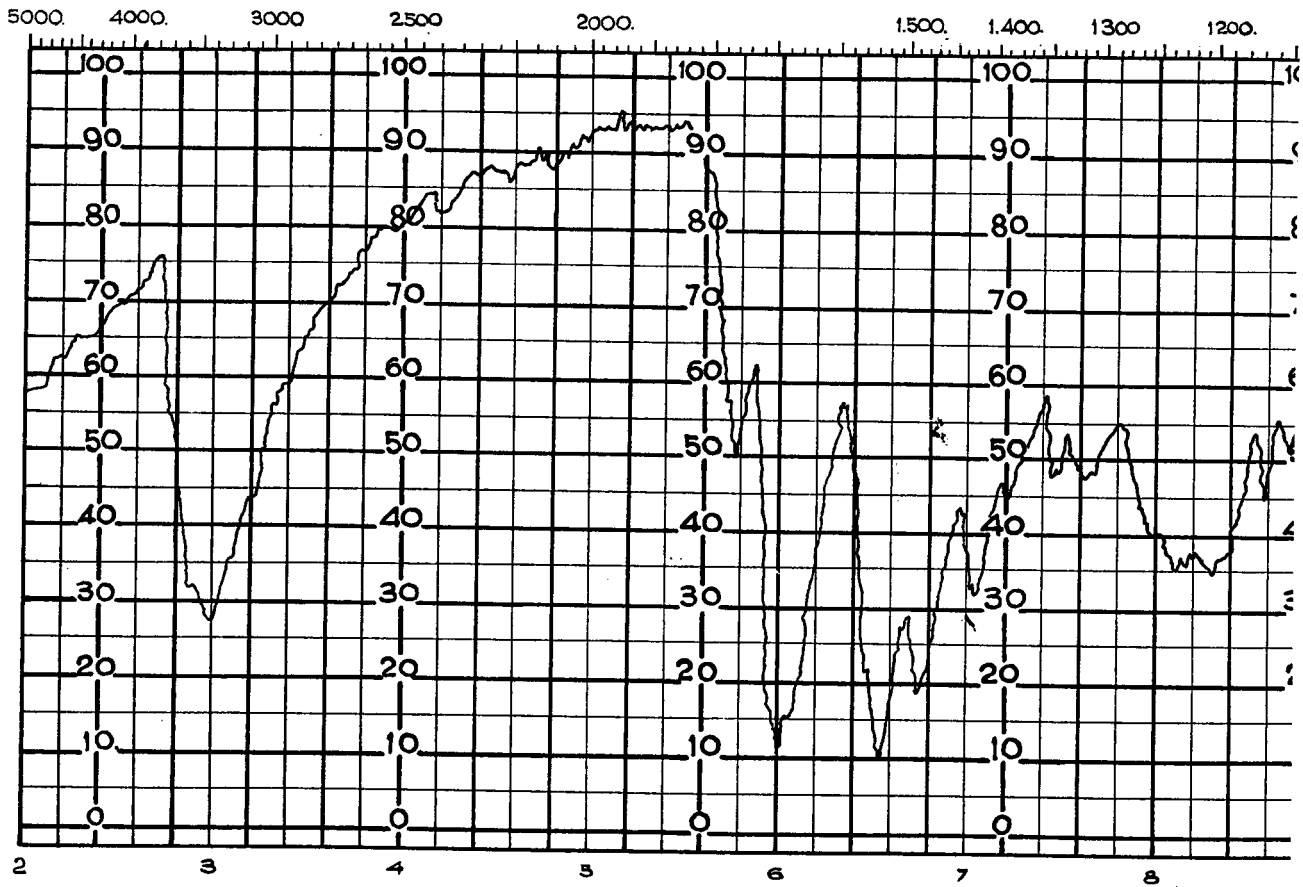
10. 2ª.- Procedimiento de preparación de un nuevo antibiótico, tal y como queda substancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta memoria consta de veintiseis hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

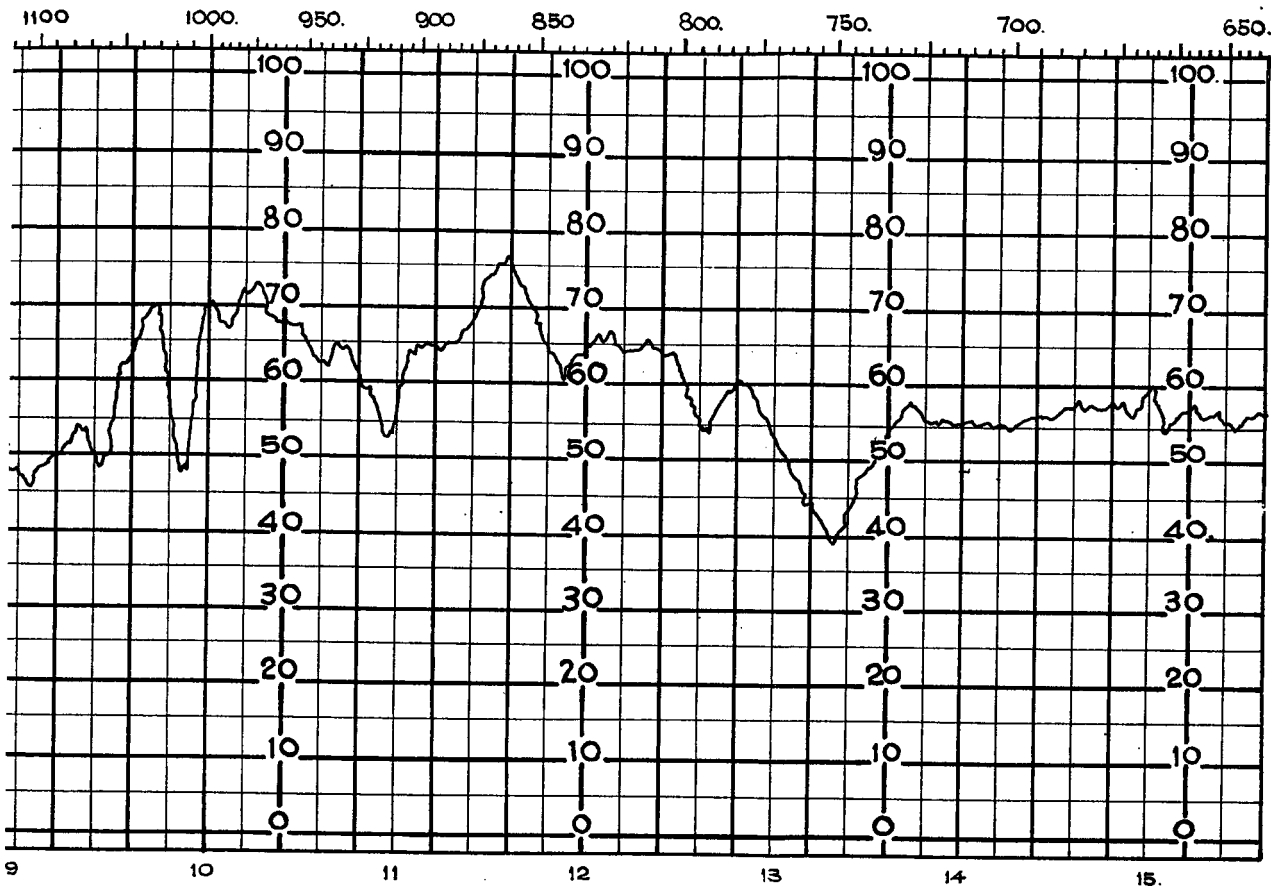
RHONE-POULENC S.A.,

J. GÓMEZ ACEDO Y MODER





274932



MADRID DE 1962
RHONE-POULENC, S.A.

