

PATENTE DE INVENCION

SO. 2050/2133.



278055

Memoria Descriptiva

sobre:

"Procedimiento de preparación de un nuevo
antibiótico".

Solicitante:

RHONE-POULENC S.A., entidad francesa, residente
en: 2, rue Jean Goujon, PARIS, Francia.

5.

La presente invención tiene por objeto
un nuevo antibiótico, designado en adelante por
el número 11.072 R.P., particularmente activo
sobre las micobacterias y algunos otros gérmenes
grampositivos. Este antibiótico presenta un in-



278055

- terés muy especial en el sentido de que posee la misma actividad sobre micobacterias resistentes a otros antibióticos, tales como la estreptomina, neomicina, kanamicina, que sobre micobacterias sensibles a estos antibióticos. Este nuevo antibiótico se produce por cultivo en condiciones artificiales de microorganismos identificados más completamente líneas adelante y pertenecientes al género streptomyces.
- 5.
10. El 11.072 R.P. cristalizado es soluble en metanol, etanol, acetona, cloroformo cloruro de metileno, acetato de etilo, dioxano, piridina, dimetilformamida y éter, es escasamente soluble en agua y óxido de isopropilo e insoluble en éter de petróleo. El antibiótico 11.072 R.P. se distingue pues por una fuerte solubilidad en numerosos disolventes orgánicos. En particular, el coeficiente de repartición del 11.072 R.P. entre los disolventes orgánicos no mezclables con agua, butanol, acetato de etilo y dicloroetano y el filtrado de cultivo (gase acuosa) es siempre superior a 20.
- 15.
- 20.
25. El 11.072 R.P. da ensayos negativos en las siguientes reacciones: reacción del biuret, reacción de Sakaguchi, reacción a la ninhidrina, reacción de Molisch, reacción de Tollens, reacción de Ehrlich, reacción a la dinitro-2,4-fenilhidrazina. Da ensayos positivos en las siguientes reacciones: reacción a la ninhidrina después de hidrólisis ácida, reacción al per-
- 30.



278055

manganato de potasio, reacción al licor de Fehling, reacción de Salivanoff y reacción de Dische. Estos ensayos demuestran que el 11.072 R.P. contiene amino-ácidos y agrupaciones osídicas, pero no ciclo aromático. Se han determinado por cromatografía sobre papel los amino-ácidos presentes en la molécula del 11.072 R.P.; después de haberlo hidrolizado durante 24 horas en ácido clorhídrico 6N: se han identificado así particularmente la glicina, la prolina, la leucina y la isoleucina.

5.

10.

El antibiótico 11.072 R.P. contiene carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Su composición elemental es la siguiente: 61,85 a 61,90% de C; 8,9 a 8,95% de H; 16,7 a 17,0% de O y 12,25 a 12,35% de N.

15.

Se caracteriza por las siguientes propiedades físicas:

Aspecto	Polvo microcristalino blanco
Punto de fusión	222-223°
20. Poder rotatorio	(Alfa) _D ²⁰ = -100° ± 5° (c = 1, metanol)

Análisis funcional:

25. - O - CH ₃	1,25%
- CO - CH ₃	5,10%
- C - CH ₃	24,45%
- N - CH ₃	13,30%

25.

Espectro ultravioleta (determinación a partir de soluciones de 10 µg/cm³ y 100 µg/cm³ en metanol):

30.

= escasa absorción a bajas longitudes de onda

1-7 J



278055

- sin máxima absorción entre 200 y 400 μ m

Espectro infrarrojo (determinación a partir de comprimidos en mezcla con BrK).

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

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

T A B L A - I.

	3330	F	1178	F
15.	2975	F	1141	m
	2905	d	1126	m
	1782	F	1102	m
	1666	mF	1079	F
	1640	mF	1051	d
20.	1620	mF	1022	m
	1535	F	926	m
	1472	m	891	md
	1449	F	876	md
	1414	m	862	d
25.	1388	m	843	m
	1371	m	828	m
	1350	m	782	d mF = muy fuerte
	1302	F	760	d F = fuerte
	1283	m	724	d m = media
30.	1270	m	711	m d = débil



278055

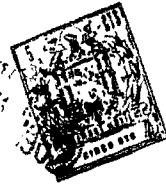
1238 d

663 m md = muy débil

1197 t

t = tope

5.
10.
El 11.072 R.P. puede identificarse según la cromatografía sobre papel. El antibiótico ha sido cromatografiado sobre papel Arches, No. 302 revelando en sentido descendente por medio de diferentes disolvente o mezclas de disolventes: los cromatogramas han sido revelados por bicautografía sobre placas de gelosa nutritiva sembradas por Mycobacterium 607 y Sarcina lutea. Los Rf obtenidos se indican en la Tabla II.



T A B L A - II 70055

Disolvente de revelado	Rf obtenidos
Fase ligera de la mezcla benceno + n butanol + agua (75 : 25 : 25 en volúmenes)	1,0
Fase ligera de la mezcla benceno + n butanol + agua (25 : 75 : 25 en volúmenes)	1,0
Fase ligera de la mezcla benceno + acetato de etilo + agua (95 : 5 : 25 en volúmenes)	0,20
Idem, ídem (87 : 13 : 25 en volúmenes)	0,45
Idem, ídem (85 : 15 : 25 en volúmenes)	0,60
Fase ligera de la mezcla benceno + cloroformo + agua (80 : 20 : 25 en volúmenes)	0,20
Idem, ídem (75 : 25 : 25 en volúmenes)	0,30
Idem, ídem (65 : 25 : 25 en volúmenes)	0,40
Idem, ídem (25 : 75 : 25 en volúmenes)	1,0
Agua destilada	0,60
n Propanol + agua (5 : 95 en volúmenes)	0,70
" (15: 85 en volúmenes)	0,80
" (25: 75 en volúmenes)	0,90
" (75: 25 en volúmenes)	1,0

Estas cromatografías muestran que el 11.072 R.P. contiene una sola sustancia activa.



27055
La actividad bacteriostática del 11.072

R.P. frente a cierto número de gérmenes ha sido determinada por uno de los métodos de dilución corrientemente empleados a tal efecto. Para cada germen se ha determinado la más pequeña concentración de sustancia que impide todo desarrollo visible en un caldo nutritivo apropiado. Los resultados de las diversas determinaciones están agrupados en la siguiente tabla, en la que se expresan las concentraciones bacteriostáticas mínimas en microgramos de sustancia por cm³ de medio de ensayo.

7 JUN 1952



- 8 -

278655

T A B L A - III - Espectro antibiótico

Razas bacterianas ensayadas	Concentraciones bacteriostáticas en $\mu\text{g}/\text{cm}^3$
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , var. hominis, raza H37 Rv	1 - 5
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , raza Vy (raza bovina)	0,5 - 1
<i>Mycobacterium species</i> - ATCC 607	0,25 - 0,50
<i>Corynebacterium pseudodiphthericum</i> (Facultad de Farmacia de París)	0,02
<i>Neisseria catarrhalis</i> (Facultad de Farmacia de París)	0,26
<i>Sarcina lutea</i> - ATCC 9341 -	0,36
<i>Micrococcus citreus</i> - ATCC 8411	6,9
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> - ATCC 4698	0,46
<i>Staphylococcus aureus</i> , raza 209P - ATCC 6538 P	250
<i>Streptococcus faecalis</i> - ATCC 9790	250
<i>Streptococcus viridans</i> (Instituto Pasteur de París)	250
<i>Streptococcus pyogenes hemolyticus</i> (Raza Dig 7 Instituto Pasteur de París)	250
<i>Mycobacterium pneumoniae</i>	250

<i>Staphylococcus pyogenes nemolyticus</i> (Raza Dig 7 Instituto Pasteur de París)	250
<i>Diplococcus pneumoniae</i> (Raza T11 - Instituto Pasteur de París)	250
<i>Bacillus subtilis</i> - ATCC 6633	250
<i>Bacillus megatherium</i> - NRRL-B-938	250
<i>Bacillus cereus</i> - ATCC 6630	250
<i>Bacillus brevis</i> - ATCC 8185	250
<i>Escherichia coli</i> - ATCC 9637	250
<i>Aerobacter aerogenes</i> - ATCC 8308	250
<i>Alcaligenes faecalis</i> - ATCC 8749	250
<i>Proteus vulgaris</i> (Facultad de Farmacia de París)	250
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - ATCC 10 031	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Raza Bass Instituto Pasteur de París)	250

Estas diferentes determinaciones muestran que la actividad del 11.072 R.P. se ejerce principalmente sobre las micobacterias, comprendidas las razas virulentas. Además, actúa tanto sobre las razas resistentes a otros antibióticos como sobre las razas no resistentes, como lo muestra la Tabla IV:

8 P₁₀



273055

T A B L A-IV: Acción sobre micobacterias resistentes a otros
antibióticos

Razas bacterianas	Concentraciones bacteriostáticas en $\mu\text{g}/\text{cm}^3$
Mycobacterium tuberculosis, raza Vy	0,5 - 1
Mycobacterium tuberculosis, raza Vy (resistente a la estreptomina)	1 - 5
Mycobacterium tuberculosis, raza Vy (resistente a la neomicina)	1 - 5
Mycobacterium tuberculosis, raza Vy (resistente a la viomicina)	1 - 5
Mycobacterium tuberculosis, raza Vy (resistente a la kanamicina)	1 - 5

Finalmente, el 11,072 R.P. se ha mostrado igualmente activo sobre numerosas razas aisladas a partir de productos patológicos de enfermos, como lo muestra la Tabla V.

7 JUN.



278055

T A B L A - V: Acción sobre ramas de Mycobacterium tuberculosis

aisladas de productos patológicos

Razas bacterianas (eventualmente designadas por un número clave correspondiente al enfermo sobre el que ha si- do aislada)	Concentraciones bacteriostáticas en $\mu\text{g/cm}^3$
H 37 Rv	0,8 - 1
Arl.	1 - 2
Ve.	0,8 - 1
Pa.	0,8 - 1
Bat.	0,4 - 0,6
Bar. (raza resistente a la isoniazida)	1 - 2
Er. (raza resistente a la isoniazida)	1 - 2
B V (raza polirresistente)	1 - 2
Sav. (raza polirresistente)	2 - 4
Bid. (raza bovina)	2 - 4

278055



- La actividad antibiótica in vitro del 11.072 R.P. sobre micobacterias ha sido confirmada in vivo sobre animales de laboratorio infectados experimentalmente por microorganismos tales como el bacilo tuberculoso (razas virulentas Vy y Br). Se ha mostrado en particular muy activo en el ratón por vía subcutánea y oral; además, se ha mostrado igualmente activo por vía oral sobre la tuberculosis del conejillo de Indias.
- 50
10. El antibiótico 11.072 R.P. puede obtenerse por cultivo aeróbico de ciertos Streptomyces, en particular del "S. caelicus" [depositado en el Northern Regional Research Laboratory de Peoria (Illinois), Estados Unidos, bajo la referencia NRRL 2957] y el "S. griseus 20.129" [depositado bajo la referencia NRRL 2986].
- 150
20. El S. caelicus ha sido aislado de un fragmento de tierra tomada cerca de Madrás, en la India. El método de aislamiento es el siguiente: la toma de tierra se pone en suspensión en agua destilada estéril y luego se diluye la suspensión en diferentes concentraciones; se extiende un pequeño volumen de cada dilución sobre la superficie de cajas de Petri conteniendo medio nutritivo de Emerson o cualquier otro apropiado.
- 250
30. Después de una incubación de algunos días a 26°, se trasplantan las colonias de microorganismos que se desean aislar a gelosas inclinadas a fin de obtener cultivos más abundantes.
- En la clasificación del "Bergey's Manual



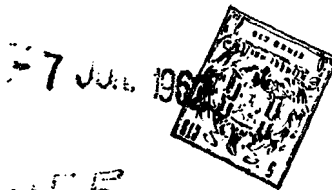
27055

of Determinative Bacteriology" séptima edición (1957) para el género streptomyces no se halla ninguna descripción de especie cuyos caracteres de cultivo y propiedades bioquímicas coincidan con los de este Streptomyces. Es por ello que este organismo puede considerarse como nueva especie a la que se le ha atribuido el nombre de "Streptomyces caelicus" en razón al color de su aparato aéreo esporulento y a su capacidad de formar un pigmento azul sobre cierto número de medios de cultivo.

Seguidamente se definen los caracteres de esta nueva especie.

El Streptomyces caelicus forma esporas de forma oval a cilíndrica de extremos muy redondeados, que miden 0,6 - 0,8 por 0,9 - 1,2 μ , sostenidas sobre largos filamentos esporíferos enrollados en espirales apretadas de forma alargada, conteniendo fácilmente hasta 10 a 15 vueltas. Los esporóforos así constituidos están insertados en hifas aéreas de 0,3 a 0,5 μ de diámetro; su inserción es monópoda. Este modo de esporulación sitúa al S. caelicus en la sección "Spira" de la clasificación de los Streptomyces de Pridham [Applied Microbiology, 6, 52-79, (1958)]; se ha observado y hallado idéntico en los medios de cultivo siguientes, recomendados a este fin por Pridham: gelosa sintética de Czapek, gelosa de Hickey y Tresner, gelosa de extracto de tomate y de harina de avena, gelosa de almidón y sales minerales y gelosa de Bennett.

278055



- El *Streptomyces caelicus* tiene como caracteres particulares, por una parte, el presentar un aparato aéreo esporulento de color azul y, por otra parte, el formar abundantemente un pigmento azul de intensidad sostenida en cierto número de medios de cultivo, en particular ciertos medios sintéticos en los que puede apreciarse particularmente. Con gran frecuencia este pigmento empieza a elaborarse desde los primeros días de cultivo, dando a estos medios un tinte azul vivo, luego su producción es tan abundante que su acumulación da con gran rapidez a la gelosa un tinte azul-negro extremadamente acentuado. En ciertos medios orgánicos, este pigmento azul es más o menos enmascarado por un pigmento negro elaborado independientemente.
- 5.
- 10.
- 15.

- Se puede diferenciar el *Streptomyces caelicus* de todas las especies de *Streptomyces* productoras de pigmento azul, descritas hasta ahora, por las siguientes razones:
- 20.

- A. El *S. caelicus* produce un pigmento cuya coloración es susceptible de variación según el grado de acidez o de alcalinidad del medio y cambia a rojo en medio ácido, como lo hace el pigmento que produce el *Streptomyces caelicolor*. Si se consideran las especies descritas en la clasificación de Bergey (séptima edición), es la especie *S. caelicolor* (*S. violaceoruber* de Wakeman y Curtis) la que más se aproxima a causa de esta producción de pigmento.
- 25.
- 30.



Difiere sin embargo ²²⁹⁸⁵⁵ esencialmente de esta especie por los siguientes detalles:

5. a) La coloración del aparato aéreo esporulado del *S. caelicus* es de un azul claro ligeramente verdoso, en tanto que es gris para el *S. coelicolor* (*S. violaceoruber*); la comparación de cultivos de las dos especies efectuada simultáneamente, no deja ninguna duda respecto a la diferencia de coloración de los aparatos aéreos.
10. b) El *S. caelicus* forma filamentos esporíferos muy largos que se enrollan en espirales apretadas y alargadas formando fácilmente hasta 10 a 15 vueltas. El aspecto de los filamentos esporulados difiere del de los filamentos del *S. coelicolor* (*S. violaceoruber*) en que no forman más que espirales poco apretadas, con un número de vueltas mucho más limitado.
15. c) El *Sr. caelicus*, contrariamente al *S. coelicolor* (*S. violaceoruber*), es una raza cromógena, produciendo un pigmento negruzco, en particular sobre la gelosa de maltosa-triptona de Williams y McCoy.
20. B. Kutzner y Waksman (*J. of Bact.* 78 528-538, 1959) han trazado un cuadro de las especies de *Streptomyces* que produce un pigmento azul; entre ellas sólo se destacan dos especies con micelio aéreo azul: el *S. caeruleus* de Baldacci y el *S. cyaneus* de Krassilnikov. El *S. caeruleus*, al no tener filamentos esporíferos en forma de espirales, no entra en la misma sección de clasi-
- 25.
- 30.



272055
ficación que el *S. caelicus*. En cuanto al *S. cyaneus*, la naturaleza de su pigmento, cuyo color es insensible a las variaciones de pH del medio, es diferente a la del pigmento del *S. caelicus*.

5. Los caracteres de cultivo y las propiedades bioquímicas del *Streptomyces caelicus* han sido examinados sobre las gelosas nutritivas y caldos nutritivos habitualmente utilizados para examinar el aspecto de las razas de estreptomyces.
10. Las observaciones efectuadas se indican en el cuadro siguiente; salvo indicaciones precisadas, se refieren a cultivo de dos a tres semanas a 26°, llevados a un buen estado de desarrollo. La mayor parte de los medios de cultivo empleados
15. han sido preparados según las fórmulas indicadas en "The Actinomycetes", S.A., Wakeman, p. 193-197, Chronica Botanica Company, Waltham (Mass), Estados Unidos, 1950; en este caso, están indicados por la letra W, seguida del número que les ha
20. sido atribuido en "The Actinomycetes". Las otras referencias han sido indicadas al final de cuadro.

- Siguiendo el método de Pridham y Gottlieb (J. of Bact 56, 107 - 114, 1948), se observa que
25. el *Streptomyces caelicus* utiliza como fuente de carbono los elementos siguientes: xilosa, arabinosa, rhamnosa, levulosa, glucoosa, galactosa, mannosa, lactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, rafinosa, dextrina, almidón, glicerina,
30. adonita, mannita, inosita. No utiliza: la sorbosa,



278055

la eritrita, la dulcita y la sorbita.

5. Como fuente de nitrógeno, el *Streptomyces caelicus* utiliza los siguientes elementos: $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, adenosina, urea, asparagina, glicina, alanina, valina, ácido glutámico, arginina, lisina, treonina, fenilalanina, tirosina, prolina, histidina, NO_3Na , NO_2Na , sarcosina e hidroxiprolina. Son medianamente utilizados: la adenina, uracilo y acetamida. No son utilizadas: la metionina, creatina, creatinina y taurina.

10.

El "*Streptomyces griseus* 20.129" ha sido aislado de un fragmento de tierra tomado en Brasil. El método de aislamiento es el mismo que se ha indicado para el *S. Caelicus*.

278055



- 17 - A

Medio de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo o envés del cultivo	Apariencia
Gelosa de Bennett (ref.A)	Bueno	Envés negro	Bien gris lora en
Gelosa de maltosa-triptona (ref. B)	Muy bueno	Envés negro	Muy Exud vivo apan
Gelosa de Emerson (W-23)	Bastante bueno	Envés negro	Muy Blar
Gelosa al extracto de levadura Pridham (ref. C)	Muy bueno	Envés negro	Muy
Gelosa de glucosa-peptona (W-7)	Bueno	Envés negro azulado	Bier
Gelosa nutritiva (W5)	Mediano	Bien desarrollado Azul negro	Nulo
Gelosa de glucosa-asparagina (W2)	Bastante bueno	Envés violeta oscuro	Muy gris
Gelosa de glicerina-asparagina (W3)	Mediano	Desarrollo mediano Violeta muy oscuro	Nulo
Gelosa de malato de calcio de Krainsky (Ref: E)	Bueno	Envés azul oscuro	Bien
Gelosa de tirosina (Ref. F)	Mediano	Azul negro muy oscuro	Tras

A

17 B



micelio vegetativo o enmas del cultivo	Aparato aéreo (comprendiendo el conjunto del micelio aéreo y de la esporulación)	Pigmento soluble
avés negro	Bien desarrollado. Blanco-grisáceo a azul-verde-grisáceo claro. Exudación de algunas gotitas coloreadas en azul vivo, tiñendo el aparato aéreo en la zona en que aparecen.	Negro
avés negro	Muy bien desarrollado. Azul verde grisáceo claro. Exudación de algunas gotitas coloreadas en azul vivo, tiñendo el aparato aéreo en la zona en que aparecen.	Negro
avés negro	Muy moderadamente desarrollado. Blanquecino a azul vivo.	Negro
avés negro	Muy bien desarrollado. Azul verde grisáceo claro.	Negro
avés negro azulado	Bien desarrollado. Azul verde grisáceo claro.	Azul-oscuro
bien desarrollado Azul negro	Nulo	Azul-ligero verde
avés violeta oscuro	Muy moderadamente desarrollado. Rosa a azul verde grisáceo claro.	Violeta-oscuro
desarrollo mediano violeta muy oscuro	Nulo	Violeta-oscuro
avés azul oscuro	Bien desarrollado. Azul verde grisáceo claro	Azul

17 e



278055

Observaciones y productos bioquímicos

La raza es cromógena. Se ve un pigmento soluble negro abundante aparecer desde los primeros días de cultivo.

Solubilización del malato de calcio

Gelosa de tirosina (Ref. F)	Mediano	Azul negro muy oscuro	Tre
Cultivo sobre patata (W 27)	Bastante bueno		Muy de
Gelosa de almidón (W10)	Bastante bueno	Envés azul	De
Gelosa sintética de Ozapek de sacaresa	Bueno	Envés negro- azulado	Bl ci ti
Gelatina pura al 12% (Ref: D)	Bastante bueno	Cultivo su- perficial de envés azul- negro	De
Caldo sintético de Ozapek de sacarosa (W18)	Bastante bueno	Velo de en- vés amari- lento.	Bl

Ref. A - JONES K.L. - Journal of Bacteriology 57, 142, 1949

Ref. B - WILLIAMS A.M. y McCOY E. - Applied Microbiology - 1,
307 - 1953

Ref. C - PRIDHAM T.G. y Coll - Antibiotics Annual - 1956 -57,
p. 947

Ref. D - "Plain gelation" - preparado según las indicaciones
del "Manual Of methods Pure Culture Study of Bacteria"
de la Society of American Bacteriologists (II 50-18)

Ref. E - GRUNDY y Coll - Antibiotics and Chemoterapy 2, 401
(1952)

Ref. F - Peptona 0,5%; extracto de carne 0,3%; tironina 0,5%;
gelosa 2%.

17 D

en desarrollado. Azul verde grisáceo claro	Azul	Solub:
razas. Gris azul a azul franco	Azul-negro oscuro	Sin s
uy reducido. Limitado a la parte superior e la patata.	Pardo-negro con o sin adición de azul-negro	Micel gro ó larme negro
esarrollo moderado. Grisáceo a azul franco.	Azul vivo de intensidad sostenida	La hi
ien desarrollado: Azul gris a azul franco. Exudación de algunas gotitas coloreadas en azul vivo, inflando el aparato aéreo en la zona en que aparecen.	Azul-negro	
esarrollo moderado. Azul grisáceo claro.	Azul negro a pardo violáceo oscuro, desarrollándose a partir de la superficie	Lícu
lanquecino a azul claro	Violáceo	Prodi posi: bast:

ización del malato de calcio

utilización visible de la tirosina

vegetativo pardo negruzco y pigmento soluble pardo-negro desde el comienzo de los cultivos. Luego, más o menos regularmente y más o menos tardíamente, aparición de pigmento azul que colorea el micelio vegetativo y se difunde en la patata

ólisis del almidón es débil y lenta.

lón total bastante rápida

ción de nitrito a partir de los nitratos: escasamente negativa al comienzo del cultivo, tornándose negativa con bastante rapidez.

- 17 - F

278055



278455

5. El estudio de esta nueva raza ha mostrado que presenta caracteres morfológicos que la relacionan con la especie *Streptomyces griseus* de Waksman y Henrici, tal como ha sido definida en el "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", séptima edición, 1957: sólo difiere en efecto de ésta última en algunos detalles que permiten distinguirla solamente como una variedad particular.

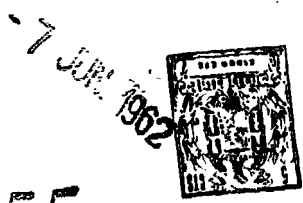
10. El *Streptomyces griseus* 20.129 forma sobre el conjunto de sus medios de cultivo un micelio vegetativo gris amarillento que se tinte a menudo de gris verdoso o incluso pardo gris verdoso, en particular en medios orgánicos. Su aparato aéreo, abundante y de aspecto pulverulento, es gris amarillo muy claro tornándose a menudo verdoso. Produce esporas esféricas a ovales que miden de 0,7 a 1,0 μ por 0,8 a 1,3 μ ; estas esporas van sostenidas sobre filamentos rectos o ligeramente sinuosos, no enrollándose nunca en espiral.

20. Los detalles que le diferencian de la especie *Streptomyces griseus* descrita en el "Bergey's Manual", son los siguientes:

25. - Producción de pigmentos gris verdoso a pardo verdoso que colora más o menos la totalidad o solamente ciertas partes del micelio vegetativo de los cultivos sobre gelosa glucosada y leche desnatada.

30. - El cultivo sobre patatas da lugar a la formación de un tinte pardo grisáceo, o incluso

278055



pardo negruzco, a pardo olive, que colorea la patata;

- Finalmente, en contra de la raza descrita por Waksman y Henrici, el *Streptomyces griseus* 20.129 no reduce los nitratos a nitritos.

5. Siguiendo el método de Pridham y Gottlieb (J. of Bact. 56 107-114, 1948), se ha establecido que el *Streptomyces griseus* 20.129 utiliza como fuente de carbono los siguientes elementos: xilosa, arabinosa, glucosa, galactosa, levulosa, mannososa, 10. maltosa, trehalosa, celobiosa, dextrina, almidón, glicógeno, glicerina, adonita y mannita. No se utilizan: la rhamnosa, fucosa, sorbosa, sacarosa, rafinosa, inulina, eritrita, dulcita, sorbita y la inosita. La lactosa es medianamente 15. utilizada, provocando solamente un crecimiento lento e incompleto del *Streptomyces*.

Como fuente de nitrógeno, el *Streptomyces griseus* 20.129 utiliza los siguientes elementos: $SO_4(NH_4)_2$, adenina, adenosina, urea, asparagina, 20. glicina, alanina, valina, ácido glutámico, arginina, lisina, treonina, metionina, fenilalanina, tirosina, prolina e histidina. No se utilizan: NO_3Na , NO_2Na , uracilo, acetamida, creatina, creatinina, taurina, sarcosina e hidroxiprolina.

25. El procedimiento de preparación del antibiótico 11.072 R.P. consiste esencialmente en cultivar *Streptomyces caelicus* e *S. griseus* 20.129 y sus mutaciones productoras en un medio y en condiciones apropiadas y en separar seguidamente 30. el antibiótico formado en el curso del cultivo.



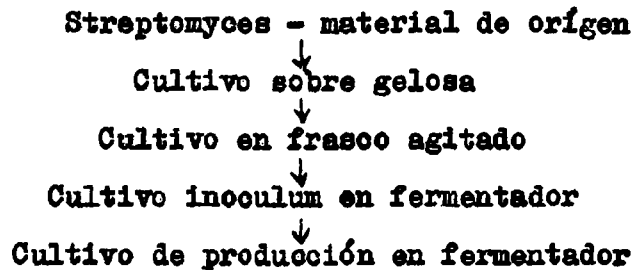
278055

El cultivo puede efectuarse por cualquier método de cultivo aeróbico, superficial o en profundidad, pero éste último es preferible por razones de comodidad. Se utilizan a este fin los diferentes tipos de aparatos que son ahora de un uso corriente en la industria de las fermentaciones.

5.

Se puede en particular adoptar la marcha siguiente para la conducción de las operaciones:

10.



15.

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

20.

25.

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

30.

7 JUN 1964



278655

estas diferentes fuentes hidrocarbonadas o unirse a ellas.

5. Las fuentes adecuadas de nitrógeno asimilable son extremadamente variadas. Pueden ser sustancias químicas muy simples como los nitratos, las sales minerales y orgánicas de amonio, la urea y los ácidos aminados. Pueden ser aportadas también por sustancias complejas que contengan principalmente nitrógeno en forma proteídica: caseína, 10. lactalbúmina, gluten y sus hidrolizados, harinas de soja, de cacahuete, de pescado, extractos de carne de levadura, "Distillers' solubles", "corn-steep", etc.

15. Entre los elementos minerales añadidos, algunos pueden tener un efecto amortiguador o neutralizante, como los fosfatos alcalinos y alcalino-térreos o los carbonatos de calcio y de magnesio.

20. Otros aportan el equilibrio iónico necesario al desarrollo del Streptomyces y a la elaboración del antibiótico, como los cloruros y sulfatos de metales alcalinos y alcalino-térreos. Finalmente, algunos actúan más especialmente como activadores de las reacciones metabólicas del 25. Streptomyces: tales como las sales de cinc, de cobalto, de hierro, de cobre y de manganeso.

30. El pH del medio de fermentación al comienzo del cultivo debe estar comprendido entre 6,0 y 7,8, preferentemente 6,5 a 7. La temperatura óptima para la fermentación es de 25-27°, pero se



273055

5. obtiene una producción satisfactoria con temperaturas comprendidas entre 23 y 35°. La aeración de la fermentación puede variar entre valores bastante grandes. Se ha observado sin embargo que unas aereaciones de 0,3 a 2 litros de aire por litro de caldo y por minuto son particularmente convenientes. El rendimiento máximo en antibiótico se obtiene después de 2 a 5 días de cultivo, dependiendo este tiempo esencialmente del medio utilizado.

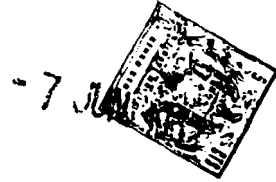
10. Según lo que antecede, se comprende que las condiciones generales del cultivo del *Streptomyces* para la producción del antibiótico 11.072 R.P. pueden variar en gran medida y adaptarse a cada necesidad particular.

15. El antibiótico 11.072 R.P. puede aislarse a partir de mostos de fermentación por los siguientes métodos: primeramente se filtra el mosto de fermentación a un pH comprendido entre 2 y 9 en presencia de un coadyuvante de filtración, siendo entonces prácticamente independiente del pH la actividad dosificada en el filtrado; para facilitar más los tratamientos ulteriores, se prefiere sin embargo filtrar en general el cultivo en una zona de pH comprendida entre 4 y 6.

20. Seguidamente puede extraerse el antibiótico del filtrado mediante un disolvente no mezclable con agua del grupo de los alcoholes alifáticos en C₄, C₅, tales como el

25.

30.



278055

- alcohol n-butílico o una mezcla de alcoholes amílicos, alcoholes aromáticos tales como el alcohol bencílico, cetonas tales como la metilisobutilcetona, ésteres tales como el acetato de etilo o de amilo, disolventes clorados tales como el cloroformo o el dicloreto. Esta extracción puede realizarse igualmente a un pH comprendido entre 2 y 9, pero se prefiere sin embargo en general operar a un pH comprendido entre 2 y 6, a fin de obtener condiciones que se presten mejor a la realización industrial. La solución orgánica que contiene el antibiótico ll.072 R.P. es seguidamente concentrada en un escaso volumen. Por adición de un mal disolvente del ll.072 R.P., tal como el exano o el óxido de isorpropilo, el antibiótico bruto precipita entonces parcial o totalmente, según la concentración efectuada y los disolventes utilizados.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.
- En el caso en que la precipitación del antibiótico bruto no sea total, se tratan las aguas madres de precipitación mediante paso sobre una columna de alúmina de tal forma que haya aproximadamente 1 kg de alúmina por litro de solución, cuya relación es preferible pero no indispensable. Después del lavado de la columna con un mal disolvente tal como el exano o el óxido de isorpropilo, se somete a elución el antibiótico que ha permanecido fijo sobre la columna, por uno de sus buenos disolventes antes mencionados, tales como el metanol, etanol, cloroformo, acetato de



278055

- etilo, etc. La solución orgánica que contiene el antibiótico es entonces concentrada en un pequeño volumen, lo que provoca, después de la adición eventual de un mal disolvente tal como el óxido de isopropilo,
5. la precipitación del resto del antibiótico bruto buscado.
- El antibiótico bruto obtenido en las operaciones precedentes no es siempre directamente cristalizable. Con frecuencia es conveniente someterlo previamente a una purificación, que, en ciertas condiciones, puede conducir directamente al antibiótico puro cristalizado. La purificación puede efectuarse según los métodos clásicos en uso, y en particular por cromatografía sobre diversos agentes absorbentes, o distribución a contra-corriente. Es particularmente ventajoso efectuar una cromatografía sobre alúmina en cloroformo. El antibiótico purificado puede ser cristalizado o re-cristalizado por disolución en un disolvente,
10. preferentemente el cloroformo, con ligero calentamiento y luego refrigeración para provocar la cristalización, o bien por disolución de una gran cantidad de un mal disolvente, con preferencia el óxido de isopropilo, y cristalización lenta a
15. temperatura ambiente. Es comprensible que los diferentes métodos indicados anteriormente pueden aplicarse sucesivamente en un orden variado o repetidos varias veces, según las exigencias de la fabricación, para obtener el 11.072 R.P. en
20. forma conveniente a las aplicaciones consideradas.
- 25.
- 30.

278055

7 JUN. 1962



Los siguientes ejemplos, dados a título no limitativo, muestran cómo puede ponerse en práctica la invención. En lo que sigue, la actividad es en todos los casos determinada por un método por difusión con el Mycobacterium sp. ATCC 607 como germen sensible, respecto a una muestra de producto puro y cristalizado como patrón. Esta actividad es pues expresada 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.

Ejemplo - 1.

Se carga en un fermentador de 170 litros, 2,400 kg de "corn steep" (50% de extracto seco) 3,600 kg de sacarosa, 0,900 kg de carbonato de calcio, 0,240 kg de sulfato amónico y, hasta completar los 100 litros, agua.

Este medio de cultivo tiene un pH de 6 aproximadamente. Se esteriliza por chapoteo de vapor a 122° durante 40 minutos. Después de su esterilización y refrigeración a 27° , el volumen final del caldo es de 120 litros y el pH de 6,85. El medio es entonces sembrado con 200 cm^3 de un cultivo en erlenmeyer agitado, de la raza "Streptomyces coelicus".

El cultivo en fermentador es aireado con aire estéril suministrado a 5 m^3/hora y agitado por una turbina que gira a 350 rpm. La temperatura se mantiene a $26-27^\circ$. El pH del medio permanece sensiblemente en su valor inicial durante todo

20335



el cultivo. El desarrollo del hongo comienza hacia la vigésima hora. Es conveniente para la siembra del cultivo productor 48 horas después de la siembra.

5. El cultivo productor se efectúa en fermentador de 800 litros cargado con las siguientes sustancias: 16 kg de harina de soja, 2 kg de Distillers' soluble, 6 kg de almidón de maíz, 6 kg de aceite de soja, 4 kg de cloruro de sodio y, hasta completar los 350 litros, agua.
10. El pH medio así obtenido se ajusta a 7,6 con 400 cm³ de sosa concentrada. Se esteriliza el medio por chapoteo de vapor a 122° durante 40 minutos. Después de la esterilización, se enfría a 26-27°. El volumen de caldo es de 400
15. litros y el pH de 6,5 aproximadamente. Entonces se siembra el medio con 40 litros del cultivo precedente en fermentador de 170 litros. Se agita el medio por una turbina que gire a 205 rpm, se airea con 15 m³/hora de aire estéril y se
20. mantiene a 26-27°.
- El pH desciende lentamente de 6,5 a 5,95 durante 24 horas, volviendo a subir luego para alcanzar 8,35 después de 90 horas de cultivo. La producción del antibiótico comienza hacia
25. la cuadragésima hora. Se interrumpe la fermentación después de 90 horas. La cantidad de antibiótico presente entonces en el medio es de 410 μ g/cm³.

7 JUN



Ejemplo - 2.

- Se colocan en un depósito provisto de un dispositivo de agitación, 170 litros de mosto de fermentación obtenido en el Ejemplo 1 (título 410 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$). Se agita el mosto durante una hora ajustando el pH a 5 por medio de ácido clorhídrico 5 N, añadiéndose luego 10 kg de coadyuvante de filtración. Se filtra la mezcla en un filtro-prensa y se lava la masa del filtrado con 70 litros de agua. El filtrado, que representa 205 litros, se ajusta a un pH de 3 por medio de ácido clorhídrico 5 N y se extrae sucesivamente con 60 y luego 40 litros de acetato de etilo. Los extractos orgánicos son reunidos y concentrados a presión reducida hasta 1 litro. El concentrado recibe la adición de 10 litros de exano y el precipitado así obtenido se orea, lava y seca; se obtiene así 86 g de producto bruto de una actividad de 488 $\mu\text{g}/\text{mg}$.
- Las aguas madres precedentes atraviesan una columna de alúmina, lavándose luego ésta con exano; el producto fijado sobre la columna se somete entonces a elución mediante metanol. La solución metanólica obtenida se concentra a presión reducida y se obtiene entonces un segundo chorro de producto bruto que pesa 9 g y tiene una actividad de 415 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

7 JUN 1962
27855

Ejemplo - 3.

5. Se disuelven 50 g de producto bruto aislado en el Ejemplo 2 (título 488 $\mu\text{g}/\text{mg}$) en 500 cm^3 de cloroformo. Se filtra la solución obtenida y luego se envía sobre una columna que contiene 1 kg de alúmina. Seguidamente se somete a elución el antibiótico con 2,5 litros de cloroformo, quedando así fijadas las impurezas sobre la alúmina. La solución clorofórmica obtenida es concentrada en seco al vacío. Se obtienen así 29,5 g de producto purificado, con una actividad de 781 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

10. Se disuelven 25 g de este producto en 1,25 litros de óxido de isopropilo a la temperatura ambiente y se agita la solución obtenida durante 15 minutos con 5 g de negro absorbente. Se filtra y se deja cristalizar durante tres días a la temperatura ambiente. Después del oreo, lavado y secado, se obtienen 15,8 g de producto puro de una actividad de 1000 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

Ejemplo - 4.

15. Se colocan en un depósito provisto de un dispositivo de agitación 1000 litros de mosto de fermentación, obtenido en varias operaciones según el método descrito en el ejemplo 1, con una actividad de 390 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ y un pH de 7,8. Este mosto se ajusta a un pH de 5 mediante ácido clorhídrico y se agita durante 30 minutos con 45 kg de coadyuvante de filtración. Se filtra la mezcla en filtro-prensa y se lava la masa del



278055

filtrado con 200 litros de agua. El filtrado, que representa 1040 litros, se extrae con 400 litros de dicloreto de carbono después de un ajuste a un pH de 3 por medio de ácido clorhídrico. Seguidamente

5. se concentra el extracto a presión reducida hasta 2 litros. Entonces se le añaden al concentrado 8 litros de óxido de isopropilo y el precipitado obtenido se filtra, lava y seca: se obtienen así 154 g de producto bruto, con una actividad de
10. 456 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

Al licor madre de precipitación se le hace atravesar una columna que contiene 8 kg de alúmina. Se lava la columna con 4 litros de éter y luego se efectúa la elución del producto

15. fijado sobre la columna mediante 30 litros de cloroformo. La solución cloroformica así obtenida es concentrada a 500 cm³ a presión reducida. Se enfría el concentrado a + 5°, lo que provoca un comienzo de cristalización. Se añaden entonces 500 cm³ de óxido de isopropilo para acabar

20. la cristalización. Los cristales obtenidos son oreados, lavados y secados y se obtienen así 192 g de producto purificado, de una actividad de 960 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Después de una recristalización en

25. óxido de isopropilo como se describe al final del ejemplo 3, se obtienen 168 g de producto puro de una actividad de 1000 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

278055



Ejemplo - 5.

- Se disuelven en un litro de cloroformo 100 g del producto bruto del Ejemplo 4, de una actividad de 456 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Se envía la solución sobre una columna que contiene 1 kg de alúmina. Seguidamente se efectúa la elución del antibiótico con 2 litros de cloroformo. La solución cloroformica obtenida es concentrada a presión reducida hasta su cristalización. Entonces se filtran, lavan y secan los cristales y se obtienen 62 g. de producto puro de una actividad de 1000 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

Ejemplo - 6.

- Se cargan en un fermentador de 170 litros, 1,200 kg de peptona, 0,600 kg de extracto de carne, 1,200 kg de glucosa hidratada y, hasta completar los 100 litros, agua.

- El pH del medio así obtenido se ajusta a 6,95 con 110 cm^3 de sosa concentrada. Se esteriliza el medio por chapoteo de vapor a 122° , durante 40 minutos. Después de un enfriamiento a $26-27^\circ$, el volumen final del caldo es de 120 litros y el pH de 6,60. Entonces se siembra el medio con 200 cm^3 de un cultivo en erlenmeyer agitado, de la raza *Streptomyces griseus* 20.129. El cultivo en el fermentador es aireado con aire estéril suministrado a 5 m^3/hora y agitado por una turbina que gira a 250 rpm. La temperatura se regula a 26° .

- El pH del medio se mantiene entre 6,40

- 7 JUN



273055

5. y 6,60 durante las dieciseis primeras horas, aumentando luego hasta alcanzar 7,50 después de 24 horas de cultivo. El desarrollo del hongo comienza hacia la vigésima hora. Es conveniente para la siembra del cultivo productor 27 horas después de la siembra.

10. El cultivo productor se efectúa en fermentador de 800 litros cargado con las siguientes sustancias: 16 kg de harina de soja, 4 kg de Distillers' solubles, 6 kg de almidón, 6 kg de aceite de soja, 4 kg de carbonato cálcico, 2 kg de cloruro sódico, 8 g de cloruro de cobalto con 6 H₂O y, hasta completar los 370 litros, agua.

15. El pH del medio así obtenido es de 6,45. El medio es esterilizado por chapoteo de vapor a 122° durante 40 minutos. Después de una refrigeración a 26-27°, el volumen del caldo es de 400 litros y el pH de 6,55. Entonces se siembra el medio con 40 litros de cultivo precedente en fermentador de 170 litros. Se agita el medio mediante una turbina que gira a 220 rpm, se airea con 15 cm³/hora de aire estéril y se mantiene a 26-27°.

20. Se agita el medio mediante una turbina que gira a 220 rpm, se airea con 15 cm³/hora de aire estéril y se mantiene a 26-27°.

25. El pH asciende por niveles sucesivos hasta el valor de 8,55, con un primer nivel a 7 de 6 a 30 horas, un segundo nivel a 7,30 de 43 a 67 horas, y luego una subida regular hasta 8,40 de 78 a 115 horas; finalmente, el pH alcanza 8,55 después de 139 horas y se detiene entonces.

30.

278055



ces la fermentación. La producción del antibiótico comienza hacia la sexagesima séptima hora y alcanza su máximo a las 90 horas. La cantidad de antibiótico presente en el medio es entonces de

5. 26 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Entonces se tratan 380 litros del mosto de fermentación obtenido anteriormente como se describe en el ejemplo 2, obteniéndose así 6,8 g de producto bruto.

10. 4,8 g de este producto bruto son puestos en solución clorofórmica y purificados por cromatografía sobre alúmina como se describe en el ejemplo 3, obteniéndose entonces 4 g de producto purificado que, después de su cristalización en

15. óxido de isopropilo como se describe en este mismo ejemplo 3, proporcionan 3 g de antibiótico 11.072 R.P. puro cristalizado, de una actividad de 1000 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

N O T A

20. 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

25. constar que el invento se refiere a dos solicitudes de patente presentadas en Francia con fecha 8 de junio de 1961 y 24 de enero de 1962, números respectivos PV. 864.301 y PV 885.778, acci-

30. giéndose por lo tanto a los beneficios que conce-

- 7 JUN



270.55

den los Convenios Internacionales en vigor y siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita patente de invención por 20 años en España: "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UN NUEVO ANTIBIOTICO"; caracterizándose por lo siguiente:

5. 1ª.- Procedimiento de preparación de un nuevo antibiótico, designado con el nº 11.072 R.P. caracterizado por ser un producto cristalizado
10. blanco, que funde a 222-223^o y posee un poder rotatorio (alfa)_D²⁰ = -100^o ± 5^o (c = 1, metanol); es soluble en metanol, etanol, acetona, cloroformo, cloruro de metileno, acetato de etilo, dioxano,
15. piridina, dimetilformamida y éter; escasamente soluble en agua y óxido de isopropilo e insoluble en éter de petróleo, contiene carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno y tiene por composición elemental del 61,85 al 61,90% de C; del 8,9 al 8,95% de H; del 16,7 al 17,0% de O y del 12,25 al 12,35% de
20. H; su espectro ultravioleta no presenta ningún máximo de absorción entre 200 y 400 mμ ; estando dotado de una actividad muy interesante contra las micobacterias.

25. 2ª.- Procedimiento de preparación de un nuevo antibiótico, según lo especificado en la reivindicación 1ª, caracterizado por el cultivo aeróbico del "S. caelious" o "S. griseus 20.129" ó de sus mutaciones productoras, sobre un medio clásico conveniente y en las condiciones habituales para este género de cultivo, y separación del
- 30.



278.55

antibiótico formado en el curso del cultivo por aplicación de los métodos físico-químicos clásicos.

5. 3ª.- Procedimiento de preparación de un nuevo antibiótico; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria.

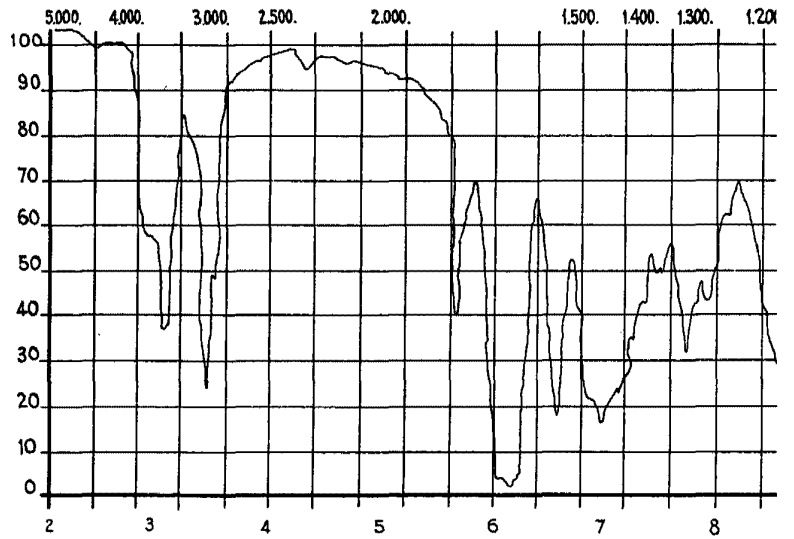
Esta memoria consta de treinta y cuatro hojas escritas a máquina por una sola cara.

- 7 JUN. 1962

Madrid,

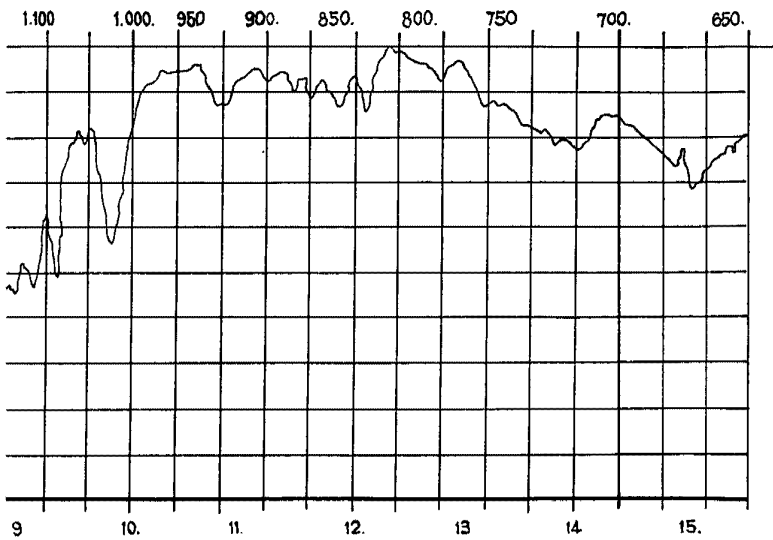
RHONE-POULENC S.A.,
J. GÓMEZ ACEBO Y MODEY

278055





278055



MADRID DE
RHONE-POULENC. S.A.

1962 JUN 1962

MEZACEBO Y MODET