

298011

PATENTE DE INVENCION

Case 5263/1+2/E

25 MAR 1951



Memoria Descriptiva

sobre:

"Procedimiento para la obtención de un nuevo antibiótico".

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

El objeto de la invención es un nuevo antibiótico soluble en agua que a continuación se denomina Ussamicina, y sus sales.

5. El antibiótico ussamicina se forma en el cultivo de una nueva cepa de *Streptomyces lavendulae*



298011

que se obtuvo por radiación de *Streptomyces lavendulae* 7K1 con luz ultravioleta y que se denomina *Streptomyces lavendulae* 7K1 Mutante UV-9. La nueva cepa se guarda bajo esta denominación en la Universidad

5. de Recife, Instituto de Antibióticos, Recife (Brasil).

La cepa *S. Lavendulae* 7K1 y su mutante UV-9 se diferencian morfológicamente: según la clasificación de Pridham et al. (1958) pertenece el *S. lavendulae* 7K1 a la sección *Rectus-flexibilis* (Cadena de esporas

10. recta, monopodialmente ramificado, diámetro 0,3

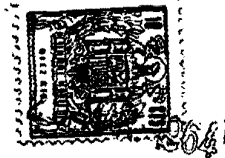
1,1 u), la mutante UV-9 sin embargo a la sección *Spira* (Cadena de esporas en espirales abiertas de 10 - 20 μ de longitud y 4 - 6 μ de diámetro). *S. lavendulae* 7K1 forma esporas redondas de 0,8 - 1,1 μ de diámetro,

15. la mutante UV-9 esporas ovaladas con un diámetro de 1,5 - 1,8 μ . La tabla I muestra una comparación de las características de crecimiento de *S. lavendulae* 7K1 y su mutante UV-9 sobre distintos medios de cultivo:

TABLA I

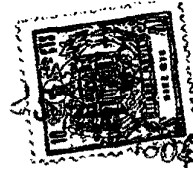
Medio de cultivo	UV-9	7K1
Almidón-Agar	Micelo de aire blanco, pigmento soluble, lacio-marrón	Micelo de aire de color rosa. Ningún pigmento soluble.
Glicerina-asparagina-agar	Micelo de aire blanco, que mas adelante se pone gris. Ningún pigmento soluble	Micelo de aire blanco que se tiñe rosa. Ningún pigmento soluble.

298011



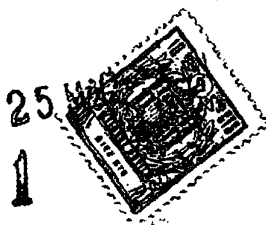
Medio de cultivo	UV-9	7K1
Glicerina-peptona-agar	Micelo de aire blanco es más adelante gris. Pigmento soluble.	Micelo de aire blanco. Ningún pigmento soluble.
Glicerina-amonio-agar	Crecimiento vegetativo de color crema. Falta el micelo de aire. Ningún pigmento soluble.	Micelo de aire blanco. Ningún pigmento soluble.
Gelatina-agar	Crecimiento vegetativo brillante incoloro que se profundiza en el centro. Falta el micelo de aire.	Crecimiento vegetativo brillante incoloro, sin profundizarse en el centro.
Glucosa-asparagina-agar	Crecimiento vegetativo incoloro. Escaso micelo de aire que se vuelve gris. Ningún pigmento	Micelo de aire blanco que se tiñe rosadamente. Ningún pigmento soluble.
Medio de cultivo para la formación de melanina.	Ninguna melanina. Pigmento soluble que se vuelve marrón.	Formación de melanina.
Glucosa-agar	Crecimiento vegetativo de color crema. Ningún pigmento soluble	Micelo de aire gris claro. El pigmento tiñe el medio de cultivo.

298011



Medio de cultivo	UV-9	7K1
Almidón-caseina-agar	Micelo de aire blanco que más adelante se vuelve gris.	Micelo de aire blanco que más adelante se tiñe rosa.
Rebanadas de patata.	Micelo de aire blanco que asume un color gris. Ningún pigmento soluble.	Crecimiento vegetativo de color tanina. Falta del micelo de aire. Falta pigmento soluble.
Agar de cultivo.	Crecimiento vegetativo incoloro. Falta micelo de aire. Pigmento soluble que tiñe el medio de cultivo de amarillo.	Crecimiento vegetativo marrón claro. Falta micelo de aire. Pigmento marrón soluble.
Czapek	Micelo de aire blanco que más adelante se vuelve gris. Pigmento verdoso soluble.	Micelo de aire blanco que se tiñe rosa más adelante.
Glicerina-calcio-agar	Escaso micelo de aire blanco. Ningún pigmento soluble.	Micelo de aire blanco que se tiñe de rosa.
Patata-glucosa-agar.	Micelo de aire blanco que se vuelve gris. Ningún pigmento soluble.	Micelo de aire blanco que se vuelve claro como cíclamen. Falta pigmento.

298011



Medio de cultivo	UV-9	7K1
Patata-glicerina-agar	Micelo de aire blanco que más adelante se vuelve gris. Pigmento marrón soluble.	Micelo de aire, al principio gris, más adelante de color rosa. Pigmento marrón claro.

La tabla II muestra el comportamiento químico de los dos cultivos. La tabla III da la evaluación de distintas fuentes de carbono.

TABLA II

Substrato	Mutante UV-9	S.lavendulae 7K1
Nitrato	Fuerte reducción	Reducción moderada
Gelatina	Crecimiento superficial en forma de película. Ningún micelo de aire. Ninguna formación de micelo. Licuación total al 15º día.	Desarrollo en forma de un anillo marrón. Ningún micelo de aire. Pigmento marrón soluble. Licuación total al 15º día.

29801



Substrato	Mutante UV-9	S.lavendulae 7K1
Nitrato	Fuerte reducción	Reducción moderada
Leche de torna- sol	Desarrollo en la super- ficie con formación de micelo de aire blanco. Peptonización total al 20º día. Alcalinización 6,4-8,0, Ninguna for- mación de pigmento y ninguna coagulación.	Desarrollo en forma de un anillo marrón sin mi- celo de aire. Peptoniza- ción total entre los días 15 y 20. Pigmento ma- rrón soluble. Ligera alca- linización. Falta coagu- lación.
Almidón	Fuerte hidrólisis ya a partir del 10º día.	Fuerte hidrólisis, pero lenta (ligera al 10º día, fuerte al 20º día)

TABLA III

Fuente de carbono	C r e c i m i e n t o	
	Mutante UV-9	S.lavendulae
Sacarosa	+	+
Lactosa	+	-
Refinosa	+	-
Ramnosa	+	-
Xilosa	+	-
Salicina	+	+
Manita	+	+
Malato de calcio	+	-

298011

25 MAR



Es sabido que la cepa original de *Streptomyces lavendulae* 7K1 produce primeramente un antibiótico denominado Eurimicina, pero que demostró ser idéntico a la neomicina. El antibiótico ussamicina formada por la

5. cepa S. *lavendulae* 7K1, mutante UW-9 es, en lo que se refiere a sus propiedades biológicas y físico-químicas, distinto a la neomicina o sus componentes. Así da en la hidrólisis ácida, ácidos amínicos; es por lo tanto un polipepturo. En el cromatograma de papel ascendente en el sistema n-butanol-piridina-ácido acético-agua (15:10:3:12) muestra un valor Rf de 0,74, mientras que la neomicina muestra manchas con valor Rf < 0,1 y un ulterior Rf = 0,13-0,14. En la cromatografía descendente en el sistema agua-n-butanol, saturado con adición de 2% de ácido tolueno-sulfónico, se encuentra para la ussamicina un valor Rf de 0,75 y para la neomicina uno de 0,25 - 0,27.
- 10.
- 15.

La ussamicina es una base orgánica y por lo tanto forma sales. En la forma de hidrocioruro se disuelve muy bien en agua. También se disuelve en metanol. En acetona y otros disolventes orgánicos, tales como éter, benzol, cloroformo, éter de petróleo, es prácticamente insoluble. Se puede precipitar con colorantes azoicos que contengan grupos de ácido sulfónico, tal como heliantina. También forma un reinecato. El antibiótico ussamicina posee, en la pureza hasta la que se pudo obtener, un color amarillo claro que

20.

25.

2980125 MAR



entre pH 3 - 8 se mantiene invariable. Los siguientes ensayos de color son negativos: maltol, glucosamina, molisch, millon. En ensayo ninhidrínico y de Sakaguchi son positivos. El antibiótico es relativamente estable:

5. una solución fuertemente ácida se puede calentar 10 minutos al baño María y las soluciones alcalinas se mantienen estables durante 30 minutos a temperatura ambiente. Si por el contrario soluciones neutras o soluciones en sosa cáustica al 5% se calientan durante 30 minutos al baño María, entonces se presenta descomposición. En la hidrólisis ácida (ácido clorhídrico 6-m, 20 horas, - 100°) de un producto en bruto del ussamicina UV-9 se forma una mezcla de aminoácidos de los cuales una parte se pudieron identificar por vía papel-cromatográfica provisionalmente como sigue: glicina, alanina, leucina, serina, ácido asparigínico, ácido glutamínico, arginina, lisina.
- 10.
- 15.

Para obtener el antibiótico ussamicina se cultiva la cepa *S.lavendulae* 7K1, mutante UV-9 en una fuente acuosa de carbono y nitrógeno así como un caldo que contiene sales inorgánicas hasta que éste muestra un efecto esencialmente antibacterial, aislándose entonces la ussamicina.

- 20.
- 25.
- Como fuente de carbono y nitrógeno entran en consideración por ej. los hidratos de carbono, tal como glucosa, sacarosa, lactosa, almidón, alcoholes, tal como manite, glicerina, ácidos amínicos, por ejemplo



glicina, pepturos, proteínas y sus productos de disociación, tales como peptona o triptona, extractos de carne, partes de granos de cereales solubles en agua, tales como de maíz y trigo, residuos de la destilación en la fabricación de alcoholes, cornsteepliquor, levadura, semillas, especialmente de la planta de colza y soja, de la planta del algodón, sales amónicas, nitratos. En sales inorgánicas contiene la solución de cultivo por ejemplo cloruros, carbonatos, sulfatos, nitratos, fosfatos de metales alcalinos y alcalinos terrosos, de magnesio, cinc, manganeso, hierro.

El cultivo es aeróbico, por ejemplo en cultivo de superficie en descanso, o preferentemente sumergido, agitando o removiendo con aire u oxígeno en botellas de agitación o en los fermentadores conocidos. Como temperatura es adecuada una entre 18 y 40°C, preferentemente 27°. Preferentemente se cultivan en varias etapas, es decir, primeramente se prepara un cultivo en caldo líquido que entonces se inyecta en proporción de aprox. 1:20 en el medio de producción propiamente dicho. El primer cultivo líquido se obtiene por ejemplo sobreinyectando un cultivo, crecido sobre medio de patata de 8-10 días de edad, en el caldo líquido, se deja crecer durante 48 horas y después se agrega al medio de producción.

El aislamiento del antibiótico del filtrado del medio de cultivo se efectúa según métodos en sí conoci-

23801 125



dos. Se pueden emplear medios de absorción, por ejemplo carbones activos, tales como norita, tierras activadas, tal como tierra de Fuller ó floridina, o absorbentes de resina, tal como asmita. La elución de los absorba-

5. tos se efectúa convenientemente con mezclas con agua de disolventes orgánicos miscibles con agua o ácidos acuosos, por ejemplo, con agua-metanol, ácido clorhídrico diluido-metanol (pH 2,0), ácido acético diluido-metanol, agua-metanol-ácido acético glacial-butanol.

10. El antibiótico se puede absorber también en resinas intercambiadoras de iones, especialmente en resinas que contengan grupos de ácido, tal como amberlita IRC-50.

15. La elución se efectúa por ejemplo con ácido diluidos o mezclas de metanol y ácidos diluidos.

Además, el antibiótico se puede precipitar también directamente del filtrado del cultivo, por ejemplo en forma del reinecato. La transformación de las sales de difícil solubilidad en las sales de fácil solubilidad del antibiótico se efectúa bien con ácidos minerales o en resinas intercambiadoras de iones, por ejemplo en Amberlita IRA-400. Este método se puede emplear también para el enriquecimiento del antibiótico.

20. Un enriquecimiento del antibiótico se logra también mezclando las soluciones acuosas o alcohólico-acuosas de las sales con un exceso de disolventes orgánicos, miscibles con agua, tal como acetona, diox-

25.



no, precipitándose las sales inorgánicas y otros materiales acompañantes y que se retiran.

Otro método de enriquecimiento y de limpieza es la cromatografía, por ejemplo la cromatografía de absorción en distintos materiales, tales como norita, óxido de aluminio, silicatos de magnesio, así como la cromatografía de distribución con celulosa, almidón, silicagel como substancias vehículo, o también la cromatografía en resinas intercambiadoras de iones, por ejemplo en Dowex-50, amberlita IRC-50.

Además se puede enriquecer el antibiótico mediante distribución en contracorriente según Craig entre dos fases de disolventes no miscibles.

Las sales del antibiótico y sus componentes se derivan de los ácidos inorgánicos u orgánicos, por ejemplo del ácido clorhídrico, de los ácidos sulfúricos, de los ácidos fosfóricos, ácido nítrico, ácido acético, ácido propiónico, ácido valerianico, palmitínico u oléico, del ácido succinico, ácido cítrico o amigdalico.

Se obtienen por reacción de los ácidos correspondientes sobre la base libre o mediante la doble reacción de sales.

El antibiótico ussamicina y sus sales poseen una elevada eficacia antibiótica contra los microorganismos gramopositivos, una más reducida contra los microorganismos gramonegativos y ninguna eficacia contra los microorganismos resistentes al ácido en una concentración hasta 100 γ /ml, véase tabla 1.

298011

25 MAR. 1966



Espectro antimicrobial del antibiótico UV-9

Microorganismos	Actividad (Y /ml)
B.subtilis 9	0,1 - 0,2
B.subtilis 27	5,0 - 10,0
B.anthraxis	> 100,0
B.mycoides	> 100,0
B.cereus	> 100,0
S.aureus W	0,2 - 0,4
S.aureus ATCC	0,2 - 0,4
M.Citreus	2,0 - 4,0
Sarcina lutea	0,2 - 0,4
Str. haemoliticus	6,0 - 8,0
K.pneumoniae	20,0 - 40,0
S.typhosa	15,0 - 20,0
E.coli N	20,0 - 40,0
Sh.paradysenteriae	15,0 - 20,0
A.aerogenes	60,0 - 80,0
N.catarrhalis	8,0 - 10,0
Pr.morganii	60,0 - 80,0
Pr.mirabilis	80,0 - 100,0
Pr. vulgaris	60,0 - 80,0
Br. suis	4,0 - 6,0
Br. melitensis	4,0 - 6,0
Br.abortus	4,0 - 6,0
Mycobacterium 607	> 100,0
Mycobacterium phlei	> 100,0
Mycobacterium smegmatis	> 100,0
M.asteroides	40,0 - 60,0
C.albicans IBB-50	> 100,0
Cr. neoformans ENCB	40,0 - 60,0

25 MAR. 1955



En vivo muestra el antibiótico un efecto anti-tumoral contra el carcino-sarcoma Walker 256 en la comprobación en ratas blancas (Sprague Dawley). La toxicidad del nuevo antibiótico es reducida. En las ratas blancas, a las cuales se les administró intraperitonealmente durante 10 días diariamente 50 mg/kg de antibiótico, no se observó ninguna anormalidad.

El antibiótico ussamicina y sus sales se pueden emplear como medicamentos en la medicina veterinaria y humana, por ejemplo en forma de preparados farmacéuticos. Estos contienen los compuestos mencionados en mezcla con un material vehículo farmacéutico, orgánico o inorgánico, adecuado para la aplicación enteral o parental. Como tales entran en consideración aquellos materiales que no reaccionen con el nuevo compuesto, tal como por ejemplo, gelatina, lactosa, almidón, estearato de magnesio, aceites vegetales, alcoholes bencílicos u otros vehículos medicinales conocidos. Los preparados farmacéuticos se pueden presentar por ejemplo, como tabletas, grageas, polvos, supositorios o en forma líquida como soluciones, suspensiones o emulsiones. En caso dado estarán esterilizados y/o contendrán materiales auxiliares, tales como medios de conservación, estabilización, reticulación o emulsión. También pueden contener otros materiales terapéuticamente valiosos. Además se puede emplear el antibiótico como medio de desinfección y conservación, así como medio aditivo

298011



a los piensos.

La invención se describe en el ejemplo siguiente.
Las temperaturas están indicadas en grados Celsius.

EJEMPLO.

5. a) *Streptomyces lavendulae* UV-9 se cultiva según el método de dos etapas bajo condiciones aeróbicas en un caldo de cultivo que por litro de agua de la red contiene 30 g de glucosa, 12,5 de cornsteep-liquor (50%), 5 g de levadura de cerveza secada, 5 g de nitrato amónico y 4 g de carbonato de calcio. La solución de cultivo esterilizada muestra un pH de 6,5-6,8. La inyección se efectúa con un cultivo que se guardó en medio de cultivo de patata en el matraz de Erlenmeyer de 125 ml y tiene 8-10 días de edad.
- 10.
15. Un octavo de este cultivo se traslada a botellas de Fernbach de 2000 ml de capacidad con 300 ml de solución de cultivo. Después de incubar 48 horas bajo agitación (aprox. 200 r.p.m.) se sobreinyectan los cultivos líquidos en proporción 1:20 en el medio de producción.
- 20.
- b) En igual forma a como descrito bajo a) se cultiva *S. lavendulae* UV-9 en una solución de cultivo que por litro de agua de la red contiene 20 g de harina de soja, 20 g de glucosa, 5 g de cloruro sódico y 2 g de carbonato de calcio. Después de la esterilización el pH es de 6,7-6,9.
- 25.

El filtrado de cultura, obtenido según a) ó

298011

25 MAR



- b), se absorbe con carbón activo y se eluye con metanol que se acidificó con ácido clorhídrico hasta un pH de 2,0. El eluado se pone a un pH de 6, se concentra por evaporación en vacío hasta la viscosidad de la melaza, se filtra y después se diluye con metanol al triple. Después de agregar acetona en exceso. Se filtra de la precipitación, el filtrado se acidifica (pH 2,0) y se evapora hasta la viscosidad de la melaza. El precipita un producto en bruto activo que se lava con acetona, se disuelve en agua y con sal de Reinecke se precipita como reinecato. Este se filtra y se lava varias veces con agua de 60-70°, disolviéndose el reinecato. Se filtra del residuo insoluble y el filtrado se enfría a 0°. Después de reposar varias horas a 0° se precipita el reinecato como precipitación en forma de gelatina. Esta se transforma en la forma conocida en el hidrocioruro. Este es una substancia de color crema que, en solución acuosa, no sufre variaciones algunas a un pH de 3 - 8. Al calentar en una solución neutra a 100° durante 30 minutos pierde la substancia la mayor parte de su actividad; se vuelve casi totalmente inactiva si se calienta en solución de sosa cáustica al 5% durante 30 minutos a 100°.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.

La reacción de maltol, glucosamina, molisch y millón son negativas, la reacción según Sakaguchi y con ninhidrina son positivas.

25.

En el cromatograma de papel en el sistema n-butanol-piridina-ácido acético-agua (15:10:3:12), desarrollo

29801



ascendente, 20 horas sobre papel Whatman nº 1, el valor Rf es 0,74. En desarrollo descendente en el sistema agua-n-butanol saturado + 2% de ácido tolueno-sulfónico el valor Rf es 0,75.

5. En la hidrólisis ácida (ácido clorhídrico 6-n, 20 horas a 100°) se obtienen aminoácidos. En el sistema bidimensional butanol secundario-ácido-fórmico-agua (75:15:10) = I y fenol-agua 80:20 = II se pueden demostrar, tñiendo con ninhidrina, los aminoácidos siguientes: glicina, alanina, leucina, serina, ácido asparagínico, ácido glutamínico, arginina y lisina.
- 10.

NOTA

15. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizar 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
20. corresponde a una solicitud de patente presentada en Suiza con fechas 27 de marzo y 24 de abril de 1.963, bajo los números 3906/63 y 5162/63, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los convenios internacionales en vigor y siendo lo que constituye
25. la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España.
- "Procedimiento para la obtención de un nuevo anti-

25 M

298011



biótico"; caracterizándose por lo siguiente:

- 5 1.- Procedimiento para la obtención de un nuevo antibiótico, y de sus sales; caracterizado, porque la cepa *Streptomyces lavendulae* 7kl, mutante UV-9 se cultiva bajo condiciones aeróbicas en una solución de cultivo acuosa que contiene una fuente de carbono y de nitrógeno así como sales inorgánicas, hasta que éste muestra un efecto considerablemente antibacterial,
10. y a continuación se aísla el antibiótico ussamicina en forma de la base o de sus sales.
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado, porque el cultivo se efectúa por inmersión.
15. 3.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado, porque el cultivo se efectúa en varias etapas.
20. 4.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-3, caracterizado, porque el antibiótico se aísla de la solución de cultivo mediante absorción en carbón activo, tierras activadas o absorbentes de resina.
25. 5.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque el antibiótico absorbido se eluye con un medio de elución ácido.
- 6.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-5, caracterizado, porque como líquido de elución se emplean mezclas con agua de disolventes orgánicos mis-

29801



cibles con agua o ácidos acuosos.

7.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-6, caracterizado, porque el antibiótico se precipita en forma de una sal de difícil solubilidad.

5. 8.- Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado, porque el antibiótico se precipita como reinecato.

10. 9.- Procedimiento para la obtención de un nuevo antibiótico; tal y como queda descrito substancialmente en la Presente Memoria.

Esta Memoria consta de 18 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

25 MAR. 1964

CIBA SOCIETE ANONYME

J. GOMEZ ACEBO Y MUÑOZ