

RAN 4410/35.



1965

314067

P A T E N T E
D E
I N V E N C I O N

por "UN PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR UNA MEZCLA ANTIBIOTICA", a favor de la firma suiza F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. A.G., domiciliada en Basilea (Suiza).

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a nuevos antibióticos y a procedimientos para su preparación. Más particularmente, el invento se refiere a nuevos antibióticos que pueden producirse por medio de cultivos pertenecientes al género *Streptomyces*.

5. El organismo que produce los nuevos antibióticos de este invento se llama *Streptomyces hazeliensis* var. *hazeliensis* nov. sp. Este organismo se aisló de una muestra de terreno obtenida en Matane, Gaspé, Canada. En lo que sigue se lo designará como *Streptomyces hazeliensis* con fines de brevedad.
10. Un cultivo de *Streptomyces hazeliensis* ha sido depositado en la

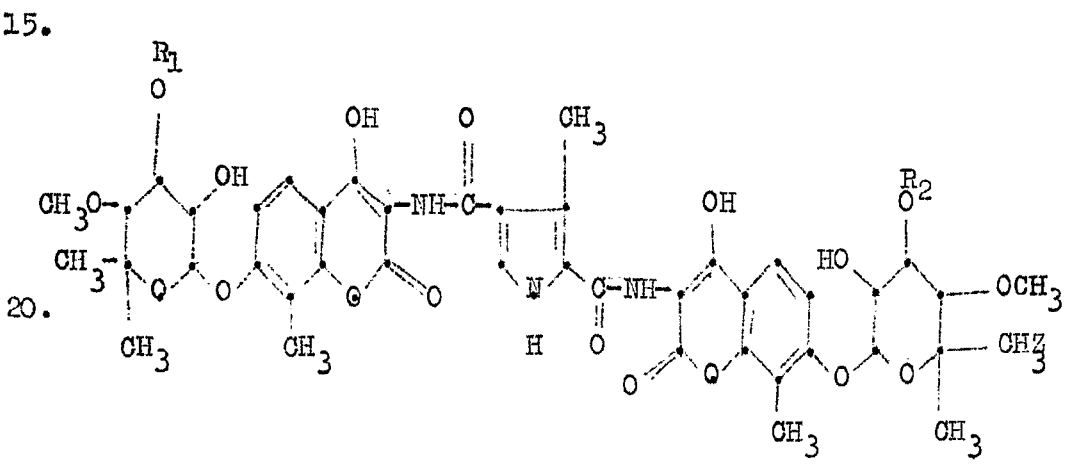


- 2 - 314067

coleccion de microorganismo del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Division del Norte de Utilizacion, Investigacion y desarrollo, Peoria, Illinois, con el numero de registro NRRL 2938.

Los nuevos antibioticos pueden prepararse por un procedimiento que consiste en cultivar Streptomyces hazelionis en condiciones aerobicas sumergidas y en un medio nutritivo acuoso que comprende fuentes de carbono organico y de nitrogeno y en recuperar, si se desea, una mezcla antibiotica del caldo de fermentacion.

Los antibioticos de este invento se han llamado sugordomicinas y pueden expresarse por medio de la formula general siguiente:



25. donde R_1 y R_2 se toman del grupo constituido por hidrogeno, 2-pirroilo y 5-metil-2-pirroilo y donde



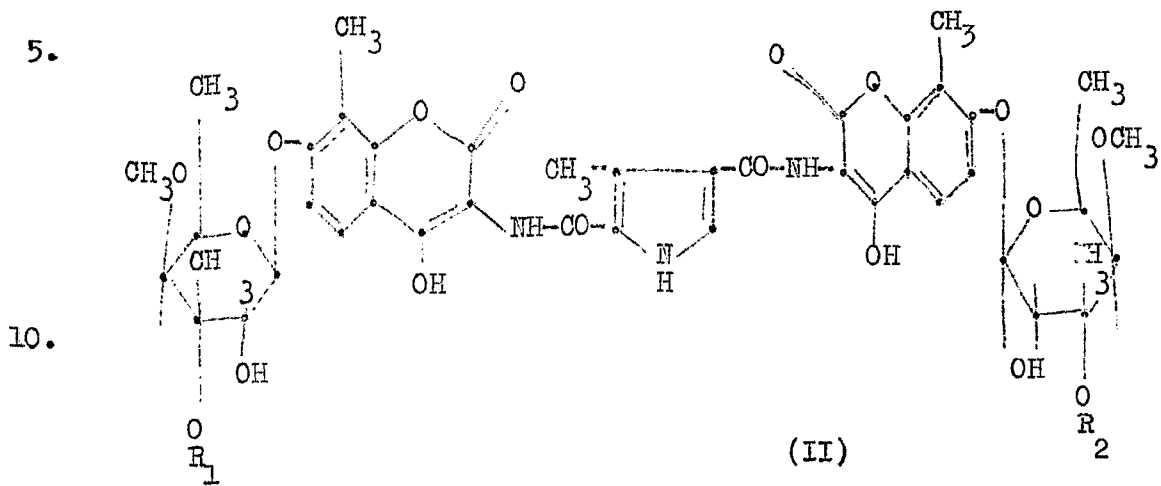
1965

- 3 -

314067

no más de uno de los símbolos R_1 y R_2 es hidrógeno.

Antibióticos de este invento particularmente interesantes son los representados por la fórmula general siguiente:



15. donde R_1 y R_2 se toman del grupo constituido por hidrógeno, 2-pirroilo y 5-metil-2-pirroilo y donde no más de uno de los símbolos R_1 y R_2 es hidrógeno. Se entiende que los anteriores compuestos pueden formar sales con bases apropiadas, y que estas sales se hallan también

20. dentro del ámbito del invento. Ejemplos de dichas sales son la sal sódica, la sal potásica, la sal amónica o cualquier otra sal de adición de base farmacéuticamente aceptable.

Una especie preferida dentro del grupo representado por las fórmulas I y II anteriores es (II) la N,N'-bis(4-hidroxi-8-metil-7- α -O-metil-5,5-dimetil-3-O-(5'-metil-2'-pirroil)-alfa-

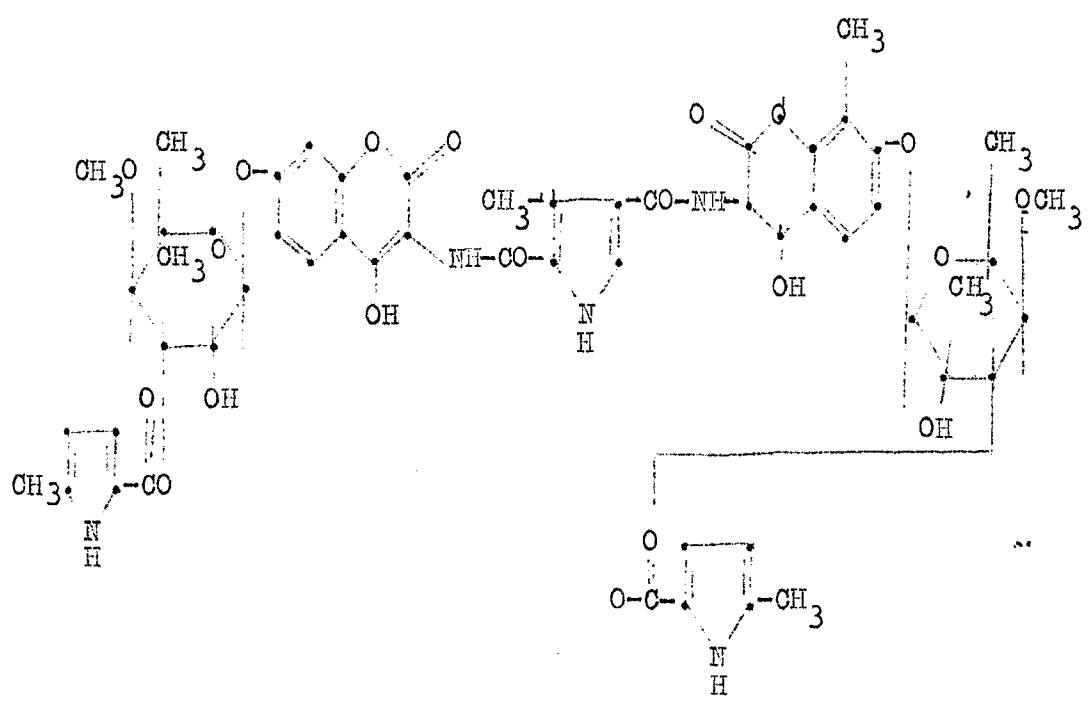
25.



314067

-I-lixopiranosiloxi-7-2-oxo-2H-1-benzopiran-3-il }-3-metil-2,4-
-pirrolodicarboxamida.

Este compuesto tiene la fórmula estructural:



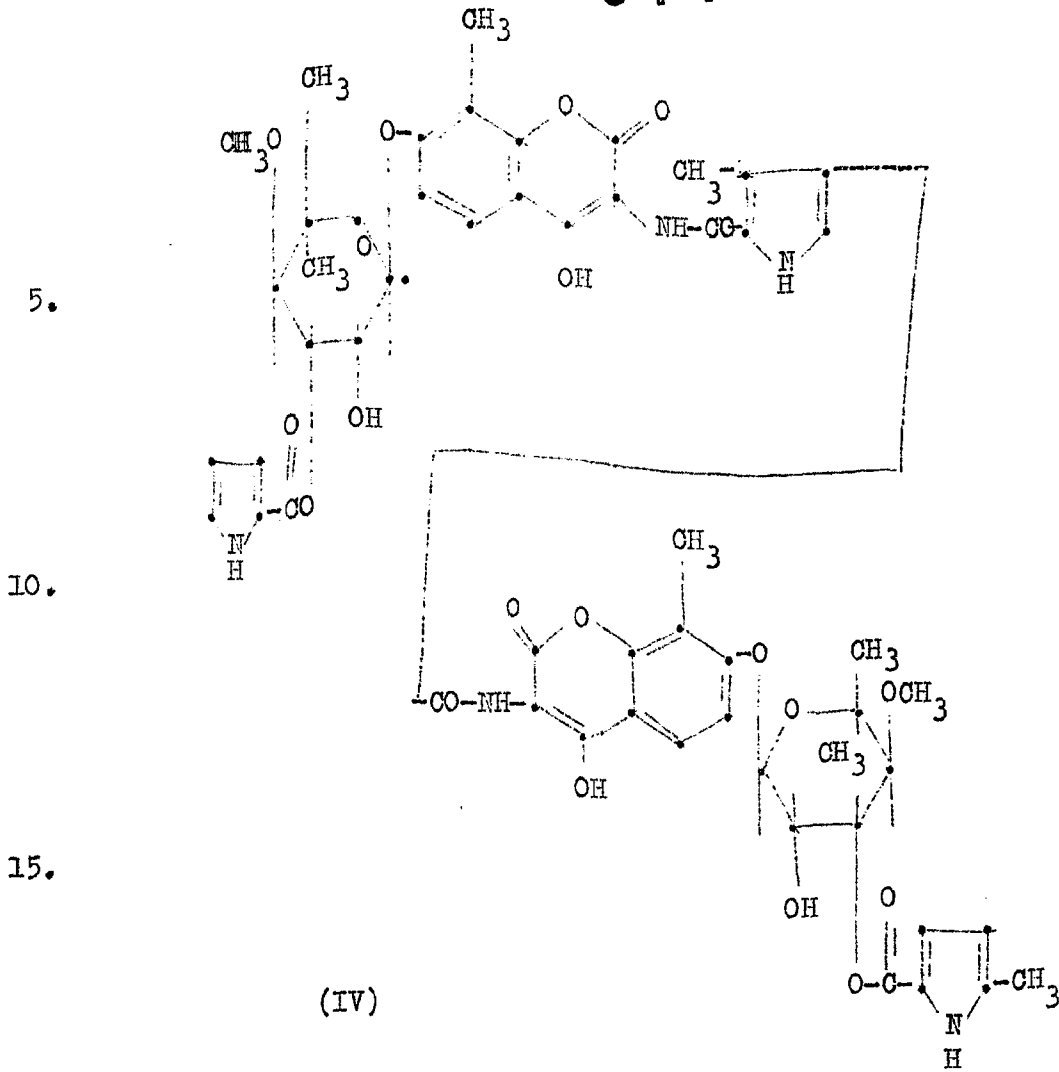
(III)

Otros antibióticos dentro del ámbito del invento incluyen los siguientes:



1965

314067



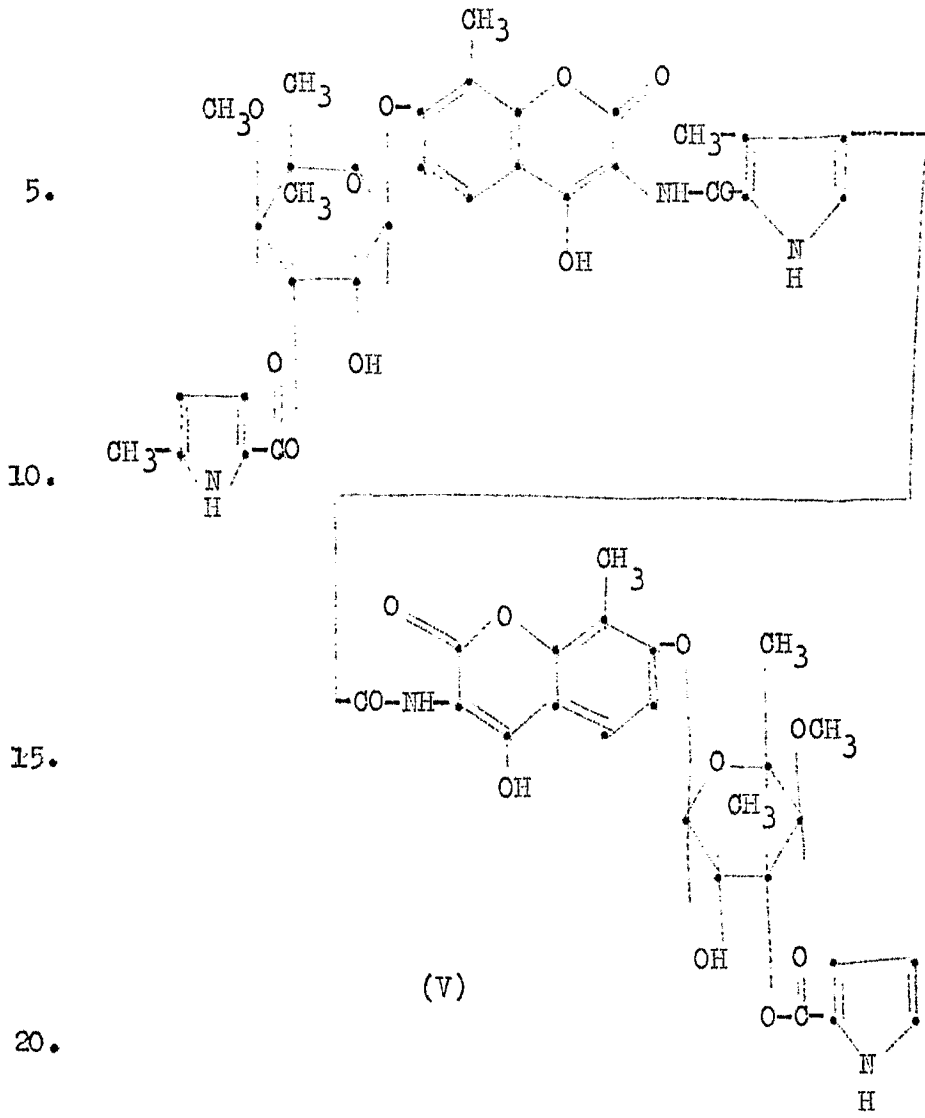
25.

2N{4-hidroxi-8-metil-7/4-O-metil-5,5-dimetil-3-O(2'-
 -pirroil)-alfa-L-lixopiranosiloxi}7-2-oxo-2H-1-benzopiran-3-il}-
 -4N'-{4-hidroxi-8-metil-7/4-O-metil-5,5-dimetil-3-O(5'-metil-
 -2'-pirroil)-alfa-L-lixopiranosiloxi}7-2-oxo-2H-1-benzopiran-3-

10 JUN 1952

314067

ii) -3-metil-2,4-pirrolodicarboxamida.



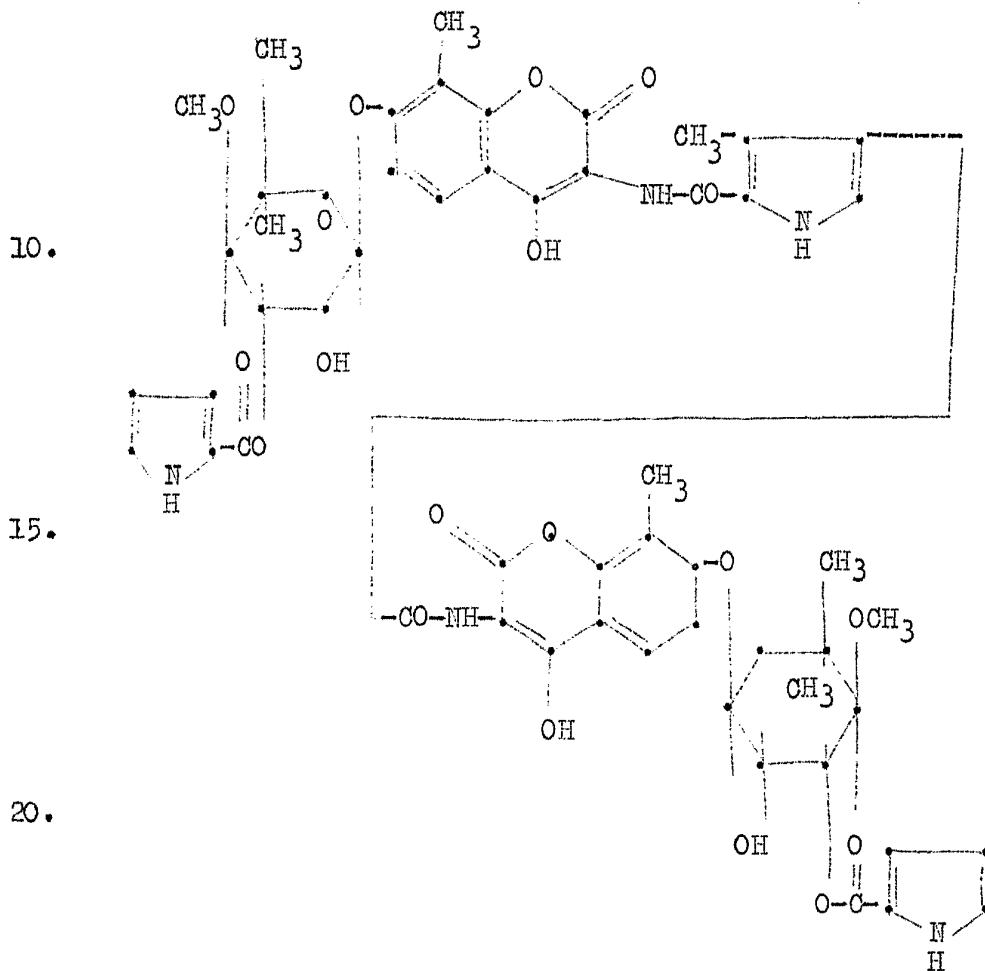
25. 2N{4-hidroxi-8-metil-7[4-O-metil-5,5-dimetil-3-O(5'-metil-2'-pirroil)-alfa-L-lixopiranosiloxi]-2-oxo-2H-1-bonzopiran-



314067

-3-il}-4N'-{4-hidroxi-8-metil-7/4-O-metil-5,5-dimetil-3-O(2'-
-pirroil)-alfa-L-lixopiranosiloxi]-2-oxo-2H-1-benzopiran-3-
-il}-3-metil-2,4-pirrolodicarboxamida

5.



(VI)

10 JUN 1965

⁻⁸⁻
314067

N,N'-bis{4-hidroxi-8-metil-7/4-O-metil-,5,5-dimetil-3-
-O(2'-pirroil)-alfa-L-lixopiranosiloxi7-2-oxo-2H-1-bonzopiran-
-3-il}-3-metil-2,4-pirrolodicarboxamida

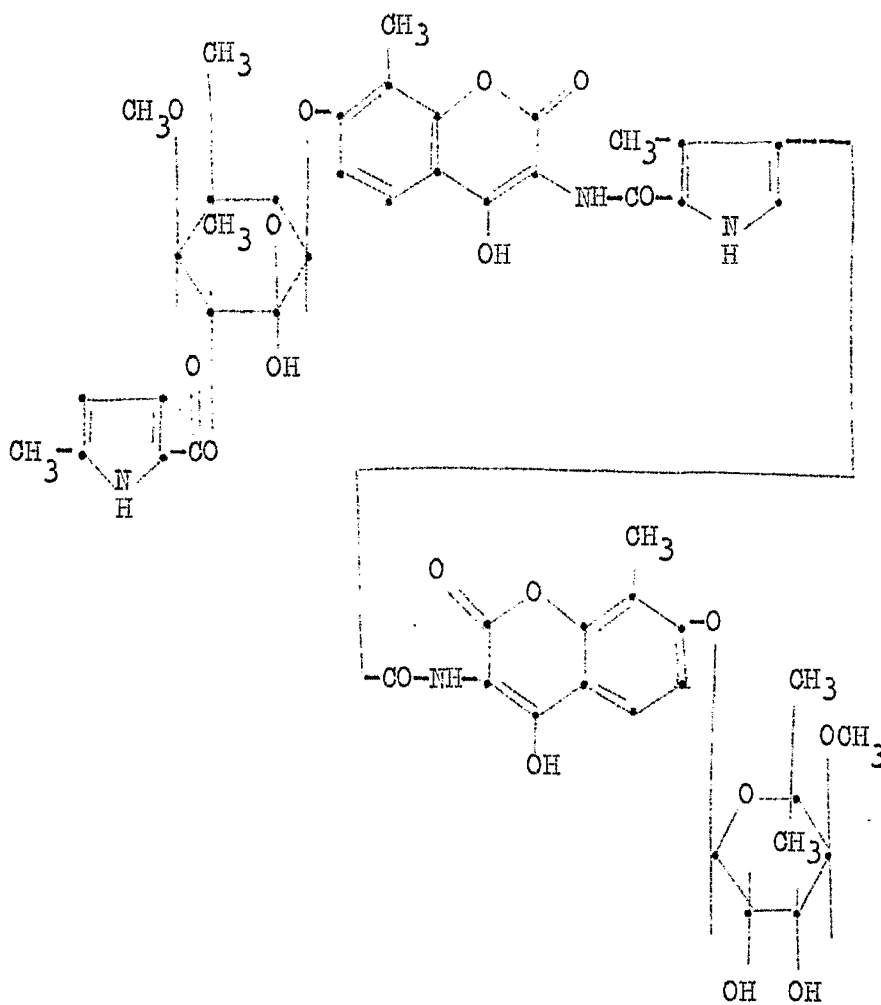
5.

10.

15.

20.

25.



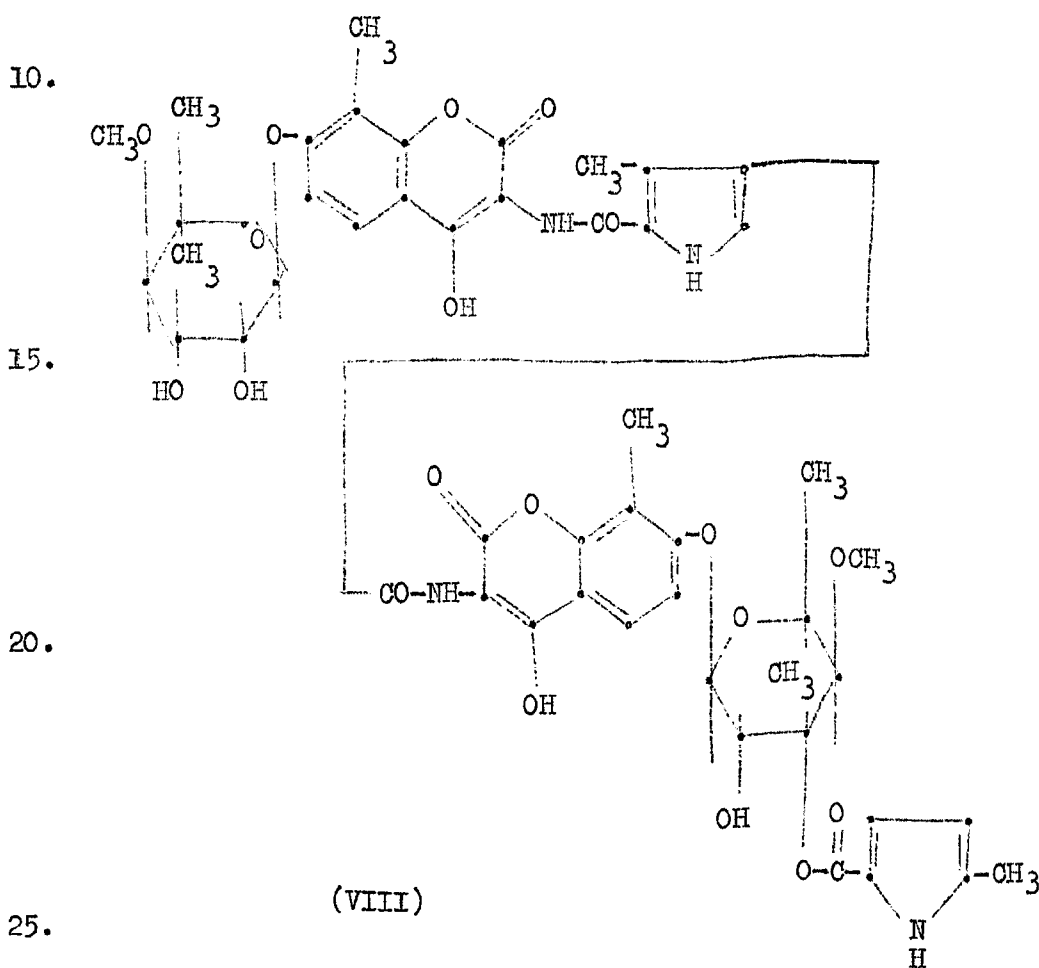
(VII)



UN. 1965

314067

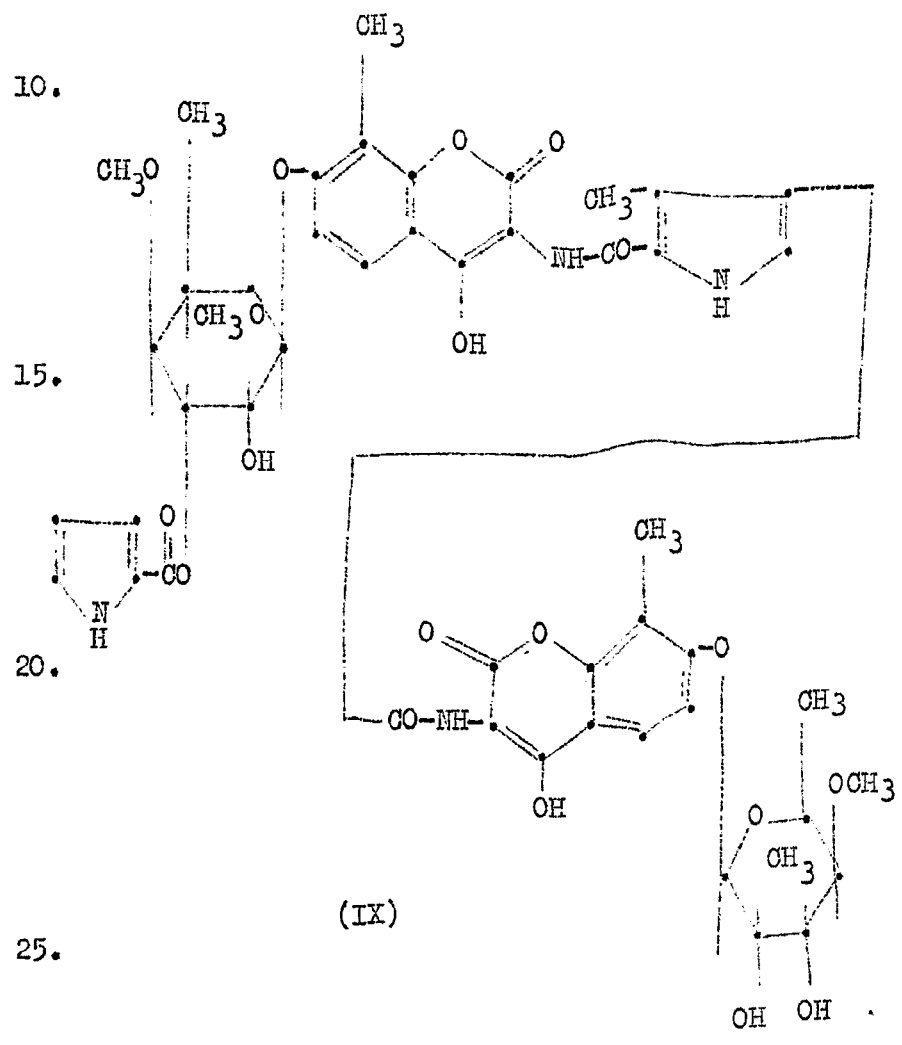
2N{4-hidroxi-8-metil-7/4-O-metil-5,5-dimetil-3-O(5'-
 -metil-2'-pirroil)-alfa-L-lixopiranosiloxi/2-oxo-2H-1-
 -benzopiran-3-il}-4N{4-hidroxi-8-metil-7/4-O-metil-5,5-
 -dimetil-alfa-L-lixopiranosiloxi/2-oxo-2H-1-benzopiran-3-il} 3-
 5. -metil-2,4-pirrolodicarboxamida





314067

2N { 4-hidroxi-8-metil-7/4-O-metil-5,5-dimetil-alfa-L-
 -lixopiranosiloksi/2-oxo-2H-1-benzopiran-3-il } -4N¹ { 4-hidroxi-
 -8-metil-7/4-O-metil-5,5-dimetil-3-O(5'-metil-2'-pirroil)-alfa-
 -L-lixopiranoxiloksi/2-oxo-2H-1-benzopiran-3-il } -3-metil-2,4-
 5. -pirroloodicarboxamida



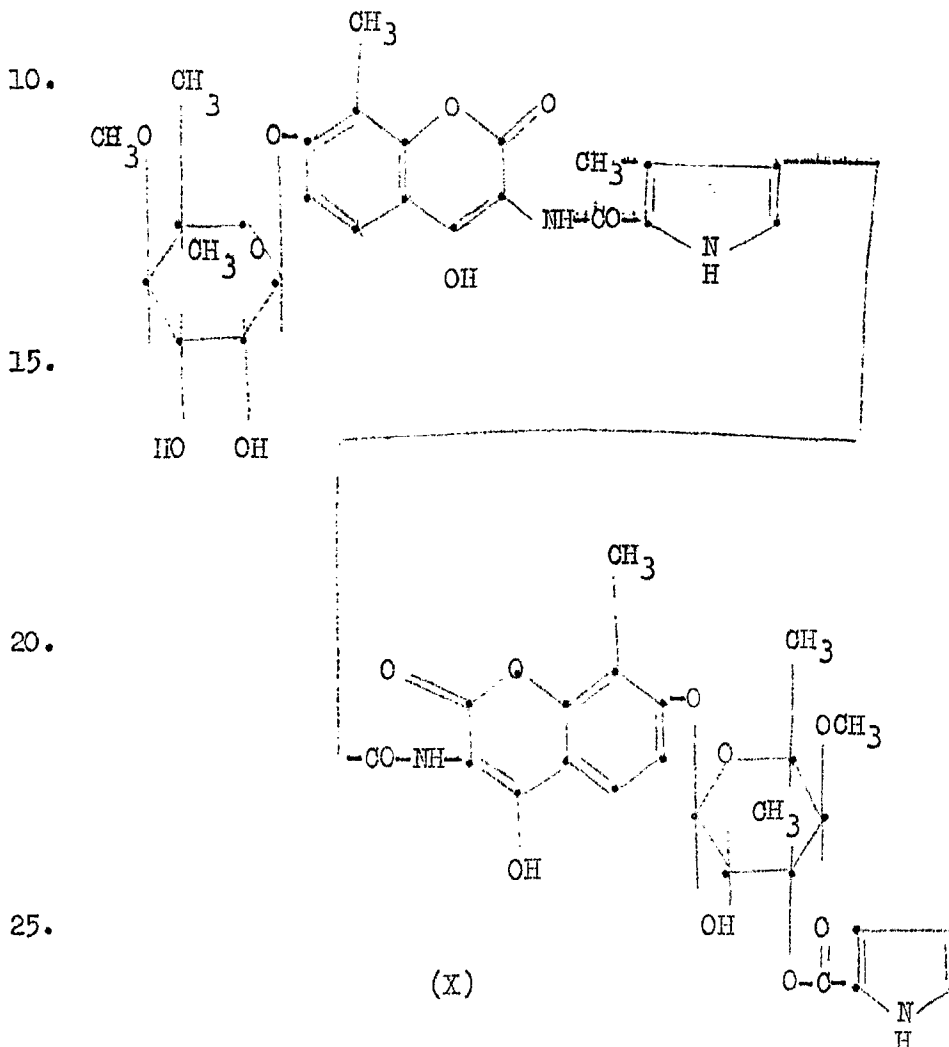


10 JUN. 1964

- 11 -

314067

- 2N { 4-hidroxi-8-metil-7/4-O-metil-5,5-dimetil-3-O(2'-
-pirroil)-alfa-L-lixopiranosiloxi } 2-oxo-2H-1-benzopiran-3-
-il } 4N' - { 4-hidroxi-8-metil-7/4-O-metil-5,5-dimetil-alfa-L-
-lixopiranosiloxi } 2-oxo-2H-1-benzopiran-3-il } -3-metil-2,4-
5. -pirrolodicarboxamida





314067

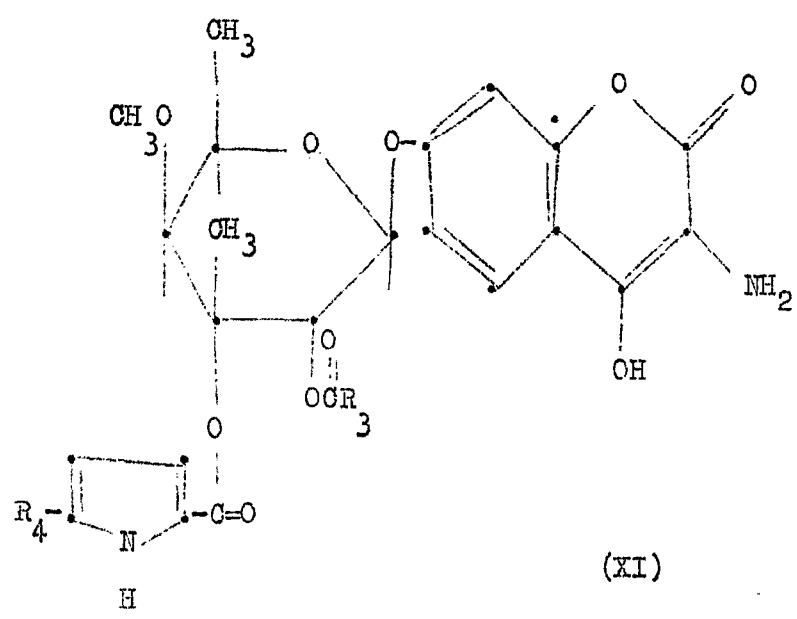
2N{4-hidroxi-8-metil-7/4-O-metil-5,5-dimetil-alfa-L-
 -lixopiranoxiloxi/2-oxo-2H-1-benzopiran-3-il}4N{4-hidroxi-
 -8-metil-7/4-O-metil-5,5-dimetil-3-O(2'-pirroil)-alfa-L-
 -lixopiranosiloxi/2-oxo-2H-1-benzopiran-3-il}-3-metil-2,4-
 5. -pirrolodicarboxamida.

Los compuestos de las fórmulas III y A anteriores pue-
 don prepararse también por via sintética, haciendo reaccionar
 un compuesto de la fórmula

10.

15.

20.



25.

donde R₃ se toma del grupo constituido por alquilo,
 aralquilo, fenilo, fenilo sustituido por alquilo,
 y fenilo sustituido por halógeno, y R₄ se toma
 del grupo constituido por hidrógeno y metilo,

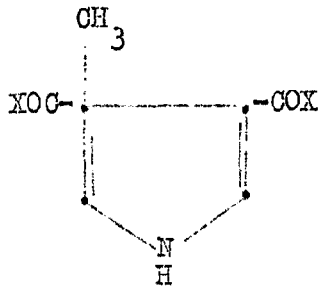


JUN 1957

314067

con un compuesto de la fórmula

5.



(XII)

10.

donde X se toma del grupo constituido por el cloro y el bromo,

y, si se desea, haciendo reaccionar con una base farmacéuticamente aceptable el producto así obtenido.

15.

El Streptomyces hazeliensis es un miembro aeróbico y aerocamente esporulante del orden de los Actinomycetales y pertenece al género Streptomyces tal como se describe en el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey, 7ª Edición, 1957. Aunque este organismo puede considerarse relacionado con

20.

el Streptomyces griseoflavus, raza No. 160, el Streptomyces niveus NRRL 2446, el Streptomyces spheroides NRRL 2449, el Streptomyces No. 58383, el Streptomyces spirogriseus NRRL 2590 y el Streptomyces griseus ATCC 12318, existen diferencias más que suficientes entre los organismos anteriores y el Streptomyces

25.

hazeliensis para establecer definitivamente que este último



314067

no sea de la misma especie que ninguno de aquellos. Las diferencias de morfología, y del color de las esporas son claramente suficientes para diferenciar el Streptomyces hazoliensis de todos los Streptomyces productores de antibióticos según los criterios de clasificación de T.G. Pridham, C.W. Hossoltine y R.G. Benedict, Microbiología Aplicada, 6, 52-79 (1958), "Una guía para la clasificación de Streptomyces según grupos seleccionados".

Otra diferenciación concluyente radica en la diferencia entre los antibióticos producidos por el Streptomyces hazoliensis y la novobiocina producida por los organismos antes indicados.

Los cultivos de Streptomyces hazoliensis desarrollados en medios favorables, tales como tomate-soja-agar, a 28°C durante 2 a 10 días, crecen con un micelio aéreo que por lo general es blanco y se vuelve gris a gris pardusco con la esporulación. En diversos medios se forma un exudado que va de incoloro hasta amarillo. Las esporoforas en agar de Bennett y asparagina-agar son principalmente rectas hasta flexuosas y terminan a veces en un gancho o bucle amplio o en espirales sueltas, abiertas, característicamente amplias (7 micras de diámetro), con 1 a 5 bucles y que son completamente irregulares en la forma y en la distancia entre los bucles. Las esporas son ovals hasta cilíndricas y varían de 1 a 1,2 micras de anchura por 1,4 a 2,4 micras de longitud. No se han visto espirales bien formadas en los medios de agar Czapek o levadura-malta-agar, pero exis-



314067

- tian pequeños ganchos o espirales primitivas. A veces surgen de un punto hasta 5 esporoforas, en forma de escoba. No existen espirales esferoides, apretadas o compactas, lo que diferencia del Streptomyces spheroides este cultivo. Aunque aparecen algunos racimos de esporoforas, estos no están característicamente retorcidos en sacacorchos en la punta, como en el caso del Streptomyces niveus. Por el contrario, las espirales de una esporofora de Streptomyces hazeliensis son mayores en la punta, más anchas y más sueltas y se vuelven más estrechas y apretadas, en el punto de inserción a las hifas.
- 5.
- 10.

- Para establecer una base de comparación del Streptomyces con los Streptomyces conocidos descritos en los medios nitrogenados complejos clásicos, así como en los medios definidos químicamente (Prodhan y Gottlieb, J. Bact. 26, 107-115 (1948), se usaron ambos tipos de medios. Los medios y los procedimientos se adaptaron de los descritos antes por Prodhan y Gottlieb: Gottlieb D., Microbiología Aplicada 9, 55-65 (1961); Un manual de métodos para estudio de cultivos puros de bacterias, por la Comisión de Técnica Bacteriológica de la Sociedad de Bacteriólogos Americanos, 1948; y por Waksman, The Actinomycetes, (Chrocina Botanica Co. 1950).
- 15.
- 20.

- En agar de Bennett y de Czapok, todas las razas de Streptomyces hazeliensis crecen abundantemente a 22°, 28° y 35°C, con mejor esporulación a las temperaturas más altas.
25. Por otra parte, el Streptomyces niveus y el Streptomyces



314067

spheroides crecen bien a las temperaturas más bajas, pero de ningún modo a 35°C. El Streptomyces № 160 y el Streptomyces sp. № 58383 tampoco crecen a 35°C.

Las respuestas de crecimiento del Streptomyces haze-

5. liensis en diversos medios se describen más abajo. Se indican denominaciones de color comunes, junto con descripciones del Color Harmony Manual, 4ª edición, Container Corporation of America, Chicago, Illinois, 1958:

10. Sacarosa-nitrato-agar (sacaron de Czapek): Buen crecimiento, pero ninguna esporulación; micelio aéreo de color cremoso (entre matiz 2 cc y gris chm, escala d). Reverso de color pardo crema; pigmento cremoso (matiz aproximadamente 2).

15. Glucosa-asparagina-agar: Crecimiento abundante, ligeramente elevado, superficie lisa, micelio aéreo gris claro, con esporas de color gris claro. Reverso de color crema pálido; ningún pigmento soluble. Una raza nuestra diminutas gotitas claras de exudado al final de las estrias.

20. Glucosa-agar nutritivo: Crecimiento escaso, plano, corcoso, con fuertes pliegues dentro del agar. Crecimiento aéreo blanco, reverso de color crema oscuro, pigmento soluble pardusco (matiz 4 no). El Streptomyces spheroides de crecimiento moderado sin ningún pigmento soluble, mientras que el Streptomyces nivous de buen crecimiento y pigmento amarillo soluble. El Streptomyces sp. № 58383 da crecimiento abundante y ningún pigmento soluble.
- 25.



314067

- Glucosa-nutriente más glicerol-agar: Crecimiento abundante, pliegues muy profundos en el agar; superficies arrugada y agrietada. Micelio vegetativo de color canela claro, con algunas gotas bastante grandes de exudado de color amarillo claro.
5. Crecimiento aéreo parcialmente blanco hasta pardo grisáceo (cm. cerca de gris 5 de), esporulado en el 25% aproximadamente. Reverso de color pardo café; pigmento soluble de color amarillo pardusco claro (matiz 3 ic) hasta pardo.
- Agar amidox: Crecimiento moderado hasta bueno, plano; micelio aéreo de un gris mediano; reverso de color pardo crema hasta pardo café oscuro. Pigmento soluble de color pardo rojizo (matiz 4-pc-pg).
10. Pasta de tomate-harina de avena-agar: Crecimiento denso, con buena esporulación; algunas gotitas de exudado. Micelio aéreo gris hasta pardo grisáceo (cm cercano a gris 5 fe). Reverso de color oliva pardusco oscuro, con pigmento soluble de un color oliváceo sucio.
15. Leche desnatada-agar: Crecimiento del sustrato bueno, pastoso, liso, sin ningún micelio aéreo. Intensa producción de pigmento soluble de color pardo oscuro, pardo claro más allá de las estrias de crecimiento (matiz 5 n-1 y matiz 3 ic).
20. Peptona-hierro-agar: Unas pocas colonias solamente; como liso, pastosos, regularmente encrespado y con cima de un blanco brillante. Micelio aéreo de color crema oscuro, con la cima blanca. Pigmento soluble de color pardo oscuro (matiz
- 25.



314067

4 pn).

- Agar de Bennett: Crecimiento abundante, micelio aéreo gris, con esporas de un pardo grisáceo (rojizo) y producción de gotitas de exudado de color amarillo pálido. Reverso de color pardo amarillento; pigmento soluble de color pardo-amarillo claro (matiz 3 pc). Una segunda raza no dió ningún exudado, mientras que una tercera dió un exudado amarillo cundiente, que humedeció toda la superficie de crecimiento.
- 5.

- Trozos de patata: Crecimiento parco al cabo de dos semanas, pero ennegrecimiento de la patata al cabo de cuatro días solamente. Por otra parte, tanto el Streptomyces spheroides como el Streptomyces nivous dieron primeramente crecimiento parco, que poco a poco se volvió muy bueno, con esporulación de un blanco grisáceo y decoloración pardusca de la patata.
- 10.
- 15.
- El Streptomyces N° 160 da crecimiento abundante, muy arrugado.

- Trozos de zanahoria: Crecimiento muy bueno del substrato, blanco que se vuelve gris ahumado a gris azulado cuando se esporula. Algún exudado amarillo claro. El Streptomyces nivous dió crecimiento moderado, con micelio aéreo blanco, mientras que el Streptomyces sp-spheroides no dió ningún crecimiento.
- 20.

Actividad proteolítica:

- (a) Gelatina: Unos tubos triplicados se inocularon con una aguja y suspensión de esporas. Antes de juzgarlos, los tubos
- 25.



314067

- se mantuvieron durante 1 hora a 3°C y luego se volvieron a la temperatura ambiente. En 7 días no hubo licuefacción, pequeñas colonias blancas en la superficie, con pigmento soluble de color pardo oscuro (matiz 2 pi-pl) inmediatamente debajo de las colonias. A los 14 días, alrededor del 25% de licuefacción, bastante crecimiento en la superficie, más algunas pelias sumergidas en la porción licuefacta; pigmento soluble de color pardo oscuro.
5. Al cabo de 21 días, 100% de licuefacción, color de la gelatina amarillo pardusco (matiz 2 pc), mientras que el color de los
10. tubos de control era matiz 1-1/2 aproximadamente. Tanto el Streptomyces niveus como el Streptomyces spheroides demuestran buen crecimiento en gelatina, pero ningún pigmento soluble. El primero da licuefacción parcial y el segundo licuefacción rápida (3 a 10 días): El Streptomyces № 160 da licuefacción rápida y ningún pigmento soluble. El Streptomyces sp. № 58383 da
15. mal crecimiento en gelatina y ninguna licuefacción.
- (b) Leche: En 2 días, todas las cinco razas de Streptomyces hazoliensis ensayadas dieron una ligera cutícula de crecimiento superficial, de color cremoso; ninguna coagulación ni peptonización; pH con electrodo de vidrio, el mismo que el de los
20. tubos de control, 6,0 a 6,2.

- A los 7 días, todas dan cutículas de crecimiento superficial con buena firmeza y color cremoso hasta pardo claro. Anillo pardo en la pared del tubo; pigmento soluble de color amarillo
25. crema hasta anaranjado claro. Una raza muestra ligera peptoni-



314067

zación; oscala de pH, 5,3 a 5,7 (pH de control., 5,7 a 6,1).

Al cabo de 14 días, buen crecimiento superficial, pero ninguna esporulación; micelio aéreo corcoso, de color crema rosado a pardo claro o lila; no hay coagulación, pero si ligera

5. peptonización. Color anaranjado cremoso (matiz 4 ca-on), en la porción no peptonizada; pH 5,2 a 5,7 (pH de control, 5,6).

El Streptomyces N° 160 da coagulación intensa e intensa peptonización de la leche.

Actividad de nitrato-reductasa:

10. (a) Caldo orgánico: Buen crecimiento a los 14 días, cutícula blanca gruesa; pigmento soluble de color amarillo oscuro, ligera producción de nitrito, que se vuelve intensa al cabo de 21 días; crecimiento superficial denso, que empieza a esporular y es grisáceo.
15. (b) Caldo inorgánico: Crecimiento ligero, sin ninguna reducción durante 14 días; buen crecimiento superficial a los 21 días, pero sin producción de nitrito, y el nitrato está todavía presente. Smith y colaboradores, en "La Streptonivicina, un nuevo antibiótico", Antib. and Chemother. 6, 135-142 (1956),
20. hallan que el Stroptomyces nivcus no da ninguna reducción de nitrato en caldo de nitrato, tanto sintético como nutricional; el Stroptomyces spheroides da solamente una nifria reducción de nitrato-agar a nitrito en 4 días, mientras que el Stroptomyces sp. N° 58383 da producción de nitrito fuertemente positiva.
25. Producción de sulfuro de hidrógeno: Al cabo de 21 horas, los



314067

clivajes mostraron crecimiento muy tenue, pero intenso desarrollo de H_2S ; a los 14 días, colonias de aspecto brillante; el color azul oscuro del medio viró a pardo oscuro.

Tirosina-agar: Todas las 5 razas son positivas a la tirosinasa,

5. con ligero crecimiento en 14 días, micelio aéreo blanco, reverso blanco; ningún pigmento al cabo de 7 días, pero a los 14 días el pigmento es de color gris beige, matiz 4 c6-ge (matiz de control, I-1/2 db).

Utilización de carbono: Se utilizan xilosa, arabinosa, ramosa,

10. glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, rafinosa (\pm), inositol, celobiosa, trehalosa, citrato, malcato y succinato. No se utilizan la inulina, la maltosa, el manitol, el sorbitol, el acetato, el formiato, el oxalato y el tartrato.

Debe observarse que se ha comprobado que el Streptomyces

15. niveus y el Streptomyces spheroides utilizan la inulina, la maltosa, el manitol y el sorbitol, en contraste con el Streptomyces hazoliensis, mientras que no crecieron en medios de citrato o succinato en pruebas paralelas en las que el Streptomyces hazoliensis creció. El Streptomyces niveus utiliza el formiato, el oxalato, el tartrato y el citrato sódico.

Utilización de nitrógeno: Se utiliza L (+)-arginina, No se utilizan la metionina, la sarcosina, la creatina, el ácido amino-isobutírico, la taurina ni la betaina.

Propiedades antagonistas: Produce los antibióticos de sugordomina,

25. pero no se ha comprobado que produzca novobiocina en



314067

ningún caso. Tanto el Streptomyces spheroides como el Streptomyces niveus producen novobiocina, pero no antibióticos de sugordomicina, aún en medios en que el Streptomyces hazeliensis da solamente antibióticos de sugordomicina.

5. En resumen, el Streptomyces hazeliensis difiere morfológicamente tanto del Streptomyces niveus como del Streptomyces spheroides en su carencia de bucles retorcidos en sacacorchos, presentes en las puntas de las esporoforas (Streptomyces niveus) y su carencia de espirales esferoides apretadas y compactas, típicas del Streptomyces spheroides.

- Mientras que el Streptomyces niveus y el Streptomyces spheroides causan muy pronto un agrietamiento y resquebrajamiento característicos de los medios de agar nutricios, el Streptomyces hazeliensis por lo general no los produce. El
15. Streptomyces niveus produce con frecuencia un pigmento soluble en diversos medios de agar, mientras que el Streptomyces spheroides no es generalmente un productor de pigmento. El Streptomyces hazeliensis, por otra parte, no produce en general pigmento, aún menos que el Streptomyces niveus.

20. También se ha descubierto que la composición de los medios en que se cultiva el Streptomyces hazeliensis afecta marcadamente: (A) a la cantidad de antibiótico producida, (b) a la rapidez de formación del antibiótico, y (c) a la clase de mezcla de antibiótico en el caldo.

25. La potencia de los caldos fermentados producidos en



314067

frascos o depósitos se determina por el método usual de difusión de agar en copa y placa, empleando Staphylococcus aureus como organismo de ensayo. (D.C. Grove y W.A. Randall, "Métodos de ensayo de antibióticos", Manual para Laboratorio, Medical

5. Encyclopedía Inc., Nueva York 1955, páginas 7 a 16).

Se asignó arbitrariamente una unidad de actividad a la cantidad de antibiótico que, disuelta en 1 cc de tampón acuoso produjo una zona de inhibición de 18 mm de diámetro en la placa de ensayo. Los propios cilindros tienen 8 mm de diámetro.

10. El antibiótico puro III tiene un valor de referencia de 5500 unidades/ng.

Los guisantes verdes o amarillos hondidos constituyen una fuente superior de nitrógeno. La harina de haba de soja, los granos desecados de los destiladores de maiz, con solubles, la harina de semilla de algodón, la harina de proteína de coco, la harina de aceite de linaza y los solubles de fermentación de maiz desecados, con grano (Soluforn) dieron todos rendimientos regulares hasta buenos, que fueron por lo general inferiores, sin embargo, a los medios que contenían guisantes. La adición a los guisantes de pequeñas cantidades de sulfato ferrosos, ceniza de huesos o sólidos desecados de maceración de maiz (cornsteep) no aumentaron los rendimientos de antibiótico; pero la presencia de CaCO_3 y K_2HPO_4 dió por resultado un aumento en los rendimientos de antibióticos.

25. La adición de un hidrato de carbono a las fuentes : natura



314067

- los de nitrógeno complejo tuvo efectos variables; ciertos hidratos de carbono resultaron nocivos para la producción de antibiótico. Con algunos otros hidratos de carbono, la proporción de carbono a nitrógeno en el medio debe controlarse si se quiere obtener un buen rendimiento de antibiótico. La adición, a un medio de guisantes amarillos, de niveles de 0,25% de sales sódicas de ácidos orgánicos causó en todos los casos de inhibición de la producción de antibiótico. En este experimento se usó un medio basal que contenía 3% de guisantes hendidos amarillos,
- 5.
10. 0,1% de CaCO_3 y 0,1% de K_2HPO_4 .

El efecto de la adición de hidrato de carbono en la producción de antibiótico puede verse en la tabla que se expone abajo, en la cual el medio basal contenía 2% de guisantes hendidos amarillos.

15.

TABLA I

<u>Adición al medio basal</u>	<u>Unidades de S.aureus/cc de caldo completo en 7 días.</u>
1% de almidón de maíz (control)	180
1% de manitol	120
20. 1% de glicerol	50
2% de glicerol	vestigios
1% de maltosa	55
1% de arabinosa	4
1% de ramosa	12
25. 1% de lactosa	18
1% de inositol	3



314067

En los experimentos siguientes, reseñados en la Tabla 2, están presentes 0,1% de CaCO_3 y 0,1% de K_2HPO_4 , además de 2% de guisantes hendidos amarillos, para formar el medio basal.



314067

T A B L A 2

	<u>Adición al medio basal</u>	<u>Unidades de S. Aureus/ cc de caldo completo</u>	<u>Día de rendi- miento máximo</u>
5.	1,0% de almidón de maiz (control)	590	7
	0,5% de almidón de maiz	310	6
	2,0% de almidón de maiz	400	7
	1% de glucosa	230	7
	2% de glucosa	25	7
10.	1% de azúcar moreno	100	7
	2% de azúcar moreno	0	7
	1% de dextrina	360	7
	2% de dextrina	290	5
15.	1% de xilosa	0	7

Efecto de los elementos minerales: Ya se ha señalado antes que la adición de 0,1% de CaCO_3 y K_2HPO_4 da por resultado la producción de mayores rendimientos de antibióticos. Si se omiten tanto el CaCO_3 como el K_2HPO_4 o se aumentan las concentraciones de uno o de ambos hasta el nivel de 0,5%, se originan descensos agudos en el rendimiento de antibiótico. Asimismo, la adición de concentraciones de 0,3% de NaCl o de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ disminuye agudamente el rendimiento de antibióticos.



314067

Generalmente se emplean agentes antiespumosos para controlar la formación de espuma que se origina durante las largas permanencias en el fermentador. Se comprobó que puede usarse cualquier aceite, de una variedad de aceites vegetales

5. como el de cartamo, el de semilla de algodón, el de sésamo, el de coco y el de soja, o de aceites animales, como lardo, ácido oléico, etc., sin que decrezca el rendimiento de antibiótico. Tampoco disminuyeron el rendimiento de antibióticos los antiespumantes de silicona.
10. En la tabla que sigue se compara el rendimiento de antibiótico obtenido en los mismos medios con el Streptomyces hazeliensis, el Streptomyces niveus y el Streptomyces spheroides. Debe observarse que ninguna de las zonas de inhibición producidas por los medios activos de Streptomyces niveus y Streptomyces spheroides era clara o aguda, mientras que las zonas producidas por el Streptomyces hazeliensis eran muy claras y agudas. Estas diferencias de aspecto de las zonas de inhibición sirven también para diferenciar las sugordomicinas de la novobiocina.
- 15.



314067

TABLA 3

Composición del medio, en %	Unidades en placa de <i>Staphylococcus aureus</i> /cc.				
	4 día		6 días		
	<i>Strep. hazeli</i> <i>ensis</i>	<i>Strep. nivous</i>	<i>Strep. spheroides</i>	<i>Strep. hazeli</i> <i>ensis</i>	<i>Strep. nivous</i>
2 de guisantes hendidos; 1 almidón de maiz, 0,1 de CaCO_3 y 0,1 de K_2HPO_4	69	50	47	320	53
4 de licor de maceración de maiz, 5 de glucosa, 0,05 de KH_2PO_4 , 0,3 de NaNO_3 y 0,1 de $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0	0	0	0	vestigios
2 de harina de soja, 2 de azúcar moreno, 0,25 de sólidos desecados de maceración de maiz y 0,1 de K_2OP_4	vestigios	0	0	13	0
2 de solubles desecados de destiladores (Soludri), 2 de glucosa, 0,1 de K_2HPO_4 y 0,1 de CaCO_3	0	54	37	0	69
2,5 de Pharmamodia ¹ y 2,5 de glucosa	0	48	10	0	3
2 de Fermamine ² tipo III, 1 de almidón, 0,1 de K_2HPO_4 y 0,05 de MgSO_4	0	8	19	0	6



314067

¹Pharmamedia es un material de la Traders Oil Mill Co., de Fort Worth, Tejas, a base de harina de semilla de algodón, que contiene 56% de proteína y 24% de hidratos de carbono

5. ²Fermamine es un hidrolizado de proteína enzimática de la Sheffield Chemical Co., de Norwich, N.Y.

- En consecuencia, una modalidad preferida para producir una mezcla de sugordomicinas por el cultivo de Streptomyces hazoliensis tal como se ha definido antes consiste en emplear
10. guisantes hendidos como fuente tanto de carbono como de nitrógeno. Optativamente, y ello es preferible, el cultivo se efectúa en presencia de un 0,05 a un 3%, preferiblemente un 0,1%, de CaCO_3 ; de un 0,01 a un 0,5%, preferiblemente un 0,1% de K_2HPO_4 ; y de un 0,1 a un 3%, preferiblemente de un 1 a un 2%
15. de un hidrato de carbono, por ejemplo un almidón o cualquiera de los azúcares reseñados en la página 13, líneas 1 a 3. El cultivo se lleva a cabo preferentemente durante unos 3 a unos 8 días, con un volumen de aireación de unos 0,5 a unos 10 cfm. por 50 galones de medio y a temperatura de unos 20°C a unos
20. 35°C. La mezcla de antibiótico puede luego aislarse del caldo de fermentación resultantes.

- La mezcla de antibióticos puede aislarse del caldo de fermentación por diversas técnicas. Una consiste en acidificar el caldo (preferentemente con ácido fosfórico, aunque cabe
25. emplear otros ácidos minerales, por ejemplo HCl, H_2SO_4 , etc.)



314067

- a pH del orden de 2 aproximadamente a 7 aproximadamente, y de preferencia a pH de 4 aproximadamente a 4,5 aproximadamente. Se añade luego, si se quiere, un material filtrante, por ejemplo una tierra de diatomáceas, un se filtra el caldo acidificado
5. La torta de filtro así obtenida se suspende en un disolvente orgánico, por ejemplo un alcohol inferior como el metanol, el etanol, el butanol, el isobutanol, etc., acetona, metilisobutilcetona, acetato de butilo o mezclas de estos disolventes, por ejemplo acetona/cloruro de metileno, metanol/benceno, etc.,
 10. con preferencia por el butanol. Luego se filtra o centrifuga la lechada resultante y se neutraliza el filtrado o extracto límpido con un álcali, por ejemplo solución de hidróxido sódico al 50%, hasta pH de 6 aproximadamente a 7 aproximadamente, y se elimina el disolvente, por ejemplo bajo presión reducida y a
 15. temperatura inferior a unos 50°C, para formar un concentrado, por ejemplo hasta una concentración de 1/40 aproximadamente del volumen original. Luego se mezcla este concentrado con un disolvente orgánico no polar, por ejemplo un disolvente hidrocarburo o un éter, como el éter de petróleo de punto de ebullición 60-90°C, benceno, hexano, pentano, éter dietílico, etc.,
 20. lo que hace que la mezcla bruta de antibiótico se precipita en forma de su sal sódica o de una mezcla de su sal sódica y la forma libre, en cuyo estado es fácil de recuperar, por ejemplo mediante sedimentación, filtración, centrifugación, etc.
 25. Otro método que puede usarse para aislar del caldo de



314067

fermentación el antibiótico bruto es separar por filtración las células, acidificar el filtrado con un ácido mineral hasta pH de 1 aproximadamente a 7 aproximadamente y luego poner en contacto el filtrado acidificado con un disolvente inmiscible en agua, como el butanol, el acetato de butilo, el acetato, el éter, el cloroformo, la metilisobutilcetona, etc. Después de separar la capa acuosa, se elimina el disolvente inmiscible en agua, para que quede la mezcla bruta de antibiótico, o, alternativamente, puede pasarse la solución de disolvente inmiscible en agua por un adsorbente (por ejemplo, una resina cambiadora de iones, como Zeo-Karb H, Dowex-50 W, Amberlite IRC-50, Amberlite IR-4, Amberlite IR-100, Ionac A-300, cloruro de Dowex-1, base Dowex-1, formiato de Dowex-1, etc., a carbón activado, etc.), para adsorber la mezcla antibiótica, que luego se separa del adsorbente por elución con un disolvente tal como el metanol, Las células que se han separado por filtración se extraen luego con un disolvente orgánico, como un alcohol inferior, por ejemplo metanol, etanol, butanol, isobutanol, etc.; acetona; acetato de butilo; acetona-cloruro de metileno; metilisobutilcetona; metanol-benceno; etc. A continuación se elimina el disolvente, dejando la mezcla bruta de antibiótico, que entonces puede combinarse con la mezcla de antibiótico obtenida del filtrado anterior.

La sal sódica bruta de la mezcla de antibiótico obtenida antes o el antibiótico ácido bruto se purifican suspendiendo



314067

la mezcla de antibiótico en acetona y tratándola con ácido mineral (por ejemplo, HCl) suficiente para dar un pH ácido, por ejemplo un pH de 2 aproximadamente a 6 aproximadamente y, de preferencia, un pH de 4,0 aproximadamente. Se separa por

5. filtración el material insoluble y se lava con un poco de acetona la torta del filtro. El filtrado y las lavazas, combinados, se evaporan en vacío para formar un concentrado, por ejemplo hasta 1/6 aproximadamente del volumen original, y se añade este concentrado a agua y benceno, lo que proporciona

10. una suspensión de materia sólida en las dos fases líquidas. Se separa por filtración esta suspensión, que es la mezcla libre de antibiótico ácido, se suspende el precipitado en metanol caliente y se enfría la suspensión metanólica. Por filtración, se separa el sólido. Este constituye la mezcla purificada de antibiótico ácido libre.

15.

La mezcla bruta de antibiótico puede purificarse también preparando su sal bencilamínica. La mezcla de antibiótico aislada antes puede disolverse en un disolvente orgánico, por ejemplo n-butanol, acetato de n-butilo, éter, acetato de etilo,

20. etc., y tratarse con un exceso de bencilamina. La sal bencilamínica de la mezcla de antibiótico se precipita y muchas de las impurezas contenidas en la mezcla bruta de antibiótico quedan en el disolvente orgánico. Se separa por filtración la sal bencilamínica precipitada y se obtienen los antibióticos libres

25. separándolos de la sal bencilamínica por tratamiento con un



314067

ácido mineral acuosa, por ejemplo ácido clorhídrico acuoso, seguido por extracción de la mezcla antibiótica libre, aparte del sistema acuoso, por el uso de un disolvente orgánico inmiscible o solo ligeramente miscible con el agua, como acetato de n-butilo, n-butanol, éter, acetato de etilo, etc. Luego se elimina el disolvente inmiscible y se vuelve a precipitar el residuo, por ejemplo en una mezcla caliente de metanol-benceno.

Se han empleado otras aminas con la intención de purificar la mezcla de antibiótico, pero solo la sal bencilamínica ha resultado plenamente satisfactoria. Entre las otras bases que no son satisfactorias figuran el hidróxido cálcico, la procaina, la etilendiamina, la dietanolamina, la monoctanolamina, la N,N'-dibenciletilendiamina, la dimetiletanolamina, la hidroxietilendiamina, la diisobutilamina y la furfurilamina.

La mezcla bruta de antibiótico puede purificarse también distribuyendo la mezcla bruta entre un disolvente orgánico (por ejemplo, acetato de butilo, éter o mezclas de cloroformo o isopropanol, etc.) y una solución tampón acuosa, amortiguada hasta pH de 6,8 aproximadamente a 11 aproximadamente. La mezcla antibiótica se halla en la solución tampón acuosa, de la que puede aislarse por acidificación (por ejemplo, con un ácido mineral como el HCl, el H_2SO_4 , etc) hasta pH de 2 aproximadamente a 5 aproximadamente; la suspensión resultante se extrae con un disolvente orgánico inmiscible o solo ligeramente miscible con el agua (por ejemplo, n-butanol, acetato de n-butilo,



314067

éter, acetato de etilo, etc.) y se recupera el disolvente orgánico, por ejemplo mediante evaporación del disolvente, la mezcla de antibiótico ácida purificada.

La mezcla de antibiótico anterior, purificada por cual-

5. quiera de las técnicas que se han expuesto, puede luego separarse en sus antibióticos componentes, de preferencia por el uso de un sistema de distribución en contracorriente, por ejemplo un sistema de distribución en contracorriente Craig. El disolvente orgánico es un disolvente orgánico inmiscible o solo
10. ligeramente miscible con el agua, por ejemplo n-butanol, acetato de n-butilo, éter, acetato de etilo, cloroformo-isopropanol, etc. La fase acuosa es agua amortiguada hasta pH del orden de 6 aproximadamente a 9 aproximadamente, y de preferencia 8 aproximadamente a 8,9 aproximadamente. Los amortiguadores
15. que pueden emplearse son los que se usan corrientemente para este fin, tales como los amortiguadores de fosfato y borato.

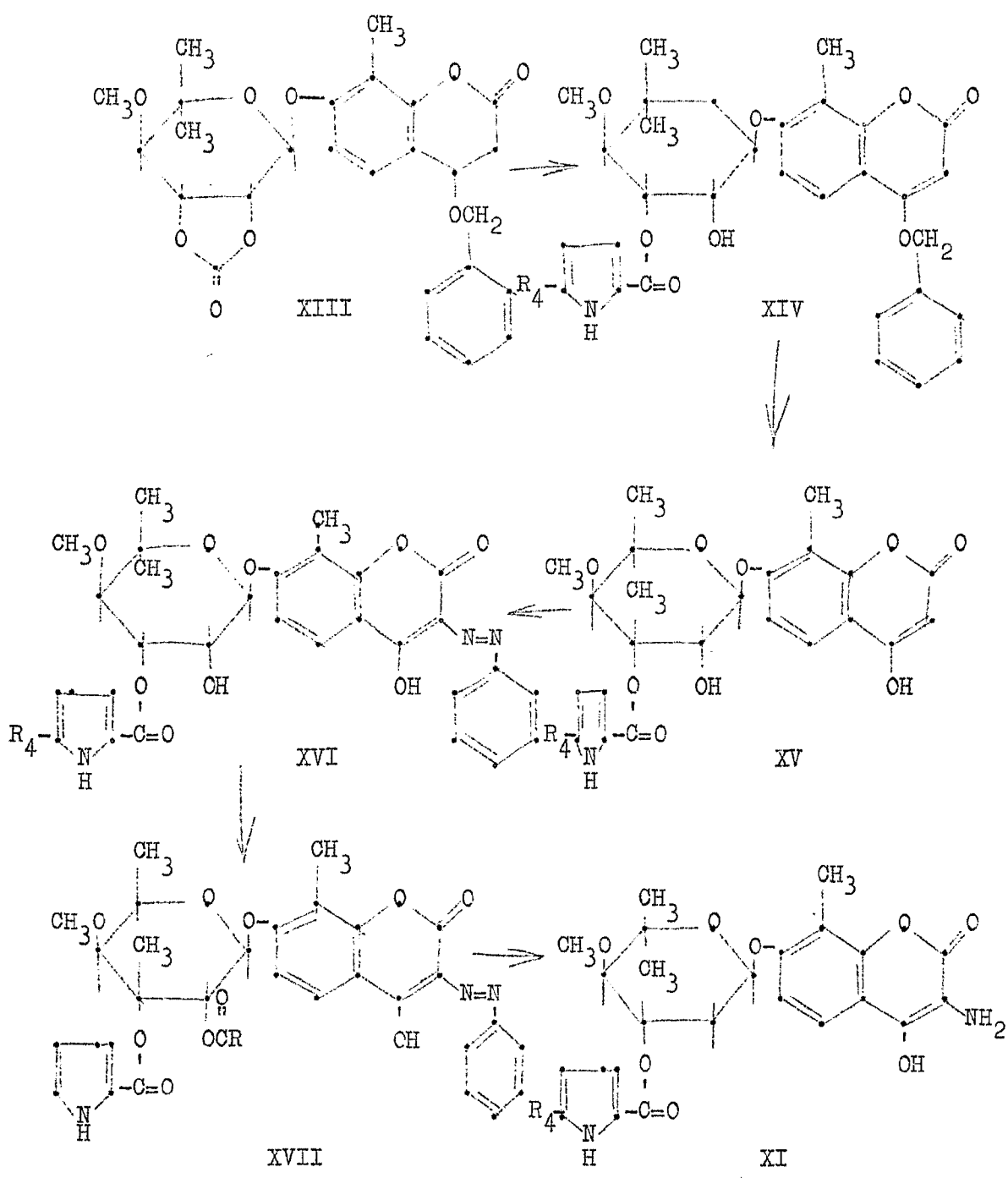
Los compuestos de la fórmula II, que son intermediarios útiles en la vía para la preparación sintética de sugordomicinas tal como aquí se han definido, pueden prepararse conforme

20. al esquema reaccional siguiente:



1965

314067





314067

En el esquema reaccional anterior, los grupos R_3 y R_4 tienen el mismo significado que se ha expuesto precedentemente.

El procedimiento representado en el esquema reaccional anterior puede efectuarse procediendo, por ejemplo, así:

5. (a) Se hace reaccionar 4-benciloxi-7alfa-(2,3-0-carbonil)-noviosiloxi-beta-metil-cumarina (XIII) con un reactivo Grignard de 2-metil-pirrol, es decir un haluro de 2-metil-pirrol-magnesio, de preferencia el bromuro, y descomponiendo el producto de la reacción en una solución ácidoacuosa, por ejemplo solución acuosa de ácido mineral tal como ácido clorhídrico diluido, para formar 4-benciloxi-7alfa-3-0- \int 5'-metil-2'-pirroil7-noviosiloxi-8-metil-cumarina.
15. (b) Se trata este compuesto con hidrógeno, en presencia de un catalizador de hidrogenación, por ejemplo carbón paladiado, etc., para formar 4-hidroxi-7alfa-3-0- \int 5'-metil-2'-pirroil7-noviosiloxi-8-metil-cumarina.
20. (c) Se trata este compuesto con anilina diazoada, para formar 3-bencendiazo-4-hidroxi-7alfa-3-0- \int 5'-metil-2'-pirroil7-noviosiloxi-8-metil-cumarina.
25. (d) Se trata la 3-bencendiazo-4-hidroxi-7alfa-3-0- \int 5'-metil-2'-pirroil7-noviosiloxi-8-metil-cumarina con un agente acilante, es decir, un agente acilante provisto del grupo R_3C (donde R_3 tiene el significado expuesto antes), por ejemplo anhí-



314067

druido acético en piridina, para formar 3-benzodiazol-4-hidroxi-
 -7alfa-2,0-acil-3-O- \int 5'-metil-2'-pirroil \int -noviosiloxi-8-metil-
 -cumarina. Otro agentes acilantes que pueden usarse para
 formar este compuesto incluyen los haluros de acilo, por ejem-
 5. plo el cloruro de acetilo, etc.

(e) Se trata luego la 3-benzodiazol-4-hidroxi-7alfa-
 -2-0-acil-3-O- \int 5'-metil-2'-pirroil \int -noviosiloxi-8-metil-cumari-
 na con hidrógeno, en presencia de un catalizador de hidrogena-
 ción, por ejemplo carbón paladiado, para formar 3-amino-4-
 10. -hidroxi-7alfa-2-0-acil-3-O- \int 5'-metil-2'-pirroil \int -noviosiloxi-
 -8-metil-cumarina.

En una modalidad preferida del invento la reacción de
 los compuestos de la fórmula XI con los compuestos de la fórmu-
 15. la XII se efectua haciendo reaccionar una 3-amino-4-hidroxi-
 -7alfa-2-0-acil-3-O- \int 5'-metil-2'-pirroil \int -noviosiloxi-8-metil-
 -cumarina, donde "acil" es el grupo $R_3\overset{O}{\parallel}C$ antes mencionado con
 R_3 representado tal como se ha definido antes, con un 2,4-dihalo-
 -carbonil-3-metil-pirrol, donde "halo" es cloro o bromo, para
 20. dar el compuesto de la fórmula III.

Los antibióticos de este invento se caracterizan por
 tener gran actividad contra el Staphylococcus aureus. Complemen-
 tariamente, estos antibióticos son activos contra una amplia
 gama de bacterias grampositivas y bacterias gramnegativas,
 25. por ejemplo contra el Acrobacter aerogenes, el Mycobacterium



314067

phlei, el Proteus vulgaris, la Sarcina lutea PCI-1001, etc.

En consecuencia, los antibióticos de este invento son útiles en el tratamiento de las infecciones bacterianas, por ejemplo las causadas por el Staphylococcus aureus. Alternativamente, la mezcla purificada de antibiótico puede usarse

5. terapéuticamente como tal.

Los compuestos de este invento pueden usarse como medicamentos en forma de preparados farmacéuticos que contengan los compuestos, o sus sales, en mezcla con un vehículo farma-

10. céutico orgánico o inorgánico, sólido o líquido, apto para administración entérica (por ejemplo, oral) o parentérica. Para componer los preparados pueden emplearse sustancias que no reaccionen con los compuestos, tales como agua, gelatina, lactosa, almidones, estearato de magnesio, talco, aceites vegetales,

15. gomas, polialquilenglicoles, jalea de petróleo o cualquier otro vehículo conocido que se use para la preparación de medicamentos. Los preparados farmacéuticos puede tener forma sólida, por ejemplo de pastillas, grageas, supositorios o cápsulas, o bien forma líquida, por ejemplo de soluciones, emulsiones o sus-

20. pensiones. Si se desea, pueden estar esterilizados y/o contener sustancias coadyuvantes, tales como agentes de preservación, agentes estabilizadores, agentes humectantes o emulgentes, sales para variar la presión osmótica o amortiguadores.

Asimismo pueden contener, en combinación, otras sustancias de
25. valor terapéutico.



314067

El invento se comprenderá mejor considerando los ejemplos que siguen, los cuales se dan unicamente con fines ilustrativos y no implican límite para el invento.

5. EJEMPLO 1.

- Se almacena Streptomyces hazeliensis en forma de esporos en frascos medicinales, ya sea en tomato-harina de avena-agar, ya sea en forma liofilizada, es decir, esporas
10. liofilizadas en 10% de albúmina de buey o 10% de leche desnatada. Se inocula una suspensión acuosa de esporas en un frasco sacudidor de 6 litros, que contiene 3 litros de medio compuesto de 1% de guisantes hendidos molidos, 1% de almidón de maiz, 0,1% de CaCO_3 , 0,1% de K_2HPO_4 y 0,1% de aceite de lardo y se incuba
 15. a 28°C, durante 3 a 5 días, en un sacudidor giratorio, a 200 r.p.m., hasta que se ha producido un buen desarrollo. La incubación se efectúa en equipo que proporciona la aireación del medio, tal como el frasco sacudidor anterior o un frasco burbujeador aireado. El crecimiento vegetativo obtenido se
 20. inocula en un fermentador de 100 galones que contiene 60 galones de un medio compuesto de 3% de guisantes hendidos, 0,1% de CaCO_3 , 0,1% de K_2HPO_4 , 0,03% de pasta de silicona (pasta Dow-Corning Silicone A) y 0,1% de aceite de lardo. En alternativa, pueden emplearse igualmente bien 60 galones del medio
 25. que se ha descrito antes. Se mantiene el fermentador a 28°C



314067

- durante 3 a 4 días con un promedio de circulación de aire de 8 pies cúbicos por minuto. Durante este tiempo la viscosidad aumenta marcadamente y el pH baja hasta 5,9-6,6. Se transfiere luego el crecimiento anterior a un fermentador de 9000 galones
5. nes que contiene 6000 galones de medio esterilizado, compuesto de 3% de guisantes hendidos molidos, 0,1% de CaCO_3 , 0,1% de K_2HPO_4 y 0,03 a 0,05% de Dow-Corning Silicone A, suspendido en 0,1% de aceite de haba de soja. Se deja que la fermentación se desarrolle a 28°C por 5 a 8 días, según el ensayo
10. biológico in vitro. Se mantiene la aireación al promedio de 25 pies cúbicos de aire por minuto durante las primeras 24 horas, luego 100 pies cúbicos por minuto durante 24 a 72 horas y 150 pies cúbicos por minuto durante 72 a 168 horas. Al cosechar, se acidifica todo el caldo a pH 3,9 por adición de ácido
15. fosfórico siruposo al 85%, seguido por 1650 libras de un material filtrante de diatomáceas, y se filtra el caldo acidificado. La torta del filtro se añade a 2000 galones de n-butanol, agitando vigorosamente. Se deja la lechada butanólica en reposo durante la noche, sin agitación, y luego se la centrifuga. El
20. extracto butanólico límpido se neutraliza a pH 7 aproximadamente con 1482 cc de solución de NaOH al 50% y luego se le somete a evaporación instantánea bajo presión reducida y temperatura inferior a 50°C, hasta un volumen de 50 galones.

Se añade este concentrado a 250 galones de éter de

25. petróleo (de punto de ebullición 60-90°) enérgicamente agitado,



314067

con lo que se separa un precipitado de la sal sódica bruta de la mezcla antibiótica. Esta sal sódica bruta está constituida probablemente por una mezcla de las formas ácida y parcialmente neutralizada de los diversos componentes de la mezcla antibiótica. Se aísla por centrifugación la sal sódica bruta y luego se la seca.

E J E M P L O 2.

Purificación de la sal sódica bruta

10.

(a) Por distribución entre disolvente y tampones

Se suspenden en 1 litro de metanol 50 g de la sal sódica bruta anterior y se agita durante 30 minutos. Luego se separa por filtración el material insoluble y se concentra el filtrado en vacío hasta obtener un jarabe espeso. Se suspende el jarabe espeso en 25 cc de metanol y 625 cc de ácido clorhídrico 0,1-n. Se extrae esta suspensión, por tres veces, con porciones de 1,5 litros de éter, y los extractos etéreos combinados, que totalizan 4,24 litros, se extraen por dos veces con 1,1 litros de tampón de fosfato M/15 a pH 6,2 y luego por dos veces con 1,1 litros de tampón de fosfato M/15 a pH 7,0. Con este tratamiento se extrae poca actividad. Luego se extrae la solución etérea, por dos veces, con 1,1 litros de tampón de fosfato M/15 a pH 7,8, lo que hace que la mezcla antibiótica pase a la fase acuosa. Se rebaja el pH de este extracto hasta 7,0 y se



10

314067

extrae la suspensión con n-butanol, que disuelve el precipitado. Se evapora en vacío el n-butanol y queda una materia sólida. Se suspende esta materia sólida en tampón de fosfato M/15 a pH 6,5, se separa por filtración el material insoluble
5. que es la mezcla antibiótica purificada, y se le seca.

(b) Por preparación de las sales bencilamínicas

Se disuelven en 10 litros de tampón de fosfato disódico M/15 a pH 9,5 100 g de sal sódica bruta. Se separa por filtra-
10. ción el material insoluble con el uso de un material filtrante y se acidifica hasta pH 2,5, con ácido clorhídrico concentrado, el filtrado oscuro. Se extrae esta suspensión con un volumen igual de acetato de butilo, que disuelve el antibiótico precipitado. Luego se concentra en vacío la solución de acetato
15. de butilo hasta 1800 cc, se separa por filtración un poco de materia insoluble y seguidamente se añaden 100 cc de bencilamina disueltos en 100 cc de acetato de butilo. De la sal bencilamínica del antibiótico se separa un precipitado fino. Después de sedimentación, se filtra para recoger el precipitado y se lava
20. éste, primeramente con un poco de acetato de butilo y luego con éter anhidro.

Se disuelven en 140 cc de metanol 20 g de una sal bencilamínica del antibiótico, se añaden 190 cc de agua y se ajusta al pH de la suspensión a 2,5 con ácido clorhídrico. Se
25. añaden luego otros 300 cc de agua para aumentar la fluidez de



40 JUN 1955

- 43 -

314067

- la suspensión y se extrae la mezcla, por dos veces, con porciones de 400 cc de acetato de butilo. Los extractos combinados de acetato de butilo se concentran hasta 800 cc aproximadamente, punto en que el ácido bruto se precipita. Se separa por filtración el sólido y se le lava con metanol frío. Luego se vuelve a precipitar este producto disolviéndolo en metanol caliente y benceno, de los que el antibiótico se separa en forma de un sólido finamente dividido, que funde a 228-230° cuando está seco.
- 5.
10. (c) Por extracción con acetona
- 50 g de la sal sódica bruta anterior se suspenden en 600 cc de acetona, se añaden 30 cc de ácido clorhídrico al 10% y se agita la mezcla durante la noche. Se filtra el material insoluble y ^{se} lava la torta del filtro con un poco de acetona.
15. El filtrado y las lavazas, combinados, se evaporan en vacío hasta unos 100 cc. A este concentrado se añaden 500 cc de agua y 200 cc de benceno, lo que da una suspensión de materia sólida en 2 fases líquidas. El precipitado que se obtiene de este suspensión es la mezcla ácida bruta de antibiótico. Se suspende este precipitado en 100 cc de metanol a 40-50°, se enfria hasta temperatura ambiente y luego se guarda en un refrigerador durante la noche. El sólido que se separa es la mezcla antibiótica purificada.
- 20.



314067

EJEMPLO 3.

Separación de la mezcla antibiótica purificada en sus componentes

5. 5 g de mezcla antibiótica purificada, obtenida por el procedimiento de purificación con acetona (c), se distribuyen en un aparato de distribución en contracorriente Craig de 200 tubos entre una fase acuosa superior de tampón de K_2HPO_4 M/15 a pH 8,2 y una fase orgánica inferior, constituida por
10. partes iguales de alcohol isopropílico y cloroformo. Después de equilibrar las fases de tampón y orgánica, se efectúa la distribución de la manera ordinaria sobre los 200 tubos, cada uno de los cuales contiene 40 cc de cada fase. Esta distribución da una mezcla de los antibióticos III, IV, V y VI en
15. los tubos 1 a 140, y una mezcla de los antibióticos VII, VIII, IX y X en los tubos 141 a 200.

Se extiende luego la prueba a 200 tubos más, esta vez con el tampón a pH 8,9.

- En la fase superior de la prolongación de la prueba
20. (en total, 400 tubos), el antibiótico III (identificado antes) está presente en los tubos 120 a 152. El antibiótico IV o V está presente en los tubos 161 a 170. El antibiótico V o IV está presente en los tubos 185 a 195. No se sabe con certeza qué antibiótico designado IV o V está presente en los tubos
25. 161 a 170 y qué antibiótico está presente en los tubos 185 a



1965

- 45 -

314067

195. Los tubos 153 a 160 contienen una mezcla del antibiótico III y el antibiótico IV o V, y los tubos 171 a 184 contienen una mezcla de los antibióticos IV y V.

En una fase inferior, los tubos contienen la misma distribución de antibióticos que en la fase superior.

Los antibióticos se aislan de la fase de disolvente combinando el contenido de los grupos de los tubos indicados antes; por ejemplo, para la preparación del antibiótico III se combinan los tubos 120 a 152 y se elimina el disolvente por evaporación hasta sequedad. Para la fase de tampón, se acidifica a pH 2,5 el contenido de los grupos de tubos indicados antes, se extrae el antibiótico en butanol o en disolvente de CHCl_3 -alcohol isopropílico(1:1) y se evapora hasta sequedad el extracto de disolvente, con lo que queda el antibiótico como residuo.

El antibiótico III obtenido de la distribución anterior en contracorriente se pasa luego por otros 200 tubos. Se obtienen tres isómeros, uno en los tubos 90 a 100, otro en el tubo 120 y otro en el tubo 140, que indican la presencia de varios isómeros estrechamente relacionados, cuyas estructuras absolutas no se conocen por ahora. Todos estos isómeros son biológicamente activos, por ejemplo manifiestan alto grado de actividad contra el Staphylococcus aureus.

La mezcla de los antibióticos VII, VIII, IX y X aislada anterior se resuelve en una mezcla de los antibióticos VII y



40

- 46 -

314067

- VIII y una mezcla de los antibióticos IX y X por distribución en contracorriente en un aparato de contracorriente Craig de 200 tubos. El sistema disolvente empleado está constituido por partes iguales de la misma fase orgánica empleada antes,
5. o sea una mezcla a volúmenes iguales de alcohol isopropílico y cloroformo, mientras que la fase acuosa es tampón de K_2HPO_4 M/15 a pH 7,0. Se equilibran el disolvente y el tampón, se introduce la mezcla antibiótica anterior (VII-X) en el aparato y se la pasa por los 200 tubos. La mezcla de los antibióticos
10. VII y VIII se centra entorno al tubo 110, y la mezcla de los antibióticos IV y X se centra entorno al tubo 170.

E J E M P L O 4.

15. Se disuelven en 50 cc de piridina absoluta 5,3 g de 3-amino-4-hidroxi-7alfa-2-O-acetil-3-O- Δ^5 -metil-2'-pirroil-7-noviosiloxi-8-metil-cumarina. Con agitación y refrigeración, se añaden a gotas 700 mg de 2,4-diclorocarbonil-3-metil-pirrol, disueltos en 20 cc de tetrahidrofurano absoluto, y se mantiene
20. la solución a la temperatura ambiente durante la noche. Luego se diluye la solución oscura con acetato de etilo, se la lava sucesivamente con H_2SO_4 1-n y con agua, se la seca sobre sulfato sódico y se destila el disolvente en vacío. Quedan
25. 5,6 g de una espuma de color pardo. Se disuelve esta última en unos 80 cc de amoníaco líquido, que se evapora lentamente



1964

- 47 -

314067

- Se disuelve el residuo en agua y una pequeña cantidad de alcohol y se lava la solución con acetato de etilo. Después de acidificar con H_3PO_4 diluido, se extrae el precipitado con acetato de etilo. Se lava la solución con agua, se la seca sobre sulfato sódico y se destila el disolvente. El residuo, una espuma de color pardo, se cristaliza en metanol/benceno; punto de fusión, 234-235°. Después de recristalización en acetonitrilo/acetona, el antibiótico, N,N'-bis { 4-hidroxi-8-metil-7- α -O-metil-5,5-dimetil-3-O-(5'-metil-2'-pirroil)-alfa-L-lixopiranosiloxi-2-oxo-2H-1-benzopirran-3-il } -3-metil-2,4-pirroldicarbodiáxida (III), muestra un punto de descomposición de 238-239° (descomposición).

- Se recristaliza una pequeña muestra en acetoacetato de etilo/dimetilformamida/agua; punto de fusión, 258° (descomposición).

El antibiótico anterior tiene un punto de descomposición que es difícil establecer con exactitud y que depende además del coeficiente de ascenso de la temperatura y del aparato.

- La 3-amino-4-hidroxi-7- α -2-O-acetil-3-O- α -5'-metil-2'-pirroil-noviosiloxi-8-metil-cumarina utilizada como material de partida anteriormente puede prepararse del modo siguiente:

- A una solución de CH_3MgI (preparada a base de 1,25 g de Mg + 3 cc de CH_3I en 50 cc de éter absoluto) se añaden a gotas 8 g de 2-metil-pirrol en 30 cc de éter absoluto. Se somete la solución a reflujo por 10 minutos y se la añade



314067

- despacio a una solución de 4,8 g de 4-benciloxi-2,3-O-carbonil-
-alfa-noviosiloxi7-8-metil-cumarina en 200 cc de benceno abso-
luto. Se forma inmediatamente un precipitado. Se agita la
mezcla durante 30 minutos y luego se añade cuidadosamente ácido
5. clorhídrico diluido. Después de añadir acetato de etilo, se
lava la capa orgánica, sucesivamente, con agua, con KHCO_3
diluido y con agua; se seca sobre sulfato sódico y se destila
el disolvente en vacío. El residuo, 4-benciloxi-7alfa-3-
-O-5'-metil-2'-pirroil7-noviosiloxi-4-metil-cumarina, se
10. cristaliza en benceno. Recristalizado en acetonitrilo, da un
punto de fusión de 131-132° (descomposición).

- 4 g de la 4-benciloxi-7alfa-3-O-5'-metil-2'-pirroil7-
-noviosiloxi-8-metil-cumarina se disuelven en 200 cc de acetato
de etilo y, después de añadir 2 g de carbón paladiado, se hidro-
15. gena la solución. Se gastan 170 cc de H_2 (cantidad teórica,
150 cc). Después de filtrar la solución, se la evapora hasta
sequedad, con lo que se obtienen 3,2 g de un compuesto amari-
lento. Para análisis, se cristaliza en acetonitrilo una
pequeña muestra; punto de fusión, 173-175° (descomposición).

20. Se disuelven 1,6 g de anilina en 120 cc de H_2O + 3,2 cc
de ácido clorhídrico concentrado y se diazoa la solución, a
5°, con 1,1 g de NaNO_2 , disueltos en 10 cc de H_2O . A los 10
minutos de terminada la adición del nitrito, se agrega una
solución de 6,4 g de acetato sódico en 30 cc de H_2O . 5 minu-
25. tos después de añade a gotas, agitando y a 5°, una solución



314067

- de 3,2 g de 4-hidroxi-7alfa-3-0- ζ 5'-metil-2'-pirroil7-noviosiloxi-8-metil-cumarina en 40 cc de alcohol. Se forma un precipitado amarillo. Se prosigue la agitación a 5º durante 3 horas y luego se extrae el precipitado en acetato de etilo, se lava
5. sucesivamente con agua, con ácido clorhídrico 1-n y con agua, se seca la solución sobre sulfato sódico y se destila el disolvente en vacío. El producto, 3-bencendiazo-4-hidroxi-7alfa-3-0- ζ 5'-metil-2'-pirroil7-noviosiloxi-8-metil-cumarina, se cristaliza en benceno; punto de fusión, 174-176º.
10. 6,5 g de la 3-bencendiazo-4-hidroxi-7alfa-3-0- ζ 5'-metil-2'-pirroil7-noviosiloxi-8-metil-cumarina se disuelven en 40 cc de anhídrido acético y 20 cc de piridina y se mantiene la solución a la temperatura ambiente durante 18 horas. Luego se descompone con agua el exceso de anhídrido acético, se
15. extrae con acetato de etilo la solución resultante y se lava la solución de acetato de etilo con HCl 1-n y con H₂O, Después de secar sobre sulfato sódico, se destila el disolvente en vacío. El residuo, 3-bencendiazo-4-hidroxi-7alfa-2-0-acetil-3-0- ζ 5'-metil-2'-pirroil7-noviosiloxi-8-metil-
20. -cumarina, se cristaliza en isopropanol; punto de fusión, 151-153º (descomposición).
25. 5,6 g de la 3-bencendiazo-4-hidroxi-7alfa-2-0-acetil-3-0- ζ 5'-metil-2'-pirroil7-noviosiloxi-8-metil-cumarina se disuelven en 250 cc de alcohol absoluto. Se añade 1 g de carbón paladiado y se hidrogena la substancia. Se gastan



314067

410 cc de H₂ (cantidad teórica, 400 cc). Después de filtrar, se evapora la solución hasta sequedad, se disuelve el residuo en acetato de etilo y se lava la solución con ácido clorhídrico 0,5-n y con agua. Después de secar sobre sulfato sódico,

- 5. se destila el disolvente en vacío. Quedan 5,3 g de una espuma de color pardo amarillento, que es la 4-amino-4-hidroxi-7alfa-
-2-0-acetil-3-0- $\sqrt{5}$ '-metil-2'-pirroil $\sqrt{7}$ -noviosiloxi-8-metil-
-cumarina.

10. E J E M P L O 5.

Preparación de pastillas que contienen:

- | | |
|--|---|
| <p>N,N'-bis { 4-hidroxi-8-metil-7-$\sqrt{4}$-0-metil-5,5$\sqrt{7}$
-dimetil-3-0-(5'-metil-2-pirroil)-alfa-L-</p> <p>15. -lixopiranosiloxi$\sqrt{7}$-2-oxo-2H-1-benzopiran-
-3-il } -3-metil-2,4-pirroldicarboxamida</p> <p>Fosfato dicálcico</p> <p>Almidón de maiz</p> <p>Estearato de magnesio</p> <p>20.</p> | <p>100 mg</p> <p>60 mg</p> <p>157 mg</p> <p>3 mg</p> <hr style="width: 50%; margin-left: auto; margin-right: 0;"/> <p>320 mg.</p> |
|--|---|

- Se mezcla homogéneamente la substancia activa con el fosfato dicálcico, el almidón de maiz y el estearato magnésico, se pasa la mezcla por una máquina desmenuzadora y se forman trociscos en una máquina compresora de pastillas. Se desmenu-
- 25. zan los trociscos hasta un tamaño de mallas apropiado (tamiz



314067

Nº 16, correspondiente a una abertura de mallas de 1,19 mm aproximadamente) y se mezcla bien. Con la mezcla completa se comprimen pastillas del peso indicado.

5. EJEMPLO 6.

Preparación de ampollas:

10. Se hace la preparación en ampollas dobles, de las que una contiene el medicamento seco y la otra contiene agua para inyección:

15. N,N'-bis {4-hidroxi-8-metil-7- β -4-O-metil-5,5-dimetil-3-O-(5'-metil-2-pirrolil)-alfa-L-lixopiranoxi} -2-oxo-2H-1-benzopiran-3-il } -3-metil-2,4-pirrolidicarboxamida 500 mg

Se envasa en las ampollas compuesto activo de una calidad exenta de fibras, se cierran las ampollas y se esterilizan éstas a 125°C durante 2 horas.

20. Inmediatamente antes del uso, se solubiliza el polvo con la solución siguiente:

Agua para inyección 5 cc.



314067

E J E M P L O 7.

Preparación de cápsulas que contienen:

5.	N,N'-bis { 4-hidroxi-8-metil-7- 4 -O-metil-5,5- -dimetil-3-O-(5-metil-2-pirrolil)-alfa-L- -lixopiranosiloxi 7 -2-oxo-2H-1-benzopiran- -3-il } -3-metil-2,4-pirrolidicarboxamida	100 mg
	Almidón de maiz	200 mg
	Talco	<u>10 mg</u>
10.		310 mg

Se mezcla homogéneamente el compuesto activo con el almidón de maiz, se pasa la mezcla por una máquina desmenuzadora y se combina con el talco. Se envasa la mezcla en cápsu-

15. las de gelatina de cáscara dura, Nº 1.

= . =



= 53 =

314067

N O T A

Hecha la descripción del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención, las siguientes reivindicaciones:

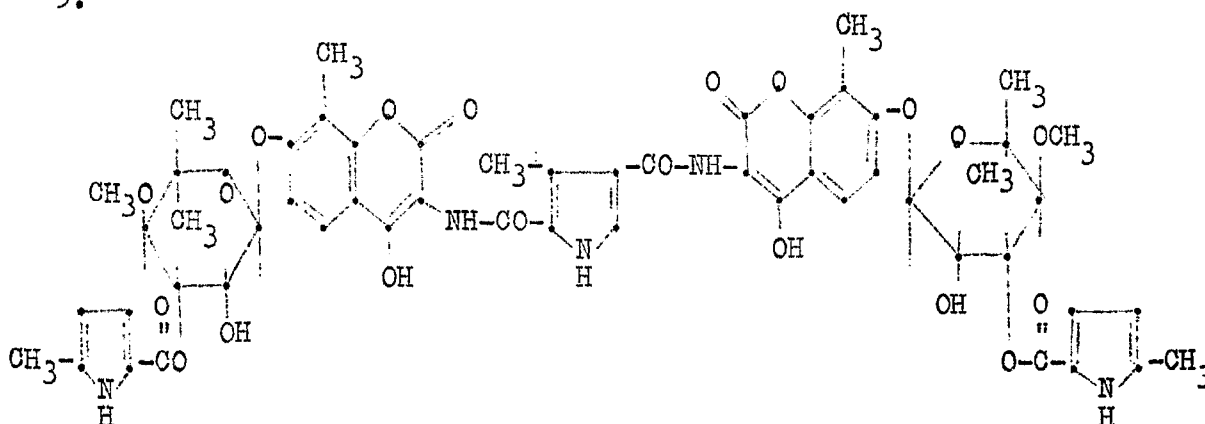
1. Un procedimiento para producir una mezcla antibiótica, caracterizado por cultivarse el organismo Streptomyces hazeliensis, en condiciones aerobias sumergidas, en un medio nutritivo acuoso que comprende fuentes de carbono orgánico y de nitrógeno y por recuperarse del caldo de fermentación una mezcla antibiótica.
- 5.
10. 2. Un procedimiento como se define en la reivindicación 1, caracterizado en que la mezcla antibiótica se recupera por extracción del caldo límpido y el crecimiento micelial con un disolvente.
15. 3. Un procedimiento como se define en las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado en que el medio nutritivo contiene complementariamente sales inorgánicas y el organismo se cultiva por unos 2 a unos 8 días, hasta que se imparte a dicho medio actividad antimicrobiana importante, después de lo cual



se recupera del caldo de fermentación la mezcla antibiótica formada y se la separa en sus componentes antibióticos.

4. Un procedimiento como se define en la reivindicación 3, caracterizado en que se aísla un antibiótico de la fórmula

5.



15. por distribución en contracorriente sobre sistemas múltiples de disolvente, que comprenden una capa de disolvente orgánico, que es a lo sumo ligeramente miscible con el agua, y una capa acuosa, amortiguada a pH del orden de 6 aproximadamente a 9 aproximadamente.

20. 5. Un procedimiento para la preparación de una sustancia antibiótica, caracterizado por hacerse reaccionar un compuesto de la fórmula

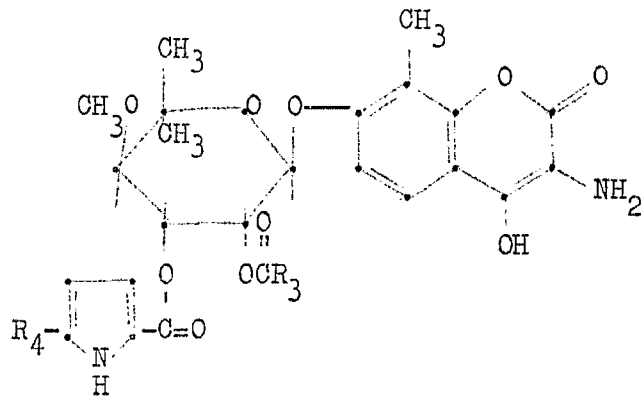


1965

= 55 =

314067

5.



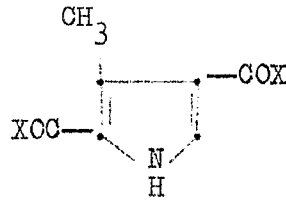
10.

donde R_3 se toma del grupo constituido por alquilo, aralquilo, fenilo, fenilo sustituido por alquilo, y fenilo sustituido por halógeno, y R_4 se toma del grupo constituido por hidrógeno y metilo,

15.

con un compuesto de la fórmula

20.



donde X se toma del grupo constituido por el cloro y el bromo,

25. y, si se desea, por hacerse reaccionar con una base farmáceu-



= 56 =

314067

ticamente aceptable el producto así obtenido.

6. Un procedimiento como se define en la reivindicación 5, caracterizado en que R_4 es metilo.

5. 7. Un procedimiento como se define en la reivindicación 6, caracterizado en que el material de partida de la fórmula XI, en el que R_4 es un grupo metílico, se prepara por un procedimiento que comprende las etapas de:

10. (a) hacer reaccionar 4-benciloxi-7alfa-(2,3,0--carbonil)-noviosiloxi-8-metil-cumarina con haluro de magnesio-2-metil-pirrol y descomponer el producto de la reacción con un ácido acuoso, para formar 4-benciloxi-7alfa-3-0- \surd 5'-metil-2'-pirroil-7-noviosiloxi-8-metil-cumarina,

15. (b) tratar este último compuesto con hidrógeno, en presencia de un catalizador de hidrogenación, para formar 4-hidroxi-7alfa-3-0- \surd 5'-metil-2'-pirroil-7-noviosiloxi-8-metil-cumarina,

20. (c) hacer reaccionar este último compuesto con anilina diazoada, para formar 3-bencendiazo-4-hidroxi-7alfa-3-0- \surd 5'-metil-2'-pirroil-7-noviosiloxi-8-metil-cumarina,

(d) hacer reaccionar este último compuesto con un agente acilante, para formar 3-bencendiazo-4-hidroxi-7alfa-2-0-acil-3-0- \surd 5'-metil-2'-pirroil-7-noviosiloxi-8-metil-cumarina, y

25. (e) hacer reaccionar este último compuesto con hidró-



= 57 =

314067

geno, en presencia de un catalizador de hidrogenación, para obtener 3-amino-4-hidroxi-7alfa-2-O-acil-3-O- $\sqrt{5}$ '-metil-2'-pirroil-noviosiloxi-8-metil-cumarina.

8. Un procedimiento como se define en la reivindicación 5. 7, caracterizado en que el grupo acilo es acetilo.

9. Un procedimiento para producir una mezcla antibiótica.

Según se describe y reivindica en la presente memoria que consta de 58 hojas, foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 10 JUN. 1965

P. a.

JAIME ISERN

P. P.