31 MAR 1967

338725

M E M O R I A D E S C R I P T I V A

por

una Patente de Invención

por veinte años en España,

a favor de:

THE UPJOHN COMPANY

(sociedad EE.UU.)

residente en

Kalamazoo, Michigan (EE.UU.)

301 Henrietta Street

por:

"PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR KALAMICINA"

- - - - -

INVENTORES: Malcolm Edward Bergy, John Henry Coats, Ladislav James Hanka y LeRoy Emanuel Johnson, de nacionalidad norteamericana.

- - - - -

PRIORIDAD: Solicitud Patente EE.UU. Serial No. 539.465 del día 1 de Abril de 1966.

- - - - - -

31 MAR 1967

338725

Esta invención se refiere a una nueva composición de materia y a un proceso para la producción de la misma. Más particularmente, esta invención se refiere a un nuevo compuesto, kalamicina (U-19,718), y a un proceso para la producción del mismo.

La kalamicina es un compuesto químico que se produce por cultivo de una actinomiceta productora de kalamicina en un medio nutritivo acuoso. Es un compuesto ácido, que tiene la propiedad de afectar adversamente el crecimiento de bacterias grampositivas y gramnegativas, por ejemplo, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Streptococcus faecalis, Streptococcus hemolyticus, Diplococcus pneumoniae, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Klebsiella pneumoniae, Salmonella schottmuelleri, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas phaseolicola, Xanthomonas pruni, y Erwinia amylovora. Kalamicina también tiene actividad antifungosa contra varios hongos, por ejemplo, Blastomyces dermatitidis, Cryptococcus neoformans, Trichopyton rubrum, Trichophyton violaceum, Trichophyton asteroides, Trichophyton mentagrophytes, Fusarium oxysporum f. cubense, y Alternaria solani. Por lo tanto, kalamicina puede usarse sola o en combinación con otros agentes antibióticos para prevenir el crecimiento o reducir el número de bacterias y hongos, como se revela anteriormente, en diversos ambientes. Por ejemplo, puede ser usada como un desinfectante de diversos equipos dentales y médicos contaminados con Staphylococcus aureus. También es útil como un agente antifungoso en preservativos industriales, por ejemplo, como un enjuague antifungoso para ropas lavadas y para impregnar papeles y géneros;

31 MAR. 1961

338725

y es útil para suprimir el crecimiento de hongos de los ensayos en placa de microorganismos sensibles y otros medios biológicos. Kalamicina también puede usarse como un suplemento de la alimentación para promover el crecimiento de animales, por ejemplo, mamíferos, aves, peces y reptiles.

PROPIEDADES QUIMICAS Y FISICAS DE KALAMICINA

La kalamicina cristalina tiene las siguientes propiedades químicas y físicas:

Color: anaranjado

Análisis elemental: C, 63.80; H, 4.07; O, 31.81,

Fórmula empírica: $C_{16}H_{12}O_6$.

Peso Molecular: 288 (titulación)

300 (espectrómetro de masa)

Punto de fusión: 163-166° C

Espectro de absorción ultravioleta:

Metanol: máx. a 212 mμ, a = 138.58

máx. a 256 mμ, a = 36.72

inflex. a 268 mμ a = 35.19

max. a 425 mμ, a = 14.84

HCl .01 N en Metanol:

max. a 212 mμ, a = 133.04

max. a 256 mμ, a = 36.66

inflex. a 268 mμ, a = 34.81

max. a 425 mμ, a = 14.86

Agua: max. a 213 mμ, a = 124.42

14 MAR. 1967

338725

inflex. a 260 mμ, a = 37.41

max. a 265 mμ, a = 37.55

max. a 428 mμ, a = 13.67

KOH .01 N: max. a 219 mμ, a = 110.46

max. a 275 mμ, a = 35.97

max. a 525 mμ, a = 16.58

Espectro infrarrojo: El espectro de absorción infrarrojo de kalamicina suspendida en aceite mineral se reproduce en el dibujo de Figura 1. Kalamicina muestra bandas a las siguientes longitudes de onda expresadas en cm^{-1}.

3640 (D)	1595 (D)	1298 (M)
3550 (D)	1575 (D)	1285 (F)
2950 (F) (aceite)	1478 (D)	1281 (M)
2920 (F) (aceite)	1458 (M) (aceite)	1265 (M)
2850 (F) (aceite)	1452 (F)	1258 (M)
1837 (D)	1416 (D)	1246 (F)
1807 (D)	1406 (D)	1237 (M)
1772 (F)	1399 (D)	1211 (F)
1760 (F)	1376 (M) (aceite)	1200 (M)
1728 (D)	1365 (M)	1195 (M)
1666 (F)	1355 (M)	1185 (D)
1653 (F)	1340 (M)	1158 (F)
1648 (F)	1315 (F)	1110 (M)
1625 (F)	1306 (M)	1096 (M)

338725

1076 (M)	928 (D)	796 (D)
1063 (M)	903 (M)	783 (F)
1056 (M)	890 (D)	753 (F)
1030 (M)	864 (M)	737 (M)
1019 (D)	845 (D)	708 (F)
993 (M)	837 (M)	698 (M)
972 (D)	802 (D)	778 (M)
		776 (M)

Las intensidades de banda se indican como "F", "M" y "D", respectivamente y son aproximadas en base al fondo del espectro en la vecindad de la banda. Una banda "F" es del mismo órden de intensidad que la banda más fuerte en el espectro; las bandas "M" tienen entre un tercio y dos tercios la intensidad de la banda más fuerte y las bandas "D" tienen menos de un tercio la intensidad de la banda más fuerte. Estos cálculos se hacen en base a una escala de porcentaje de transmisión.

La kalamicina tiene un trazado característico en cromatografía de papel como se muestra en el dibujo de Figura II cuando se usan los siguientes sistemas solventes:

I. 1-butanol, agua (84:16), 16 horas.

II. 1-butanol, agua (84:16), más ácido p-toluenosulfónico 0.25%, 16 horas.

III. 1-butanol, ácido acético, agua (2:1:1), 16 horas.

IV. Piperidina al 2% (v/v) en 1-butanol, agua (84:16), 16 horas.

MAR 1967

338725

V. 1-butanol, agua (4:96), 5 horas.

VI. 1-butanol, agua (4:96) más ácido p-toluenosulfónico 0.25%, 5 horas.

EL MICROORGANISMO

La actinomiceta usada de acuerdo con esta invención para la producción de kalamicina es una cepa recientemente aislada del conocido microorganismo Streptomyces tanashiensis. Esta cepa recientemente aislada fue designada como Streptomyces tanashiensis cepa Kala. Una de las características de esta cepa es la producción de kalamicina bajo las condiciones de fermentación que se revelan posteriormente. Puede obtenerse un subcultivo de Streptomyces tanashiensis cepa Kala de la colección permanente de la Northern Utilization Research and Development Division, Agricultural Research Service, Departamento de Agricultura de los E.U.A., Peoria, Illinois. Su número de identificación en ese depósito es NRRL 3215.

La semejanza de Streptomyces tanashiensis cepa Kala con la descripción comunicada de Streptomyces tanashiensis (Ver Waksman, The Actinomycetes, Vol. 2, 1961 en la página 279) provocó la comparación de los dos microorganismos bajo las condiciones de fermentación reveladas a continuación. Estas pruebas demostraron que en S. tanashiensis, NRRL B-1692, producía kalamicina en cantidades suficientes para ser detectadas por cromatografía en papel. Sin embargo, la producción de kalamicina por cualquier cepa de Streptomyces tanashiensis, incluyendo NRRL B-1692, no se había informado hasta ahora en la materia.

31 MAR 1961

338725

El S. tanashiensis cepa Kala es melanina positivo, tiene crecimiento aéreo de color gris a gris rosado, y tiene esporóforos rectos a flexuosos que llevan esporos irregulares que pueden aparecer hialinos en el centro y oscuros en los polos al exámen directo. Se desarrollan mejor a 18-28°C.

El nuevo compuesto de la invención es producido cuando el microorganismo elaborador se desarrolla en un medio nutritivo acuoso bajo condiciones aeróbicas de inmersión. Debe entenderse también que para la preparación de cantidades limitadas, pueden emplearse cultivos de superficie en frascos. El organismo se desarrolla en un medio nutritivo conteniendo una fuente de carbono, por ejemplo, un carbohidrato asimilable y una fuente de nitrógeno, por ejemplo, un compuesto de nitrógeno asimilable o material proteíco. Las fuentes de carbono preferidas incluyen glucosa, azúcar morena, sacarosa, glicerol, almidón, almidón de maíz, lactosa, dextrina, melasas y semejantes. Las fuentes de nitrógeno preferidas incluyen licor de macerado de maíz, levadura, levadura de cerveza autolizada con los sólidos de la leche, harina de soja, harina de semillas de algodón, harina de maíz, sólidos de la leche, digerido pancreático de caseína, sustancias solubles de destilería, licores de peptona animal, restos de carne y huesos y semejantes. Puede usarse ventajosamente una combinación de estas fuentes de carbono y nitrógeno. Los oligo metales, por ejemplo, zinc, magnesio, manganeso, cobalto, hierro y semejantes, no deben necesariamente agregarse al medio de fermentación, puesto que el

338725

agua corriente y los ingredientes impuros son usados como componentes del medio.

La producción del compuesto de la invención puede efectuarse a cualquier temperatura que conduzca a un crecimiento satisfactorio del microorganismo, por ejemplo, entre unos 18° y 40° C y preferentemente entre unos 20° y 32°C. Ordinariamente, se obtiene la producción óptima del compuesto en unos 2 a 10 días. El medio normalmente se mantiene muy cerca de la neutralidad, o del lado alcalino durante la fermentación. El pH final depende, en parte, de los amortiguadores presentes, si hay alguno y en parte del pH inicial del medio de cultivo que se ajusta ventajosamente a aproximadamente pH 7.2 antes de la esterilización.

Cuando el desarrollo se lleva a cabo en grandes recipientes y tanques, es preferible usar la forma vegetativa, en lugar de la forma esporo, del microorganismo para inoculación, para evitar una demora pronunciada en la producción del nuevo compuesto y la concomitante utilización ineficaz del equipo. Por consiguiente, es preferible producir un inóculo vegetativo en un cultivo de caldo nutritivo, inoculando el caldo de cultivo con una alícuota de un cultivo de suelo o de cultivo en agar inclinado. Cuando se ha conseguido así un inóculo vegetativo activo jóven, este se transfiere asépticamente a grandes recipientes o tanques. El medio en el cual se produce inóculo vegetativo puede ser el mismo o diferente del utilizado para la producción del nuevo compuesto, siempre que este sea tal en que pueda obtenerse un buen desarrollo del microorganismo.

31 MAR 1967

338725

El nuevo compuesto de la invención es una sustancia química ácida que tiene la fórmula $C_{16}H_{12}O_6$. Es soluble en acetato de etilo, acetato de amilo, acetato de butilo, y semejantes ésteres alifáticos; acetona, metil etil cetona, isopropil butil cetona, y semejantes alcanonas inferiores; cloroformo, cloruro de metileno, y semejantes hidrocarburos halogenados; y dimetil sulfóxido. La kalamicina también tiene un grado de solubilidad aceptable en alcanoles inferiores, por ejemplo, metanol, etanol, isopropanol, los butanoles y semejantes. Es relativamente insoluble en agua, ciclohexano y éter.

Pueden emplearse una variedad de procedimientos en la aislación y purificación de kalamicina, por ejemplo, extracción con solvente, cromatografía en silica gel, distribución líquido-líquido en un aparato Craig y cristalización de solventes. Los procedimientos de extracción con solvente son preferibles para la recuperación comercial puesto que consumen menos tiempo y son más económicos. La cromatografía con silica gel es el procedimiento de purificación preferido.

En un proceso de recuperación preferido, kalamicina se recupera de su medio de cultivo por separación del micelio y sólidos no disueltos por medios convencionales tales como por filtración o centrifugación. El antibiótico se separa del caldo filtrado o centrifugado por extracción. Para la extracción de la kalamicina del caldo filtrado, pueden utilizarse solventes en los cuales es soluble como se indicó anteriormente. Se prefiere como solvente

31 MAR 1967

338725

de extracción el cloruro de metileno. El extracto obtenido por extracción con cloruro de metileno puede concentrarse al vacío hasta una solución acuosa, que a su vez puede secarse por congelación para proporcionar directamente el antibiótico impuro. Esta preparación puede usarse en ambientes en que no es necesaria alta pureza del antibiótico.

La kalamicina puede extraerse del producto de fermentación filtrado a pH entre aproximadamente 5.0 a 7.0. A pH acuosos de aproximadamente 10.0 y mayores, no se extrae kalamicina apreciablemente en los solventes anteriores en los cuales es soluble. Usando esta propiedad, kalamicina puede extraerse a un pH menor de 9.0 con uno de los solventes anteriores en los cuales es soluble. Puede entonces ser nuevamente extraída con agua a un pH mayor de 10.0 y luego reextraída a un pH menor de 9.0 en un solvente en el cual es soluble. El extracto final puede entonces concentrarse hasta sequedad para proporcionar una preparación impura de kalamicina.

Alternativamente, kalamicina puede separarse del medio de cultivo usando una resina de intercambio aniónica fuertemente básica. Las resinas de intercambio aniónico adecuadas para este propósito se obtienen por clorometilación por el procedimiento dado en páginas 88 y 97 de Kunin, Ion Exchange Resins, 2da. Ed. (1958), John Wiley and Sons, Inc., de poliestireno unido con ligaduras cruzadas, si se desea, con divinil benzeno, preparado por el procedimiento dado en página 84 de Kunin, supra y cuaternando con trimetilamina o dimetiletanolamina por el procedimiento dado en página 97 de Kunin,

supra. Las resinas de intercambio aniónico de este tipo se obtienen en el comercio bajo los nombres de fábrica Dowex 1, Dowex 2, Dowex 3, Amberlite IRA-400, Duolite A-102, y Permutit S-1.

Como una otra alternativa, kalamicina puede recuperarse del medio de cultivo filtrado o del extracto orgánico por técnicas de adsorción, empleando adsorbentes tales como ácido silícico, carbón decolorante o resina decolorante (una resina decolorante adecuada es Permutit DR, Patente E.U.A. 2,702,263), alúmina y Florisil (un silicato sintético del tipo descrito en Patente E.U.A. 2,393,625 y vendido por la Floridin Co.). El antibiótico adsorbido puede eliminarse del adsorbente en forma relativamente pura por elución con un solvente orgánico adecuado, por ejemplo, uno de aquellos mencionados anteriormente en los cuales la kalamicina es soluble.

La kalamicina de alta pureza puede obtenerse sometiendo una preparación seca impura de kalamicina, como se describe anteriormente, a la cromatografía con silica gel y cristalización usando solventes tales como acetato de etilo y ciclohexano para desarrollar la columna. Las fracciones obtenidas de cromatografía con sílica gel pueden concentrarse para obtener kalamicina cristalina.

Se forman sales de kalamicina empleando el ácido libre de kalamicina y una base inorgánica u orgánica. Las sales de kalamicina pueden prepararse, como por ejemplo, disolviendo la kalamicina ácido libre en agua, agregando una base diluída hasta que el pH de la solución sea alrededor de 10.0 a 11.0 y secando por congelación la solución para proporcionar un residuo seco compuesto de la sal -

31 ABR 1967

338725

kalamicina. Las sales de kalamicina que pueden formarse incluyen - las sales de sodio, potasio y calcio. Otras sales de kalamicina, - incluyendo aquellas con bases orgánicas tales como monoaminas primarias, secundarias y terciarias, como también con poliaminas, pueden formarse asimismo usando los procedimientos descritos anteriormente u otros comunmente empleados. Otras sales valiosas se obtienen con bases terapéuticamente eficaces que imparten a la misma efectos terapéuticos adicionales. Tales bases son, por ejemplo, las bases purínicas tales como teofilina, teobromina, cafeína o derivados de tales bases purínicas; bases antihistamínicas que pueden formar sales con ácidos débiles; compuestos de la piridina tales como amida del ácido nicotínico, hidrazida del ácido isonicotínico y semejantes; - fenilalquilaminas tales como adrenalina, efedrina y semejantes; colina y otras. Las sales de kalamicina pueden usarse para los mismos propósitos biológicos que el ácido libre.

La kalamicina tiene un amplio espectro antibacteriano como se demuestra en Tabla I. El espectro antibacteriano fue determinado usando un procedimiento de ensayo por dilución en tubo, siendo el medio BHI (Brain Heart Infusion Broth, Difco, Detroit, Michigan) (Caldo Infusión de Corazón y Cerebro, Difco, Detroit, Michigan). Los tubos de ensayo (18 x 150 mm) se prepararon de la manera acostumbrada como se detalla en Snell, E.E., Vitamin Methods, Vol I, Academic Press, Inc., New York 1950, página 327. Los organismos de ensayo desarrollados durante 18 horas a 37°C, se usaron para inocular el medio de ensayo. Los endayos fueron leídos a las 20 horas.

338725

31 MAR 1967

TABLA I

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE KALAMICINA

ORGANISMO DE ENSAYO	CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA EN MCG./ML.
Staphylococcus aureus	2
Streptococcus hemolyticus	16
Streptococcus faecalis	4
Escherichia coli	250
Proteus vulgaris	125
Klebsiella penumoniae	250
Salmonella schottmuelleri	125
Pseudomonas aeruginosa	125
Bacillus subtilis	1
Diplococcus pneumoniae	1
Saccharomyces pastorianus	8

La kalamicina tiene una actividad antifungosa como se muestra en Tabla II. El espectro antifungoso se determinó por ensayo en placa por dilución en agar.

TABLA II

ACTIVIDAD ANTIFUNGOSA DE KALAMICINA

MICROORGANISMO DE ENSAYO	CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA EN MCG./ML.
Nocardia asteroides	1
Coccidiodes immitis	1
Blastomyces dermatitidis	1

31 MAR 1967

338725

Geotrichum sp.	10
Hormodendrum compactum	1
Phialophora verrucosa	10
Histoplasma capsulatum	1
Cryptococcus neoformans	1
Sporotrichum schenckii	10
Monosporium apiospermum	10
Trichophyton rubrum	1
Candida albicans ABBOTT	10
Trichophyton violaceum	10
Trichophyton interdigitale	10
Trichophyton asteroides	10
Trichophyton mentagrophytes	10

La kalamicina también tiene actividad antiprotozoario ya que inhibe en pruebas in vitro a los protozoarios Ochromonas danica y Tetrahymena pyriformis. La kalamicina se colocó en discos de papel de 12.7 mm. que fueron luego colocados sobre bandejas de agar - previamente sembradas con los microorganismos de ensayo. Las bandejas se incubaron a la temperatura ambiente y las lecturas se hicieron a las 24 horas.

El nuevo compuesto de la invención, kalamicina, es activo contra Bacillus subtilis y puede utilizarse para disminuir o prevenir el olor en pescados y cajones de pescados, causado por este microorganismo. También puede usarse para tratar lugares de cria de gusanos de seda para evitar o disminuir las infecciones causadas -

31 MAR 1967

338725

por este microorganismo. También, puesto que kalamicina es activa contra Cryptococcus neoformans, puede ser usada para tratar los palomares para inhibir este hongo que ha sido encontrado en las materias fecales de la paloma. (Journal of the American Medical Association, Vol. 191, No.4, Enero 25, 1965, páginas 269-274). El nuevo compuesto de la invención también puede usarse como el agente antifungoso en las palas de los zapatos, que fue indicado en Patente - E.U.A. 3,130,505. Además, el nuevo antibiótico de la invención - puede usarse para fregar las mesas y equipo de laboraorio en un laboratorio micológico.

La kalamicina puede usarse para controlar y erradicar varios hongos y bacterias patógenas de las plantas y sus frutos. Por ejemplo, kalamicin puede usarse para controlar y erradicar el marchitamiento de la papa que es causado por Alternaria solani;enfermedades de las rosas y marchitamiento de peras y manzanos causados - por Erwinia amylovora; las manchas negras de ciruelas, albaricoques, y melocotones causados por Xanthomonas pruni; el marchitamiento en halo de las habas causado por Pseudomonas phaseolicola; y la enfermedad de Panama de las bananas (marchitamiento de la banana) causado por Fusarium oxysporum f. cubense.

Los ejemplos siguientes son ilustrativos del proceso y - productos de la presente invención, pero no deben ser interpretados como límite de la misma. Todos los porcientos se dan en peso y todas las proporciones de mezcla de solvente se dan en volumen, salvo que se indique de otra manera.

31 MAR 1960

338725

Ejemplo 1

A. Fermentación

Un cultivo madre de suelo de Streptomyces tanashiensis cepa Kala, NRRL 3215, se usó para inocular una serie de frascos - Erlenmeyer de 500 ml, conteniendo cada uno 100 ml de un medio de cultivo estéril compuesto por los siguientes ingredientes:

Glucosa monohidratada	25 g/litro
Farmamedia*	25 g/litro
Agua corriente c.s.p.	Diferencia

* Farmamedia es una harina de semillas de algodón de grado industrial producida por Trader's Oil Mill Company, Fort Worth, Texas.

Los frascos se desarrollaron durante tres días a 28° C - en un agitador rotatorio Gump, operando a 250 r.p.m.

El inóculo de siembra, descrito anteriormente, se usó para inocular una serie de frascos Erlenmeyer de 500 ml., conteniendo cada uno 100 ml del medio de fermentación estéril. La proporción - de inoculación fue 5 ml de inóculo de siembra por 100 ml de medio - de fermentación. El medio de fermentación estaba compuesto por los siguientes ingredientes:

Glucosa monohidratada	25 g/litro
Licor de Peptona Wilson No.159*	5 g/litro
Carbonato de calcio	5 g/litro
Agua corriente, c.s.p.	Diferencia

* El Licor de Peptona Wilson No.159 es una preparación de proteínas hidrolizadas de origen animal.

31 MAR 1967

338725

El pH del medio de fermentación se ajusta a 7.2 con una solución acuosa de hidróxido de sodio.

Los frascos de fermentación inoculados, descritos anteriormente, se incubaron durante 5 días a una temperatura de 32° C en un agitador rotatorio Gump operando a 250 r.p.m.

El título antibiótico de los líquidos de fermentación se controló por medio del uso del ensayo de discos en placa usando el microorganismo Saccharomyces cerevisiae. El S. cerevisiae se inocula en agar de ensayo que tiene la siguiente composición:

Dextrosa	30 g/litro
Extracto de levadura (Difco)	7 g/litro
KH_2PO_4	5 g/litro
Agar	20 g/litro
Agua destilada c.s.p.	Diferencia

Se llenan cajas de Petri y se coloca sobre el agar solidificado un disco de papel de 12.7 mm. Se aplica una alícuota de 0.08 ml de la preparación de kalamicina, y se determina la zona de inhibición de crecimiento después de incubación durante 18 horas a 28° C.

La actividad se expresa en términos de biounidades. Se define una biounidad (BU) como la concentración del antibiótico que produce una zona de inhibición de 20 mm bajo las condiciones standard. Así, si por ejemplo un líquido de fermentación tiene que diluirse a 1/100 para dar la zona de inhibición de 20 mm, la potencia de tal fermentado es 100 BU por ml.

338725

El procedimiento de ensayo anterior también puede usarse con el microorganismo S.pastorianus en lugar de S. cerevisiae.

Un frasco de agitación para fermentación de kalamicina, como se describe anteriormente, mostro una concentración de 5.7 biounidades usando S. cerevisiae.

B. Recuperación

En el fermentado total (100 ml) de una fermentación de kalamicina como se describe anteriormente, se suspendió el 5% de su peso de tierra de diatomeas y se filtró. El residuo sólido se lavó con un décimo de su volumen de agua y el agua de lavado se agregó al fermentado filtrado. El fermentado filtrado más el lavado se extrajo con acetato de etilo. El extracto de acetato de etilo se concentró hasta una mezcla acuosa y se secó por congelación para dar una preparación impura de kalamicina. El proceso de recuperación, descrito anteriormente, dió los siguientes resultados:

ETAPAS	CANTIDADES	VALORACION (S. cerevisiae)
Fermentado total	100 ml.	1.0 biounidades/ml.
Fermentado límpido	100 ml.	0.95 biounidades/ml.
Extracto de acetato de etilo	95 ml	1.10 biounidades/ml.
Extracto de kalamicina secado por congelación	16 mg.	5.2 biounidades/mg.

C. Purificación

(1) Cromatografía con silica gel.

Una preparación impura de kalamicina, como se obtuvo por un proceso como se describe anteriormente, se purificó sobre -

31 MAR 1960

338725

una columna cromatográfica de silica gel. La columna se preparó de la manera siguiente:

Una cantidad de 5 Kg de silica gel (silica gel número - - 7734 E. Merckag-Darmstadt, 0.05-0.20 mm para cromatografía) se mezcló con 4.0 litros de una solución acuosa conteniendo 136.0 gramos de KH_2PO_4 y 142.0 gramos de Na_2HPO_4. El exceso de agua se separó por evaporación y el gel amortiguado se activó a una temperatura de gel de 120-130°C, durante aproximadamente dos horas y se enfrió a la temperatura ambiente. El gel amortiguado enfriado se suspendió con una cantidad suficiente de ciclohexano para proporcionar una mezcla que puede verterse, que también tenía una consistencia fluída suficiente para dejar escapar las colecciones de aire. Esta mezcla se vertió sobre una columna de vidrio de cuatro pulgadas de diámetro y se cargó hasta una altura constante de 45 pulgadas, usando 3 a 4 libras por pulgada cuadrada de presión de aire.

Se disolvió una preparación impura de kalamicina, 564.5 gramos, en un litro de acetona. La solución acetónica del antibiótico, entonces se mezcló con un kilogramo de silica gel activado y amortiguado, preparado como anteriormente. La acetona se separó por evaporación a temperatura ambiente y la mezcla de silica gel secada se distribuyó uniformemente sobre la parte superior del ciclohexano que queda sobre la parte superior del lecho de columna cromatográfica. Se hizo descender el nivel de ciclohexano por escurrimiento hasta unas pocas

31 MAR 1960

338725

pulgadas del material de partida. Una mezcla de solvente, compuesto por acetato de etilo y ciclohexano (10:90), se depositó en capa sobre la parte superior del ciclohexano. Se comenzó el flujo y se pasaron 20 litros de esta mezcla a través de la columna y se descartaron. El solvente de lavado se reemplazó por el solvente de desarrollo compuesto por acetato de etilo y ciclohexano (1:3) y 102 litros de la mezcla de solvente se pasaron a través de la columna. Se recogieron fracciones desde el principio de desarrollo y se designaron como litros de efluyente. Cada fracción fue analizada para investigar kalamicina saturando discos de ensayo de 12.7 mm con líquido de cada fracción, secando los discos y colocándolos en una bandeja de agar que fue sembrada con el microorganismo S. pastorianus. La fracción que inhibía el crecimiento del organismo contenía kalamicina. Se encontró presente kalamicina en las fracciones 43-98. Las fracciones 47-58 se recolectaron y enfriaron. Los cristales de kalamicina, que se formaron espontáneamente por enfriamiento de las fracciones, se separaron por filtración, se lavaron con ciclohexano y se secaron al vacío hasta un peso constante de 21.7 gramos. Esta preparación cristalina de kalamicina tenía una valoración de 143 BU/mg S. pastorianus y tenía un máximo UV en metanol a 258 mμ, a = 34.0. El licor madre de la cristalización anterior se mezcló con fracciones 43-46 y 59-86 de la columna cromatográfica de silica gel y se concentró al vacío hasta un volumen de aproximadamente 750 ml. Se agregaron dos litros de acetato de etilo al concentrado para disolver -

31 MAR 1961

algo del material precipitado y la solución se clarificó por filtración. Se agregaron tres litros de ciclohexano y la solución se concentró al vacío hasta un volumen de 2.0 litros y se conservaron durante la noche a 5ºC. Los cristales de kalamicina que se formaron se separaron por filtración, se lavaron con ciclohexano y se secaron al vacío hasta un peso constante de 55.5 gramos. Esta preparación de kalamicina tenía una valoración de 150 BU/mg, (biounidades S. pastorianus) y tenía un máximo UV en metanol a 258 mu, a = 37.0. Los licores madre de esta última cristalización se concentraron al vacío hasta un volumen de 100 ml y se conservaron a 5ºC durante la noche. Los cristales que se formaron se separaron por filtración y se secaron hasta un peso constante de 6.8 gramos. Esta preparación de kalamicina tenía una valoración de 160 BU/mg, (biounidades S. pastorianus) y tenía un máximo UV en metanol a 258 mu, a = 35.5.

Ejemplo 2 - La sal sódica de kalamicina.

Una solución de kalamicina se pone en contacto con una resina de intercambio catiónico que había sido generada al ciclo sódico. La sal resultante entonces se cristaliza de la solución concentrada. Alternativamente, la sal puede secarse por congelación hasta un polvo amoffo.

- - - - -

N O T A.-

= = = = = =

La presente patente de invención, comprende las siguientes reivindicaciones:

1.- Procedimiento para preparar kalamicina, un compuesto que:

31 MAR 1967

(a) es eficaz para inhibir el crecimiento de varias bacterias gramnegativas y grampositivas y hongos; y en su forma cristalina esencialmente pura,

(b) es soluble en acetato de etilo, acetato de amilo, cloroformo, cloruro de metileno, acetona, metil etin cetona y es relativamente insoluble en agua;

(c) tiene el siguiente análisis elemental; C, 63.80; H, 4.07; O, 31.81;

(d) tiene un peso molecular de 300 como se determina por el espectrómetro de masa;

(e) tiene un espectro de absorción infrarrojo como se muestra en figura 1 del dibujo acompañante; y

(f) tiene un trazado en cromatografía de papel característico, como se muestra en figura II del dibujo acompañante, caracterizado porque consiste en cultivar un organismo productor de kalamicina en un medio nutritivo acuoso bajo condiciones aeróbicas hasta que una actividad sustancial sea impartida a dicho medio por la producción de kalamicina y aislar kalamicina del medio de cultivo.

2.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque consiste en cultivar Streptomyces tanashiensis cepa Kala en un medio nutritivo acuoso bajo condiciones aeróbicas hasta que una actividad sustancial sea impartida a dicho medio por la producción de kalamicina.

3.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque consiste en cultivar Streptomyces tanashiensis cepa Kala en un medio nutritivo acuoso conteniendo una fuente de

338725

carbohidrato asimilable y nitrógeno asimilable bajo condiciones aeróbicas hasta que una actividad sustancial sea impartida a dicho medio por la producción de kalamicina y aislar la kalamicina así producida.

4.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque el aislamiento consiste en filtrar el medio, extraer el filtrado resultante con un solvente para kalamicina no miscible en agua y recuperar la kalamicina de los extractos de solvente.

5.- Procedimiento para preparar kalamicina.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva, se ilustra con los planos que a la misma se acompañan.

Y consta dicha memoria de veintitres hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

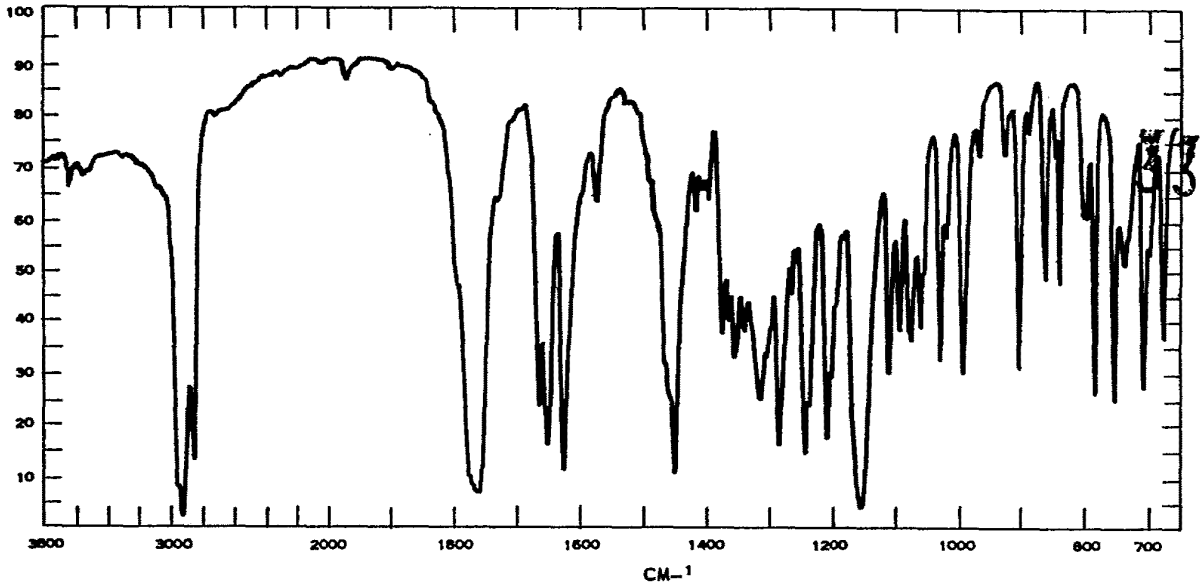
Madrid, a 31 MAR. 1967

CARLOS ROE

P. P.

338/25

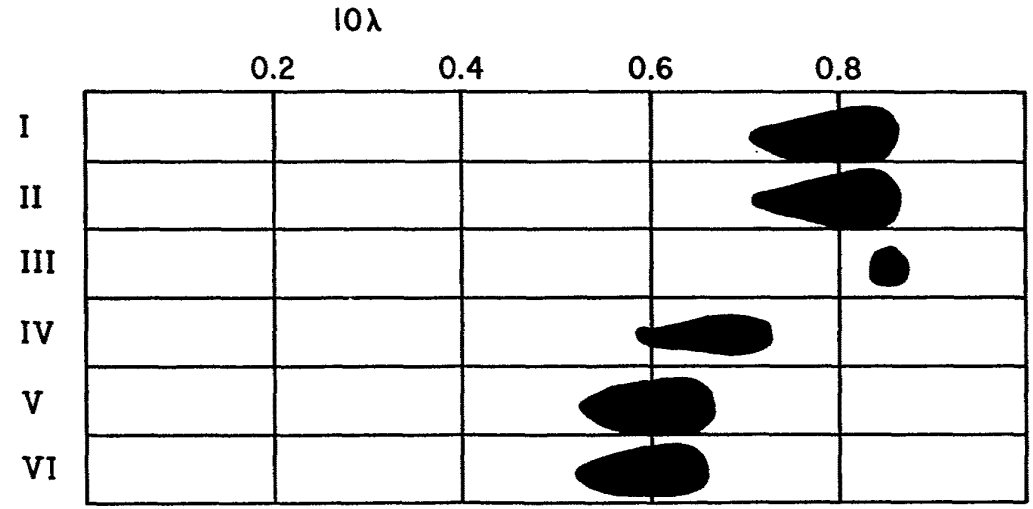
FIGURA 1.



338725

3 MAR 1967

FIGURA 2.



338/25

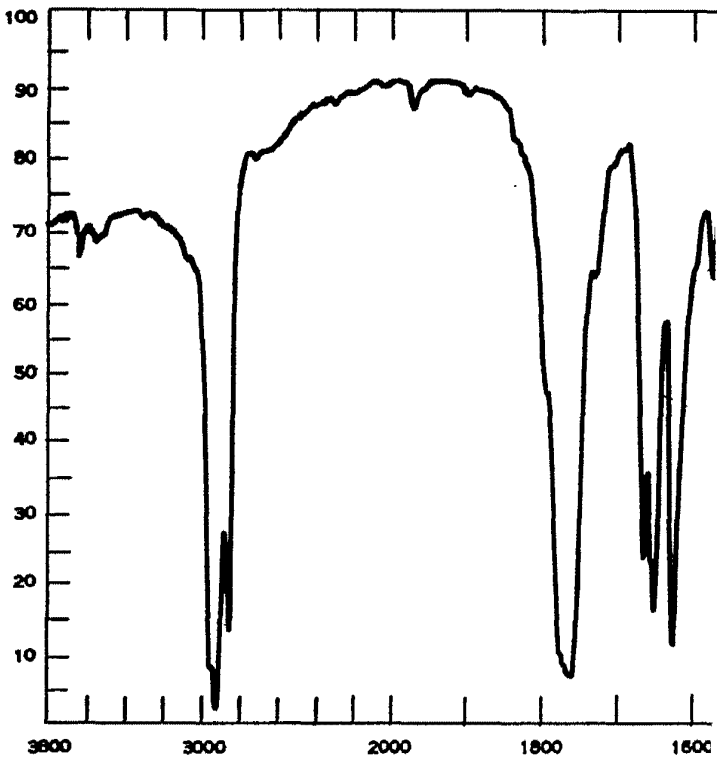


FIGURA 1.

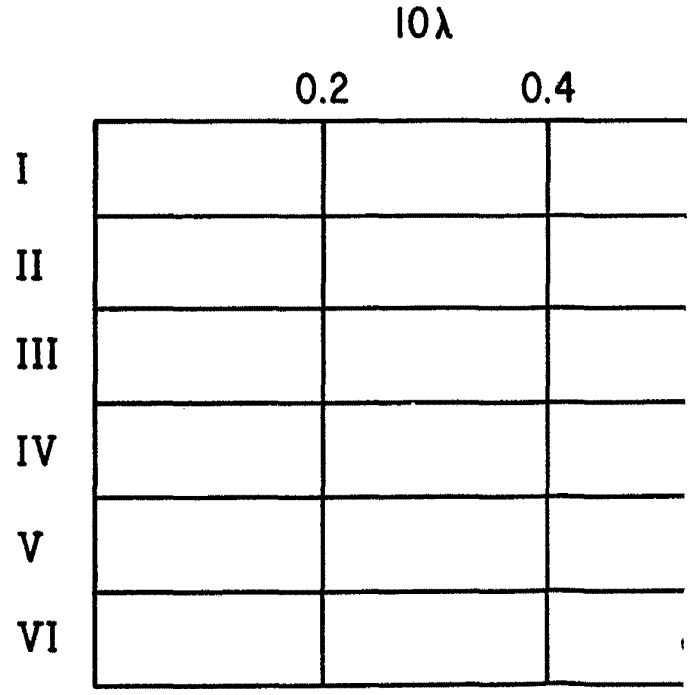
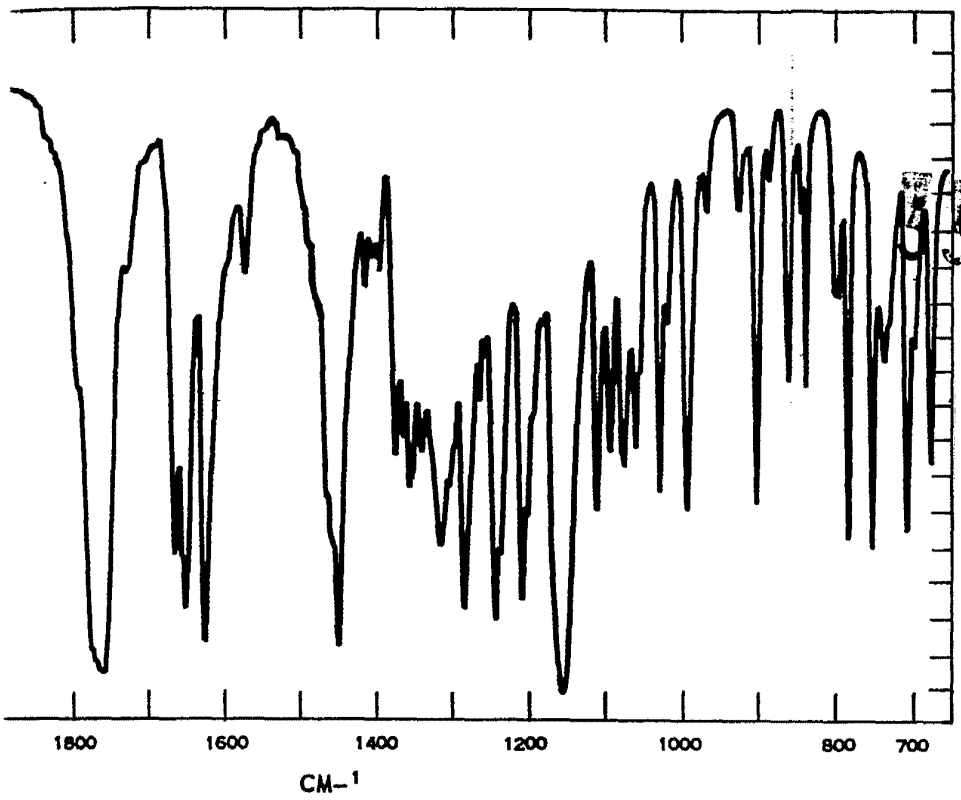
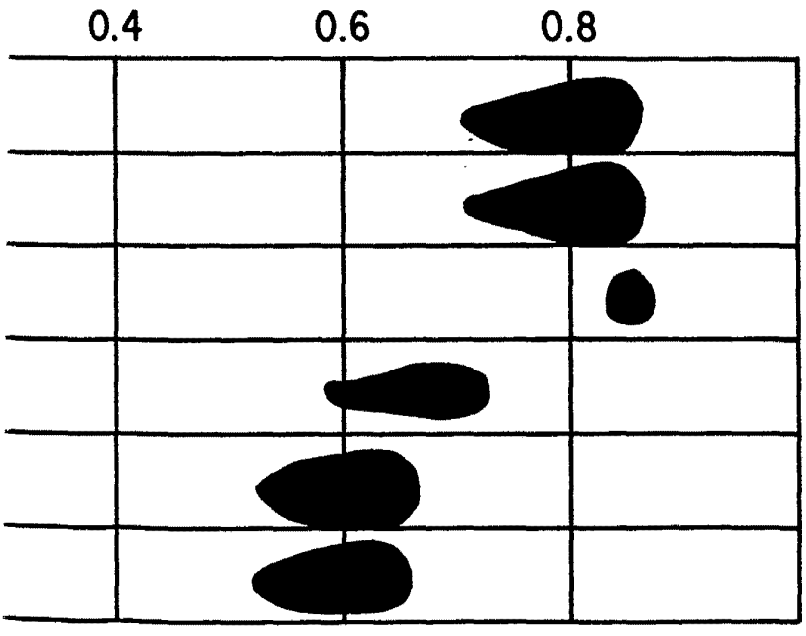


FIGURA 2.



31 MAR 1967
38725



ESPACIO VARIABLE
CARLOS ROEB