

339495

P.- 34.921

Nº 74.645
U.S. Serial Nº
488.109
(Filed September
17.1965)

339495

Memoria descriptiva



191 DE 1965

para solicitar PATENTE DE INVENCION, en España por 20 años

a nombre de ELI LILLY AND COMPANY,

entidad / ~~de nacionalidad~~ norteamericana

con domicilio en 740 South Alabama Street, Indianápolis, Indiana, Estados Unidos de América,

por: "METODO PARA PRODUCIR UN COMPLEJO ANTIBIOTICO DE TENE-
BRIMICINA", (Clase Internacional C12d)



La presente invención se refiere a un método para preparar nuevas sustancias antibióticas.

La presente invención proporciona un método para producir un complejo antibiótico de tenebrimicina, tenebrimicina I, I', II, III, IV, V, VI, o mezclas de ellas, que comprende cultivar un microorganismo Streptomyces tenebrarius, en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, bajo condiciones de inmersión aerobia, hasta que dicho microorganismo produce en dicho medio de cultivo una cantidad sustancial del antibiótico deseado.

El nuevo complejo antibiótico producido por los métodos de la invención comprende al menos siete factores, cada uno de los cuales tiene actividad antibiótica. El complejo, como base libre, es soluble en agua y sulfóxido de dimetilo, lentamente soluble en metanol, e insoluble en la mayoría de los demás disolventes orgánicos, tal como acetona, alcoholes superiores, dioxano, acetato de etilo, éter dietílico, acetonitrilo, metilisobutilcetona y disolventes hidrocarbonados. El complejo en forma de base libre es estable a temperaturas de refrigeración, temperatura ambiente, y 37°C, durante al menos 8 semanas, en un intervalo de pH de 1 a 11.

Los gráficos ilustrativos adjuntos presentan escalas, en las que: la horizontal inferior corresponde a la longitud de onda (micras); la horizontal superior, a la frecuencia (cm^{-1}); y la vertical, a la transmisión (%).

En la fig. 1 se muestra el espectro de absorción infrarroja del complejo antibiótico, obteni-



do con una mezcla del mismo con aceite mineral. Las bandas que se pueden distinguir en el espectro de absorción infrarroja, en el intervalo de 2 a 15 micras, son las siguientes: 3,02 (ancha), 3,15, 5,82, 6,26, 7,43, 8,8 (ancha) y 9,7 (muy ancha) micras.

En una serie de ensayos químicos efectuados con el complejo, se obtuvieron reacciones positivas en los ensayos de ninhidrina, antrona y Elson-Morgan. El ensayo Lowry de proteínas produjo una reacción ligeramente positiva. Los ensayos de biuret y Sakaguchi fueron negativos.

Como se ha indicado antes, el complejo antibiótico comprende al menos siete factores distintos. En la nomenclatura aquí empleada, el término tenebrimicina se usará para designar al complejo antibiótico, mientras que los diversos factores que constituyen el complejo serán designados como tenebrimicina I, tenebrimicina I', tenebrimicina II, tenebrimicina III, tenebrimicina IV, tenebrimicina V y tenebrimicina VI.

En el complejo, tal como es obtenido corrientemente, la tenebrimicina I, tenebrimicina I' y tenebrimicina III están presentes en pequeñas cantidades. De las tenebrimicinas restantes, las más abundantes parecen ser la tenebrimicina II, que constituye aproximadamente el 45 a 50% del complejo, y la tenebrimicina V, que constituye aproximadamente el 30% del complejo. La tenebrimicina IV está presente en proporción de aproximadamente 15 a 20%, mientras que la tenebrimicina VI constituye aproximadamente el 10% del complejo. Las tenebrimicinas más abundantes han sido separadas y caracte-



rizadas, conteniéndose las descripciones de sus propiedades en los párrafos que siguen.

5 La tenebrimicina II es una sustancia sólida blanca. La titulación electrométrica en agua indica la presencia de grupos titulables que tienen valores del pK aproximadamente iguales a 5,7, 6,7, 7,7 y 8,7. La rotación específica de la luz sódica D por este factor, a temperatura de 25°C, es igual a +159° cuando la concentración del antibiótico es 1%, en peso/volumen, en solución acuosa. El microanálisis indica que la tenebrimicina II tiene aproximadamente la siguiente composición, en tanto por ciento: C, 44,90; H, 8,20; N, 12,53; O, 33,24 (directo). El peso molecular aparente, indicado por los datos de titulación, es aproximadamente 10 454. La fórmula empírica que se ajusta mejor a estos 15 datos es $C_{16}H_{36}N_4O_9$.

El espectro de absorción infrarroja de la tenebrimicina II, en mezcla con aceite mineral, se muestra en la fig. 2 de los dibujos adjuntos. Las bandas que se pueden distinguir en el espectro de absorción infrarroja, en el intervalo de 2 a 15 micras, son las siguientes: 3,02, 3,14, 6,05, 6,23, 7,4, 8,5, 8,75, 20 9,17, 9,65, 10,11, 11,15, 11,7 y 12,6 micras.

La tenebrimicina II forma un derivado acetilado que tiene una rotación específica, $[\alpha]_D^{25}$, 25 aproximadamente igual a +130°, cuando la concentración del compuesto es 1%, en peso/volumen, en solución acuosa. El derivado no tiene grupos titulables restantes. La composición elemental, determinada por microanálisis, indica que se han añadido cuatro grupos acetilo a la estructura de la tenebrimicina II. 30

5-6-67



La tenebrimicina IV es una sustancia básica con grupos titulables, que tiene valores del pK aproximadamente iguales a 5,3, 6,8, 7,8 y 9,0, tal como lo indica la titulación electrométrica en agua. La rotación específica de la tenebrimicina IV, determinada en solución acuosa al 1%, a temperatura de 25°C, es igual a +114°. El microanálisis indica la siguiente composición, en tanto por ciento, para la tenebrimicina IV: C, 41,66; H, 7,78; N, 15,02; O, 34,93 (directo). El peso molecular aparente, determinado con los datos de titulación, es aproximadamente 478. Estos datos sugieren una fórmula empírica $C_{16}H_{36}N_5O_{10}$ para la tenebrimicina IV.

El espectro de absorción infrarroja de la tenebrimicina IV, en mezcla con aceite mineral, se muestra en la fig. 3 de los dibujos. Las bandas que se pueden distinguir en el espectro de absorción infrarroja, en el intervalo de 2 a 15 micras, son las siguientes: 3,05, 3,17, 5,85, 6,27, 7,46, 8,75, 9,7, 10,5, 11,1 y 12,85 micras.

El derivado tetra-acetilado de la tenebrimicina IV es un sólido cristalino que funde a aproximadamente 265 a 267°C. La rotación específica, $[\alpha]_D^{25}$, es igual a +109°, cuando la concentración del derivado es 1% en solución acuosa.

La titulación electrométrica de la tenebrimicina V muestra grupos titulables que tienen valores del pK aproximadamente iguales a 5,5, 7,0, 8,0 y 9,1. La rotación específica de la luz sódica D por una solución acuosa de este factor al 1%, determinada



a temperatura igual a 25°C, es igual a +118°. La composición elemental, determinada por microanálisis, es la siguiente: C, 41,05; H, 7,60; N, 13,62; O, 36,76 (directo). Los datos analíticos y el peso molecular aparente, igual a 424, determinado por datos de titulación, sugieren como fórmula empírica de la tenebrimicina V

5 $C_{14}H_{32}N_4O_{10}$.

La fig. 4 muestra el espectro de absorción infrarroja de la tenebrimicina V, en mezcla con aceite mineral, con las siguientes bandas que se pueden distinguir en el intervalo de 2 a 15 micras: 3,05, 3,19, 6,32, 7,45, 8,75, 9,7, 11,15 y 12,25 micras.

10

Igual que la tenebrimicina IV, la tenebrimicina V forma un derivado tetra-acetilado cristalino. El derivado funde con descomposición a aproximadamente 260°C, y da una rotación específica, $[\alpha]_D^{25}$, aproximadamente igual a +109°, cuando la concentración del compuesto es igual a 0,42% en agua.

15

La tenebrimicina VI tiene grupos titulables, con valores del pK aproximadamente iguales a 5,6, 7,2, 8,2 y 9,3, determinados por titulación electrométrica en agua. Los datos de titulación sugieren un peso molecular aparente igual a 396. La rotación específica de la luz sódica D, por una solución acuosa de tenebrimicina VI al 1%, a temperatura de 25°C, es aproximadamente igual a +127°.

20

25

El microanálisis indica una composición aproximada, en tanto por ciento, de C, 44,04; H, 8,40; N, 13,78; O, 33,62 (directo). La fórmula empírica más consistente con los datos anteriores es $C_{16}H_{36}N_4O_9$.

339495

El espectro de absorción infrarroja de la

30



tenebrimicina VI se muestra en la fig. 5 de los dibujos, Las bandas que se pueden distinguir en el intervalo de 2 a 15 micras son las siguientes: 3,05, 3,19, 6,35, 7,47, 8,75, 9,8, 12,3 y 12,95 micras.

5 Una solución acuosa del derivado tetraacetilado de tenebrimicina VI, al 1%, tiene una rotación específica aproximadamente igual a $+95^{\circ}$, determinada a 25°C . en solución acuosa al 1%.

10 Por métodos usuales se pueden preparar sales de adición de ácido de la tenebrimicina, o de sus componentes antibióticos independientes. Se pueden emplear ácidos orgánicos o inorgánicos para la formación de sales. Un método conveniente para la preparación de
15 tales sales comprende la adición de una solución de ácido formador de sal, a una solución acuosa del antibiótico. En el caso de sales insolubles de adición de ácido, la sal precipita de la solución y es fácilmente separada por técnicas usuales, tal como filtración o centrifugación. En el caso de que la sal de adición de
20 ácido deseada no precipite fácilmente, se puede ayudar a la precipitación, tal como concentrando la solución hasta menor volumen, o añadiendo un disolvente miscible con el agua, tal como acetona o similares. La sal de adición de ácido se puede volver a convertir convenientemente en la
25 forma de base libre del antibiótico, haciendo pasar una solución acuosa de la sal sobre una resina intercambiadora de aniones en el ciclo hidróxilico.

30 Los diversos factores que constituyen el complejo de tenebrimicina se pueden distinguir, entre sí y de otros antibióticos que tienen propiedades si-



5 milares, por técnicas de cromatografía en papel, tal
como la siguiente. Se efectuó la cromatografía en forma
descendente usual, a $22,8 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$, en papel Whatman n^o
1 que tenía unas dimensiones de 19 x 46,5 cm. Los resul-
tados se muestran en la tabla siguiente. La constante de
migración para cada uno de los antibióticos es expresada
como constante R_e en vez de como índice R_f , más usual.
El índice R_e expresa la relación de la distancia recorri-
da por el antibiótico respecto al extremo de la cinta,
10 en vez de al frente de disolvente. Este método de ex-
presar la constante fué elegido en vista del hecho de
que el frente de disolvente había avanzado hasta más
allá del extremo de la cinta, durante el intervalo de
tiempo empleado con la mayoría de los sistemas disolven-
tes.
15

339495

5-6-67

Tabla 1

Cromatografía en papel de las tenebrimicinas y antibióticos conocidos con propiedades similares

| | Sistema disolvente* e índices Re | | | | | | |
|---------------------------|----------------------------------|------|------|------|------|---|---|
| | A | B | C | D | E | F | G |
| Complejo de tenebrimicina | - | - | - | 0,65 | 0,32 | 0 | 0 |
| Tenebrimicina I | 0,20 | - | - | - | - | - | - |
| Tenebrimicina I' | 0,27 | - | - | - | - | - | - |
| Tenebrimicina II | 0,40 | 0,17 | 0,32 | - | - | - | - |
| Tenebrimicina III | 0,40 | 0,34 | 0,41 | - | - | - | - |
| Tenebrimicina IV | 0,49 | 0,20 | 0,32 | - | - | - | - |
| Tenebrimicina V | 0,55 | 0,22 | 0,35 | - | - | - | - |
| Tenebrimicina VI | 0,71 | 0,31 | 0,38 | - | - | - | - |
| Kanamicina | 0,35 | 0,35 | 0,41 | 0,65 | 0,42 | 0 | 0 |



339495

Tabla 1 (cont.)

| | Sistema disolvente * e índices R _e | | | | | | |
|--------------|---|----------------------|--------------|------|------|---|------|
| | A | B | C | D | E | F | G |
| Kanamicina B | 0,57 | 0,26 | 0,32 | 0,70 | 0,29 | 0 | 0,05 |
| Gentamicina | 0,83 | 0,51 0,75 0,95 | 0,39 0,62 | - | 0,51 | 0 | 0,1 |
| Catenulina | 0,44 | 0,25 | 0,34 | 0,65 | 0,35 | 0 | 0 |
| Neomicina | 0,60 | 0,12 | 0,19 | - | - | 0 | 0,05 |

* Los sistemas disolventes empleados, y la duración de la cromatografía, se indican a continuación:

A = n-butanol saturado con agua, más 2% de ácido p-toluénsulfónico, durante 40 horas.

B = etanol acuoso al 80%, más 1,5% de cloruro sódico, durante 40 horas en papel tamponizado con sulfato-bisulfato 0,95 M.



339495



C = propanol, piridina, ácido acético y agua
(15:10:3:12) durante 40 horas.

D = Agua saturada de metilisobutilcetona, más
1% de ácido p-toluénsulfónico, durante 6
horas.

E = propanol y agua (1:1) durante 24 horas,
en papel tamponizado con fosfato 0,75 M,
pH igual a 4,0.

F = n-butanol saturado de agua, durante 18
horas.

G = n-butanol saturado de agua, más 2% de áci-
do p-toluénsulfónico y 2% de piperidina,
durante 18 horas.

Los datos cromatográficos antes relacionados
indican que aunque con cualquier sistema disolvente único
parece que varios de los factores comprendidos en el com-
plejo de tenebrimicina son idénticos entre sí o a otros
antibióticos conocidos, la cromatografía con una variedad
de sistemas disolventes establece claramente la no iden-
tidad. Estos resultados, considerados con los otros datos,
tal como las propiedades físicas y fisicoquímicas, acti-
vidades microbiológicas, toxicidades, y similares, sus-
tentan la conclusión de que los factores individuales
comprendidos en el complejo de tenebrimicina constituyen
una serie de sustancias antibióticas hasta ahora descono-
cidas.

El complejo de tenebrimicina, y los factores
individuales comprendidos en dicho complejo, tienen ac-
ción inhibidora contra el crecimiento de microorganismos
que son patógenos para animales y plantas. Las concentra-



ciones inhibitoras del complejo, y de las tenebrimicinas individuales, contra un cierto número de organismos, se muestran en la tabla siguiente. Las concentraciones inhibitoras mínimas fueron determinadas por el método de dilución de agar.

5

5-6-67

- 12 -

339495

Tabla 2

Mínima concentración inhibidora, microgramos/ml

| Organismos de ensayo | Tenebri- micina* | | Tenebri- micina II | | Tenebri- micina IV | | Tenebri- micina V | | Tenebri- micina VI | | |
|----------------------------|---------------------|--|-----------------------|--|-----------------------|--|----------------------|--|-----------------------|--|--------|
| | | | | | | | | | | | |
| Staphylococcus aureus 3055 | 6,25 | | 6,25 | | 6,25 | | 6,25 | | 6,25 | | 3,12 |
| Bacillus subtilis | < 1,56 | | < 1,56 | | < 1,56 | | < 1,56 | | < 1,56 | | < 1,56 |
| Mycobacterium avium | < 1,56 | | < 1,56 | | < 1,56 | | 6,25 | | 6,25 | | < 1,56 |
| Streptococcus faecalis | 6,25 | | 3,12 | | < 1,56 | | 3,12 | | 3,12 | | 3,12 |
| Lactobacillus casei | 25 | | 50 | | 25 | | 25 | | 25 | | 12,5 |
| Leuconostoc citrovorum | 25 | | 50 | | 25 | | 25 | | 25 | | 12,5 |
| Escherichia coli Nº 1 | 25 | | 25 | | 12,5 | | 12,5 | | 12,5 | | 12,5 |
| Escherichia coli Nº 2 | 25 | | 50 | | 12,5 | | 25 | | 25 | | 12,5 |
| Proteus sp. Nº 1 | 50 | | 100 | | 50 | | 50 | | 50 | | 25 |
| Proteus sp. Nº 2 | 25 | | 25 | | 12,5 | | 25 | | 25 | | 12,5 |
| Pseudomonas sp. Nº 2 | 25 | | 25 | | 100 | | 100 | | 100 | | 6,25 |

339-495



Tabla 2 (cont.)

| Organismos de ensayo | Tenebrimicina* | Tenebrimicina II | Tenebrimicina IV | Tenebrimicina V | Tenebrimicina VI |
|---------------------------|----------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|
| Pseudomonas sp. Nº 5 | 6,25 | 12,5 | 6,25 | 3,12 | < 1,56 |
| Klebsiella-Aerobacter | | | | | |
| Nº 14 | 6,25 | 12,5 | 3,12 | 12,5 | 6,25 |
| Klebsiella-Aerobacter | | | | | |
| Nº 15 | 12,5 | 12,5 | 6,25 | 12,5 | 6,25 |
| Salmonella sp. Nº 1 | 25 | 25 | 25 | 25 | 12,5 |
| Vibrio metschnikovvi | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 6,25 | 5,26 |
| Agrobacterium tumefaciens | 50 | 25 | 25 | 50 | 50 |
| Erwinia amylovora | < 1,56 | < 1,56 | < 1,56 | < 1,56 | < 1,56 |
| Pseudomonas solanacearum | 25 | 25 | 12,5 | 12,5 | 12,5 |
| Xanthomonas phaseoli | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 6,25 | 3,12 |

* Las mínimas concentraciones inhibitorias para las tenebrimicinas individuales fueron determinadas con las bases libres. El complejo de tenebrimicina se empleó como sal sulfato.



330405



La toxicidad aguada del complejo de tenebrimicina, y de sus constituyentes relativamente más abundantes, ha sido determinada en ratones. Los valores LD₅₀ para el sulfato de tenebrimicina son aproximadamente 300 mg/kg cuando el antibiótico es inyectado por vía intravenosa, y aproximadamente 350 mg/kg cuando la droga es administrada por vía intraperitoneal. Con dosis subcutáneas de 750 mg/kg o dosis orales de 5600 mg/kg, todos los ratones sobrevivieron. No se observó irritación significativa cuando un ojo de cada uno de cuatro ratones fue tratado con una gota de una solución acuosa de sulfato de tenebrimicina al 50%, tres veces al día, durante 5 días. Los valores LD₅₀, expresados como mg/kg, de la base libre, para las tenebrimicinas individuales, administradas a ratones por vía intravenosa, son los siguientes: tenebrimicina II, aproximadamente 385; tenebrimicina IV, aproximadamente 220; tenebrimicina V, aproximadamente 140; y tenebrimicina VI, aproximadamente 120.

El nuevo complejo antibiótico de la invención se produce cultivando una cepa adecuada de un organismo actinomiceto, bajo condiciones aerobias, en un medio de cultivo adecuado, hasta que el medio de cultivo contiene una actividad antibiótica sustancial. La tenebrimicina puede ser recuperada empleando diversos métodos de aislamiento y purificación conocidos en la técnica. El complejo antibiótico puede ser empleado como tal, o puede ser sometido a más métodos de purificación, para aislar los diversos componentes del mismo, en estado de mayor pureza.

Debido a la incertidumbre de los estudios

339495



5 taxonómicos con el grupo de organismos Streptomyces,
siempre hay un elemento de duda asociado con la clasifi-
cación de un nuevo organismo descubierto. Sin embargo,
por lo que se puede determinar, el organismo que produce
el complejo antibiótico proporcionado por la invención
no se parece lo suficiente a ninguna de las especies de
Streptomyces descritas por Wacksman en The Actinomycetes
(Los actinomicetos), vol. II, The Williams and Wilkens
Company (1961), para garantizar comparaciones de culti-
vos. Por tanto, el organismo es descrito y caracterizado
10 como especie nueva.

15 El organismo que produce el complejo anti-
biótico es un Streptomyces formador de espirales, ter-
modúrico, resistente al calor, entre aerobio y microaeró-
filo, con esporas oblongas de pared lisa. No tiene igual
en cuanto a ser inhibido por intensidades relativamente
bajas de luz artificial. Debido a esta última propiedad,
se ha elegido para este organismo el nombre de nueva es-
pecie Streptomyces tenebrarius sp. n.

20 El organismo fué aislado de una muestra de
tierra, suspendiendo porciones de la muestra de tierra
en agua destilada estéril, y aplicando las suspensiones
en forma de bandas sobre agar nutritivo. Las placas de
agar nutritivo sembradas fueron incubadas a de 25 a 35°C
25 hasta que se aseguró el crecimiento. Al final del período
de incubación se transfirieron colonias de los organis-
mos productores de antibióticos, con un alambre de pla-
tino esterilizado, a planos inclinados de agar. Luego
fueron incubados los planos inclinados de agar, propor-
cionando cantidades adecuadas de medio de inoculación
30



para producir el antibiótico. La cepa del organismo empleado para producir el complejo antibiótico ha sido puesta en depósito permanente en la American Type Culture Collection, en Washington, D.C., y se le ha asignado el número de cultivo ATCC 17920. Dicha cepa produce todos los factores del complejo antibiótico, pero bajo las condiciones de fermentación preferidas predominan las tenebrimicinas II, IV, V y VI.

Los métodos empleados en los estudios taxonómicos del S. tenebrarius ATCC 17920 son los usados corrientemente en la taxonomía de los actinomicetos. Las características del cultivo fueron observadas después de 14 días de incubación. La morfología fué determinada en agar de peptona de Czapel, y en agar de Bennett, durante 2 a 7 días de incubación. La acción sobre la leche y la reducción de nitrato fueron observadas a los 7 y 14 días, la producción de sulfuro de hidrógeno a las 24 y 48 horas, y la utilización de carbono a los 10 días. A no ser que se indique otra cosa, los cultivos fueron incubados a 37°C. Los ensayos de utilización de carbono se efectuaron según el método descrito por Pridham y Gottlieb, J. Bact., 56, 107 (1948).

Los resultados de los estudios taxonómicos se resúmen en los párrafos siguientes. Las cifras entre paréntesis se refieren a los bloques de color el Dictionary of Color de Maerz y Paul, McGraw Book Company (1950). Los colores representados por los bloques de color han sido traducidos a los nombres de colores ISCC-NBS, que se hallan en la circular 553 del Departamento de Comercio de los EE.UU., National Bureau of Standards



(NBS), 1955.

Morfología microscópica, características de cultivo y fisiología del S. tenebrarius ATCC 17920

5 Morfología.- En agar de peptona de Czapek, se
forman formas de esporas ramificadas en racimos al azar,
en el micelio aéreo. Las esporas aisladas son raras. El
micelio aéreo intacto se desprende fácilmente del sub-
strato. Las cadenas de esporas maduras forman usualmente
10 5 ó 6 espirales abiertas. Las esporas son entre oblongas
y cilíndricas. Cuando son observadas con ayuda del micros-
copio electrónico, las esporas parecen lisas, y miden de
0,7 a 1,3 por 2,0 a 2,1 micras. En el medio de Bennett se
observaron esclerocios.

15 Características de la colonia en:

Agar de Czapek.- Escasa cantidad de creci-
miento; micelio aéreo ralo, naranja-amarillo claro (11-
A2); buena esporulación; reverso naranja-amarillo claro
11-A2); pigmento soluble ligeramente rosa (1-B1).

20 Peptona de Czapek.- Abundante crecimiento;
micelio aéreo abundante, marrón amarillento claro con
áreas blancas (11-A4); abundante esporulación; reverso
rojo grisáceo claro (4-H1); pigmento soluble rosa gri-
sáceo (4-B1).

25 Agar de malato cálcico.- Crecimiento mode-
rado, micelio aéreo moderado, naranja-amarillo claro
(11-A2); esporulación moderada; reverso rosa grisáceo
(4-D1); pigmento soluble rosa grisáceo (4-B1).

30 Agar de tirosina.- Poco crecimiento, poco
micelio aéreo, naranja-amarillo claro (9-B2); poca es-



porulación; reverso naranja-amarillo claro (10-B3); ningún pigmento soluble.

5 Agar de sales inorgánicas-almidón.- Crecimiento moderado, micelio aéreo moderado, rosa parduzco con áreas blancas (11-A4); esporulación abundante; reverso amarillo claro (11-B2); pigmento soluble amarillo claro (11-B2).

10 Agar de glucosa asparragina.- Crecimiento moderado, micelio aéreo moderado, amarillo claro (9-D2) con áreas blancas (10-A1); esporulación moderada; reverso amarillo claro (11-B2); ningún pigmento soluble.

15 Pasta de tomate-harina de avena.- Crecimiento abundante, micelio aéreo abundante, marrón amarillento claro (12-B5); esporulación abundante; reverso marrón rojizo grisáceo oscuro (48-J2); pigmento soluble rojo púrpura oscuro (47-H1).

20 Extracto de levadura.- Crecimiento abundante, micelio aéreo abundante, naranja-amarillo claro (11-A2) con áreas blancas; esporulación abundante; reverso amarillo moderado (11-J6); ningún pigmento soluble.

25 Agar nutritivo.- Escaso crecimiento, micelio aéreo ralo blanco (10-A1); esporulación escasa; reverso amarillo verdoso grisáceo (12-I2); ningún pigmento soluble.

30 Agar de Bennett.- Crecimiento moderado, micelio aéreo moderado, blanco (10-A1 a 10-B1); esporulación moderada; reverso amarillo claro (11-C2); ningún pigmento soluble.

30 Acción sobre la leche.- Gran anillo ama-



B1

rillo de crecimiento sobre la superficie. Se observó coagulación y peptonización.

Reducción de nitrato.- Positiva.

Producción de H₂S.- Negativa.

5

Gelatina nutritiva.- Licuación total al cabo de 14 días.

Requisitos de temperatura en agar de peptona de Czapek:

- 20°C.- Ningún crecimiento.
- 10 26°C.- Buen crecimiento, ningún micelio aéreo
- 30°C.- Crecimiento y micelio aéreo moderados, pero nada de esporulación
- 37°C.- Crecimiento, micelio aéreo y esporulación muy abundantes
- 15 43°C.- Crecimiento, micelio aéreo y esporulación muy abundantes
- 50°C.- Crecimiento, micelio aéreo y esporulación muy abundantes
- 20 55°C.- Escaso crecimiento
- 60°C.- Ningún crecimiento

Punto de muerte por calor.- Las esporas de una suspensión de esporas calentada a 75°C durante 15 min. continúan siendo viables. Cuando la suspensión de esporas fué calentada a 100°C durante 15 min. no hubo esporas viables.

25

Tensión de oxígeno.- El crecimiento es aerobio o microaerófilo en cultivos con aguja o por picadura.

Efecto del ión férrico.- Solo se produce un pigmento rojo soluble en presencia de ión férrico, y

30

5-6-67



la intensidad de pigmentación es proporcional a la concentración de ión férrico, dentro de un intervalo dado.

Efecto de la concentración de ión hidrógeno, observado en agar de peptona de Czapek.- Ningún crecimiento por debajo de pH igual a 5,0; entre 5,0 y 6,0, el crecimiento y el micelio aéreo son buenos. El crecimiento y la esporulación son abundantes a pH igual a 7,0; entre 8,0 y 8,6, el crecimiento y el micelio aéreo son buenos. El pigmento soluble es más intenso a pH de 5,0 a 6,0, y es entre ligero y nulo a pH de 6,5 a 8,6.

Reacción a la luz, observada en agar de Czapek.- El crecimiento y la esporulación son abundantes en la oscuridad. Cuando unas placas de cultivo son incubadas a 38 cm de una fuente de luz fluorescente blanca fría, normalizada, de 15 watios, el crecimiento es escaso y el micelio aéreo está ausente. El crecimiento y el micelio aéreo son moderados cuando las placas de cultivo se incuban a 38 cm de una bombilla de luz de wolframio esmerilada, de 60 watios.

En la tabla en que se resumen los resultados del ensayo de utilización de carbono, efectuados con S. tenebrarius ATCC 17920, los símbolos empleados se interpretan como sigue:

- + = positivo
- (+) = probable
- (-) = dudoso
- = nada

339495

5-6-67

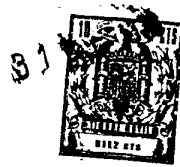
Tabla 3

Utilización de carbono por la cepa *S. tenebrarius* ATCC 17920

| <u>Fuente de carbono</u> | <u>Respuesta</u> | <u>Fuente de carbono</u> | <u>Respuesta</u> |
|--------------------------|------------------|--------------------------|------------------|
| L(+) | - | D(+) | + |
| Arabinosa | | Trehalosa | |
| L(+) | - | L(+) | - |
| Ramnosa | | Rafinosa | |
| D(-) | + | Celulosa | - |
| Ribosa | | Inulina | (-) |
| D(+) | - | i-Inosita | + |
| Xilosa | | Mannita | - |
| D(-) | + | d-Sorbita | (-) |
| Fructosa | | Salicina | (+) |
| D(+) | + | Control (sin carbono) | (-) |
| Mannosa | | | |
| D(+) | + | | |
| Glucosa | | | |
| Lactosa | (-) | | |
| Maltosa | + | | |
| Sacarosa | (+) | | |

339495





El S. tenebrarius ATCC 17920 produce, además de tenebrimicina, el antibiótico antifúngico conocido caerulomicina, que también es producido por el Streptomyces caerulius (Can. J. Microbiol., 5, 317, 1959). La investigación de un cultivo del último organismo reveló que no produce tenebrimicina bajo las condiciones descritas para su cultivo, ni se le puede inducir a que lo haga bajo diversas condiciones.

También se ha aislado y caracterizado una segunda cepa de la nueva especie Streptomyces tenebrarius sp. n., cepa que solo produce tres de los factores del complejo antibiótico. A esta cepa de S. tenebrarius, que solo produce las tenebrimicinas I, I' y II, se le ha asignado el número ATCC 17921. La cepa ATCC difiere de la cepa ATCC 17920, principalmente, en que no puede producir micelio aéreo ni esporas, y en la mayoría de los medios no produce pigmento soluble. Los datos de caracterización de esta cepa del organismo se resumen en los párrafos siguientes. Los métodos empleados para los estudios taxonómicos de S. tenebrarius ATCC 17921 son los mismos antes mencionados en la descripción de la caracterización del S. tenebrarius ATCC 17920, y los símbolos empleados tienen el mismo significado que antes.

Morfología microscópica, características de cultivo y fisiología del S. tenebrarius ATCC 17921.

Morfología .- No hay presentes ni micelio aéreo ni esporas; el micelio de vegetación se fragmenta en cantidades de rebanada.

Características de la colonia en:

Agar de Czapek.- Buen crecimiento vegeta-



tivo, blanco amarillento (9-B1); ningún micelio aéreo; ningún pigmento soluble.

5 Peptona de Czapek.- Abundante crecimiento vegetativo, amarillo grisáceo (12-B3); ningún micelio aéreo; pigmento soluble ligeramente parduzco.

Agar de malato cálcico.- Moderado crecimiento vegetativo, amarillo grisáceo (12-B2); ningún micelio aéreo; pigmento soluble ligeramente marrón grisáceo.

10 Agar de tirosina.- Moderado crecimiento vegetativo, amarillo grisáceo (11-B2); no se produce micelio aéreo ni pigmento soluble.

Agar de sales inorgánicas-almidón.- Buen micelio vegetativo, amarillo-marrón claro (13-C6); ningún micelio aéreo; pigmento soluble marrón claro.

15 Agar de glucosa-asparagina.- Moderado crecimiento vegetativo, amarillo grisáceo (11-D2); ningún micelio aéreo ni pigmento soluble.

20 Pasta de tomate-harina de avena.- Moderado micelio vegetativo, amarillo claro (10-B2); ningún micelio aéreo ni pigmento soluble.

Extracto de levadura.- Moderado micelio vegetativo, amarillo-marrón claro (12-E5); ningún micelio aéreo ni pigmento soluble.

25 Agar nutritivo.- Moderado crecimiento vegetativo, amarillo claro (9-K4); ningún micelio aéreo ni pigmento soluble.

Agar de Bennett.- Moderado crecimiento vegetativo, amarillo grisáceo (12-E4); ningún micelio aéreo ni pigmento soluble.

30 Acción sobre la leche.- Anillo de creci-



miento, de color canela, sobre la superficie. Se observó coagulación y peptonización.

Reducción de nitrato.- Positiva.

Producción de H₂S.- Negativa.

5

Gelatina nutritiva.- Licuación total en 7 días.

Tensión de oxígeno.- El crecimiento es aerobio o microaerófilo en cultivos por picadura.

Requisitos de temperatura en medio de Bennett.-

10

El crecimiento es moderado a 26, 30, 43, 49 y 55°C, y es de lo más abundante a 37°C; no hay crecimiento a 60°C. El micelio vegetativo es amarillo-marrón claro a y por debajo de 27°C, y es marrón ligeramente rojizo a y por encima de 43°C. No se observan ni micelio aéreo ni pigmento soluble a ninguna temperatura.

15

339495

5-6-67

5-6-67

Tabla 4

Utilización de carbono por el S. tenebrarius, cepa ATCC 17921

| <u>Fuente de carbono</u> | <u>Respuesta</u> | <u>Fuente de carbono</u> | <u>Respuesta</u> |
|--------------------------|------------------|--------------------------|------------------|
| L(+) Arabinosa | - | Scarosa | (-) |
| L(+) Ramnosa | - | Trehalosa | (+) |
| D(-) Ribosa | + | Rafinosa | - |
| D(+) Xilosa | (-) | Celulosa | - |
| D(-) Fructosa | + | i-Inosita | + |
| D(+) Mannosa | (+) | Mannita | (-) |
| D(+) Glucosa | + | d-Sorbita | (-) |
| Lactosa | - | Salicina | (-) |
| Maltosa | + | Control (sin carbono) | - |

339495





5 Aunque la invención se describe en detalle con referencia particular a los organismos S. tenebrarius ATCC 17920 y ATCC 17921, recientemente hallados, se ha de entender que la producción del complejo de tenebrimicina, o de los diversos factores comprendidos en dicho complejo, por otras cepas o mutante de dichos organismos, están dentro del ámbito de la invención. Las proporciones de los diversos factores de tenebrimicina producidas por tales otras cepas o mutantes no serían necesariamente las mismas aquí indicadas. Tales otras cepas o mutantes se pueden producir u obtener por métodos conocidos, por ejemplo sometiendo un organismo productor de tenebrimicina a rayos X o irradiación ultravioleta, o a agentes químicos tales como, por ejemplo, mostazas nitrogenadas.

10 El medio de cultivo que se puede emplear en la producción de tenebrimicina puede ser cualquiera de varios medios, ya que, como es evidente por los ensayos de utilización antes descritos, los organismos que producen tenebrimicina, pueden utilizar una variedad de fuentes de energía. Sin embargo, para mayor economía de la producción, máximo rendimiento de antibiótico y facilidad de aislamiento, son preferibles ciertos medios de cultivo que contienen fuentes nutritivas relativamente simples. Por ejemplo, entre los medios que son útiles en la producción de tenebrimicina se incluyen las fuentes asimilables de carbono, tales como glucosa, fructosa, mannososa, maltosa, almidón, y similares. Una fuente de carbono muy preferida es la glucosa. Además, entre los medios que se pueden emplear se incluyen las fuentes



de nitrógeno asimilable, tal como peptonas, caseína hidrolizada, levadura, aminoácidos y similares. Las fuentes de nitrógeno actualmente preferidas son las peptonas, caseína hidrolizada y glutamina.

5

Se pueden incorporar en los medios, con resultados beneficiosos, sales minerales, por ejemplo las que proporcionan iones calcio, magnesio, sodio, potasio, cloruro, sulfato, fosfato y carbonato, aunque se deben evitar los excesos de fosfato, ya que este parece reducir el rendimiento de antibiótico. También se puede incluir beneficiosamente en el medio una fuente de factores de crecimiento tales como levadura o extracto de levadura.

10

15

Igual que se necesita para el crecimiento y desarrollo de otros microorganismos, se deben incluir en el medio de cultivo los elementos de trazas necesarios para el crecimiento de los organismos empleados en la invención. Tales elementos de trazas están presentes corrientemente como impurezas incidentales a la adición de otros constituyentes del medio.

20

25

Las condiciones elegidas para la producción de tenebrimicina son condiciones de cultivo aerobio sumergido. Para preparar cantidades relativamente pequeñas se pueden emplear frascos de agitación y cultivo superficial, pero para preparar grandes cantidades se prefiere el cultivo aerobio sumergido, en depósitos estériles. El medio del depósito estéril puede ser inoculado con una suspensión esporulada, pero se prefiere la forma vegetativa del cultivo, debido al retardo de crecimiento experimentado cuando se usa como agente inoculador una

30

5-6-67



5 suspension esporulada. Al evitar así el retardo de crecimiento se consigue un uso más eficaz del equipo de fermentación. Por tanto, es deseable producir primero con el organismo un agente inculador vegetativo, inoculando una cantidad relativamente pequeña del medio de cultivo con la forma de esporas del organismo, y transferir asépticamente el agente inculador vegetativo al depósito mayor, cuando se haya obtenido un agente inculador vegetativo joven y activo. Se emplea convenientemente una porción del agente inculador vegetativo igual a aproximadamente 4% del volumen del medio en que se induce la inoculación. El medio de fermentación en que se produce el agente inculador vegetativo puede ser el mismo o diferente del medio utilizado para la producción de tenebrimicina a gran escala.

10 Como es evidente por los requisitos de temperatura para el organismo, antes detallados, el organismo crecerá en un intervalo de temperaturas relativamente amplio. Sin embargo, parece que los organismos crecen mejor a temperaturas comprendidas aproximadamente entre 30 y 50°C. Parece que la producción óptima de tenebrimicina tiene lugar a una temperatura de aproximadamente 37 a 43°C. Los organismos que producen la tenebrimicina son sensibles a la luz, y no crecen bien en presencia de ella. Por tanto, las fermentaciones en que se emplean los organismos se efectúan de forma deseable en ausencia de luz visible.

15 Según la práctica habitual en los procedimientos de cultivo aerobio sumergido, se hace pasar aire estéril a través del medio de cultivo. Para que



5 sea eficaz el crecimiento de los organismos y la producción de tenebrimicina, el volumen de aire empleado en la producción de tenebrimicina en depósitos es mayor que 0,1 volúmenes de aire por minuto por volumen de medio de cultivo, y preferiblemente es sustancialmente mayor. El crecimiento eficaz de los organismos y los rendimientos óptimos de tenebrimicina se obtienen cuando el volumen de aire empleado es al menos 1 volumen de aire por minuto por volumen de medio de cultivo.

10 La concentración de actividad de tenebrimicina en el medio de fermentación se puede seguir fácilmente durante el curso de la fermentación, sometiendo a ensayo muestras del medio de cultivo, para determinar su actividad inhibidora del crecimiento de organismos de los que se sabe que son inhibidos en presencia de tenebrimicina. Dos de los organismos así empleados, para seguir la producción de tenebrimicina, son el Klebsiella pneumoniae y Mycobacterium butyricum. El primer organismo se emplea generalmente en la bien conocida técnica turbidimétrica, mientras que el último se utiliza en el método de placa de vaso.

20 En general, la producción máxima del antibiótico tiene lugar en de 4 a 7 días después de la inoculación del medio de cultivo, cuando se emplea el cultivo aerobio sumergido o cultivo en frasco de agitación, y en un tiempo algo mayor cuando se usa cultivo superficial.

25 El micelio y los residuos no disueltos son separados del caldo de fermentación por medios usuales, tal como filtración o centrifugación. El producto activo



antibiótico está contenido en el caldo filtrado, y puede ser recuperado del mismo empleando técnicas de absorción. los absorbentes que se pueden emplear más ventajosamente son las resinas intercambiadoras de cationes, por ejemplo las del tipo disponible en el comercio con el nombre registrado "IRC-50".

En general, el método para recuperar tenebrimicina del caldo de fermentación es el siguiente. La totalidad del caldo es filtrado con ayuda de un coadyuvante de filtración, después de haberse reducido el pH de la mezcla hasta aproximadamente 2, por adición de un ácido tal como ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico y similares. El pH del filtrado se ajusta a aproximadamente 5,5, por adición de una base concentrada, y se vuelve a filtrar la mezcla. Se hace pasar el filtrado por una columna de intercambio de iones, llena de una resina tal como IRC-50 en el ciclo amónico. Luego es lavada la columna con agua destilada, y el producto activo antibiótico es eluido con ácido diluido. Las fracciones que contienen el producto activo antibiótico son reunidas y concentradas hasta aproximadamente 1/20 del volumen original. El pH del concentrado es aumentado hasta aproximadamente 11, por adición de base concentrada, y el concentrado básico es vertido en aproximadamente 6 volúmenes de acetona, mezclado bien y enfriado. El precipitado microbiológicamente inactivo que se separa es eliminado por filtración. Se reduce el pH del filtrado hasta aproximadamente 3,5, por adición de ácido sulfúrico al 20%, con mezclado concienzudo. El complejo de tenebrimicina es precipitado en forma de sal sulfato,



31

mientras que la caerulomicina que se produce conjunta-
mente en la fermentación permanece en la capa que sobre-
nada, que es despreciada. Se disuelve el sulfato de te-
nebrimicina en la mínima cantidad de agua, y se hace pa-
5 pasar la solución acuosa por una columna de Dowex 1 x 1.
La solución acuosa de sulfato de tenebrimicina es seguida
por agua destilada, en la columna, y el efluente de la
columna se recoge en fracciones. Las fracciones activas
son reunidas y concentradas hasta formar un jarabe espe-
10 so, y luego son secadas, produciendo la forma de base
libre de la tenebrimicina.

Si se desea, los principales factores
comprendidos en el complejo de tenebrimicina pueden ser
obtenidos como antibióticos individuales, por nuevo frac-
15 cionamiento de la tenebrimicina obtenida como se ha des-
crito antes, en columnas de intercambio de iones. Para
el fraccionamiento, la tenebrimicina se emplea en forma
de sal de adición de ácido, convenientemente de sulfato.
Se obtiene convenientemente una solución de sulfato de
20 tenebrimicina preparando una solución acuosa de tenebri-
micina al 20%, y ajustando el pH de la solución a apro-
ximadamente 4,5, por adición de ácido sulfúrico. Las
impurezas coloreadas pueden ser eliminadas agitando la
solución así preparada con aproximadamente 5% (peso/vo-
25 lúmen) de un carbono activo tal como, por ejemplo,
Darco G-60. La descoloración efectiva se obtiene usual-
mente agitando la mezcla que contiene el carbono, duran-
te aproximadamente 1 hora. Luego se filtra la mezcla, y
el filtrado que contiene el sulfato de tenebrimicina se
30 carga en una columna llena de IRC-50 en el ciclo amónico.



La columna es lavada con agua, y los antibióticos individuales comprendidos en el complejo de tenebrimicina son eluidos de forma fraccionada, con hidróxido amónico 0,1 N. En términos generales, la elución se efectúa de forma extremadamente lenta, y se necesita usualmente un número muy grande de fracciones, para efectuar el fraccionamiento del complejo. Así, por ejemplo, el fraccionamiento total de aproximadamente 250 g de tenebrimicina requiere aproximadamente 700 fracciones, comprendiendo cada una aproximadamente 900 ml de eluido.

Las primeras fracciones activas obtenidas contienen las tenebrimicinas I, I' y II. Estas son seguidas por una serie de fracciones activas en las que el único antibiótico presente es tenebrimicina II. La elución de tenebrimicina II es seguida por un cierto número de fracciones inactivas, antes de que sean eluidas las fracciones que contienen tenebrimicina IV. Parece que las primeras fracciones que contienen tenebrimicina IV contienen trazas de tenebrimicina III. La tenebrimicina V es obtenida de la columna en las fracciones activas que siguen a la tenebrimicina IV. Para obtener tenebrimicina VI se sigue eluyendo la columna con una solución de hidróxido amónico más concentrada, después de haberse recuperado de la columna toda la tenebrimicina V. El hidróxido amónico 0,3 N es un eluyente adecuado para la separación de tenebrimicina VI.

Ejemplo 1

Preparación de tenebrimicina

Se produce un cultivo esporulado de S. tenebrarius ATCC 17920, cultivando el organismo en un

339495



medio inclinado de agar de Bennett modificado que tiene la siguiente composición:

| | | |
|----|---|---------|
| | Dextrina | 10 g. |
| 5 | Extracto de levadura (Difco) | 1 g |
| | Caseina hidrolizada (NZ-Amine A, vendida por Sheffield Farms) | 2 g |
| 10 | Extracto de carne de va- cuno (Difco) | 1 g |
| | CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0,01 g |
| | Agar lavado | 20 g |
| | Agua desionizada, c.s. | |
| | para | 1000 ml |

15 El pH del medio se ajusta a 7, antes de tratar en autoclave.

El medio inclinado es inoculado con esporas de S. tenebrarius ATCC 17920, y es incubado en ausencia de luz visible, durante 5 días a 37°C. El crecimiento del cultivo en el medio inclinado es cubierto con agua, y el medio es rascado suavemente para separar las esporas, proporcionando una suspensión acuosa de esporas.

20 La suspensión de esporas así obtenida se emplea para inocular 800 ml de un medio que tiene la siguiente composición:

| | | |
|----|--|-------|
| 25 | Dextrosa | 0,05% |
| | Harina Nutrisoy (vendida por Archer-Daniels-Midland Company; | |
| | contiene de 35 a 45% de | |

339495



| | | |
|----|---|--------|
| | proteína dispersable) | 1,5% |
| | Dextrina 700 (dextrina de patata con poco cloruro, fabricada por Morningster-Paisley Company) | 1% |
| 5 | Cloruro potásico | 0,1% |
| | MZ-Amine A | 0,3 |
| | KH_2PO_4 | 0,05% |
| 10 | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,5% |
| | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,025% |
| | Agua desionizada | |

El medio vegetativo inoculado es incubado a aproximadamente 37°C durante 16 horas, en un agitador rotatorio que trabaja a 250 rpm, y que tiene una excentricidad de 64 mm.

Se emplea una porción de 50 ml. del cultivo vegetativo para inocular un depósito de siembra de 44 litros, que contiene un medio acuoso que tiene la siguiente composición:

| | | |
|----|---|--------|
| | Dextrosa | 1% |
| | Sémola de soja | 1,5% |
| | KH_2PO_4 | 0,05% |
| | MgSO_4 | 0,5% |
| 25 | KCl | 0,1% |
| | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,025% |
| | Agente antiespumante | 0,025% |

339495

El medio del depósito de siembra es esterilizado a 120°C durante aproximadamente 30 min. El medio del depósito de siembra inoculado es incubado a 37°C durante 12 horas. La agitación a una velocidad de 370 rpm. se



5 inicia inmediatamente después de la inoculación, y durante todo el período de incubación se mantiene una aireación con caudal de 22,5 litros/min. Al final del período de incubación se utiliza el contenido del depósito de siembra para inocular un fermentador de 950 litros, que contiene un medio que tiene la siguiente composición:

| | | |
|----|-------------------------|------|
| | Dextrosa | 4% |
| | Aceite de soja refinado | 3% |
| 10 | Harina de soja | 3% |
| | NH_4Cl | 0,5 |
| | $CaCl_2$ | 0,3% |
| | $MgSO_4$ | 0,2% |
| | NH_4NO_3 | 0,1% |
| 15 | NZ-Amine A | 0,5% |
| | Agente antiespumante | 0,2% |
| | Agua desionizada | |

20 Antes de la inoculación, el medio de fermentación es esterilizado durante 30 min. a 120°C. La fermentación es efectuada a 37°C, con aireación con caudal de 475 litros/min., durante todo el período desde la inoculación hasta la recogida. La agitación se inicia a 125 rpm y se aumenta hasta 180 rpm al cabo de 12 horas. La fermentación se continúa durante 5 días.

25 El caldo de cultivo fermentado se filtra, para separar el micelio y otros sólidos no disueltos. El caldo filtrado contiene tenebrimicina, en concentración de aproximadamente 680 unidades/ml.



: Ejemplo 2

Preparación de tenebrimicina I, I' y II

5 Se sigue el método descrito en el ejemplo 1,
usando S. tenebrarius ATCC 17921 como organismo productor
del antibiótico. El caldo de fermentación filtrado así
obtenido contiene predominantemente tenebrimicina II,
con pequeñas porciones de tenebrimicinas I y I'.

Ejemplo 3

10 Aislamiento de complejo de tenebrimicina

El pH de 880 litros de caldo de fermentación
de antibiótico, obtenido como se describe en el ejemplo
1, es reducido hasta aproximadamente 2 por adición de
aproximadamente 10 a 15 litros de ácido sulfúrico acuoso
15 al 20%. Después de añadir al caldo acidificado 45 kg. de
un coadyuvante de filtración, del comercio, la mezcla
se somete a mezclado concienzudo y se filtra. La torta
de filtración se lava con agua, y la solución de lavado
se añade al filtrado.

20 El pH del filtrado se ajusta a 5,5, por
adición de hidróxido sódico acuoso al 50%. Se añaden
aproximadamente 4 kg de un coadyuvante de filtración,
del comercio, y la mezcla se agita concienzudamente y
se filtra. El filtrado se hace pasar por una columna de
25 IRC-50 que tiene unas dimensiones de 10,2 x 183 cm. La
columna está llena de resina en ciclo amónico, hasta
una altura de lecho de 112 a 114 cm. Después de haber
pasado todo el filtrado por la columna, la columna es
lavada con aproximadamente 200 litros de agua destila-
30 da. El producto activo antibiótico es eluído luego, en



un período de aproximadamente 12 a 15 horas, con aproximadamente de 150 a 175 litros de ácido sulfúrico 0,1 N, recogién dose el eluido en fracciones de 10 litros. La actividad antibiótica se hace detectable en el eluido cuando su pH disminuye hasta aproximadamente 4, o algo menos. A medida que avanza la elución continúa descendiendo el pH del eluido, hasta que llega a un nivel de aproximadamente 1,5. Las fracciones que contienen producto activo antibiótico son reunidas y concentradas a presión reducida, hasta aproximadamente 1/20 del volumen original.

El pH del eluido concentrado se ajusta a 11 por adición de hidróxido sódico acuoso al 50%, y el concentrado básico es añadido después a aproximadamente 6 volúmenes de acetona. La mezcla es enfriada a baja temperatura y abandonada, para permitir que se separe un precipitado exento de actividad antibiótica. La mezcla es filtrada, y la torta de filtración, que contiene precipitado inactivo, es lavada con agua y despreciada.

El pH del filtrado es ajustado a 3,5, por adición de ácido sulfúrico acuoso al 20%, con mezclado concienzudo. El complejo de tenebrimicina precipita como sulfato durante este tratamiento, y es precipitado de forma sustancialmente total cuando el pH de la solución llega a aproximadamente 4, o algo menos. La mezcla es filtrada, y el filtrado, que contiene la caerulomicina que se produjo conjuntamente en la fermentación, es despreciado.

339495

La torta de filtración que comprende el sulfato de tenebrimicina es disuelta en la mínima cantidad

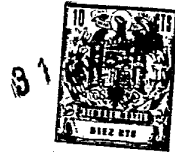


de agua, y enfriada a baja temperatura. Cualquier sólido que no se disuelva fácilmente es despreciado, igual que todo sólido que precipite o cristalice durante el enfriamiento a baja temperatura. La solución transparente de sulfato de tenebrimicina es hecha pasar por un lecho de resina Dowex 1 x 1, en el ciclo básico, de 10,2 x 213 cm. La solución de antibiótico es seguida, en la columna, por aproximadamente de 40 a 50 litros de agua destilada. El efluente es recogido en fracciones de 10 litros, y las fracciones activas son combinadas y concentradas a vacío, formando un jarabe espeso que es secado en bandeja, dando tenebrimicina seca.

Ejemplo 4

Separación de los factores de tenebrimicina

Se obtiene sulfato de tenebrimicina, ajustando a 4,5 el pH de una solución acuosa al 20%, que contiene 258 g del complejo de tenebrimicina en forma de base libre, por adición de ácido sulfúrico concentrado. La solución de sulfato de tenebrimicina así preparada es descoloreada por agitación, durante aproximadamente 1 hora, con 5% (peso/volumen) de Darco G-60. La solución es filtrada, y el filtrado es hecho pasar por una columna de 9 x 105 cm., llena con aproximadamente 7 litros de resina IRC-50 en el ciclo amónico. Después de haber pasado a través de la columna el filtrado que contiene la sal de antibiótico, la columna es lavada con aproximadamente 17 litros de agua desionizada. La elución del producto activo antibiótico retenido en la columna se inicia con solución de hidróxido amónico 0,1 N, con caudal de aproximadamente 20 ml/min. El eluido es recogido en fracciones



de aproximadamente 900 ml., y en cada fracción se determina la actividad microbiológica. Las fracciones que contienen el mismo factor antibiótico son reunidas y liofilizadas, para obtener las tenebrimicinas individuales secas. Las tenebrimicinas individuales están distribuidas entre las fracciones activas, de la forma siguiente:

| | <u>Fracción</u> | <u>Antibiótico presente</u> |
|----|---|--|
| | 1-34 | Inactiva |
| 10 | 35-53 | Tenebrimicina I, I' y II |
| | 54-77 | Tenebrimicina II |
| | 78-153 | Inactiva |
| | 154-172 | Tenebrimicina IV con trazas de tenebrimicina III |
| 15 | 173-249 | Tenebrimicina IV |
| | 250-256 | Inactiva |
| | 257-634 | Tenebrimicina V |
| | 635-668* | Inactiva |
| | 669-698 | Tenebrimicina VI |
| 20 | *En este punto se cambia el eluido a hidróxido amónico 0,3 N. | |

Ejemplo 5

Preparación de heliantatos de las tenebrimicinas

La preparación de los heliantatos de las tenebrimicinas individuales se ilustra por el siguiente método para preparar heliantatos de tenebrimicina II.

Una solución de 2 g de tenebrimicina II en 22 ml de agua es preparada y ajustada a un pH igual a 5, por adición de ácido sulfúrico al 50%. Luego se añade

30
5-6-67

339495



a la solución de antibiótico una solución acuosa caliente de naranja de metilo al 10%. El heliantato de tenebrimicina II se separa como precipitado, y es separado por filtración. La sal sólida es lavada concienzudamente con agua caliente, y secada bajo vacío, produciendo 3,5 g. de heliantato de tenebrimicina II.

Ejemplo 6

Purificación final de los factores de tenebrimicina

La purificación final de los factores individuales de tenebrimicina se ilustra por el método siguiente para purificar la tenebrimicina VI.

Se prepara el heliantato de tenebrimicina VI, según un método análogo al descrito en el ejemplo 5. Se forma una suspensión de 4 g de la sal así preparada con aproximadamente 200 ml de agua, ajustado a un pH igual a 2 por adición de ácido sulfúrico. La mezcla es agitada durante aproximadamente 4 horas, y luego es filtrada por un embudo de vidrio sinterizado, de porosidad intermedia, para separar el ácido heliántico. El filtrado es descolorado haciéndole pasar por una capa delgada de carbono activo, y luego es hecho pasar por una columna de 1 x 32 cm, llena de resina Dowex 1 x 2 en el ciclo hidroxílico. El filtrado es seguido, en la columna, por agua destilada para completar la elución del producto activo antibiótico. El efluente es recogido en fracciones, y las fracciones activas son reunidas y liofilizadas, dando un residuo seco que comprende el antibiótico. El residuo es disuelto en aproximadamente 15 ml de agua, y luego es hecho pasar por una columna de 1 x 25 cm, llena de resina



Bio Rad AG11A8 (es una resina del tipo de retraso de ión, preparada polimerizando ácido acrílico en una resina Dowax 1, y vendida por Bio Rad Laboratories, Richmond, California). El producto activo antibiótico es eluido de la columna con agua destilada, y las fracciones activas se vuelven a reunir y liofilizar, produciendo aproximadamente 700 mg de tenebrimicina VI muy purificada.

- N O T A -

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención, en España, por VEINTE años, son los siguientes:

1.- Método para producir un complejo antibiótico de tenebrimicina, tenebrimicina I, I', II, III, IV, V, VI, o mezclas de ellas que comprende cultivar un microorganismo, Streptomyces tenebrarius, en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, bajo condiciones de inmersión aerobia, hasta que una cantidad sustancial de antibiótico deseado es producido por dicho microorganismo en dicho medio de cultivo.

2.- Método según la reivindicación 1, donde el medio de cultivo es mantenido a una temperatura comprendida entre aproximadamente 37°C y aproximadamente 43°C, y el crecimiento del microorganismo es efectuado durante de aproximadamente 4 a aproximadamente 7 días.

3.- Método según la reivindicación 1 ó 2,



donde el crecimiento del microorganismo es efectuado en ausencia de luz visible.

5 4.- Método según la reivindicación 1, 2 ó 3, donde se aísla tenebrimicina I, tenebrimicina I', tenebrimicina II, tenebrimicina III, tenebrimicina IV, tenebrimicina V, tenebrimicina VI, o mezclas de ellas, del complejo de tenebrimicina.

10 5.- Método según la reivindicación 1, 2 ó 3, donde el microorganismo es Streptomyces tenebrarius ATCC 17920 o ATCC 17921.

15 6.- Método según la reivindicación 5, donde se cultiva Streptomyces tenebrarius ATCC 17920, se recupera de dicho medio de cultivo el complejo de tenebrimicina, y se aísla del complejo tenebrimicina II, tenebrimicina IV, tenebrimicina V o tenebrimicina VI.

7.- Método según la reivindicación 5, que comprende cultivar Streptomyces tenebrarius ATCC 17921, y producir tenebrimicina II que contiene menores cantidades de tenebrimicina I y tenebrimicina I'.

20 8.- Método para producir un complejo antibiótico de tenebrimicina.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y con los fines que se han especificado.

339495



Esta Memoria consta de cuarenta y cuatro ho-
jas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 31 ENC 1967

P.A.

[Handwritten signature]

fb.

5-6-67

339495

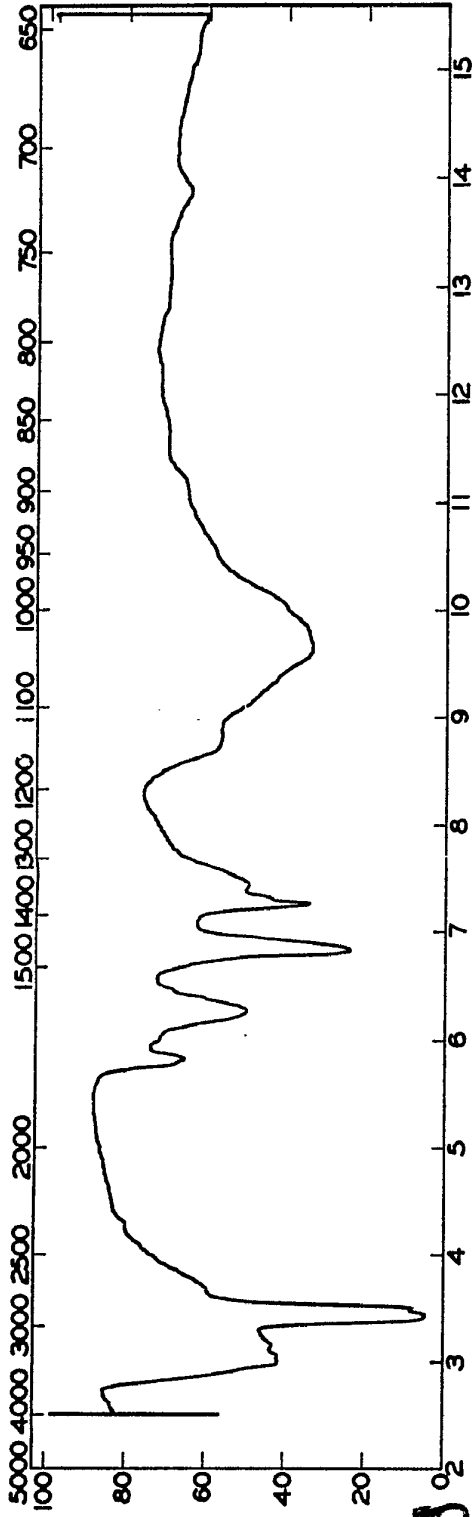


FIG. 1

339495

339495

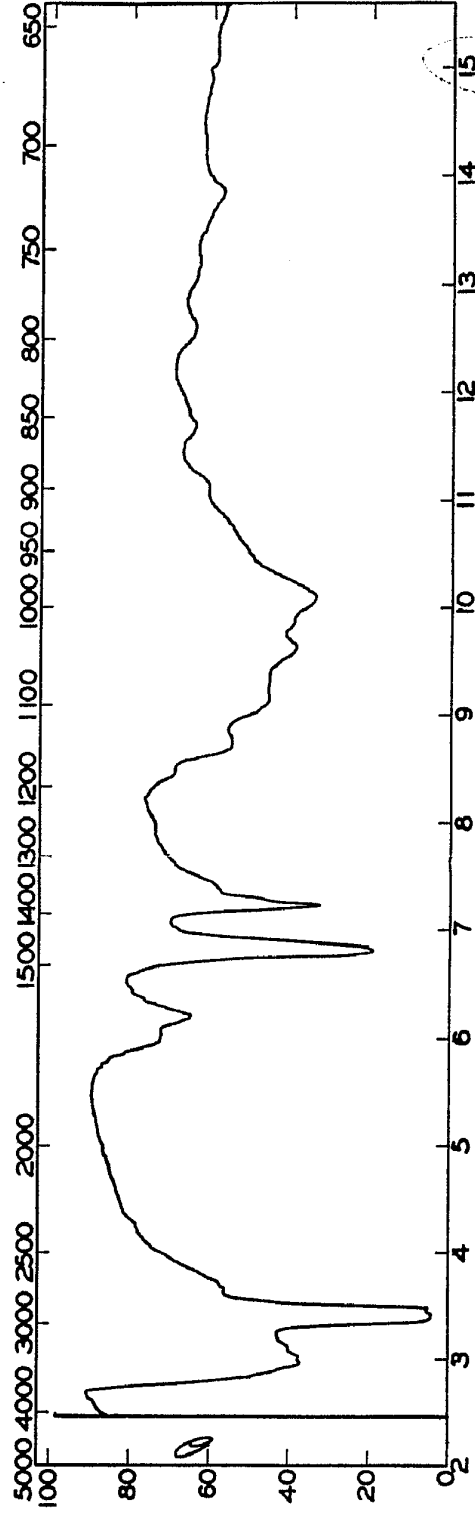


FIG. 2

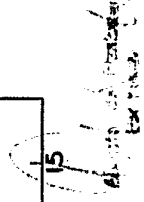

 Alberto de la Hoz
 Tax number

FIG. 1

339495

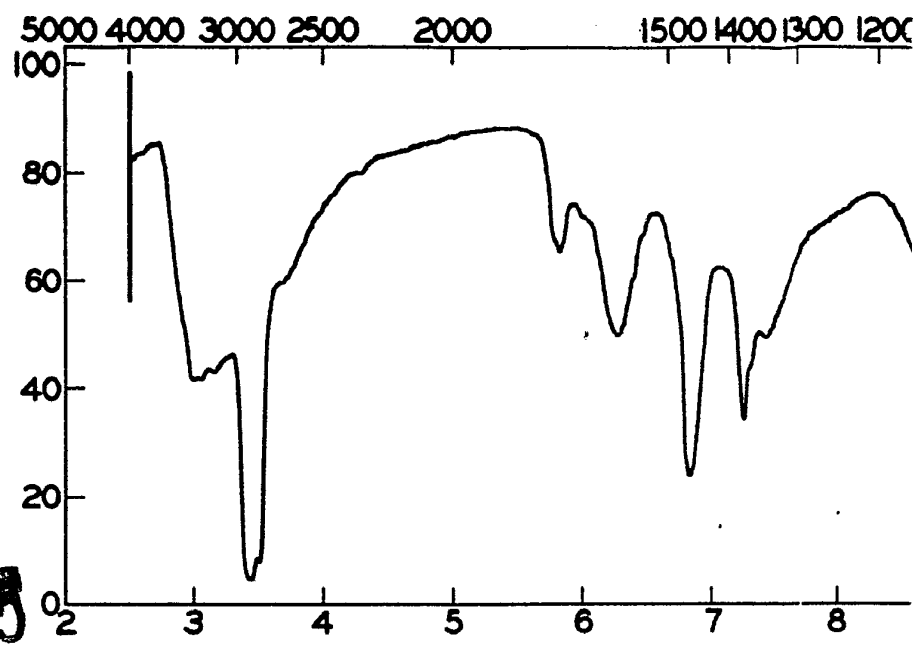
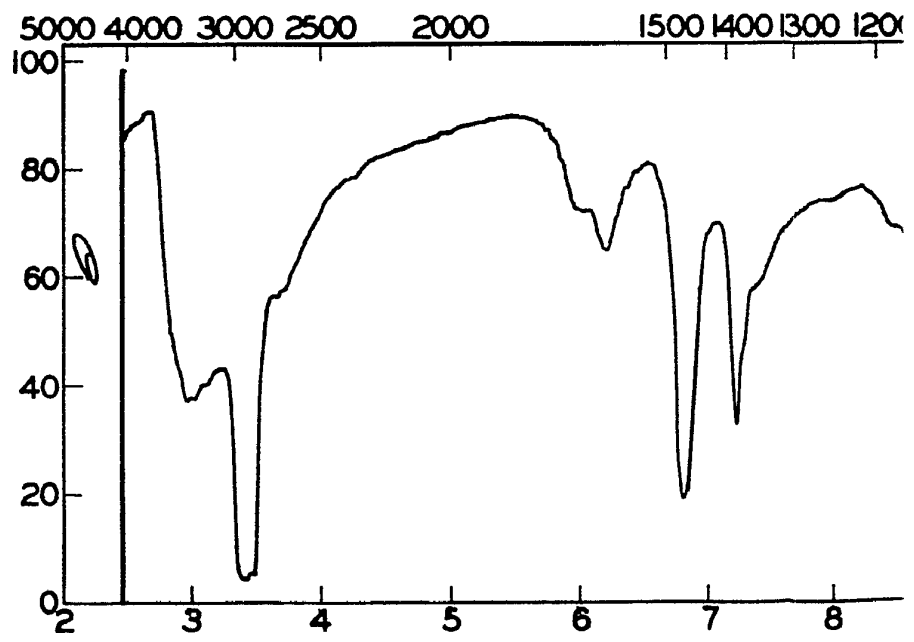
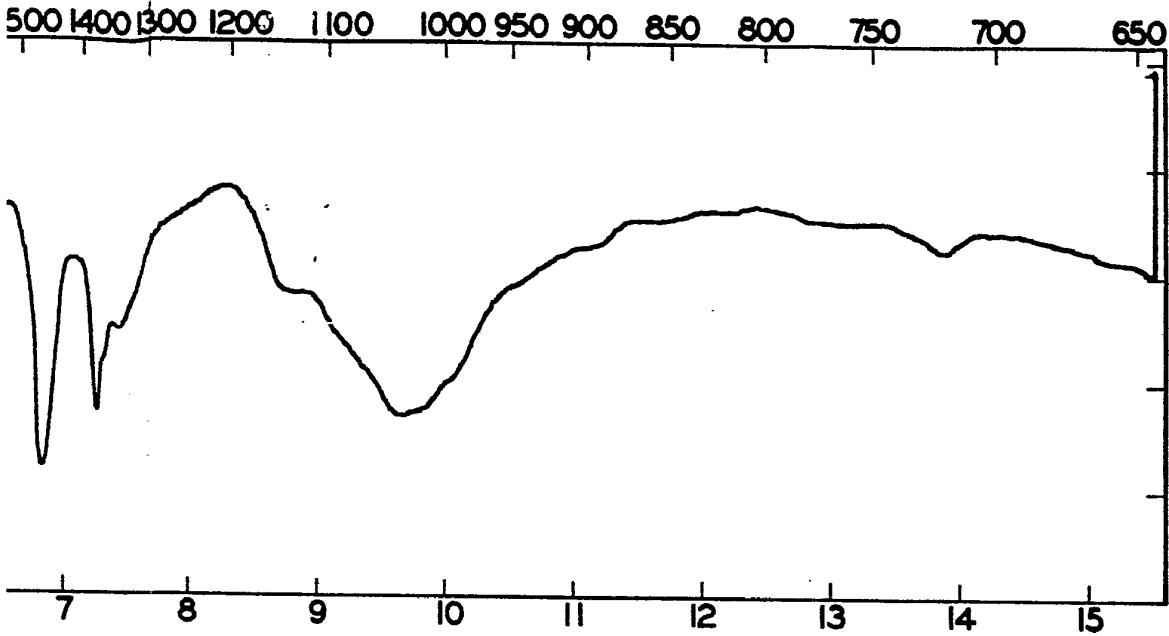


FIG. 2

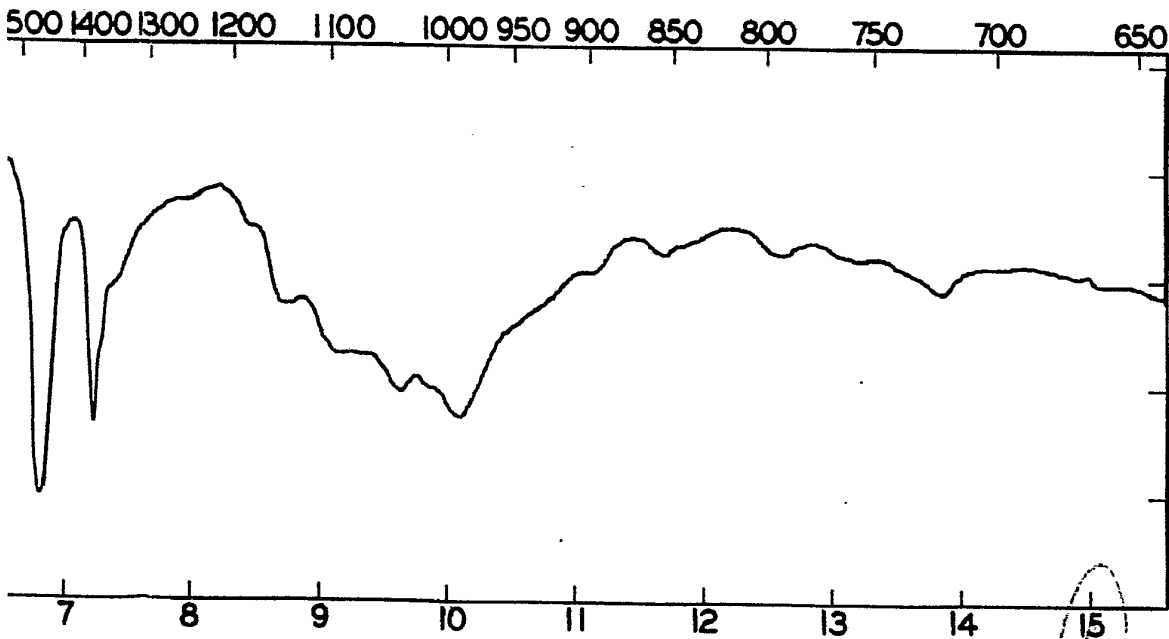


SPAIN

1402



339495



Alfredo de Alencar
Ex. 1000



5 MY

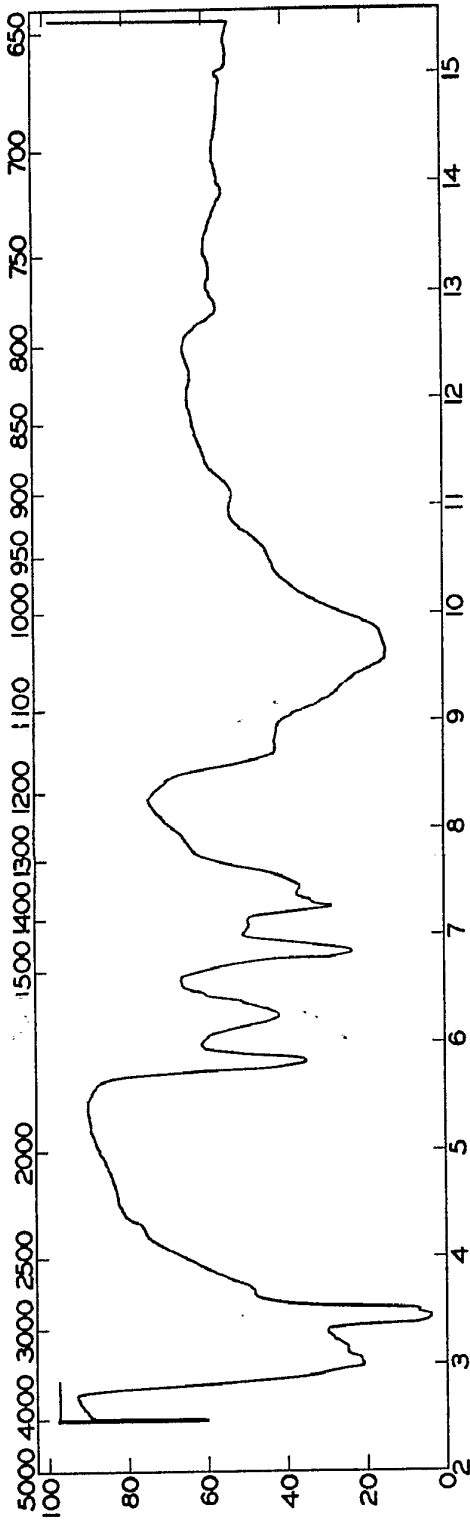


FIG. 3

339495

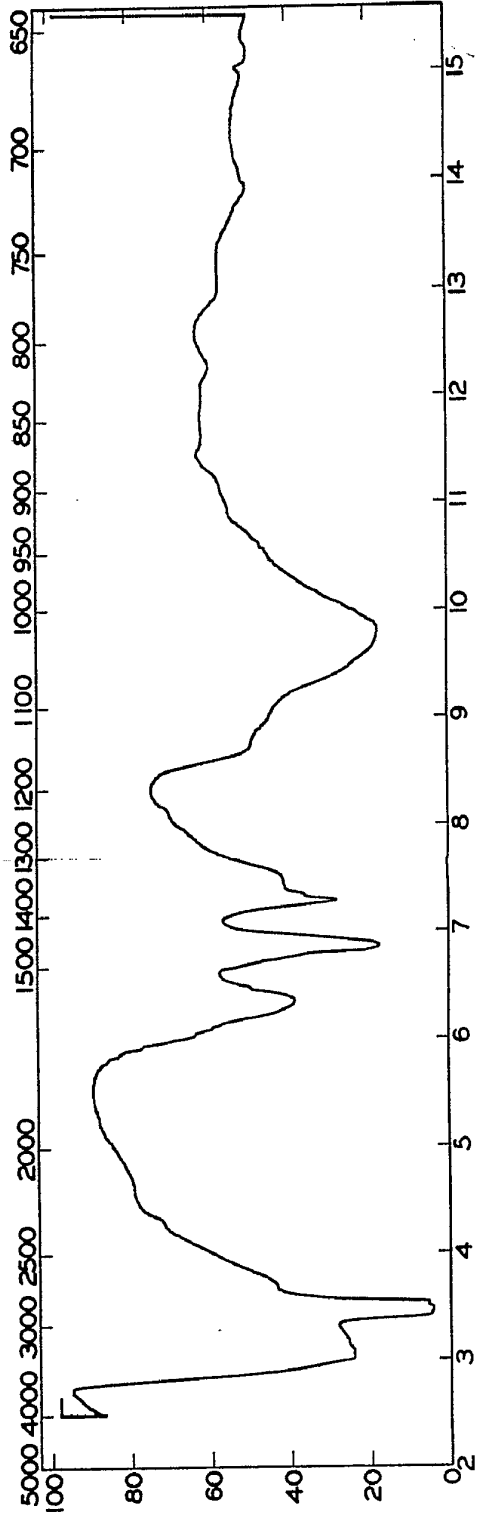
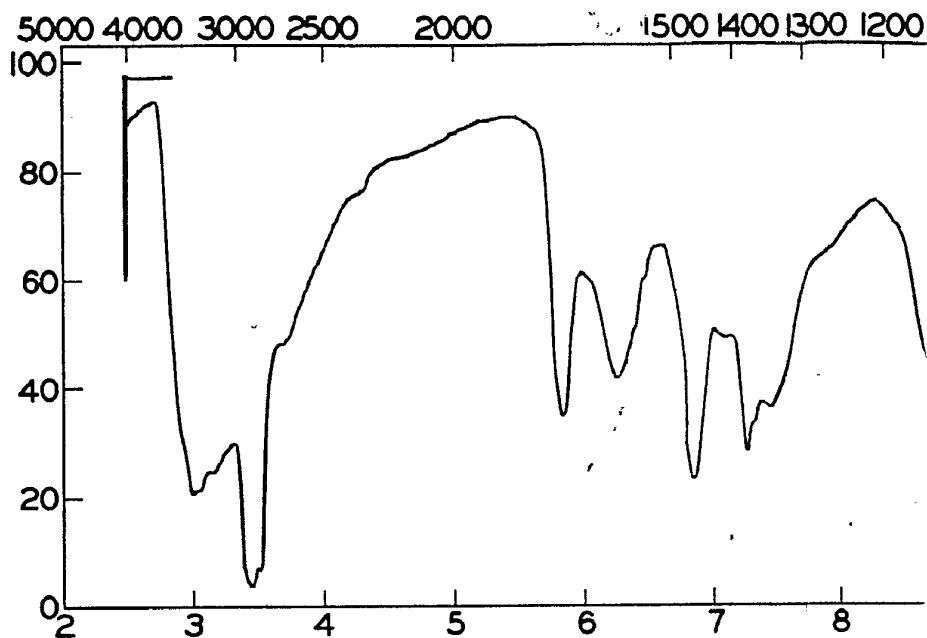


FIG. 4

339495

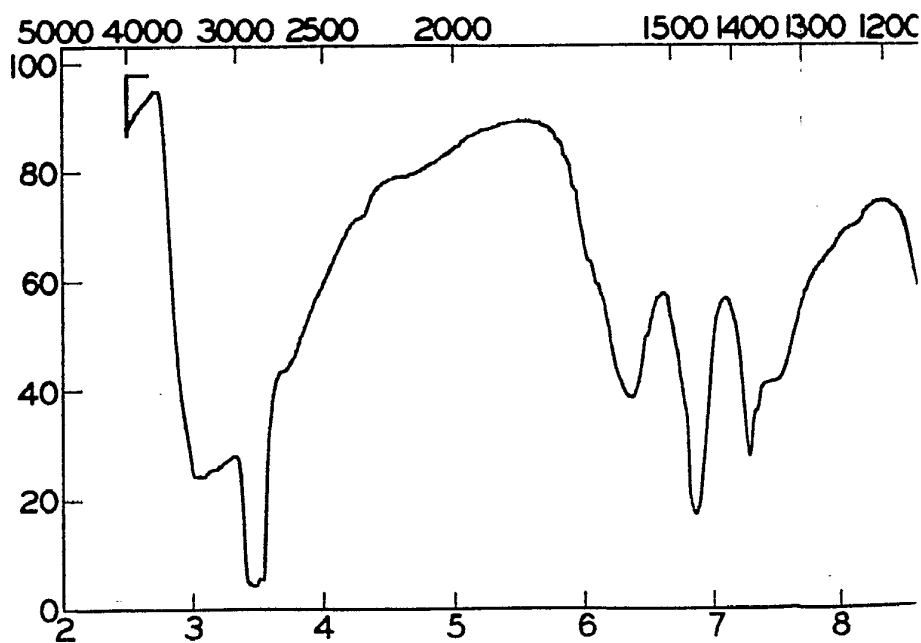
Handwritten signature or initials in the bottom right corner.

FIG. 3

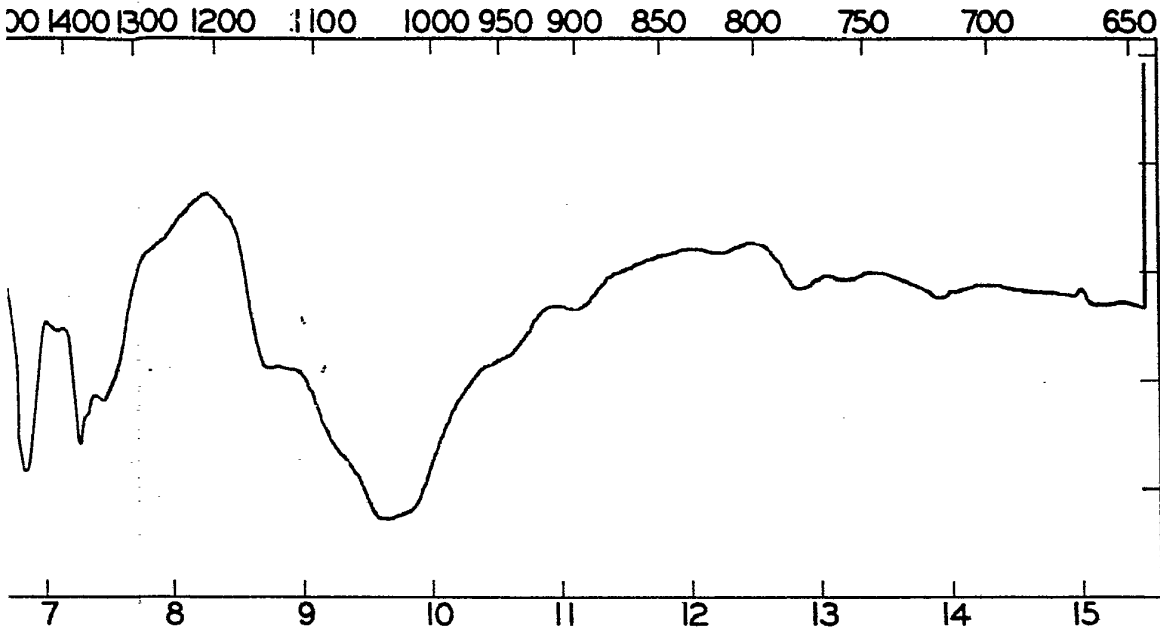


339495

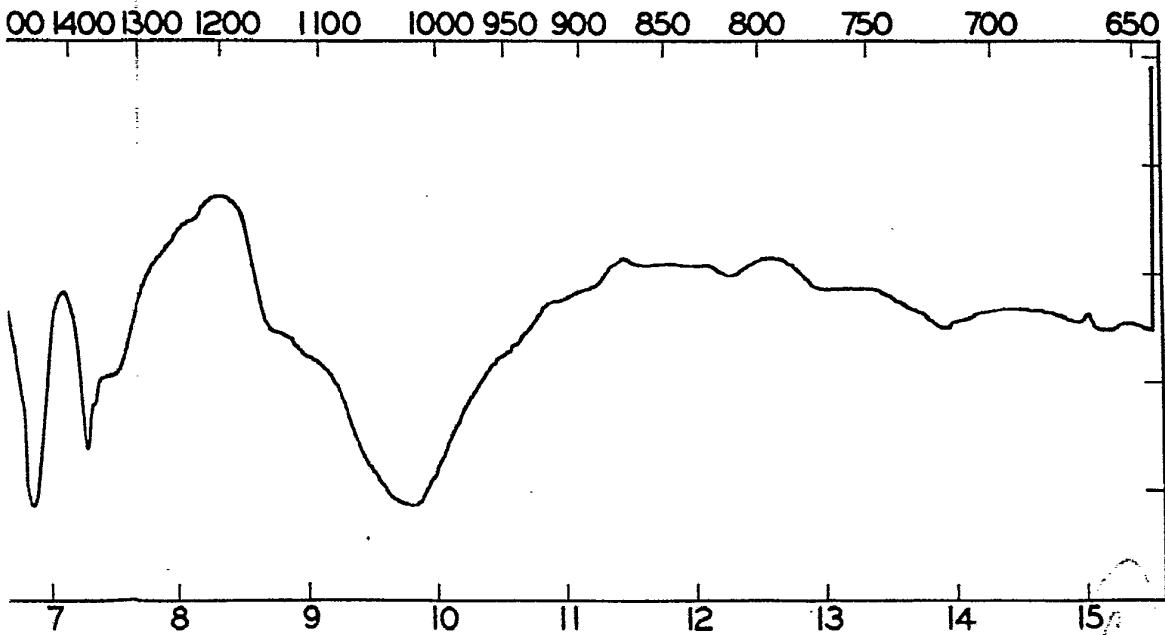
FIG. 4



S:AIN



339495



Handwritten signature or scribble

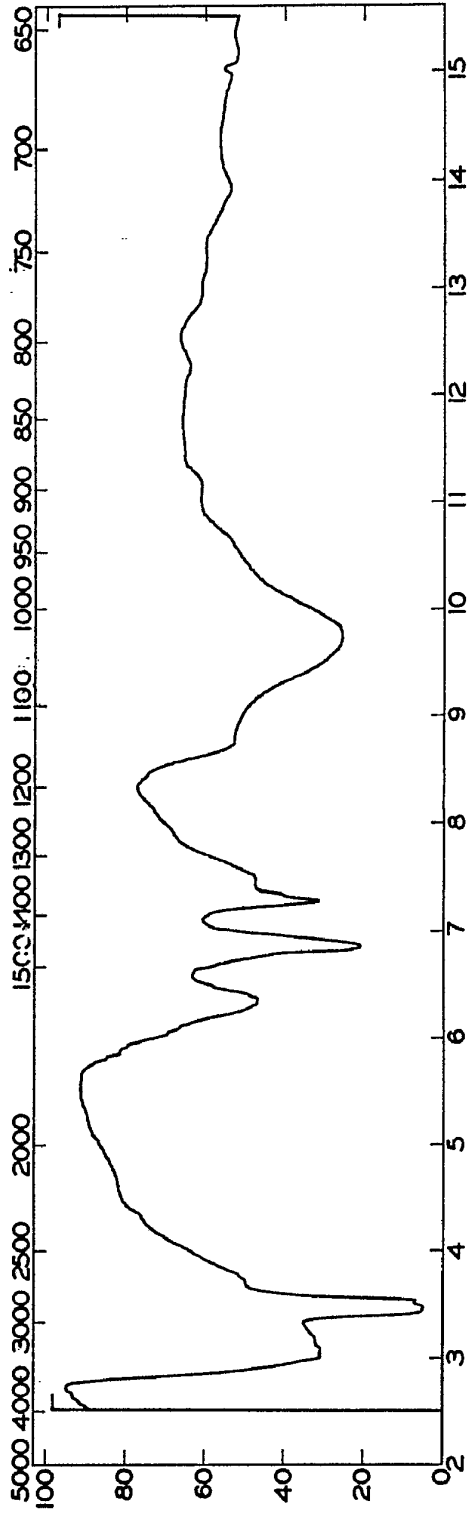


81

339495

339495

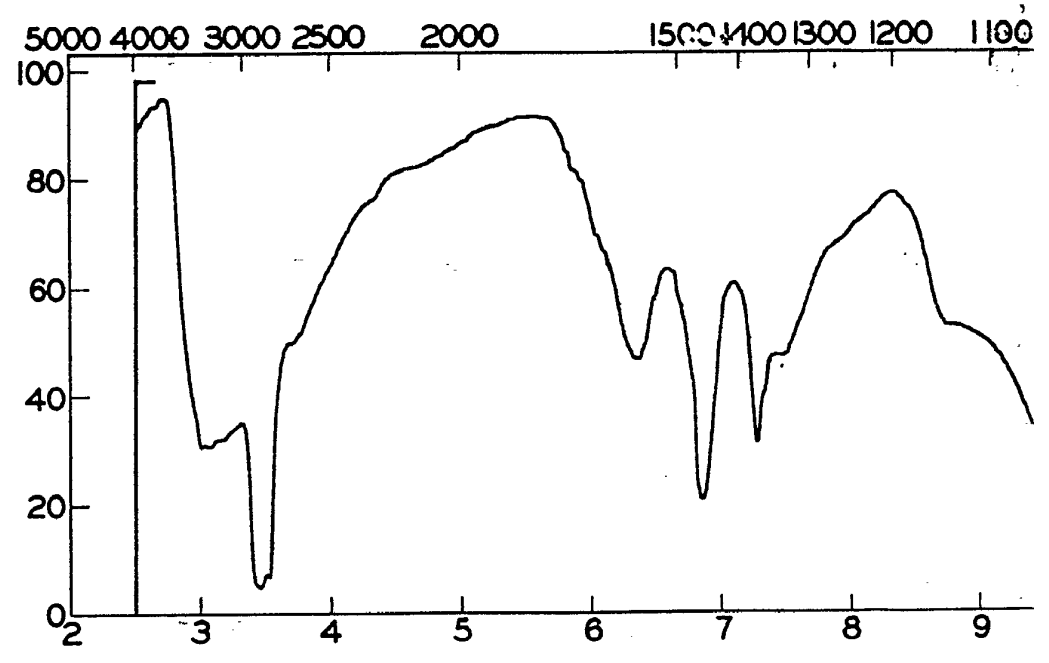
FIG. 5



Handwritten signature or initials in the bottom right corner.

339495

FIG. 5



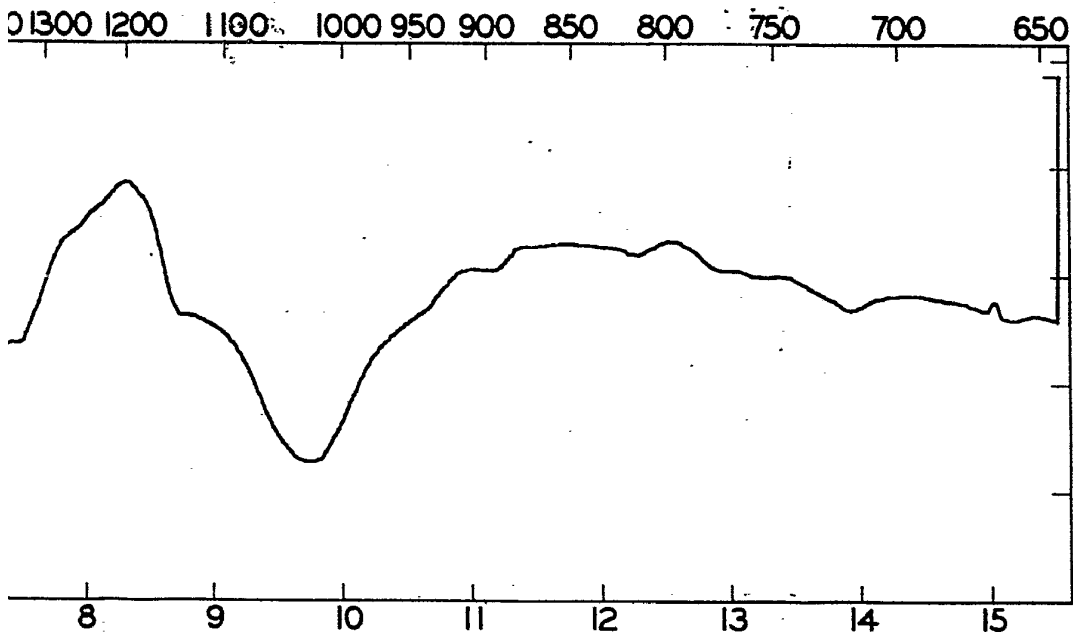
SPAIN

81



FIG. 5

339495



[Handwritten signature]