

P. 36.720.-

B 1212  
Case P.C. 4962 LH(SDG)

347 136

**Memoria descriptiva**

12 FEB 1968



para solicitar PATENTE DE INVENCION

por 20 años

a nombre de CHAS. PFIZER & CO., INC.

entidad / ~~de nacionalidad~~ norteamericana

con domicilio en 235 East 42nd Street, Nueva York, N.Y.,  
Estados Unidos de América

por: "UN PROCEDIMIENTO DE FABRICAR CARBOMICINA A POR FERMENTACION" (Clase Internacional C12d)



La presente invención se refiere a la fabricación del antibiótico denominado carbomicina A y, en particular, al empleo de agentes tensoactivos en su fabricación por fermentación.

En el procedimiento para la fabricación de carbomicina A por fermentación, la adición al medio de fermentación de un agente tensoactivo que consiste en un éter de (poli)oxietilenglicol soluble, no iónico ni inhibidor de desarrollo, en proporción que dé una concentración aproximada de solución del 0,2-4% de dicho agente tensoactivo en dicho medio, da lugar a un apreciable aumento en la potencia del caldo de fermentación. En el presente invento es preferible fabricar el antibiótico por cultivo del Streptomyces halstedii ATCC-13449 en un medio nutriente acuoso, en condiciones aeróbicas de sumersión. La presente fermentación se distingue de otras muchas fermentaciones productoras de antibióticos en que, según parece, se necesita durante el procedimiento un desarrollo y división de células a fin de obtener la producción de carbomicina A, lo que da lugar al requisito de que el agente tensoactivo sea no inhibidor del desarrollo. Asimismo, esta fermentación es única y singular por el hecho de que el cultivo utilizado tiene la inusitada característica de formar conglomerados de desarrollo fuertemente retorcidos, que se asemejan a abultados cilindros con cabos o extremos sueltos. Los agentes tensoactivos no iónicos aflojan estos conglomerados, con el consiguiente refuerzo de potencia que, según se piensa, ocurre a causa de una mejor transmisión o traslación de nutrientes en la superficie de las células. Parte del efecto pudiera deberse también a la mayor solubilidad de los in-



termedios críticos.

Los agentes tensoactivos eficaces para la presente invención son los productos no iónicos de condensación de un óxido de etileno hidrófilo en todos los casos presentes, y de un hidrófugo seleccionado de entre los alcoholes grasos y alcohilfenoles de cadena recta, tales como el nonilfenol, alcohol de laubilo, alcohol de tridecilo, alcohol de estearilo y alcohol de oleilo. Haciendo variar el tanto por ciento en peso de óxido de etileno contenido en el agente tensoactivo, es posible modificar las características de este último adaptándolo a su empleo como emulsificante, agente humectante, solubilizante, etc.; una escala que suele usarse para medir el tanto por ciento en peso de óxido de etileno contenido en el agente tensoactivo es el índice o número de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB), igual a la quinta parte del tanto por ciento en peso de óxido de etileno contenido en los presentes agentes tensoactivos. Parece ser que, aumentando la proporción en peso del contenido de óxido de etileno se llega a reducir el grado en que el agente tensoactivo puede inhibir el desarrollo del microorganismo. Así, un elevado índice de HLB parece indicar que los agentes tensoactivos, en la presente invención, son no inhibidores del desarrollo. Naturalmente, según la naturaleza del hidrófugo del agente tensoactivo, hay varios intervalos de variación del índice de HLB que han demostrado resultar efectivos para con los diversos agentes tensoactivos. Por consiguiente, no es posible especificar un valor mínimo del índice de HLB, por debajo del cual todos los agentes tensoactivos lleguen a ser inhibidores del desarrollo; pero, en ge



neral, los agentes tensoactivos que han resultado ser eficaces tienen índices de HLB comprendidos en el intervalo de aproximadamente 14,0 a 17,5. Algunos agentes tensoactivos cuyo índice de HLB está por debajo de este intervalo han presentado este mismo efecto. En realidad, se da el caso de que el alcohol de estearilo polioxietilado que contiene dos unidades de óxido de etileno por molécula tiene un índice de HLB de sólo 4,9, y sin embargo de su empleo se obtiene un refuerzo de potencia.

10           La concentración de agentes tensoactivo eficaz para aumentar el rendimiento de antibiótico en la presente fermentación es sorprendentemente elevada. En otras fermentaciones se han obtenido efectos observables con concentraciones de agente tensoactivo de sólo 0,001%, y las concen-

15           traciones superiores a alrededor de 1 a 2% han presentado a menudo un efecto tóxico, y dado lugar a un menor rendimiento. En cambio, en el presente medio de fermentación ha resultado ser beneficiosa una concentración de aproximada-

20           mente 0,2 a 4% en peso/volumen de agente tensoactivo. Por bajo del 0,2% no es posible observar efecto alguno, y aun cuando las concentraciones superiores al 4% no parecen ser perjudiciales, no presentan ventaja alguna sobre las con-

25           centraciones comprendidas dentro del intervalo que acaba de enunciarse. El intervalo preferido es de alrededor del 2% al 4% aproximadamente. Así, es necesario que el agente tensoactivo a utilizar en la presente invención sea solu-

30           ble en el medio de fermentación dentro de dicho intervalo de variación de la concentración. Este requisito impone un límite superior al número de unidades de óxido de etileno por molécula de agente tensoactivo, ya que un mayor peso



molecular sirva para reducir la solubilidad del agente tensoactivo.

Entre los agentes tensoactivos solubles, no iónicos, ni inhibidores del desarrollo que han resultado ser eficaces se encuentran los nonilfenoles polioxietilados que contienen por lo menos unas 13 unidades de óxido de etileno por molécula (por ejemplo, el Tergitol NP-33, NP-35 y NP-40 de Union Carbide, y el Hodag E-20 y E-30 de la Hodag Chemical Company), los alcoholes de laurilo polioxietilados que contienen por lo menos unas 12 unidades de óxido de etileno (por ejemplo, el Brij 35 de la Atlas Chemical Company y el Lipal 12LA de la Drew Chemical Company), los alcoholes de tridecilo polioxietilados que contienen por lo menos unas 15 unidades de óxido de etileno (por ejemplo, el Hodag TD-15), los alcoholes de estearilo polioxietilados que contienen por lo menos unas 2 unidades de óxido de etileno (por ejemplo, el Hodag S-2 y S-10), y los alcoholes de oleilo polioxietilados que contienen por lo menos unas 12 unidades de óxido de etileno (por ejemplo, el Emulphor ON-870 de la General Aniline & Film). El límite superior de dichos intervalos de variación del número de unidades de óxido de etileno por molécula viene impuesto por el requisito de que los agentes tensoactivos sean solubles dentro del margen o intervalo de concentración anteriormente especificado. Se prefieren, como agentes tensoactivos, los nonilfenoles polioxietilados que contengan aproximadamente de 13 a 35 unidades de óxido de etileno y los alcoholes de laurilo polioxietilados que contengan de 12 a 23 unidades de óxido de etileno; más preferible es el uso de nonilfenol polioxietilado que contiene 15 unidades



de óxido de etileno.

5 Como acaba de hacerse observar, se dispone en el mercado de numerosos agentes tensoactivos. Hay otros que pueden obtenerse fácilmente por métodos conocidos en general de las personas versadas en la materia, y en los cuales un hidrófugo seleccionado se condensa con óxido de etileno en las proporciones molares convenientes. Véase por ejemplo, Schwartz, Perry y Berch, "Surface Active Agents and Detergents" ("Agentes tensoactivos y detergentes"), vol. II, pp. 125-129, Interscience, 1958, así como las referencias allí citadas.

10 Los agentes tensoactivos pueden introducirse en el medio directamente, o bien en solución acuosa. Asimismo, es posible añadir inicialmente la cantidad total de agente tensoactivo, o bien añadir primero una fracción y luego el resto, durante el transcurso del proceso de fermentación; con este último método de adición se han observado resultados algo mejores.

20 Otra ventaja que inesperadamente ha llegado a obtenerse mediante la adición de los agentes tensoactivos aquí especificados, al medio de fermentación, reside en que no es necesario en este caso cosechar o recoger el antibiótico en un tiempo crítico. Antes del uso de los agentes tensoactivos se había observado que la potencia del caldo de fermentación no permanecía constante al alcanzar su máximo valor, sino, por el contrario, empezaba a declinar al llegar a la cresta. En cambio, con la adición de agente tensoactivo al medio, el caldo de fermentación conserva su potencia máxima, o casi máxima, durante un tiempo apreciablemente mayor.

30 Como más arriba se ha hecho notar, los únicos agentes



tensoactivos eficaces en la presente invención son los no  
inhibidores del desarrollo. Un método conveniente para  
determinar si un agente tensoactivo no iónico dado inhibe  
o no el desarrollo consiste en añadir el agente tensoac-  
5 tivo al medio de fermentación en el proceso de tratamiento  
que a continuación se describe. Aproximadamente a las 24  
horas de haber sido añadido el "inoculum" al medio de fer-  
mentación, se toma una muestra del caldo, se centrifuga  
(a 2.000 rpm durante 5 minutos) y se anota el volumen de  
10 desarrollo de las células. Si dicho volumen de desarrollo  
de células queda sobrepasado en no más del 10% por el volu-  
men de desarrollo de células en una muestra de control tra-  
tada de igual modo pero sin la adición de agente tensoac-  
tivo alguno, este último puede considerarse como no in-  
15 hibidor del desarrollo respecto al presente cultivo.

Como ya se ha dicho, el uso de los agentes tensoac-  
tivos especificados en lo que antecede aumentará el rendi-  
miento de antibiótico obtenido del cultivo de cualquier  
microorganismo productor de carbomicina A. Un procedimiento  
20 preferido para la fabricación de la carbomicina A (patente  
de EE.UU. 2.796.379 concedida a F.W. Tanner, Jr. y col. el  
18 de junio de 1957) trae consigo el cultivo del *Streptomyces*  
*Malstedii* ATCC-13449, de preferencia en un medio nutriente  
acuoso a una temperatura aproximada de 24<sup>o</sup>-30<sup>o</sup>C y en condi-  
25 ciones de sumersión, con agitación y aireación. Los medios  
nutrientes útiles para este procedimiento incluyen un car-  
bohidrato (por ejemplo, azúcares, almidón, glicerol y fé-  
cula de maiz) y una fuente de nitrógeno orgánico tal como  
la caseína, harina de soja, harina de cacahuete, gluten de  
30 trigo, harina de semilla de algodón, lactalbúmina, triptona



y producto de digestión enzimática de la caseína. Se prefiere, como fuente de nitrógeno, el uso de este último, es decir, del producto de digestión enzimática de la caseína. También puede utilizarse con resultados convenientes una fuente de sustancias de desarrollo, tales como las materias solubles de los residuos de la destilación del alcohol, el extracto de levadura, las melazas o residuos de fermentación, así como sales minerales tales como el cloruro sódico, fosfato potásico, nitrato sódico y sulfato magnésico, y minerales de indicios como el cobre, el zinc y el hierro. Si durante la fermentación se tropieza con una excesiva formación de espuma, pueden añadirse al medio de fermentación agentes antiespumantes, tales como los aceites vegetales. El pH de la fermentación tiende a permanecer más bien constante pero, si se tropieza con variaciones, puede también añadirse al medio un agente de tampón tal como el carbonato cálcico.

El inoculum para la preparación de la carbomicina A por desarrollo de una cepa de S. halstedii puede obtenerse empleando el desarrollo en cultivos inclinados ("slants") de medios tales como la lactosa bovina o el agar de Emerson. El desarrollo puede usarse para inocular sea en frascos agitados, sea en depósitos de inoculación para desarrollo sumergido, o bien, como alternativa, puede efectuarse la inoculación en los depósitos tomando el inoculum de los frascos de agitación. El desarrollo del microorganismo suele llegar a su máximo al cabo de 2 o 3 días, aproximadamente. No obstante, las variaciones en el equipo utilizado, el régimen de aireación, la velocidad de agitación, etc., pueden afectar a la velocidad con que se llegue a



alcanzar el máximo de actividad. En general, el período conveniente para producir el antibiótico oscila entre unas 24 horas y 4 días. La aireación del medio en depósitos para desarrollo sumergido se mantiene a razón de alrededor de medio a dos volúmenes de aire libre por volumen de caldo y por minuto. La agitación puede mantenerse por medio de agitadores de tipos adecuados, conocidos en general de las personas familiarizadas con la industria de la fermentación. Naturalmente, es preciso mantener condiciones asépticas durante toda la preparación y el traslado del inoculum, y el período de desarrollo del microorganismo.

La recuperación del antibiótico se efectúa por medios ya conocidos en general en la técnica del ramo, tales como los de extracción, precipitación y el empleo de fuertes resinas de cambio catiónico.

La presente invención abarca no sólo el uso del organismo mencionado en lo que antecede, sino también el de los mutantes del mismo producidos al someter el organismo a acciones tales como las de los rayos X, rayos ultravioleta, "mostaza" de nitrógeno y similares.

Los siguientes ejemplos se dan con el objeto de ilustrar de modo más completo la presente invención. Se sobrentiende que estos ejemplos no tienen otro fin que el puramente ilustrativo, y no han de considerarse como única manera de poder realizar la invención.

#### EJEMPLO I

Se prepara un inoculum, utilizando un medio de desarrollo que posea la composición siguiente:

30



12

	<u>Gramos</u>
Cerelose <sup>(R)</sup> (dextrosa).....	15
Harina de soja.....	30
Sulfato magnésico heptahidrato .....	1
5 Carbonato cálcico .....	10

Se diluye esta mezcla con agua hasta alcanzar el volumen de un litro, se ajusta el pH a 6,8 con hidróxido potásico, y luego se esteriliza y se enfría. Las esporas de un cultivo inclinado de 7 días, en agar de Emerson, del S. halstedii ATCC-13449 son trasladadas en condiciones asépticas a 20 ml de agua, obteniéndose por agitación una suspensión homogénea de las esporas. De esta suspensión se trasladan 0,5 ml a 750 ml del medio arriba indicado, dejando desarrollar el organismo en un frasco agitado durante 30 horas a 30°C.

Se prepara un medio nutriente con la siguiente composición:

	<u>Gramos</u>
Cerelose <sup>(R)</sup> (dextrosa)	25,0
20 Melaza de remolacha	15,0
Almidón	5,0
Sulfato de manganeso monohidrato	1,5
Sulfato de magnesio heptahidrato	1,25
Producto de digestión de caseína (5%)	400 ml

25 Esta mezcla se diluye con agua hasta llegar a 1 litro, ajustándose el pH a 7,0 con hidróxido potásico. Se añaden 0,5 ml de agente antiespumante DCN (de la Dow Chemical Company) y 10 g de alcohol de laurilo polioxietilado que con



tenga 23 unidades de óxido de etileno (Brij 35 de la  
las Chemical Company), esterilizándose luego la mezcla.

5 Del inoculum se trasladan 100 ml, en condiciones  
asépticas, al medio nutriente arriba indicado. Al cabo de  
dos días de agitación y aireación, se halla que la poten-  
cia del caldo es de 725 mcg/ml.

10 Se añade formaldehído para bioestabilizar el caldo,  
en proporción que dé una solución de 0,5% v/v, se ajusta  
el pH a 7,0 y se somete la solución a extracción luego dos  
veces, con 1/3 de volumen de metil isobutil cetona. El an-  
15 tibiótico se extrae de la cetona pasándolo a 1/5 de volu-  
men de agua a un pH aproximado de 2,0, utilizando ácido sul-  
fúrico para ajustar el pH, y se concentra luego la fase  
acuosa a 1/5 de volumen, después de ajustar el pH aproxi-  
15 madamente a 4,6. El antibiótico se precipita ajustando el  
pH aproximadamente a 8,3 con hidróxido sódico, y separán-  
dolo por filtración.

#### EJEMPLO II

20 Al medio del ejemplo I se le añade un nonilfenol  
polioxietilado que contiene 15 unidades de óxido de etile-  
no (1), en lugar de dicho alcohol de laurilo polioxietila-  
do. Las cantidades de agente tensoactivo utilizadas son  
las que figuran a continuación, con las correspondientes  
potencias de caldo obtenidas con las mismas.



<u>Agente tensoactivo</u> <sup>(1)</sup> , g/l	<u>Potencia</u> , mcg/ml
0	375
2	475
5	520
10	615
20	730
30	825
40	800

(1) Tergitol NP-35 de la Union Carbide

10 EJEMPLO III

Se prepara un medio nutriente de la composición que sigue:

	<u>Gramos</u>
15 Cerelose <sup>(R)</sup> (dextrosa)	25,0
Melaza de remolacha	15,0
Almidón	5,0
Sulfato de manganeso monohidrato	1,5
Sulfato de magnesio heptahidrato	1,25
Producto de digestión de caseína (5%)	400 ml

20 Se diluye la mezcla con agua a un litro, y se ajusta el pH a 7,0 con hidróxido potásico. Se agregan 20 g del agente tensoactivo Tergitol NP-35, y el medio se esteriliza luego y siembra con un inoculum de S. halstedii ATCC-13449 en condiciones asépticas. Al cabo de 12 horas de agitación y

25 aireación a 30°C se añaden otros 20 g del agente tensoactivo. La potencia del caldo es de 950 mcg/ml al cabo de dos días. La potencia de un caldo de fermentación al cual se le hayan añadido inicialmente la totalidad de los 40 g de agente tensoactivo es de 800 mcg/ml.



EJEMPLO IV

5 Se prepara un medio nutriente como el del Ejemplo I, pero sustituyendo en él dicho alcohol de laurilo polioxietilado por los agentes tensoactivos indicados más abajo. Tras la esterilización, se siembra el medio con un inoculum de S. halstedii ATCC-13449 en condiciones asépticas y se somete a agitación y aireación a 30°C durante 2 días. Se determinan luego las potencias de caldo obtenidas, que resultan ser en cada caso esencialmente mayores que la de una fermentación de control.

10

- Nonilfenol polioxietilado (13 u. de óxido de etileno)
- Noninfenol polioxietilado (20 u. de óxido de etileno)
- Nonilfenol polioxietilado (35 u. de óxido de etileno)
- Alcohol de tridecilo polioxietilado (15 u. de óxido de etileno)
- Alcohol de laurilo polioxietilado (12 u. de óxido de etileno)
- 15 Alcohol de estearilo polioxietilado (2 u. de óxido de etileno)
- Alcohol de estearilo polioxietilado (10 u. de óxido de etileno)
- Alcohol de oleilo polioxietilado (12 u. de óxido de etileno)
- Alcohol de oleilo polioxietilado (23 u. de óxido de etileno)

20 Esta solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América el 16 de Enero de 1967, bajo el número 609.332, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.



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:

5

1º.- Un procedimiento de fabricar carbomícina A por fermentación, caracterizado por el perfeccionamiento que consiste en la adición, al medio de fermentación, de un agente tensoactivo que es un éter de (poli)oxietilenglicol soluble, no iónico ni inhibidor del desarrollo, en proporción que dé una concentración aproximada de solución del 0,2 al 4% de dicho agente tensoactivo en dicho medio.

10

2º.- El procedimiento de la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que dicho agente tensoactivo está seleccionado de entre el grupo que consta de nonilfenoles polioxietilados solubles que contienen por lo menos unas 13 unidades de óxido de etileno, los alcoholes de laurilo polioxietilados solubles que contienen por lo menos unas 12 unidades de óxido de etileno, los alcoholes de tridecilo polioxietilados solubles que contienen por lo menos unas 15 unidades de óxido de etileno, los alcoholes de estearilo polioxietilados solubles que contienen por lo menos unas 2 unidades de óxido de etileno, y los alcoholes de oleilo polioxietilados solubles que contienen por lo menos unas 12 unidades de óxido de etileno.

15

20

25

3º.- El procedimiento de la reivindicación 1 o la 2, caracterizado por el hecho de que dicho agente tensoactivo



12

es nonilfenol polioxietilado que contiene aproximadamente de 13 a 35 unidades de óxido de etileno.

5 4º.- El procedimiento de la reivindicación 1 o la 2, caracterizado por el hecho de que dicho agente tensoactivo es nonilfenol polioxietilado que contiene 15 unidades de óxido de etileno.

10 5º.- El procedimiento de la reivindicación 1 o la 2, caracterizado por el hecho de que dicho agente tensoactivo es alcohol de laurilo polioxietilado que contiene aproximadamente de 12 a 23 unidades de óxido de etileno.

6º.- El procedimiento de la reivindicación 1 o la 2, en el que la concentración de dicho agente tensoactivo es aproximadamente de 2% a 4%.

15 7º.- El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para la producción de carbomicina A por cultivo de Streptomyces halstedii ATCC-13449 en un medio nutriente acuoso, en condiciones aeróbicas de sumersión, con el perfeccionamiento caracterizado por comprender la adición, a dicho medio, de nonilfenol polioxietilado que contiene 15 unidades de óxido de etileno, en proporción que dé una concentración aproximada de 2% a 4% de dicho nonilfenol polioxietilado en dicho medio.

20

8º.- Un procedimiento de fabricar carbomicina A por fermentación.

25 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.



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

Madrid, 12 ENF 1968

P.A.

Alberto de Foz

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Alberto de Foz', written over the typed name.