

P - 37.134

348645

U. S. 604.694 &  
AS GC 113 b-S

**Memoria descriptiva**



21 FEB 1968

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de E. R. SQUIBB & SONS, INC.

entidad / ~~de nacionalidad~~ norteamericana

con domicilio en 745 Fifth Avenue, Nueva York, N. Y. Estados Unidos de América.

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UNA SUSTANCIA EFICAZ EN LA INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS GRAM-POSITIVAS" (Clase Internacional C12d).

13.2.68



21

Este invento se refiere a los nuevos antibióti-  
cos umbrinomicina y diumicina, y a sus respectivos compo-  
nentes, umbrinomicina A y umbrinomicina B y diumicina A  
y diumicina B. Los antibióticos son producidos simultánea-  
5 mente cultivando el microorganismo Streptomyces umbrinus.  
La umbrinomicina y la diumicina son separadas por trata-  
miento selectivo con disolvente, y los componentes de cada  
una son aislados por cromatografía o por otros métodos co-  
nocidos en el ramo. La umbrinomicina y la diumicina poseen  
10 ambas actividad antibacteriana contra bacterias Gram-posi-  
tivas, entre otras cosas.

Este invento se refiere a nuevas sustancias an-  
tibióticas, a métodos para su producción por fermentación,  
y a métodos para su concentración, purificación y aisla-  
15 miento.

Las nuevas sustancias antibióticas de este in-  
vento comprenden dos grupos de sustancias. La mezcla de  
antibióticos de un grupo que está designada en lo que si-  
gue, de forma genérica, como umbrinomicina, y contiene  
al menos dos antibióticos específicos que serán llamados  
20 umbrinomicina A y umbrinomicina B. La mezcla de antibióti-  
cos del otro grupo es designada en lo que sigue en forma  
genérica como diumicina, y contiene al menos dos antibió-  
ticos específicos que serán denominados diumicina A y diu-  
micina B.

La umbrinomicina y la diumicina son producidas  
simultáneamente por el cultivo bajo condiciones controla-  
das del microorganismo Streptomyces umbrinus. La cepa  
de Streptomyces umbrinus utilizada fué aislada a partir  
de una muestra de tierra obtenida en Carolina del Norte.  
30 Esta cepa ha sido depositada en el American Type Culture



Collection en Rockville, Maryland, en donde se le dió el número de entrada 15.972, y es citada en lo que sigue como Streptomyces umbrinus ATCC 15.972.

5

EL MICROORGANISMO

10

El microorganismo Streptomyces umbrinus empleado en la práctica de este invento es aislado y caracterizado agitando primeramente una porción de la muestra de tierra en agua destilada estéril y cultivándola sobre placa alúmina en un medio de agar que contiene los siguientes materiales.

15

	<u>Gramos</u>
Agar	15
Sacarosa	10
Galactosa	10
Acido cítrico	1,2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,4
KCl	0,08
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,418
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,036
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,023
ZnCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,021
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,004
Agua destilada hasta	1000 ml.

20

25

30

El medio es ajustado a pH 7,0 y es esterilizado en un autoclave a 121°C durante 30 minutos. Después de una incubación de 7 a 10 días a 25°C, se aislan colonias de Streptomyces umbrinus desde la tierra cultivada



sobre placas. Estas colonias aisladas son hechas crecer entonces en un medio que contiene:

	<u>Gramos</u>
5 Extracto de carne de buey	1,5
Extracto de levadura	3,0
Peptona	6,0
Dextrosa	1,0
Agua destilada hasta	1000 ml.

10 El medio es esterilizado o tratado en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

El organismo es capaz de utilizar los siguientes manantiales de carbono en un medio básico, que contiene  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en calidad de manantial de nitrógeno,:

15 glucosa, manitol, inositol, xilona, arabinosa, fructosa, ramnosa, rafinosa, galactosa, trehalosa, melibiosa, sacarosa y lactosa. El crecimiento no es sustentado por el sorbitol.

20 El organismo crece bien y forma esporulas sobre agar de pasta de tomate y harina de avena, sobre agar de extracto de malta y de levadura y sobre agar de almidón y sales sintéticas. El crecimiento vegetativo es rápido, produciendo un micelio vegetativo de color pardo chocolate característico, que experimenta fragmentación en aproximadamente 7 días.

25

Se produce el micelio aéreo en aproximadamente 14 días y se le puede asignar a la serie de Pridham de color de esporas de color oliva-ante. El color se iguala con las muestras 3ba a 3cb en el Color Harmony Manual. Los esporóforos son rectos (sección de morfología RF) sin

30



tendencia a la tortuosidad o a formar espirales. Las esporas son lisas y de cilíndricos a ovoides. Se produce un pigmento melanoide sobre medios orgánicos.

### LOS ANTIBIOTICOS

El Streptomyces umbrinus produce antibióticos que poseen amplia actividad contra bacterias gram-positivas, por ejemplo Staphylococcus aureus, Bacillus polymyxa y Mycobacterium bovis, levaduras y hongos.

Para formar los antibióticos, el Streptomyces umbrinus es hecho crecer a 25°C bajo condiciones aerobias sumergidas en un medio nutriente acuoso que contiene un carbohidrato asimilable y un manantial de nitrógeno. La fermentación se lleva a cabo durante aproximadamente 168 horas, período de tiempo al final del cual se han formado los antibióticos.

Después que se completa la fermentación, el caldo de cultivo es ajustado a un pH de aproximadamente 3 y es filtrado después de añadir un auxiliar de filtración. Los antibióticos son extraídos desde el micelio (es decir, la torta de filtración) con metanol. El extracto metanólico es ajustado a un pH de aproximadamente 6 a 8 y es concentrado en vacío, dejando una suspensión acuosa.

Para recuperar solo los antibióticos de umbrinomicina, la suspensión acuosa es ajustada a un pH 7,0 y después es extraída con cloroformo. Entonces, la fase orgánica es secada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y es concentrada hasta pequeño volumen. El concentrado es diluido con 8



21 FEB 1968

a 10 volúmenes de acetona. La fase soluble en acetona es concentrada hasta pequeño volumen y es diluida con 10 volúmenes de n-hexano. El precipitado resultante es recogido por centrifugación, es lavado con hexano y es secado. La purificación se efectúa por cromatografía sobre gel de sílice, seguida por nueva cromatografía sobre alumina lavada con ácido. El material purificado así obtenido es una mezcla de los antibióticos isoméricos, umbrinomicina A y umbrinomicina B, que después son desdoblados por cromatografía con elución de gradiente sobre alúmina lavada con ácido.

Para recuperar los antibióticos de diumicina, la suspensión acuosa, preferiblemente a un pH 8, es extraída con butanol. La umbrinomicina es extraída en el butanol, dejando la diumicina en la capa acuosa. Las capas son separadas, y la capa de butanol, que contiene la umbrinomicina, es tratada separadamente. La capa acuosa que contiene la diumicina es ajustada a pH 3 con ácido clorhídrico concentrado, y es extraída con butanol saturado con agua. La capa de butanol es extraída por retorno con agua a pH 7, y los extractos acuosos son concentrados en vacío hasta sequedad. El residuo es disuelto en metanol y el material insoluble en metanol es eliminado por filtración. La solución metanólica es diluida con acetona para producir un precipitado del antibiótico crudo de diumicina, que es secado y después es purificado adicionalmente por una combinación de cromatografía en columna Sephadex, cromatografía en gel de sílice y distribución o reparto en contracorriente; o, alternativamente, por una combinación de cromatografía Sephadex, cromato-



grafía en gel de sílice y cromatografía de reparto Avie  
cel. La cromatografía en papel de reparto o distribución  
en contracorriente puede utilizarse para desdoblar el  
complejo de diumicina en diumicina A y B.

5

### UMBRINOMICINA

La umbrinomicina es una mezcla de al menos dos  
antibióticos, umbrinomicina A y umbrinomicina B. Este, y  
10 todos sus componentes, son antibióticos que poseen amplia  
actividad contra bacterias gram-positivas, levaduras y  
hongos. Así, en un ensayo de dilución en tubo doble, efec  
tuando con un material de umbrinomicina con la pureza  
del obtenido en el Ejemplo 5, siguiente, se determinó que  
15 la concentración inhibidora mínima (C.I.M.) en microgra  
mos por ml, era la siguiente:

	<u>MICROORGANISMO</u>	<u>C.I.M. (µg/ml)</u>
	<u>Staphylococcus aureus 209P</u>	0,08
20	<u>Candida albicans</u>	12,5
	<u>Trichophyton mentagrophytes</u>	1,6
	<u>Fusarium bulbigenum</u>	18,7
	<u>Mycobacterium bovis B.C.G.</u>	0,3
	<u>Salmonella schottmuelleri</u>	>50
25	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	750
	<u>Proteus vulgaris</u>	750

Los componentes individuales, umbrinomicina A  
y umbrinomicina B, poseen el mismo espectro antimicro,ia-  
no cualitativo.

30

La umbrinomicina, y cada uno de sus componentes



21

antibióticos, puede ser utilizada en laboratorios de investigación y de hospitales para aislar las bacterias negativas a partir de tierras, o a partir de esponjas de hilas o de exudados corporales en que están presentes poblaciones mixtas de organismos gram-positivos y gram-negativos. Además, la umbrinomicina, y cada uno de sus componentes antibióticos, puede ser utilizada para desinfectar equipos de laboratorio contaminados con Staphylococcus aureus, especialmente cuando el equipo puede ser objeto de daño por los medios usuales de desinfección.

La umbrinomicina, la umbrinomicina A y la umbrinomicina B son alcoholes que forman ésteres con ácidos. Estos ésteres pueden ser formados haciendo reaccionar la umbrinomicina con un halogenuro de acilo o un anhídrido de ácido en la presencia de una base, tal como piridina. Como la umbrinomicina contiene tres grupos hidroxilo acilables, es capaz de formar monoésteres, diésteres y triésteres, dependiendo de la proporción de agente acilante a umbrinomicina presente en el medio de reacción. Si se utiliza un exceso de agente acilante, se forma un triéster.

Aunque se puede utilizar cualquier agente acilante, los agentes acilantes preferidos son los anhídridos de ácido y los cloruros de acilo de ácidos carboxílicos hidrocarbonados de menos de 12 átomos de carbono, tales como los ácidos alcanóicos inferiores (por ejemplo ácido acético y ácido propiónico), los ácidos alquenóicos inferiores, los ácidos arilcarboxílicos monocíclicos (por ejemplo ácido benzoico), los ácidos aril-alcanóicos inferiores monocíclicos (por ejemplo ácido fenacético), los ácidos cicloalcanocarboxílicos, y los ácidos cicloalque-



nocarboxílicos.

La umbrinomicina A cristalina tiene las siguientes propiedades físicas y químicas: rojo; p. de f.: 126 a 129°C.

5 Análisis elemental (aproximado):

C = 63,78 %

H = 6,19%

O = 30,03% (por diferencia)

10

Fórmula empírica:  $C_{22}H_{24}O_8$

Solubilidad: Soluble en éter, metanol y benceno; insoluble en hexano.

15

Espectro ultravioleta: Los máximos de absorción de ultravioleta de la umbrinomicina A cristalina en etanol son:

$\lambda$  max. (m $\mu$ )

$\epsilon$

20

242,5

13,520

304

15,800

476

5,600

25

Espectro de infrarrojos: El espectro de infrarrojos de la umbrinomicina A suspendida en la mezcla de Nujol está reproducido en la Fig. 1 de los dibujos.

La umbrinomicina B cristalina tiene las siguientes propiedades físicas y químicas:

Color: castaño; p. de f. : 192 a 193,5°C.

Análisis elemental (aproximado)

21



C = 63,53 %

H = 5,91 %

O = 30,56 % (por diferencia)

5

Formula empírica:  $C_{22}H_{24}O_8$ . Solubilidad: La misma que umbrinomicina A.

Espectro ultravioleta: Los máximos de absorción de ultravioleta de la umbrinomicina B cristalina en etanol son:

10

$\lambda$ max. (m $\mu$ )	$\epsilon$
243	16,500
304	19,000
476	5,500

15

Espectro de infrarrojos: El espectro de infrarrojos de la umbrinomicina B suspendida en la mezcla Nu-jol está reproducido en la Fig. 2 de los dibujos:

20

DIUMICINA

25

La diumicina es una mezcla de al menos dos antibióticos, diumicina A y diumicina B. Esta, y todos sus componentes, son antibióticos que poseen actividad contra las bacterias gram-positivas y las bacterias resistentes a los ácidos. Así, en un ensayo de dilución en tubo doble efectuado con material de diumicina con la pureza del obtenido en el Ejemplo 14 siguiente, se determinó que las concentraciones inhibitoras mínimas (C.I.M.) en microgramos por ml, eran las siguientes:

30



	Microorganismo	C.I.M. (µg./ml.)
	<u>Staphylococcus aureus</u> 209 P	0,06
	<u>Streptococcus Pyogenes</u> C 203	< 0,002
	<u>Bacillus subtilis</u> SC 3777	0,14
5	<u>Klebsiella pneumoniae</u> SC 1565	> 25,0
	<u>Sarcina lutea</u> SC 2495	> 25,0
	<u>Escherichia coli</u> SC 2927	> 25,0
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> SC 3840	> 25,0
	<u>Candida albicans</u> SC 1539	> 25,0
10	<u>Salmonella schottmuelleri</u> SC 3850	> 25,0
	<u>Mycobacterium tuberculosis</u> BCG	3,0

15 Los componentes individuales, diumicina A y diumicina B, poseen el mismo espectro antibacteriano cualitativo.

20 La diumicina, la diumicina A y la diumicina B son ácidos que forman sales con bases. Estas sales pueden ser formadas haciendo reaccionar la diumicina con una base, tal como una base inorgánica, por ejemplo hidróxido de amonio, un hidróxido de metal alcalino, tal como hidróxido de sodio e hidróxido de potasio, y un hidróxido de metal alcalino-térreo, tal como hidróxido de calcio, hidróxido de bario e hidróxido de magnesio, y una base orgánica, tal como aminas primarias, secundarias y terciarias, por ejemplo una (alcoholo inferior)-amina, tal como metilamina, una di (alcoholo inferior)-amina, tal como dietilamina, una tri (alcoholo inferior), amina, tal como trietilamina, una (hidroxi-alcoholo inferior)-amina, tal como etanolamina, etc.

30 Las diumicinas son antibióticos que contienen



fósforo, que no producen 6-desoxiglucosamina (quinovosamina) por hidrólisis con ácido.

La diumicina A tiene las siguientes propiedades físicas y químicas:

5                   Color: incoloro (blanco). P. de f. (del ácido): aproximadamente 180°C don descomposición:

                  Análisis elemental (ácido libre-hidrato) (aproximado):

10                   C = 46,5%  
                  H = 7,2%  
                  N = 4,5%  
                  P = 2,0%  
                  O = 39,8% (por diferencia)

15                   Rotación óptica específica:  $\frac{d}{D} = 8,7^{\circ}$  (sal de potasio en agua).

                  Peso molecular: (en una centrífuga ultrasónica de análisis).

20                   1800  $\pm$  10% en 10% de (cloruro de sodio 0,2 molar, tampón de fosfato 0,02 molar y pH 6,5) y 90% de etanol.

                  Solubilidad: soluble en agua, alcanoles inferiores, piridina y ácido acético. Apenas soluble, o insoluble, en acetona, cloroformo y benceno.

25                   Espectro de ultravioleta: La diumicina A, en forma de su sal de potasio en agua, tiene un máximo de absorción de ultravioleta a 257 m $\mu$  ( $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ , 118).

30                   Espectro de infrarrojos. El espectro de infrarrojos de la diumicina A en forma de ácido libre en gránulos de KBr está reproducido en la Fig. 3 de los dibujos



y en forma de la sal de potasio en gránulos de KBr está reproducido en la Fig. 4 de los dibujos.

Equivalente neutro por valoración potenciométrica: 540.

5 Coeficiente de reparto en n-propanol, n-butanol y amoniaco 0,5N (2:3:4 en volumen) = 0,19.

La diumicina B tiene las siguientes propiedades físicas y químicas:

10 Color: incoloro (blanco). P. de f.: aproximadamente 170°C con descomposición.

Análisis elemental (ácido libre-hidrato) (aproximado)

C = 45,9%

H = 6,6%

15 N = 4,6%

P = 1,8%

O = 41,1% ( por diferencia)

H<sub>2</sub>O de hidratación = 7,6 %

20 Peso molecular: (en una centrífuga ultrasónica de análisis)

1850 ± 10% en el mismo disolvente que se describe para la diumicina A.

Solubilidad: La misma que la diumicina A.

25 Espectro ultravioleta: la diumicina B no tiene máximo de absorción de ultravioleta entre 200 y 300 mμ .

30 Espectro de infrarrojos: el espectro de infrarrojos de la diumicina B en forma de ácido libre en gránulos de KBr está reproducido en la Fig. 5 de los dibujos, y en forma de la sal de potasio está reproducido en la Fig. 6 de los dibujos.



Coeficiente de reparto en n-propanol, n-butanol y amoníaco 0,5N (2:3:4 en volumen) = 0,39.

La torta de filtración de la fermentación de Streptomyces umbrinus, así como cada uno de los antibióticos recuperados a partir de la misma (es decir umbrinomicina, umbrinomicina A, umbrinomicina B, diumicina, diumicina A y diumicina B), poseen propiedades que favorecen el crecimiento cuando son alimentados a animales, tales como aves de corral (por ejemplo pollos y pavos), cerdos y otros animales de granja. Para este fin, son mezclados con el pienso del animal en una concentración dentro del margen de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 g por tonelada de alimento final.

Los siguientes ejemplos ilustran el invento (estando todas las temperaturas en grados centígrados):

Ejemplo 1.- Cultivos inclinados de agar de harina de avena y pasta de tomate son sembrados con Streptomyces umbrinus ATCC 15972. Son incubados durante 7 a 10 días y después son utilizados para inocular 125 ml de medio acuoso de harina de soja, contenidos en matraces Erlenmeyer de 500 ml. La composición del medio de germinación es:

	Harina de soja (nutriente de Staley)	15 g
	Puré de patatas deshidratado	15 g
25	Glucosa	50 g
	CoCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O 10 ml de una solución al 0,05%	
	CaCO <sub>3</sub>	10 g
	Agar	2,5 g
30	Agua destilada	1 litro



El medio es esterilizado durante 20 minutos a 121°C y con una presión de vapor de agua de 6,75 Kg ó de 1,05 Kg/cm<sup>2</sup>. Los matraces de germinación son incubados a 25°C durante 72 a 96 horas en un agitador rotatorio.

5 Se efectúa una transferencia de 5% desde el matraz de germinación a matraces Erlenmeyer de 500 ml que contienen 135 ml del mismo medio de germinación que se utiliza anteriormente, excepto que se omite el agar. Los matraces de fermentación son incubados y agitados de la misma manera que los matraces de germinación. Se toman 10 muestras en los días 3,5 y 7. Estas son examinadas ajustando el pH a 3 con ácido clorhídrico 0,2N, separando por centrifugación el micelio y extrayendo el micelio con un volumen de metanol igual al del líquido flotante. El extracto metanólico es examinado por cromatografía en papel. 15 Cantidades apropiadas del extracto son aplicadas en forma de manchas sobre hojas de papel Whatman 4, y los cromatogramas son revelados con un sistema disolvente de la siguiente composición: n-butanol, agua y ácido acético 20 de 4:5:1 (n volumen/volumen/volumen). La fase superior de este sistema disolvente es utilizada en calidad de disolvente. En este sistema, el material antibiótico crudo de umbrinomicina tiene un valor Rf de aproximadamente 0,9 mientras que las diumicina tiene un valor Rf de aproximadamente 0,3. El material antibiótico es detectado por 25 bioautografía frente a Staphylococcus aureus 209 P.

Ejemplo 2.- Una carga de 4,5 litros de Streptomyces umbrinus ATCC 15972 es fermentada de la siguiente manera:

30 (A) Preparación del inóculo



21

Manantial del inóculo: Cultivo de Streptomyces umbrinus ATCC 15972 conservado por liofilización en leche.

Medio

5	Harina de soja	15 g
	Puré de patatas deshidratado	15 g
	Glucosa	50 g
	CoCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	10 ml de una solución al
	2	0,05%
10	CaCO <sub>3</sub>	10 g
	Agar	2,5 g
	Agua destilada	1 litro

15 Dos matraces, que contienen 125 ml del medio por cada matraz de 500 ml, son incubados durante 96 horas a 25°C en el agitador rotatorio, 250 ml de los anteriores cultivos son añadidos a 4,5 litros del anterior medio, excepto que se omite el agar. en un jarrp p recipiente agitadp de 7 litros y es incubado durante 168 horas en un baño de agua a 25°C después de la adición de

20 aproximadamente 0,005% con relación a la carga de un desespumante. Durante la incubación, el caldo de cultivo es aireado a la velocidad de 2 litros de aire por minuto y es agitado a 500 r.p.m. El material resultante es

25 acidificado hasta pH 3,0 con ácido clorhídrico, y es filtrado para obtener la torta de micelio.

Ejemplo 3. Una carga de 30 litros de Streptomyces umbrinus es fermentada en un recipiente de acero inoxidable de 38 litros con los medios y bajo las condiciones de trabajo que se describen a continuación:

30 Etapas 1.- Inóculo: Cultivo de S. umbrinus ATCC



15.972 conservado por liofilización en leche y hecho crecer en un cultivo inclinado de agar de pasta de tomate y de harina de avena.

Medio

5	Harina de soja (de Staley 4S)	1,5%
	Puré de patatas deshidratado	1,5%
	Glucosa	5,0%
	CoCl 2H O 2 2	0,0005%
	CaCO 3	1,0%
10	Agar	0,25%

125 ml de este medio en un matraz de 500 ml, son incubados durante 96 horas en un agitador rotatorio a 25°C.

15 Etapa 2.- Manantial de inóculo: 125 ml procedentes de la primera etapa.

Medio: El mismo que en la etapa 1. 1000 ml de medio y de inóculo en un matraz de 4000 ml son incubados durante 48 horas a 25°C en el agitador rotatorio.

20 Etapa 3.- Manantial de inóculo: 100 ml procedente de la Etapa 2.

Medio

25	Harina de soja (de Staley 4S)	1,5%
	Almidón Hi-Starch Nº 2	1,5%
	Glucosa	5,5%
	CoCl 2H O 2 2	0,0005%
	CaCO 3	1,0%
	Ucon LB625	0,05%

30 30 litros del medio que contiene el inóculo son incubados durante 168 horas. Durante la incubación, el caldo de cul-



21

tivo es aireado a la velocidad de 30 cm por minuto de velocidad superficial de aire, y es agitado durante las primeras 12 horas, y con 120 cm por minuto de velocidad superficial de aire y es agitado después de esto.

5                    Ejemplo 4. La torta de micelio húmeda obtenida en el ejemplo 2 (que contiene aproximadamente 4% de auxiliar de filtración) es extraída dos veces con metanol, con 2 partes (en peso/volumen) de metanol. La torta es filtrada entre las extracciones. Los filtrados combinados son  
10                    ajustados a pH 6 a 8 y son concentrados en vacío para eliminar el metanol, dejando una suspensión acuosa.

                    La suspensión acuosa, obtenida por concentración del extracto metanólico, es ajustada a pH 7,0 y es extraída tres veces con cloroformo, utilizando 0,3 volúmenes de  
15                    cloroformo cada vez. El pH es determinado después de cada extracción y, si es necesario, es ajustado de nuevo a pH 7,0. Los extractos en cloroformo reunidos son secados con sulfato de sodio anhidro y son concentrados en vacío para formar un jarabe denso.

20                    Se añaden 8 a 10 volúmenes de acetona al jarabe denso y la mezcla es agitada durante una hora y es filtrada. El líquido flotante es concentrado entonces en vacío hasta pequeño volumen, y el concentrado es diluido con  
25                    10 volúmenes de n-hexano, produciendo un precipitado de umbrinomicina cruda.

                    La purificación adicional de la umbrinomicina cruda se efectúa por cromatografía en capa delgada del precipitado insoluble en hexano sobre gel de sílice H. El sistema disolvente está compuesto por 10% de CHCl<sub>3</sub> en acetato de etilo. La banda coloreada de salmón es eluida des-  
30



24

de el gel de sílice con acetato de etilo. El eluato es con-  
 centrado en vacío, es secado con Na SO<sub>2</sub>, y es cromatogra-  
 fiado de nuevo sobre gel de sílice H con el mismo sistema  
 disolvente. La banda coloreada de salmón es eluída y el  
 eluato es concentrado hasta sequedad, produciendo 118 mg de  
 material.

5

Ejemplo 5.- 118 mg. de material, obtenidos tal  
 como se describe en el Ejemplo 4, son cargados sobre 20 g  
 de alúmina lavada con ácido, contenidos en una columna de  
 vidrio. La columna es lavada con hexano para eliminar el  
 material inactivo, y el material es eluído con acetato de  
 etilo, metanol y ácido acético (94:5:1 en v/v/v). La ban-  
 da de color rojo oscuro es recogida y concentrada hasta se-  
 quedad, produciendo 70 mg de material antibiótico de umbrin-  
 omicina purificada.

10

15

Ejemplo 6.- El material (25 mg) preparado en el  
 Ejemplo 5, es cromatografiado de nuevo por cromatografía  
 en capa delgada sobre alúmina lavada con ácido de Merck,  
 utilizando acetato de etilo y cloroformo al 50% y el eluato  
 es concentrado para dar 21 mg de polvo castaño. La recrista-  
 lización a partir de benceno produce aproximadamente 14,4  
 mg de material de umbrinomicina purificado, de punto de fu-  
 sión 105 a 110°C.

20

$\lambda$  ETOH  
 max.

25

302 m $\mu$  ( $\epsilon$ , 20.200), 472 m $\mu$  ( $\epsilon$ , 5600).

Análisis: calculado para: C H O (416,4):  
 22 24 8

C, 63,45; H, 5,81

Encontrado

C, 63,22; H, 5,98

30

El material purificado obtenido de acuerdo con



21  
el Ejemplo 6 resulta ser una mezcla de los antibióticos umbrinomicina A y umbrinomicina B.

Ejemplo 7. Aislamiento de umbrinomicina A y umbrinomicina B.

5                   La mezcla antibiótica, preparada en el Ejemplo 6, es desdoblada en dos antibióticos isoméricos, umbrinomicina A y umbrinomicina B, por cromatografía en columna sobre alúmina lavada con ácido (actividad, IV) utilizando la técnica de elución de gradiente, con los disolventes siguientes: benceno, cloroformo y acetato de etilo.  
10 La umbrinomicina A es eluída primeramente desde la columna y es recrystalizada a partir de benceno, con punto de fusión 113 a 117°C. Después de purificación adicional por cromatografía en capa delgada sobre alúmina lavada con  
15 ácido, utilizando una mezcla 1: 1 de cloroformo y acetato de etilo en calidad de disolvente revelador, seguido por recrystalización a partir de benceno, se obtiene umbrinomicina A pura en forma de cristales de color rojo oscuro.

20                   La umbrinomicina B es eluída en segundo lugar desde la columna. La cristalización fraccionada a partir de benceno dá cristales de color castaño oscuro de umbrinomicina B pura.

Ejemplo 8. Acilación de umbrinomicina B. La umbrinomicina B (27 mg) es disuelta en 1 ml de piridina y  
25 0,5 ml de anhídrido acético, y la mezcla es dejada reposar durante la noche. La solución resultante es concentrada, y el residuo es lavado con bicarbonato de sodio al 10% y es extraído en cloroformo. El extracto en cloroformo es concentrado y el producto es purificado por cromatografía  
30 en capa delgada sobre alúmina neutra de actividad 4 utili-



zando cloroformo como disolvente revelador. La banda de color naranja apropiada es eluida con acetato de etilo y el producto es cristalizado a partir de metanol para producir cristales de color naranja de triacetil umbrinomicina B, de p. de f. 125 a 126°C.

5

$\lambda$  <sup>EtOH</sup>  
max. 253 m $\mu$  ( $\epsilon$ , 10,800), 302m $\mu$   
(22,400); 458 m $\mu$  ( $\epsilon$ , 4100).

10

Similarmente, siguiendo el procedimiento del Ejemplo 8, pero sustituyendo el anhídrido acético por cantidades equivalentes de diversos agentes acilantes, por ejemplo anhídrido propiónico o cloruro de benzoilo, se obtienen los respectivos derivados acilados de umbrinomicina B.

15

Ejemplo 9. Acilación de umbrinomicina A. Siguiendo el procedimiento de acetilación descrito en el Ejemplo 8, la umbrinomicina A dá un derivado triacetilado naranja, de punto de fusión 169,5 a 170,5°C.

20

$\lambda$  <sup>EtOH</sup>  
max 254 m $\mu$  ( $\epsilon$  11.000),  
302 m $\mu$  ( $\epsilon$ , 21.200), 454 m $\mu$  ( $\epsilon$ , 2900)

25

Ejemplo 10. El pH de los caldos de cultivo de fermentación reunidos, obtenidos a partir de fermentaciones de 3 a 30 litros, tal como se describe en el Ejemplo 3, es ajustado a pH 3 con ácido clorhídrico concentrado. Se añade auxiliar de filtración (Hyflo, 1,5 kg) y el material insoluble es eliminado por filtración, para producir 11,0

30



kg de torta de mecilio.

Ejemplo 11. La torta de filtración (11,0 kg) obtenida en el Ejemplo 10 es extraída dos veces con porciones de 30 l. de metanol, durante media hora. La torta es filtrada entre las extracciones. Los extractos en metanol combinados son ajustados a pH 6, y son concentrados en vacío hasta 2,5 litros, para eliminar el metanol. La suspensión acuosa resultante es ajustada a pH 8 y es extraída durante cuatro veces con porciones de 500 ml de butanol para retirar el antibiótico de umbrinomicina, dejando el antibiótico de diumicina en la fase acuosa. La fase acuosa es ajustada entonces a pH con HCl 2N, y es extraída tres veces con porciones de 1 litro de butanol. Los extractos en butanol reunidos (3 litros) son extraídos tres veces con porciones de 200 ml de agua, que son ajustados a pH 7 con NaOH 2,5 N durante la extracción. Los extractos acuosos combinados son secados por congelación, o liofilizados. El residuo (22,9 g) es disuelto en 250 ml de metanol, el material insoluble es separado por filtración, y el filtrado es concentrado para producir 12,0 g de antibiótico crudo en forma de un sólido amorfo de color rojo parduzco que tiene un contenido de 5 a 10% de diumicina.

Ejemplo 12. 2 g del antibiótico crudo obtenido en el Ejemplo 11 son disueltos en 10 ml de bicarbonato de amonio 0,1 N y son cargados sobre una columna (de 90 x 3,2 cm) de Sephadex 75, equilibrada con el mismo tampón. La columna es revelada con solución 0,1 N de bicarbonato de amonio, se recogen 100 fracciones de 15 ml cada una y se analizan por medición de la absorción ultra-



5 violeta a 257 m $\mu$ . Se encuentra que el grado de absorción a 257 m $\mu$  se corresponde aproximadamente con el grado de actividad biológica. Se encuentra la mayoría del antibiótico en las fracciones números 25 a 40. Estas fracciones son secadas por congelación, para producir 0,85 g de un producto que consiste en 15 a 20% del antibiótico de diumicina.

10 Ejemplo 13. El antibiótico crudo obtenido tal como se describe en el Ejemplo 12 es purificado adicionalmente por cromatografía sobre gel de sílice lavado con ácido (de 100 a 200 mallas de tamaño). El antibiótico crudo (0,80 g) disuelto en 20 ml de propanol y amoniaco 2N (8:2 en volumen), es cargado sobre una columna (de 15 33 x 2,5 cm) de gel de sílice, y la columna es revelada y eluida con la misma mezcla disolvente recogiendo fracciones de 15 ml cada una. Las fracciones son examinadas en cuanto a la absorción de ultravioleta a 257 m $\mu$  y en cuanto a la actividad biológica. Se encuentra la mayoría de los antibióticos en las fracciones núm. 65 a 90. Las 20 fracciones biológicamente activas combinadas son concentradas hasta sequedad en vacío, dejando 152 mg de un producto amorfo de color tostado claro, que tiene un contenido del antibiótico diumicina de 80 a 85%.

25 Ejemplo 14. El antibiótico de diumicina puede ser purificado adicionalmente por cromatografía en columna por reparto sobre celulosa cristalina (Avicel), utilizando un sistema de propanol, butanol e hidróxido de amonio 2 N (de 1:3:4 en volumen). La celulosa es impregnada con 50% de su peso de la fase inferior del anterior 30 sistema, y es colocada como relleno en una columna (de



38 x 2,5 cm) utilizando la fase superior. El antibiótico (235 mg) obtenido tal como se describe en el Ejemplo 13, es disuelto en 3 ml de la fase inferior del sistema de propanol, butanol y amoniaco acuoso 2 N (de 1:3:4), y la solución es colocada sobre la columna. La fase superior de este sistema es utilizada entonces para revelar y eluir el antibiótico. Se recogen 90 fracciones de 15 ml cada una. Se encuentra la mayoría del antibiótico en las fracciones números 12 a 37. Estas fracciones son combinadas, son concentradas hasta sequedad, el residuo es disuelto en metanol, y es precipitado por la adición de éter para producir 200 mg de una sal de amonio de diumicina pura, amorfa e incolora.

Ejemplo 15. El complejo de diumicina obtenido en el Ejemplo 14 consiste en el antibiótico principal, diumicina A y un componente secundario, diumicina B. La diumicina A puede ser separada de la diumicina B por distribución en contracorriente del complejo, utilizando el sistema disolvente de n-propanol, n-butanol, amoniaco 0,5 N (2:3:4 en volumen). El complejo de sales de amonio (300 mg) (procedente del ejemplo 14), es sometido a 500 transferencias en un aparato de distribución en contracorriente bajo una atmósfera de gas nitrógeno, utilizando el sistema antes mencionado. Se combinan los tubos 65 a 90 ( $K = 0,19$ ) y se concentran en vacío. El residuo es recogido en metanol y es precipitado con éter para producir 98 mg de sal de amonio de diumicina A. Los tubos 145 a 200 son tratados de una manera similar para obtener 10 mg de la sal de amonio de diumicina B ( $K=0,47$ ).

El ácido libre del antibiótico principal, diu-



micina A, es obtenido disolviendo la sal de amonio (50 mg) en agua, y tratando la solución con la resina de intercambio de iones Dowex 50 (forma  $H^+$ ). La resina es separada por filtración y el filtrado es concentrado hasta sequedad bajo vacío. El residuo es precipitado desde la solución en metanol por la adición de acetato de etilo, para producir 41 mg del ácido libre de diumicina A, amorfo e incoloro.

Ejemplo 16.— La diumicina A y la B pueden ser desdobladas por cromatografía en papel por reparto, y son detectadas por bioautografía. 0,1  $\mu$ g del material obtenido en el Ejemplo 14 son aplicados en forma de mancha sobre un papel de filtro doblemente lavado con ácido (por ejemplo Munktells N<sup>o</sup> S-302) de 550 mm de longitud, y la hoja de papel de filtro es sumergida en una solución de acetona y la fase inferior del sistema disolvente (2:1 en volumen). La hoja es secada con aire a la temperatura ambiente (durante 2 a 3 minutos) para eliminar la acetona y después es revelada con la fase superior del sistema disolvente, que consiste en n-propanol, n-butanol, amoniaco 0,5 N (1:3:4 en volumen) durante 16 horas. Los disolventes son eliminados por secado con aire y la hoja es bioautografiada sobre agar sembrado con Staphylococcus aureus 209 P. La diumicina A está caracterizada por un valor  $R_f$  de 0,32, y la diumicina B por un valor  $R_f$  de 0,45.

Ejemplo 17. Sales de diumicina A. El ácido libre de diumicina A es suspendido en agua (30 mg/ml) y se añade una solución 1 N de hidróxido de potasio a pH 8, y la solución es agitada hasta la disolución completa de antibiótico. Se añaden 8 volúmenes de acetona y el pre-



cipitado de sal de potasio es separado por filtración, y es secado bajo presión reducida.

5 Similarmente, siguiendo el procedimiento del ejemplo 17, pero sustituyendo por cantidades equivalentes de hidróxido de sodio, hidróxido de bario, o de bases orgánicas tales como dimetilamina, se obtienen las respectivas sales de diumicina A. Similarmente, sustituyen  
10 do la diumicina A por la diumicina B en el procedimiento del Ejemplo 17, se obtiene la sal de potasio de diumicina B.

El invento puede realizarse de otras diversas maneras dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones:

15 Esta solicitud que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América el 27 de Diciembre de 1966, Nº 604.694 y 15 de noviembre de 1967 Nº 693.038 se acoge a los beneficios del artº 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

20

N O T A

25 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:

30 1.-Un procedimiento para preparar una sustancia eficaz en la inhibición del crecimiento de bacterias gram-positivas, seleccionada del grupo que consiste en



umbrinomicina, umbrinomicina A, umbrinomicina B, los ésteres de cada una de las umbrinomicinas derivadas de ácidos carboxílicos hidrocarbonados con menos de 12 átomos de carbono, diumicina, diumicina A, diumicina B, y las sales de cada una de las diumicinas, siendo dicha umbrinomicina A un alcohol que tiene un color rojo, que es soluble en éter, en metanol y en benceno y es insoluble en hexano, tiene un espectro de absorción de ultravioleta que muestra máximos a 242,5, 304 y 476 m $\mu$ , un espectro de infrarrojos en mezcla Nujol tal como se muestra en la figura 1 y un análisis elemental (aproximado): C = 63,78%; H = 6,19%; y O = 30,03% (por diferencia); siendo dicha umbrinomicina B un alcohol que tiene un color castaño, que es soluble en éter, metanol y benceno, y es insoluble en hexano, tiene un espectro de absorción de ultravioleta que muestra máximos a 254, 304 y 476 m $\mu$ , un espectro de infrarrojos en la mezcla Nujol tal como se muestra en la figura 2, y un análisis elemental (aproximado): C = 63,53%; H = 5,91 % y O = 30,56% (por diferencia); siendo dicha diumicina A un ácido que contiene fósforo, que tiene un color blanco, que es soluble en agua, en alcoholes inferiores, en piridina y en ácido acético, y es apenas soluble, o insoluble, en acetona, en cloroformo y en benceno, tiene un espectro de absorción de ultravioleta que muestra un máximo a 257 m $\mu$ , y un espectro de infrarrojos en forma del ácido libre, en gránulos de KBr, tal como se muestra en la figura 3, y un análisis elemental (aproximado): C = 46,5%; H = 7,2%; N = 4,5%; P = 2,0%; y O = 39,8% (por diferencia); y siendo dicha diumicina B un ácido que contiene fósforo que

14.2.68



1969

5 tiene un color blanco, que es soluble en agua, en alcáño-  
les inferiores, en piridina y en ácido acético, que es  
apenas soluble, o insoluble, en acetona, en cloroformo  
y en benceno, tiene un espectro de absorción de ultra -  
violeta que no muestra máximos entre 220 y 300 m $\mu$ , un  
espectro de infrarrojos en forma del ácido libre en grá-  
nulos de KBr tal como se muestra en la figura 4, y un  
análisis elemental (aproximado) : C = 45,9%, H = 6,6 %;  
N = 4,6%; P = 1,8%; y O = 41,1% (por diferencia), carac-  
10 terizado por cultivar el microorganismo Streptomyces  
umbrinus ATCC 15972 en un medio nutriente acuoso bajo con-  
diciones aerobias hasta que se comunique actividad anti-  
biótica a dicho medio, separar desde el caldo de cultivo  
de fermentación el micelio del mismo, y extraer dicha sus-  
15 tancia desde el micelio.

2.-Un procedimiento para preparar una sustancia  
eficaz en la inhibición del crecimiento de bacterias  
gram-positivas.

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

Esta Memoria consta de veintiocho hojas escri-  
tas a máquina por una sola cara.

Madrid,

17 MAR. 1969

P.A.

Alberto de Izaburu  
Pon. Poner.



FIGURA 1.

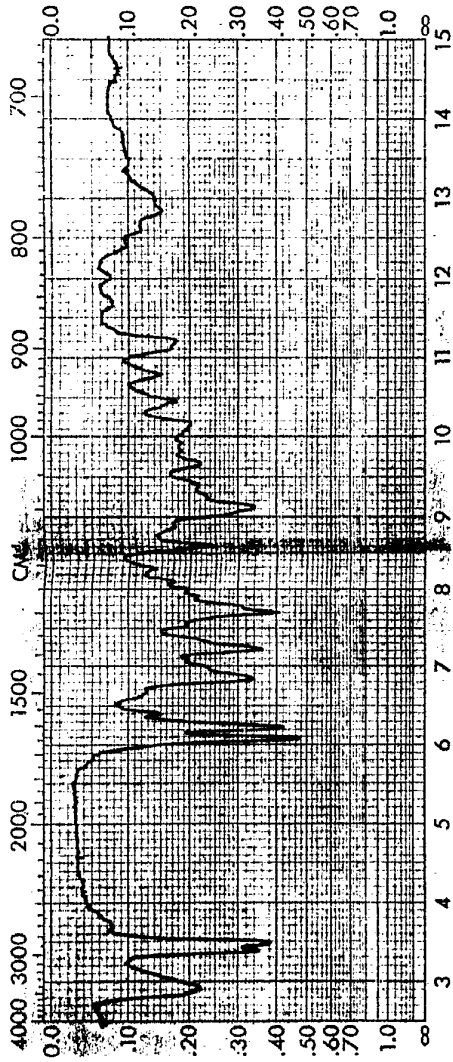
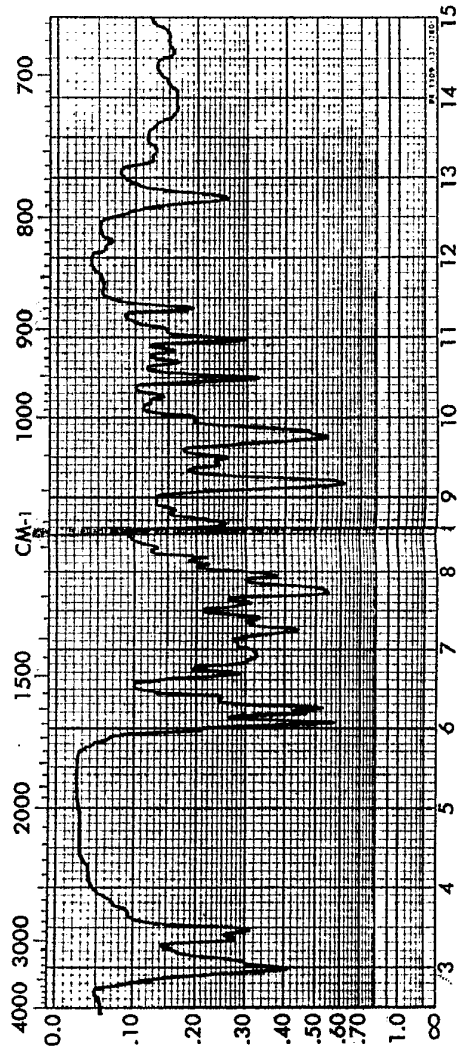


FIGURA 2.



*Handwritten signature or initials in the bottom right corner.*

48

FIGURA I.

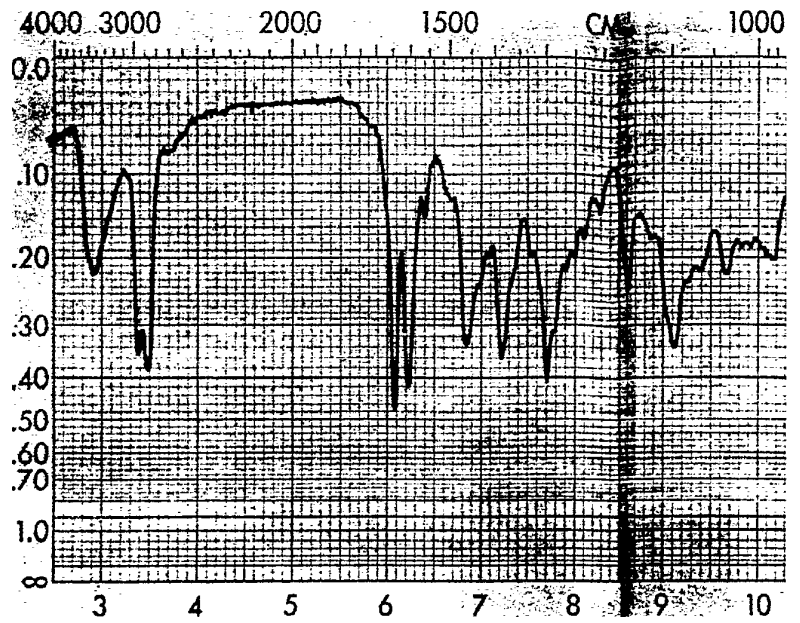
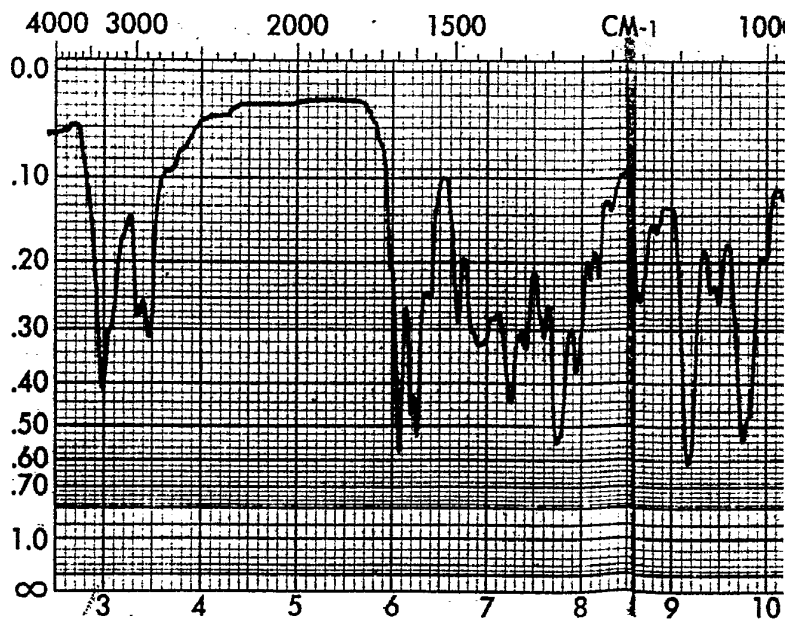


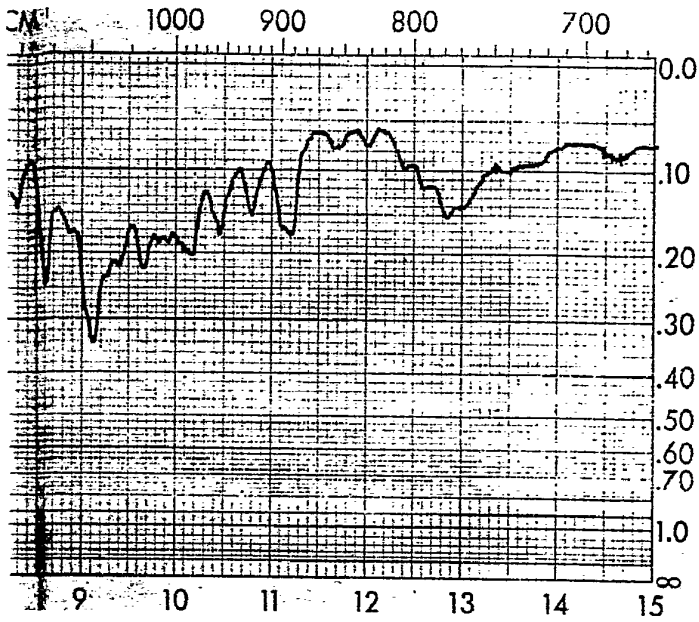
FIGURA 2.



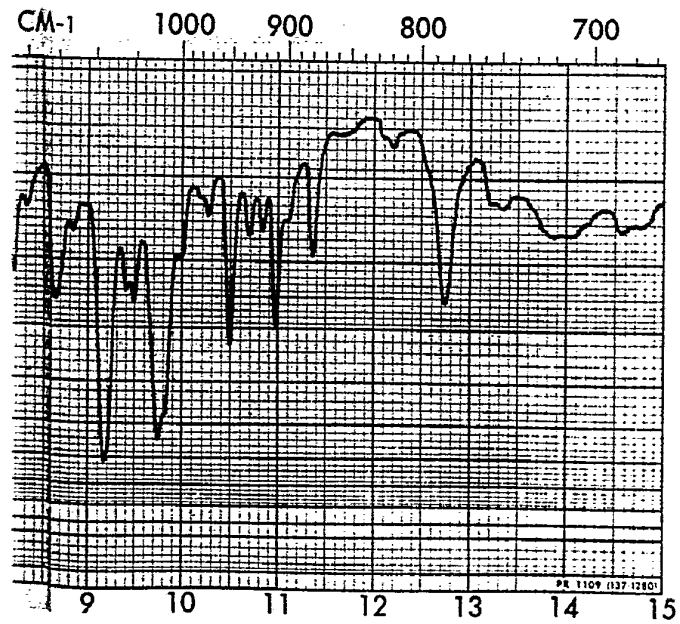
334



### GURA 1.



### GURA 2.



*Handwritten signature or initials.*



FIGURA 3.

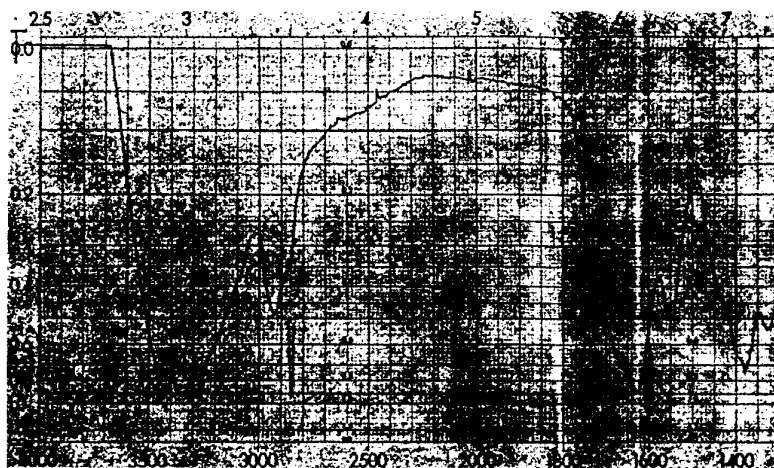
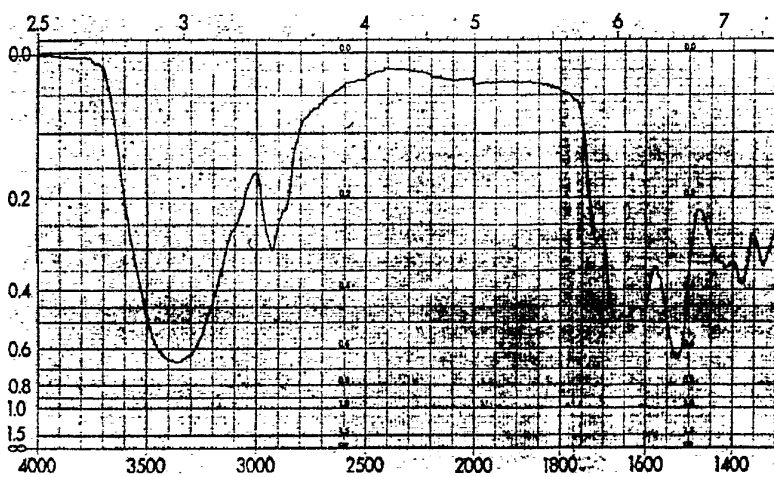
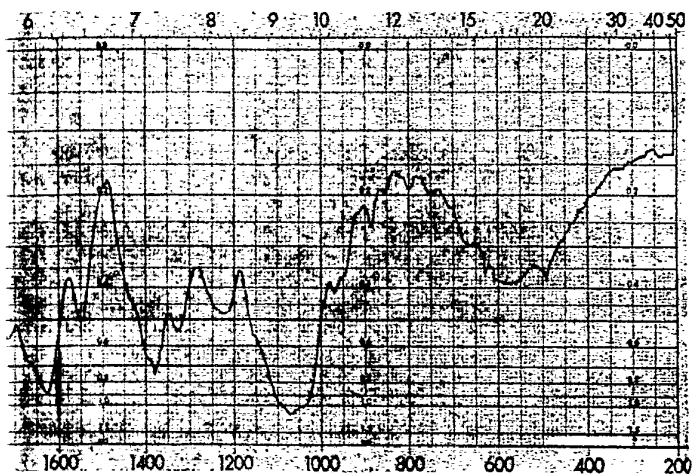


FIGURA 4.

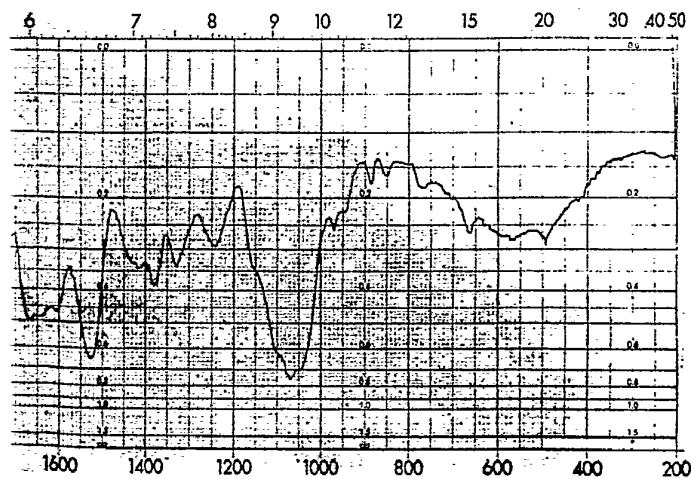




3URA 3.



3URA 4.



*Handwritten signature or initials in the bottom right corner.*

FIGURA 5

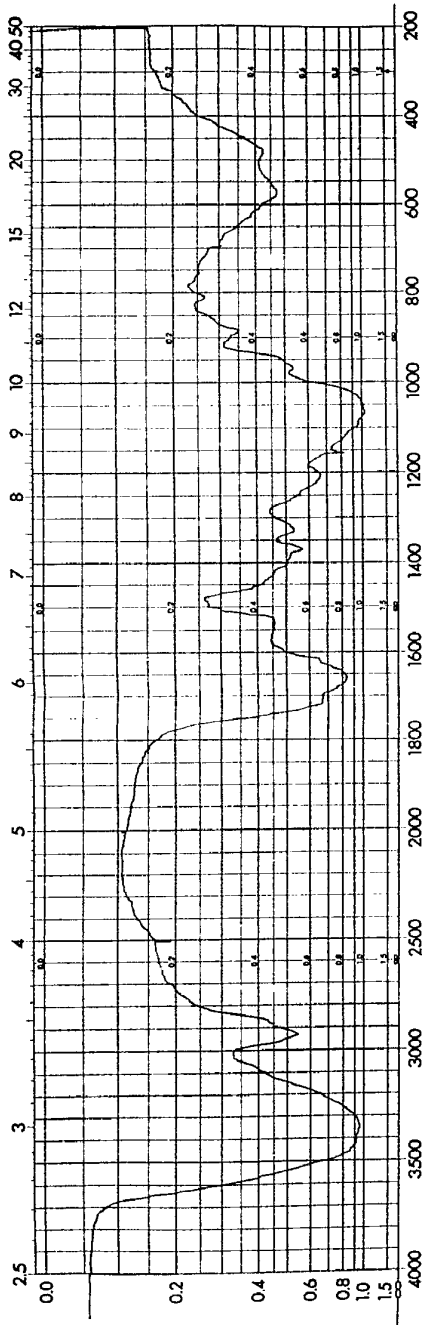


FIGURA 6

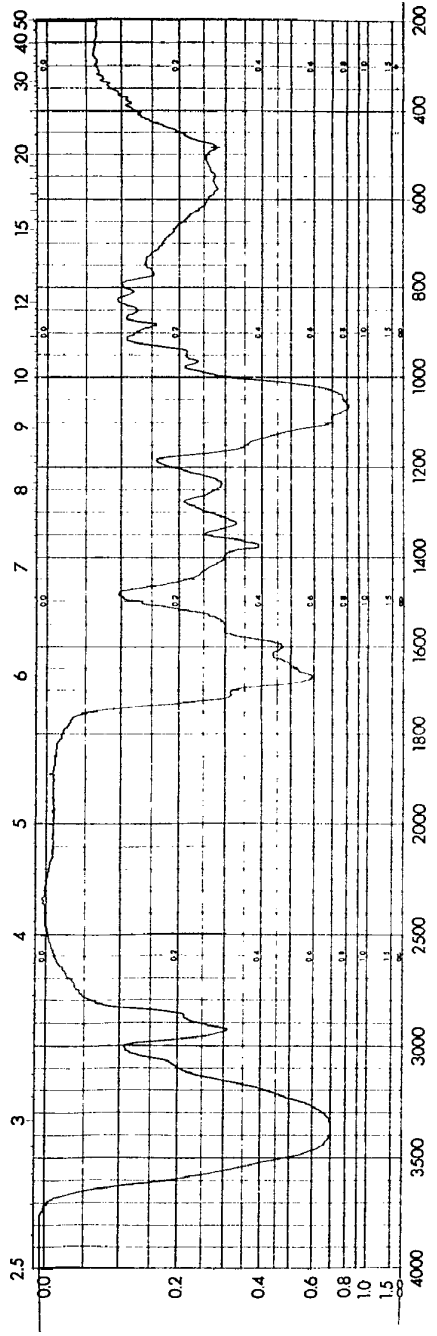


FIGURA 5

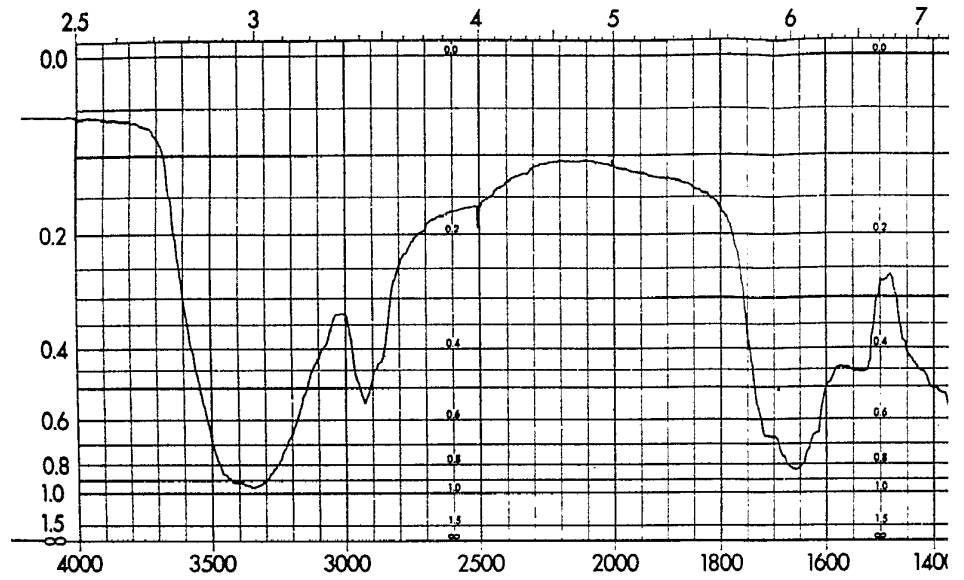
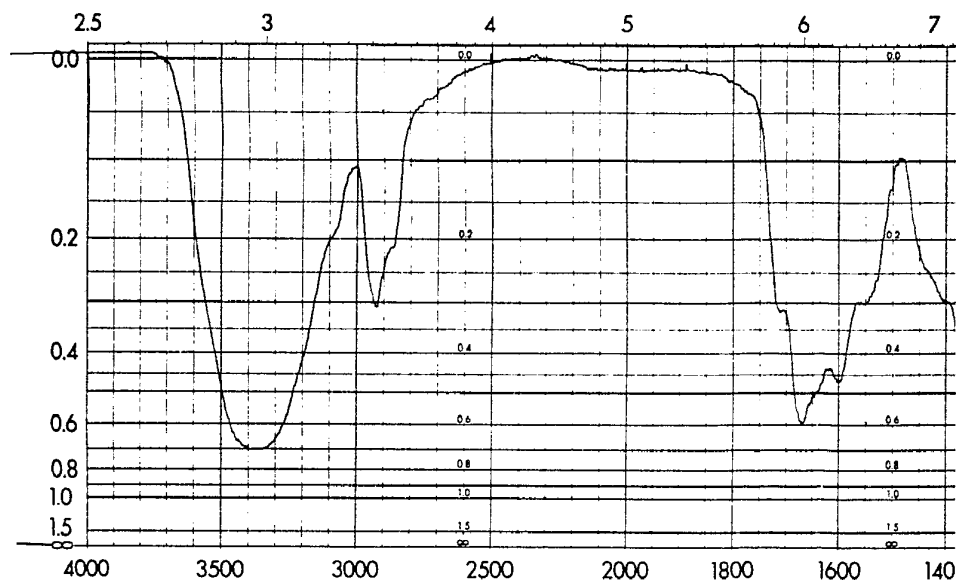
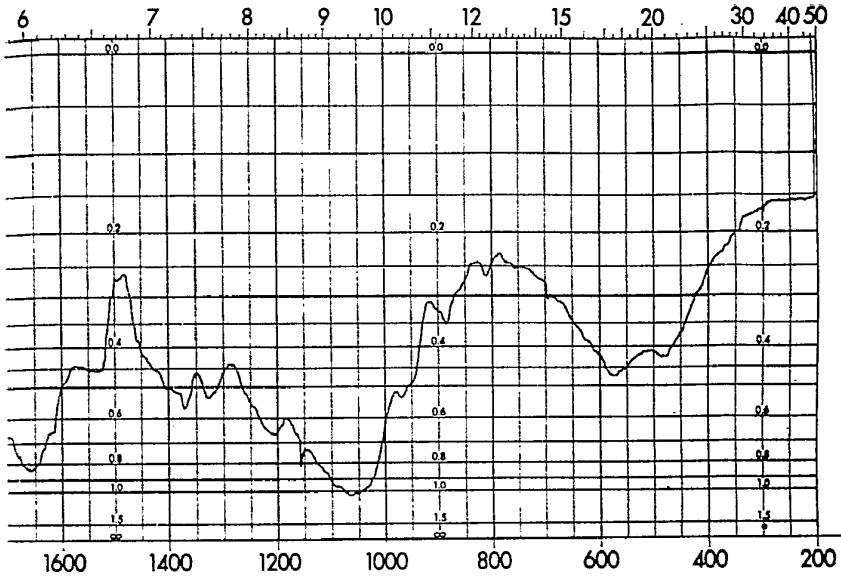


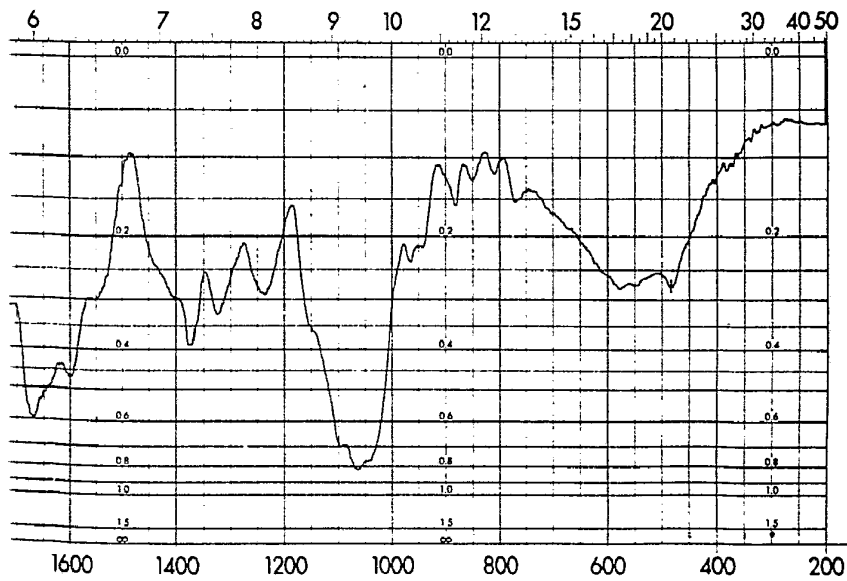
FIGURA 6



# URA 5



# JRA 6



*Handwritten signature or initials.*