

Case 939A



354,296

PATENTE  
DE  
INVENCIÓN

por "UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR ANTIBIOTICOS QUE PERTENECEN A UN COMPLEJO ANTIBIOTICO", a favor de la firma suiza SCHERICO LTD., residente en LUCERNA (Suiza), Topferstrasse 5.

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA



Esta invención se relaciona con un nuevo complejo de antibióticos, y con métodos para su producción, aislación y purificación. Mas específicamente esta invención se relaciona con nuevos y útiles antibióticos obtenibles mediante el cultivo de una especie hasta ahora no descrita del género *Micromonospora* del orden Actinomycetales.

La especie hasta ahora no descrita del género *Micromonospora* que se empleó en la primera producción del nuevo complejo de antibióticos de esta invención fue aislada originalmente de una muestra de suelo obtenida directamente de la tierra por uno de los inventores aquí nombrados y ha sido denominada *Micromonospora* sp. W847. Dos cepas de esta especie *Micromonospora* han sido aisladas y se ha comprobado que son de particular uso en el procedimiento de esta invención. Estas dos cepas son variantes de color naturales y se las puede distinguir microscópicamente por el grado al cual se produce esporulación. Cultivos de organismos vivientes de estas dos cepas han sido depositados y forman parte de la colección de cultivos en existencia del United States Department of Agriculture, Northern Utilization Research and Development Division, Peoria, Illinois, donde han sido designados NRRL 3274 y NRRL 3275. Estas cepas son obtenibles, de dicha repartición que mantiene la colección, a pedido. Estas cepas serán denominadas individualmente en lo que sigue *Micromonospora* sp. W847 (NRRL 3274) y *Micromonospora* sp. W847 (NRRL 3275), y colectivamente *Micromonospora* sp. W847. Siempre que se haga referencia en esta descripción a *Micromonospora* sp. W847, sin indicación del número de la cepa, la información involucrada es aplicable a ambas cepas mencionadas más arriba.

El examen macroscópico de cultivos de 28 días de edad (24-26°C) de *Micromonospora* sp. W847 (NRRL 3274) sobre Agar de Sacarosa de Czapek, se caracteriza por buen crecimiento que no manifiesta micelio aéreo y por colonias elevadas y plegadas de una consistencia blanda, húmeda y no cerosa que no produce pigmento dispersable. El color de la superfi-



cie de las colonias, descrito de acuerdo con "Descriptive Color Name Dictionary", Taylor, Knoche y Granville, publicado por Container Corporation of America, 1950 (USA), juntamente con el número de color tomado de "Color Harmony Manual", 4° edición, 1958, publicado por la misma  
5 compañía, es anaranjado m4-la. Este color corresponde al sinónimo o casi sinónimo, anaranjado fuerte 50, que se encuentra en National Bureau of Standards Circular N° 553, Noviembre 1, 1955, USA (todas las designaciones de color de las colonias empleadas más adelante se basan en el mismo sistema de referencia de color).

10 El examen microscópico del mismo cultivo muestra un micelio regular compuesto de filamentos ramificados largos de un diámetro de aproximadamente 0,6  $\mu$ . Se encuentran esporos con poca frecuencia.

El examen macroscópico de cultivos de 28 días de edad de *Micromonospora* sp. W847 (NRRL 3275), crecidos en el mismo medio y bajo  
15 las mismas condiciones descritas más arriba, se caracteriza por buen crecimiento que manifiesta las mismas características de conjunto de las colonias que la cepa precedente excepto por el color. El color de la superficie de las colonias es negro. Microscópicamente este cultivo muestra un micelio regular compuesto de filamentos ramificados largos  
20 de un diámetro de aproximadamente 0,6  $\mu$ . Sin embargo en esta cepa los esporos son muy abundantes y son producidos al azar a través de todo el micelio. Los esporos son de forma entre ovoide y esférica con un diámetro de 0,7-1,0  $\mu$  y son de color castaño oscuro cuando están maduros.

25 Se puede caracterizar también colonias de *Micromonospora* sp. W847 por sus características de crecimiento (bajo condiciones aeróbicas) sobre diversos medios nutritivos. La siguiente Tabla 1 indica las características de crecimiento de *Micromonospora* sp. W847 sobre algunos de los medios nutritivos más ampliamente usados. Se realizan las obser-  
30 vaciones de las colonias sobre cultivos de 14 días de edad (24-26°C)



a menos que se especifique lo contrario.

Tabla 1

Características de las colonias de Micromonospora sp. W847 sobre diversos medios

5	Agar de glucosa-asparagina	Crecimiento pobre
	Agar de Bennett	Crecimiento pobre
	Agar de Emerson	Crecimiento pobre
	Agar de pasta de tomate-harina de avena	Crecimiento pobre
10	Agar de glucosa-extracto de levadura	Buen crecimiento, elevado, finamente plegado
	Rodaja de patata	Crecimiento pobre
	Agar de sacarosa-nitrato (Agar de Czapek)	Buen crecimiento, elevado, plegado
	Agar de tirosina	Crecimiento regular, cristales pobremente disueltos directamente debajo de las colonias, pigmento castaño dispersable producido después de 3 semanas, pigmento dispersable no negro o típico de una tirosina positiva como la producida por streptomyces.
15	Observaciones después de 2, 7 y 14 días (Gordon y Smith, J.Bact. 69,147)	

20 Micromonospora sp. W847 muestra crecimiento particularmente bueno a temperaturas entre 26 y 37°C pero no muestra crecimiento sustancial a temperaturas tan elevadas como 50°C. Es aeróbico y no reduce nitrato a nitrito. Esta especie no licúa la gelatina; no hidroliza la leche y no descompone la celulosa. No se produce pigmento dispersable sobre agar de peptona-hierro.

25 Micromonospora sp. W847 muestra buen crecimiento sobre medios de carbohidrato que contienen 0,5 % de base de extracto de levadura y 1 % de l-arabinosa, glucosa, almidón y sacarosa pero solamente regular crecimiento donde la fuente de carbohidrato es 1 % de xilosa. Crece pobremente sobre medios de esta clase en los cuales la única fuente de

30 carbohidrato es 1 % de d-arabinosa, celulosa, dulcitol, galactosa, gli-



cerol, lactosa, levulosa, melibiosa, melizitosa, rafinosa, ramnosa, ribosa, inositol o manitol.

Otra característica de *Micromonospora* sp. W847 es su capacidad para utilizar fuentes de nitrógeno. En la siguiente Tabla 2 se indican las características de crecimiento de las colonias sobre fuentes típicas de nitrógeno, más 1% de glucosa, observadas después de 14 días de crecimiento (24-26°C).

Tabla 2

Utilización de fuentes de nitrógeno

10	Fuente de nitrógeno	Características de crecimiento
	0,5 % de extracto de levadura Difco	Buen crecimiento, elevado, finamente plegado
	1,0 % de NZ Amine Tipo A <sup>(*)</sup>	Crecimiento regular
	1 % de Asparagina	Crecimiento pobre
15	1 % de ácido glutámico	Crecimiento pobre
	1 % de nitrato de amonio	Crecimiento pobre

(\*) Producto de Sheffield Chemical Company, Norwich, Nueva York.

Se puede preparar el nuevo compuesto antibiótico que se describirá más adelante, mediante el uso de *Micromonospora* sp. W847 var. NRRL 3274 y/o var. NRRL 3275 y/o otra cepa de dichas especies (incluyendo sus mutantes y variantes) que tienen sustancialmente la misma actividad biológica en el sentido de que producen antibióticos del mismo complejo. Por lo tanto esta invención no deberá ser considerada tan limitada como para excluir el uso de variantes de *Micromonospora* sp. W847 o sus mutantes producidos a partir de este organismo por agentes de mutación tales como por ejemplo irradiación con frecuencia alta incluyendo rayos X y ultravioleta, actinofagos y mostaza nitrogenada. En la siguiente descripción en que se describe el procedimiento para la producción de antibióticos, se comprenderá que el uso del término Mi-



cromonospora sp. W847 incluye las variantes de color específicamente descritas más arriba como así también todas las otras variantes y mutantes plenamente equivalentes de estas especies.

El antibiótico

5 1) Preparación de complejo antibiótico W847

Micromonospora sp. W847, particularmente mediante técnicas de fermentación controlada según se describe más adelante, produce una mezcla compleja de sustancia antibiótica a la cual se denominará más adelante Complejo Antibiótico W847.

10 A fin de preparar un Inoculum apropiado para subsiguiente fermentación, se hace crecer de preferencia Micromonospora sp. W847 bajo condiciones aeróbicas sumergidas con agitación continua a temperaturas comprendidas entre aproximadamente 22 y 37°C durante un período de aproximadamente 2 a 4 días. En general se encuentra especialmente satisfactoria una temperatura de 35°C a través de un período de 3 días. El  
15 medio normalmente utilizado en esta primera etapa de germinación es acuoso y contiene cantidades de fuentes de carbono y nitrógeno asimilables por el organismo. Se ajusta convenientemente la alcalinidad de los medios aproximadamente hasta pH 7,5 antes del tratamiento en autoclave  
20 mediante la adición de una base tal como hidróxido de sodio.

Ejemplos de medios empleados en la etapa de germinación son los siguientes: Medio I: Bacto-extracto de carne de vaca (Difco), 3 g; Bacto-Tripton (Difco), 5 g; dextrosa, 1 g; almidón (patata), 24 g; Bacto-extracto de levadura (Difco), 5 g; CaCO<sub>3</sub>, 2 g; agua corriente,  
25 1000 ml; Medio II: Bacto-extracto de levadura (Difco), 5 g, solubles de pescado, 1 g; licor de maceración de maíz, 1 g; dextrosa 20 g, CaCO<sub>3</sub>, 1 g; agua corriente 1000 ml.

Convenientemente se emplea una segunda etapa de germinación (por ejemplo etapa del inoculum) antes de la fermentación o cosecha  
30 del antibiótico a fin de enriquecer el inoculum. Empleando medios como



los descritos más arriba, se puede inocular nuevo medio con el cultivo germinado previamente preparado (5 % peso/volumen) y se le incuba entre aproximadamente 22 y 37°C durante aproximadamente 2 a 4 días. Generalmente se encuentra especialmente satisfactoria una temperatura de 28°C a través de un período de 3 días.

A fin de producir el Complejo Antibiótico W847, se puede agregar un inoculum de 5 % (peso/volumen), tomado de la etapa del inoculum, a un medio acuoso de fermentación que antes del tratamiento en autoclave, ha sido ajustado aproximadamente a pH 7,1-7,8. Se introduce aire, por lo general aproximadamente 3 a 6 lt por minuto, en la fermentación que por lo general se lleva a cabo a una temperatura entre aproximadamente 22 y 37°C a través de un período de aproximadamente 2 a 6 días con agitación continua. Particularmente con referencia al Medio III que se describe más adelante, se ha comprobado que se obtiene máximos rendimientos del Complejo Antibiótico W847 después de la fermentación durante 66 h a 31°C con introducción de aire a razón de 4,5 lt por minuto y con agitación por impulsor a 250 rpm. Utilizando fermentadores de 14 lt que contienen 10 lt de medio, se obtienen bajo estas condiciones rendimientos comprendidos entre 300 y 800 µg/ml.

Medios útiles en la etapa de fermentación incluyen por ejemplo los siguientes: Medio III: sacarosa 30 g; dextrosa 2,5 g; tripticasa 17 g; NaNO<sub>3</sub>, 3 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,5 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,5 g; KCl, 0,5 g; FeSO<sub>4</sub>, 0,01 g; NaCl, 5 g; agua corriente 1000 ml; Medio IV: Bacto-extracto de levadura (Difco), 5 g; dextrosa 10 g; almidón 20 g, hidrolizado de caseína 5 g; CaCO<sub>3</sub>, 4 g; agua corriente 1000 ml; Medio V: sacarosa 20 g; peptona 5 g; hidrolizado de proteína de semilla de algodón 5 g; CaCO<sub>3</sub>, 4 g; agua corriente 1000 ml; Medio VI: sacarosa 30 g; peptona 8 g; NaHO<sub>3</sub>, 3 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,5 g; FeSO<sub>4</sub>, 0,01 g; agua corriente 1000 ml; Medio VII: Tripticasa, 17 g; NaCl, 5 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,5 g; dextrosa 2,5 g; caldo Czapek-Dox 35 g; agua corriente, c.s.p. 1000 ml.



Para recuperar el Complejo Antibiótico W847 a partir del medio de fermentación, se puede proceder por ejemplo de la siguiente manera: Se ajusta el caldo entero hasta aproximadamente pH 9,5 con una base tal como por ejemplo hidróxido de sodio. Se extrae entonces el

5 caldo entero en aproximadamente 2 volúmenes, por cada volumen de caldo, de un solvente orgánico apropiado inmiscible con agua tal como por ejemplo acetato de etilo, bicloruro de metileno, acetato de butilo, clorofor-

10 mo, butanol y similares. Se concentra entonces la fase solvente bajo presión reducida hasta un pequeño volumen, concentración de aproximadamente 100 veces, y se la purifica mediante cromatografía en columna empleando por ejemplo LH 20 Sephadex, que es un dextrano alquilado que tiene ligaduras cruzadas, (Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Uppsala, Suecia) suspendido en etanol acuoso aproximadamente al 95 %. Se eluye

15 la columna con el etanol acuoso. Se combinan las fracciones de la columna de acuerdo con sus actividades antibacterianas según queda en evidencia por ensayo sobre disco de agar contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), se concentra hasta sequedad, se disuelve en una pequeña cantidad de éter etílico o acetona y se agrega a un volumen en exceso de éter de petróleo (p. de ebullición aproximadamente 30 a 60°C). Se transfiere

20 la mezcla a un baño de hielo seco/acetona (aproximadamente -50°C) y se la deja reposar durante aproximadamente 20 min después de lo cual se la deja retornar a la temperatura ambiente. Se separa por decantación el licor madre con respecto a cualquier residuo aceitoso y se le concentra hasta sequedad. Por lo general se comprueba que el material producido en esta manera tiene una potencia de aproximadamente 232  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de

25 acuerdo con el procedimiento de bio-ensayo que se describe más adelante.

El ensayo es un ensayo en copa cilíndrica utilizando *Sarcina lutea* (ATCC 9341) como organismo de ensayo. Las condiciones del ensayo son similares al ensayo con placa cilíndrica descrito para eritromicina

30 (Grove y Randall, 1955, Med, Encyclopedia, Inc., N.Y.), Un microgramo



de actividad del Complejo Antibiótico W847 es la cantidad de material que produce una respuesta zonal de  $20,8 \pm 0,5$  mm bajo las condiciones de este ensayo.

5 Se puede preparar también Complejo Antibiótico W847 por ejemplo utilizando las siguientes técnicas de fermentación y aislación.

Empleando el Medio I para la preparación de un inoculum, se inoculan frascos de fermentación que contienen este medio con un cultivo (aproximadamente 5 % peso/volumen) de *Micromonospora* sp. W847. Se disponen los frascos sobre un sacudidor rotativo que opera aproximadamente a 280 impulsos por minuto y se los incuba a 28°C durante 72 h. Al término de este tiempo se inoculan fermentadores, cada uno cargado con medio de fermentación (por ejemplo Medio VII) ajustado a pH 7,15-7,25 con aproximadamente 5 % (volumen/volumen) del cultivo de inoculum de 72 h. Se agita el medio de fermentación a razón de aproximadamente 10 500 r.p.m. a una temperatura de 31°C. Se induce circulación de aire a través del medio a razón de aproximadamente 0,5 lt de aire/lt de caldo/minuto. Se puede aumentar el régimen de agitación a 600 r.p.m. después de 24 h y a 700 r.p.m. después de 48 h. Se da por terminada la fermentación al término de aproximadamente 69 h. Se reúnen los caldos de todos los fermentadores para la extracción y recuperación del Complejo Antibiótico W847 según se describe más adelante.

Se ajusta los caldos de fermentación así reunidos, aproximadamente hasta pH 9,25 con hidróxido de sodio acuoso (50 %) y se los extrae en aproximadamente 2 volúmenes de acetato de etilo y se concentran los extractos hasta aproximadamente 1 a 2 % del volumen original. Al 25 concentrado de acetato de etilo se le extrae entonces por lo menos 2 veces en la mitad de los volúmenes de ácido clorhídrico (aproximadamente 0,14 n). También se puede llevar a cabo la extracción ácida con otros ácidos minerales de aproximadamente la misma normalidad. A los extractos 30 ácidos combinados se los hace levemente alcalinos con hidróxido de



sodio acuoso al 5 % (hasta aproximadamente pH 8,5-9,0) y se los extrae por lo menos 2 veces en volúmenes aproximadamente iguales de acetato de etilo. Bajo presión reducida se concentran hasta sequedad los extractos de acetato de etilo combinados, de manera de obtener el Complejo Antibiótico W847. El complejo en esta etapa demuestra una potencia de 450 a 550  $\mu\text{g}/\text{mg}$ .

## 2) Caracterización del Complejo Antibiótico W847

Mediante cromatografía sobre papel se compara el Complejo Antibiótico W847 con una variedad de antibióticos, incluyendo diversas macrolidas. En una serie de sistemas solventes, según se muestra en la siguiente Tabla 3, el Complejo Antibiótico W847 se mueve como un solo punto y se diferencia de todos los otros antibióticos, excepto las macrolidas, que fueron ensayados, (es decir magnamicina, oleandomicina, espiramicina y eritromicina).

T A B L A 3

VALORES COMPARATIVOS R<sub>f</sub> DE COMPLEJO DE ANTIBIOTICO W 847.

R<sub>f</sub> de los antibióticos

Sistemas cromatográficos sobre papel	Complejo Anti- biótico W847	Kanamicina	Oleandomicina	Espiramicina	Penicilina	Kanamicina	Gloranfencol	Clortetraciclina	Centamicina	Astreptomizina	Tetraciclina
80% metanol más 3% de cloruro de sodio (peso/volumen) 1:1 descendente *	0,90	0,90	0,90	0,90	0,63	0,30	0,84	0,74	0,59	0,57	0,72
Propenol-Piridina: Acido acético:agua (6:4:1:3) ascendente (volumen/volumen)	0,93	0,93	0,93	0,93	0,91	0,18	0,91	0,75	0,26	0,40	0,70
Butanol:Acido acético: Agua (4:1:5) ascendente (volumen/volumen)	0,78	0,78	0,76	0,78	0,85	0,00	0,92	0,45	0,00	0,00	0,38
80% fencl ascendente (volumen/volumen)	0,86	0,86	0,86	0,86	0,81	0,17	0,93	0,87	0,50	0,06	0,83

\* Papel regulado con 0,95 molar Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0,05 molar NaHSO<sub>4</sub>





Mediante cromatografía en capa delgada sobre placas de gel de sílice GF (Analtech Inc., Wilmington, Delaware) se lleva a cabo la diferenciación del Complejo Antibiótico W847 con respecto a estos importantes antibióticos de macrolida. Se detectan zonas mediante los siguientes dos métodos:

5

1) Se rocía placas con una mezcla de ácido sulfúrico concentrado-metanol (1:1 volumen/volumen) y se las revela por calentamiento a 105°C durante varios minutos. Las zonas de material orgánico aparecen como áreas coloreadas contra un fondo blanco.

10

2) Se deja permanecer placas en contacto con una capa de agar sembrada con *S. aureus*. Se coloca una hoja de papel Whatman N° 1 entre la capa de agar sembrada y la placa para asegurar que el gel de sílice no se adhiera al agar. Se separa el papel y el gel de sílice después de 15 min. Se incuba la placa de agar a 37°C durante la noche y se evalúan las zonas de inhibición.

15

En la siguiente Tabla 4 se indican los resultados de estos experimentos.

T A B L A 4

CRROMATOGRAFIA COMPARATIVA EN CAPA DELGADA DEL COMPLEJO ANTIBIOTICO W847

Sistema	Antibiótico	R <sub>f</sub> y Color por rociado con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	R <sub>f</sub> de la zona de Inhibición
Cloroforme:metanol: 17% amoníaco 2:1:1 (volumen/volumen)	Complejo antibiótico W847	Negro azulado	0,98
	Oleandomicina	Verde	0,98
	eritromicina	Amarillo tostado	0,98
	magnamicina	Púrpura azulado	0,98
Butanol:ácido acético Agua 3:1:1 (Volumen/volumen)	Complejo antibiótico W847	Púrpura rojizo	0,13
	Eritromicina	Castaño verdoso	0,26
	Espiramicina	Púrpura gris	0,96; 0,30
	Oleandomicina	Verde	0,19
	magnamicina	Púrpura rojizo	0,40; 0,47





Además por comparación de las propiedades físicas, químicas y biológicas del Complejo Antibiótico W847, y de sus fracciones separadas, de acuerdo con lo descrito más arriba, con las propiedades de macrolidas conocidas de acuerdo con lo informado en la literatura, el Complejo Antibiótico W847 y sus componentes son distinguibles de todos los antibióticos macrolidas conocidos.

El complejo Antibiótico W847 proporciona una reacción positiva de color en los ensayos con ninhidrina, almidón KI y biureto, y una reacción negativa de color en los ensayos con cloruro estanoso, Molisch y de Sakaguchi. El complejo es esencialmente transparente en la región ultravioleta. La actividad del Complejo Antibiótico W847 no queda significativamente alterada cuando se somete una solución del mismo a una temperatura de 100°C durante 30 min. a través de toda la gama de pH de 2 a 10 (se ensaya la estabilidad disolviendo el antibiótico en etanol, diluyendo con regulador de pH y ensayando sobre disco contra *S. aureus* y *Escherichia coli*). El complejo no demuestra pérdida de actividad después de tratamiento con tripsina, quimotripsina, pepsina, alfa-amilasa o penicilinasas en soluciones de pH regulado (pH opcional para cada enzima) a 37°C para una exposición de hasta 24 h. El Complejo Antibiótico W847 es soluble en la mayoría de los solventes orgánicos polares como por ejemplo acetato de etilo, metanol, etanol y acetona.

### 3) Separación de componentes del Antibiótico W847

La bioautografía de placas con gel de sílice en capa delgada, sobre agar sembrado con *Sarcina lutea* después de cromatografía en un sistema solvente que consiste en cloroformo:metanol (60:40 volumen/volumen) indica que el Complejo Antibiótico W847 consiste, en por lo menos 4 componentes antibióticos a los cuales se identificará en adelante como Fracciones de Antibiótico W847 A, B, C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> (o como Antibiótico W847-A, Antibiótico W847-B, Antibiótico W847-C<sub>1</sub> y Antibiótico W847-C<sub>2</sub>). Estas fracciones, en el sistema solvente descrito más arriba, demuestran va-



lores  $R_F$  de 0,19 (Fracción A), 0,38 (Fracción B), 0,52 (Fracción  $C_1$ ) y 0,65 (Fracción  $C_2$ ), respectivamente.

5 Se puede lograr la separación de las fracciones disolviendo el Complejo Antibiótico W847 en acetona mezclada con ácido silícico, evaporando la acetona y agregando la mezcla seca a la parte superior de una columna de ácido silícico. Se eluye la columna con cloroformo: metanol (60:40 volumen/volumen) y se recogen fracciones. Se vigila la columna mediante ensayo sobre disco de cada fracción contra *S. aureus* y *E. coli*. Se cromatografían las fracciones activas sobre placas de gel de sílice con capa delgada, operando durante aproximadamente 1,5 h en el mismo sistema solvente utilizado para la columna. Se detectan los diagramas de las fracciones antibióticas mediante los dos métodos descritos más arriba. Se combinan las fracciones de acuerdo con sus diagramas cromatográficos y se las concentra.

15 Mediante este método se separa la fracción  $C_2$  como una sal de clorhidrato y se la aísla como polvo blanco disolviendo las fracciones activas reunidas en metanol y precipitando en aproximadamente 10 volúmenes de éter etílico. El clorhidrato de Fracción  $C_2$  manifiesta en esta etapa una potencia de aproximadamente 1100  $\mu\text{g}.\text{mg}$ .

20 Durante la cromatografía, la base W847- $C_2$  se convierte en una sal de clorhidrato por reacción con pequeñas cantidades de cloruro de hidrógeno, que están presentes en el solvente. Según era de esperar el clorhidrato no manifiesta solubilidad apreciable en éter etílico y por lo tanto se le precipita mediante adición del mismo.

25 Se puede obtener la forma de base libre de W847- $C_2$  agregando álcali diluido, tal como NaOH 0,1n, a una solución acuosa del clorhidrato hasta aproximadamente pH 8,5-9,5 y separando la base libre por filtración con respecto a la suspensión acuosa.

30 Estas últimas fracciones, recogidas desde la columna descrita más arriba, al reunir las y concentrarlas hasta sequedad proporcionan



una fracción del Antibiótico W847-C<sub>1</sub> bajo la forma de un polvo blanco. En esta etapa el polvo de Antibiótico W847-C<sub>1</sub>, así obtenido, manifiesta una potencia de aproximadamente 880 µg/mg en el ensayo en taza cilíndrica descrito más arriba.

5 Usando las técnicas bioautógrafas descritas más arriba y cloroformo:metanol (60:40 volumen/volumen) como sistema solvente, el Antibiótico W847-C<sub>1</sub> aislado tiene actividad antibacteriana de espectro amplio in vitro contra los siguientes organismos gram-positivos y gram-negativos: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Sarcina lutea* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8689.

10 Se pueden combinar las fracciones activas restantes de la columna de ácido silícico y lograr resolución adicional mediante cromatografía en columna de Florisil (silicato de magnesio), en la siguiente manera: Se prepara la columna activando el Florisil a 100°C durante 16 h: fijando el hexano y virtiendo el lodo resultante en una columna de vidrio. Se carga la columna con Complejo Antibiótico W847 residual (después de separar las Fracciones C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>) disuelto en cloruro de metileno y se revela progresivamente con un volumen de retención (es decir el volumen de solvente que es retenido por el absorbente) de hexano, un 15 volumen de retención de éter etílico, un volumen de retención de acetato de etilo y luego con cantidades crecientes de acetona en acetato de etilo. Se vigila la separación mediante ensayo sobre disco de las fracciones contra *S. aureus* y *E. coli* seguido por cromatografía en capa delgada de acuerdo con lo descrito más arriba.

25 Empleando esta técnica se puede llevar a cabo la separación de las Fracción A y Fracción B. Se aísla ambas como polvos blancuzcos mediante concentración hasta sequedad de las fracciones cromatográficas reunidas. Las fracciones A y B responden a 145 µg/mg y 71 µg/mg respectivamente en el ensayo *S. lutea*.

30 De la siguiente manera se puede también aislar del concentra-



do de acetato de etilo preparado en la manera descrita antes, una mezcla de fracciones del Antibiótico W847-C. Se disuelve el residuo en acetona y se le vierte en agua fría con agitación vigorosa. Se permite que la suspensión se caliente hasta la temperatura ambiente y se la filtra. El precipitado comprende una mezcla de Antibiótico W847-C<sub>1</sub> y Antibiótico C<sub>2</sub>, y en lo que sigue se la denominará complejo antibiótico W847-C, y en este caso afecta la forma de la base libre. Se puede preparar convenientemente una sal de adición de ácido del complejo mediante la titulación, de una solución de la base en metanol, mediante el ácido apropiado y precipitando la sal por adición de éter etílico. Cuando se utiliza el precedente procedimiento para obtener el Complejo Antibiótico W847-C, se puede extraer del filtrado acuoso los Antibióticos W847-A y W847-B, y subsiguientemente concentrar el extracto hasta un residuo y cromatografiarlo sobre silicato de magnesio de acuerdo con lo descrito más arriba.

4) Caracterización químicas de las Fracciones A, B, C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> del Antibiótico W847

Los antibióticos de esta invención son bases nitrogenadas; por consiguiente cada fracción es capaz de formar sales de adición de ácido en una manera similar a la descrita para el Complejo Antibiótico W847-C. De estas sales son típicas las formadas con ácidos tales como clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, esteárico, propiónico, tartárico, maleico y similares. Como era de anticipar, estas sales manifiestan también actividad antibiótica similar a la del antibiótico libre, aunque por lo general difieren por sus características de potencia y solubilidad.

Los antibióticos de esta invención son también compuestos hidroxilados; por consiguiente son capaces de ser esterificados, de preferencia con un ácido carboxílico hidrocarbonado. Ejemplos de los mismos son ésteres tales como los acetatos, propionatos, ciclopropil-car-



boxilatos, succinatos, benzoatos y similares. Estos ésteres manifiestan por lo general actividad antibiótica similar a la del antibiótico libre, aunque por lo general se diferencian por sus características de potencia y solubilidad.

5                    En la Tabla 5 se indican las propiedades químicas y físicas de las Fracciones A, B, C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> del Antibiótico W847.

T A B L A 5

PROPIEDADES QUÍMICAS Y FÍSICAS DE LAS FRACCIONES DE ANTIBIÓTICO N847.

	Fracción A		Fracción B		Fracción C1		Fracción C2	
	Hallado	Calculado	Hallado	Calculado	Hallado	Calculado	Hallado	Calculado
Rotación óptica	- 90°		-92° ±		-104°		-102°	
$[\alpha]_D^{25}$ (1% en etanol)								
Punto de fusión	255-259°C (desc.)		125-135°C (desc.) *		243-246°C (desc.)		146-150°C (desc.)	
pKa	9,1		8,8		8,8		8,6	
Equivalente de neutralización	442		490		488		492	
Análisis elemental								
Carbono	60,23	60,25	58,90	60,11	50,23	59,58	58,93	60,35
Hidrógeno	9,28	9,19	8,94	8,99	8,93	8,81	8,73	8,89
Nitrógeno	3,30	3,19	2,88	3,05	2,94	2,92	2,88	2,87
Oxígeno (por diferenc.)	27,19	27,36	29,8	27,85	27,90	28,30	29,46	27,89
Fórmula empírica	$C_{44}H_{80}N_2O_{15}$		$C_{46}H_{82}N_2O_{16}$		$C_{48}H_{84}N_2O_{17}$		$C_{49}H_{86}N_2O_{17}$	
Peso molecular	877,10		919,14		961,17		975,20	

\* Monohidrato





En las figuras 1, 2, 3 y 4 respectivamente de los dibujos, se ilustran los espectros infrarrojos de las Fracciones A, B, C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> del Antibiótico W847. Se indican las longitudes de onda ( $\lambda$ ) en  $\mu$ , y las frecuencias ( $\nu$ ) en  $\text{cm}^{-1}$ . T representa la transmitancia, y A la absorbencia. Se obtienen los espectros de las respectivas fracciones del Antibiótico en aceite mineral (Nujol) y en la Tabla 6 se indican las crestas más significativas de absorción con las siguientes designaciones: MF= muy fuerte, F = fuerte, M-F = moderado a fuerte, M = moderado, D = débil, amp = amplio, agu = agudo, esc = escalón y bl = banda lateral. Las crestas que deben atribuirse al medio Nujol, más bien que a la respectiva fracción del W847, están indicadas "N" (por Nujol).

Las Fracciones A, B, C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> del Antibiótico W847 tienen espectros característicos de resonancia magnética nuclear (RMN) que se muestran en los dibujos como figuras 5, 6, 7 y 8, respectivamente. Se observan los espectros de RMN en un espectrómetro Varian A-60-A con una solución (aproximadamente 0,4 ml, concentración aproximadamente 20 mg/ml) de la muestra de cada fracción en cloroformo deuterado. Se registran los espectros en partes por millón (ppm) en tetrametilsilano, que es el patrón interno.

T A B L A 6

ESPECTROS INFRARROJOS DE LAS FRACCIONES DEL ANTIBIOTICO W 847

Fracción A		Fracción B		Fracción C <sub>1</sub>		Fracción C <sub>2</sub>	
Longitud de onda (μ)	Intensidad de cresta	Longitud de onda (μ)	Intensidad de cresta	Longitud de onda (μ)	Intensidad de cresta	Longitud de onda (μ)	Intensidad de cresta
2,82-2,90	M-F, amp.	2,87	M	2,82	b l	2,83	D-M
3,35-3,50	N	2,97	esc.	2,87	D	3,33-3,48	N
5,77	F	3,35-3,50	N	3,35-3,50	N	5,70	F
5,82	Artefacto	5,72	F	5,72	F	5,80	artefacto
5,88	instrumento	5,83	F	5,87	D-M	5,88	instrumento
5,82	M-F	6,82	N	6,82	N	6,80	esc.
7,24	N	7,25	N	7,25	N	7,23	N
7,36	N	8,05	F	7,45	M	8,00	N
7,82	bl	8,45	F, amp.	7,57	M	8,53	F, amp.
8,45	M-F agu	8,59	F	7,82	M	8,93	F
8,92	M-F amp	8,94	F	8,03	M	9,08	esc.
8,92	MF	9,30	F	8,13	F	9,27	M-F
9,02	MF	9,62	F	8,60	F	9,65	F
9,12	MF	9,91	M-F	8,94	M-F	10,00	M-F amp.
9,32	M-F	10,02	M-F	9,05	F	10,38	M
9,53	MF	10,29	M	9,56	F	10,97	M
9,63	MF	10,84	D-M	9,70	F	11,15	M
9,98	MF	11,08	D-M	10,13	M-F	11,52	D
10,27	F	11,20	D-M	10,48	M	11,92	D-M
11,02	M-F			11,02	D-M		
11,17	M-F			11,18	D-M		





Las estabilidades de las fracciones A, B, C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> del Antibiótico W847 son las siguientes: A pH 2,0 a 6,0 y a una temperatura de 100°C, las Fracciones A y B demuestran una pérdida significativa de actividad en 30 min; sin embargo son estables al someterlas a las mismas condiciones pero a pH 7,0 a 10,0. La Fracción C<sub>1</sub> es por el contrario estable a pH 2,0 a 8,0 durante 30 min a 100°C, pero es inestable bajo las mismas condiciones a pH 10,0. La Fracción C<sub>2</sub> es inestable bajo condiciones tanto ácidas (pH 2,0) como alcalinas (pH 10,0) a 100°C, pero es estable a PH 4,0 a 8,0 durante 30 min a 100°C.

10 5) Propiedades biológicas del Complejo Antibiótico W847, Fracciones A, B, C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>, y Complejo Antibiótico W847-C

A) Ensayos in vitro

El Complejo Antibiótico W847, Fracciones A, B, C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> y Complejo Antibiótico W847-C, poseen todos una actividad antibacteriana de espectro amplio in vitro, contra una variedad de organismos gram-positivos y gram-negativos. Ya sea como complejo o como fracciones individuales, se los puede usar por lo tanto para limpiar y esterilizar elementos de vidrio de laboratorio, para limpiar y esterilizar instrumentos quirúrgicos y similares. Además se pueden emplear estos antibióticos en combinación con jabones y detergentes para limpiar y sanear áreas utilizadas para la preparación de alimentos tales como cocinas, salones comedores y similares.

En la Tabla 7 se indica el espectro antibacteriano in vitro del Complejo Antibiótico W847, Fracciones A, B, C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> y Complejo Antibiótico W847-C contra organismos gram-positivos y gram-negativos típicos. Se determina la susceptibilidad de los organismos de ensayo a los antibióticos mediante un ensayo de dilución en tubo, en caldo de levadura-carne de vaca, ajustado a pH 8,0 mediante hidróxido de sodio. Se identifican las cepas de microorganismos ensayados mediante sus números de colección; aquí y en otras tablas subsiguientes, los números



precedidos por las letras "DA" se refieren a la colección de Schering Corporation, Bloomfield (N.J.), U.S.A.

T A B L A 7

ESPECTRO ANTIBACTERIANO DEL COMPLEJO ANTIBIOTICO W 847, FRACCIONES A, B, C<sub>1</sub> Y C<sub>2</sub>, Y COMPLEJO C

Micro-organismo	Concentración inhibitoria mínima (µg/ml) del Antibiótico W847					
	Base del complejo	A	B	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	Complejo C
Bacillus megatherium DA 7064	0,3	0,6	1,2	0,3	0,6	0,3
Bacillus subtilis ATCC 6633	0,03	0,005	0,05	0,03	0,005	0,005
Diplococcus pneumoniae DA 700	-	1,2	1,2	-	0,6	-
Diplococcus pneumoniae ATCC 10015	-	0,5	0,5	-	0,05	-
Diplococcus pneumoniae BA 150	6,0	>2,7	>2,7	12,0	>2,7	>2,7
Enterococcus sp. DA 800	0,3	0,6	0,6	0,3	0,08	0,3
Enterococcus sp. DA 801	0,3	0,6	0,6	0,3	0,6	0,3
Enterococcus sp. DA 802	0,3	0,6	0,6	0,3	0,6	0,3
Sarcina lutea ATCC 9341	0,0075	0,2	0,2	0,3	0,03	0,3
Staphylococcus aureus ATCC 12715	0,3	0,005	0,005	0,0075	0,0005	0,00075
Staphylococcus aureus ATCC 538P	0,3	0,08	0,2	0,3	0,005	0,01
Staphylococcus aureus ATCC 11631 *	0,3	0,6	0,2	0,3	0,005	0,03
Staphylococcus aureus (Gray)	0,3	0,6	0,6	0,3	0,6	0,3
Staphylococcus aureus DA 2001	0,03	0,6	0,6	0,3	0,6	0,5
Staphylococcus aureus DA 2003	0,03	0,6	0,2	0,03	0,03	0,03
Staphylococcus aureus DA 2010	0,3	0,6	0,6	0,075	0,6	0,3
Staphylococcus aureus DA 2014	0,3	0,6	0,6	0,3	0,2	0,25
Staphylococcus aureus DA 2018	0,3	0,6	0,6	0,03	0,6	0,03
Staphylococcus aureus DA 2032	0,3	0,6	0,6	0,075	0,1	0,1
Staphylococcus aureus DA 2033. <del>xx</del>	> 16	> 0,6	> 0,6	> 0,075	> 0,08	> 0,08
Streptococcus faecalis DA 20	0,3	2,7	2,7	32,0	2,7	2,7
Streptococcus pyogenes DA 21	0,75	0,03	0,1	0,3	0,005	0,075
Streptococcus pyogenes DA 11	0,3	5,0	5,0	0,3	0,6	0,3
Streptococcus pyogenes DA 12	-	0,6	0,2	0,3	0,03	0,3
Kyobacterium smegmatis 10143	-	0,2	0,2	-	0,03	-
Escherichia coli ATCC 10536	0,75	5,0	5,0	0,3	0,05	0,3
Klebsiella pneumoniae ATCC 10031	6,0	6,0	12,0	12,0	12,0	12,0
Proteus vulgaris DA 121	12,0	6,0	24,0	12,0	24,0	24,0
Pseudomonas aeruginosa ATCC 8639	6,0	12,0	24,0	24,0	24,0	24,0
Salmonella schottmulleri DA 10	6,0	6,0	12,0	6,0	6,0	6,0
Salmonella schottmulleri DA 10	6,0	6,0	12,0	12,0	12,0	12,0



\* Una cepa resistente a la penicilina.   
 \*\* Una cepa resistente a la eritromicina.



Se compara la actividad antibacteriana del Complejo Antibiótico W847 con la de la eritromicina, penicilina G y meticilina en la siguiente Tabla 8 (determinándose la susceptibilidad mediante la técnica de ensayo de dilución en tubo descrita más arriba). Se realizan los ensayos utilizando los siguientes medios: Complejo Antibiótico W847 y eritromicina en caldo de levadura-carne de vaca a pH 8,0; penicilina G y meticilina en caldo de levadura-carne de vaca a pH 6,8. Los resultados demuestran que el Complejo Antibiótico W847 se compara favorablemente por su actividad con los otros antibióticos ensayados contra bacterias gram-positivas. Además el Complejo Antibiótico W847 es activo contra *Mycobacterium smegmatis* a una concentración más baja que la eritromicina, mientras que la penicilina G y meticilina son inactivas hasta 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

COMPARACION DEL ESPECTRO ANTIBACTERIANO DEL COMPLEJO ANTIBIOTICO W847 CON ERITROMICINA,  
PENICILINA G Y METICILINA

	Complejo W847	Eritromicina	Penicilina G	Meticilina
<i>Bacillus cereus</i>	0,2	0,05	0,12	4,8
<i>Bacillus subtilis</i>	0,005	0,005	0,01	0,03
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	0,2	0,05	0,12	1,8
<i>Sarcina lutea</i> (3 cepas dife- rentes)	0,0005	0,005	0,06	0,3
<i>Staphylococcus aureus</i> (7 cepas dife- rentes)##	0,005-0,2	0,005-0,05	0,003-0,06	0,12-0,6
<i>Staphylococcus aureus</i> (1 cepa dife- rente ##)	0,03-0,6	0,005-0,5	1,2-9,4	1,2-7,5
<i>Staphylococcus aureus</i> (1 cepa dife- rente ##)	2,7	50,0	-	-
<i>Streptococcus faecalis</i>	0,005	0,0005	0,75	25,0
<i>Streptococcus pyogenes</i> (4 cepas dife- rentes)	0,03-0,2	0,05	0,01-0,02	0,6
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	0,5	5,0	10	10

Complejo antibiótico W847 y eritromicina en caldo de levadura-carne de vaca a pH 8,0;  
penicilina G y meticilina en caldo de levadura-carne de vaca a pH 6,8.

\* Aislados clínicos que incluyen organismos resistentes a la penicilina.

\*\* Aislados clínicos que son resistentes a la eritromicina.





B) Ensayos in vivo

Según se hizo notar más arriba, el Complejo antibiótico W847, Complejo antibiótico W847-C, y las Fracciones A, B, C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> manifiestan una gama amplia de actividad antimicrobiana contra micro-organismos gram-positivos y gram-negativos. En el grupo gram-positivo están incluidos micro-organismos patógenos que incluyen especies de los géneros Streptococcus, Staphylococcus y Diplococcus que se sabe que causan muchas manifestaciones de enfermedad. Varias especies de Staphylococcus y Streptococcus son los organismos responsables de causar mastitis bovina. Se controla y se trata fácilmente estas especies mediante los antibióticos aquí descritos después de un régimen relativamente breve de administración.

El Complejo Antibiótico W847, las Fracciones A, B, C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>, y el Complejo W847-C, son también activos contra organismos gram-negativos que incluyen especies de los géneros Escherichia, Salmonella, Proteus y Pseudomonas. Estos organismos son responsables de muchos síndromes de enfermedades serias que incluyen infecciones del tracto urinario y diarreas. Estos síndromes son bastante comunes en animales domésticos tales como ganado vacuno, caballos, ovejas, cerdos, perros y gatos, y se los puede controlar y tratar eficazmente mediante los antibióticos aquí descritos.

El Complejo Antibiótico W847, suspendido en aceite de maní, proporciona una DL<sub>50</sub> (dosis letal para 50% de la población ensayada) de 270 mg/kg en el ratón mediante la vía intraperitoneal. Para administración subcutánea y oral, la DL<sub>50</sub> es mayor de 5.000 mg/kg. La DP<sub>50</sub> (dosis protectora para 50% de la población ensayada) es 150 mg/kg por vía subcutánea (suspensión en aceite de maní) contra una infección letal de S. aureus en el ratón. Contra Streptococcus pyogenes por la misma vía, la DP<sub>50</sub> en el ratón es 100 mg/kg.

Además de lo precedente, el Complejo antibiótico W847, admi-



nistrado a razón de 17,5 mg/kg a perros, es detectable en el suero sanguíneo durante 7 días. Esto resulta sorprendente en vista del hecho de que, cuando se administra una dosis comparable de eritromicina, no persiste a través de un intervalo de 24 h.

5 En la siguiente tabla 10 se tabula los datos de toxicidad aguda para fracciones y complejos del Antibiótico W847.

Las Tablas 11, 12 y 13 permiten ilustrar la protección a los animales proporcionada por los antibióticos de la presente invención.

T A B L A 10

TOXICIDAD DE LAS FRACCIONES Y COMPLEJOS DEL ANTIBIOTICO W847 EN EL RATON (DL<sub>50</sub> en mg/kg)

Vía	Base del Complejo W847 en aceite de maní	HCL del Complejo W847 en H <sub>2</sub> O	Base de Fracción del 847 (x)	Base de Fracción del 847 en aceite de maní	Complejo W-847-C
Oral	> 1160	> 2500	7500	-	> 500
Subcutánea	> 1160	2500	7000	> 500	> 500
Intraperitoneal	75	300	350	-	400

Vía	Base del W847-C <sub>1</sub> *	HCL del W847-C <sub>2</sub> en H <sub>2</sub> O
Oral	> 1000	> 500
Subcutánea	> 1000	> 500
Intraperitoneal	500	> 500

\* En carboximetil-celulosa acuosa al 0,5%.



T A B L A 11

ACTIVIDAD DEL COMPLEJO ANTIBIOTICO W847 CONTRA INFECCIONES INTRAPERITONEALES LETALES EN EL RATON (DF50 en us/kg)

	Complejo Antibiótico W847 en aceite de maní	HCl del Complejo Antibiótico W847 en H <sub>2</sub> O	HCl de la fracción C2 del Antibiótico W847 en H <sub>2</sub> O
<u>Tratamiento Subcutáneo</u>			
Staphylococcus aureus Gray	35	4,3	5
Staphylococcus aureus DA 2030	-	4,3	-
Staphylococcus aureus DA 2000	-	3,5	-
Staphylococcus aureus Smith	-	2,3	-
Streptococcus pyogenes C DA 21	23	4,6	4,5
Streptococcus pyogenes DA 32	-	1,5 *	-
Streptococcus pyogenes DA 31	-	1,5 *	-
Streptococcus pyogenes DA 12	-	1,5 *	-
Streptococcus pyogenes DA 9	-	1,5 *	-
Diplococcus pneumoniae DA 150	35	23,2	150
Diplococcus pneumoniae DA 150 (2 días tratamiento)	23/dfa	11,6/dfa	30/dfa
Diplococcus pneumoniae DA 151	-	11,6	-
Diplococcus pneumoniae ATCC 10015	-	1,5 *	-
<u>Tratamiento Oral</u>			
Staphylococcus aureus Gray	> 116	> 116	50
Streptococcus pyogenes DA 21	-	> 116	-
Diplococcus pneumoniae DA 150	-	116	-

\* PD<sub>100</sub>





**T A B L A 12**  
**ACTIVIDAD DE LAS FRACCIONES DEL ANTIBIOTICO W847 CONTRA INFECCIONES PERITONEALES EN EL**  
**RATON - (DP50 en mg/kg.)**

	Via de Tratamiento	Base de W847-A (1)	Base de W847-C <sub>1</sub> (1)
Streptococcus pyogenes C 203	Oral	300	207
Streptococcus pyogenes C 203	S.C.	220	118
Streptococcus pyogenes C	Oral	300	300
Streptococcus pyogenes C	S.C.	134	180
Streptococcus pyogenes No. 22	Oral	180	>250
Streptococcus pyogenes No. 22	S.C.	180	200
Streptococcus pyogenes No. 9	Oral	250	>250
Streptococcus pyogenes No. 9	S.C.	167	250
Staphylococcus aureus Smith	Oral	250	180
Staphylococcus aureus Smith	S.C.	75	117
Staphylococcus aureus Gray	Oral	300	>250
Staphylococcus aureus Gray	S.C.	20	62
Staphylococcus aureus W	Oral	117	150
Staphylococcus aureus W	S.C.	20	25
Staphylococcus aureus No. 41	Oral	150	170
Staphylococcus aureus No. 41	S.C.	20	25
Diplococcus pneumoniae eye	Oral	300	300
Diplococcus pneumoniae eye	S.C.	90	167
Diplococcus pneumoniae No. 2	Oral	250	200
Diplococcus pneumoniae No. 2	S.C.	70	170
Enterococcus No. 802	Oral	300	> 250
Enterococcus No. 802	S.C.	160	180
Enterococcus No. 804	Oral	250	250
Enterococcus No. 804	S.C.	180	250
Escherichia coli	Oral	200	250
Escherichia coli	S.C.	100	250
Klebsiella pneumoniae	Oral	250	> 250
Klebsiella pneumoniae	S.C.	150	> 250
Pseudomonas aeruginosa	Oral	> 250	> 250
Pseudomonas aeruginosa	S.C.	161	> 250

1) En carboximetil-celulosa (1) S.C. = subcutánea.

T A B L A 13

ACTIVIDAD DE LAS FRACCIONES DEL ANTIBIOTICO W847 Y COMBINACIONES DE LAS MISMAS CONTRA INFECCIONES INTRAPERITONEALES EN EL RATON (D.P. 50 en mg/kg.)

Organismo	Base de W847-B en aceite de mani	Base de W847-C1 *	HCl de W847-C2 en H2O	Base del complejo W847-C *	HCl del complejo W847-C en H2O
<u>Administración subcutánea de Antibióticos</u>					
Staphylococcus aureus Gray	150	200	45	50	50
Streptococcus pyogenes C	-	150	10	50	50
Staphylococcus aureus Smith	-	-	-	86	-
Streptococcus pyogenes No. 5	-	-	-	39	-
<u>Administración oral de Antibióticos</u>					
Organismo					
Staphylococcus aureus Gray	-	> 250	100	390	> 250
Streptococcus pyogenes C	-	> 250	100	310	> 250
Staphylococcus aureus Smith	-	-	-	310	-
Streptococcus pyogenes No. 5	-	-	-	390	-

\* Suspensión ultrasonificada en carboximetil-celulosa acuosa al 0,5%.





La Fracción A del Antibiótico W847, suspendida en carboximetilcelulosa acuosa al 0,5% y dispersada por ultrasonificación, es activa por administración subcutánea en el ratón contra *S. aureus* Gray con una DP<sub>50</sub> (dosis protectora para 50% de la población ensayada) de 20 mg/kg y contra *P. aeruginosa* con una DP<sub>50</sub> de 161 mg/kg. La DL<sub>50</sub> en el ratón por vía subcutánea es 7.000 mg/kg.

La Fracción B del Antibiótico W847 suspendida en aceite de mani es activa por administración subcutánea en el ratón contra *S. aureus* con una DP<sub>50</sub> de 150 mg/kg y contra *P. aeruginosa* 350 mg/kg retardan la muerte en 24 h. La DL<sub>50</sub> en el ratón por vía subcutánea es mayor de 500 mg/kg.

La Fracción C<sub>1</sub> del Antibiótico W847, suspendida en carboximetilcelulosa acuosa al 0,5% y dispersada por ultrasonificación, es activa en el ratón contra *S. aureus*. Cuando se la administra subcutáneamente contra *S. aureus* Gray tiene una DP<sub>50</sub> de 62 mg/kg. Por la misma vía tiene una DP<sub>50</sub> de 180 mg/kg contra *S. pyogenes* C. El antibiótico es un poco menos activo oralmente, teniendo una DP<sub>50</sub> contra *S. aureus* Gray y *S. pyogenes* mayor de 250 mg/kg. La DL<sub>50</sub> en el ratón por vía subcutánea es mayor de 1000 mg/kg. El Antibiótico W847-C<sub>1</sub> manifiesta también actividad antipalúdica contra *Plasmodium berghei* y, cuando se le administra a roedores (100 mg/kg/día) 24 h después de la infección, causa una supresión significativa del recuento de parásitos en la sangre.

La Fracción C<sub>2</sub> del Antibiótico W847, bajo la forma de una suspensión en carboximetil-celulosa acuosa, es activa por administración subcutánea. Sin embargo, se la usa más ventajosamente como solución acuosa de su sal de clorhidrato y, al administrarla subcutáneamente a ratones, tiene una DP<sub>50</sub> de 45 mg/kg contra *S. aureus* Gray y una DP<sub>50</sub> de 10 mg/kg contra *S. pyogenes*. Por la vía oral tiene una DP<sub>50</sub> de 100 mg/kg contra ambos organismos. La DL<sub>50</sub> en el ratón por administración intraperitoneal es mayor de 500 mg/kg.



EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos permiten ilustrar más completamente las técnicas preferidas para la preparación de los antibióticos descritos más arriba.

5                   (1) Fermentación de los micro-organismos

EJEMPLO 1

Fermentación en frasco sacudidor

A) Etapa de germinación

Se agrega 0,5 ml de cultivo liofilizado de Micromonospora sp. W847 a un frasco de Erlenmeyer de 300 ml que contiene 100 ml del siguiente medio que ha sido ajustado a pH 7,5 mediante hidróxido de sodio diluido antes de la esterilización:

	Bacto-extracto de carne de vaca (Difco)	3,0 g
	Bacto-triptosa (Difco)	5,0 g
15	Dextrosa	1,0 g
	Almidón (patata)	24,0 g
	Bacto-extracto de levadura (Difco)	5,0 g
	Carbonato de calcio	2,0 g
	Agua corriente	1000,0 ml

20                   Se incuba el frasco y sus contenidos durante 3 días a 37°C sobre un sacudidor rotativo (280 r.p.m.; carrera 5 cm).

B) Etapa de inoculum

Se transfiere asépticamente 25 ml de inoculum desde la etapa de germinación a un frasco de Erlenmeyer de 2 lt que contiene 500 ml del medio estéril utilizado más arriba para germinación. Se incuba el frasco y sus contenidos durante 3 días a 28°C sobre un sacudidor rotativo (280 r.p.m.; carrera 5 cm).

C) Etapa de fermentación

30                   Se transfiere asépticamente alícuotas de 25 ml desde la etapa de inoculum a frascos de Erlenmeyer de 2 lt que contienen 500 ml del si-



guiente medio estéril que ha sido ajustado a pH 7,8 con hidróxido de sodio acuoso diluido antes de la esterilización:

	Sacarosa	30,0 g
	Nitrato de sodio	3,0 g
5	Fosfato dipotásico	1,0 g
	Sulfato de magnesio	0,5 g
	Sulfato ferroso	0,01 g
	Peptona	8,0 g
	Agua corriente	1000,0 ml

10 Se incuba los frascos y sus contenidos durante 4 días a 28°C sobre un sacudidor rotativo (280 r.p.m.; carrera de 5 cm). Se reúne los contenidos de los Frascos y se ajusta una alícuota del caldo entero a pH 9,5 y se extrae en acetato de etilo (aproximadamente 2 volúmenes por cada volumen de caldo). Se separa la fase solvente y se concentra 100  
15 veces bajo presión reducida. Se ensaya la actividad del concentrado mediante la técnica de difusión sobre disco de agar utilizando *S. aureus* (ATCC 6538P) como organismo de ensayo. El concentrado proporciona una zona de inhibición de aproximadamente 20 a 35 mm.

#### EJEMPLO 2

#### 20 Fermentación en tanque

##### A) Etapa de germinación

Se lleva a cabo la etapa de germinación y la etapa de inoculum en la manera descrita en el Ejemplo 1.

##### B) Etapa de fermentación

25 Se transfiere asépticamente 500 ml de inoculum a un fermentador de 14 lt que contiene 10 lt de medio estéril de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 1 al cual se agregó 6 ml de antiespumante, Dow Corning B (Dow Corning Corporation, Midland, Michigan). Se deja avanzar la fermentación durante 66 h bajo las siguientes condiciones:

30 Temperatura 31°C



Entrada de aire estéril	4 lt/min
Agitación	250 r.p.m.
Antiespumante (Dow Corning B)	según necesidades

Al término de este período, la potencia del antibiótico así producido alcanza una cresta que permanece sustancialmente constante. A través de toda la fermentación el pH de la mezcla de fermentación permanece sustancialmente dentro de la gama de 7,2 a 8,2. El volumen de las células compactadas alcanza un valor constante de 3,5-4,5 ml. La actividad del antibiótico así producido en el caldo entero proporciona un diámetro de la zona de 15 a 25 mm cuando se ensaya sobre disco contra *S. aureus* o *P. aeruginosa*.

EJEMPLO 3

Fermentación en tanque

A) Preparación de inoculum

A cuatro frascos de 2 lt, cada uno de los cuales contiene 500 ml de caldo estéril de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 1A, se agrega 0,5 ml de un cultivo liofilizado de *Micromonospora* sp. W847. Se coloca los frascos sobre un sacudidor rotativo que opera a 280 r.p.m. (carrera 5 cm) y se incuba a 28°C durante 72 h.

B) Etapa de fermentación

A cada uno de cuatro fermentadores se agrega 10 lt del siguiente medio de producción estéril ajustado a pH 7,5 a 7,25 antes de la esterilización:

Tripticasa	170,0 g
Cloruro de sodio	50,0 g
Fosfato dipotásico	25,0 g
Dextrosa	25,0 g
Caldo de Czapek-Dox	350,0 g
Antiespumante G.E.-60	Según necesidades
(General Electric Company)	
(Schenectady, Nueva York)	



Agua corriente, c.s.p. 10,0 lt

Se inocular cada fermentador con 500 ml del cultivo sembrado de 72 h preparado de acuerdo con lo descrito más arriba. Se lleva la temperatura del medio de fermentación a 31°C y se agita a razón de 500 r.p.m. mientras se introduce circulación de aire a través del medio a razón de 0,5 lt de aire por cada litro de caldo por minuto. Se aumenta el régimen de agitación a 600 r.p.m. después de 24 h y a 700 r.p.m. después de 48 h. Se da por terminada la fermentación al término de 69 h. Se reúne los caldos provenientes de los cuatro fermentadores para su extracción (aproximadamente 37 lt).

(2) Extracción del complejo antibiótico W847

EJEMPLO 4

Extracción del complejo antibiótico W847 a partir de fermentación del laboratorio (Técnica cromatográfica)

Se ajusta 60 lt del caldo entero, preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2, a pH 9,5 mediante hidróxido de sodio acuoso diluido. Se extrae en 2 volúmenes de acetato de etilo por cada volumen de caldo. Se separa la fase solvente y se concentra bajo presión reducida para obtener un residuo aceitoso (aproximadamente 30,0 g). La actividad biológica (dilución 1/20) de este residuo aceitoso proporciona una zona de inhibición que tiene un diámetro de aproximadamente 20 a 30 mm contra *S. aureus* y aproximadamente 15 a 25 mm contra *P. aeruginosa*. Se purifica el residuo aceitoso mediante cromatografía en columna de acuerdo con la siguiente técnica.

Se prepara una columna usando 1000 g de LH20 Sephadex (Pharmacia Fine Chemical, Inc.) suspendido en etanol acuoso al 95%. Se transfiere el residuo aceitoso a la columna y se eluye con etanol al 95% a un régimen de circulación de 200 ml/h. Se recoge fracciones de 50 ml. Se combina las fracciones de acuerdo con su actividad antibacteriana (que se determina mediante ensayo sobre disco de agar contra *S. aureus*

ATCC 6538P). Se concentra hasta sequedad las fracciones que tienen actividad máxima. Se disuelve el residuo sólido en una pequeña cantidad de acetona y se vierte en un volumen en exceso de éter de petróleo (punto de ebullición 30-60°C). Se transfiere la mezcla a un baño de hielo seco/  
5 acetona (aproximadamente -50°C) y se deja reposar durante 20 min. Se deja que la mezcla vuelva a la temperatura ambiente y se separa el licor madre con respecto al residuo aceitoso por decantación. Se concentra el licor madre hasta sequedad para obtener Complejo Antibiótico W847 purificado.

10 El Complejo Antibiótico W847 así producido tiene una potencia de aproximadamente 225 a 275 µg/mg cuando se le ensaya de acuerdo con la técnica en taza cilíndrica descrita más arriba.

#### EJEMPLO 5

15 Extracción del Complejo Antibiótico W847 a partir de fermentación en tanque (técnica de extracción en solvente)

Se ajusta el caldo reunido (aproximadamente 37 lt), obtenido en la manera descrita en el Ejemplo 3, hasta pH 9,5 mediante hidróxido de sodio acuoso al 50%. Se extrae en dos volúmenes de acetato de etilo y se evapora el extracto hasta un volumen de 2150 ml. Se aísla el Complejo Antibiótico W847 mediante una de las siguientes técnicas.  
20

#### A) Extracción en ácido clorhídrico

Se extrae dos veces una alícuota de 500 ml del concentrado en acetato de etilo mediante porciones de 250 ml de ácido clorhídrico al 0,5% (0,14N). Se hace levemente alcalinos los extractos ácidos combinados mediante la adición de hidróxido de sodio acuoso al 5% (aproximadamente pH 8,5 a 9,0) y se extrae dos veces mediante porciones de 250 ml de acetato de etilo. Se combina los extractos de acetato de etilo y se los concentra bajo presión reducida hasta sequedad. El complejo así reducido tiene una potencia de aproximadamente 525 µg/mg cuando se le  
25  
30 ensaya mediante la técnica en taza cilíndrica descrita más arriba.



B) Extracción en ácido sulfúrico

Se utiliza la extracción descrita en el Ejemplo 5A, pero sustituyendo el ácido clorhídrico por ácido sulfúrico 0,1 n. El complejo así producido tiene una potencia de aproximadamente 550  $\mu\text{g}/\text{mg}$  en el ensayo en taza cilíndrica.

(3) Resolución del Complejo Antibiótico W847 y preparación de derivados

EJEMPLO 6

Aislación de la Fracción C<sub>2</sub> del Antibiótico W847

Se prepara una columna (longitud 105 cm, diámetro 7,6 cm) usando 2000 g de ácido silícico (reactivo analítico, Mallinckrodt) compactando pequeños segmentos en un lecho compacto. Se disuelve 13,0 g del Complejo Antibiótico W847, preparado de acuerdo con el Ejemplo 4, en acetona mezclada con ácido silícico y se evapora la acetona bajo presión reducida. Se agrega la mezcla seca a la parte superior de la columna. Se eluye la columna con una mezcla de cloroformo (60 partes en volumen y metanol (40 partes en volumen) a un régimen de circulación de 100 ml/h. Se recoje fracciones de 200 ml. Se vigila la columna mediante ensayo sobre disco de cada fracción contra S. aureus y E. coli. Se cromatografía las fracciones activas sobre placas de ácido silícico en capa delgada operando durante 1,5 h en el mismo sistema solvente utilizado para la columna. Se combina las fracciones de acuerdo con sus diagramas cromatográficos según se determina mediante los dos métodos descritos más arriba (ver Caracterización del Complejo Antibiótico W847). Se concentra las fracciones bajo presión reducida. Combinando las fracciones de acuerdo con lo indicado en la siguiente Tabla 14, se aísla el clorhidrato de la Fracción C<sub>2</sub> del Antibiótico W847 bajo la forma de un polvo blanco disolviendo los residuos combinados en un volumen de metanol y precipitando con 10 volúmenes de éter etílico. En esta etapa, este material tiene una potencia de aproximadamente 1000  $\mu\text{g}/\text{mg}$  en el



ensayo con taza cilíndrica descrito más arriba.

Aislación del material de Fracción C<sub>1</sub> del Antibiótico W847

Combinando fracciones posteriores de acuerdo con lo indicado en la siguiente Tabla 14, se obtiene un aislado de la Fracción C<sub>1</sub> del Antibiótico W847 bajo la forma de un polvo blanco por concentración hasta sequedad de las fracciones seleccionadas de la columna. En esta etapa, este material manifiesta una potencia de aproximadamente 9000 µg/mg en el ensayo en tazas cilíndrica descrito más arriba. Se eluye el material activo restante de la columna, se le reúne y se le concentra hasta un residuo.

EJEMPLO 7

Aislación de las Fracción A y Fracción B del Antibiótico W847

Se activa 500 g de Florisil a 100°C durante 16 h. Se fija en hexano y se forma una lechada en una columna de vidrio (longitud 105 cm; diámetro 3,8 cm; volumen de retención 700 ml). Se carga la columna con 2,8 g de residuo del Ejemplo 6 y se disuelve 10 ml de cloruro de metileno. Se eluye progresivamente la columna con 700 ml de hexano, 700 ml de éter, 700 ml de acetato de etilo y cantidades crecientes de acetona en acetato de etilo (régimen de circulación 200 ml/h). Se recoge fracciones de 100 ml. Se vigila la columna en la manera descrita más arriba mediante ensayo de fracciones contra S. aureus y E. coli seguido por cromatografía en capa delgada. Se combina las fracciones de acuerdo con lo indicado en la siguiente Tabla 14.

TABLA 14

Resultados de las separaciones en columna

Fracción	Fracción de columna	Peso	R <sub>f</sub> del diagrama en capa delgada cloroformo-metanol (60/40)	Potencia (µg/mg)
----------	---------------------	------	--	------------------

Columna de ácido silícico



W847C <sub>2</sub> .HCl	28-48	1,2 g	0,65	900-100
W847C <sub>1</sub>	56-58	625 mg	0,52	850-100
<u>Columna de Florisil</u>				
W847B	164-227	540 mg	0,38	125-175
	(30% acetona en acetato de etilo)			
W847A	370-397	283 mg	0,19	50-100
	(80% acetona en acetato de etilo)			

10

EJEMPLO 8

Sal de clorhidrato del Complejo Antibiótico W847

Se suspende aproximadamente 140 mg de Complejo Antibiótico W847, aislado de acuerdo con lo descrito más arriba en el Ejemplo 5, en aproximadamente 50 ml de agua. Se ajusta el pH de la suspensión aproximadamente a 6,5 a 7,0 mediante la adición de ácido clorhídrico diluido (n/1) y se agita vigorosamente. Mediante filtración se separa los insolubles si los hubiera y se liofiliza el filtrado para obtener un clorhidrato del Antibiótico W847 que pesa aproximadamente 90 mg y que por análisis da aproximadamente 550  $\mu\text{g}/\text{mg}$ .

20

Mediante el uso de sustancialmente el procedimiento de este Ejemplo con ya sea el Complejo antibiótico W847 o sus diversas fracciones, y usando cantidades equivalentes de otros ácidos como por ejemplo ácido sulfúrico o fosfórico, se puede preparar también las respectivas sales. Se considera que todas las sales pertenecen al Complejo Antibiótico W847 y que son el pleno equivalente de los antibióticos libres aquí descritos, y que quedan comprendidas dentro del alcance de la invención.

25

La siguiente Tabla 15 indica la actividad de las sales de clorhidrato, sulfato y fosfato producidas a partir del Complejo Antibiótico W847, con una potencia de 232  $\mu\text{g}/\text{mg}$  del Complejo antibiótico W847 contra una variedad de organismos gram-positivos y gram-negativos, en un medio

30

de caldo de levadura-carne de vaca a pH 8,0.



T A B L A 15

ESPECTRO ANTIBACTERIANO DE SALES DE ADICION DE ACIDO SOLUBLES EN AGUA DEL COMPLEJO ANTIBIOTICO W847.

Micro-organismo	Mínima Concentración Inhibidora (µg/ml)	
	Sal de clorhidrato	Sal de Sulfato
Bacillus subtilis ATCC 6633	0,01	0,01
Staphylococcus Aureus ATCC 6538P	0,1	0,1
Staphylococcus Aureus ATCC 11163	0,1	0,1
Sarcina lutea ATCC 9341	0,001	0,001
Streptococcus faecalis ATCC 10541	0,1	0,1
Escherichia coli ATCC 10536	2,8	2,8
Klebsiella Pneumoniae ATCC 10031	1,4	1,4
Proteus vulgaris DA 121	5,6	11,1
Pseudomonas aeruginosa ATCC 8689	1,4	1,4
Salmonella schottmuelleri DA 10	1,4	2,8





### EJEMPLO 9

#### Aislación del Complejo Antibiótico W 849

Se disuelve 542 g de Completo W847 (ver Ejemplo 5) en 5,4 lt. de acetona y se trata la solución resultante con 81 g. de carbón decolorante durante aproximadamente 30 min. aproximadamente a la temperatura ambiente. Se separa por filtración el carbón decolorante y se concentra el filtrado bajo presión reducida hasta aproximadamente 2,0 lt. Se prepara una lechada de aproximadamente 80 lt. de hielo y agua y, con agitación vigorosa, se agrega la solución acetónica. Se deja que la temperatura de la suspensión resultante alcance aproximadamente 25° C con agitación; y se recoge el producto por filtración. Se lava los sólidos con una pequeña cantidad de agua y se los seca aproximadamente a 50°C bajo presión reducida, de manera de obtener aproximadamente 212 g de Complejo Antibiótico W847-C que por análisis, da aproximadamente 1075  $\mu\text{g}/\text{mg}$ .

Se puede obtener producto adicional (aproximadamente 85 g) por concentración del licor madre; sin embargo, este producto puede estar contaminado con Fracciones A y B.

Se puede usar ventajosamente el Complejo Antibiótico W847-C, preparado en la manera descrita más arriba, en la preparación de sales de adición de ácido según se ilustra mas adelante.

### EJEMPLO 10

#### Preparación de una sal de tartrato de un Complejo Antibiótico.W847

A una composición sólida que comprende 2,0 g de un completo de Antibiótico W847-C<sub>1</sub> y Antibiótico W847-C<sub>2</sub>, obtenidos de acuerdo con el precedente Ejemplo 9, se agrega 30 ml de éter dietílico con agitación. A la solución resultante se agrega 0, g de ácido tartárico disuelto en 2,5 ml de etanol. Se agita la mezcla durante aproximadamente 15 min. y se filtra entonces la sal precipitada. Se lava el precipitado con éter dietílico y se seca el producto de manera de obtener aproximadamente 2,0



g de sal de tartrato cuyo bioanálisis da aproximadamente 575  $\mu\text{g}/\text{mg}$  y cuya rotación es  $-57^\circ$  medida en una solución en etanol al 1%.

#### EJEMPLO 11

##### ; Ester de propionato del Complejo Antibiótico W847-C

5 Se disuelve 1,0 g de Complejo Antibiótico W847-C en 5,0 ml de acetona anhidra y se agrega 0,35 ml de anhídrido propiónico. Se agita la mezcla a la temperatura ambiente durante 4 horas y luego se agrega lentamente y con agitación 8 ml de amoníaco acuoso al 1,2%. Se filtra el precipitado resultante y se le lava con acetona acuosa al 40%,  
10 y luego con agua para obtener el producto deseado. El producto obtenido en esta manera tiene las siguientes constantes: punto de fusión =  $207-210^\circ\text{C}$ ;  $[\alpha]_D^{25} = -63^\circ$  (C = 1% en etanol).

#### EJEMPLO 12

##### Ester de diacetato del Complejo Antibiótico W.847-C

15 Se disuelve 11,0 g del Complejo W847-C en 50 ml de piridina y se agrega 5,5 ml de anhídrido acético. Se agita la mezcla de reacción a la temperatura ambiente durante aproximadamente 18 horas, y se la vierte entonces en 2,0 lt. de agua enfriada con hielo que contiene 50 ml de amoníaco acuoso al 14% con agitación vigorosa. Se filtra el precipitado resultante, se le lava con agua y se le seca para obtener el  
20 producto deseado que tiene un punto de fusión de  $237-241^\circ\text{C}$  y que tiene una rotación de aproximadamente  $-86^\circ$  (C = 1% en etanol).

Se puede extraer también acetato de etilo el producto precipitado, lavar el extracto con agua y evaporarlo bajo presión reducida hasta un residuo. Subsiguientemente se disuelve el residuo en acetona,  
25 se le trata con carbón decolorante y se le precipita mediante la adición de un volumen igual de agua de manera de obtener el producto del título.

Teniendo en cuenta los Ejemplos precedentes, resulta evidente  
30 para los entendidos en esta materia que los antibióticos de la presente



invención forman otros ésteres. De acuerdo con la presente invención, se considera que todos los ésteres pertenecen al Complejo Antibiótico W847 y que son el pleno equivalente de aquellos cuya preparación se describe aquí, y que estos ésteres quedan comprendidos dentro del alcance de la presente invención.

5

(4) Formas de dosis farmacéutica

Los siguientes Ejemplos están dirigidos a ciertas de las formas de dosis farmacéutica en que se puede usar los antibióticos. Las formulaciones, excluyendo los tópicos, están destinadas a permitir la administración de aproximadamente 5 a 50 mg de antibiótico por kilogramo de peso del cuerpo por día. Naturalmente se contempla administrar los medicamentos en dosis divididas, 2 a 8 veces en un período de 24 hr.

10

Las formulaciones para tópicos se aplican por lo general al área infectada 2 a 4 veces por día.

15

En el uso de las formulaciones que se describen más adelante, la dosis de antibiótico que se administra y la frecuencia de la administración dependen en gran parte de la etapa y de la severidad de la infección, del tipo de infección y de las características individuales de las especies animales sometidas a tratamiento.

20

EJEMPLO 13

Cápsula:

Complejo antibiótico W847	250,00 mg.
Lactosa	248,75 mg.
Estearato de magnesio	<u>1,25 mg.</u>
	500,00 mg.

25

Procedimiento:

- 1) Mezclar el complejo antibiótico W847 y la lactosa.
- 2) Agregar el estearato de magnesio y mezclar.
- 3) Llenar cápsulas.

30

EJEMPLO 14



Suspensión oral:

	Antibiótico W847-A	25,0 g.
	Silicato de magnesio aluminio	9,5 g.
	Carboximetil celulosa sódica, USP	2,5 g.
5	Citrato de sodio, USP	25,0 g.
	Aroma	c. s.
	Color	c.s.
	Metilparabeno, USP.	0,9 g.
	Propilparabeno, USP	0,2 g.
10	Polisorbato 80, USP	1,0 g
	Solución de sorbitol, USP	500,0 g
	Agua, c.s.p.	1000,0 ml

Procedimiento:

- 1) Se calienta 200 ml. de agua a ebullición y en ella se disuelve la  
15 mitad de los parabenos. Se enfría hasta aproximadamente 70°C y se mezcla entonces en el Polisorbato 80. Se salpica en el silicato, se agita hasta que resulta una suspensión suave y uniforme, que es la premezcla 1.
- 2) Se calienta otros 200 ml de agua a ebullición, y en ella se disuel-  
20 ve el resto de los parabenos. En esto se dispersa la carboximetilcelulosa hasta que se obtiene como resultado un gel suave. Se mezcla en la solución de sorbitol. Se disuelve entonces el citrato de sodio para obtener la premezcla 2.
- 3) Con agitación constante se agrega lentamente la premezcla 2 a la  
25 premezcla 1. Se enfría la mezcla resultante a 25° C. Se agrega el Antibiótico W847-A, sabor y color, y se mezcla íntimamente. Se agrega suficiente cantidad de agua para llevar a 1000 ml. el volumen total.

EJEMPLO 15

30 Crema para tópico



	Antibiótico W847-B	10 g
	Acido esteárico	200 g
	Monoestearato de arobitán	104 g
	Mono-oleato de sorbitán	20 g
5	Monolaurato de poliexietilen sorbitán	56 g
	Agua, c. s. p.	1000 g

Procedimiento

- 1) Se calienta el ácido esteárico, monoestearato de sorbitán, mono-oleato de sorbitán, y monolaurato de poliexietilo sorbitán hasta 65°C de manera de obtener una premezcla 1.
- 2) Se calienta aproximadamente 90% del agua necesaria hasta 70°C, se le agrega entonces a la premezcla 1, y se mezcla para formar la base de crema.
- 3) Se forma una lechada del Antibiótico W847-B con aproximadamente 10% del agua, se hace pasar a través de un molino coloidal, se agrega entonces la lechada molida a la base para crema fundida, y se mezcla. Se deja enfriar.

EJEMPLO 16

Ungüento para tópico

20	Antibiótico W847-C <sub>1</sub>	10 g
	Petrolato	<u>990 g</u>
		1000 g

Procedimiento:

- 1) Se derrite el petrolato.
- 2) Se forma una lechada del Antibiótico W847-C<sub>1</sub> con aproximadamente 10% del petrolato y se hace pasar a través de un molino coloidal.
- 3) Se mezcla la lechada molida con el resto del petrolato derretido. Se deja enfriar.

EJEMPLO 17

30 Solución parenteral



Tartrato del Antibiótico W847-A		250 mg/ampolla
Acido cítrico	) Sirven como regulador de pH.	14 mg/ampolla
Fosfato disódico		26 mg/ampolla
Agua destilada estéril		5,0 mg/ampolla

5 Procedimiento:

- 1) Se mezcla asépticamente tartrato del Antibiótico W847-A estéril con regulador citrato/fosfato estéril.
- 2) Con esta mezcla se llenan frascos estériles.
- 3) Inmediatamente antes del uso se agrega agua y se sacude bien.

10 EJEMPLO 18

Suspensión parenteral

Antibiótico W847-C <sub>2</sub>	250 mg/ampolla
Carboximetil-celulosa sódica	3 mg/ampolla
Polisorbato 80 USP	1 mg/ampolla
15 Metilparabeno	3,6 mg/ampolla
Propilparabeno	0,4 mg/ampolla
Agua, c.s.p.	2,0 ml/ampolla

Procedimiento:

- 1) Se prepara una solución de la carboximetil-celulosa sódica, polisorbato 80, metilparabeno y propilparabeno indicados más arriba.  
20 Se trata la solución en autoclave.
- 2) Asépticamente se forma una lechada del Antibiótico W847-C<sub>2</sub> estéril con una porción del vehículo indicado más arriba y se hace pasar a través de un molino coloidal.
- 25 3) Se mezcla la lechada molida con el resto del vehículo.
- 4) Con esta mezcla se llenan ampollas estériles.

Con referencia a los ejemplos 13-18 anteriores, es de observar que sus componentes antibióticos se pueden reemplazar por cualquier otro complejo antibiótico, fracción de antibiótico o mezcla de fracciones de  
30



antibiótico de acuerdo con la invención en la forma libre o en la forma de derivados, tales como ésteres o sales, excepto que las soluciones parentéricas tal como se representan por el ejemplo 17, contengan descablemente el complejo antibiótico, fracción o mezcla de fracciones en la forma de una sal de adición de ácido.

-----



REIVINDICACIONES

Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención, las siguientes reivindicaciones con prioridad de la solicitud de patentes estadounidenses seriales núms. 641.522 del 26 de Mayo de 1967 y 707.100 del 21 de Febrero de 1968, existiendo en ellas unidad de invención.

5

1. Un procedimiento para preparar antibióticos que pertenecen a un complejo antibiótico identificado como Complejo W847, que comprende incubar un micro-organismo de la especie *Micromonospora* Sp. W847, hasta que se ha formado por lo menos un compuesto que tiene actividad antibiótica sustancial.

10

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que se incuba el micro-organismo en un medio nutritivo acuoso, bajo condiciones aeróbicas.

3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en que se lleva a cabo la incubación bajo condiciones aeróbicas sumergidas.

15

4. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que el micro-organismo utilizado es *Micromonospora* Sp. W847 (NRRL 3274) o un mutante o variante del mismo, productores de Complejo W 847.

20

5. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que el micro-organismo utilizado es *Micromonospora* Sp. W847 (NRRL 3275) o un mutante o variante del mismo productores de Complejo W847.

25

6. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones



3 o 4, en que se incuba el micro-organismo a una temperatura de 22 a 37°C, y un pH de 7,1 a 7,8.

5. 7. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que incluye recuperar un producto antibióticamente activo (antibiótico) que contenga por lo menos un compuesto antibióticamente activo.
8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en que se recupera el antibiótico en forma libre.
9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en que se recupera el antibiótico bajo la forma de un derivado funcional.
10. 10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en que el derivado es un éster, con un ácido carboxílico hidrocarbonado.
11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en que el derivado es una sal de adición de ácido.
15. 12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en que la sal es una sal de clorhidrato, sulfato, fosfato, estearato, propionato, tartrato o maleato.
13. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en que la recuperación incluye la etapa de hacer el caldo alcalino, extraerlo en un solvente inmiscible con agua y aislar el Complejo Antibiótico W847 o una fracción o fracciones del mismo con respecto al extracto.
20. 14. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en que la recuperación incluye resolución del producto antibióticamente activo primeramente obtenido, a fracciones, y aislación de por lo menos una de estas fracciones.
25. 15. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en que la fracción aislada es Fracción A del Antibiótico W847.
30. 16. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en que la fracción aislada es Fracción B del Antibiótico W847.

35 4296



17. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en que la fracción aislada es Fracción C<sub>1</sub> del Antibiótico W847.
18. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en que la fracción aislada es Fracción C<sub>2</sub> del Antibiótico W847.
5. 19. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, en que se logra la resolución mediante técnicas que incluyen separación cromatográfica.
20. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, en que se logra la resolución mediante técnicas que incluyen extracción en solvente.
10. 21. Un procedimiento, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, en que la resolución envuelve las etapas siguientes:
- concentrar el extracto;
15. disolver el residuo aceitoso en acetona;
- mezclar la solución de acetona con agua mediante agitación vigorosa;
- permitir el calentamiento de la mezcla a temperatura ambiente;
- filtrar la mezcla precipitada de fracciones C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>;
- extraer el filtrado con un disolvente orgánico;
20. cromatografiar el extracto en silicato magnésico activado (Florisil) para separar fracciones A y B;
- disolver la mezcla de fracciones C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> en metanol;
- triturar la solución de metanol con un ácido;
- precipitar una sal de fracción C<sub>2</sub> por adición de éter; y
25. aislar la fracción C<sub>1</sub> de los licores madres.
22. Un procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 21, que incluye la etapa de convertir por lo menos una fracción en una sal de fosfato.
23. Un procedimiento para preparar antibióticos que pertenecen a un complejo antibiótico.
- 30.

85 4296



Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 54 hojas, foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 24 de Mayo de 1968.

P.a.

JAIMÉ ISERN

P. P.

Firmado: JOSÉ RODRIGUEZ

5.

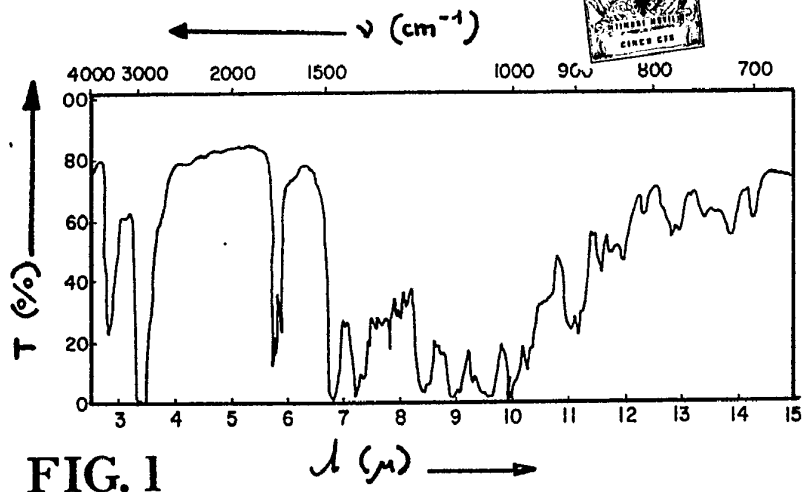


FIG. 1

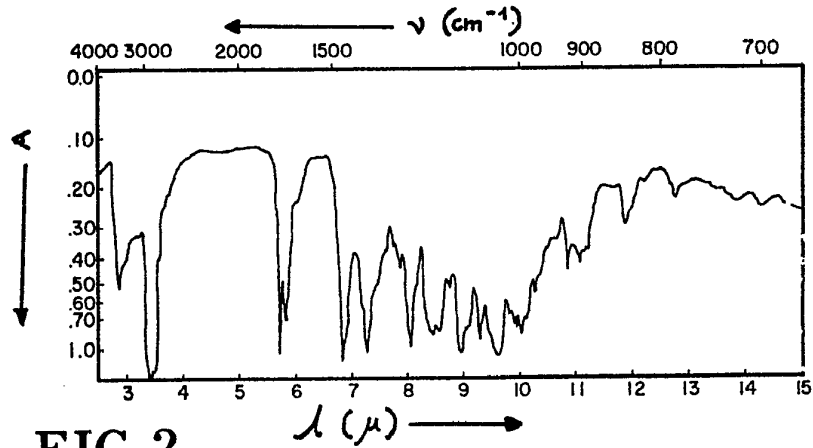


FIG. 2

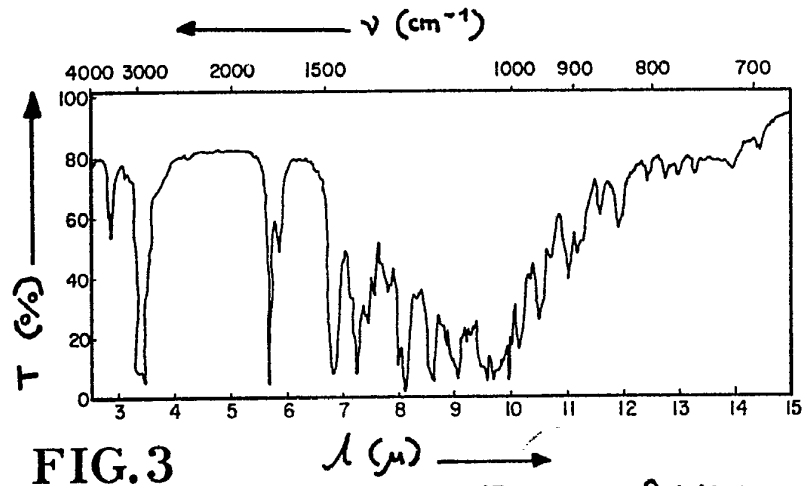


FIG. 3

24 MAY. 1968  
Madrid.  
Jaime Isern  
P.P.  
JOSE RODRIGUEZ

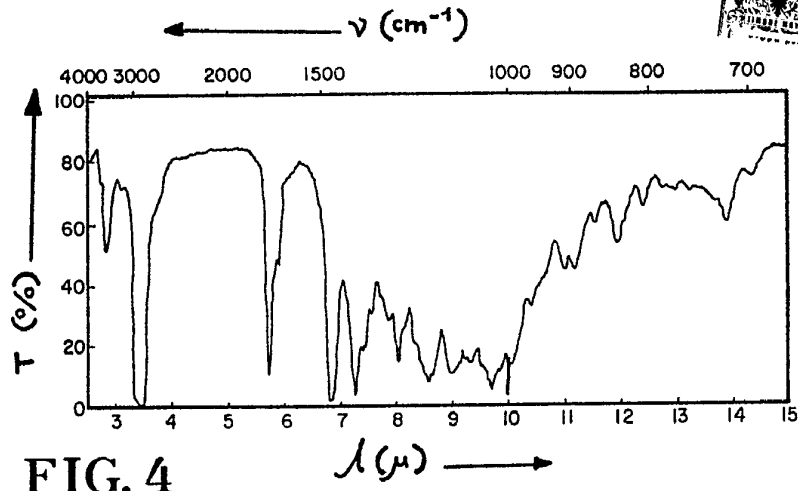


FIG. 4

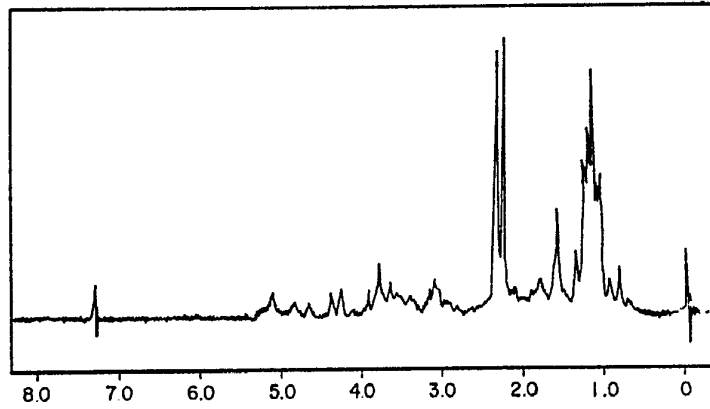


FIG. 5

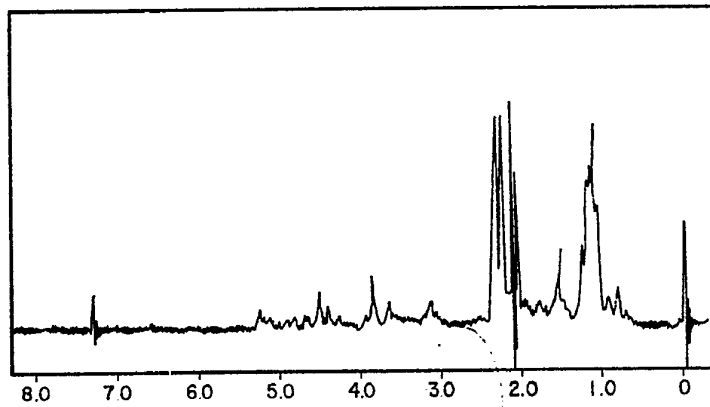


FIG. 6

Hacienda 21 MAY 1958  
Jaime Isern  
P.P.  
Firmado: JOSE RODRIGUEZ

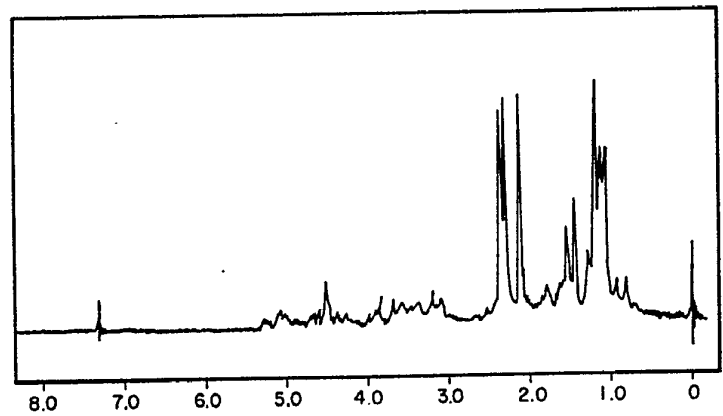


FIG. 7

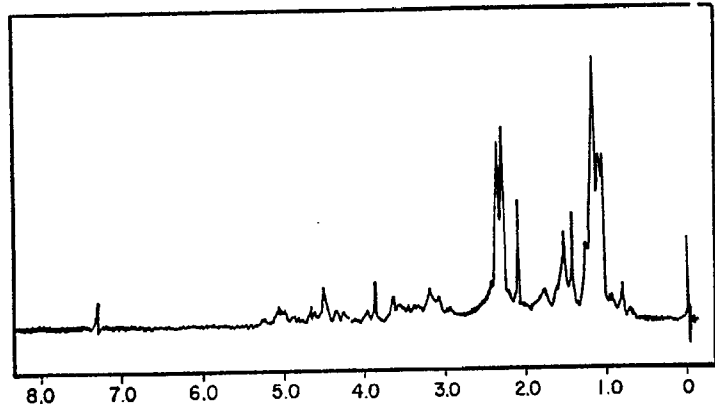


FIG. 8

Madrid, 24 MAY, 1968  
Jaime Izerrn  
P.P.

Madrid: JOSE RODRIGUEZ