



P A T E N T E
D E
I N V E N C I O N

por "UN PROCEDIMIENTO MICROBIOLÓGICO PARA LA PREPARACIÓN DE LA SUBSTANCIA ANTIBIOTICA TAIMICINA", a favor de la firma italiana SOCIETA FAR ACEUTICI ITALIA, residente en MILAN (Italia).

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

- Este invento tiene por objeto un procedimiento para la preparación de un complejo antibiótico. Mas particularmente, el objeto de este invento es un procedimiento para preparar el nuevo complejo antibiótico taimicina, el cual comprende
5. las substancias llamadas taimicina A, taimicina B y taimicina C y sus sales, que han demostrado ser particularmente útiles en terapéutica como productos antihelmínticos y antiprotozoarios. El procedimiento para la preparación de dicho complejo antibiótico consiste en el cultivo del nuevo microorganismo
 10. Streptomyces michiganensis var. amylolyticus, llamado también Streptomyces F.I. 2461.

El Streptomyces michiganensis var. amylolyticus ha sido



depositado en el Instituto Micológico de la Comunidad Británica, Ferry Lane, Kew, Surrey (Gran Bretaña), recibiendo las siglas I.M.I. 131670.

- El nuevo microorganismo Streptomyces michiganensis var. amylolyticus se ha aislado de una muestra terreno tomada en Trang (Thailandia); presenta las características morfológicas, culturales y bioquímicas siguientes:

Propiedades morfológicas.

- En los terrenos de cultivos usuales, el micelio vegetativo consta de hifas más o menos delgadas, de 0,5 a 0,9 micras de espesor, largas y abundantemente ramificadas, que forman hifas más gruesas, de 1,1 a 1,4 micras de espesor, recogidas en racimos de ramificación simpodial. Estas últimas son más bien largas, desde rectas hasta flexuosas, y forman conidios dispuestos primeramente en cadenas y luego libres.

Los conidios son ovales, de superficie lisa y tienen el tamaño siguiente: 1,1-1,4 x 1,2-1,9 micras.

Propiedades culturales bioquímicas:

- En la tabla 1 se muestran las propiedades de cultivo observadas en los diferentes medios cultivando el microorganismo a 28°C y efectuando las observaciones al cabo de 3, 8, 15 y 20 días de la inoculación. El microorganismo presenta en esencia un desarrollo rápido y abundante, con formación de un



- micelio vegetativo compacto, más bien sólido, con pátina lisa en los terrenos sintéticos y ligeramente plegada en los terrenos orgánicos. En los primeros, el color del micelio vegetativo y de su envés va del amarillo pajizo al amarillo limón, mientras que en los segundos es ocre y castaño claro. En estos terrenos se produce también un pigmento soluble de color de té claro, que con el envejecimiento vira a un tono castaño claro.

10. El micelio aéreo es abundante en todos los terrenos de cultivo, tiene aspecto más bien pulverulento y es de color blanco marfil con tonos de amarillo de azufre en los terrenos sintéticos, mientras que en los orgánicos el color pasa del blanco yeso al blanco marfil con tonos a veces de beige claro y a veces de amarillo de azufre atenuado.

15. Las características bioquímicas del microorganismo en examen son las siguientes:

gelatina: hidrólisis total y rápida

nitratos: se reducen a nitritos

almidón: hidrólisis discreta

20. leche: coagulación y peptinización

melamina: producción ligera

producción de H₂S: modesta.

- El microorganismo utiliza: l-arabinosa, glucosa, d-xilosa, d-fructosa, maltosa, d-manitol y meso-inositol;
25. no utiliza: sacarosa, ramnosa ni rafinosa.



El microorganismo no se desarrolla a 50°C y no produce esclerosios. En cultivo líquido sumergido y agitado, esta raza produce el complejo antibiotico taimicina.

Tabla 1 - Características de cultivo de la raza F.I. 2461

MEDIO	DESARROLLO	MICELIO AEREO	MICELIO VEGETATIVO	PIGMENTOS SOLUBLES
Agar Bennet (1)	abundante, en patina lisa	abundante; de crema marfil a beige claro, con tonalidades de amarillo de azufre; raso	de amarillo pajizo a amarillo limón hasta castaño claro, con envés idéntico	color de té claro
Agar Czapeck (1)	abundante	abundante; de blanco a marfil; raso	escaso incoloro	-----
Agar-asparagina-glucosa (1)	abundante; en pátina lisa	abundante; raso; de blanco marfil a amarillo de azufre pálido	de amarillo pajizo a amarillo limón, también en el envés	-----
Agar-glicerina-glicina (I)	abundante; en pátina lisa	abundante; raso; de color marfil con tonalidades beige, a veces de color vinoso rosado pálido	de amarillo pajizo a amarillo limón, a veces con tonos castaños; envés idéntico	-----
Agar de Emerson (1)	abundante; en pátina más o menos relevada	abundante; raso; de blanco yeso a blanco beige	color castaño, también en el envés	color castaño claro



Agar-almidón y sales (2)	abundante; en pátina lisa	abundante; raso; color amarillo de azufre	de amarillo limón a amarillo de azufre; envés idéntico	-----
Agar-patata (4)	abundante; en pátina lisa	abundante; raso; blanco con tonalidad beige	de amarillo pajizo a amarillo ocre hasta castaño claro; envés idéntico	color de té
Agar-avena (3)	abundante; en pátina lisa	de blanco marfil a amarillo de azufre; abundante, raso	de amarillo pajizo a amarillo limón hasta castaño claro; envés idéntico	-----
Agar-glicerina-asparagina (1)	abundante; en pátina lisa	de blanco a amarillo de azufre claro; abundante raso	de amarillo pajizo a amarillo limón; envés idéntico	-----
Agar-extracto de levadura-glucosa (1)	abundante; en pátina más o menos relevada	de blanco yeso a beige claro con tonalidades de amarillo de azufre; abundante, raso	castaño más o menos oscuro; envés idéntico	color castaño
Agar-peptona-almidón (1)	abundante; en pátina lisa	de blanco yeso a beige hasta amarillo de azufre; abundante, raso	castaño, con envés idéntico	castaño
Agar-peptona-KNO ₃ (1)	abundante; en pátina lisa	abundante; raso, de color blanco yeso	de amarillo pajizo a castaño claro, con envés idéntico	color de té



- (1) Waksman S.A.: The Actinomycetes, vol. II, The William and Wirlkins Co., 1961, p. 328-334.
- (2) Pridham T.G., Anderson P., Foley C., Lindenfelser L.A., Hesseltine C.M. y Benedict R.B.: Antibiotics Annual, 1956-1957, p. 947-953.
5. (3) Baldacci E., Giolitti G., Küster E., y Scotti T. : Journal de Microbiology 9, p. 39 (1961).
- (4) A 200 g de patatas hervidas y filtradas por una gasa se añaden 20 g de glucosa y 20 g de agar; luego se ajusta al volumen de 1 litro y se esteriliza a 120°C por 20 minutos.
- 10.

Identificación de la raza

- Los caracteres que presenta el microorganismo en examen y que se han descrito precedentemente permiten referirlo
15. al género *Streptomyces* Waksman et Henrici (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7ª Edición, 1957, pág. 744-745). La raza pertenece a la serie "Rectus flexibilis", serie "olive-buff" de Pridham y col. (Appl. Microbiol. 6, 1958, pág. 52), a la serie "virgatus" de Baldacci (Giornale di Microbiologia, 6, 1958, pág 10), a la serie "Erythrochromogones" de Waksman (The Actinomycetes, vol. II, pág. 117 y 149, 1961) y al grupo de estreptomicetos que tienen micelio aéreo "griseus" de Hütter (Giornale di Microbiologia, 11, pág. 191, 1963)
 - 20.



Una comparación entre los caracteres del microorganismo en examen y los de la especie perteneciente a los grupos sistemáticos (taxa) citados ha puesto de relieve una estrecha semejanza entre nuestro microorganismo y el Streptomyces

5. michiganensis, Cortaz y col. (Arch. Mikrobiol. 26, pág. 205, 1957). En las Tablas 2 y 3 se exponen los datos de la comparación entre nuestro microorganismo y la última especie; se puede observar que las diferencias entre los dos cultivos se refieren a variaciones de tonalidad en el color del micelio vegetativo y en el color del micelio aéreo, así como a la
10. utilización del almidón.



TABLA 2

Comparación entre las propiedades de cultivo del Streptomyces F.I. 2461 y el Streptomyces michiganensis raza 14970 ATCC.

Medio	<u>Streptomyces F.I. 2461</u>		<u>Streptomyces michiganensis</u> raza 14970 ATCC	
	Micelio vegetativo	Micelio aéreo	Micelio vegetativo	Micelio aéreo
Agar de Bennet	de pajizo a amarillo limón hasta castaño claro; pigmento soluble, de color de té	beige claro con tonalidad de amarillo de azufre; abundante	de pajizo a amarillo de limón hasta castaño claro; pigmento soluble, de color de té	beige con tonalidades de amarillo de azufre; abundante
Agar de Czapeck	incoloro	blanco discreto	incoloro	blanco discreto
Agar-asparagina-glucosa	de pajizo a amarillo limón	de blanco marfil a beige claro; abundante	de pajizo a amarillo limón	blanco marfil; abundante
Agar-asparagina-glicerina	amarillo limón	beige; abundante	amarillo limón	beige abundante
Agar de Emerson	castaño; pigmento soluble de color castaño	beige abundante	castaño; pigmento soluble de color castaño	beige, con tonalidades de amarillo azufre; abundante



Agar, almidón y sales	de pajizo a amarillo limón	de beige a amarillo de azufre pálido; abundante	de amarillo limón a amarillo anaranjado; pigmento soluble de color amarillo limón	de beige a amarillo de azufre neto; abundante
Agar-patata	de amarillo pajizo a ocre hasta castaño claro; pigmento soluble de color de té	blanco marfil con tonalidades de beige; abundante	de amarillo pajizo a ocre hasta castaño claro; pigmento soluble de color de té	blanco marfil con tonalidades de beige; abundante
Agar-avena	amarillo pajizo a amarillo limón	blanco marfil con tonalidades de beige, a veces amarillo de azufre; abundante	de amarillo a anaranjado; pigmento soluble de color limón	de beige a amarillo de azufre; abundante
Agar-asparagina-glucosina	amarillo pajizo a amarillo limón	blanco marfil a amarillo azufre; abundante	amarillo pajizo a amarillo limón	blanco marfil a amarillo de azufre; abundante
Agar extracto de levadura-glucosa	castaño claro; pigmento soluble de color castaño	de blanco yeso a beige claro; abundante	castaño claro; pigmento soluble de color castaño	beige con tonalidad marcada de amarillo azufre; abundante
Agar-peptona-nitrato de potasio	de amarillo pajizo a castaño claro	blanco yeso; abundante	de amarillo pajizo a castaño claro	ausente



Agar-tirosina (Gordon y col., 1955)+	Producción de pigmento soluble de color castaño; descomposición rápida de la tirosina	Producción de pigmento soluble de color negro; descomposición lenta de la tirosina.
Agar-tirosina (Waksman, 1961)	Comportamiento idéntico de ambas razas, con ligera producción de un pigmento melanoide	

+ GORDON, R.E. y SMITH M.M.: J. Bact 69, 147, 1955.

TABLA 3

Comparación entre los caracteres bioquímicos del Streptomyces F.I. 2461 y del Streptomyces michiganensis raza 14970 ATCC

	<u>S.F.I. 2461</u>	<u>S. michiganensis</u> 14970 ATCC
Utilización de la glucosa	+	+
" " " l-arabinosa	+	+
" " " d-xilosa	+	+
" " " d-fructosa	+	+
" " " maltosa	+	+
" " " d-manitol	+	+
" " " sacarosa	-	-
" " " ramnosa	-	-
" " " rafinosa	-	-
Hidrólisis de la gelatina	+	+
Ataque de la tirosina	+	+
Producción de melamina	+	+
Hidrólisis del almidón	+	-
Producción de hidrógeno sulfurado	+	+
Reducción de los nitratos	+	+
Coagulación y peptonización de la leche	+	+



Se concluye que el microorganismo Streptomyces F.I. 2461 pertenece a la especie Streptomyces michiganensis. Las diferencias que se han señalado permiten considerar la raza F.I. 2461 como una variedad de esta especie, variedad para la cual proponemos la denominación: Streptomyces michiganensis var. amyloleticus.

Por la literatura (Hütter, 1963) se sabe que las razas pertenecientes a la especie Streptomyces michiganensis pueden producir diversos antibióticos de actividad antibacteriana y antifungosa; pero no se conoce la producción de sustancias que tengan actividad antihelmíntica.

El examen efectuado por nosotros ha confirmado que el extracto miceliar de la raza 14970 ATCC del Streptomyces michiganensis no contiene sustancias de actividad antihelmíntica.

Por fermentación del nuevo microorganismo Streptomyces michiganensis var. amyloleticus o Streptomyces F.I. 2461 se ha podido preparar un complejo antibiótico cuyas actividades principales son la antihelmíntica y la antiprotozoaria.

El microorganismo Streptomyces michiganensis var. amyloleticus o F.I. 2461 puede conservarse por trasplantes sucesivos en terrenos sólidos, o por liofilización de una suspensión en leche de sus esporas.

Objeto de este invento es un procedimiento microbiológico para la preparación del complejo antibiótico taimicina por fermentación del nuevo microorganismo Streptomyces michi-



ganensis var. amylolyticus en un medio de cultivo que contenga una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales minerales, extracción del antibiótico taimicina y sucesiva separación y caracterización de las sustancias que lo componen.

5. Particularmente, el microorganismo se hace desarrollar en un medio de cultivo líquido, en condiciones aerobias y a temperatura de 24°C a 37°C. y preferentemente a 28°C, por un período de 72 a 160 horas. El pH puede variar, según los terrenos de fermentación que se empleen, de 6 a 8: Como
10. fuente de carbono pueden utilizarse la glucosa, la dextrina, el almidón, diversas harinas (de maíz, de soja, de trigo, etc.) corn steep y otras sustancias de uso corriente. La
15. fuente de nitrógeno, además de las sustancias complejas mencionadas antes que contienen nitrógeno, puede ser caseína, hidrolizados de caseína, harina de semillas de algodón y sales amónicas, tales como sulfatos, fosfatos, cloruros y otras sustancias de uso común. Las sales minerales útiles para
20. la producción del antibiótico pueden variar según el terreno que se utilice, El carbonato cálcico está casi siempre presente y se pueden agregar además cloruros, sulfatos, fosfatos, etc., de sodio, de potasio, de magnesio, de manganeso, de hierro, de cobre, de zinc y de cobalto.

La fermentación puede llevarse a cabo en matraces de Erlenmeyer y en fermentadores de laboratorio o industriales

25. de diversa capacidad.



El complejo antibiótico taimicina consta de tres sustancias, llamadas taimicina A, taimicina B y taimicina C, las cuales presentan propiedades químico-físicas semejantes, pero actividad biológicas diferentes.

5. La determinación de la concentración del complejo antibiótico en el medio cultivo se efectúa durante el período de crecimiento del microorganismo, ensayando muestras obtenidas por la extracción con alcohol metílico del micelio húmedo. Después de evaporación del disolvente en vacío, se recoge el residuo con el volumen más pequeño posible de dimetilformamida y luego se diluye con agua.

10. Estas muestras se ensayan sobre microorganismos sensibles al antibiótico (por ejemplo, sobre el Rhabditis macrocerca) preparando una serie de diluciones de la muestra en examen y comparándolas con soluciones del complejo antibiótico de título conocido. De manera análoga se pueden titular las muestras obtenidas durante las purificaciones sucesivas. Soluciones alcohólicas de las muestras, parcialmente purificadas, pueden titularse espectrofotométricamente a 290 y 320 milímetros comparándolas con muestras de los componentes del complejo que tengan título conocido.

15. Una vez terminada la fermentación, el complejo antibiótico, contenido principalmente en el micelio, se extrae con disolventes orgánicos apropiados, como alcoholes inferiores, acetona, cloroformo, cloruro de metileno o metilisobutilcetona. En la práctica corriente se emplea alcohol metílico y, después de tres extracciones efectuadas cada vez con un



volumen equivalente a $1/3$ del volumen del cultivo, se recogen los extractos y se concentran bajo presión reducida hasta $1/6-1/8$ del volumen original.

- Se filtra y se centrifuga al precipitado resultante,
5. que contiene 10% del antibiótico, se ajusta la parte sobrenadante a pH 5,8-6,2 y se extrae con éter de petróleo para eliminar las impurezas. La fase inferior se extrae con cloroformo y el extracto, lavado con agua, se seca sobre sulfato sódico anhidro, se concentra luego bajo presión reducida y se precipita con éter de petróleo o con hexano. El precipitado bruto
 10. contiene 10 a 15% de antibiótico. Estos productos brutos se disuelven en cloroformo o en mezcla de cloroformo/tetracloruro de carbono/alcohol metílico/agua y se adsorbe la solución sobre una columna cromatográfica de ácido silícico suspendido
 15. en cloroformo.

- Se lava con cloroformo para eliminar las impurezas y luego se eluye la columna con cloroformo que contiene porcentajes crecientes de alcohol etílico. La elución se efectúa analizando el espectro ultravioleta de muestras de las diversas
20. fracciones y mediante cromatografía sobre capa delgada. Eluyendo con cloroformo/etanol (3:1) se obtiene taimicina C; eluyendo con cloroformo/etanol (2:1) se obtiene taimicina B; y con porcentajes mayores de etanol se obtiene la taimicina A con porcentajes variables de taimicina B.

25. De los eluatos concentrados se recuperan, diluyendo con agua y ajustando la solución a pH 6, los productos parcialmente



purificados. Mediante evaporación lenta del alcohol residual, se logra precipitar de los concentrados acuosos las sales sódicas.

5. La taimicina C se puede purificar todavía más por cristalización en metanol/agua.

10. La taimicinas A y B se purifican por medio de distribución en contracorriente, utilizando respectivamente la mezcla cloroformo/tetracloruro de carbono/alcohol metílico/agua (3:2:4:1) y (2,5:2,5:4:1); al final se precipitan, en forma de sales sódicas, de soluciones acuosas con pH 6-6,2.

Por término medio se obtiene, por litro de caldo de cultivo, 40 mg de taimicina A, 15 mg de taimicina B y 5 mg de taimicina C.

Propiedades físico-químicas:

15. El antibiótico taimicina consta de un complejo de tres sustancias que tienen características físico-químicas semejantes, pero actividad biológica diferente.

20. Todas las sustancias se han aislado en forma de sal sódica, se presentan como polvos blancos amorfos y son estables en pH neutro o ligeramente básico. Resultan solubles en dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo, dioxano, alcoholes acuosos y acetona acuosa; poco solubles en alcoholes inferiores, cloroformo, acetona y benceno; y prácticamente insolubles en agua y éter de petróleo. Las principales características
25. físico-químicas se resumen en la tabla que sigue:



T A B L A 4

	TAIMICINA A punto de fusión: 250° (con descomposición)	TAIMICINA B 260°C (con descomposición)	TAIMICINA C 240° (con descomposición)
5.	$[\alpha]_D^{23}$ (c 0,9 dioxano) : +7° (c 0,77 CH ₃ OH) : +24°	+ 45°	-12°
10.	%C 60,30 %H 7,88 %N 4,71 %Na 4,01	67,26 7,97 5,98 1,51	62,50 8,11 4,45 2,39
15.	Espectro ultravioleta:		
	$\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 240 y 294 m μ (E _{1cm} ^{1%} 192 y 149)	238 y 321 m μ (E _{1cm} ^{1%} 449 y 255)	240 y 290 m μ (E _{1cm} ^{1%} 152 y 157)
	$\lambda_{\text{max}}^{\text{NaOH 0,05 N en CH}_3\text{OH}}$ 244 y 292 m μ (E _{1cm} ^{1%} 200 y 140)	235 y 320 m μ (E _{1cm} ^{1%} 470 y 250)	246 y 287 m μ (E _{1cm} ^{1%} 154 y 156)
20.	$\lambda_{\text{max}}^{\text{HCl 0,05 N en CH}_3\text{OH}}$ 322,5 m μ (E _{1cm} ^{1%} 50)	322,5 m μ (E _{1cm} ^{1%} 300)	ningún máximo



La taimicina B se ha aislado también en forma de ácido libre: éste muestra el mismo comportamiento farmacológico que la taimicina sal sódica y presenta las características siguientes: punto de fusión = 245°C; % de C = 68,85,

5. % de H = 7,81, % de N = 5,35; espectro ultravioleta:

CH₃OH 322 (E 1% 306)
max 1 cm

T A B L A 5

10.	Reacciones	TAIMICINA A	TAIMICINA B	TAIMICINA C
	Cloruro férrico	+	+	+
	Cloruro de titanio	-	+	-
	2:4 DNPH	+	+	-
15.	Diazo	-	-	+
	Sal cuprosa verde, soluble en cloroformo	-	+	-

Además, las taimicinas no reaccionan con los reactivos siguientes: ninhidrina, nitroprusiato, Melish, Fehling, Bial, antrona, orcinol, Ehrlich y Sakaguchi.

20.

A base de estas características físico-químicas, la taimicina B, en especial, muestra algunas analogías con el antibiótico estreptolidigina (Waksman y Lechevalier, The



Actinomycetes 3, 1962, pág. 371), pero se diferencia claramente de ésta no solo por la actividad biológica, sino también por las características cromatográficas que se reseñan en la Tabla 6 que sigue.

T A B L A 6

Cromatografía sobre capa delgada

5.	Estrato	Disolvente	Rf TAIMICINA A	Rf TAIMICINA B	Rf TAIMICINA C	Rf Es- trep toli digi na sódic o
10.	MN Kieselgel G 254	alcohol butílico/ acetona/agua (4:5:1)	0,40	0,30	0,70	0,85
	Kieselgel G	alcohol butílico/ acetona/agua (4:5:1)	0,60	0,30	0,75	0,80
15.	Kieselgel HF 254-366	alcohol butílico/ acetona/agua (4:5:1)	0,35	0,25	0,50	0,85
	MN Kieselgel G 254	acetato de etilo/ piridina/alcohol isopropílico/agua (7:2:3:2)	0,50	0,50	0,80	1,00
	Kieselgel G	alcohol propílico/ acetato de etilo/ agua (8:1:1)	0,45	0,25	0,50	0,60
20.	Alúmina	alcohol butílico/ piridina/agua (6:4:3)	0,50	0,30	0,70	-



Actividad antiprotozoaria

La actividad antiprotozoaria se ha ensayado "in vitro" sobre Entamoeba histolytica raza F 22, en terreno monofásico de Pavlova.

5. Después de 48 horas de incubación a 37°C, la lectura microscópica en cámara de Fott ha permitido la determinación de la dosis inhibidora mínima (DIM) como se indica en la Tabla 7. Por dosis inhibidora mínima (DIM) se entiende la cantidad mínima de las sustancias capaz de inhibir totalmente "in vitro" el desarrollo del organismo ensayado.

TABLA 7

Actividad antiprotozoaria "in vitro" sobre Entamoeba Histolytica raza F 22. DIM en gammas/cc en terreno Pavlova

15.	Fracciones ensayadas	DIM en gammas/cc
	Taimicina A	6,25
	Taimicina B	0,78
	Taimicina C	25

20. Actividad antihelmíntica

La actividad antihelmíntica se ha ensayado "in vitro" sobre diversos helmintos, con distintas modalidades.



La Rhabditis macrocerca, mantenida en cultivos de laboratorio, se cultivó en agar tratado con los componentes del antibiótico taimicina en diversas concentraciones.

- La Syphacia obvelata y la Hymenolepis nana, tomadas
5. de ratones infestados experimentalmente, se sumergieron en soluciones salinas amortiguadas a pH 7,5. Se añadieron en diversas concentraciones los componentes del antibiótico taimicina y se comprobó la supervivencia de los dos helmintos con períodos diferentes de contacto.
10. Por dosis inmovilizadora mínima se entiende la cantidad mínima de substancia capaz de inmovilizar "in vitro" los movimientos del organismo de ensayo. En la Tabla 8 se exponen los datos referentes a la dosis inhibidora mínima y a la dosis inmovilizadora mínima, determinadas al cabo de
15. 1 a 4 horas para las fracciones separadas del complejo antibiótico taimicina.



T A B L A 8

Especie ensayada	TAIMICINA A			TAIMICINA B			TAIMICINA C		
	MID √/cc	Dosis in- moviliza- dora mí- nima, en √/cc		MID √/cc	Dosis in- moviliza- dora mí- nima, en √/cc		MID √/cc	Dosis in- moviliza- dora mí- nima, en √/cc	
		en 1 hora	en 4 horas		en 1 hora	en 4 horas		en 1 hora	en 4 horas
5. <u>Rhabditis ma- crocerca</u>	31	+	+	5	+	+	250		
10. <u>Syphacia ab- velata</u>	++	>1000	1000	++	>1000	1000	++	>1000	>1000
<u>Hymenolepis nana</u>	++	1000	100	++	1000	100	++	>1000	>1000

15.

Explicación: + = no determinada

++ = no determinable

20. La actividad antihelmíntica se ha ensayado "in vitro" sobre ratones albinos de 25 g de peso, infestados experimentalmente con Hymenolepis nana. Los experimentos se realizaron sobre grupos de 10 ratones cada uno.



Los resultados demuestran que el 100% de los ratones parasitados con Hymenolepis nana a los 25 días de la infestación, se curan con la administración de diferentes fracciones del antibiótico taimicina por sonda esofágica, a dosis claramente inferiores a las permitidas por los índices de toxicidad. En la Tabla 9 se exponen los índices de toxicidad aguda en el ratón (DL_{50}).

T A B L A 9

Vía de administración	TAIMICINA A	TAIMICINA B	TAIMICINA C
Oral	> 1000	250	> 1000
intraperitoneal	25	5	250

Los índices referentes a la actividad terapéutica se reseñan en la Tabla 10.



T A B L A 10

Actividad antihelmíntica "in vivo" (administración del anti-tibiótico taimicina por sonda esofágica durante 5 días

5.	Infestación por <u>Hymenolcpis nana</u>	Dosis terapéutica mínima, en mg/kg		
		TAIMICINA A	TAIMICINA B	TAIMICINA C
		25	25	50

10.

Los ejemplos que siguen sirven para ilustrar el invento, pero sin limitarlo.

EJEMPLO 1.

15.

Se preparan dos matraces de Erlenmeyer de 300 cc que contienen cada uno 60 cc del terreno siguiente:

20.	Dextrina	3%
	Caseína	0,5%
	Carbonato cálcico	0,4%
	Sulfato amónico	0,1%
	Monofosfato potásico	0,01%
	Corn Steep Liquor	0,3%
	Agua del grifo hasta	100.



La esterilización se efectúa calentando a 120°C durante 20 minutos. El pH del terreno después de la esterilización varía entre 6,8 y 7.

5. Se inocular cada matraz con 0,5 cc de una suspensión de esporas obtenida lavando con 5 cc de agua destilada estéril la pátina de un cultivo en plano inclinado de Streptomyces F.I. 2461 de 15 días de edad, desarrollado sobre agar-patata glucosado.

10. Se incuban los matraces a 28°C durante 24 horas, en un agitador giratorio, con 225 r.p.m. y una excentricidad de 3 cm.

2 cc de este cultivo se utilizan para inocular matraces de 300 cc que contienen cada uno 60 cc del terreno productivo siguiente:

15.	Almidón soluble	12%
	Corn Steep Liquor	2,5%
	Carbonato cálcico	1%
	Sulfato amónico	1%
20.	Harina de semillas de algodón	0,4%
	Sulfato manganoso	0,01%
	Cloruro de cobalto	0,0007%
	Agua del grifo hasta	100.



- Se ajusta el pH a 6,2 con solución 4-n de hidróxido sódico y se esteriliza calentando a 120°C durante 20 minutos. Se incuba a 28°C de la manera que se ha descrito antes para el cultivo vegetativo. Al cabo de 120 horas de incubación,
5. se obtiene una producción de 100 microgramos de complejo anti-biótico por cc de caldo de cultivo.

EJEMPLO 2.

- Se procede como en el ejemplo 1, con la diferencia de que para la fase productiva se emplea el terreno siguiente:
- 10.

Dextrina	7%
Harina de semilla de algodón	1%
Corn Steep Liquor	1%
15. Sulfato amónico	0,6%
Carbonato cálcico	0,5%
Monofosfato potásico	0,001%
Agua del grifo hasta	100.

- Se esterilizan mediante calentamiento a 120°C durante 20 minutos. Después de la esterilización, el pH varía entre 6,6 y 6,8. Se incuba el cultivo a 28°C en las condiciones que ya se han descrito en el ejemplo 1.
- 20.

- Al cabo de 120 horas de incubación, se obtiene una producción de 100 microgramos de complejo antibiótico por cc de caldo de cultivo.
- 25.



EJEMPLO 3.

Se preparan dos matraces de Erlenmeyer de 300 cc que contienen cada uno 60 cc del terreno siguiente:

	Dextrina	4%
	Carbonato cálcico	0,5%
5.	Sulfato amónico	0,2%
	Cascina	1%
	Corn Steep Liquor	1%
	Monofosfato potásico	0,001%
	Agua del grifo hasta	100.

10.

La esterilización se efectúa calentando a 120°C durante 20 minutos. Después de la esterilización, el pH del terreno varía entre 6,7 y 7.

15.

Se inocular cada matraz con 0,5 cc de una suspensión de esporas obtenida lavando con 5 cc de agua destinada estéril, la pátina de un cultivo en plano inclinado de Streptomyces F.I. 2461 de 15 días de edad, desarrollados sobre agar-patata glucosado.

20.

Se incuban los matraces a 28°C durante 24 horas en las mismas condiciones que en los ejemplos 1 y 2.

2 cc de un cultivo así obtenido se utilizan para inocular matraces de 300 cc que contienen cada uno un terreno productivo de la misma composición que el empleado para la



fase vegetativa anterior.

Se incuban los matraces a 28°C tal como se ha descrito para la fase vegetativa y al cabo de 120 horas la concentración del complejo antibiótico es de 120 microgramos por cc de caldo de cultivo.

5.

EJEMPLO 4.

Se procede como en el ejemplo 3, con la diferencia de que se emplea para la fase productiva el terreno siguiente:

10.	Corn Steep Liquor	1,5%
	Sulfato amónico	0,4%
	Carbonato cálcico	0,6%
	Almidón soluble	2%
	Glucosa	0,5%
	Harina de maíz	0,1%
15.	Harina de soja	0,4%
	Difosfato potásico	0,03%
	Aceite de lardo	0,25%
	Agua del grifo hasta	100.

20. Se ajusta el pH a 6,7 con solución de 4-n de hidróxido sódico y se esteriliza calentando a 120°C durante 20 minutos.

La concentración del complejo antibiótico es de 150 microgramos por cc de caldo de cultivo al cabo de 120 horas.



EJEMPLO 5.

Tres matraces de 300 cc que contienen 60 cc cada uno del terreno de cultivo siguiente:

	Dextrina	4,0%
5.	Caseina	1,0%
	Sulfato amónico	0,1%
	Corn Steep Liquor	1,0%
	Carbonato cálcico	0,5%
	Monofosfato potásico	0,01%
10.	Agua del grifo hasta	100,

se esterilizan por calentamiento a 120°C durante 20 minutos y luego se inoculan con una suspensión de esporas de un cultivo sobre agar-patata glucosado (como en el ejemplo 1) de Streptomyces michiganensis var. mycolyticus. Luego se incuban los matraces a 28°C en un agitador giratorio, a 225 r.p.m. y durante 24 horas. Con el contenido de los tres matraces se inocular un fermentador de 10 litros que contiene 6 litros del mismo terreno de cultivo que se ha descrito antes.

20. Se incuba este cultivo a 27°C, con agitación de 400 vueltas por minuto e introducción de 1 litro de aire estéril por 1 litro de cultivo y por minuto.

25. Al cabo de 20 horas, 2,5 litros del cultivo así obtenido se utilizan para inocular un fermentador de 80 litros que contiene 50 litros de un terreno de la constitución siguiente:



	Dextrina	6,0%
	Caseina	2,0%
	Corn Steep Liquor	1,0%
	Carbonato cálcico	0,5%
5.	Monofosfato potásico	0,01%
	Agua del grifo hasta	100.

La esterilización mediante calentamiento a 120°C por 30 minutos.

10. La fermentación se efectúa a 27°C, con agitación de 250 r.p.m. y con una corriente de aire de 0,7 litros por litro de terreno y por minuto. La fermentación dura 110 horas. La concentración máxima es de 100 microgramos de complejo antibiótico por cc de caldo de cultivo.

15. El líquido de cultivo procedente de la fermentación se filtra por medio de un adsorbente silíceo y se obtienen una torta y un filtrado, el cual se desecha.

Se lava la torta con agua, se suspende luego en alcohol metílico y se agita.

20. Se filtra el extracto y se repite la extracción por dos veces. Los extractos metanólicos, reunidos, se concentran bajo presión reducida hasta unos 5 litros.

Se separa por centrifugación el precipitado de color verde-amarillento y luego se le lava con agua y se lo seca en vacío sobre anhídrido fosfórico; se obtienen 25 g del complejo bruto.



Se reúnen el filtrado y las lavazas y se ajustan a pH 6,2; luego se extrae por dos veces con un volumen de éter de petróleo y a continuación se extrae la fase acuosa con cloroformo. Se lava el extracto con agua, se lo seca sobre sulfato sódico, se lo filtra y se lo concentra bajo presión reducida; añadiendo éter de petróleo al aceite residual, se obtienen 10 g de un precipitado amarillo amorfo, que contiene alrededor de 15% del complejo antibiótico. En total se obtienen 35 g de producto bruto, que contienen alrededor de 3,5 g de antibiótico.

101

12 g de antibiótico bruto (al 10% aproximadamente) se disuelven en 300 cc de la fase inferior de la mezcla (cloroformo/tetracloruro de carbono/alcohol metílico/agua 3:2:4:1), se filtra y se adsorbe el filtrado sobre una columna cromatográfica que contiene 900 g de ácido silícico, suspendidos en cloroformo. Se lava la columna con cloroformo y se recogen las fracciones de 1 litro. La elución se efectúa analizando las muestras de las diversas fracciones mediante cromatografía sobre capa delgada.

15.

20.

Se desechan las fracciones 1 a 4.

Luego se eluye con mezclas de cloroformo/etanol aumentando progresivamente el porcentaje del alcohol.

Se desechan las fracciones 5 a 20.

Fluyendo con cloroformo/etanol (3:1), las fracciones 21-26 del eluato contienen tamicina C.

25.

**POOR
QUALITY**



Eluyendo con cloroformo/etanol (2:1), las fracciones 27-35 contienen principalmente el componente taimicina B, con porcentajes menores de taimicina A y taimicina C.

5. Los eluatos con mayores porcentajes de etanol contienen taimicina A.

10. Se recogen las diversas fracciones y se las concentra hasta pequeño volumen bajo presión reducida; luego se diluye con el mismo volumen de agua, ajustando el pH alrededor de 6.

Mediante evaporación lenta del alcohol residual, se logra que se precipiten del concentrado acuoso los antibióticos, en forma de sales sódicas.

15. De las fracciones 21-26 se obtienen 130 mg de taimicina C.

De las fracciones 27-35 se obtienen 350 mg de taimicina B.

De las fracciones 36-50, se obtienen 950 mg de taimicina A.

20. La taimicina C se purifica todavía por cristalización en etanol/agua; de 130 mg se obtienen 90 mg de producto puro.

25. La taimicina B se purifica todavía por distribución en contracorriente en 40 tubos del aparato de Craig, utilizando fases de 25 cc cada una del sistema cloroformo/tetracloruro de



carbono/alcohol metílico/agua (2,5:2,5:4:1).

Al final, la taimicina B está contenida en los tubos 6 a 17; la mezcla B y A está contenida en los tubos 18 a 23; y la taimicina A está contenida en los tubos 24-33.

5. Los tres grupos de fracciones se concentran separadamente hasta pequeño volumen, se ajusta el concentrado a pH 6 y luego, evaporando despacio el alcohol metílico, se obtiene la precipitación de las sales sódicas. Se obtienen 200 mg de taimicina B, 60 mg de mezcla y 30 mg de taimicina A, a partir de 340 mg de taimicina B bruta.

10. La taimicina A se purifica con el mismo procedimiento, variando la composición de la mezcla utilizada para la contracorriente (cloroformo/tetracloruro de carbono/alcohol metílico/agua 3:2:4:1) y el número de transferencias, que son 100. Partiendo de 800 mg del producto obtenido de la columna de ácido silícico, se obtienen de los tubos 15 a 35, 150 mg de taimicina B; de los tubos 36 a 49, 100 mg de mezcla; y de los tubos 50 a 75, 420 mg de taimicina A.

20. A partir de la taimicina B (sal sódica) puede obtenerse el ácido libre respectivo procediendo así: a una solución que contiene 300 mg de taimicina B en 40 cc de cloroformo y 10 cc de etanol, se añaden 5 cc de ácido acético normal. Al cabo de unos minutos, se agregan 45 cc de agua, se agita y luego se separa la fase clorofórmica. Se extrae con 20 cc de



clorofermo la fase acuosa, se reúnen los extractos clorofórmicos, se lava con agua y se secan sobre sulfato sódico anhidro. Al cabo de unas horas, de la solución clorofórmica, filtrada y concentrada hasta un volumen de 10 cc, se obtiene 250 mg de un precipitado cristalino. La recrystalización en clorofermo/etanol da 200 mg de tainicina B, fundente a 245°C.



N O T A

Descrito el objeto de la invención, se declara nuevas las siguientes reivindicaciones, con prioridad italiana nº 16.923 A/67 del 7 de junio de 1967.

5. 1. Un procedimiento microbiológico para la preparación de la sustancia antibiótica taimicina, (constituída por las sustancias taimicina A, taimicina B y taimicina C) y sus sales, caracterizado por cultivarse el nuevo microorganismo Streptomyces michiganensis var. amylolyticus en condiciones aeróbicas, en terreno de cultivo líquido que contenga una
10. fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales minerales, a temperatura de 24º a 37ºC, por un período de tiempo de 72 a 160 horas y con pH de 6 a 8; por aislarse del caldo de fermentación el complejo antibiótico resultante, mediante extracción con disolventes apropiados y precipitación sucesiva;
15. y por separarse, si se quiere, el complejo antibiótico en los tres componentes taimicina A, taimicina B y taimicina C, mediante técnicas conocidas.

2. Un procedimiento microbiológico para la preparación de la sustancia antibiótica taimicina.

20. Según se describe y reivindica en la presente memoria que consta de 35 hojas, foliadas y escritas a máquina por



una sola de sus caras, acompañadas de la documentación correspondiente.

Madrid, a

p.a.

- 6 JUN. 1958

DE D. SAIME ISERO

Firmado: JOSE RODRIGUEZ