



366.730

Case 948

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE <u>C 07</u>
SUBCLASE <u>G</u>

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

por "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE ANTIBIOTICO
W847-A", a favor de la firma suiza SCHERICO LIMITED, residen-
te en LUCERNA (Suiza).

- . -

MEMORIA DESCRIPTIVA



La presente invención se relaciona con un nuevo procedimiento para la preparación de un antibiótico denominado W847-A, y de sus derivados farmacéuticamente aceptables.

5 En la patente belga No. 715.638 se describe un complejo antibiótico identificado como Complejo W847, su preparación por incubación de una especie, entonces nueva, de micro-organismos denominados Micro-
monospora sp. W847, y las valiosas propiedades terapéuticas de este complejo antibiótico en su forma libre y en la forma de sus derivados funcionales. En dicha patente belga se describe también diversas fracciones
10 nes antibióticamente activas que han sido aisladas a partir del Complejo W847, y que han sido denominadas Fracción A, Fracción B, Fracción C₁ y Fracción C₂. A las mezclas de las Fracciones C₁ y C₂ se las denomina Complejo W847-C.

De acuerdo con la patente belga No. 715.638, se puede formar
15 el Complejo Antibiótico W847 cultivando el micro-organismo Micromonospora sp. W847 en un medio nutritivo bajo condiciones aeróbicas sumergidas. Estos micro-organismos son del género Micromonospora y del orden Actinomycetales. Cultivos de organismos vivos de dos cepas de este género han sido depositados y forman parte de la colección de cultivos en existencia del United States Department of Agriculture, Northern Utilization
20 Research and Development Division, Peoria, Illinois, donde han recibido las denominaciones NRRL 3274 y NRRL 3275. Estas cepas son obtenibles de dicha dependencia a pedido.

Según lo podrán apreciar los entendidos en esta materia, resulta
25 ta altamente deseable disponer para el uso de fracciones antibióticas individuales, contrariamente a un complejo, puesto que se puede administrar una fracción individual con mayor seguridad de uniformidad en su potencia, efectos, concentración, absorción y similares. En una manera similar, es deseable disponer del antibiótico como un compuesto cristalino puro individual de manera de proveer normas uniformes de pureza y
30



dosis.

Más todavía, los presentes estudios han demostrado que el W847-A tiene varias ventajas netas en comparación con el componente principal W847-C₁ en lo que se refiere a mejor tolerancia, menos toxicidad subaguda, mejor actividad contra organismos gram-negativos, niveles de cresta más elevados en la sangre y una actividad protectora levemente mejor en el ratón.

Mediante el método descrito en la patente belga No. 715.638, se separa y se aísla las varias fracciones del Complejo W847, y la Fracción A en particular, mediante técnicas cromatográficas tediosas y prolongadas. Además, la Fracción A (es decir Antibiótico W847-A) está presente en el Complejo W847 producido en el caldo de fermentación del proceso descrito en dicha patente belga en solamente una cantidad relativamente pequeña, es decir, menor del 10%, siendo el componente principal W847-C₁. En consecuencia, aún usando esta técnica tediosa de aislación, se obtiene W847-A solamente con pequeños rendimientos. En consecuencia, resulta deseable la búsqueda de un procedimiento mediante el cual se obtenga W847-A con mejor rendimiento, utilizando técnicas más simples.

Se ha comprobado ahora que cada uno de W847-B, W847-C₁ y W847-C₂ contiene por lo menos un grupo hidrolizable y que, por eliminación del mismo, se obtiene W847-A.

Por consiguiente, de acuerdo con la presente invención, se obtiene W847-A con buenos rendimientos mediante un procedimiento simple que comprende hidrólisis selectiva de un substrato que contiene W847-B, W847-C₁ y W-847-C₂ de manera de convertirlo a W847-A y la aislación de W847-A o de una fracción enriquecida con W847-A, en forma libre o bajo la forma de un derivado funcional. De preferencia, se efectúa la hidrólisis selectiva bajo condiciones no ácidas, en particular como una hidrólisis alcalina controlada en un medio que tiene un pH comprendido en la gama de aproximadamente 9 a 12. Convenientemente se continúa la hidrólisis hasta que la



conversión queda sustancialmente completa.

Es particularmente conveniente aplicar el procedimiento de la presente invención al caldo de fermentación del procedimiento de la patente belga No. 715.638 sin aislación de ninguna de las fracciones, ni siquiera el Complejo W847, con respecto a dicho caldo. Sin embargo, también es posible aplicar el procedimiento de la presente invención al Complejo W847 aislado (que se obtiene por lo general extractando el caldo con un solvente inmiscible con agua y concentrando), o al Complejo W847-C todavía más aislado, o a cualquiera individual de los Antibióticos W847-B, W847-C₁ y W847-C₂, o a una mezcla que contiene dos o más fracciones del Complejo W847. Además, no se debe considerar a la presente invención como limitada a la conversión del Antibiótico Complejo W847, W847-B, W847-C₁ o W847-C₂, solamente cuando han sido producidos por utilización de *Micromonospora* sp. W847 var. NRRL 3274 ó var. NRRL 3275. En primer lugar, se puede utilizar otras variantes de *Micromonospora* sp. W847 o mutantes de las mismas producidos a partir de este organismo mediante agentes mutantes tales como por ejemplo radiación de alta frecuencia que incluye rayos X y ultravioleta, actinófagos y mostaza nitrogenada. En segundo lugar, otros micro-organismos pueden producir una o más fracciones de Antibiótico W847. En tercer lugar, fracciones de Antibiótico W847 sintéticamente producidas podrían ser similarmente hidrolizadas a W847-A. En otras palabras, el procedimiento de la presente invención es aplicable y es eficaz para convertir sustancias antibióticas W847-B, W847-C₁ ó W847-C₂ o sus mezclas a Antibiótico W847-A, independientemente de la manera en que se produce las primeras sustancias mismas.

Se puede identificar positivamente los materiales de partida de la presente invención sin referencia a su método de fabricación. El Complejo Antibiótico W847 posee un espectro antibacteriano que es sustancialmente como el indicado en la Tabla I, sustancialmente sin dis-



minución de la potencia después de contacto durante 24 hr a 37°C con cualquiera de las siguientes enzimas: tripsina, quimotripsina, pepsina, α -amilasa y penicilinasas.

5 Se puede identificar positivamente los componentes W847-A, W847-B, W847-C₁ y W847-C₂ por sus propiedades químicas y físicas de acuerdo con lo indicado en la Tabla II; sus espectros infrarrojos de acuerdo con lo ilustrado en las figuras 1, 2, 3 y 4, respectivamente, de la patente belga No. 715.638; sus espectros de resonancia magnética nuclear (RMN), de acuerdo con lo ilustrado en las figuras 5, 6, 7 y 8, 10 respectivamente, de la patente belga No. 715.638; y sus espectros antibacterianos de acuerdo con lo indicado en la Tabla I. Se obtiene los espectros infrarrojos en aceite mineral (Nujol) y las crestas de absorción más importantes están indicadas en la Tabla III con las siguientes designaciones: F = fuerte, Md = moderada, D = débil, MF = 15 muy fuerte, Md-F = moderada a fuerte, an = ancha, ag. = aguda, esc. = escalón y b.l. = banda lateral. Se observa los espectros de RMN en un espectómetro Varian A-60-A en una solución (aproximadamente 0,4 ml, aproximadamente 20 mg/ml) de la muestra de cada frac- 20 ción en cloroformo deuterado. Se registra los espectros en partes por millón (p.p.m.) en tetrametilsilano, que es el patrón interno. En la Tabla I se determina la susceptibilidad de los organismos de ensayo a los antibióticos mediante un ensayo de dilución en tubo en un caldo de levadura y carne de vaca ajustado a pH 8,0 mediante hidróxido de sodio.

T A B L A I

Espectro antibacteriano del Antibiótico Complejo W847 y las fracciones A, B, C₁, C₂ y Complejo C

Concentración inhibitoria mínima
Antibiótico W847

Micro-organismos	Base del complejo	HCl del complejo	Fracción A	Fracción B	Fracción C ₁	Fracción C ₂	Complejo C
Bacillus megatherium DA 7064	0,3	0,3	0,6	1,2	0,3	0,6	0,3
Bacillus subtilis ATCC 6633	0,03	0,3	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 DA 150	6,0	6,0	>2,7	>2,7	12,0	>2,7	>2,7
Enterococcus sp. DA 800	0,3	0,75	0,6	0,6	0,3	0,08	0,3
Enterococcus sp. DA 801	0,3	0,75	0,6	0,6	0,3	0,6	0,3
Enterococcus sp. Da 802	0,3	>1,0	0,2	0,2	0,3	0,03	0,3
Sarcina lutea ATCC 9341	0,0075	0,0075	0,005	0,005	0,0075	0,0005	0,00075
Staphylococcus aureus ATCC 12715	0,3	0,75	0,08	0,2	0,3	0,005	0,03
Staphylococcus aureus ATCC 6538P	0,3	0,03	0,6	0,2	0,03	0,005	0,03
Staphylococcus aureus ATCC 11631 (1)	0,3	0,075	0,6	0,6	0,3	0,6	0,3
Staphylococcus aureus (Gray)	0,3	0,3	0,6	0,6	0,3	0,6	0,5
Staphylococcus aureus DA 2001	0,03	0,3	0,6	0,2	0,03	0,03	0,03
Staphylococcus aureus DA 2003	0,03	0,03	0,6	0,6	0,075	0,6	0,3
Staphylococcus aureus DA 2010	0,3	0,3	9,6	0,6	0,3	0,2	0,25
Staphylococcus aureus DA 2014	0,3	0,3	0,6	0,6	0,03	0,6	0,03
Staphylococcus aureus DA 2018	0,3	0,3	0,6	0,6	0,075	0,1	0,1
Staphylococcus aureus DA 2032	0,075	0,3	0,6	0,6	0,075	0,08	0,08
Staphylococcus aureus DA 2033 (2)	>16	>16	>2,7	>2,7	>32,0	>2,7	>2,7
Streptococcus faecalis DA 20	0,3	0,3	0,3	0,1	0,3	0,005	0,075
Streptococcus pyogenes DA 21	0,75	>1,0	5,0	5,0	0,3	0,6	0,3
Streptococcus pyogenes DA 11	0,3	-	0,6	0,2	0,3	0,03	0,3
Streptococcus pyogenes DA 12	-	-	0,2	0,2	-	0,03	-

Cont.



16

<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 10143	0,75	0,3	5,0	5,0	0,3	0,05	0,3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	6,0	> 16	6,0	12,0	12,0	12,0	12,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	12,0	> 16	6,0	24,00	12,0	24,0	12,0
<i>Proteus vulgaris</i> DA 121	6,0	> 16	12,0	24,0	24,0	24,0	24,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 8689	6,0	12	6,0	12,0	6,0	6,0	6,0
<i>Salmonella schottmulleri</i> DA 10	6,0	12,0	6,0	12,0	12,0	12,0	12,0

Medio: Caldo de levadura - carne de vaca (pH 8,0).

Complejo = mezcla de componentes A, B, C₁ y C₂.

- 1) Cepa resistente a la penicilina.
- 2) Cepa resistente a la eritromicina.



T A B L A 2

Propiedades químicas y físicas de las fracciones del Antibiótico W847.

	Fracción A		Fracción B		Fracción C ₁		Fracción C ₂	
Rotación óptica $[\alpha]_D^{25}$ 1% en etanol	- 90°		- 92°1		- 104°		- 102°	
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	
Eq. de neutralización	442		490		488		492	
<u>Análisis elemental</u>								
Carbono	Hallado 60,23	Calculado 60,25	Hallado 58,90	Calculado 58,95	Hallado 60,23	Calculado 59,98	Hallado 60,54	Calculado 60,35
Hidrogeno	9,28	9,19	8,94	9,03	8,93	8,81	8,60	8,89
Nitrógeno	3,30	3,19	2,88	2,99	2,94	2,92	2,87	2,87
Oxígeno (por diferencia)	27,19	27,36	29,18	29,03	27,90	28,30	27,99	27,89
Fórmula empírica	C ₄₄ H ₈₀ N ₂ O ₁₆		C ₄₆ H ₈₂ N ₂ O ₁₆		C ₄₈ H ₈₄ N ₂ O ₁₇		C ₄₉ H ₈₆ N ₂ O ₁₇	
Peso molecular	877,10		919,14		963,17		975,20	

1) Monohidrato



T A B L A 3.

Espectros infrarrojos de fracciones del Antibiótico W847

Fracción A		Fracción B		Fracción C ₁		Fracción C ₂	
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	Md-F-an.	2,87	Md	2,82	b.l.	2,83	D-Md
3,35-3,50	Nujol	2,97	esc.	2,87	D	3,33-3,48	Nujol
5,77	F.	3,35-3,50	Nujol	3,35-3,50	Nujol	5,70	F
5,82	(Artef. del instrumento)	5,72	F	5,72	F	5,80	(artef. del instrumento)
5,88	Mf-F	5,83	F	5,87	D-Md	5,88	esc.
6,82	Nujol	6,82	Nujol	6,82	Nujol	6,80	Nujol
7,24	Nujol	7,25	Nujol	7,25	Nujol	7,23	Nujol
7,36	b.l.	8,05	F	7,45	Md	8,00	F
7,82	Md-F-ag.	8,45	F, an.	7,57	Md	8,53	F, an.
8,45	MF, an.	8,59	F	7,82	Md	8,93	F
8,92	MF	8,94	F	8,03	F	9,08	esc.
9,02	MF	9,30	F	8,13	MF	9,27	Md-F
9,12	MF	9,62	F	8,60	F	9,65	F
9,32	Md-F	9,91	Md-F	8,94	Md-F	10,00	Md-F ancha
9,53	MF	10,02	Md-F	9,05	F	10,38	Md
9,63	MF	10,29	Md	9,56	F	10,97	Md
9,98	MF	10,84	D-Md	9,70	F	11,15	Md
10,27	F	11,08	D-Md	10,13	Md-F	11,52	D
11,02	Md-F	11,20	D-Md	10,48	Md	11,92	D-Md
11,17	Md-F			11,02	D-Md		
				11,18	D-Md		





Según resulta evidente de acuerdo con la Tabla I, el Antibiótico W847-A manifiesta una gama amplia de actividad antimicrobiana contra micro-organismos tanto gram-positivos como 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 enfermedades. Varias especies de Staphylococcus y Streptococcus son los organismos responsables que causan la mastitis bovina. Se controla fácilmente estas especies y se las trata mediante Antibiótico W847-A después de un régimen de administración relativamente breve. El Antibiótico W847-A es también activo 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 los seres humanos, como así también en animales domésticos tales como ganado vacuno, caballos, ovejas, cerdos, perros y gatos, y se los puede controlar y tratar eficazmente mediante el Antibiótico W847-A.

El Antibiótico W847-A, suspendido en carboximetil celulosa acuosa al 0,5% y dispersado por ultrasonificación es activo, por administración subcutánea, en el ratón contra S. aureus Gray con DP_{50} (dosis protectora para 50% de la población ensayada) de 20 mg/kg y contra P. aeruginosa con una DP_{50} de 161 mg/kg. La DL_{50} en el ratón por vía subcutánea es 7000 mg/kg.

Se puede usar también el Antibiótico W847-A para limpiar y esterilizar vajilla de laboratorio, instrumentos quirúrgicos y similares. Se le puede usar también en combinación con jabones y detergentes para limpiar y sanear áreas utilizadas para preparación de alimentos, tales como cocinas, comedores y similares.

Aunque no se debe considerar limitada la presente invención por



la siguiente teoría de la química en que se basa el procedimiento de conversión de la presente invención, parece involucrar reacciones de saponificación sorprendentemente selectivas. Mas específicamente, parece ser que el Antibiótico W847 contiene un anillo de lactona y por lo menos cuatro grupos hidroxilo esterificables. En el Antibiótico W847-A estos cuatro grupos hidroxilo aparentemente no se esterifican. Las fracciones antibióticas W847-B, W847-C₁ y W847-C₂ resultan ser ésteres de monoacetato, diacetato y monoacetato-monopropionato del Antibiótico W847-A. Bajo las condiciones de hidrólisis selectiva del procedimiento de la presente invención, los ésteres aparentemente se saponifican a los grupos hidroxilo libre sin causar escisión del anillo de lactona o cualquier otra degeneración o redistribución de la macroestructura del antibiótico. Esto es sorprendente, en el sentido de que hubiera sido de esperar la escisión del anillo de lactona bajo estas condiciones.

Se obtiene como resultado una descomposición significativa, y por lo tanto un pobre rendimiento del producto deseado, cuando se lleva a cabo la hidrólisis bajo condición de pH ácido o a un pH por encima de aproximadamente 12. La hidrólisis a un pH de por lo menos 7, pero menor de aproximadamente 9, es demasiado lenta para resultar práctica. Este último punto queda en evidencia por el hecho de que la mezcla de fermentación en el procedimiento de la patente belga No. 715.638 se encuentra dentro de esta gama y sin embargo, después de los varios días necesarios para la fermentación, está presente una cantidad solamente pequeña de W847-A (menos del 10%).

Según se mencionó más arriba, se prefiere la hidrólisis directa del caldo de fermentación del procedimiento de la patente belga No. 715.638. Entre otras ventajas, este procedimiento permite separar el Antibiótico W847-A con respecto al caldo por extracción con aproximadamente un quinto del volumen del caldo de cloruro de metileno o solvente equivalente. Por otra parte, cuando se aísla primeramente el antibiótico Complejo W847 con



respecto al caldo, requiere aproximadamente una cantidad de solvente que es dos veces el volumen del caldo. Se puede filtrar el caldo ya sea antes o después de llevar a cabo el procedimiento de hidrólisis de la presente invención. En general se agrega, antes de la filtración, un auxiliar de filtro tal como Celite o Supercel. Después de hidrólisis directa del caldo de fermentación de acuerdo con la forma de realización preferida descrita más arriba, de la presente invención, se extrae convenientemente el caldo filtrado con un solvente orgánico polar inmiscible con agua tal como cloruro de metileno, y se concentra el extracto.

5
10
15
20
Cuando no se lleva a cabo la reacción de hidrólisis selectiva sobre el caldo entero, el sistema solvente deberá contener de preferencia un componente orgánico polar miscible con agua a fin de aumentar la solubilidad de los componentes del Antibiótico W847 y aumentar así el régimen de hidrólisis. El metanol representa un componente conveniente de esta clase. Otros solventes orgánicos miscibles con agua, de esta clase, con etanol, isopropanol, acetona y dimetilacetamida. Naturalmente, dicho componente polar debe ser de la clase que no se saponifica él mismo, bajo las condiciones de reacción. Después de la hidrólisis, se concentra y/o extracta convenientemente el medio de hidrólisis, y se cristaliza entonces el W847-A a partir de los concentrados.

En una u otra de las formas de realización descritas más arriba, se puede facilitar la cristalización mediante la adición de un solvente en el cual el Antibiótico W847-A tiene una solubilidad limitada, como por ejemplo acetona.

25
Los materiales apropiados para hacer básico el medio de hidrólisis incluyen hidróxido de amonio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio y similares. También en este caso, la cantidad agregada es de preferencia tal que produce un pH comprendido dentro de la gama de aproximadamente 9 a 12.

30
Se puede aumentar el régimen de hidrólisis trabajando a tempera-



turas elevadas. Sin embargo, el uso de estas temperaturas elevadas no es práctico, cuando se hidroliza el caldo directamente, o cuando se usa hidróxido de amonio para hacer básico al medio.

5 Se puede verificar en varias maneras que la hidrólisis ha quedado convenientemente completa. Un procedimiento conveniente utiliza cromatografía en capa delgada y consiste en separar una alícuota de 10 ml de la mezcla de reacción y, si fuera necesario, agregar suficiente ácido sulfúrico para reducir el pH dentro de la gama de aproximadamente 9,0 a 9,5. Se extrae entonces la alícuota con 15 ml de acetato de etilo y se concentra el extracto hasta sequedad bajo presión reducida. Se disuelve entonces el residuo en 0,2 ml de etanol al 95% y se salpica 20 μ l (20 λ) de esta solución sobre placas GF de gel de sílice en capa delgada (Analtech, Inc.) utilizando un sistema solvente de 40% de metanol-60% de cloroformo. En una manera similar se salpica una cantidad semejante de una muestra de Antibiótico W847-A auténtico. Después de 15 a 30 min. se rocia las placas con una muestra de ácido sulfúrico concentrado-metanol (1:1 v/v) y se revela por calentamiento a 105°C durante varios minutos. Se compara la posición y color de los dos puntos.

10

15

El Ejemplo 1 ilustra la preparación del Antibiótico Complejo W847 por fermentación, y los Ejemplos 2 y 3 ilustran medios para extraer el Complejo del caldo de fermentación. Estos procedimientos están descritos en la ya mencionada patente belga No. 715,638.

20

Los siguientes Ejemplos ilustran el procedimiento de transformación de la presente invención, tal como se le aplica al caldo de fermentación de la patente belga No. 715.638 (Ejemplo 4) al Complejo W847 aislado (Ejemplo 5) y al Complejo W847-C aislado (Ejemplo 6).

25

Todas las partes son en peso a menos que se indique lo contrario.

EJEMPLO 1

Producción del Antibiótico Complejo W847

30 Se agrega 0,5 ml de cultivo liofilizado de Micromonospora sp. W847



a un frasco de 2 lt que contiene 500 ml del siguiente medio que ha sido ajustado a pH 7,5 mediante hidróxido de sodio diluido antes de la esterilización:

5	Bacto-Extracto de carne de vaca (Difco)	3,0 g
	Bacto-Triptosa (Difco)	5,9 g
	Dextrosa	1,0 g
	Almidón (patata)	24,0 g
	Bacto-Extracto de Levadura (Difco)	5,0 g
	Carbonato de calcio	2,0 g
10	Agua corriente	1000,0 ml

Se incuba el frasco y su contenido durante 72 hr a 28°C en un sacudidor rotativo (280 r.p.m., carrera 5 cm.).

A un fermentador se agrega 10 lt del siguiente medio de producción estéril ajustado a pH 7,15 a 7,25 antes de la esterilización:

15	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
20	Antiespumante G.E.-60 (General Electric Company)	Cantidad necesaria
	Agua corriente, c.s.p.	10,0 lt.

Se incula este fermentador con 500 ml del cultivo de siembra de 72 hr preparado de acuerdo con lo descrito más arriba. Se lleva la temperatura del medio de fermentación a 31°C y se agita a 500 r.p.m. mientras se introduce una 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 hr y a 700 r.p.m. después de 48 hr. Se termina la fermentación al término de 69 hr.

30 Al término de este período, la potencia del antibiótico así pro-



ducido alcanza una cresta que permanece sustancialmente constante. A través de toda la fermentación, el pH de la mezcla de fermentación permanece sustancialmente en la gama de 7,2 a 8,2. El volumen de las células compactadas alcanza un valor constante de 3,5 a 4,5 ml. El caldo entero proporciona un diámetro de zona de 15 a 25 mm cuando se ensaya en disco contra S. aureus o P. aeruginosa.

EJEMPLO 2

Extracción del Antibiótico Complejo W847 (técnica cromatográfica.)

Se ajusta 60 lt de caldo entero, preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, a pH 5 mediante hidróxido de sodio acuoso diluido. Se extrae en dos volúmenes de acetato de etilo por cada volumen de caldo. Se separa la fase de solvente y se la concentra bajo presión reducida de manera de obtener un residuo aceitoso (aproximadamente 30,0 g). Este residuo aceitoso, a una dilución 1/20, proporciona un diámetro de la zona de inhibición 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 las siguientes técnicas:

Se prepara una columna utilizando 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 mg/hr. Se recoge fracciones de 50 ml. Se combina fracciones de acuerdo con su actividad antibacteriana (determinada mediante ensayos sobre discos de agar contra S. Aureus ATCC 6538P). A las fracciones que tienen actividad máxima se las concentra hasta sequedad.

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-acetona (aproximadamente -50°C) y se deja reposar durante 20 min. Se deja retornar



la mezcla hasta 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 Antibiótico Complejo W847 purificado.

EJEMPLO 3

5 Extracción de Antibiótico Complejo W847 (técnica de extracción con ácido)

Se ajusta 37 lt del caldo, obtenido de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 1 a pH 9,5 mediante hidróxido de sodio acuoso al 50%. Se extrae en dos volúmenes de acetato de etilo por cada volumen de caldo y se evapora el extracto hasta un volumen de 2150 ml. Se extrae una alícuota de 500 ml., del concentrado de acetato de etilo, dos veces, con porciones de 250 ml de ácido clorhídrico al 0,5% (0,14N) o de ácido sulfúrico 0,1N. A los extractos ácidos combinados se los hace levemente alcalinos mediante la adición de hidróxido de sodio acuoso al 5% (aproximadamente pH 8,5 a 9,0) y se extrae dos veces con porciones de acetato de etilo de 250 ml. Se combina los extractos de acetato de etilo y se los concentra bajo presión reducida hasta sequedad.

EJEMPLO 4

Producción de Antibiótico W847-A por hidrólisis directa del caldo de fermentación.

Se agrega hidróxido de amonio concentrado al caldo de fermentación total descrito en el Ejemplo 1 para hacer a la mezcla 1N en amoníaco, pH aproximadamente 10,8 (71,3 ml de amoníaco acuoso concentrado por cada litro de caldo). Se deja reposar a la temperatura ambiente durante 3 a 4 días. Se agrega Supercel al caldo y se filtra la mezcla. Se extrae el caldo filtrado una vez con 1/5 de su volumen de cloruro de metileno. Se retrolava el extracto de cloruro de metileno una vez con agua. Se concentra la solución de cloruro de metileno hasta bajo volumen y se agrega acetona y se cristaliza. Se recoge por filtración el W847-A cristalino y se le lava con acetona enfriada con hielo. Se combina los lavados con el licor madre y se los concentra para obtener cosechas adicionales. Se



seca el producto durante la noche a 50° C en un horno bajo presión reducida, punto de fusión aproximadamente 250°C (descomposición).

EJEMPLO 5

Preparación de W847-A por hidrólisis del Complejo W847.

5 Se disuelve una parte de Complejo W847 (al cual se obtuvo de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 3) en 7 partes de metanol y se agrega 3 partes de agua que contiene 0,67 parte de hidróxido de amonio concentrado, obteniéndose una solución de metanol acuoso al 70% que es 1N en amoniaco. Se deja reposar esta solución a la temperatura ambiente durante 14 días. Se agrega 15% de Darco (en peso del material de partida), se agita a la temperatura ambiente. durante 30 min, se filtra y se concentra aproximadamente 1/3 de su volumen bajo presión reducida. Se extrae dos veces en 1/2 volumen de cloruro de metileno. Se concentra los extractos combinados de cloruro de metileno hasta bajo volumen y se agrega acetona y se cristaliza. Se recoge por filtración el producto cristalino y se le lava con acetona enfriada con hielo. Se combina los lavados con el licor madre y se los concentra de manera de obtener una segunda cosecha. Se seca el producto durante la noche a 50°C en un horno a presión reducida, punto de fusión aproximadamente 250°C. (descomposición).

10

15

20

EJEMPLO 6

Preparación de W847-A por hidrólisis del Complejo W847-C.

A) Preparación del Complejo W847-C.

Se disuelve 542 g de Complejo W847 (obtenido de acuerdo con lo descrito en el ejemplo 3) 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 aproximadamente a 2,0 lt. Se prepara una lechada de aproximadamente 80 lt de hielo y agua, y con vigorosa agitación, se agrega la solución acetónica.

25

30



Se deja que la temperatura de la suspensión resultante aumente aproximadamente a 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 modo de obtener aproximadamente 212 g de Antibiótico Complejo W-847-C. Se puede obtener adicional (aproximadamente 85 g) mediante concentración del licor madre.

B) Hidrólisis de la Fracción W847-C.

A una solución de 250 g de esta Fracción W847-C en 1900 ml de metanol, se agrega 25 g de Darco y se agita la mezcla a la temperatura ambiente durante 30 min. y luego se la filtra. Al filtrado se agrega 166,5 ml de amoníaco acuoso concentrado (15N) y se lleva el volumen total hasta 2500 ml mediante metanol. A la solución, que es ahora 1N en amoníaco, se la mantiene a la temperatura ambiente durante 14 días y se la trata entonces con 25 g de Darco de acuerdo con lo explicado más arriba. A la solución filtrada se la concentra bajo presión reducida y se agrega acetona para obtener un producto cristalino. Se calienta la acetona sobre baño de vapor durante un breve tiempo para permitir una disolución completa de las impurezas y una cristalización óptima del producto deseado, y luego se enfría y se filtra el producto. La concentración de licor madre proporciona cosechas adicionales. Se lava el producto cristalino W847-A con acetona fría y se seca a 50°C en una horno bajo presión reducida.

El rendimiento total de Antibiótica W847-A es 149,6 g (60% en peso), punto de fusión aproximadamente 250°C (descomposición). Se puede recrystalizar el W847-A en acetona de manera de obtener material analítico, punto de fusión 255-259°C (descomposición), $[\alpha]_D^{25} = -90^\circ$ (etanol); peso molecular hallado: 868 (en benceno); titulación: equivalente de neutralización = 435, pKa = 9,0; Anal. hallado: C. 60,23; H, 9,28; N, 3,30 (término medio de dos determinaciones).

De acuerdo con lo descrito más arriba, se puede usar directamente



el Antibiótico W847-A mismo. Sin embargo, también se contempla que se puede formar derivados del W847-A así producido, mediante esterificación, formación de sal y similares, para llevar al óptimo las propiedades físicas y/o farmacológicas deseadas.

5. Ejemplos de derivados funcionales apropiados están descritos en la patente belga Nº 715.638. Para los entendidos en esta materia resultarán evidentes numerosas otras variantes comprendidas dentro del principio de la presente invención.

10. En resumen, la Patente de Invención que se solicita, recaerá sobre las siguientes:

366730



REIVINDICACIONES

Descrito el objeto del presente invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones con prioridad de la solicitud de patente estadounidense serial núm. 726.738 del 6 de mayo de 1968.

5

1. Un procedimiento para la preparación del antibiótico W847-A y de sus derivados aceptables farmacéuticamente, tal como sales y ésteres, caracterizado porque comprende la hidrólisis selectiva de un substrato que contiene por lo menos uno de los antibióticos denominados W847-B, W847-C₁ y W847-C₂ de manera de convertirlos a W847-A y aislación de W847-A en forma libre o bajo forma de sus derivados, tal como sales y ésteres.

10

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que se efectúa la hidrólisis bajo condiciones no ácidas.

15

3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en que se lleva a cabo la hidrólisis a un pH comprendido en la gama de aproximadamente 9 a 12.

20

4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en que se ajusta el pH dentro de la gama de aproximadamente 9 a 12 mediante la adición, antes de la hidrólisis, de compuestos inorgánicos básicos y de preferencia amoníaco, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, carbonato de sodio o bicarbonato de sodio.

5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en que el medio de hidrólisis es 1N en amoníaco.

25

6. Un procedimiento, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en que se aplica la hidrólisis a un caldo de fermentación, que contiene el complejo W847, de prefe-



rencia después de filtración de dicho caldo.

7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en que se agrega un auxiliar de filtro antes de la filtración del caldo de fermentación.

5 8. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en que se aplica la hidrólisis a una sustancia, o mezcla de sustancias, aislada de un caldo de fermentación que contiene Complejo W847.

10. 9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en que se lleva a cabo la hidrólisis a temperatura elevada, en un medio que no contiene amoníaco.

15 10. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 8 ó 9, en que la solución contiene un solvente orgánico polar inerte miscible con agua, de preferencia metanol, etanol, isopropanol, acetona o dimetilacetamida.

11. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que se somete el material de partida a hidrólisis hasta que dicha hidrólisis queda substancialmente completa.

20 12. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende extraer el medio de hidrólisis, después de la hidrólisis, con un solvente orgánico, de preferencia cloruro de metileno, concentrar el extracto y cristalizar Antibiótico W847-A con respecto al extracto concentrado.

25 13. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en que se facilita la cristalización mediante la adición de un solvente en el cual el W847-A es escasamente soluble y de preferencia acetona.

14. Un procedimiento para la preparación del antibiótico W847-A.

30 Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 21 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a

3 MAYO 1969

D. P. Firmador JOSE RODRIGUEZ