



Case 951A-12

368.762

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

por "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN PRODUCTO ANTIBIOTICAMENTE ACTIVO DENOMINADO ANTIBIOTICO 66-40" a favor de la firma suiza SCHERICO LTDA., residente en LUCERNA (Suiza).

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

- La presente invención se relaciona con un nuevo antibiótico de espectro amplio denominado Antibiótico 66-40, que tiene un efecto adverso sobre el crecimiento de bacterias gram-positivas y gram-negativas, con un método microbiológico para su producción, y con composiciones farmacéuticas que contienen este antibiótico. Se puede preparar, aislar y usar el antibiótico en su forma libre o en la forma de sus derivados funcionales farmacéuticamente aceptables, distintos de las sales de adición de ácido, en forma libre o en la forma de sus solvatos.
- 5.
- 10.

El Antibiótico 66-40 es un elaborado biosintético al cual se obtiene cultivando, en un medio nutritivo acuoso,

BAD ORIGINAL



una cepa de Micromonospora productora del Antibiótico 66-40.

- El micro-organismo preferido que se utiliza, de acuerdo con la presente invención, para la producción del nuevo antibiótico ha sido denominado Micromonospora inyoensis (al cual en lo que sigue se denomina a veces M. inyoensis). Esta especie fue aislada de una muestra de suelo tomada de Inyo National Forest de las White Mountains de California. Una de las características de su cepa es su capacidad para producir el Antibiótico 66-40. A un cultivo del organismo vivo se le ha hecho parte
5. de la colección permanente de The Northern Utilization and Research Division, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, donde se ha asignado la denominación de acceso NRRL 3292. Subcultivos de M. inyoensis NRRL 3292 son fácilmente obtenibles a pedido para el público de
10. dicha repartición M. inyoensis es aeróbico y crece bien sobre la superficie de una variedad de medios nutritivos sólidos y líquidos. Manifiesta un crecimiento y producción de antibiótico especialmente buenos bajo condiciones aeróbicas sumergidas.
- 15.

20. M. inyoensis es diferenciable de otras especies de Micromonospora por una variedad de parámetros taxonómicos.

- Después de 14 días de incubación a 24-26° C. sobre un medio de agar que comprende 3% de NZ Amine Type A (Sheffield Chemical Company, Norwich, Nueva York), 1% de dextrosa y 1,5%
25. de agar, se observa que el crecimiento es solamente entre regular



- y pobre. Macroscópicamente no hay micelio aéreo evidente. Ocasionalmente aparecen tardíamente unas pocas colonias bien desarrolladas en el área de inoculación. Sobre algunas placas, se observa un pigmento difundible de color castaño rojizo débil,
5. asociado con las colonias. [Al describir las formaciones de color para esta observación y para otras, se emplea el siguiente sistema y referencias. Las designaciones de color consisten en dos indicadores. El primero es un nombre de color tomado de "Descriptive Color Name Dictionary", por Taylos, Knoche y
10. Granville, publicado en 1950 por Container Corporation of America, USA, con un número de color que corresponde al nombre del color, habiéndose tomado el número de "The Color Harmony Manual", 4a Edición, publicado en 1958 por The Container Corporation of America. El segundo indicador consiste en un
15. nombre de color y número que se refieren al sinónimo o cuasisinónimo que se encuentra en National Bureau of Standards (USA), Circular 553, Noviembre 1, 1955]. El color de la superficie de la colonia varía desde Tile Red g5ne - Strong Brown 55 hasta Brown Mahogany m6pi. Microscópicamente el micelio
20. es largo, ramificado, regular y no tabicado, según se observa mediante microscopía por contraste de fase. El micelio tiene un diámetro de aproximadamente 0,5 μ . Los esporos nacen individualmente sobre esporóforos simples de un diámetro de 1,0 a 1,5 μ . Los esporos son de pared áspera y su forma es entre
25. ovoide y esférica.



M. inyoensis crece bien entre 28 y 37° C.; no se produce crecimiento a 50° C. El crecimiento es pobre sobre un medio de glucosa asparagina-agar. Una colonia en crecimiento de *M. inyoensis* hidroliza gelatina, leche, almidón, y reduce nitrato a nitrito, cuando se aplica estos ensayos de acuerdo con Gordon y otros, J. Bacteriology 69, 147 (1956) y 73, 15 (1957). Además, la sacarosa es utilizable como fuente de carbono.

En la Tabla A se indica características adicionales de cultivo de *M. inyoensis*.

TABLA A

	<u>Medio</u>	<u>Características</u>
15.	Agar de Bennett	Crecimiento moderado - Color: Castaño herrumbre-g5pg; castaño fuerte-55
	Agar de Emerson	Crecimiento regular - Color: rojo ladrillo-g6ng; castaño rojizo moderado-43
	Pasta de tomate-harina de avena Agar	Crecimiento regular
20.	Glucosa asparagina Agar	Crecimiento pobre
	Glucosa Extracto de levadura Agar	Buen crecimiento - Color: castaño rosado-g7ni; rojo grisaseo oscuro 20 (pigmento difundible castaño débil producido por algunas colonias)
	Rodaja de patata	Crecimiento pobre, pero mejora cuando se agrega carbonato de calcio de calidad de reactivo
25.	Agar de Czapek	Crecimiento regular



Tirosina Agar	Crecimiento regular, no hay pigmento difundible
Peptona Hierro Agar	Crecimiento regular, sin pigmento difundible

5. M. inyoensis es capaz de utilizar una variedad de fuentes de carbono y nitrógeno. En la Tabla B se indican observaciones sobre la utilización de carbohidratos. Se observa una estimación visual del grado de crecimiento en medio que consiste en 0,5% de extracto de levadura, 1% de carbohidrato y 10. 1,5% de agar, todo en agua destilada.

TABLA B

Utilización de Carbohidratos

	<u>Carbohidrato en el medio</u>	<u>Crecimiento</u>
15.	Testigo	pobre
	L-arabinosa	pobre
	D-glucosa	bueno
	D-galactosa	regular a pobre
20.	β -lactosa	regular a pobre
	D-levulosa	pobre
	rafinosa	pobre
	L-ramnosa	pobre
	almidón	bueno
25.	sacarosa	bueno



	D-xilosa	regular a pobre
	inositol	pobre
	D-manitol	pobre
	d(-)-arabinosa	pobre
5.	dulcitol	pobre
	D-ribosa	regular
	α-melibiosa	pobre
	D(+)-melizitosa	pobre
	glicerol	pobre

10.

En la Tabla C la utilización de nitrógeno está indicada de acuerdo con lo determinado por estimación visual del crecimiento sobre placas de agar en un medio que consiste en 1% de glucosa, 1,5% de agar y una fuente de nitrógeno como la indicada, todo en agua destilada.

15.

TABLA C

	<u>Fuente de nitrógeno</u>	<u>Crecimiento</u>
20.	1% NZ Amina Tipo A	Regular a moderado
	0,5% levadura	bueno
	1% asparagina	pobre
	1% ácido glutámico	pobre
	1% nitrato de amonio	pobre

25.

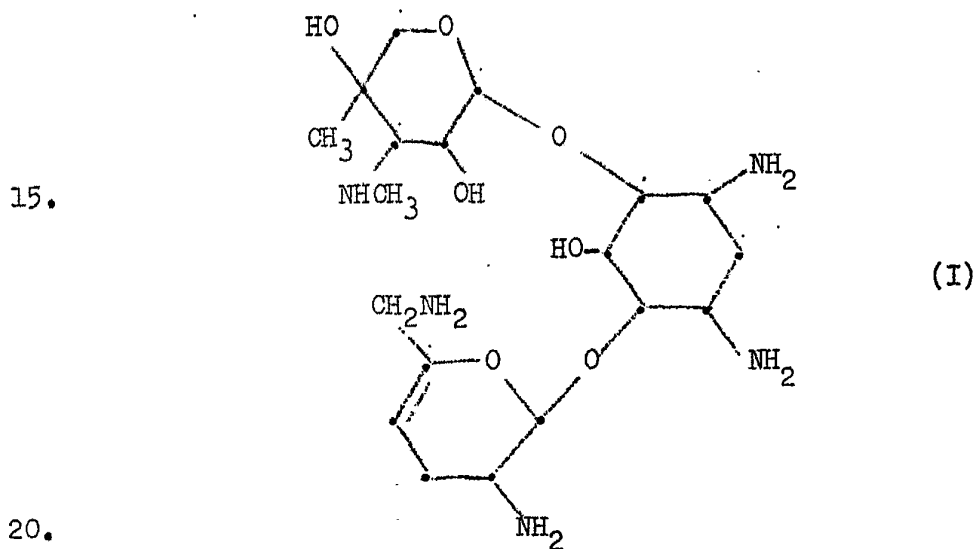
Se produce el Antibiótico 66-40, el nuevo compuesto de la presente invención, cuando se hace crecer el micro-organismo elaborante M. inyoensis en un medio nutritivo acuoso



bajo condiciones aeróbicas, de preferencia sumergidas, de acuerdo con lo que se describe más adelante.

5. El Antibiótico 66-40 es un pseudo-oligosacárido básico al cual se distingue fácilmente de otros pseudo-oligosacáridos por su estructura química, y sus propiedades biológicas, físicas y químicas, de acuerdo con lo que se describe aquí.

10. En base a los datos físicos y químicos que se dan más adelante, se cree que el Antibiótico 66-40 posee la siguiente estructura química aproximada aunque no se debe deducir de ella asignaciones estereoquímicas:





El Antibiótico 66-40 tiene un espectro característico de absorción infrarroja en aceite mineral (Nujol) como el que se ilustra en la figura 1, donde las abcisas indican la longitud de onda en micras y las ordenadas la transmitancia en %. Las partes de absorción más significativas están tabuladas en la Tabla D, con las siguientes denominaciones: F = fuerte, M = mediano, D = débil, anc = ancho y MD = muy débil.

10.

TABLA D

Bandas significativas de absorción infrarroja del Antibiótico 66-40

	2,98 u (M-F)	6,82 u (nujol)	10,46 u (M-F)
15.	3,05 u (M-F)	7,25 u (nujol)	11,97 u (M)
	3,16 u (M-F)	8,77 u (M-F)	12,75 u (MD)
	3,35 u-3,50 u (nujol)	9,00 u (M-F)	13,45-13,90 u (D, anc)
	5,93 u (D-M)	9,47 u (F)	
20.	6,25 u (M)	9,72-10,07 u (F, anc)	



El Antibiótico 66-40 tiene también un espectro característico de resonancia magnética nuclear (espectro RMN) según se ilustra en la figura 2. Se obtiene el espectro RMN mediante el uso de Varian A-60-A (Varian Associates, 611

5. Hansen Way, Palo Alto, California) con una solución (aproximadamente 0,4 ml.; concentración aproximadamente 20 mg/ml.) del antibiótico en óxido de deuterio (D₂O). Se registra el espectro en partes por millón p.p.m.) con la sal de sodio de ácido 3-(trimetilsilo)-propansulfónico como patrón interno.

10.

En la Tabla E se indica datos adicionales pertenecientes a ensayos cualitativos con el Antibiótico 66-40 (base libre) y sus constantes físicas.

TABLA E

15.

a) Reacciones de color

Sakaguchi	negativa
Almidón-ioduro de potasio	positiva
Ninhidrina	positiva
20. Cloruro estannoso	negativa
Molisch	negativa
Biureto	positiva

b) Constantes físicas

25.

$[\alpha]_D^{26}$ (C=0, 3% en H ₂ O)	+ 188,9°
Punto de fusión (monohidrato)	185° - 190° c.
Peso equivalente	92
PKa	8,0



	<u>Análisis Elemental</u>	<u>Hallado</u>	<u>Calculado para un Monohidrato</u>
	C	49,80	49,02.....
	H	8,20	8,44.....
5.	N	14,95	15,04 ..
	O (por diferencia)	27,05	27,50 ..

Análisis elemental corresponde a la fórmula $C_{19}H_{37}N_5O_7 \cdot H_2O$

Peso molecular determinado por espectrometría de masa

10. 447,26

Absorción ultravioleta transparente en la gama entre 220-400 m μ

c) Solubilidad de la base del Antibiótico 66-40 en diversos solventes

	<u>Solvente</u>	<u>Solubilidad (1)</u>
15.	Metanol	Escasamente soluble
	Acetona	Insoluble
	Cloroformo	Levemente soluble
	Eter	Insoluble
	Benceno	Insoluble
20.	Agua	Muy soluble

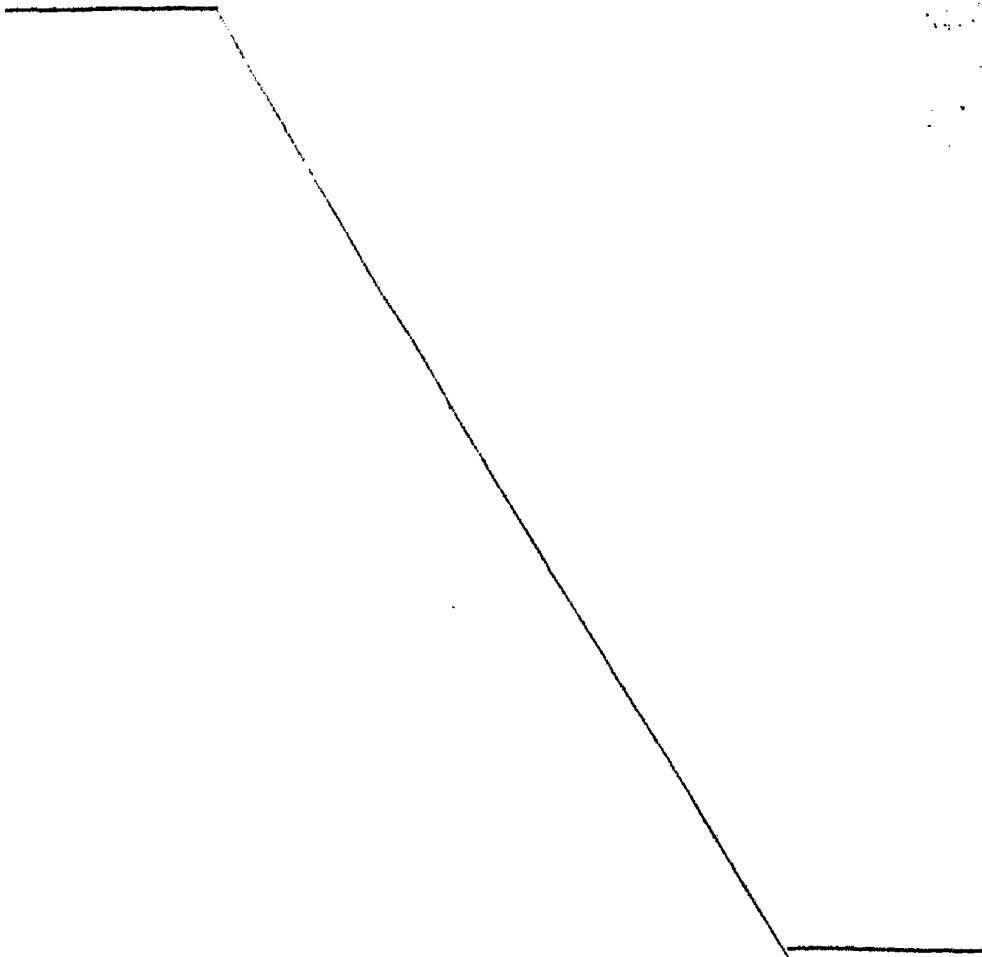
(1) La terminología está de acuerdo con U.S. Pharmacopia XVIII, pág. 8.

25. En la Tabla F se indica el espectro de masa de la base libre del Antibiótico 66-40. En esta tabla las columnas



encabezadas m/e representan la relación entre masa y carga, mientras que las columnas encabezadas Int.Rel. representan intensidad relativa y, según lo indica el nombre, se refiere a las intensidades de las crestas a las diversas relaciones

5. entre masa y carga (m/e), con relación a las de la cresta $m/e = 118$.





Según se mencionó más arriba, la presente invención se relaciona también con derivados farmacéuticamente aceptables del antibiótico 66-40, como por ejemplo sus solvatos... (por ejemplo hidratos), sales y productos de condensación...

5. con aldehidos y/o cetonas. Se comprenderá que se puede someter el antibiótico a más de un postratamiento; por ejemplo la presente invención abarca también los solvatos de sales del Antibiótico 66-40.

10. A continuación se describe en detalle algunos de estos derivados.

- Siendo básico, el Antibiótico 66-40 forma fácilmente sales no tóxicas con ácidos orgánicos e inorgánicos, como por ejemplo ácido clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, esteárico, propiónico, tartárico, maleico, benzoico y similares. Se puede usar también ácidos polibásicos parcialmente neutralizados (por ejemplo neutralizados con una base inorgánica como ser NaOH o una base orgánica). En general las sales de ácido mineral, como las formadas con ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares, son solubles en agua y se las puede obtener por concentración o liofilización de una solución acuosa de los mismos o por precipitación con un solvente orgánico miscible con agua, de preferencia un alcohol o cetona alifáticos inferiores. Sin embargo, corresponde observar que los clorhidratos del Antibiótico 66-40 manifiestan sustancial solubilidad en metanol y
- 15.
- 20.
- 25.



por lo tanto son atípicos. Se puede precipitar los clorhidra-
tos a partir de una solución acuosa mediante la adición de
una alquilo inferior cetona, tal como acetona. Titulando una
solución acuosa del Antibiótico 66-40 con una cantidad menor
5. que la estequiométrica de ácido, será posible formar sales
parciales de adición de ácido. Bajo la expresión "sal de
adición de ácido" deben considerarse abarcados aquí todos
estos compuestos.

10. Las sales de adición de ácido no tóxicas descri-
tas más arriba manifiestan sustancialmente el mismo espectro
antibiótico que la base nitrogenada libre, aunque difieren por
sus características de solubilidad.

15. El nuevo antibiótico y sus sales de adición de ácido
formen hidratos con agua y otros solvatos con solventes orgá-
nicos. Por lo tanto es evidente que, en los procedimientos
de aislación aquí descritos, se obtiene normalmente el anti-
biótico como un hidrato y se obtiene normalmente sus sales
de adición de ácido como solvatos de alcoholes o cetonas
20. alifáticos inferiores. Estos hidratos y solvatos son relati-
vamente estables, de modo que los productos aislados contienen
agua o solvente, por lo general aproximadamente 1 mol por
cada mol de antibiótico.

25. En la Tabla G se indican datos físicos de algunos
derivados de esta clase.



TABLA G

Constantes físicas de las sales del Antibiótico 66-40
Clorhidrato de Antibiótico 66-40 como solvato metanólico

[α]_D²⁵ (C = 1% en H₂O) +112,2°

5.	<u>Análisis Elemental</u>	<u>Hallado</u>	<u>Calculado</u>
	C	37,70	36,29
	H	7,15	7,00
	N	10,61	10,58
	Cl	25,60	26,78

10. El análisis corresponde a C₁₉H₃₇N₅O₇·5HCl·CH₃OH
 Absorción ultravioleta: transparente en la gama comprendida entre 220-400 mμ.

Sulfato del Antibiótico 66-40 como solvato metanólico

15. [α]_D²⁵ (C = 1% en H₂O) + 105,1°

	<u>Análisis elemental</u>	<u>Hallado</u>	<u>Calculado</u>
	C	32,52	33,14
	H	6,33	6,39
20.	N	9,32	9,66
	SO ₄	33,90	33,13

25. El análisis corresponde a (C₁₉H₃₇N₅O₇)₂·5H₂SO₄·2CH₃OH
 Absorción ultravioleta: transparente en la gama comprendida entre 220-400 mμ.



- Según se mencionó más arriba, el Antibiótico 66-40 forma también productos de condensación no tóxicos con aldehidos y/o cetonas, mediante procedimientos conocidos en la técnica. Los productos preferidos, probablemente bases de Schiff, aquí contemplados, son los preparados mediante condensación del antibiótico con aldehidos y/o cetonas que tienen hasta 12 átomos de carbono. Entre estos aldehidos y cetonas se incluyen compuestos alifáticos, alicíclicos, aromáticos y heterocíclicos. Además, se comprenderá que los aldehidos y cetonas que tienen una estructura de anillo cerrado pueden llevar sustituyentes tales como hidroxilo, halógeno, nitro, alcóxilo inferior, alcanciloxilo inferior y similares. Solamente a título ilustrativo y sin limitaciones, entre los aldehidos y cetonas aquí contemplados se encuentran: acetaldehido, acetona, metil etil cetona, crotonaldehido, furfural, ciclopentil-acetaldehido, vanilina, veratraldehido, benzofenona, benzaldehido, acetofenona, salicilaldehido, piridoxal y similares.

20. Corresponde hacer notas que estos productos de condensación no son estables en presencia de agua.

25. Según se mencionó más arriba, se produce Antibiótico 66-40 cuando se hace crecer el micro-organismo elaborante, M. inyoensis, en un medio nutritivo acuoso bajo condiciones aeróbicas, de preferencia sumergidas.



- Para cantidades limitadas de antibiótico, se puede utilizar cultivo en superficie en botellas o frascos para sacudimiento, en vez de condiciones sumergidas. Se hace crecer el organismo en un medio nutritivo que contiene una
5. fuente de carbono, por ejemplo un carbohidrato asimilable. Se requiere también un compuesto nitrogenado asimilable o material proteico. Las fuentes preferidas de carbono incluyen glucosa, maltosa, manosa, sacarosa, almidón, almidón de maíz y similares. Fuentes nitrogenadas preferidas incluyen licor
10. de maceración de maíz, extractos de levadura, harina de soya, peptonas de carne, hidrolizados de caseína, extractos de carne de vaca y similares. Se puede usar con ventaja combinaciones de estas fuentes de carbono y nitrógeno. Generalmente es innecesario agregar elementos vestigiales, puesto que
15. se emplea agua corriente como medio de formulación; sin embargo, se ha comprobado que resulta ventajosa la adición de sales de cobalto.

- Se puede efectuar la producción del Antibiótico 66-40 a cualquier temperatura que conduzca a crecimiento satisfactorio del micro-organismo; por ejemplo entre 20 y 40° C.,
20. y de preferencia 25 a 35° C.

- Comúnmente se obtiene producción óptima en 3 a 7 días. El pH del medio permanece por lo general bastante próximo a
25. 7 durante la fermentación. El pH final depende en parte de los



- reguladores de pH que estén presentes, si los hay, y con ventaja se le ajusta aproximadamente a 8,0 antes de la esterilización. Cuando se lleva a cabo el crecimiento en recipientes y tanques grandes, es deseable producir un inoculum vegetativo
5. en un caldo nutritivo, inoculando el cultivo del caldo con un cultivo de suelo o un cultivo liofilizado del organismo. Cuando se ha obtenido así un inoculum activo, se le transfiere asépticamente a recipientes o tanques más grandes. El medio en el cual se produce el inoculum vegetativo puede ser el mismo que
10. el utilizado para la producción del antibiótico en tanques, o diferente de este último, mientras se obtenga buen crecimiento del micro-organismo.

- Después de completar la fermentación, se puede trabajar el medio, por ejemplo en la siguiente manera. Se ajusta
15. el caldo entero a un pH de aproximadamente 2 mediante ácido mineral, de preferencia ácido sulfúrico acuoso, con lo cual se libera el antibiótico básico soluble en agua con respecto al micelio y se disuelve en el medio acuoso de fermentación.
20. Se filtra la mezcla completa de manera de separar el caldo, y se neutraliza el filtrado seguido por adición de ácido oxálico para precipitar iones de calcio. Después de una filtración adicional y ajuste hasta neutralidad, de preferencia mediante hidróxido de amonio, se hace pasar el filtrado neutralizado claro a través de una resina intercambiadora de iones, de
25. preferencia del tipo LRC-50 Amberlite bajo la forma amonio.



Ejemplos de las resinas de tipo Amberlite aquí utilizadas, para intercambio tanto aniónico como catiónico, se encuentran en Handbook of Chemistry and Physics, 42a Edición, Chemical Rubber Publishing Company, Cleveland, Ohio (1960). Se des-

5. carta el caldo usado, y se eluye el antibiótico de la resina mediante hidróxido de amonio. Se concentra el eluato y se le evapora hasta un residuo que consiste en Antibiótico 66-40 crudo que tiene una potencia de aproximadamente 500 $\mu\text{g}/\text{ng}$. de acuerdo con el procedimiento de análisis aquí descrito.
10. Se puede efectuar la purificación del antibiótico crudo mediante la utilización de una resina de intercambio aniónico, de preferencia Dowex 1 x 2 o un tipo Amberlite IRA 401S, Se puede adsorber el antibiótico crudo a partir de una solución acuosa sobre la columna y eluirlo de la misma mediante agua destilada. El material obtenido de esta manera da por análisis aproximadamente 900 $\mu\text{g}/\text{mg}$. El antibiótico crudo es también purificable, por ejemplo, mediante cromatografía en columna sobre celulosa utilizando un sistema solvente cloroformo:metanol:hidróxido de sodio al 17% (2:1:1); se usa la fase superior del sistema solvente para "humedecer" primeramente la columna, y se usa la fase inferior con fines de elución. Se puede disponer el antibiótico sobre la columna por adsorción a partir de una solución concentrada en la fase superior del sistema solvente mencionado más arriba.
15. te agua destilada. El material obtenido de esta manera da por análisis aproximadamente 900 $\mu\text{g}/\text{mg}$. El antibiótico crudo es también purificable, por ejemplo, mediante cromatografía en columna sobre celulosa utilizando un sistema solvente cloroformo:metanol:hidróxido de sodio al 17% (2:1:1); se usa la fase superior del sistema solvente para "humedecer" primeramente la columna, y se usa la fase inferior con fines de elución. Se puede disponer el antibiótico sobre la columna por adsorción a partir de una solución concentrada en la fase superior del sistema solvente mencionado más arriba.
20. la fase superior del sistema solvente para "humedecer" primeramente la columna, y se usa la fase inferior con fines de elución. Se puede disponer el antibiótico sobre la columna por adsorción a partir de una solución concentrada en la fase superior del sistema solvente mencionado más arriba.
25. Para analizar las diversas preparaciones con res-



- pecto a la potencia expresada en microgramos por miligramo del antibiótico, se emplea por lo general el método normalizado de ensayo en vaso cilíndrico empleando *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (ATCC = American Type Culture Collection) como organismo de ensayo. Este método es completamente análogo al descrito por Oden y otros en *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* (1963). Una actividad antibiótica de 1 μ g del antibiótico es la cantidad de material que produce una respuesta zonal de $16,3 \pm 0,9$ mm. bajo las condiciones del método de análisis y se expresa como μ g/mg.
- 5.
- 10.

Los siguientes Ejemplos ilustran los procedimientos de fermentación y aislación que proporcionan Antibiótico 66-40.

EJEMPLO 1

15.

Tanque de Fermentación de *Micromonospora inyoensis*

Etapa de Germinación 1

- Bajo condiciones asépticas, se agrega un cultivo liofilizado (o células obtenidas de un cultivo inclinado) de *M. inyoensis* a un frasco para sacudimiento de 300 ml. que contiene 100 ml. del siguiente medio estéril:
- 20.



	Extracto de carne de vaca	3 g.
	Triptona	5 g.
	Extracto de levadura	5 g.
	Dextrosa	1 g.
5.	Almidón	24 g.
	Carbonato de calcio	2 g.
	Agua corriente	1000 ml.

10. Se incuba el frasco y sus contenidos durante 5 días a 35° C sobre un sacudidor rotativo (280 r.p.m., carrera 50,8 mm).

Etapa de Germinación 2

15. Se transfiere asépticamente 25 ml. del medio de fermentación de la Etapa de germinación 1 a un frasco para sacudimiento de 2 lt. que contiene 500 ml. del medio estéril de germinación descrito más arriba. Se incuba el frasco y sus contenidos durante 3 días a 28° C. en un sacudidor rotativo (280 r.p.m., carrera 50,8 mm.).

20. Etapa de Fermentación

25. Se transfiere asépticamente 500 ml. del medio, obtenido de la Etapa de germinación 2, a un tanque de fermentación de 14 lt. que contiene 9,5 lt. del siguiente medio estéril:



5.	Dextrina	50 g.
	Dextrosa	5 g.
	Harina de soya	35 g.
	Carbonato de calcio	7 g.
	Cloruro de cobalto	10^{-6} molar
	Agua corriente	1000 ml.
	Antiespumante (GE60=emulsión de silicona)	10 ml.

10. Antes de esterilizar al medio mencionado más arriba, se ajusta el pH a 8. Se fermenta aeróbicamente durante 66 a 90 hr. mientras se agita a 250 r.p.m. con una entrada de aire a razón de 4,5 lt/lt/min y 22,5 atmósferas. La potencia del antibiótico producido al término de este período alcanza un máximo de 150-225 $\mu\text{g/ml}$ y permanece
15. relativamente constante. El pH del medio de fermentación cambia levemente durante la producción del antibiótico, variando en la gama de 6,8 a 7,3.

EJEMPLO 2

20.

Aislación del Antibiótico 66-40

25. Se ajusta el caldo entero del Ejemplo 1 a pH 2 mediante ácido sulfúrico 6N (para la finalidad de este ejemplo se indica las cantidades con respecto a 170 lt. de caldo de fermentación que se obtiene reuniendo caldos acidificados provenientes de 17 tandas obtenidas de acuerdo



- con el procedimiento del Ejemplo 1). Se agita el caldo acidificado durante aproximadamente 15 min. y luego se le filtra. Se lava el micelio con agua y se combina los lavados con el filtrado. Se ajusta el pH del filtrado a 7 mediante
5. hidróxido de amonio 6N. Al filtrado neutralizado se agrega suficiente ácido oxálico para precipitar calcio, y se filtra. Se reneutraliza el filtrado mediante hidróxido de amonio. Se carga el filtrado sobre una columna de adsorción de intercambio catiónico que contiene 1500 a 2000 g. de IRC-50
 10. Amberlite en su forma de amonio. Se descarta el eluato, se lava la resina con agua y se eluye mediante hidróxido de amonio 2N. Se recoge fracciones de 400 ml. y se vigila mediante ensayo sobre discos con S. aureus ATCC 6538P. Se combina las fracciones activas y se las evapora hasta sequedad bajo presión reducida de manera de obtener aproximadamente 28 g. de Antibiótico 66-40 crudo que tiene una actividad de aproximadamente 500 $\mu\text{g/g}$.
 - 15.

EJEMPLO 3

20.

Purificación de Antibiótico 66-40

- Se disuelve 28 g de Antibiótico 66-40 crudo, obtenido en el Ejemplo 2, en 100 ml. de agua destilada y se le carga en una columna de adsorción de intercambio aniónico
25. (Dowex LX2) bajo la forma de hidroxilo. Se forma una lechada



- con 2000 g. de la resina en agua, en una columna de un diámetro de 63,5 mm. y una altura de 914,4 mm. Se eluye la columna con agua destilada a razón de aproximadamente 23 ml./min., recogiendo fracciones de 100 ml. y vigilando con un
5. medidor de conductividad y mediante ensayo sobre disco contra Staphylococcus aureus. El ensayo sobre disco provee una separación aproximada de fracciones de eluato que contienen antibiótico con respecto a las desprovistas de antibiótico. Para asegurar que las fracciones están apropiadamente combinadas, se cromatografía sobre papel una porción de cada
10. fracción, utilizando la fase inferior de un sistema cloroformo:metanol:hidróxido de amonio al 17% (2:1:1). Se rocía papel con ninhidrina, y se combina y liofiliza los eluatos que contienen material similar, de manera de obtener aproximadamente
15. 5,7 g. de Antibiótico 66-40 que, por análisis, da aproximadamente 900 µg/mg.

EJEMPLO 4

20. Preparación de Sulfato de Antibiótico 66-40

- Se disuelve 3,9 g. de base de Antibiótico 66-40, que se prepara de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 3, en 60 ml. de agua y se ajusta el pH a 4,5 mediante ácido sulfúrico 6N. Se agita la solución con carbón decolorante
25. durante aproximadamente $\frac{1}{2}$ hr y se filtra. Se agrega este filtrado a aproximadamente 1 lt. de metanol. Se filtra y se



seca de manera de obtener 4,8 g. de la sal de sulfato; por análisis da aproximadamente 640 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

EJEMPLO 5

5. Purificación alternada de Antibiótico 66-40 por vía de su Sulfato

10. Se mezcla 200 g. de polvo de celulosa Whatman No 1 con 20 ml. de la fase superior de un sistema solvente que está compuesto por cloroformo:metanol:hidróxido de amonio al 17% (2:1:1) y se compacta en pequeños segmentos en una columna que tiene un diámetro interno de 6,35 mm. y una altura de 508 mm. Se hace correr a través de la columna la fase inferior del sistema solvente hasta que emerge una banda amarilla de impurezas. Se disuelve 2 g. de sulfato de Antibiótico 15. 66-40, que se prepara de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 4, en aproximadamente 3 ml. de la fase solvente superior, se mezcla con un poco de polvo de celulosa, se seca bajo presión reducida y se compacta en la parte superior de la columna de celulosa. Se deja correr la fase inferior a través de la columna a razón de 1 ml./min. recogiendo fracciones 20. de 5 ml. cada 15 min.

25. Se individualiza alícuotas de cada fracción sobre papel de filtro y se las ensaya con reactivo ninhidrina para determinar la presencia o ausencia de antibiótico. La cromatografía sobre papel, de las fracciones que contienen antibió-



tico, establece que el material deseado está situado entre las fracciones 121 a 190.

- Se combina las fracciones 121 a 190, se las evapora hasta sequedad, se las redisuelve en agua y se las hace pasar a través de IRA 401S (una resina intercambiadora de aniones) en el ciclo hidroxilo. Se ajusta el pH del eluato a 4,5 con ácido sulfúrico; el eluato se trata con carbón, se filtra y se concentra hasta un volumen más pequeño. Se agrega este concentrado a una cantidad en exceso de metanol y se separa por filtración el precipitado blanco que se forma. Se disuelve el precipitado en agua y se le hace pasar a través de una columna de resina IRA 401S bajo la forma hidroxilo. Se recoge, concentra y liofiliza el efluente, de manera de obtener aproximadamente 300 mg. de base de Antibiótico 66-40 que, por análisis, da aproximadamente 1000 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

EJEMPLO 6

Preparación de Clorhidrato de Antibiótico 66-40

- Se disuelve 104,7 mg. de base de Antibiótico 66-40, que se prepara de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 2, en 4 ml. de agua y se ajusta el pH a 4,5 mediante ácido clorhídrico. Se evapora la solución hasta sequedad y se redisuelve el residuo en metanol. Se agrega esta solución a un exceso de acetona y se filtra el precipitado resultante de manera de obtener 130 mg. de clorhidrato de Antibiótico



66-40 que, por análisis, da 753 µg/mg.

EJEMPLO 7

Preparación de Monohidrato cristalino de Antibiótico 66-40

5. Se prepara una columna cromatográfica de gel de sílice (26 x 2,5 cm) utilizando la fase inferior (orgánica) de una mezcla solvente que consiste en isopropanol:CHCl₃: hidróxido de amonio en una relación en volumen de 1:2:1 como revelador/eluyente. Se disuelve 1,0 g. de base de Antibiótico 66-40 en 5,0 ml. de mezcla solvente. Se adsorbe la solución de antibiótico sobre el gel de sílice y se cromatografía. Se recoge fracciones de 5,0 ml. y se determina la ubicación de las fracciones deseadas mediante cromatografía en capa delgada sobre placas de gel de sílice. Se combina y se evapora las fracciones apropiadas (44-78) bajo presión reducida y se obtiene así un jarabe amarillo claro, que por destilación azeotrópica con etanol, cristaliza bajo la forma de rosetas de color amarillo claro. El producto obtenido en esta manera es monohidrato de Antibiótico 66-40 que tiene un punto de fusión de aproximadamente 185-190° C. El rendimiento es aproximadamente 650 mg.



EJEMPLO 8

Preparación del Producto de Condensación de Benzaldehido del
Antibiótico 66-40

Se trata 5,0 g. de Antibiótico 66-40 en 60 ml.

5. de etanol absoluto con 5,9 g. de benzaldehido (leve exceso por encima de 5 equivalentes) y se somete a reflujo durante 1 hr. Se enfría la solución y se la filtra de manera de obtener 7,0 g. de un sólido cristalino blanco, punto de fusión 123-126°C., $[\alpha]_D^{26} = +43,2^{\circ}$ (C = 0,3% en CHCl_3). El análisis elemental indica cinco residuos de benzaldehido.
- 10.

En una manera similar, reemplazando el reactivo benzaldehido en el precedente ejemplo con una cantidad equivalente de uno cualquiera de los siguientes aldehidos:

15. Acetaldehido,
Furfural,
Ciclopentil acetaldehido,
Crotonaldehido,
Salicil aldehido,
20. Vanilina,
Veratraldehido, o
Piridoxal,

- y siguiendo sustancialmente el procedimiento descrito en el
25. Ejemplo, se obtiene los correspondientes productos de conden-



sación de aldehído (probablemente bases de Schiff en lo que se refiere a la estructura química).

El Antibiótico 66-40, y sus derivados funcionales farmacéuticamente aceptables, poseen un amplio espectro antibac-

5. teriano. El antibiótico posee la propiedad de afectar adversamente el crecimiento de bacterias gram-positivas y gram-negativas, y por lo tanto se le puede usar ya sea solo o en combinación con otros agentes antibióticos, para impedir el crecimiento o reducir la cantidad de bacterias en diversos ambientes.
10. Por ejemplo se le puede usar para desinfectar cristalería de laboratorio, equipos dentales y médicos contaminados con Staphylococcus aureus u otras bacterias cuyo crecimiento se ve adversamente afectado por Antibiótico 66-40. Debido a su actividad particularmente eficaz contra bacterias gram-negativas, es
15. útil para combatir infecciones causadas por estos organismos gram-negativos.

En la Tabla H se indica la actividad in vitro del Antibiótico 66-40 contra una variedad de bacterias gram-positivas y gram-negativas. Se determina la concentración inhibidora mínima (CIM) utilizando caldo de levadura-carne de vaca como medio de ensayo. Se emplea una técnica de dilución seriada doble. La CIM es el punto central entre el último tubo claro y el primer tubo turbio según se determina por observación visual. Se realiza determinaciones utilizando una dilución 10^{-3} de un cul-

25.



tivo de las bacterias de ensayo en caldo durante 24 hrs. Se incubaba todos los tubos durante 18 hrs. a 37° C. En la Tabla, se utiliza para el estudio el Antibiótico 66-40 que tiene una potencia de 1000 µg/mg.

5.

TABLA H

Actividad In Vitro del Antibiótico 66-40

	<u>Micro-organismos utilizados</u>	<u>CIM</u>
	<u>Bacterias gram-positivas</u>	<u>µg/ml.</u>
10.	Diplococcus pneumoniae DA 150 ⁽¹⁾	3,0
	Enterococcus sp. DA 800	2,25
	Enterococcus sp. DA 801	2,25
	Enterococcus sp DA 802	2,25
	Staphylococcus aureus ATCC 6538P	0,23
15.	Staphylococcus aureus ATCC 11631	0,21
	Staphylococcus aureus Gray	0,05
	Staphylococcus aureus DA 2033	0,08
	Streptococcus faecalis ATCC 10541	3,0
	Streptococcus pyogenes DA 1	3,0
20.	Streptococcus pyogenes DA 21	3,7
	Streptococcus pyogenes DA 15	3,7
	<u>Bacterias gram-negativas</u>	
	Escherichia coli ATCC 10536	0,6
25.	Escherichia coli DA 3	0,3
	Escherichia coli DA 4	0,6



	Escherichia coli DA 1	0,6
	Klebsiella pneumoniae DA 20	0,23
	Klebsiella pneumoniae ATCC 10031	3,0
	Proteus vulgaris DA 121	0,6
5.	Proteus vulgaris ATCC 9921	0,6
	Proteus vulgaris DA 13	0,3
	Proteus vulgaris DA 12	3,0
	Pseudomonas aeruginosa ATCC 8709	0,45
	Pseudomonas aeruginosa ATCC 8689	0,6
10.	Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	0,6
	Salmonella schottmuelleri DA 10	0,53
	Salmonella sp. DA 101	0,3
	Salmonella sp. DA 102	0,3
	Aerobacter sp. DA 3a	0,3

15.

(1) DA se refiere al número de colección de Schering Corporation.

Se determina la toxicidad aguda del Antibiótico 66-40, bajo de su sulfato, en una manera normal mediante una variedad de días en ratones que pesan 18 a 20 g. Los datos de toxicidad indicados en la Tabla J están expresados con relación a la base libre.

20.



TABLA J

Toxicidad aguda del Antibiótico 66-40

<u>modo de Administración</u>	<u>DL</u> <u>50 (mg/kg.)</u>
Subcutánea	288
Intraperitoneal	221
5. Endovenosa	34

El Antibiótico 66-40 manifiesta una acción anti-bacteriana contra infecciones bacterianas patógenas inducidas en animales de laboratorio y en particular en el ratón. Para

10. determinar la actividad protectora in vivo del Antibiótico 66-40 contra infecciones de origen bacteriano patógeno en el ratón, se administra a ratones dos veces una dosis del anti-biótico, una inmediatamente antes de una inyección intrape-ritoneal de la bacteria infectante, y una vez 4 hrs. después

15. de dicha inyección. Se determina la cantidad de sobrevivien-tes 48 hrs. después de la infección y se analiza estos datos mediante procedimientos probatorios normalizados para deter-minar valores de DP₅₀ con límites de seguridad del 95%. La

20. Tabla K indica la actividad protectora del Antibiótico 66-40 contra diversas bacterias patógenas.



TABLA K

Actividad Protectora del Antibiótico 66-40 en el ratón

	<u>Organismo</u>	<u>Via de Administración</u>	<u>DF₅₀ (mg/kg)</u>
5.	<u>Staphylococcus aureus Gray DC 445</u>	subcutánea	0,12
		oral	25,0
	<u>Streptococcus pyogenes C DC 28</u>	subcutánea	0,87
	<u>Klebsiella pneumoniae DC 801</u>	subcutánea	0,70
		oral	50,0
	<u>Pseudomonas aeruginosa ATCC 8709</u>	subcutánea	1,12
10.	<u>Salmonella paratyphi B DC 837</u>	subcutánea	1,91

De acuerdo con la Tabla K resulta evidente que el índice terapéutico (DL_{50}/DP_{50}) mediante la vía subcutánea está comprendido entre 330 y 2400 con respecto a los organismos gram-positivos y 150 a 410 con respecto a los organismos gram-negativos.

Además, los ratones infectados intraperitonealmente con ocho dosis DL_{50} de Rickettsia akaria obtuvieron 100% de protección mediante la administración subcutánea de 2 mg. de Antibiótico 66-40 administrado una vez por día durante 4 días.

En vista de los precedentes datos in vivo, y especialmente en vista del favorable índice terapéutico manifes-



tado por el Antibiótico 66-40, resulta evidente que se puede usar el antibiótico para controlar y tratar una variedad de infecciones en huéspedes mamíferos. Entre estas infecciones se encuentran las causadas por géneros de organismos tales

5. como Streptococcus, Staphylococcus, Streptococcus, Escherichia, Salmonella, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas, y similares. Estos organismos causan, o se sospecha que causan la mastitis bobina, infecciones del tracto urinario y diarrea. Se sospecha que especies de los mismos organismos causan enfermedades de la piel y de las vías respiratorias superiores, o agravan manifestaciones pre-existentes de estas enfermedades en los mamíferos. Por lo tanto, el Antibiótico 66-40 y sus derivados proveen un arma potente para combatir estos organismos y los estados de enfermedad causados por los mismos.
- 10.
15. mos.

Se puede aplicar el Antibiótico 66-40, y sus derivados, como tópico bajo la forma de ungüentos, tanto hidrófilos como hidrofugos, bajo la forma de lociones que pueden ser del tipo acuoso, no acuoso o en emulsión, o bajo la forma de cremas. Portadores farmacéuticos que son útiles para la preparación de estas formulaciones incluyen por ejemplo sustancias tales como agua, aceites, grasas, poliésteres, polioles y similares.

20.

25. En general, las preparaciones para tópico contienen aproximadamente 0,1 a 3,0 g. del antibiótico por cada 100 g. de ungüento, crema o loción. Por lo general, se aplica sua-



vemente las preparaciones tópicas a lesiones aproximadamente 2 a 5 veces por día.

Se puede utilizar los antibióticos de la presente invención en forma líquida, tales como soluciones, suspensiones y similares, para uso óptico y ótico, y se los puede administrar también parenteralmente por inyección intramuscular. Por lo general se administra la solución o suspensión aceptable a razón de aproximadamente 1 a 5 mg, de antibiótico por cada kilogramo de peso del cuerpo por día, dividido en aproximadamente 2 a 4 dosis. La dosis exacta depende de la etapa de la infección y de su severidad, la susceptibilidad al antibiótico del organismo infectante, y las características individuales de los mamíferos tratados.

El siguiente Ejemplo 9 describe los ingredientes y el procedimiento para preparar una solución inyectable.

EJEMPLO 9

Solución inyectable

	Por frasco de <u>2,0 ml⁽²⁾</u>	Por cada <u>50 lt⁽²⁾</u>
Sulfato de Antibiótico 66-40	84,0 mg.	2100,0 g.
Ester metílico de ácido p-hidroxibenzoico, USP ⁽¹⁾ (=Metilparabeno)	3,6 mg.	90,0 g.



	Ester propílico de ácido p-hidroxibenzoico, USP ⁽¹⁾ (=Propilparabeno)	0,4 mg.	10,0 g.
	Bisulfito de sodio, USP ⁽¹⁾	6,4 mg.	160 g.
	Dihidrato de tetra-acetato de etilendiamina disódico, R.G.	0,2 mg.	5,0 g.
5.	Agua para inyección, USP ⁽¹⁾ , c.s.p.	2,0 ml.	50,0 lt.

(1) US-Pharmacopea

(2) Incluye una sobrecarga de fabricación del 5%

10. Procedimiento para una tanda de 50,0 lt.

15. Se carga aproximadamente 35 lt. de agua para inyección en un recipiente encamisado de acero inoxidable apropiado, y se calienta hasta aproximadamente 70° C. Se carga el metilparabeno y el propilparabeno en el agua para inyección calentada, y se disuelve con agitación. Cuando los parabenos están completamente disueltos, se enfría los contenidos del tanque hasta 25-30°C. haciendo circular agua fría a través de la camisa del tanque. Se riega la solución con gas nitrógeno durante por lo menos 10 min. y se la mantiene cubierta con nitrógeno durante el subsiguiente tratamiento. Se carga y se disuelve el dihidrato de tetra-acetato de etilendiamina disódico y bisulfito de sodio. Se carga y se disuelve el sulfato de Antibiótico 66-40. Se lleva el volumen de la tanda hasta 50,0 lt. mediante agua para inyección, y se agita hasta que queda homogénea. Bajo condiciones estériles se filtra la

20.

25.



- solución a través de un filtro retentivo de bacterias apropiado, recogiendo el filtrado en un tanque para llenado. Con el producto se llena asépticamente frascos para dosis múltiples estériles libres de pirógeno, se los taponan y se los cierra herméticamente.
- 5.

EJEMPLO 10

Unguento de Antibiótico

10.	Base de Antibiótico 66-40	10 g.
	Petrolato	990 g.

Procedimiento

- 1) Se derrite el petrolato;
- 2) Se introduce mezclando la base Antibiótico 66-40 con aproximadamente 10% del petrolato derretido;
15. 3) Se hace pasar la mezcla de antibiótico y petrolato a través de un molino coloidal; y
- 4) Se agrega el resto del petrolato y se enfría la mezcla hasta que se vuelve semisólida.

- En esta etapa se puede disponer el producto en recipientes apropiados.
- 20.

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



REIVINDICACIONES

Se declaran nuevas y de propia invención, las siguientes reivindicaciones con prioridad de la solicitud de patentes estadounidenses seriales núms. 740.742 del 27.6.68 y 797.304 del 16.12.68.

5. 1. Un procedimiento para la producción de un producto antibióticamente activo denominado Antibiótico 66-40, en su forma libre o en la forma de sus derivados aceptables farmacéuticamente, distintos de las sales de adición de ácido en forma libre o en la forma de sus solvatos, y productos de condensación con aldehídos o cetonas, caracterizado porque comprende incubar un microorganismo de las especies Micromonospora inyoensis en un medio nutritivo acuoso bajo condiciones aeróbicas hasta que se comunica una substancial actividad antibacteriana a dicho medio y aislar del mismo el producto antibióticamente activo bajo la forma libre o en la forma de un derivado farmacéuticamente aceptable, distinto de las sales de adición de ácido en forma libre o en la forma de sus solvatos.
- 10.
- 15.
20. 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que se lleva a cabo la incubación bajo condiciones sumergidas en un medio nutritivo que contiene fuentes asimilables de por lo menos nitrógeno y carbono.



3.- Un procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en que el micro-organismo incubado es Micromonospora inyoensis NRRL 3292.

5. 4.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que se incuba el micro-organismo a una temperatura de aproximadamente 20 a 40° C., de preferencia 25 a 35° C., y a un pH desde bastante próximo a 7 hasta aproximadamente 8.

10. 5.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en que para la aislación se utiliza métodos de intercambio iónico, que incluyen las etapas de: liberar el antibiótico con respecto al micelio, adsorber el antibiótico sobre una resina intercambiadora de iones; eluir el antibiótico con respecto a la resina; concentrar el eluato,

15.

6.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en que para la purificación del Antibiótico 66-40 se utiliza métodos cromatográficos.

20. 7.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que incluye la conversión del antibiótico o derivado del mismo, a un derivado farmacéuticamente aceptable, mediante por lo menos uno de los siguientes postratamientos en cualquier etapa después de la formación del antibiótico: (a) precipitación del solvato en su solución

25. orgánica o acuosa, mediante el agregado de un solvente en el



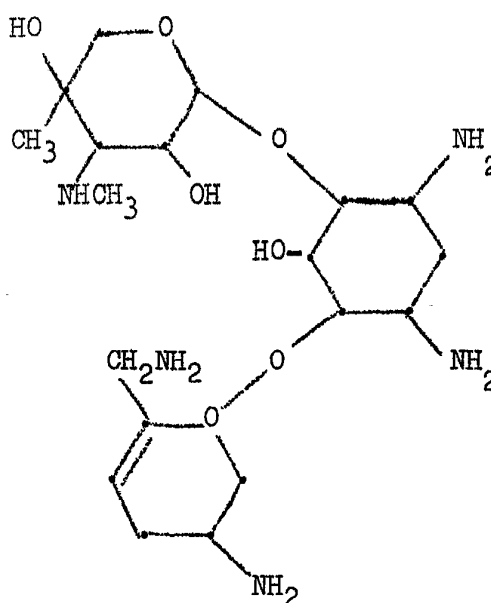
cual el producto es insoluble o solo levemente soluble;
(b) condensación con un aldehído o una cetona, de preferen-
cia con aldchido o cetonas que tienen hasta 12 átomos de
carbono.

5. 8. Un procedimiento, de acuerdo con la reivindi-
cación 7, que incluye la conversión del antibiótico o de
un derivado del mismo en un hidrato.

9. Un procedimiento, de acuerdo con la reivin-
dicación 7, que incluye la condensación con benzaldehído
10. para producir antibiótico 66-40 pentabencilideno.

10. Un procedimiento, según cualquiera de las
reivindicaciones anteriores, en el que el antibiótico 66-40,
tiene una forma estructural aproximada que es substancial-
mente la siguiente

15.



(I)

20.

25.



en su forma libre o bajo la forma de sus derivados
funcionales farmacéuticamente aceptables.

11. Un procedimiento para la producción de
un producto antibióticamente activo denominado
5. Antibiótico 66-40.

Según se describe y reivindica en la presente
memoria descriptiva que consta de 40 hojas foliadas y
escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 25 de Junio de 1969

p.a.

JAIMÉ ISERN

~~P. P.~~

firmado: JOSÉ RODRÍGUEZ

CASE 951A

368.762

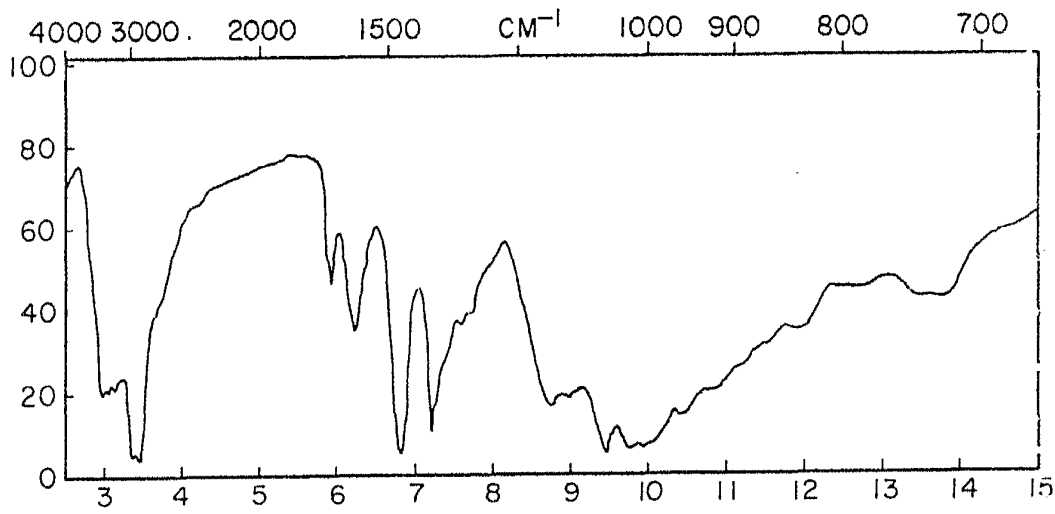


FIG. 1

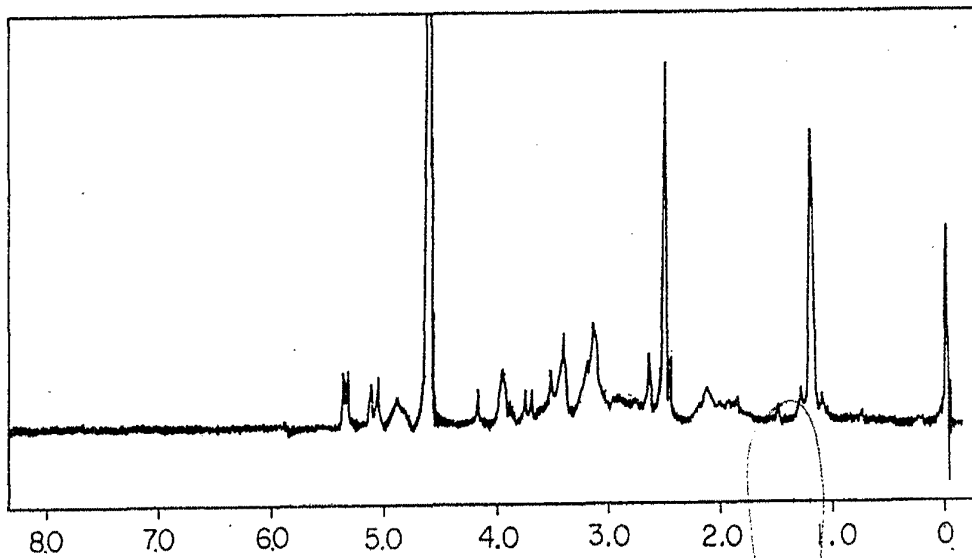


FIG. 2

Madrid, a 25 JUN. 1969
p.a. JAIME ISERN
P. P.
FIRMENOT JOSE RODRIGUEZ