

SEICHO KAISHA
CLASIFICACION
CLASE C-19 A-61
SUBCLASE D R

376246



376246

MEMORIA DESCRIPTIVA

Correspondiente a una PATENTE DE INVENCION por veinte años.

A favor de

MEIJI SEIKA KAISHA, LTD., de nacionalidad japonesa.

Residente en TOKYO (Japón).-No.8, 2-chome, Kyobashi, Chuo-ku.

P O R :

"PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UNA SUSTANCIA ANTIBIOTICA"



376246

Este invento se refiere a nuevas y útiles sustancias anti-
tibióticas denominadas sustancias SF-837, sustancia SF-837-A₂,
sustancia SF-837-A₃ y sustancia SF-837-A₄, respectivamente, y
también a la producción de estas sustancias antibióticas y al
5.- aislamiento de cada una de estas sustancias antibióticas.

Hemos hallado que se producen nuevas sustancias antibióti-
cas que presentan una potente acción inhibitoria del crecimiento
entre bacterias patogénicas Gram positivas y las bacterias an-
tibiótico resistentes piogénicas, en un cultivo de un micro-
10.- organismo que pertenece al género Streptomyces, que tales sus-
tancias antibióticas nuevas pueden ser recuperadas del cultivo
de dicho microorganismo, y que son notablemente eficaces para
inhibir el crecimiento de las diversas clases de patógenos ta-
les como el Staphylococcus aureus. Hemos designado a estas sus-
15.- tancias antibióticas nuevas y útiles como sustancia SF-837,
sustancia SF-837-A₂, sustancia SF-837-A₃ y sustancias SF-837-A₄,
respectivamente.

Todas las sustancias, SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-
837-A₄ son eficaces para inhibir el crecimiento de las bacte-
20.- rias Gram positivas, así como el crecimiento de las bacterias
patogénicas que son resistentes a los antibióticos conocidos.
Las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ son
en esencia no tóxicas y presentan un efecto terapéutico sobre
las bacterias infecciosas Gram positivas en los seres humanos
25.- y en los animales.

De conformidad con el primer aspecto del presente invento,
por consiguiente, se aporta una sustancia antibiótica eficaz
para inhibir el crecimiento de las bacterias Gram positivas,
seleccionada de la sustancia SF-837, sustancia SF-837-A₂, sus-
30.- tancia SF-837-A₃ y sustancia SF-837-A₄ y las sales de adición

376246



- de ácido de las mismas, así como el derivado diacetil de la sustancia SF-837, el derivado diacetil de la sustancia SF-837-A₂, el derivado mono-acetil de la sustancia SF-837-A₃ y el derivado mono-acetil de la sustancia SF-837-A₄, siendo cada una de las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄, una sustancia que es soluble en metanol, etanol, acetona, cloroformo, acetato de etilo, acetato de butilo, agua acidificada, benceno, éter de etilo y tetracloruro de carbono, pero apenas soluble en éter de petróleo, n-hexano y agua neutra, que es básica, forma sales con los ácidos, que es positiva en la prueba de critromicina con ácido sulfúrico al 50 por ciento, pero es negativa en las reacciones con reactivo nihidrina y reactivo cloruro férrico, que contiene sólo los elementos carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno, que es levógira en etanol y que presenta las características de los antibióticos macrólidos, siendo las propiedades detalladas de la sustancia SF-837 que su base libre forma un polvo blanco que tiene un punto de fusión de 122 a 124°C., muestra un valor de pKa' de 6,9 en etanol acuoso al 50 por ciento, da un análisis elemental de C 60,38 por ciento, H 8,35 por ciento, N 1,65 por ciento, y O el resto (29,62 por ciento), muestra un peso molecular de 813 determinado por el análisis de masa, de donde tiene una fórmula empírica C₄₁H₆₇O₁₅N, presenta una rotación óptica de $(\alpha)_D^{22} - 67^\circ$ en una concentración del 1 por ciento en etanol, presenta una absorción característica máxima en la región ultravioleta del espectro cuando se disuelve en etanol a la siguiente longitud de onda en μ : 232 ($n_{1\%}^{1\text{cm.}} = 325$) y presenta bandas de absorción características en la región infrarroja del espectro cuando se pelletiza en forma de base libre en bromuro de potasio a los siguientes números de onda en cm^{-1} : 3.500, 2.970



376246

- 2.930, 1.735, 1.460, 1.408, 1.376, 1.360, 1.330, 1.295, 1.275, 1.190, 1.165, 1.120, 1.082, 1.050, 1.015, 910, 860, 840, 805, 780, 735 y 680; el derivado diacetil de la sustancia SF-837 forma agujas de color blanco con un punto de fusión de 122 a
- 65.- 125° C cuando se recristalizan a partir de tetracloruro de carbono, da un análisis elemental de C 60,35 por ciento, H 8,02 por ciento, N 1,58 por ciento y O 30,05 por ciento (resto) y una fórmula empírica $C_{45}H_{71}O_{17}N$, presenta una absorción característica máxima de 232 m μ . ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$ = 295) en la región ultravioleta del espectro cuando se disuelve en etanol y presenta bandas de absorción características en la región infrarroja del espectro cuando se pelletiza en bromuro de potasio con los siguientes números de onda en cm^{-1} : 3.450, 2.970, 2.930, 1.728, 1.454, 1.368, 1.232, 1.167, 1.122, 1.082, 1.054, 1.024, 1.002,
- 75.- 957, 907, 863, 837, 783 y 762; y las propiedades de la sustancia SF-837-A₂ siendo que su base libre forma un polvo de color blanco que tiene un punto de fusión de 125 a 128°C, muestra un valor pKa' de 6,8 en etanol acuoso al 50 por ciento, da un análisis elemental de C 60,58 por ciento, H 8,85 por ciento, N 1,72 por ciento y O el resto (28,2 por ciento), muestra un peso molecular de 827 determinado por análisis de masa, de donde tiene una fórmula empírica $C_{42}H_{69}O_{15}N$, presenta una rotación óptica de $(\alpha)_D^{22} - 68^\circ$ a una concentración del 1 por ciento en etanol, presenta una absorción característica máxima con una
- 85.- longitud de onda de 232 m μ . ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$ = 320) en la región ultravioleta del espectro cuando se disuelve en etanol y presenta bandas de absorción características en la región infrarroja del espectro cuando se pelletiza en forma de base libre en bromuro de potasio a los siguientes números de onda en cm^{-1} :
- 90.- 3.500, 2.970, 2.935, 1.737, 1.460, 1.410, 1.377, 1.360, 1.300,

376246



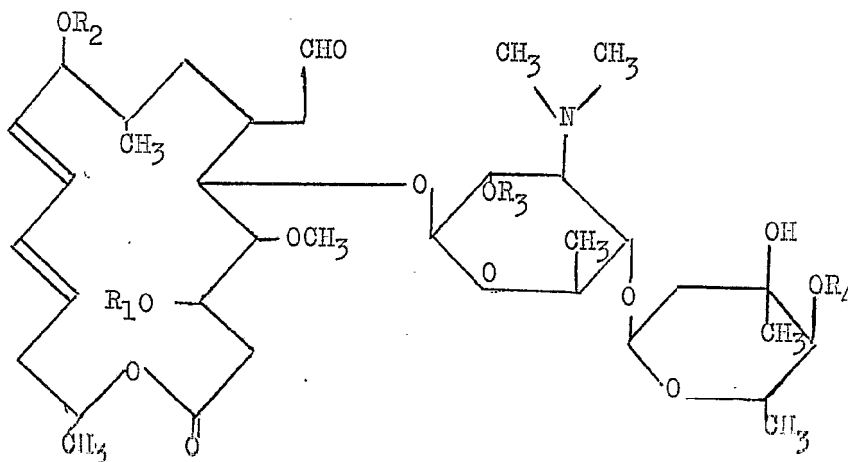
- 1.275, 1.190, 1.170, 1.123, 1.082, 1.052, 1.017, 990, 920, 910, 860, 840, 805, 780, 740 y 700; el derivado diacetil de la sustancia SF-837-A₂ forma agujas de color blanco de un punto de fusión de 130 a 134°C, da un análisis elemental de C 60,68 por ciento, H 8,23 por ciento, N 1,49 por ciento y O 29,60 por ciento (resto), de donde tiene una fórmula empírica C₄₆H₇₃O₁₇N; y siendo las propiedades detalladas de la sustancia SF-837-A₃ que su base libre forma un polvo blanco con un punto de fusión de 122 a 125°C, muestra un valor de pKa' de 7,0 en etanol acuoso
- 95.- al 50 por ciento, da un análisis elemental de C 60,53 por ciento, H 8,23 por ciento, N 1,87 por ciento y O el resto (29,32 por ciento), muestra un peso molecular de 811 determinado por análisis de masa, de donde tiene una fórmula empírica C₄₁H₆₅O₁₅N, presenta una rotación óptica de $\left(\alpha\right)_{D}^{22} - 42^{\circ}$ a una concentración de 1 por ciento en etanol, presenta una absorción máxima característica a una longitud de onda de 280 mμ. (E₁^{1%} cm. = 295) en la región ultravioleta del espectro cuando se disuelve en etanol y presenta bandas de absorción características en la región infrarroja del espectro cuando se pelletiza en la
- 100.- forma de base libre en bromuro de potasio con los siguientes números de onda en cm⁻¹: 3.500, 2.970, 2.930, 1.738, 1.680, 1.640, 1.600, 1.460, 1.378, 1.360, 1.300, 1.275, 1.252, 1.190, 1.168, 1.121, 1.083, 1.052, 1.015, 980, 910, 840, 805 y 780; el derivado monoacetil de la sustancia SF-837-A₃ forma cristales arenosos con un punto de fusión de 182 a 185°C, da un análisis elemental de C 60,56 por ciento, H 7,92 por ciento, N 1,68 por ciento y O el resto (29,84 por ciento) y de donde tiene la fórmula empírica C₄₃H₆₇O₁₆N; y siendo las propiedades detalladas de la sustancia SF-837-A₄ que su base libre forma un
- 105.- polvo de color blanco con un punto de fusión de 120 a 122°C,
- 110.-
- 115.-
- 120.-

376246



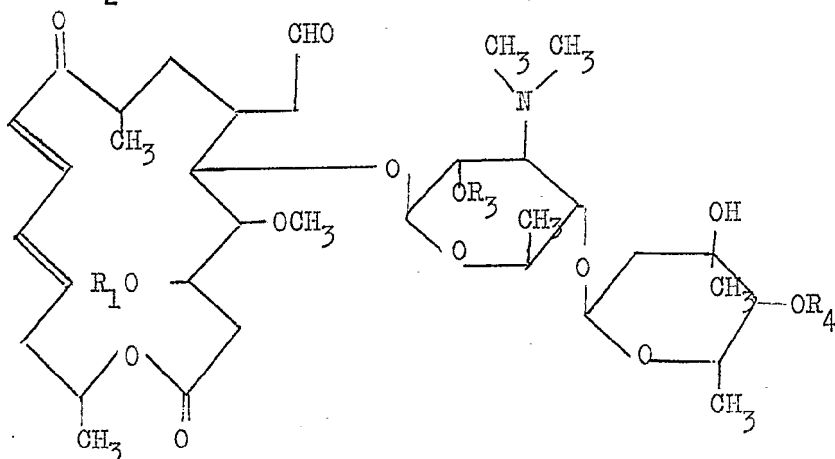
- muestra un valor de pKa' de 7,0 en etanol acuoso al 50 por ciento, da un análisis elemental de C 60,82 por ciento, H 8,52 por ciento, N 1,73 por ciento y O el resto (28,93 por ciento), muestra un peso molecular de 825 determinado por análisis de masa, de donde tiene una fórmula empírica de $C_{42}H_{67}O_{15}N$, presenta una rotación óptica de $[\alpha]_D^{22} - 40^\circ$ a una concentración del 1 por ciento en etanol, presenta una absorción máxima característica a una longitud de onda de 280 mμ. ($E_1^{1\% \text{ cm.}} = 285$)
- 125.- en la región ultravioleta del espectro cuando se disuelve en etanol y presenta bandas de absorción características en la región infrarroja del espectro cuando se pelletiza en forma de la base libre en bromuro de potasio con los siguientes números de onda en cm^{-1} : 3.500, 2.970, 2.930, 1.738, 1.260, 1.640, 1.600, 1.460, 1.378, 1.360, 1.300, 1.276, 1.252, 1.190, 1.170,
- 130.- 1.120, 1.082, 1.052, 1.017, 980, 920, 910, 863, 840 y 780; el derivado monacetil de la sustancia SF-837-A₄ forma cristales arenosos con un punto de fusión de 166 a 168°C, da un análisis elemental de C 60,85 por ciento, H 8,06 por ciento, N 1,65 por ciento, y O 29,44 por ciento (resto), de donde tiene una fórmula empírica de $C_{44}H_{69}O_{16}N$.
- 135.-
- 140.-

Se ha demostrado que las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ así como los derivados acetil de las mismas pueden ser representados por las siguientes fórmulas generales:





<u>Sustancia</u>	<u>R₁</u>	<u>R₂</u>	<u>R₃</u>	<u>R₄</u>
SF 837	COCH ₂ CH ₃	H	H	COCH ₂ CH ₃
di-O-acetil SF 837	COCH ₂ CH ₃	CHCH ₃	COCH ₃	COCH ₂ CH ₃
SF 837-A ₂	COCH ₂ CH ₃	H	H	COCH ₂ CH ₂ CH ₃
di-O-acetil SF 837-A ₂	COCH ₂ CH ₃	COCH ₃	COCH ₃	COCH ₂ CH ₂ CH ₃



<u>Sustancia</u>	<u>R₁</u>	<u>R₃</u>	<u>R₄</u>
SF 837-A ₃	COCH ₂ CH ₃	H	COCH ₂ CH ₃
mono-O-acetil SF 837-A ₃	COCH ₂ CH ₃	COCH ₃	COCH ₂ CH ₃
SF 837-A ₄	COCH ₂ CH ₃	H	COCH ₂ CH ₂ CH ₃
mono-O-acetil SF 837-A ₄	COCH ₂ CH ₃	COCH ₃	COCH ₂ CH ₂ CH ₃

145.- De aquí, estas sustancias pueden ser expresadas por los siguientes nombres químicos, de conformidad con las nomenclaturas de los Chemical Abstracts:

(1).-Sustancia SF 837

150.- 7-(formilmetil)-4,10-dihidroxi-5-metoxi-9,16-dimetil-2-oxooxaciclohexadeca-11,13-dien-6-il-3,6-dideoxi-4-O-(2,6-dideoxi-3-C-metil- α -L-ribohexopiranosil)-3-(dimetilamina)- β -D-glucopiranosido 4,4-dipropionato (éster).



(2).-Sustancia SF 837-A₂

155.- 7-(formilmetil)-4,10-dihidroxi-5-metoxi-9,16-dimetil-2-oxooxaciclihexadeca-11,13-dien-6-il-3,6-dideoxi-4-O-(2,6-dideoxi-3-C-metil- α -L-ribohexopiranosil)-3-(demetilamina)- β -D-glucopiranosido 4-monopropionato (éster) 4-monobutirato (éster).

(3).-Sustancia SF 837-A₃

160.- 7-(formilmetil)-4-hidroxi-5-metoxi-9,16-dimetil-2,10-dioxooxaciclohexadeca-11,13-dien-6-il-3,6-dideoxi-4-O-(2,6-dideoxi-3-C-metil- α -L-ribohexopiranosil)-3-(dimetiltamina)- β -D-glucopiranosido 4,4-dipropionato (éster).

(4).-Sustancia SF 837-A₄

165.- 7-(formilmetil)-4-hidroxi-5-metoxi-9,16-dimetil-2,10-dioxooxaciclohexadeca-11,13-dien-6-il-3,6-dideoxi-4-O-(2,6-dideoxi-3-C-metil- α -L-ribohexopiranosil)-3-(dimetilamina)- β -D-glucopiranosido 4-monopropionato (éster) 4-monobutirato (éster).

170.- No hemos hallado que cualquiera de las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ contenga los elementos azufre, fósforo y halógeno.

175.- Cuando se efectúa la prueba de estreptomicina con ácido sulfúrico al 50 por ciento, la sustancia SF-837 y la sustancia SF-837-A₂ dan un color tirando a moreno y púrpura rojizo, mientras que la sustancia SF-837-A₃ y la sustancia SF-837-A₄ da un color moreno amarillento claro.

180.- Como sales de adición ácida de las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ del presente invento se pueden mencionaro, por ejemplo, la sal de estas sustancias con ácidos orgánicos e inorgánicos no tóxicos, tales como el ácido hidroc্লórico, ácido sulfúrico, ácido hidrobromico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cinámico, ácido ascórbico, ácido glicólico y similares.



Con referencia a las figuras de los gráficos adjuntos:

185.-

La Figura 1 muestra una curva del espectro de absorción ultravioleta de la sustancia SF-837 en la forma de base libre disuelta en etanol.

190.-

La figura 2 muestra una curva del espectro de absorción infrarroja de la sustancia SF-837 como base libre, pelletizada en bromuro de potasio, en la que la columna O/100 indica el porcentaje de transmitancia y las referencias numerales inferiores al número de onda (cm^{-1}).

195.-

La figura 3 muestra una curva del espectro de resonancia magnética nuclear (100 Mc.) de la base libre de la sustancia SF-837 disuelta a una concentración del 10 por ciento en dencloroformo, en la que las referencias numerales indican las partes por millón.

200.-

La figura 4 muestra los cromatogramas de capa fina de alúmina de la SF-837 y sus antibióticos relacionados. (Leucemicina A₃; Leucomicina A₆; Josamicina; Tertiomicina B; Leucomicina A₄; Leucomicina A₈; Tertiomicina A).

205.-

La figura 5 muestra una curva del espectro de absorción ultravioleta de la sustancia SF-837-A₂ en forma de base libre, disuelta en etanol.

La figura 6 muestra una curva del espectro de absorción infrarroja de la sustancia SF-837-A₂, como base libre, pelletizada en bromuro de sodio, en la que las referencias numerales laterales expresan el porcentaje de transmitancia y las inferiores el número de onda (cm^{-1}).

210.-

La figura 7 muestra una curva del espectro de absorción ultravioleta de la sustancia SF-837-A₃ en forma de base libre disuelta en etanol.

La figura 8 muestra una curva del espectro de absorción



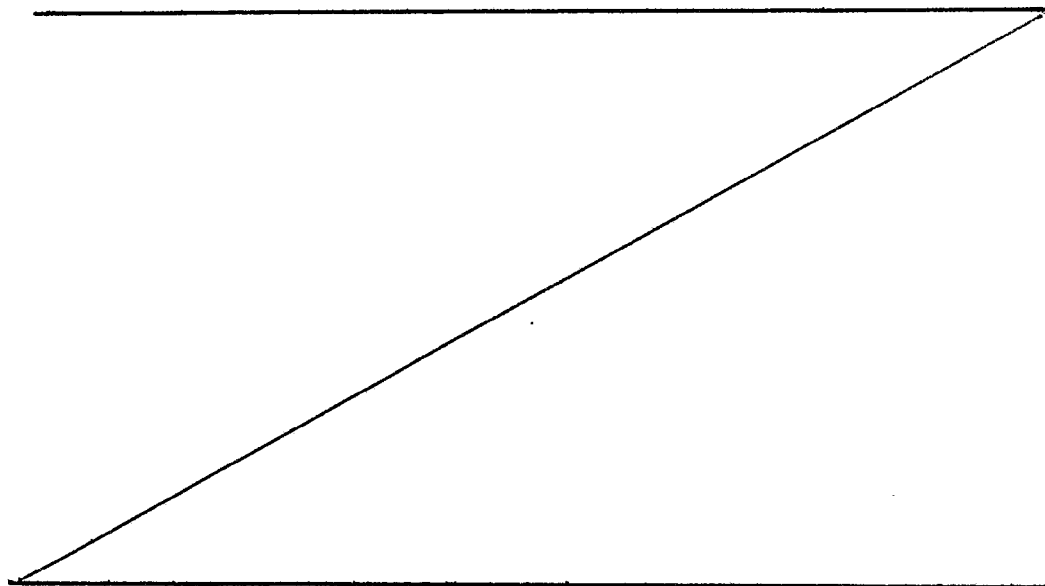
215.- infrarrojo de la sustancia SF-837-A₃, como base libre, pelletizada en bromuro de potasio, en la que las referencias numerales expresan el porcentaje de transmitancia y las inferiores el número de onda (cm⁻¹).

220.- La figura 9 muestra una curva del espectro de absorción ultravioleta de la sustancia SF-837-A₄ en la forma de base libre disuelta en etanol.

225.- La figura 10 muestra una curva del espectro de absorción infrarroja de la base libre de la sustancia SF-837-A₄, pelletizada en bromuro de potasio, en la que las referencias numerales laterales expresan el porcentaje de transmitancia y las inferiores el número de onda (cm⁻¹).

230.- Cuando las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ son sometidas a cromatografía de capa fina de gel de sílice o de alúmina, utilizando diversos sistemas disolventes, hemos hallado que dan una sola mancha con diferentes valores R_f, respectivamente, de manera que la pureza y la homogeneidad de estas sustancias puede ser confirmada.

Los valores R_f de estas sustancias para diferentes sistemas disolventes se tabulan en la Tabla 1 que sigue.

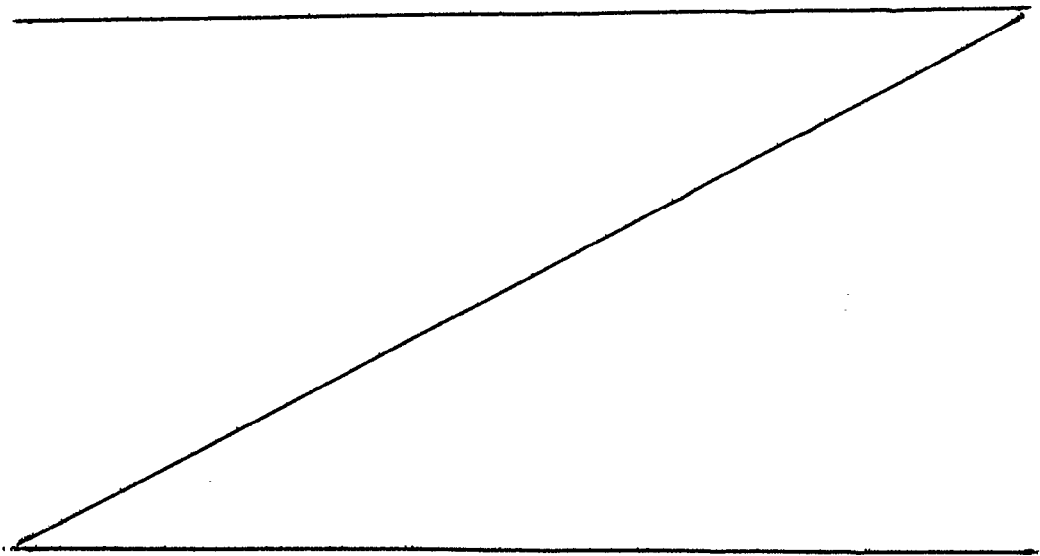




T A B L A 1

Sistemas disolventes	Valor Rf			
	Sustancia SF-837	Sustancia SF-837-A ₂	Sustancia SF-837-A ₃	Sustancia SF-837-A ₄
Cromatografía de capa fina de gel de sílice Benceno-acetona (2:1)	0,45	0,51	0,50	0,55
n-butanol-ácido acético-agua (3:1:1:)	0,67	0,68	0,68	0,69
Metanol	0,82	0,83	0,83	0,84
Cromatografía de capa fina de alúmina Acetato de etilo-benceno (2:1)	0,34	0,40	0,45	0,52
Acetato de etilo	0,78	0,84	0,87	0,91

235.- Los espectros antibacterianos de las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ y sus derivados de acetyl se muestran en la Tabla 2. Las concentraciones mínimas inhibitoras de estos nuevos antibióticos fueron determinadas utilizando el método de dilución en caldo con diversos medios de cultivo, según se indica en la Tabla 2.





376246

Microorganismo de prueba

Concentración inhibidora mínima (mcg/ml.)

Microorganismo de prueba	Sustancia SF-837	Sustancia Diacetil SF-837	Sustancia SF-837-A ₂	Sustancia Diacetil SF-837-A ₂	Sustancia SF-837-A ₃	Sustancia Monacetil SF-837-A ₃	Sustancia SF-837-A ₄	Sustancia Monacetil SF-837-A ₄	Medio de cultivo usado
Staphylococcus aureus 209P	0,39	0,78	0,39	0,78	0,39	0,78	0,39	0,78	1
Staphylococcus aureus 209P, resistente a la penicilina	0,78	0,78	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	1
Staphylococcus aureus 209P resistente a la estreptomkina y a la sustancia A-249	0,39	0,39	0,39	0,78	0,39	0,39	0,78	0,78	1
Staphylococcus aureus 209P resistente a la novobiocina	3,125	6,25	12,50	12,5	12,5	12,5	12,5	>25	1
Staphylococcus aureus 209P resistente a la actinomicina	0,39	0,78	--	--	--	--	--	--	1
Staphylococcus aureus 209P resistente a la kenamicina	3,125	6,25	0,78	1,56	0,78	1,56	0,78	1,56	1
Staphylococcus aureus Smith	0,39	0,78	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	1
Staphylococcus aureus Merajima	0,78	0,78	0,39	0,78	0,78	1,56	0,78	1,56	1
Staphylococcus aureus resistente a estreptomcina, penicilina y tetraciclina	1,56	6,25	0,78	1,56	1,56	3,125	1,56	3,125	1



F A B L A 2 (continuación)

Staphylococcus aureus 193	1,56	3,125	--	--	--	--	--	--	1
Bacillus subtilis ATCC 6635	0,39	0,78	0,2	0,4	0,39	0,78	0,39	1,56	1
Sarcina lutea	0,05	0,10	0,05	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	1
Escherichia coli	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	1
Pseudomonas aeruginosa	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	1
Proteus vulgaris	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	1
3762 Ilebsiella pneumoniae	>25	>25	--	--	--	--	--	--	1
1 Shigella Dysenteriae	>25	>25	--	--	--	--	--	--	1
4 Mycobacterium smegma- tis 607	>25	>25	12,5	>25	>25	>25	>25	>25	2
Mycobacterium phlei	12,5	12,5	--	--	--	--	--	--	2
Gandida albicans	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	3
Penicillium chrysogenum	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	3
Aspergillus niger	>25	>25	--	--	--	--	--	--	3
Socharomyces cerevisiae	>25	>25	--	--	--	--	--	--	3



240.- Con referencia a la Tabla 2, los medios de cultivo usados fueron:

- 1.-Medio de infusión de corazón.
- 2.-Medio de caldo de glicerina.
- 3.-Medio de Saboraud.

245.- Según los resultados de la Tabla 2, es evidente que las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ tienen todas actividad antibacteriana útil contra las bacterias Gram positivas, así como contra las bacterias piogénicas que son resistentes a los antibióticos conocidos. Además, en forma ventajosa, no se ha hallado que la actividad antibacteriana de estas sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ pueda ser inactivada por el suero.

250.- En los resultados de las pruebas de toxicidad por administración oral y parenteral, se ha hallado que las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ del presente invento son todas de baja toxicidad. Así, cuando las bases libres de las mismas fueron dosificadas oralmente a ratones, presentaron valores DL₅₀ de 3.200 mg./Kg., 3.100 mg./Kg., 2.900 mg./Kg. y 2850 mg./Kg., respectivamente.

255.- Además, se ha observado que las bases libres de las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄, así como sus derivados acetyl del presente invento son útiles como antibióticos en la práctica.

260.- De esta forma, la base libre de la sustancia SF-837 fué probada en cuanto a su efecto terapéutico inyectando por vía subcutánea una suspensión acuosa en la región femoral del ratón ICR que había sido infectado letalmente por medio de inyección intraperitoneal de Staphylococcus aureus cepa Smith, con una dosis 10 veces mas alta que su valor de DL₅₀. Se calculó entonces que la



- 270.- base libre de la sustancia SF-837 tenía un valor DC_{50} muy útil de 51 mg./Kg. En el tratamiento del ratón ICR infectado con una cantidad de 100 veces la DL_{50} de Streptococcus hemolyticus cepa Ti-125 Gr-A Tipo I, la administración oral de las bases libres de las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃, SF-837-A₄ presentaba los siguientes valores DC_{50} de 120 mg./Kg., 135 mg./Kg., 170 mg./Kg. y 155 mg./Kg., respectivamente.

- Los efectos terapéuticos del derivado diacetil de la sustancia SF-837, el derivado diacetil de la sustancia SF-837-A₂, el derivado monoacetil de la sustancia SF-837-A₃ y el derivado monoacetil de la sustancia SF-837-A₄, fueron probados también de la forma siguiente. Es decir, se inyectó por vía intraperitoneal una suspensión acuosa de una cepa Smith de Staphylococcus aureus al ratón ICR, con una dosificación 100 veces más alta que su valor DL_{50} . Treinta minutos después de esta infección, los ratones inyectados fueron tratados por medio de la administración oral de una suspensión acuosa conteniendo la sustancia activa de prueba y una pequeña cantidad de goma arábiga. En cada grupo fueron tratados 10 ratones, y fueron alimentados durante 7 días después del tratamiento. Partiendo de los resultados de una serie de las pruebas se calculó después que estos derivados acetil presentan valores DC_{50} útiles de 170 mg./Kg., 180 mg./Kg. 200 mg./Kg. y 200 mg./Kg., respectivamente.

- Para fines terapéuticos, las bases libres, las sales de adición de ácido y los derivados acetil de las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ del presente invento pueden ser formulados de manera convencional en forma de tableta o cápsula para la administración oral o de suspensión para inyección, con o sin aditivos aceptables farmacéuticamente, tales como un portador un excipiente, un agente de suspensión y otros. Para la preparación de la solución acuosa para inyección se prefiere



utilizar las sales de adición de ácido, tales como el tartarato, debido a su más alta solubilidad en agua. Además, puede comprenderse perfectamente que las bases libres, las sales de adición de ácido y los derivados acetil de las sustancias SF-837, SF-305.- 837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ del presente invento pueden utilizarse no sólo en su forma aislada, sino también en forma de una mezcla de dos o más de ellas para fines terapéuticos.

De conformidad con el segundo aspecto del presente invento, se aporta además un procedimiento para la producción de la sustancia SF-837, la sustancia SF-837-A₂, la sustancia SF-837-A₃ y la sustancia SF-837-A₄, que consiste en cultivar una cepa de Streptomyces mycarofaciens en un medio de cultivo conteniendo fuentes de nitrógeno y de carbono asimilables, bajo condiciones aerobias, para producir y acumular la sustancia SF-837, la sustancia SF-837-A₂, la sustancia SF-837-A₃ y la sustancia SF-837-A₄ en el cultivo y después recuperar estos antibióticos en mezcla del cultivo, para después, si se desea, separar estas sustancias antibióticas una de otra.

El microorganismo que produce la sustancia SF-837, la sustancia SF-837-A₂, la sustancia SF-837-A₃ y la sustancia SF-837-A₄ al mismo tiempo, cuando se cultiva, fué aislado por primera vez por los presentes inventores de una muestra de suelo, y denominado Streptomyces mycarofaciens nov. sp., que ha sido depositado sin restricciones en la American Type Culture Collection, Washington D.C., bajo el número ATCC 21454.

El Streptomyces mycarofaciens tiene las siguientes características microbiológicas:

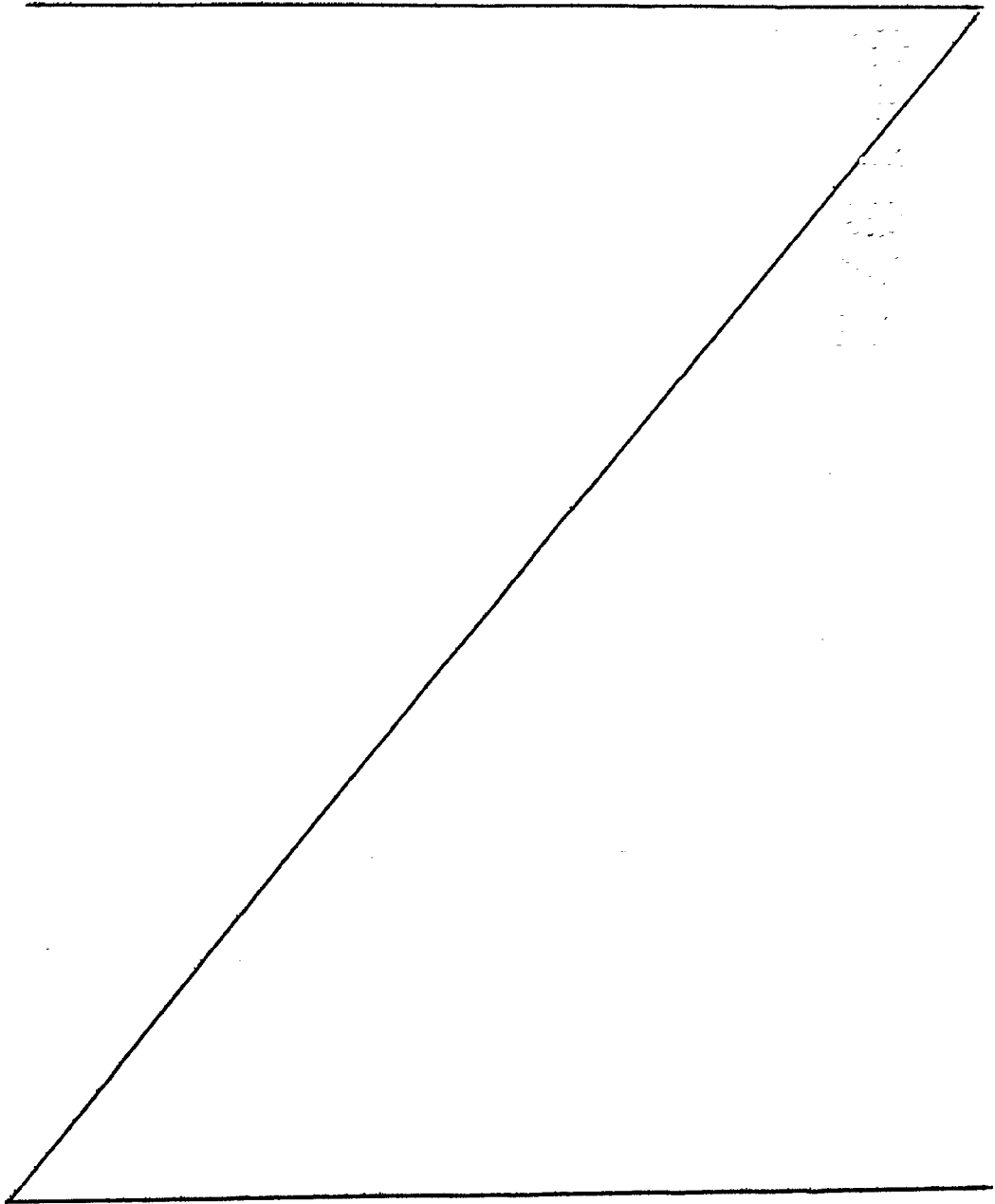
(I).-Observaciones morfológicas:

1) Micelio aéreo: el micelio aéreo produce espiral abierta abundantemente en ágar de glicerina-Ozapek, ágar de glicerina calcio-malato y ágar dealmidón sintético, etc.



2) Espora: Las esporas son de forma esférica, forma ovalada o forma elíptica, la estructura de la superficie es espino-
sa (espinas relativamente más finas y más alargadas) y el tamaño
de la espora mide 0,5 a 0,7 micrones por 0,8 a 1,0 micrones.

335.- (II).-Las características en los diferentes medios de cul-
tivo se muestran en la Tabla 3 que sigue.





T A B L A 3 376246

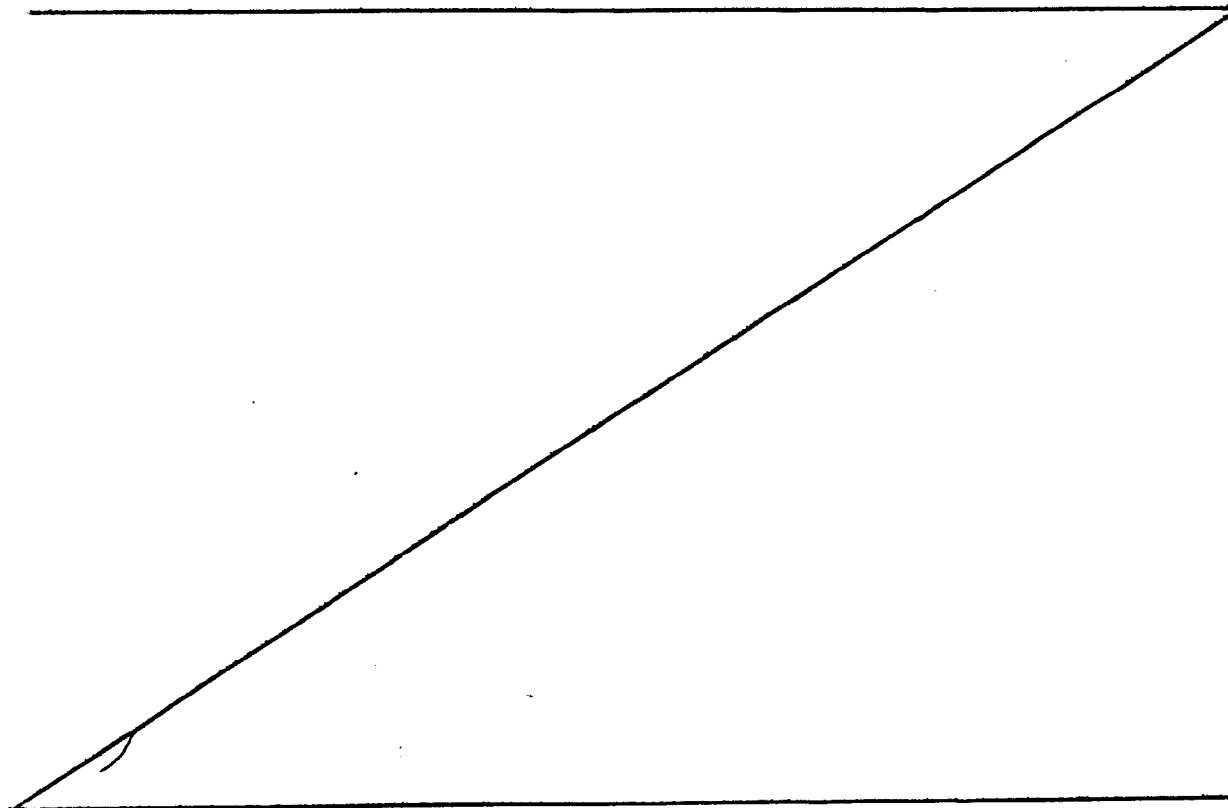
<u>Medio de cultivo</u>	<u>Crecimiento</u>	<u>Micelio aéreo</u>	<u>Pigmento soluble</u>
Sucrosa ágar de Czapek	Crecimiento pobre, inodoro a crema.	Escaso, algodonoso, gris blanquizco.	Ninguno
Agar de glicerina de Czapek	Moreno oscuro	Blanco a crema parcialmente con formación de micelio aéreo y algodonoso	Ninguno o rosa tenue.
Agar de glucosa asparagina de Krainsky	Moreno claro a moreno rojizo	Blanco, con tinte rosa	Ninguno o amarillo moreno claro
Agar de glucosa asparagina de Ushinsky	Moreno con tinte rojizo	Rosa a lavanda	Moreno claro
Agar de calcio-malato	Crecimiento pobre crema	Ninguno	Ninguno
Agar de glicerina calcio-malato	Marrón claro	Rosa que se torna gradualmente en grisáceo (algodonoso)	Ninguno
Agar de almidón sintético	Moreno oscuro con tinte púrpura	Rosa con tinte muy rojizo, que gradualmente cambia a grisáceo (algodonoso)	Ninguno
Agar de caldo	Moreno amarillento	Muy escaso blanco	Ninguno
Agar de caldo de glucosa	Espeso, bueno y moreno a moreno oscuro	Blanco a crema amarillento	Ninguno
Agar de glucosa peptona	Moreno	Escaso, blanco	Ninguno
Agar de tirosina	Moreno rojizo	Blanco	Ninguno
Tapón de patata	Grueso, bueno y moreno a moreno negruzco.	Abundante, moreno amarillento.	Moreno negruzco.
Tapón de zanahoria.	Moreno	Blanco a crema	Moreno en la periferia del crecimiento



TABLA 3 (continuación)

Leche desnatada	Forma de anillo, crecimiento de superficie, moreno claro.	Escaso, blanco	Ninguno
Huevo	Moreno pálido	Ninguno	Ninguno
Suero coagulado de Löeffler	Moreno pálido	Ninguno	Ninguno
Solución de glucosa de Czapek	Crecimiento en superficie y fondo, moreno pálido.	Escaso, blanco	Ninguno
Gelatina (20°C)	Crema a moreno pálido.	Ninguno	Ninguno
De Bennett	Moreno a moreno negrozco.	Ninguno	Ninguno
Medio de celulosa	Sin crecimiento	---	---

Nota: La temperatura de incubación fué de 28°C, en general, a menos que se indique otra cosa.



376246



(III).-Propiedades fisiológicas:

	Producción de sulfuro de hidrógeno:	Negativa.
	Producción de tirosinasa:	Negativa.
340.-	Producción de nitrito:	Positiva.
	Coagulación de leche desnatada:	Positiva.
	Peptonización de la leche desnatada:	Negativa.
	Hidrolisis del almidón:	Positiva.
	Licuación de la gelatina:	Positiva (debil).
345.-	Disolución del suero coagulado de Löeffler:	Negativa.
	Acción cromogénica:	Negativa.

(IV).-Utilización de las fuentes de carbono:

- (1).-Utiliza: glucosa, galactosa, fructosa, maltosa,
350.- lactosa, dextrina, almidón, glicerina, inositol, manosa, salic-
cina, acetato de sodio, citrato de sodio, succinato de sodio.
- (2).-Dudoso: Arabinosa y ramnosa.
- (3).-No utiliza: xilosa, sacarosa, rafinosa, dulcitol,
sorbitol, manitol y celulosa.

355.- (V).-Temperatura de crecimiento: de 15 a 38°C.

Las características microbiológicas arriba mencionadas de la cepa productora de las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ (denominada de aquí en adelante, simplemente cepa SF-837) pueden resumirse como sigue: la conidiofora es espiral, la espora es espinosa. En medio de cultivo sintético se observa un crecimiento de color crema a moreno a moreno rojizo, y se producen micelio aéreo color rosa y micelio aéreo algodonoso de color gris. No se observó formación notable de pigmento soluble, pero se observó la formación notable de pigmento soluble de color moreno claro en un grupo restringido de medio de cultivo sintético. En medio de cultivo orgánico, por otra parte, se observa



370.- generalmente crecimiento de color morono con formación de micelio aéreo de color blanco a crema, pero sin producción de pigmento soluble. Sin embargo, sobre tapón de patata se forma micelio de color moreno amarillento abundantemente y se observa la producción de pigmento soluble de color negruzco.

375.- Según la descripción de Waksman (Waksman, The Actinomycetes, Vol 2, 1961), puede verse que las características de cultivo mencionadas de la cepa SF-837 son parcialmente cercanas a las de las series fradiae, ruber y flavus del género Streptomyces. En consecuencia, a continuación se da consideración a este punto.

380.- En primer lugar, en vista de que la cepa SF-837 es negativa a la formación de melanina y muestra la formación de micelio aéreo de color o tinte rosa, la cepa SF-837 debe ser comparada con las cepas de la serie fradiae, concretamente Streptomyces fradiae, Streptomyces luridus, Streptomyces roseus y Streptomyces fuscus. Sin embargo, la cepa SF-837 es diferenciada de las pertenecientes a la serie fradiae porque su micelio aéreo de color o tinte rosa aparece temporalmente en la fase inicial de incubación, y en muchos casos cambia a micelio de color gris y algodonoso aéreo en las fases media y última de la incubación, mientras que el color o tinte rosa observado en las cepas de la serie fradiae es mucho más estable. Además, el micelio aéreo del Streptomyces fradiae es recto y diferente de la espiral de la cepa SF-837. Por otra parte, el Streptomyces Fradiae es claramente diferente de la cepa SF-837 en que el primero muestra abundante formación de micelio aéreo en ágar de sucrosa de Czapek y crecimiento incoloro en ágar de almidón.

395.- La cepa SF-837 se diferencia del Streptomyces fuscus y del Streptomyces luridus en que el primero de estos no muestra la formación de espiral y en que el segundo muestra la formación de



- 400.- espiral solo en un grupo restringido de medios de cultivo, mientras que la cepa SF-837 muestra abundante formación de espiral en muchos medios de cultivo. Además, el *Streptomyces roseus* es común a la cepa SF-837 en que se observa la formación de espiral, pero pueden diferenciarse con claridad uno de otro porque el *Streptomyces roseus* muestra crecimiento incoloro en ágar de almidón sintético, pero no muestra la formación de micelio aéreo en tapón de patata.
- 405.- En segundo lugar, en vista de que la cepa SF-837 es negativa a la formación de melanina y muestra un crecimiento de color o tinte rosa, la misma debe ser comparada con el *Streptomyces arythraeus*, el *Streptomyces niveoruber* y el *Streptomyces purpurascene*, etc., que pertenecen a la serie ruber.
- 410.- El *Streptomyces niveoruber* es claramente distinto a la cepa SF-837 por cuanto la estructura superficial de la espora del primero es lisa, mientras que la de la última es espinosa. Además, el *Streptomyces albosporeus* se diferencia de la cepa SF-837 porque el *Streptomyces albosporeus* forma micelios aéreos que
- 415.- son rectos predominantemente, muestra un crecimiento de color distintamente rojo sobre ágar de sucrosa de Czapek y en ágar de glicerina malato de calcio, pero no produce micelio aéreo en ágar de almidón. Además, el *Streptomyces aerithraeus* no concuerda con la cepa SF-837 en que el primero muestra crecimiento de color rojo sobre ágar de sucrosa de Czapek y en tapón de patata y muestra un crecimiento de color crema en ágar de glucosa-asparagina y ágar de almidón sintético, sobre los que la cepa SF-837 mostraría más bien un crecimiento de tinte rosa. Por otra parte, el *Streptomyces purpuracene* es común con la cepa SF-837 en la
- 420.- estructura espinosa de la superficie de esporas, pero el primero se diferencia de la última en que aquél produce pigmento notable-
- 425.-



mente soluble de color o tinte rosa en medio de cultivo sintético, mientras que la última carece de dicho pigmento soluble.

La comparación de la cepa SF-837 se hace además con el
430.- *Streptomyces microflavus* y el *Streptomyces roseoflavus*, que pertenecen a la serie flavus, pero que se estiman en estrecha relación con aquella. A la vista de las características de cultivo de ellos, el *Streptomyces microflavus* y el *Streptomyces roseoflavus* se acercan a la cepa SF-837 en algunos aspectos,
435.- pero estas dos cepas producen esporas cuya superficie estructural es lisa (H.D. Tresner et al., "Journal of Bacteriology Vol. 91, páginas 1.988 a 2.005, 1.966), que se diferencia claramente de la estructura espinosa de la spora de la cepa SF-837.

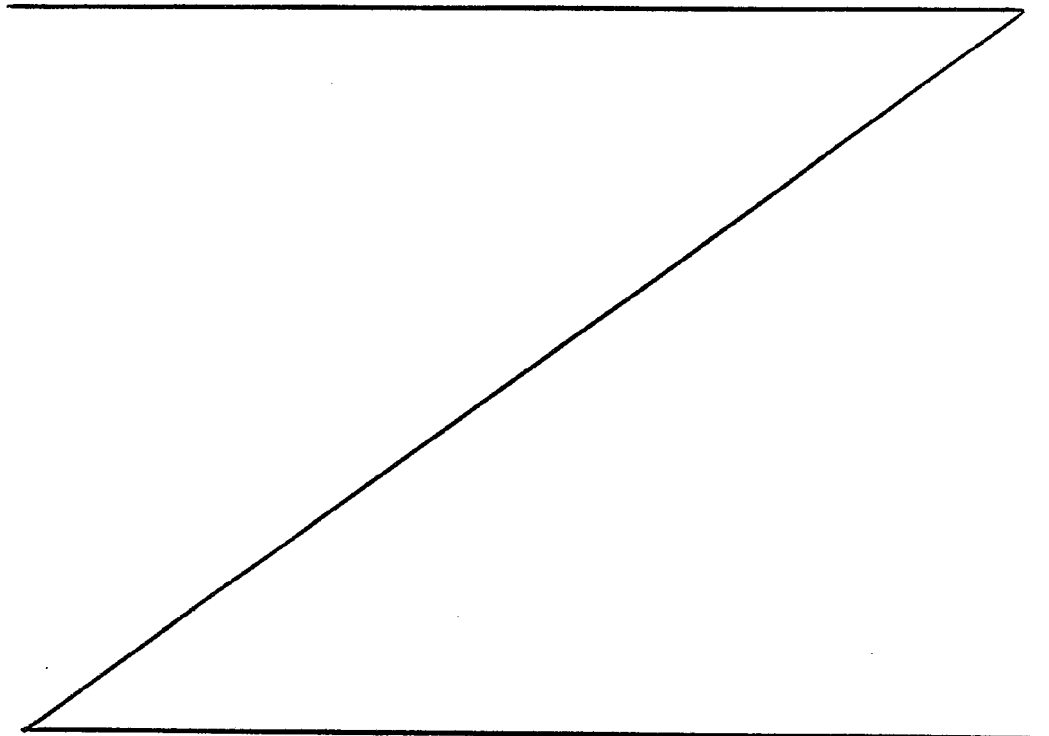
En consecuencia, no se puede hallar cepa alguna que coincida con la cepa SF-837, entre las especies conocidas del género
440.- *Streptomyces*.

Por otra parte, las nuevas sustancias antibióticas SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ que son producidas por la cepa SF-837 son típicas de los antibióticos macrólidos básicos. Entre
445.- las nuevas sustancias antibióticas del presente invento, la SF-837 y la SF-837-A₂ presentan un máximo de absorción a una longitud de onda de 232 mμ. en el espectro ultravioleta y, en vista de esto, puede suponerse que estas dos sustancias son antibióticos de la misma serie que la leucomicina, josamicina, espiramicina, miamicina y terciomicina. Además, las sustancias SF-837-A₃
450.- SF-837-A₄ muestran una absorción máxima alta en la proximidad de una longitud de onda de 280 mμ. en el espectro ultravioleta, y en vista de esto, estas dos sustancias puede suponerse que son antibióticos de la misma serie que la nidamicina, carbomicina B,
455.- tilosina, relomicina y macrocina. Por consiguiente, ahora se compararán las propiedades microbiológicas de la cepa SF-837 con



las de los micro-organismos que producen los antibióticos conocidos arriba mencionados.

Puede comprenderse perfectamente que la cepa SF-837 es diferente del micro-organismo productor de la jasomicina *Streptomyces kitasatoensis*; el micro-organismo productor de la jasomicina *Streptomyces narbonensis* variedad *josamyceticus*; el micro-organismo productor de la espiramicina, *Streptomyces ambofaciens*; el micro-organismo productor de la miamicina *Streptomyces ambofaciens*; el micro-organismo productor de la terciomicina, *Streptomyces eurocidicus*, *Streptomyces albireticuli*; el micro-organismo productor de la carbomicina B, *Streptomyces halstedii*; el micro-organismo productor de la tilosina y de la macrocina, *Streptomyces fradiae*, y el micro-organismo productor de la relomicina, *Streptomyces hygrosopicus*, ya que aparecen diferencias claras entre las características morfológicas de la cepa SF-837 y las de los micro-organismos conocidos, según se muestra en la Tabla 4 que sigue.



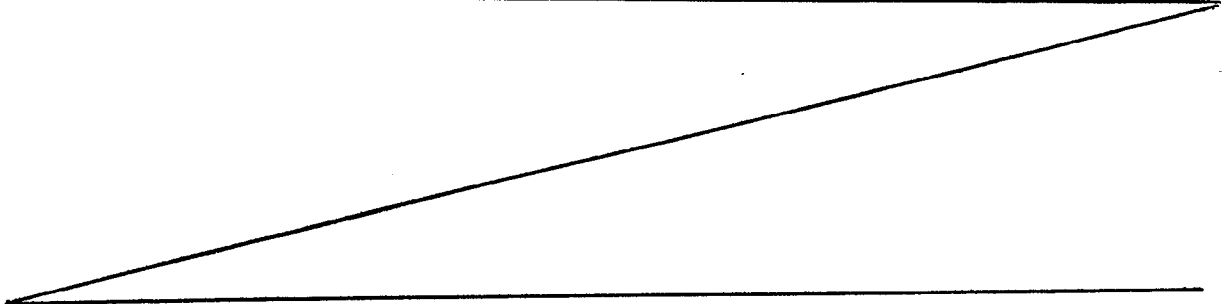
376246



T A B L A 4

7

Antibióticos producidos	Micro-organismos	Micelio aéreo	Estructura superficial de la esporo
Sustancia SF-837 Sustancia SF-837-A ₂ Sustancia SF-837-A ₃ Sustancia SF-837-A ₄	Cepa SF-837	Espiral	Espinosa
Leucomicina	<i>Streptomyces kitasatoensis</i>	Verticilo	Lisa
Josamicina	<i>Streptomyces narboensis</i> var. <i>josamyceticus</i>	Recto	Lisa
Espiramicina	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Espiral	Lisa
Miamicina	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Espiral	Lisa
Terciomicina	<i>Streptomyces eurocidicus</i>	Verticilo	Lisa
Terciomicina	<i>Streptomyces albireticuli</i>	Verticilo	Lisa
Carbomicina B	<i>Streptomyces halstedii</i>	Espiral	Lisa
Tilosina	<i>Streptomyces fradiae</i>	Recto	Lisa
Microcina	<i>Streptomyces fradiae</i>	Recto	Lisa
Relomicina	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	Espiral	Lisa





475.- La cepa SF-837 es también claramente diferente del micro-organismo productor de la nidamicina, *Streptomyces djakartensis* (el cual es nombrado en la memoria de la Patente Alemana número 1.077.381) cuya estructura superficial de espora no es descrita, en que el *Streptomyces djakartensis* es positivo a la formación de melanina, pero no peptoniza ni coagula la leche desnatada.

480.- Como resultado de la arriba mencionada comparación microbiológica y consiguiente consideración, hemos confirmado no sólo que la cepa SF-837 es una cepa nueva de uno de los micro-organismos que producen los antibióticos macrólidos básicos, sino también que es diferente a todas las cepas conocidas, incluso
485.- desde el punto de vista de la taxonomía del total de actinomicetas. Así, hemos designado a esta cepa SF-837 como *Streptomyces mycarofaciens* nov. sp.

La cepa SF-837 tiene propiedades que son capaces de variar, como puede observarse normalmente con los otros *Streptomyces*.
490.- Así, por ejemplo, la cepa SF-837 puede producir variantes y mutantes cuando se trata con diversos mutágenos conocidos, tales como rayos ultravioletas, rayos X, ondas electromagnéticas de alta frecuencia, rayos radioactivos y productos químicos, etc. Todas las variantes y mutantes naturales y artificiales de la
495.- cepa SF-837 se pueden utilizar en el procedimiento del presente invento, en cuanto tienen la capacidad de producir cualquiera de las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃, SF-837-A₄ del presente invento.

500.- De conformidad con el procedimiento del presente invento, la cepa SF-837 o su variante o mutante, pueden ser cultivados en una forma conocida en un medio de cultivo que contenga los nutrientes que puedan ser utilizados por los micro-organismos habituales. Como fuentes de nutrientes, pueden emplearse cualesquiera de los nutrientes que han sido utilizados habitualmente en el



- 505.- cultivo de los *Streptomyces*. Por ejemplo, la glucosa, almidón, glicerina, dextrina, sucrosa, almidón sacarificado, melazas y similares, son útiles como fuente de carbono. Como fuente de nitrógeno pueden utilizarse la harina de soja, el embrión de trigo, el extracto de carne, peptona, corn steep liquor, pro-
- 510.- teína vegetal soluble, levadura seca, sulfato de amonio, nitrato de sodio y similares. Si es necesario, pueden añadirse al medio de cultivo sales inorgánicas tales como carbonato de calcio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfatos y similares. Además, los materiales orgánicos e inorgánicos que ayudan al creci-
- 515.- miento de la cepa SF-837 y que promueven la producción de por lo menos una de las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄.

- Como método de cultivo de la cepa SF-837, se prefiere el cultivo líquido y, de manera particular, el cultivo líquido bajo
- 520.- condiciones aeróbicas sumergidas, de modo similar a los procedimientos generales para la producción de los antibióticos conocidos. El cultivo puede ser efectuado bajo condiciones aeróbicas y la temperatura de fermentación adecuada se encuentra en la gama de 20°C a 30°C. Para la producción comercial o de laboratorio
- 525.- de las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄, sin embargo, a menudo se prefiere realizar el cultivo a una temperatura en las proximidades de 28°C. En estas circunstancias, la concentración de las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ en el caldo de cultivo alcanza un máximo al cabo de 2
- 530.- a 5 días de fermentación, por el método de cultivo con agitación o con el método de cultivo en tanque.

- La sustancia SF-837 es el producto metabólico principal del *Streptomyces mycarofaciens*, y las sustancias SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄, de modo normal, se producen normalmente con propor-
- 535.- ciones menores en una gama del 5 al 20 por ciento por peso de la



sustancia SF-837 producida.

540.- Las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ del presente invento pueden ser producidas al mismo tiempo por el cultivo de la cepa SF-837 y tienen propiedades físico-químicas similares a las establecidas en adelante, y pueden recuperarse del cultivo, purificarse y aislarse en general utilizando cualquiera de los métodos conocidos de los que por lo general se dispone para la recuperación, purificación y aislamiento de los antibióticos básicos conocidos.

545.- La recuperación de las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ del presente invento, del cultivo, puede realizarse de diversas formas.

550.- Así, las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ producidas a partir del cultivo de la cepa SF-837 están presentes en la torta de micelio que contiene la fase sólida, así como en la fase líquida del cultivo. El cultivo puede ser filtrado en una forma conocida para dar la torta de filtro (es decir la torta de micelio que contiene la fase sólida) y el filtrado (es decir, la fase líquida del caldo de fermentación) de

555.- forma separada. Las sustancias activas presentes en el filtrado pueden ser extraídas con un disolvente orgánico no miscible en agua, adecuado, tal como acetato de etilo, acetato de butilo, cloroformo, benceno, éter de etilo, metil isobutil cetona y butanol, etc., bajo condiciones neutra o débilmente alcalina. Las

560.- sustancias activas presentes en la torta de filtro también pueden extraerse con agua acidificada, o con un disolvente orgánico miscible con agua, adecuado, tal como metanol, etanol y acetona, etc. De forma alternativa, el cultivo puede ser extraído directamente con un disolvente orgánico inmiscible con agua, sin fil-

565.- tración preliminar de la torta de micelio, de manera que las



sustancias activas puedan ser transferidas inmediatamente desde el cultivo al disolvente orgánico usado.

- Las sustancias activas que han sido transferidas en solución al disolvente orgánico pueden ser re-extractadas a continuación con agua acidificada. El extracto resultante en agua acidificada puede ser hecho neutro después o débilmente alcalino en su naturaleza mediante la adición de sustancias básicas tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio o bicarbonato de sodio, y después agitadas junto con un disolvente orgánico adecuado, de modo que las sustancias activas sean transferidas de nuevo a la fase de disolvente orgánico. Repitiendo estas operaciones de extracción inversa, pueden ser eliminadas en cierto grado las impurezas de las sustancias activas. El extracto en el disolvente orgánico puede ser concentrado a sequedad bajo presión reducida, de manera que se puede recuperar un polvo crudo conteniendo las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄. De manera alternativa, la solución de las sustancias activas en agua acidificada puede ser liofilizada como tal para dar las sales de adición ácida de las sustancias activas, o la solución acuosa puede ser hecha neutra o débilmente alcalina por medio de la adición de un material básico adecuado para precipitar las sustancias activas en forma de base libre.
- 570.-
575.-
580.-
585.-

- Las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ son básicas por naturaleza, como se ha mencionado ya, y por lo tanto el cultivo o su filtrado, o la solución de las sustancias activas también pueden tratarse con un cambiador de ión como, por ejemplo, la resina cambiadora de ión Amberlite IRC-50, etc., y celulosa cambiadora de ión, de manera que las sustancias activas sean absorbidas por el cambiador de ión que a continuación
- 590.-
595.-



puede ser levigado utilizando un disolvente adecuado.

El polvo crudo resultante que contiene las sustancias activas así obtenido puede ser purificado más extrayéndolo con un disolvente orgánico adecuado, tal como benceno, que puede disolver las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ de aquél, para eliminar más impurezas resultantes, lavando con un disolvente orgánico adecuado tal como un éter de petróleo, ligroina y n-hexano, que escasamente pueden disolver las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ pero pueden disolver muy bien las impurezas, y/o por medio de la adición de éter de petróleo, ligroina o n-hexano a una solución de las sustancias activas en un disolvente orgánico tal como benceno.

De esta forma, se puede obtener una mezcla purificada de la sustancia SF-837 con las sustancias SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄, en la que la proporción total de las sustancias SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ varía normalmente en una gama del 5 al 20 por ciento por peso del contenido de la sustancia SF-837, dependiendo de las condiciones de fermentación, la forma de la recuperación, los métodos de purificación empleados y otros diversos factores. Esta mezcla purificada, como tal, está dispuesta para formulación y para administración para fines terapéuticos, sin aislar cada una de las sustancias componentes de ella.

Si se desea, la mezcla purificada de la sustancia SF-837 con una proporción menor de sustancias SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ puede convertirse directamente en una mezcla de sus sales de adición de ácido disolviendo la mezcla de las bases libres en un disolvente orgánico tal como el éter de etilo, tratando la solución con una solución de un ácido orgánico o inorgánico tal como ácido hidrocblórico, ácido sulfúrico, ácido tartárico, ácido cítrico, disuelto en un disolvente orgánico ade-



- cuado tal como éter de etilo y precipitándola así en la forma de una mezcla de las sales de adición de ácido que se puede filtrar y secar y que después estará dispuesta para formulación y para administración para fines terapéuticos. La mezcla purificada de las bases libres también puede convertirse en una mezcla de los mencionados derivados de acetil en una forma convencional de acetilación, por ejemplo disolviendo en piridina, tratando la solución con anhídrido acético a temperatura ambiente o a una temperatura ligeramente elevada, durante un período de tiempo suficiente, para dar los derivados de diacetil de las sustancias SF-837 y SF-837-A₂ y los derivados monoacetil de las sustancias SF-837-A₃ y SF-837-A₄, y depositando los productos de la acetilación por medio de la adición de agua de hielo a la mezcla de reacción. La mezcla de los derivados acetilados puede ser después filtrada y lavada con agua, para que quede libre de las impurezas, y a continuación esta mezcla, como tal, está dispuesta para formulación y administración para fines terapéuticos.
- 630.-
- 635.-
- 640.-

- Con el fin de efectuar la separación de las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ unas de otras, es eficaz emplear métodos cromatográficos utilizando un absorbente adecuado tal como gel de alúmina o sílice activado y similares y un disolvente adecuado de desarrollo, así como diversos tipos de métodos de distribución a contra-corriente, solos o en combinación. En la mezcla purificada de las bases libres de las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ que se ha obtenido con los procedimientos arriba mencionados de recuperación y purificación, las sustancias SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ se encuentran normalmente presentes como componentes menores, y en una proporción más pequeña que la sustancia SF-837. En consecuencia, para el aislamiento de los componentes puede ser efi-
- 645.-
- 650.-
- 655.-



660.- caz que dicha mezcla purificada de las bases libres se someta primero a un método de distribución a contra-corriente, con el fin de separar una fracción rica en la sustancia SF-837 de una fracción rica en una mezcla de las sustancias SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄, y que estas dos fracciones sean después sometidas por separado a cromatografía con gel de sílice o de alúmina, para efectuar el aislamiento completo de las sustancias componentes unas de otras.

665.- En general, la separación de las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ puede realizarse de modo conveniente, por ejemplo, sometiendo una solución en un disolvente orgánico adecuado del polvo crudo arriba mencionado que contenga las sustancias activas mezcladas recuperadas a cromatografía en una columna de gel de sílice o de alúmina activado utilizando una mezcla de acetato de etilo-benceno (1:1) o benceno-acetona (4:1) como disolvente de desarrollo y, si es necesario, repitiendo los procedimientos de cromatografía varias veces. Por lo general, las sustancias activas pueden ser levigadas de manera sucesiva de la columna de alúmina en el orden de sustancias SF-837-A₄, sustancias SF-837-A₃, sustancia SF-837-A₂ y sustancia SF-837, cuando se desarrolla con acetato de etilo-benceno (1:1). Al mismo tiempo, se prueba o ensaya una parte menor de cada una de las fracciones del levigado, por medio de cromatografía de capa fina de alúmina. Las fracciones que entonces se observa que dan una sola mancha característica de una de las sustancias activas en esta cromatografía de capa fina de alúmina, y de las que puede confirmarse por tanto que solo contienen una de las sustancias activas, se combinan juntas y después se concentran hasta la sequedad bajo presión reducida, y estos procedimientos se repiten con cada una de las fracciones que contienen la sustancia SF-837 sola, las

670.-

675.-

680.-

685.-



fracciones que contienen la sustancia SF-837-A₂ sola, las fracciones que contienen la sustancia SF-837-A₃ sola, y las fracciones que contienen la sustancia SF-837-A₄ sola. De esta forma se pueden separar unas de otras las bases libres puras de las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄, en forma de polvo de color blanco, respectivamente.

Para la purificación y separación de las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ puede añadirse que cualquiera de los métodos conocidos que han sido utilizados para la purificación y la separación de los antibióticos macrólidos puede aplicarse a dicha finalidad, ya que también ellas son miembros de los antibióticos macrólidos. Sin embargo, preferimos realizar la producción, recuperación o aislamiento, purificación y separación de las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃, SF-837-A₄ del cultivo de la cepa SF-837, y entre sí, mediante los siguientes pasos que comprenden el cultivo de la cepa SF-837 a una temperatura de 20 a 30°C en un medio de líquido profundo aireado conteniendo las fuentes de nitrógeno y carbono asimilables conocidas, hasta que se de una actividad antibacteriana significativa al caldo de cultivo, la filtración del cultivo, la extracción del filtrado del cultivo y un pH de 7 a 9 con un disolvente orgánico no miscible con agua para las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ tal como acetato de etilo, acetato de butilo, cloroformo, éter de etilo, metil isobutil cetona y butanol, reextractando a continuación el extracto orgánico resultante conteniendo las sustancias activas con ácido acuoso diluído (a pH 2 a 3), tal como un ácido hidroclicórico acuoso, ácido sulfúrico acuoso y similares, haciendo el extracto acuoso resultante alcalino (con preferencia a pH 7 a 9) por medio de la adición de álcali, extractando de nuevo el extracto acuoso con uno

376246



- de los disolventes orgánicos no miscibles con agua para transferir las sustancias activas al último disolvente orgánico, repitiendo por lo menos una vez esta transferencia de las sustancias activas desde un extracto orgánico en una cantidad de disolvente orgánico no miscible en agua en ácido acuoso diluido y después
- 720.- en otra cantidad de disolvente orgánico no miscible en agua, concentrando la solución orgánica resultante final de las sustancias activas, así parcialmente purificadas, hasta la sequedad en vacío, disolviendo el polvo crudo resultante de las sustancias activas mezcladas en acetato de etilo o acetato de butilo, pasando la solución a través de una columna de carbón activado, desarrollando con acetato de etilo o acetato de butilo, recogiendo las fracciones a tiras del levigado, concentrando las fracciones activas a un volumen más pequeño, extractando el concentrado con
- 725.- ácido hidroclicórico acuoso diluido, haciendo el extracto acuoso alcalino por medio de la adición de un álcali, separando el precipitado formado en esencia hecho de las sustancias activas mezcladas, disolviendo el precipitado en benceno, sometiendo la solución de benceno a cromatografía con una columna de gel de sílice y utilizando una mezcla de benceno acetona como disolvente de desarrollo, recogiendo el levigado en fracciones, probando cada una de las fracciones por medio de cromatografía de capa fina de alúmina, combinando juntas y concentrando a sequedad en vacío sólo las fracciones que den una sola mancha característica de la
- 730.- sustancia SF-837-A₄ en esta cromatografía de capa fina de alúmina, con lo que la base libre de la sustancia SF-837-A₄ se produce en la forma de polvo puro, combinando juntas y concentrando a sequedad en vacío sólo las fracciones que den una sola mancha característica de la sustancia SF-837 en la cromatografía de capa fina de alúmina, con lo que la base libre de la sustancia
- 735.-
- 740.-
- 745.-

376246



- SF-837 se produce en forma de polvo puro, combinando juntas y concentrando a sequedad en vacío las fracciones que sean eluidas de dicha columna de gel de sílice después de dar las fracciones mencionadas la mancha única característica de la sustancia SF-
- 750.- 837-A₄ aunque antes de dar las mencionadas fracciones la mancha única característica de la sustancia SF-837 y que contienen en solución las sustancias SF-837-A₂ y SF-837-A₃ juntas con una porción menor de la sustancia SF-837, con lo que se obtiene un polvo de una mezcla de las sustancias SF-837-A₂ y SF-837-A₃ jun-
- 755.- tas con una porción menor de la sustancia SF-837, disolviendo este polvo en benceno, sometiendo la solución resultante de dicho polvo en benceno a cromatografía en una columna de alúmina activada y utilizando una mezcla de acetato de etilo-benceno y a continuación una mezcla de acetato de etilo-acetona como di-
- 760.- solvente de desarrollo, recogiendo el levigado de la misma en fracciones, probando cada una de estas fracciones por medio de una cromatografía de capa fina de alúmina, combinando juntas y concentrando a sequedad bajo vacío solo las fracciones que den una sola mancha característica de la sustancia SF-837-A₃ en la
- 765.- cromatografía de capa fina de alúmina que se acaba de mencionar, con lo que la base libre de la sustancia SF-837-A₃ se produce en forma de polvo puro, combinando juntas y concentrando a sequedad en vacío las restantes fracciones del levigado a partir de la columna de alúmina activada mencionada para dar un polvo conteniendo principalmente la sustancia SF-837-A₂, disolviendo de
- 770.- nuevo este polvo en benceno, sometiendo de nuevo a cromatografía en columna de alúmina activada y usando una mezcla de acetato de etilo-benceno como disolvente de desarrollo, recogiendo el levigado de la misma en fracciones, probando cada una de las fracciones por medio de cromatografía de capa fina de alúmina, com-
- 775.-



binando juntas y concentrando a sequedad en vacío solo las fracciones que dan una sola mancha característica de la sustancia SF-837-A₂ en la cromatografía de capa fina acabada de mencionar, con lo que la base libre de la sustancia SF-837-A₂ se produce en forma de polvo puro.

Las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ que han sido separadas unas de otras en el estado puro, según se ha mencionado arriba, pueden ser convertidas a continuación cada una de ellas en sal de adición ácida o en el antedicho derivado de acetil, si se desea. La conversión en la sal de adición ácida puede efectuarse disolviendo la base libre en un disolvente orgánico adecuado tal como éter de etilo, etc., y añadiendo después al mismo una solución saturada de un ácido orgánico o inorgánico adecuado tal como ácido tartárico, ácido cítrico, ácido acético, ácido hidroclicórico, ácido sulfúrico y similares disueltos en éter de etilo. La conversión en los derivados de diacetil de las sustancias SF-837 y SF-837-A₂ o en los derivados monoacetil de las sustancias SF-837-A₃ y SF-837-A₄ puede realizarse, por ejemplo, disolviendo la base libre en piridina y a continuación tratando la solución con un gran exceso de anhídrido acético, en la misma forma que se ha mencionado antes.

Según se ha mencionado arriba, las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ del presente invento pertenecen a la clase de los antibióticos macrólidos. Las sustancias SF-837 y SF-837-A₂ presentan un máximo de absorción a una longitud de onda de 232 mμ en la región ultravioleta del espectro y por lo tanto tienen que ser comparadas con algunos de los antibióticos macrólidos conocidos, concretamente el grupo de espiramicina (I, II y III), grupo de leucomicina (A₁ a A₉ y B₁ a B₄), josamicina, terciomicina (A y B) y miamicina. Las diferencias de las sustan-

376246



cia SF-837 y de la sustancia SF-837-A₂ con estos antibióticos macrólidos conocidos se aclaran mas adelante.

En primer lugar, la espiramicina se distingue de las sustancias SF-837 y SF-837-A₂ del presente invento por las diferencias en sus valores Rf en cromatografía de capa fina de gel de sílice que se mencionan en la Tabla 5 siguiente y tambien juzgando por la comparación de los valores de las rotaciones ópticas de los valores pKa' de la espiramicina que se mencionan en las páginas 304 a 317 de la "Helvetica Chimica Acta" Vol. 39, puesto que la espiramicina I muestra $(\alpha)_D^{20} -96^\circ$ y pKa' de 7,7; la espiramicina II muestra $(\alpha)_D^{20} -80^\circ$ y pKa' de 7,6; y la espiramicina III muestra $(\alpha)_D^{20} -79^\circ$ y pKa' de 7,6.

T A B L A 5

Antibióticos	Valor Rf
Disolvente de desarrollo consistente en n-butanol: ácido de acético: agua (3:1:1)	
Sustancia SF-837	0,67
Sustancia SF-837-A ₂	0,68

Espiramicina I	0,11
Espiramicina II	0,13
Espiramicina III	0,19
Terciomicina A	0,78
Terciomicina B	0,76

En segundo lugar, la miamicina, el grupo B de leucomicina B₁, B₂, B₃ y B₄) y la leucomicina A₂ se distinguen de las sustancias SF-837 y SF-837-A₂ del presente invento en que la mia-



micina tiene un valor nulo de rotación óptica ("Antibiotics and Chemotherapy", páginas 37 a 39 (1.957), en que las leucomicinas B₁, B₂, B₃ y B₄ tienen un punto de fusión de 214 a 215°C, 214 a 216°C, 216 a 217°C y 221 a 223°C, respectivamente (Gaceta de Patentes Japonesa N° Sho-35-18750) y en que las leucomicina A₂ tiene un valor de E₁^{1%}_{1 cm.} 158 para el máximo de absorción en la región ultravioleta del espectro y un peso molecular de 1.220 a 1.250 (Gaceta de Patentes Japonesa N° Sho-35-18750).

En tercer lugar, las terciomicinas A y B se diferencian claramente de las sustancias SF-837 y SF-837-A₂ del presente invento en vista de las diferencias en sus puntos de fusión, su rotación óptica y sus valores Rf en cromatografía de capa fina de gel de sílice, según aparece en las Tablas 5 y 6. La terciomicina tiene un punto de fusión de 202 a 204°C y un grado de rotación óptica de $[\alpha]_D -44^\circ$ ("Journal of Antibiotics", páginas 105 a 109 (1955), y la terciomicina B tiene un punto de fusión de 97 a 99°C y un grado de rotación óptica de $[\alpha]_D -55^\circ$ ("Journal of Antibiotics" páginas 161 a 163 (1.955)).

En cuarto lugar, las leucomicinas A₁, A₃, A₄, A₅, A₆, A₇, A₈ y A₉ y la josamicina pueden ser diferenciadas de las sustancias SF-837 y SF-837-A₂ comparando directamente sus valores Rf en cromatografía de capa fina de alúmina (utilizando acetato de etilo como disolvente de desarrollo), según se muestra en la Tabla 6 siguiente y en vista de las propiedades conocidas de la

leucomicina A₁ según se describen en la solicitud de Patente Japonesa n° Sho-36-98, y considerando además que la leucomicina A₃ tiene un punto de fusión de 120 a 121°C y un grado de rotación óptica de $[\alpha]_D -55,4$ ("Antimicrobial Agents and Chemotherapy", páginas 631 a 636 (1.967)), las propiedades conocidas de

las leucomicinas A₄, A₅, A₆, A₇, A₈ y A₉ descritas en el "Jour-



nal of Antibiotics" páginas 272 a 278 (1.968) y que la josamicina tiene un punto de fusión de 130 a 133°C., y un grado de rotación óptica de $(\alpha)_D^{20} -70^\circ\text{C}$ (Gaceta de Patentes japonesa num. Sho-41-21759).

T A B L A 6

Antibióticos	Valores Rf
Sustancia SF-837	0,78
Sustancia SF-837-A ₂	0,84

Josamicina	0,65
Leucomicina A ₁	0,08
Leucomicina A ₅	0,05
Leucomicina A ₇	0,01
Leucomicina A ₉	0,02
Leucomicina A ₃	0,65
Leucomicina A ₄	0,60
Leucomicina A ₆	0,57
Leucomicina A ₈	0,53
Terciomicina A	0,61
Terciomicina B	0,64

- 855.- La diferencia de la sustancia SF-837 del presente invento con los antibióticos conocidos arriba mencionados puede hacerse mucho más evidente observando los cromatogramas de capa fina de alúmina que se muestran en la Figura 4 de los dibujos adjuntos. Los cromatogramas de la Figura 4 fueron preparados manchando una
- 860.- solución de la sustancia SF-837 y leucomicina A₃, una solución de la sustancia SF-837 y leucomicina A₄, una solución de la sustancia SF-837 y leucomicina A₆, una solución de la sustancia SF-837 y leucomicina A₈, una solución de la sustancia SF-837 y josamicina, una solución de la sustancia SF-837 y terciomicina
- 865.- A y una solución de la sustancia SF-837 y terciomicina B, res-



pectivamente, en y a lo largo del mismo nivel de una placa de capa fina de alúmina, sometiendo a cromatografía ascendente utilizando acetato de etilo-benceno (2:1) como disolvente de desarrollo, y finalmente coloreando las manchas resultantes mediante tratamiento con ácido sulfúrico al 10 por ciento, a 80°C durante 5 minutos.

Además, las leucomicinas A₃, A₄ y A₈ muestran una banda de absorción aguda (atribuible al grupo O-acetil) a 2,22 p.p.m. (100 Mc) en la curva del espectro de resonancia magnética nuclear ("Journal of Antibiotics" páginas 272 a 278, (1.968)) y

875.- la josamicina muestra también una banda de absorción aguda (atribuible al grupo O-acetil) a 2,17 p.p.m. (60 Mc) en la curva del espectro de resonancia magnética nuclear ("Journal of Antibiotics", páginas 174 a 180 (1.957)). Esta señal no puede ser observada en una curva del espectro de resonancia magnética nuclear de la sustancia SF-837 del presente invento, como se muestra en la Figura 3 de los dibujos adjuntos.

880.- Según la explicación que antecede, está claro que las sustancias SF-837 y SF-837-A₂ del presente invento no coinciden con cualquiera de los antibióticos conocidos, y deben ser anti-
885.- bióticos nuevos.

Las sustancias SF-837-A₃ y SF-837-A₄ del presente invento presentan un máximo de absorción a una longitud de onda de 280 mμ en la región ultravioleta del espectro diferente del de las
890.- sustancias SF-837 y SF-837-A₂ del presente invento, que presentan un máximo de absorción a una longitud de onda de 232 mμ en la región ultravioleta del espectro. En vista de las propiedades físico-químicas arriba mencionadas de las sustancias SF-837-A₃ y SF-837-A₄, sin embargo, está claro que estas sustancias son
895.- similares de los antibióticos macrólidos.



Entre el grupo conocido de antibióticos macrólidos, la carbomicina B, la nidamicina, la tilosina, la relomicina y la macrocina deben ser comparadas con las sustancias SF-837-A₃ y SF-837-A₄ del presente invento, en vista del hecho de que estas sustancias antibióticas conocidas presentan también una notable absorción a una longitud de onda de aproximadamente 280 mμ. en la región ultravioleta del espectro. A efectos de comparación, las propiedades físico-químicas de estas sustancias antibióticas se tabulan en la Tabla 7 que sigue.

T A B L A 7

Antibióticos	Punto de fusión	Absorc. máx. en espectro ultravioleta a	Fórmula molecular	Peso molecular	Rotación óptica (grádo)
Carbomicina B	141-144°C	278 mμ (E ₁ ^{1%} cm 276)	C ₄₂ H ₆₇ O ₁₅ N	825	- 35
Nidamicina	132-134°C	279 mμ (E ₁ ^{1%} cm 275)	C ₄₀ H ₆₅ O ₁₄ N	783	- 43
Tilosina	128-132°C	284 mμ (E ₁ ^{1%} cm 245)	C ₄₅ H ₇₇ O ₁₇ N	907	- 46
Relomicina	172-175°C	282 mμ (E ₁ ^{1%} cm 245)	C ₄₅ H ₇₉ O ₁₇ N	909	- 44
Macrocina	134-136°C	283 mμ (E ₁ ^{1%} cm 244)	C ₄₆ H ₇₉ O ₁₇ N	921	- 52,5

Nota: Los datos que se ofrecen en la Tabla 7 proceden de "Index of Antibiotics from Actinomycetes", de Umezawa et al., publicado en 1.967.

905.- En primer lugar, la tilosina, la relomicina y la macrocina se diferencian de manera clara de las sustancias SF-837-A₃ y SF-837-A₄ del presente invento en vista de sus fórmulas moleculares y pesos moleculares y, en el caso de la tilosina del valor R_f en la Tabla 8 siguiente.

910.- En segundo lugar, la carbomicina B y la nidamicina apenas pueden ser diferenciada de las sustancias SF-837-A₃ y SF-837-A₄ con respecto a sus propiedades físico-químicas, pero son obvia-

376246



915 mente distinguibles unas de otras en razón de la diferencia de sus valores Rf en cromatografía de capa fina de alúmina y gel de sílice, según se muestra en la Tabla 8 que sigue:

T A B L A 8

Antibióticos	Valores Rf	
	Cromatografía de capa fina de alúmina desarrollada con acetato de etilo-benceno (2:1)	Cromatografía de capa fina de gel de sílice desarrollada con benceno-acetona (2:1)
Sustancia SF-837-A ₃	0,45	0,50
Sustancia SF-837-A ₄	0,52	0,55
Carbomicina B	0,46	0,56
Nidamicina	0,05	0,42
Tilosina	0,02	0,18

920.- Cuando se hidrofila con álcali, una molécula de la sustancia SF-837-A₃ da dos moléculas de ácido propiónico, y una molécula de la sustancia SF-837-A₄ da una molécula de ácido propiónico y una molécula de ácido butírico, mientras que una molécula de carbomicina B da ácido acético y ácido iso-valérico ("Angewandte Chemie" páginas 50-58, 1.957), y una molécula de nidamicina da una molécula de ácido iso-valérico ("Arzneimittel Forschung", Vol, 12, 1.191-5, 1.962). En consecuencia, es mucho más claro que las sustancias SF-837-A₃ y SF-837-A₄ del presente invento son diferentes de la nidamicina y carbomicina B.

925.- Dado que no ocurre en la tilosina un eslabonamiento de ester distinto del de lactona ("Tetrahedro Letters", páginas 2.339 a 2.345, 1.964) así como en la relomicina que es un derivado reducido de la tilosina ("Antimicrobial agent and Chemotherapy", páginas 45 a 48, 1.963), la tilosina y la relomicina se

930.-



distinguen de las sustancias SF-837-A₃ y SF-837-A₄.

Según la explicación que antecede está claro que las sustancias SF-837 y SF-837-A₂, así como las sustancias SF-837-A₃ y SF-837-A₄ del presente invento pueden reconocerse como nuevas
935.- sustancias antibióticas que no coinciden con alguno de los antibióticos macrólidos conocidos.

El presente invento se ilustra a continuación, aunque sin ser limitado en modo alguno, por los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1.-

La cepa SF-837, concretamente *Streptomyces mycarofaciens*
940.- identificado como ATCC Nº 21454 fué inoculada a 60 lts. de un medio de cultivo líquido conteniendo un 2,5 por ciento de almidón sacarificado, un 4 por ciento de proteína vegetal soluble, un 0,3 por ciento de cloruro de potasio y un 0,3 por ciento de carbonato de calcio, a pH 7,0 y a continuación se cultivó en un
945.- fermentador de vibración, a 28°C, durante 35 horas, bajo aireación. El cultivo resultante fué filtrado directamente y la torta de filtro que contenía la torta de micelio se lavó con ácido hidroclicórico diluído.

El filtrado del cultivo con el líquido de lavado se obtuvo
950.- con un volumen total de 50 lts. (potencia de 150 mcg/ml.). El filtrado (pH 8) fué extraído a continuación con 25 lts. de acetato de etilo y 22 lts. de la fase de acetato de etilo se concentraron en aproximadamente 3 lts., bajo presión reducida. El concentrado fué diluído con 1,5 lts. de agua, ajustado a pH 2,0 por
955.- medio de la adición de ácido hidroclicórico 5N y después se sacudió detenidamente. La fase acuosa fué separada de la fase orgánica y esta solución acuosa fué ajustada a pH 8 por medio de la adición de hidróxido de sodio 3N y se extrajo después con 800 ml. de acetato de etilo. El extracto de acetato de etilo resultante
960.- fué sacudido de forma similar junto con 500 ml. de ácido hidro-



clórico acuoso para transferir las sustancias activas al último que de nuevo fué extraído con 400 ml. de éter de etilo a pH 8. El extracto de éter fué secado con sulfato de sodio anhidroso y concentrado bajo presión reducida para dar 16,5 gr. de polvo de color amarillo claro.

965.-

Se disolvieron 12 gr. de este polvo crudo en 200 ml. de acetato de etilo y la solución fué pasada a través de una columna de 600 ml. de carbón pulverizado que había sido impregnado con acetato de etilo. El desarrollo fué realizado utilizando acetato de etilo como disolvente y las fracciones activas del levigado fueron recogidas con un volumen total de 2.500 ml.,

970.-

que a continuación se evaporó a sequedad bajo presión reducida, para dar 5 gr. de un polvo de color blanco. Este polvo fué disuelto en 10 ml. de benceno y las materias insolubles fueron

975.-

filtradas. La solución filtrada en benceno fué sometida entonces a aislamiento cromatográfico pasándola a través de una columna de 700 ml. de gel de sílice que había sido impregnado con benceno. El desarrollo de las sustancias activas absorbidas en el gel de sílice se efectuó usando un sistema disolvente consis-

980.-

tente en benceno acetato (4:1) y el levigado fué recogido en fracciones de 20 ml. cada una. Las fracciones activas Nums. 90 a 380 que dieron una sola mancha en cromatografía de capa fina de alúmina y que pudieron reconocerse como que contenían la sustancia SF-837 puramente, dado el valor Rf de la mancha indivi-

985.-

dual se combinaron juntas en un volumen total de 4.000 ml., y después se concentraron bajo presión reducida para dar 1,5 gr. de polvo de color blanco con un punto de fusión de 122 a 124°C, el cual se halló por análisis que era base libre de la sustancia SF-837 pura.

EJEMPLO 2.-

990.-

Se pusieron 20 lbs. de un medio de cultivo comprendiendo



- el 3 por ciento de glucosa, el 1 por ciento de peptona, el 0,5 por ciento de extracto de carne, el 0,2 por ciento de cloruro sódico, el 0,3 por ciento de carbonato de calcio y el 0,3 por ciento de aceite de soja (ajustado a pH 7) en un fermentador de vibración de una capacidad de 30 lts., y después se esterilizaron calentando a 120°C durante 20 minutos. Después, se inoculó la cepa SF-837, es decir, el *Streptomyces mycarofaciens* al medio de cultivo, y se cultivó con agitación a 28°C durante 48 horas, con aireación. El caldo fermentado fué filtrado a pH 6 para dar
- 995.- 18 lts. de filtrado (potencia, 200 mcg/ml.). El filtrado fué ajustado a pH 7,5 por medio de la adición de hidróxido de sodio 3N y después se extrajo con 8 lts. de acetato de butilo. El extracto de acetato de butilo fué elaborado a continuación del mismo modo que en el ejemplo U y, finalmente, se sometió a aislamiento de cromatografía con columna de gel de sílice en la misma forma que en el ejemplo I. Se obtuvo un polvo de color blanco con un punto de fusión de 122 a 124°C, consistente en sustancia SF-837, con un rendimiento de 800 mg.
- 1005.-
- EJEMPLO 3.-
- Se suspendieron 4,0 grs. del polvo de color amarillo crudo que se recuperó de la concentración del extracto de éter del ejemplo I, en 1.000 ml. de agua y la suspensión acuosa fué ajustada a pH 3,5 por medio de la adición de ácido hidroclicórico 5N. La solución fué pasada entonces a través de una columna de 100 ml. de Amberlite CG-50 (tipo H) para efectuar la absorción de las sustancias activas. La resina cambiadora de iones fué lavada con 800 ml. de agua destilada y después se levigó con ácido hidroclicórico 0,4N-etanol (1:2). Las fracciones activas del levigado fueron recogidas con un volumen total de 180 ml., se ajustó a pH 6,0 por medio de la adición de hidróxido de sodio 3N y después se concentró a 40 ml. bajo presión reducida. El concentrado
- 1010.-
- 1015.-
- 1020.-

376246



- 1025.- fué ajustado a pH 8,0 por medio de la adición de hidróxido de sodio 3N y después se extrajo dos veces, cada una de ellas con 50 ml. de éter de etilo, Los extractos combinados del éter de etilo fueron concentrados entonces bajo presión reducida, para dar 2,1 gr. de polvo de color amarillo pálido. Este polvo fué disuelto en 10 ml. de acetato de etilo y la solución resultante fué sometida a cromatografía pasando a través de una columna de 200 ml. de alúmina impregnada de acetato de etilo y se desarrolló con acetato de etilo. Las fracciones activas del levigado fueron recogidas con un volumen total de 200 ml., con la adición de 40 ml. de agua destilada, ajustadas a pH 1,8 por medio de la adición de ácido hidroclicórico 5N y después se sacudió detenidamente. La fase acuosa fué separada de la fase orgánica y la solución acuosa fué ajustada a pH 8,5 por medio de la adición de hidróxido de sodio 1N, de manera que se depositó un precipitado. Este precipitado fué filtrado y disuelto en benceno y la solución fué sometida a aislamiento de cromatografía con gel de sílice en la misma forma que en el ejemplo I. Se obtuvo un polvo de color blanco consistente en sustancia SF-837 pura, con un rendimiento de 300 mg.

EJEMPLO 4.-

- 1045.- La cepa SF-837, concretamente *Streptomyces mycarofaciens*, identificada como ATCC N^o 21454, fué inoculada a 300 lts. de un medio de cultivo líquido conteniendo el 2,0 por ciento de glucosa, el 1 por ciento de peptona, el 0,5 por ciento de extracto de carne, el 0,4 por ciento de cornsteep liquor, el 0,2 por ciento de cloruro sódico, el 0,3 por ciento de CO₂Ca y el 0,2 por ciento de manteca de cerdo, a pH 7,0 y se cultivó con agitación a 28°C durante 70 horas, bajo aireación.

- 1050.- El caldo fermentado fué filtrado directamente, y la torta de filtro comprendiendo la torta de micelio se lavó con ácido



- hidroclórico diluido. El filtrado del cultivo combinado con los líquidos de lavado se obtuvo con un volumen total de 280 lts. (potencia, 320 mcg/ml.). El filtrado fué extraído con 70 lts. de acetato de etilo y 71 lts. de la fase de acetato de etilo
- 1055.- resultante se concentró aproximadamente 20 lts., bajo presión reducida. El concentrado fué diluido con 10 lts. de agua, se ajustó a pH 2 por medio de la adición de ácido hidroclórico 5N y después se agitó detenidamente. La fase acuosa se separó de la fase orgánica, se ajustó a pH 9 por medio de la adición de
- 1060.- hidróxido de sodio 3N y después se extrajo con 4 lts. de acetato de etilo. El extracto resultante del acetato de etilo se agitó entonces de manera similar junto con 2 lts. de ácido hidroclórico acuoso, para transferir las sustancias activas al último que de nuevo se extrajo con un filtro de acetato de etilo a
- 1065.- pH 8. Este extracto de acetato de etilo fué secado entonces sobre sulfato de sodio anhidroso y concentrado bajo presión reducida para dar 92 gr. de un polvo de color amarillo, crudo.
- Fueron disueltos 90 gramos de este polvo crudo en 1 lt. de acetato de etilo y la solución se pasó a través de una columna
- 1070.- de 1,5 lts. de polvo de carbón impregnado de acetato de etilo. El desarrollo se realizó utilizando acetato de etilo como disolvente, y las fracciones activas del levigado fueron recogidas con un volumen total de 5,5 lts., el cual se evaporó después a sequedad bajo presión reducida, para dar 55 gr. de un polvo
- 1075.- de color blanco (potencia, 700 mcg/mg.).
- Este polvo fué sometido a un método de distribución contra corriente con benceno y tampón fosfato 0,3M (pH 4,40) (se usaron 2,5 lts. de cada disolvente y el desplazamiento de la capa móvil inferior se efectuó 10 veces). La sustancia SF-837
- 1080.- estaba presente distribuída en los tubos primero a tercero y,



de forma predominante, en el segundo tubo, y había presentes porciones más grandes (aproximadamente el 80 por ciento) de las sustancias SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ retenidas en el primer tubo.

- 1085.- El contenido del primer tubo se concentró (2,4 lts.) se concentró bajo presión reducida, para dar 7,7 gr. de un polvo de color blanco (potencia de 700 mcg/mg.). Este polvo fué disuelto en 15 ml. de benceno, fueron filtradas algunas materias insolubles y la solución filtrada fué pasada a continuación por una columna de 800 ml. de gel de cílice impregnado de benceno.
- 1090.- Las sustancias activas absorbidas fueron desarrolladas por cromatografía utilizando una mezcla de disolvente de benceno-acetona (4/1) y recogiendo el levigado en fracciones de 50 ml. cada una. Una parte menor de cada una de las fracciones obtenidas se ensayó sometiendo a cromatografía de capa fina de alúmina (con 2:1 de acetato de etilo-benceno como disolvente de desarrollo). Las fracciones 28 a 30, que dieron una sola mancha en la cromatografía de capa fina de alúmina se combinaron juntas y después se concentraron en vacío para dar 140 mg. de un polvo de color blanco con un punto de fusión de 120 a 122°C., que se identificó por análisis como la base libre pura de la sustancia SF-837-A₄.
- 1095.- Las fracciones nums. 38 a 57, que dieron tres manchas en la cromatografía de capa fina de alúmina, se combinaron juntas y se concentraron en vacío, para dar 1,1 gr. de un polvo de color blanco que por análisis resultó contener las sustancias SF-837-A₂ y SF-837-A₃, junto con una cantidad menor de sustancia SF-837. Las fracciones nums. 70 a 95, que dieron una sola mancha en la cromatografía de capa fina de alúmina, y en las que se recogió la sustancia SF-837 sola, se concentraron entonces en vacío para dar 0,8 gr. de un polvo de color blanco con un punto
- 1100.-
- 1105.-
- 1110.-



de fusión de 122 a 124°C., que se identificó como la base libre pura de la sustancia SF-837.

EJEMPLO 5.-

- 1115.- En 4 ml. de benceno se disolvieron 1 gr. del polvo de color blanco que contenía las sustancias SF-837-A₂ y SF-837-A₃, junto con una cantidad menor de la sustancia SF-837 que había sido recuperada de la cromatografía de capa fina de gel de sílice del ejemplo 4. La solución fué sometida a separación por cromatografía pasándola a través de una columna de 100 ml. de alúmina impregnada de benceno y desarrollando con una mezcla de disolvente de acetato de etilo-benceno (1:1). El levigado fué tomado en fracciones de 20 ml. cada una de ellas y cada una de las fracciones fué ensayada sometiéndola a cromatografía de capa fina de alúmina (utilizando 2:1 de acetato de etile-benceno como disolvente de desarrollo). Las fracciones nums. 30 a 48 que dieron una sola mancha en la cromatografía de capa fina de alúmina que se acaba de mencionar se combinaron juntas y se concentraron en vacío para dar 230 mg. de un polvo de color blanco con un punto de fusión de 122 a 125°C, que por análisis se halló que consistía en la base libre pura de la sustancia SF-837-A₃.
- 1120.- Después de que la fracción nº 80 fué levigada de la columna, el disolvente de desarrollo fué cambiado a una mezcla de acetato de etilo-benceno (2:1), y las fracciones nums. 90 a 125 fueron recogidas juntas y concentradas en vacío para dar 280 mg. de un polvo de color blanco que, por análisis, se encontró que contenía aproximadamente el 70 por ciento por peso de la sustancia SF-837-A₂. Se disolvieron 250 mg. de este polvo en 3 ml. de benceno y la solución fué sometida de nuevo a cromatografía pasándola por una columna de 50 ml. de alúmina impregnada de benceno y se desarrolló con 300 ml. de acetato de etilo-benceno (1:3) y después con una mezcla de acetato de etilo-benceno (2:1).
- 1125.-
- 1130.-
- 1135.-
- 1140.-



El levigado fué tomado en fracciones de 5 ml. cada una y cada fracción fué ensayada por cromatografía de capa fina de alúmina. Las fracciones Nums. 36 a 47 que dieron una sola mancha en esta cromatografía de capa fina de alúmina fueron combinadas juntas y concentradas en vacío para dar 80 mg. de un polvo de color blanco con un punto de fusión de 125 a 128°C que se identificó por análisis como la base libre pura de la sustancia SF-837-A₂.

1145.-

EJEMPLO 6.-

La cepa SF-837, concretamente *Streptomyces mycarofaciens*, se inoculó a 30 lts. de medio de cultivo líquido que comprendía un 3,0 por ciento de glucosa, un 5 por ciento de proteína vegetal soluble, un 0,2 por ciento de CLK y un 0,3 por ciento de CO₃Ca, a pH 7,0 y se cultivó con agitación en un fermentador de vibración, a 30°C, durante 85 horas, con aireación. El caldo fermentado fué filtrado directamente y la torta de filtro comprendiendo la torta de micelio se lavó con ácido hidrocblórico diluído. El filtrado del cultivo junto con el líquido del lavado fué obtenido con un volumen total de 28 lts. (potencia, 300 mcg/ml.). El filtrado (pH 8,4) fué extraído con 7 lts. de acetato de butilo y el extracto de acetato de butilo resultante se trató a continuación de forma similar a la del ejemplo 4, para realizar la extracción inversa de las sustancias activas con los que se obtuvo un polvo crudo de color amarillo, con un rendimiento de 15,2 gr. En 200 ml. de acetato de butilo se disolvieron 15 gr. de este polvo crudo, y la solución fué sometida a cromatografía pasándola a través de una columna de 400 ml. de carbón impregnado de acetato de butilo y después se desarrolló con acetato de butilo. Las fracciones activas del levigado fueron recogidas con un volumen total de 1,8 lts., y después se concentraron en vacío a aproximadamente 220 ml. El concentrado fué diluído con 50 ml. de agua destilada, se ajustó a pH 2 por medio

1150.-

1155.-

1160.-

1165.-

1170.-



de la adición de ácido hidroclicórico y después se agitó detenidamente. La fase acuosa fué separada de la fase orgánica y esta solución acuosa fué ajustada a pH 9,0 por medio de la adición de hidróxido de sodio 1N, para depositar un precipitado. Este precipitado fué filtrado y secado en un secador, dando 6,3 gr. 1175.- de un polvo de color blanco (potencia, 720 mcg/mg.).

El polvo fué disuelto en 12 ml. de benceno, y se filtraron las materias insolubles. La solución filtrada fué sometida a continuación a cromatografía pasándola por una columna de 600 1180.- ml. de gel de sílice impregnado de benceno y desarrollando las sustancias activas absorbidas con un disolvente mezclado de benceno-acetona (6:1). El levigado fué tomado en fracciones de 20 ml. cada una. Las sustancias SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ fueron levigadas de la columna antes que la sustancia SF-837.

Cada una de las fracciones fué probada por cromatografía de capa fina de gel de sílice (usando benceno-acetona 2:1 como disolvente de desarrollo). Las fracciones nums. 64 a 82 fueron concentradas juntas y combinadas en vacío para dar 800 mg. de un polvo de color blanco que, por análisis, se encontró que poseía

un contenido de las sustancias SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄, 1190.- junto con una cantidad menor de la sustancia SF-837. Este polvo de color blanco fué sometido después a la separación por cromatografía con una columna de gel de sílice, en la misma forma que en el ejemplo 4, y después a la separación cromatográfica con

una columna de alúmina de la misma forma que en el ejemplo 5, 1195.- con lo que se obtuvieron 15 mg. de la base libre pura de la sustancia SF-837-A₂, 85 mg. de la base libre pura de la sustancia SF-837-A₃ y 35 mg. de la base libre pura de la sustancia SF-837-A₄, recuperadas en forma de polvos de color blanco, respectivamente.

1200.- mente.

376246



EJEMPLO 7.-

En 10 ml. de éter de etilo se disolvieron 200 mg. de la sustancia SF-837 que fué obtenida con el procedimiento del ejemplo 2, y la solución resultante se le añadió gota a gota una solución saturada de ácido cítrico. El precipitado formado fué filtrado y secado para dar 230 mg. del citrato de la sustancia SF-837, con un punto de fusión de 162 a 167°C (con descomposición).

1205.- Cuando cada 200 mg. de las bases libres de las sustancias SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ aisladas en los ejemplos 4 y 5 fué tratada con una solución saturada de ácido cítrico, en la misma forma que se mencionó antes, se obtuvieron los correspondientes citratos de las sustancias SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ con rendimiento de 210 mg., 220 mg. y 190 mg., respectivamente.

EJEMPLO 8.-

En 20 ml. de agua destilada se suspendieron 300 mg. de la sustancia SF-837-A₃, y a la suspensión resultante se añadió una solución acuosa de ácido tartárico. La mezcla fué ajustada bien y mezclada a pH 4. La mezcla fué filtrada para eliminar algunas materias insolubles y el filtrado fué liofilizado para dar 340 mg. de tartrato de la sustancia SF-837-A₃ en forma de un polvo blanco con punto de fusión a 115°C.

1220.-

EJEMPLO 9.-

En 1,5 ml. de piridina se disolvieron 300 mg. de la sustancia SF-837 como base libre, y a la solución resultante se añadió 1,0 ml. de anhídrido acético. La mezcla fué agitada y a continuación se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 horas. La mezcla de reacción fué vertida en agua de hielo y agitada para dar un precipitado. Este precipitado fué filtrado y secado en un secador para dar 330 mg. de un polvo blanco. La recristalización de este polvo blanco de tetracloruro de carbono dió 305 mg. del derivado diacetil de la sustancia SF-837 en for-

1225.-

376246



1230.- ma de agujas blancas con un punto de fusión de 122 a 125°C.

En una forma similar, cada 300 mg. de las bases libres de las sustancias SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ se trató con un exceso de anhídrido acético en solución de piridina, de manera que se obtuvieron el derivado diacetil de la sustancia SF-837-

1235.- A₂ y los derivados monoacetil de las sustancias SF-837-A₃ y SF-837-A₄ en forma de cristales blancos, con rendimientos de 310 mg. (punto de fusión 130 a 134°C), 295 mg. (punto de fusión 182 a 185°C) y 300 mg. (punto de fusión de 166 a 168°C), respectivamente.

1240

REIVINDICACIONES

1ª).-"PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UNA SUSTANCIA ANTIBIOTICA" que se caracteriza por la selección de la sustancia SF-837, la sustancia SF-837-A₂, la sustancia SF-837-A₃ y la sustancia SF-837-A₄ y las sales de adición ácida de las mismas, así

1245.- como los derivados diacetil de las sustancias SF-837 y SF-837-A₂ y los derivados monoacetil de las sustancias SF-837-A₃ y SF-837-A₄, siendo cada una de las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ solubles en metanol, etanol, acetona, cloroformo, acetato de etilo, acetato de butilo, agua acidificada,

1250.- benceno, éter de etilo y tetracloruro de carbono pero apenas solubles en éter de petróleo, n-hexano y agua neutra, siendo cada una de ellas básica, formando sales con ácidos, siendo positivas en la prueba de eritromicina con ácido sulfúrico al 50 por ciento y negativas en las reacciones con nihidrina y el reacti-

1255.- vo cloruro férrico, conteniendo solo los elementos carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno, siendo levógiros en etanol y presentando las características de los antibióticos macrólidos; siendo las propiedades detalladas de la sustancia SF-837 que su base libre forma un polvo blanco que tiene un punto de fusión



- 1260.- de 122 a 124°C, muestra un valor pKa' de 6,9 en etanol acuoso al 50 por ciento, da un análisis elemental de C 60,38 por ciento H 8,35 por ciento, N 1,65 por ciento y O el resto (29,6 por ciento), muestra un peso molecular de 813 determinado por el análisis de masa, de donde tiene una fórmula empírica $C_{41}H_{67}O_{15}N$
- 1265.- $C_{41}H_{67}O_{15}N$, presenta una rotación óptica de $(\alpha)_D^{22} -67^\circ$ a una concentración del 1 por ciento en etanol, presenta una absorción máxima característica en la región ultravioleta del espectro cuando se disuelve en etanol a la siguiente longitud de onda en μ : 232 ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 325$) y exhibe bandas de absorción características en la región infrarroja del espectro cuando se pelletiza en forma de base libre en bromuro de potasio a los siguientes números de onda en cm^{-1} : 3.500, 2.970, 2.930, 1.735, 1.460, 1.408, 1.376, 1.360, 1.330, 1.295, 1.275, 1.190, 1.165, 1.120, 1.082, 1.050, 1.015, 910, 860, 840, 805, 780, 735 y 680; el derivado
- 1270.- diacetil de la sustancia SF-837 forma agujas de color blanco de un punto de fusión de 122 a 125°C cuando se recristaliza de tetracloruro de carbono, de un análisis elemental de C 60,35 por ciento, H 8,02 por ciento, N 1,58 por ciento, y O 30,05 por ciento (resto) y, por lo tanto, una fórmula empírica de $C_{45}H_{71}O_{17}N$
- 1275.- presenta un máximo de absorción característico de 232 μ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 295$) en la región ultravioleta del espectro cuando se disuelve en etanol y exhibe bandas de absorción características en la región infrarroja del espectro cuando se pelletiza en bromuro de potasio a los siguientes números de onda en cm^{-1} : 3.450, 2.970,
- 1280.- 2.930, 1.728, 1.454, 1.368, 1.232, 1.167, 1.122, 1.082, 1.054, 1.024, 1.002, 957, 907, 863, 837, 783 y 762; y siendo las propiedades detalladas de la sustancia SF-837-A₂ que la base libre de la misma forma un polvo de color blanco con un punto de fusión de 125 a 128°C, muestra un valor pKa' de 6,8 en etanol acuoso al
- 1285.- 50 por ciento, da un análisis elemental de C 60,58 por ciento,
- 1290.-

376246



- H 8,85 por ciento, N 1,72 por ciento y O el resto (28,85 por ciento), muestra un peso molecular de 827 determinado por análisis de masa, de donde tiene una fórmula empírica $C_{42}H_{69}O_{15}N$, presenta una rotación óptica de $[\alpha]_D^{22} -68^\circ$ a una concentración del 1 por ciento en etanol, exhibe un máximo de absorción característico a una longitud de onda de 232 m μ ($E_1^{1\%}{}_{1\text{cm}} = 320$) en la región ultravioleta del espectro cuando se disuelve en etanol y presenta bandas de absorción características en la región infrarroja del espectro cuando se pelletiza en forma de base libre en bromuro de potasio con los siguientes números de onda en cm^{-1} : 3.500, 2.970, 2.935, 1.737, 1.460, 1.410, 1.377, 1.360, 1.300, 1.275, 1.190, 1.170, 1.123, 1.082, 1.052, 1.017, 990, 920, 910, 860, 840, 805, 780, 740 y 700; el derivado diacetil de la sustancia SF-837-A₂ forma agujas de color blanco con un punto de fusión de 130 a 134°C, da un análisis elemental de C 60,68 por ciento, H 8,23 por ciento, N 1,49 por ciento y O el resto (29,60 por ciento) de donde tiene una fórmula empírica $C_{46}H_{72}O_{17}N$ y siendo las propiedades detalladas de la sustancia SF-837-A₃ que su base libre forma un polvo de color blanco con un punto de fusión de 12 a 125°C, muestra un valor pKa' de 7,0 en etanol acuoso al 50 por ciento, da un análisis elemental de C 60,53 por ciento, H 8,23 por ciento, N 1,87 por ciento y O el resto (29,32 por ciento), muestra un peso molecular de 811 determinado por análisis de masa, de donde tiene una fórmula empírica de $C_{41}H_{65}O_{15}N$, presenta una rotación óptica de $[\alpha]_D^{22} -42^\circ$ a una concentración del 1 por ciento en etanol, presenta un máximo de absorción característica a una longitud de onda de 280 m μ ($E_1^{1\%}{}_{1\text{cm}} = 295$) en la región ultravioleta del espectro cuando se disuelve en etanol y presenta bandas de absorción características en la región infrarroja del espectro cuando se pelletiza en forma de base libre en bromuro de potasio



- a los siguientes números de onda en cm^{-1} : 3.500, 2.970, 2.930, 1.738, 1.680, 1.640, 1.600, 1.460, 1.378, 1.360, 1.300, 1.275, 1.252, 1.190, 1.168, 1.121, 1.083, 1.052, 1.015, 980, 910, 863, 840, 805 y 780; el derivado monoacetil de la sustancia SF-837-A₃
- 1325.- forma cristales arenosos con un punto de fusión de 182 a 185°C, da un análisis elemental de C 60,56 por ciento, H 7,92 por ciento, N 1,68 por ciento y O el resto (29,84 por ciento) y tiene una fórmula empírica $\text{C}_{43}\text{H}_{67}\text{O}_{16}\text{N}$; y siendo las propiedades detalladas de la sustancia SF-837-A₄ que su base libre forma un polvo de color blanco con un punto de fusión de 120 a 122°C, muestra un valor pKa' de 7,0 en etanol acuoso al 50 por ciento, da un análisis elemental C 60,82 por ciento, H 8,52 por ciento, N 1,73 por ciento y O el resto (28,93 por ciento), muestra un peso molecular de 825 determinado por análisis de masa, de donde tiene una fórmula empírica $\text{C}_{42}\text{H}_{67}\text{O}_{15}\text{N}$, presenta una rotación óptica de $(\alpha)_{\text{D}}^{22} -40^{\circ}$ a una concentración del 1 por ciento en etanol, presenta un máximo de absorción característica a una longitud de onda de 280 m μ ($\text{E}_{1\text{cm}}^{1\%} = 285$) en la región ultravioleta del espectro cuando se disuelve en etanol y presenta bandas de absorción características en la región infrarroja del espectro cuando se pelletizza en la forma de la base libre en bromuro de potasio a los siguientes números de onda en cm^{-1} : 3.500, 2.970, 2.930, 1.738, 1.680, 1.640, 1.600, 1.460, 1.378, 1.360, 1.300, 1.276, 1.252, 1.190, 1.170, 1.120, 1.082, 1.052, 1.017, 980, 920, 910, 863, 840 y 780; el derivado monoacetil de la sustancia SF-837-A₄ forma cristales arenosos con un punto de fusión de 166 a 168°C, da un análisis elemental C 60,85 por ciento, H 8,06 por ciento, N 1,65 por ciento, y O el resto (29,44 por ciento), de donde tiene una fórmula empírica $\text{C}_{44}\text{H}_{69}\text{O}_{16}\text{N}$.
- 1340.-
- 1345.-
- 1350.- 2ª).- "PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UNA SUSTANCIA ANTIBIOTI-

376246



CA" que se caracteriza por la asociación de las sales de adición ácida de la base libre y el derivado diacetil de la sustancia SF-837, según la reivindicación 1ª.

3ª).- "PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UNA SUSTANCIA ANTIBIOTI-
1355.- CA" que se caracteriza por la asociación de la base libre, las sales de adición ácida y el derivado diacetil de la sustancia SF-837-A₂, según la reivindicación 1ª.

4ª).- "PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UNA SUSTANCIA ANTIBIOTI-
1360.- CA" que se caracteriza por la asociación de la base libre, las sales de adición de ácido y el derivado monoacetil de la sustancia SF-837-A₃, según la reivindicación 1ª.

5ª).- "PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UNA SUSTANCIA ANTIBIOTI-
1365.- CA" que se caracteriza por la asociación de la base libre, las sales de adición ácida y el derivado monoacetil de la sustancia SF-837-A₄, según la reivindicación 1ª.

6ª).- "PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UNA SUSTANCIA ANTIBIOTI-
CA" que se caracteriza por la asociación de una mezcla de la sustancia SF-837 con las sustancias SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄, según la reivindicación 1ª.

7ª).- "PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UNA SUSTANCIA ANTIBIOTI-
1370.- CA" que se caracteriza porque para la producción de la sustancia SF-837, la sustancia SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ se procede al cultivo de una cepa de Streptomyces mycarofaciens en un medio de cultivo que contiene fuentes de nitrógeno y de carbono asimilables bajo condiciones aeróbicas para producir y acumular la
1375.- sustancia SF-837, la sustancia SF-837-A₂ la sustancia SF-837-A₃ y la sustancia SF-837-A₄ en el cultivo, y la recuperación de estas sustancias antibióticas en mezcla del cultivo.

8ª).- "PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UNA SUSTANCIA ANTIBIOTI-
1380.- CA" que se caracteriza porque para la producción de las bases li-

376246



- bres de la sustancia SF-837, la sustancia SF-837-A₂, la sustancia SF-837-A₃ y la sustancia SF-837-A₄, que comprende el cultivo de una cepa de *Streptomyces mycarofaciens*, identificada como ATCC N° 21454, se prepara en un medio de cultivo, líquido conteniendo
- 1385.- fuentes de carbono y nitrógeno asimilables, bajo condiciones aeróbicas, para producir y acumular la sustancia SF-837, la sustancia SF-837-A₂, la sustancia SF-837-A₃ y la sustancia SF-837-A₄ en el cultivo y aislando a continuación una mezcla de la sustancia SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄ del cultivo, y separando a continuación estas sustancias antibióticas unas de otras.
- 1390.- 9ª).- "PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UNA SUSTANCIA ANTIBIOTICA" que se caracteriza porque la producción de las bases libres de la sustancia SF-837, la sustancia SF-837-A₂, la sustancia SF-837-A₃ y la sustancia SF-837-A₄, cada una en forma aislada,
- 1395.- comprende el cultivo de una cepa de *Streptomyces mycarofaciens* identificada como ATCC N° 21454, en un medio de cultivo líquido conteniendo fuentes de nitrógeno y carbono asimilables, a una temperatura de 20 a 30°C, bajo condiciones aeróbicas, hasta que se da una actividad antibacteriana considerable al caldo de cultivo, la filtración del cultivo, la extracción del filtrado del cultivo a pH 7 a 9 con un disolvente orgánico no miscible en agua para las sustancias SF-837, SF-837-A₂, SF-837-A₃ y SF-837-A₄, tales como acetato de etilo, acetato de butilo, cloroformo, éter de etilo, metil isobutil cetona, y butanol, la re-extracción a continuación del extracto orgánico resultante conteniendo las sustancias activas con ácido acuoso diluído tal como ácido hidroc্লórico acuoso, ácido sulfúrico acuoso y similares, la conversión del extracto acuoso resultante en alcalino (con preferencia a pH 7 a 9) por medio de la adición de un álcali, la
- 1400.- extracción de nuevo del extracto acuoso con uno de los disolven-
- 1405.-
- 1410.-

376246



- tes orgánicos no miscibles con agua para transferir las sustancias activas al último disolvente orgánico, la repetición de esta transferencia de las sustancias activas, por lo menos una vez, a partir de un extracto orgánico en una cantidad de un disolvente orgánico no miscible en agua en un ácido diluído acuoso y después en otra cantidad de disolvente orgánico no miscible con agua,
- 1415.- la concentración de la solución orgánica resultante de la sustancia activa, purificada así parcialmente, a sequedad en vacío, la disolución del polvo crudo resultante de las sustancias activas
- 1420.- mezcladas en acetato de etilo o acetato de butilo, el paso de la solución a través de una columna de carbón activado, el desarrollo con acetato de etilo o acetato de butilo, la recogida de las fracciones activas del levigado, la concentración de las fracciones activas a un volumen mas pequeño, la extracción del concentrado con ácido hidroclopórico diluído, la conversión del extracto acuoso en alcalino por medio de la adición de álcali, la separación del precipitado formado hecho en esencia de las sustancias activas mezcladas, la disolución del precipitado en benceno, el sometimiento de la solución de benceno a cromatografía con una
- 1425.- columna de gel de sílice y utilizando una mezcla de benceno-acetona como disolvente de desarrollo, la recogida del levigado en fracciones, la prueba de cada una de las fracciones por cromatografía de capa fina de alúmina, la combinación de las mismas juntas y la concentración a sequedad en vacío solo de las fracciones
- 1430.- que dan una sola mancha característica de la sustancia SF-837-A₄ en esta cromatografía de capa fina de alúmina, con lo que la base libre de la sustancia SF-837-A₄ se da en forma de polvo puro, la combinación juntas y la concentración a sequedad en vacío solamente de las fracciones que dan una sola mancha característica de la sustancia SF-837 en la cromatografía a capa fina
- 1435.-
- 1440.-



- de alúmina, con lo que la base libre de la sustancia SF-837 es dada en forma de polvo puro, la combinación juntas y la concentración a sequedad en vacío de las fracciones que son levigadas de dicha columna de gel de sílice después de las fracciones mencionadas dando la mancha única característica de la sustancia SF-837-A₄, pero dando antes de las mencionadas fracciones la mancha única característica de la sustancia Sf-837 y que contiene en solución ambas sustancias SF-837-A₂ y SF-837-A₄ junto con una proporción menor de la sustancia SF-837, con lo que se obtiene un polvo de una mezcla de las sustancias SF-837-A₂ y SF-837-A₃ junto con una parte menor de la sustancia SF-837, la disolución de este polvo en benceno, el sometimiento de la solución resultante de dicho polvo en benceno a cromatografía de una columna de alúmina activada y usando una mezcla de acetato de etilo-benceno y a continuación una mezcla de acetato de etilo-benceno como disolvente de desarrollo, la recogida del levigado en fracciones, la prueba de cada una de estas fracciones por medio de una cromatografía de capa fina de alúmina, la combinación juntas y la concentración a sequedad en vacío solo de las fracciones que dan una sola mancha característica de la sustancia SF-837-A₃ en la cromatografía de capa fina de alúmina que se acaba de mencionar, con lo que la base libre de la sustancia SF-837-A₃ se produce en forma de polvo puro, y también la combinación juntas y la concentración a sequedad en vacío de las restantes fracciones del levigado de la columna de alúmina activada arriba mencionada, para dar un polvo conteniendo principalmente la sustancia SF-837-A₂, la disolución de nuevo de este polvo en benceno, el sometimiento a continuación de esta solución en benceno de nuevo a cromatografía de una columna de alúmina activada, y el uso de una mezcla de acetato de etilo-benceno como disolvente de desarrollo, la recogida
- 1445.-
- 1450.-
- 1455.-
- 1460.-
- 1465.-
- 1470.-

376246



del levigado del mismo en fracciones, probando cada una de ellas por cromatografía de capa fina de alúmina, la combinación juntas y la concentración a sequedad en vacío solo de las fracciones que dan una mancha única característica de la sustancia SF-837-A₂ en la cromatografía de capa fina de alúmina acabada de mencionar, con lo que la base libre de la sustancia SF-837-A₂ se da en la forma de polvo puro.

1475.- 10ª).- "PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UNA SUSTANCIA ANTIBIOTICA".

La presente memoria descriptiva consta de sesenta y una hojas foliadas y mecanografiadas por una sola cara, componiendo un total de mil cuatrocientas ochenta y tres líneas, incluidas las presentes.

Madrid, 26 de Septiembre de 1.972.-

JOSE M. TORO
P.P.

376246

FIG.1

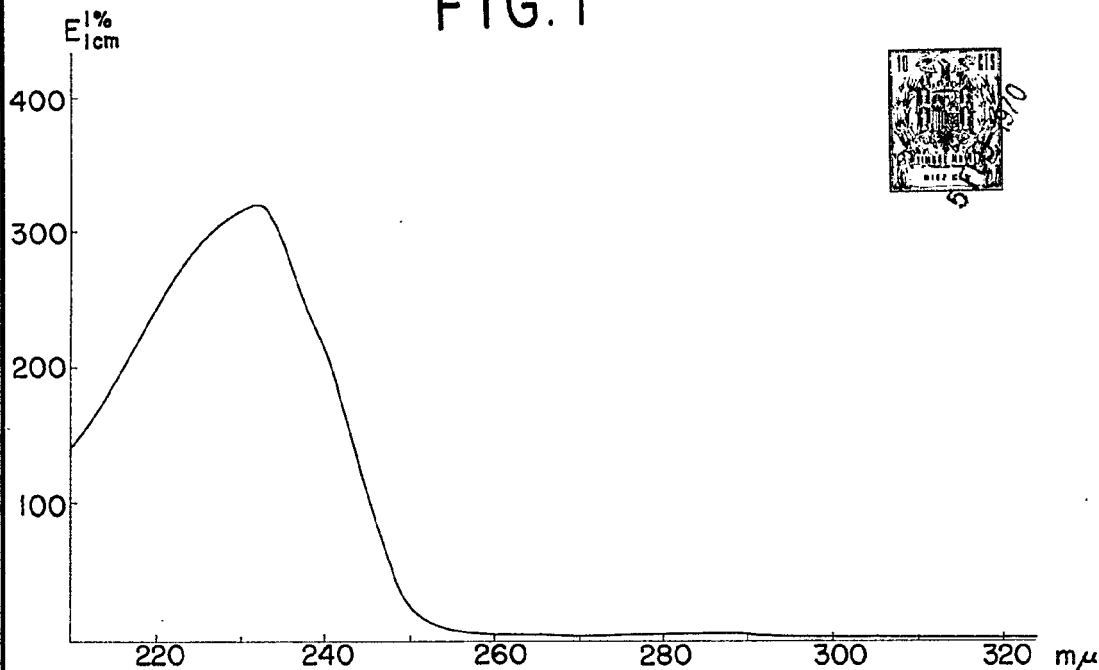
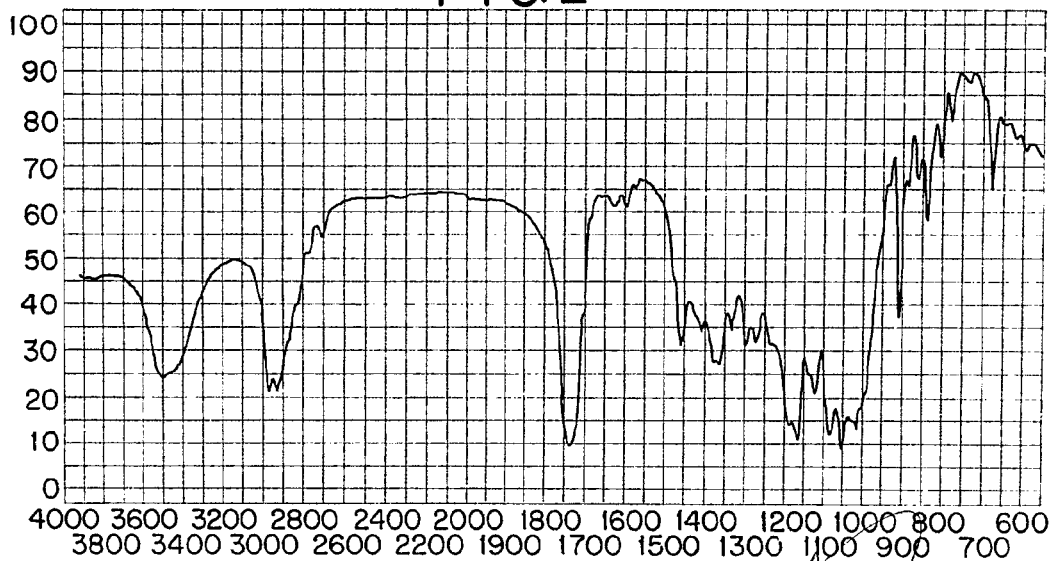


FIG.2



Madrid, 5 de febrero de 1970
P.A.

ESCALA VARIABLE

376246

FIG. 3

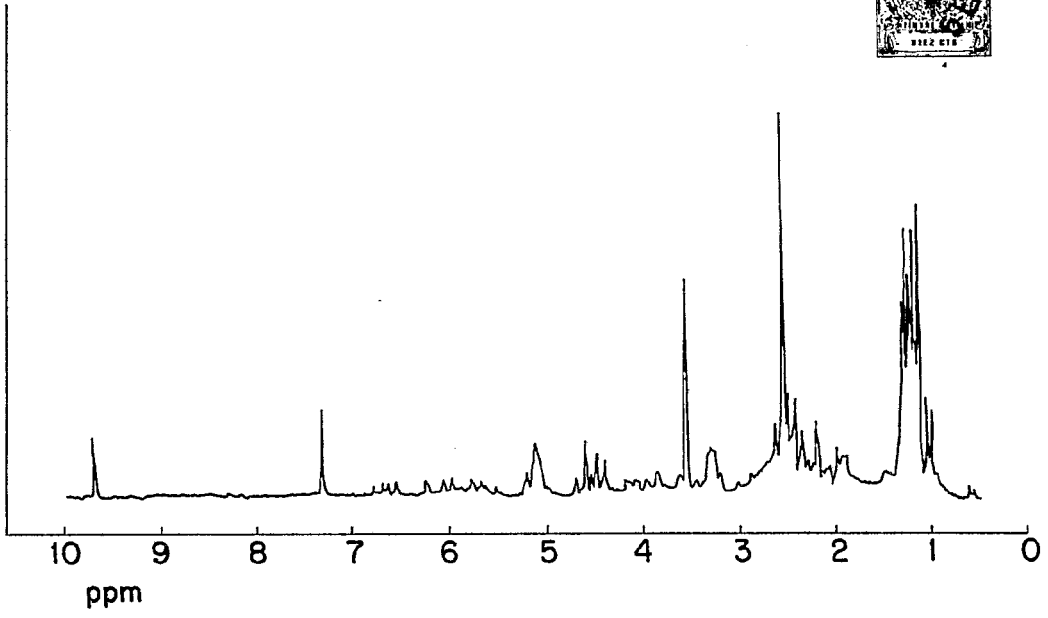


FIG. 4

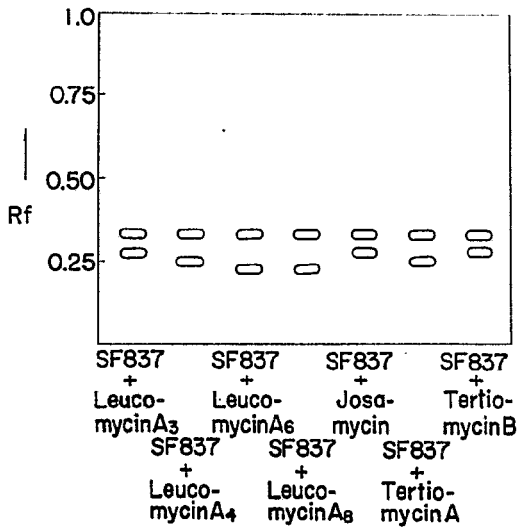
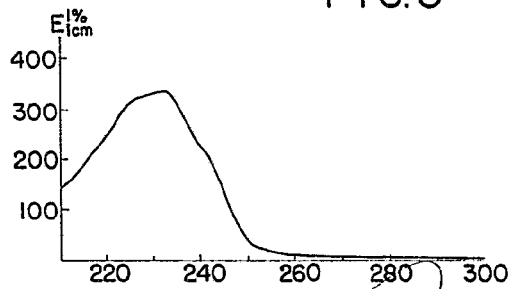


FIG. 5



Madrid, de Febrero de 1970
P.A.

[Handwritten signature]

ESCALA VARIABLE

376246



FIG. 6

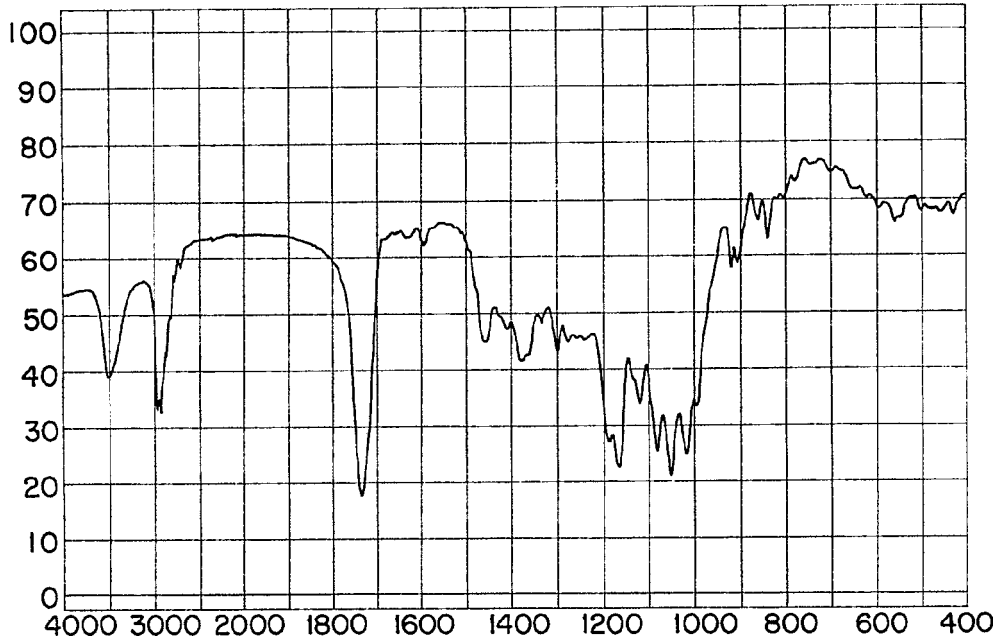


FIG. 7

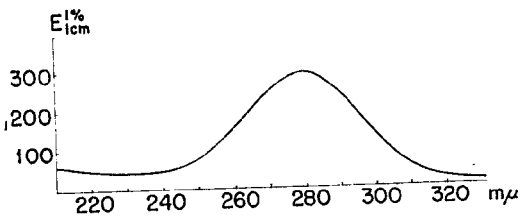
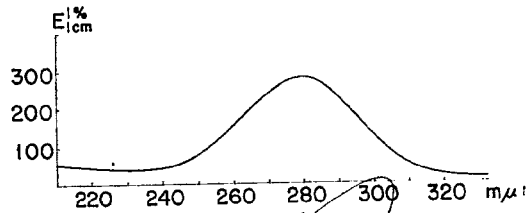


FIG. 9



Madrid, 5 de Febrero de 1970
P.A.

ESCALA VARIABLE

376266



FIG.8

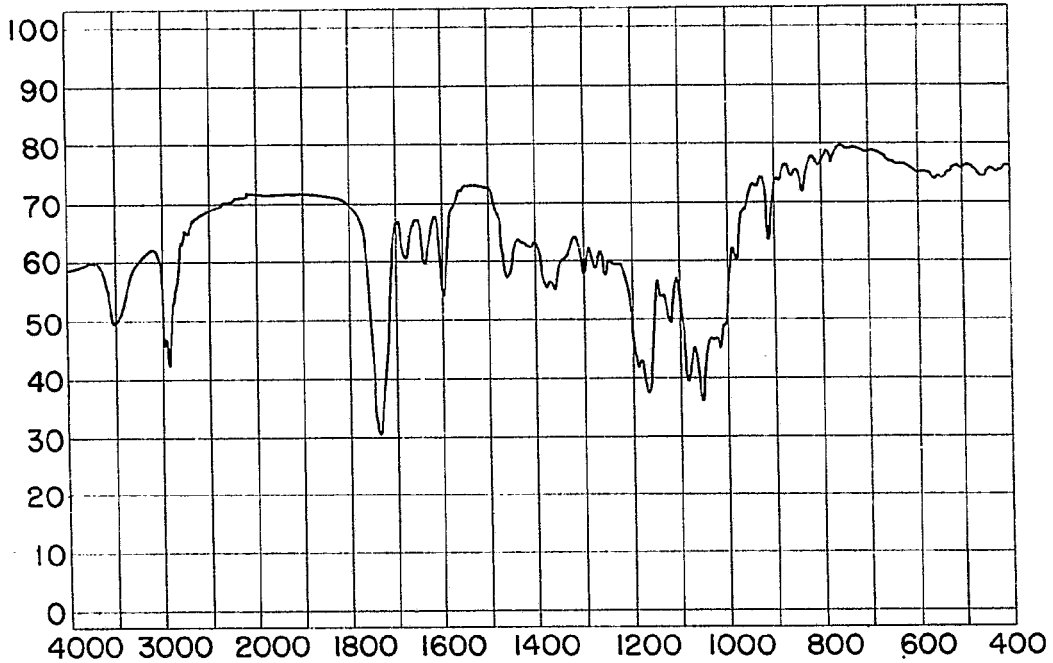
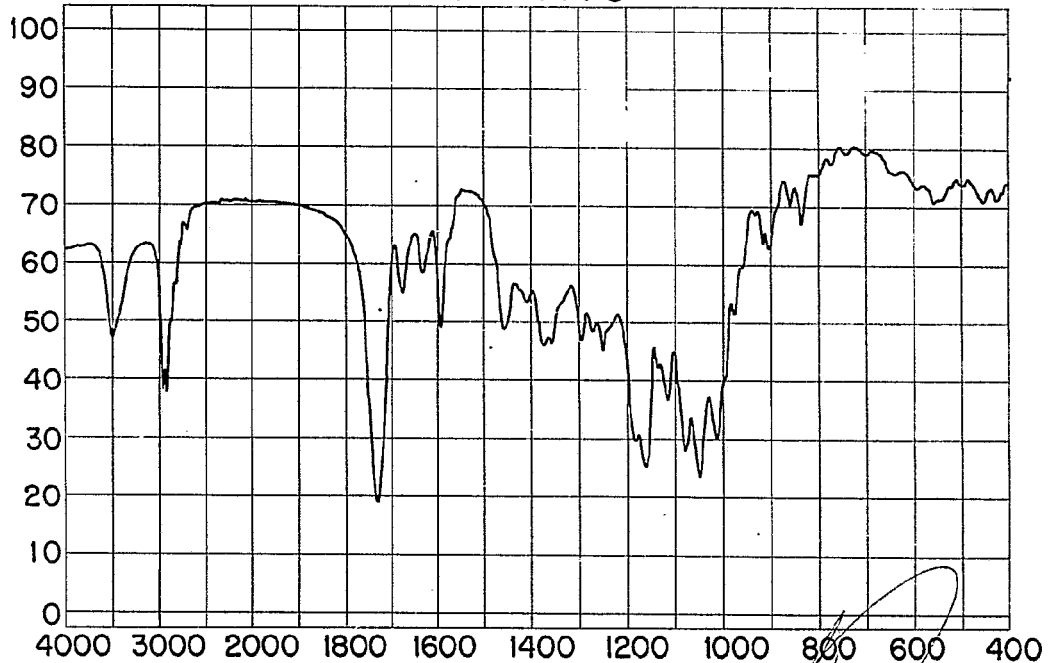


FIG.10



Madrid, 5 de Febrero de 1970
P.A.

JOSE M. GARCIA

ESCALA VARIABLE