

4744



PATENTE DE INVENCION

Ip 475.

F.E. 30-5-75

Int. Cl.²: C12D//A61K

Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE RIFAMICINA B POR
FERMENTACION

Solicitante: GRUPO LEPETIT S.p.A., entidad italiana, residente en
Via Durando 38, 20158 MILAN, Italia.

5. Con anterioridad se ha informado que durante la fermentación en medios normales de crecimiento *Streptomyces mediterranei* sintetiza una familia de antibióticos colectivamente llamada el complejo rifamicina (P.Sensi et al., 1959; *Antibiotics Annual 1959-160*, pags. 262). El trabajo subsiguiente re-



- veló que la adición de dietil barbiturato de sodio al medio de cultivo da por resultado la formación de un producto único de fermentación, rifamicina B (Margalith P. y Pagani H., Applied Microbiology, 9, 325, 1961). Sin embargo, la adición
5. de barbituratos en fermentaciones de escala industrial presenta algunas desventajas como ser un costo más elevado de los medios de cultivo y disminución del régimen de crecimiento de las clases que en algunos casos es perjudicial para el rendimiento antibiótico.
10. El presente invento se relaciona con la aislación de cepas mutantes de *Streptomyces mediterranei* que producen únicamente rifamicina B, indistintamente de la presencia o ausencia de dietilbarbiturato de sodio en el medio de fermentación.
15. Aislación de cepas mutantes
- Una suspensión de esporos de *Streptomyces mediterranei* ATCC 13685 fue tratada con N-metil-N'-nitroso-N-Nitroguanidina a 1 mg/ml en tampón de tris-hidroximetil-aminometano de pH 9.0 durante 60 minutos a 28°C. Los esporos tratados con mutageno fueron luego lavados y aplicados a platos
20. Petri que contenían agar Bennett. Al cabo de 14 días de incubación a 28°C, las colonias sobrevivientes fueron recogidas y examinadas en cuanto a su capacidad de producir rifamicina B en medio líquido y sin dietilbarbiturato de sodio. Los mutantes que producían grandes cantidades de rifamicina B en
25. ausencia de dietil barbiturato de sodio fueron examinados más detenidamente. Uno de estos mutantes fue llamado M 18 y fue depositado con el ATCC bajo el número 21789 y sus características se describirán en detalle más adelante. Los otros
30. mutantes difieren de la clase M 18 solo en propiedades meno-



res y corresponden substancialmente a la descripción de la clase M 18 en la tabla 4. Se obtuvieron resultados similares sometiendo *Streptomyces mediterranei* ATCC 13685 a mutación con rayos ultravioletas o con otros agentes mutagénicos químicos, comunmente utilizados.

5.

Fermentación

Una clase industrial de *Streptomyces mediterranei* ATCC 13685 y la clase M 18 se propagaron sobre agar Bennett 6-8 días a 28°C. El medio vegetativo fue inoculado con un declive de agar Bennett (1/2 declive por redoma) y las redomas fueron incubadas sobre un agitador rotatorio a 28°C por 72 horas. El medio vegetativo usado contenía:

10.

Extracto de carne vacuna	5 g
Extracto de levadura	5 g
Peptona	5 g
Hidrolizado de caseína	3 g
NaCl	1.5 g
H ₂ O	hasta 1 litro

15.

El pH fue ajustado a 7.3 con NaOH. Se usó 100 ml

20.

de medio vegetativo en frascos Erlenmeyer de 500 ml. Después de 72 horas de crecimiento, el medio vegetativo fue usado para inocular (5% volumen/volumen) el medio de fermentación.

Se usaron dos medios de fermentación:

RFB 744 : un medio sintético

25.

RFB 2244 : un medio complejo

Las fermentaciones siempre se llevaban a efecto usando 50 ml de medio en un frasco Erlenmeyer de 500 ml.

La composición de los dos medios era la siguiente:

RFB 744

30.

Glucosa 96 g

- 4 - 414444



	$(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	15 g
	KH_2PO_4	2 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
	CaCO_3	17 g
5.	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0033 g
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.04 g
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.002 g
10.	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.001 g
	Dietilbarbiturato de sodio	2 g
	H_2O	1000 cc
	pH antes de esterilizar	pH 6.8
	pH después de esterilizar	pH 6.3

15.

RFB 2244

	Glucosa	126.5 g
	CaCO_3	9.5 g
	Harina de maní	25 g
20.	Harina de soja	10 g
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01 g
	$\text{CuCO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0033 g
25.	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.050 g
	$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.004 g
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.002 g
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.001 g
	Dietil barbiturato de sodio	1,5 g

30.



- pH antes de la esterilización 7.4
 Corregido con 15 % NaOH
 pH después de la esterilización 6.2 - 6.3
 Antiespumante A 0.2 ml por frasco que contiene 50 ml de medio de crecimiento.

Los mismos medios fueron preparados sin la adición de dietil barbiturato de sodio para llevar a cabo fermentaciones cooperativas. Las condiciones de fermentación y relaciones se dan en la tabla 1 y 2 conjuntamente con la indicación de los rendimientos de rifamicina B obtenidos.

T A B L A I

Clase	Rifamicina B en medio con barbiturato	µg/ml sin barbiturato
Streptomyces <u>mediterranei</u> ATCC 13685	2210	< 390 (2)
Mutante M 18 ATCC 21789	2290	2240

El medio de fermentación usado era RFB 224 con o sin 1.5 g de dietil barbiturato de sodio por litro. Temperatura 28°C, duración de la fermentación 190 horas.

(2) Este resultado representa un límite superior para la cantidad de rifamicina B presente cuando la presencia de complejo de rifamicina interfiere con el ensayo normal.



T A B L A II

Cepa	Rifamicina B ($\mu\text{g/ml}$)		Rifamicina compleja ($\mu\text{g/ml}$)	
	con barbiturato	sin barbiturato	con barbiturato	sin barbiturato
Streptomyces mediterranei ATCC 13685	344	107	10	99
Mutante M 18 ATCC 21789	580	513	10	10

El medio de fermentación usado era BF3 744 con o sin 1.5 g por litro de dietil barbiturato de sodio. Tiempo de fermentación 144 horas a 28°C en un agitador rotatorio.

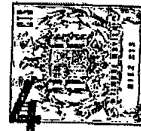
Ensayo de rifamicina B

El contenido de rifamicina B de caldos filtrados fue verificado por una técnica espectrofotométrica diferencial descrita por Pasqualucci et al., Journal of Pharmaceutical Sciences 59, 685, 1970

Estimación del complejo de rifamicina

Muestras de medio de fermentación fueron ajustadas a pH 2.0 con ácido hidroc্লórico y extraídas con acetato de etilo. El extracto orgánico fue luego extraído con tampón de fosfato pH 7.38; en estas condiciones, la rifamicina B es extraída por tampón mientras el complejo de rifamicina permanece en la fase orgánica agotada. El complejo de rifamicina en el acetato de etilo agotado fue estimado espectrofotométricamente midiendo la densidad óptica a 460 m μ de una

- 7 49444



alícuota apropiadamente diluida en alcohol etílico que contenía 1 % de ácido ascórbico.

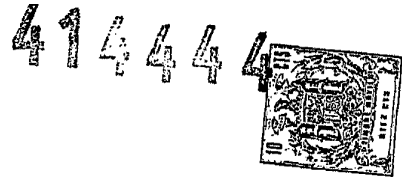
Descripción de streptomyces mediterranei M 18 ATCC 21789

Para la investigación de las características de crecimiento, Str. mediterranei y su estirpe mutante M 18 se criaron en una variedad de medios normales según Gottlieb y Shirling (Methods of characterization of Streptomyces species, Intern. J. Syst., Bact. 16, 313-340, 1966); además se usaron algunos medios recomendados por Waksman (The actinomycetes, Vol. II. The William and Wilkings Co., 1961)

Las siguientes tablas informan de las características de crecimiento y propiedades de la cepa mutante M 18 ATCC 21789 y de Streptomyces mediterranei ATCC 13685.

T A B L A III

Fuentes de carbono	Streptomyces mediterranei 13685	Mutante M 18 ATCC 21789
Inositol	++	++
Fructosa	++	++
Ramnosa	++	++
Xilosa	++	++
Rafinosa	-	-
Arabinosa	++	++
Celulosa	-	-
Sucrosa (control positivo)	++	++
Sin carbono (control negativo)	-	-



T A B L A IV

Comparación de propiedades morfológicas y de desarrollo de *Streptomyces mediterranei* ATCC 13685

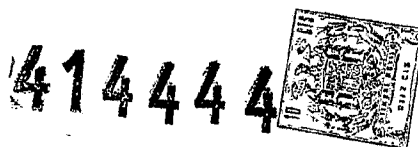
mutante M 18 ATCC 21789

Medios	<i>Streptomyces mediterranei</i> ATCC 13685	<i>Streptomyces mediterranei</i> M 18 ATCC 21789
Agar de <u>h</u> arina de <u>a</u> vena	Desarrollo regular con <u>s</u> uperficie lisa. Hialina de micelio vegetativo a amarillento con revés a rosáceo. Mycelio aéreo blancuzco con revés rosáceo. Vestigios de pigmento <u>s</u> oluble amarillento.	Abundante desarrollo con <u>s</u> uperficie lisa. Micelio vegetativo verduzco a naranja con sombra de ámbar. Micelio aéreo ausente. Pigmento <u>s</u> oluble verde amarillo.
Agar de glucosa de extracto de levadura (Medio No.2 Gottlieb y Shirling)	Abundante desarrollo <u>a</u> marillento a rosáceo con superficie áspera. Escaso micelio aéreo. Sin pigmentación del medio.	Abundante desarrollo con <u>s</u> uperficie arrugada. Micelio vegetativo ámbar marrón con cantos de marrón naranja. Vestigios de micelio aéreo rosáceo. Pigmento soluble intenso marrón ámbar.
Agar de glucosa Emerson	Abundante desarrollo, <u>a</u> marillento a naranja rosáceo con superficie áspera. Escaso <u>m</u> icelio aéreo se hace rosáceo.	Abundante desarrollo con <u>s</u> uperficie lisa. Micelio vegetativo naranja. Sin micelio aéreo. Pigmento soluble <u>a</u> marillo oro.



T A B L A IV (continuación)

Agar de Bennett	Buen desarrollo, amarillento que se vuelve amarillo naranja. Micelio aéreo se vuelve rosáceo. Leve pigmento ámbar.	Abundante desarrollo con su <u>su</u> perficie muy arrugada. Mice <u>u</u> lio vegetativo marrón ámbar con cantos marrón naranja. Vestigios de micelio aéreo rosáceo. Pigmento intenso marrón ámbar soluble.
Agar Penassay	Pobre desarrollo	Abundante desarrollo con su <u>su</u> perficie fina y lisa. Mice <u>u</u> lio vegetativo naranja claro. Sin micélio aéreo. Ves <u>u</u> tigios de pigmento soluble amarillo claro.
Agar de melaza de extracto de levadura	Pobre desarrollo áspero in <u>u</u> coloro a amarillento, micelio aéreo blancuzco. Pigmento so <u>u</u> luble ámbar intenso.	Abundante desarrollo con una superficie muy arrugada. Micelio vegetativo marrón quemado con cantos marrón na <u>u</u> ranga. Vestigios de micelio aéreo rosáceo. Pigmento solu <u>u</u> ble ocre amarillo intenso.
Agar de glucosa Czapek-Dox	Pobre desarrollo, fino e in <u>u</u> coloro a melón claro. Vesti <u>u</u> gios de micelio aéreo blanco rosáceo sin pigmento soluble.	Abundante desarrollo con su <u>su</u> perficie lisa. Micelio vege <u>u</u> tativo naranja claro. Sin micelio aéreo. Pigmento solu <u>u</u> ble amarillo limón claro.



T A B L A IV . (continuación)

Agar de papa	Pobre desarrollo, fino e incoloro. Vestigios de micelio aéreo blancuzco. Sin pigmento soluble.	Abundante desarrollo con <u>su</u> <u>perficie</u> lisa. Micelio <u>vege</u> <u>tativo</u> rosa ámbar.
Agar de asparagina de glucosa	Desarrollo regular con <u>super</u> <u>ficie</u> lisa. Fino micelio <u>vege</u> <u>tativo</u> de color rojo naranja claro y revés amarillento. Sin micelio aéreo. Algún pigmento soluble amarillo.	Abundante desarrollo con <u>su</u> <u>perficie</u> lisa. Micelio <u>vege</u> <u>tativo</u> naranja. Sin micelio aéreo. Vestigios de pigmento soluble amarillo limón.
Agar de asparagina (Medio No.3 Gottlieb y Shirling)	Desarrollo regular con <u>super</u> <u>ficie</u> lisa. Fino micelio <u>vege</u> <u>tativo</u> de color rojo naranja claro y revés amarillento. Sin micelio aéreo. Algún pigmento soluble amarillo claro.	Abundante desarrollo con <u>su</u> <u>perficie</u> fina y lisa. Mice- lio vegetativo naranja cla- ro. Sin micelio aéreo. Sin pigmento soluble.
Agar nutri- tivo	Desarrollo moderado con <u>super</u> <u>ficie</u> lisa; melón a naranja con revés naranja amarillento. Micelio aéreo blanco rojizo. Ausencia de pigmento soluble.	Abundante desarrollo con <u>su</u> <u>perficie</u> lisa. Micelio <u>vege</u> <u>tativo</u> naranja. Pigmento <u>sō</u> <u>luble</u> amarillo claro.

414444



T A B L A IV (continuación)

Agar de Pridham	Desarrollo moderado; liso incoloro con manchas rojo langosta. Micelio aéreo rojo. Sin pigmentación del medio.	Abundante desarrollo con su superficie lisa. Micelio vegetativo naranja claro con pequeños parches de color rojo de ladrillo. Vestigios de micelio aéreo rojo. Pigmento soluble amarillo.
Agar de almidón (Medio No.4 Gottlieb y Shirling).	Pobre desarrollo, incoloro a rojo naranja claro. Escaso micelio aéreo blanco. Hidrólisis del almidón: dudosa.	Abundante desarrollo con su superficie lisa. Micelio vegetativo naranja intenso con matiz morenucho. Abundante micelio aéreo rojo. Pigmento soluble amarillo cromo. Hidrólisis del almidón: negativa.
Agar de triptona de dextrosa	Abundante desarrollo, rojo naranja con amarillo oro a naranja en el revés.	Abundante desarrollo con su superficie arrugada. Micelio vegetativo naranja. Sin micelio aéreo. Pigmento soluble amarillo.
Agar de cobalto Hickey y Tresner	Desarrollo moderado, hialina a naranja rojizo claro. Algún micelio aéreo rojizo. Algún pigmento soluble amarillento.	Abundante desarrollo con su superficie lisa. Micelio vegetativo rosa ámbar. Vestigios de micelio aéreo rojizo. Pigmento soluble rosa ámbar.

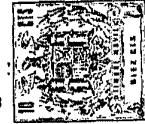
414444



T A B L A IV

(continuación)

<p>Agar de <u>ti</u> rosina (Me dio No. 7 Gottlieb y Shirling).</p>	<p>Pobre desarrollo</p>	<p>Abundante desarrollo con su perficie arrugada. Micelio vegetativo naranja intenso con matiz morenucho. Mice- lio aéreo ausente. Pigmento soluble amarillo. Reacción de tirosinasa: fuertemente positiva.</p>
<p>Agar Ca malate</p>	<p>Desarrollo regular, incoloro. Micelio aéreo blancuzco con matiz rojo. Sin pigmento so- luble. Digestión parcial de Ca malate.</p>	<p>Desarrollo regular con su- perficie lisa. Micelio vege- tativo naranja claro. Sin micelio aéreo. Pigmento so- luble amarillo limón claro. Escasa digestión de Ca malate</p>
<p>Gelatina</p>	<p>Sin pigmentación. Liquefacción: lenta e incom- pleta.</p>	<p>Sin pigmentación. Liquefacción: positiva.</p>
<p>Caldo de nitrato</p>	<p>Desarrollo superficial con micelio aéreo rojo. Sin reduc- ción a nitritos. Caldo se vuel- ve amarillento.</p>	<p>Desarrollo superficial con micelio aéreo rojizo. Reduc- ción de nitratos. Caldo se - vuelve amarillento.</p>
<p>Leche tornasol</p>	<p>Sin peptonización o coagula- ción. Leve reacción alcalina.</p>	<p>Sin coagulación, sin peptoni- zación.</p>



T A B L A IV (continuación)

<p>Agar de <u>le</u> che desna- tada</p>	<p>Abundante desarrollo con su- perficie lisa. Micelio vege- tativo naranja. Hidrólisis de caseína: positiva. Micelio aé- reo rojo. Sin pigmento soluble.</p>	<p>Abundante desarrollo con su- perficie lisa. Micelio vege- tativo naranja. Pigmento so- luble amarillo oro. Sin mico- lio aéreo. Hidrólisis de ca- seína: fuertemente positiva.</p>
<p>Agar de hierro de extracto de levadu- ra de pep- tona. (Me- dio No.6 Gottlieb y Shirling)</p>	<p>Desarrollo moderado con super- ficie lisa. Micelio vegetati- vo incoloro. Vestigios de mi- celio aéreo blancuzco. Sin pigmento soluble. Producción H₂S: negativa.</p>	<p>Desarrollo moderado con su- perficie fina y lisa. Mice- lio vegetativo incoloro. Sin micelio aéreo. Sin pigmento soluble. Producción H₂S: ne- gativa</p>

La determinación del color se realizó usando el método de Maerz y Paul.

(A Dictionary of colour, McGraw-Hill, Inc., Nueva York 1950).

N O T A

Descrita suficientemente la naturaleza del inven-
to, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe
hacerse constar que las disposiciones anteriormente citadas
son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no

Handwritten signature or initials.



alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento se refiere a una solicitud de Patente presentada en Italia, bajo el número 23926 A/72, de 5 de mayo de 1972, acogándose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE RIFAMICINA B POR FERMENTACION; caracterizándose por lo siguiente:

5.

10.

15.

20.

25.

1ª.- Procedimiento para la producción de rifamicina B por fermentación, caracterizado porque una cepa mutante seleccionada de *Streptomyces mediterranei* M 18 ATCC 21789 y sus equivalentes se fermenta, en condiciones aeróbicas y en un medio nutritivo acuoso que contiene una fuente de carbono asimilable, una fuente de nitrógeno asimilable y sales minerales esenciales, hasta que el medio acusa una substancial actividad antibiótica y se aísla rifamicina B del medio.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la fermentación se lleva a cabo en ausencia de inhibidores de la formación de rifamicinas A, C, D y E.

3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª y 2ª, caracterizado porque la fermentación se lleva a cabo en ausencia de ácido dietilbarbitúrico y sus análogos.

4ª.- Procedimiento para la producción de rifamicina B por fermentación, tal y como queda substancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de catorce hojas, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, - 5 Mayo 1973
GRUPPO LEPETIT S.p.A.

CONSEJO DE ADMINISTRACION
Presidente: L. Costa Ferrández