

REF.: X-3683 SPAIN

417327

14 NOV



Int. CIA: C07G

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: ELI LILLY AND COMPANY

RESIDENCIA: 307 East McCarty Street, INDIANAPOLIS,

Indiana, U.S.A.

ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL

ANTIBIOTICO A-2315

Prioridad: Patente estadounidense n.º 276.546 del 31-7-72

417327

NOV 1971



1 Esta invención se refiere a un procedimiento para la producción de una nueva sustancia antibiótica. En especial, esta invención se refiere al antibiótico nitrogenado neutro, arbitrariamente denominado aquí antibiótico A-2315.

5 El antibiótico A-2315 se produce cultivando el Actinoplanes philippinensis NRRL 5462 recién caracterizado, bajo condiciones de fermentación aerobia sumergida, hasta que se ha producido una cantidad sustancial de actividad antibiótica. El antibiótico es aislado del caldo de fermentación
10 filtrado como sólido amorfo, preferiblemente por extracción con un disolvente orgánico y purificación por cromatografía de columna sobre alúmina activada o gel de sílice. El antibiótico A-2315 es un agente antibacteriano útil, especialmente contra los estreptococos Gram-positivos. En un aspecto, el
15 antibiótico A-2315 es eficaz para inhibir los organismos responsables de la caries dental y de las enfermedades periodontales. El antibiótico A-2315 también provoca el desarrollo cuando se incorpora a la dieta del ganado aviar; además, es un agente fungicida de las plantas.

20 El antibiótico A-2315 es un sólido amorfo, blanco, con un peso molecular de 503,2638, determinado por el espectro de masas y el siguiente análisis elemental: 61,51 % de carbono, 7,51 % de hidrógeno, 8,69 % de nitrógeno y 21,53 % de oxígeno. Basándose en su análisis elemental y en el peso
25 molecular, se atribuye al A-2315 la fórmula empírica $C_{26}H_{37}N_3O_7$. La valoración electrométrica del A-2315 en dimetilformamida al 66 % en agua no indica la presencia de grupos valorables. La rotación específica del antibiótico A-2315 es -132° cuando se determina a una temperatura de $27^\circ C$ en
30 metanol, donde la concentración del antibiótico es de 0,375 %



417327

1 en peso/volumen.

5 La curva de absorción infrarroja del A-2315 en cloroformo se encuentra en el gráfico que acompaña a esta memoria. Se observan los siguientes máximos de absorción distinguibles (d = débil; m = medio; i = intenso): 2,81 (d), 2,99 (d-m), 3,38 (m), 5,82 (m), 6,02 (i), 6,20 (d), 6,30 (m), 6,40 (d), 6,66 (m-i), 6,82 (d), 6,94 (d-m), 7,05 (d), 7,30 (d-m), 7,71 (d), 8,88 (d-m), 9,11 (d-m), 10,41 (m), 10,89 (d-m), 11,14 (d-m) micras.

10 El espectro de absorción ultravioleta del antibiótico A-2315 en etanol al 95 % presenta un máximo de absorción a 214 mμ (ε 40.200) con un índice de absorción ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$) de 799.

15 El antibiótico A-2315 es soluble en metanol, etanol, alcoholes superiores y la mayoría de los disolventes orgánicos, pero solo es ligeramente soluble en agua. En los sistemas de cromatografía en papel indicados a continuación, empleando Sarcina lutea como organismo detector, el antibiótico A-2315 presenta los siguientes valores Rf:

Valor Rf	Sistema disolvente
0,19	Metil-etil-cetona (MEC) : benceno : agua (1:5:1) capa superior
0,91	Butanol saturado con agua
0,91	Butanol saturado con agua más 2 % de ácido p-toluensulfónico (p-TSA)
25 0,56	Metil-isobutil-cetona (MIBC), saturada con agua
0,60	MIBC saturada con agua más 2 % de p-TSA
0,83	Agua : metanol : acetona (12:3:1), ajustada a pH 10,5 con NH ₄ OH y después bajada a pH 7,5 con H ₃ PO ₄
30 0,75	1 % MIBC, 0,5 % NH ₄ OH en agua

174 NOV 1970

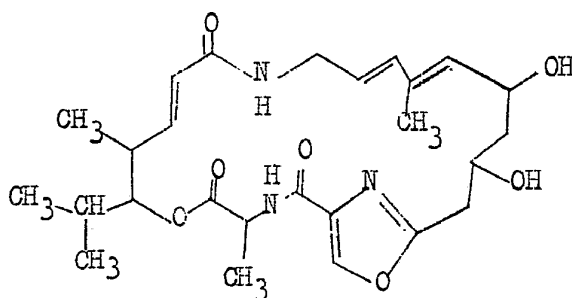


417327

Valor Rf	Sistema disolvente
0,72	17,4 g K ₂ HPO ₄ , 30 ml de etanol por litro de agua
0,65	7 % NaCl más 2,5 % MEC en agua
0,84	Propanol : agua (1:9)
0,90	Butanol : etanol : agua (13,5:15:150).

Cuando se somete al análisis de aminoácidos, el antibiótico A2315 libera una gran cantidad de alanina. El antibiótico A-2315 contiene dos grupos hidroxilo y es capaz de formar derivados ésteres de forma convencional, por ejemplo por acetilación con anhídrido acético en piridina. Estos ésteres también son útiles como antibióticos.

Basándose en los datos físicos observados y en los estudios de elucidación de la estructura, puede proyectarse un intento de estructura del A-2315. Sin embargo, la estructura no ha sido determinada con certeza y debe sobreentenderse que la estructura aquí presentada representa simplemente una hipótesis de trabajo. Se postula la siguiente estructura para el antibiótico A-2315:



El antibiótico A-2315 ejerce una acción inhibitoria contra el crecimiento de ciertos microorganismos. Los niveles a los cuales el antibiótico A-2315 inhibe el crecimiento de los organismos fueron determinados utilizando diversos procedimientos de ensayo.



417327

1 Procedimiento de selección de disco-placa

5 Se emplearon unas placas de ágar, inoculadas con el organismo de ensayo; unos discos de 6 mm (0,02 ml de capacidad) se saturan mediante diluciones log 2 de la solución de antibiótico. El contenido del disco es 1/50 de la concentración de la solución empleada, es decir, a partir de una solución a una concentración de 1500 µg/ml se obtiene un contenido en el disco de 30 µg.

10 Los resultados obtenidos para los ensayos de disco-placa del antibiótico A-2315 se encuentran en la Tabla I.

TABLA I

Actividad en disco-placa del A-2315

	<u>Organismo de ensayo</u>	<u>Concentración mínima de inhibición, CMI (µg/disco)</u>
15	<u>Staphylococcus aureus</u> 3055 ^x	0,025
	<u>Staphylococcus aureus</u> 3130 ^{xy}	0,2
	<u>Staphylococcus aureus</u> 3074 ^{xy}	0,4
	<u>Mycobacterium avium</u>	3,13
	<u>Streptococcus pyogenes</u>	0,012
20	<u>Bacillus subtilis</u>	50,0
	<u>Sarcina lutea</u>	0,008
	<u>Proteus</u> sp.	100,0
	<u>Escherichia coli</u>	12,5
	<u>Salmonella typhimurium</u>	12,5
25	<u>Salmonella typhosa</u>	12,5
	<u>Shigella flexneri</u>	1,56
	<u>Klebsiella pneumoniae</u>	12,5
	<u>Klebsiella pneumoniae</u>	50,0
	<u>Candida albicans</u>	100,0
30	<u>Saccharomyces pastorianus</u>	>100,0



417327

TABLA I (continuación)

1

Organismo de ensayo	Concentración mínima de inhibición, CMI (ug/disco)
---------------------	--

5

<u>Trichophyton mentagrophytes</u>	>100,0
<u>Fusarium moniliforme</u>	>100,0
<u>Neurospora sp.</u>	>100,0

10

- x Susceptible a la bencilpenicilina
- xx Resistente a la bencilpenicilina
- xxx Resistente a la bencilpenicilina y resistente a la metilcilina.

15

Los resultados de los ensayos de confirmación de la susceptibilidad por dilución del caldo del antibiótico A-2315 frente a organismos patógenos Gram-positivos, antes de su empleo en la terapia de infecciones experimentales en ratones, se encuentran compendiados en la Tabla II.

TABLA II

Susceptibilidad a la dilución del caldo del A-2315

20

Organismo de ensayo	CMI (ug/ml)
<u>Staphylococcus aureus</u> 3055 ^x	3,13
<u>Streptococcus pyogenes</u> C203 ^x	0,4
<u>Diplococcus pneumoniae</u> Park I	25,0

25

- x Susceptible a la bencilpenicilina.

30

Cuando el antibiótico A-2315 se administra por inyección subcutánea a unos ratones, presenta una acción antimicrobiana in vivo sobre las infecciones bacterianas experimentales. Como se administran dos dosis de A-2315 a ratones en infecciones representativas, los valores de la DE₅₀ (dosis efectiva para proteger al 50 % de los animales experimen



417327

1 tales; véase Warren Wick y colaboradores, J. Bacteriol. 81, 233-235 (1961)) son los siguientes:

	<u>Staphylococcus aureus</u> 3055	90 mg/kg
	<u>Streptococcus pyogenes</u>	83 mg/kg
5	<u>Diplococcus pneumoniae</u> (Park I)	>166 mg/kg

La toxicidad aguda del antibiótico A-2315, administrado por vía oral o subcutánea a ratones, expresada como DL₀, es superior a 500 mg/kg. La toxicidad aguda del A-2315, administrada intraperitonealmente a ratones, expresada como DL₅₀, es superior a 400 mg/kg.

Otra propiedad útil del antibiótico A-2315 es su actividad contra el Mycoplasma gallisepticum, un organismo patógeno del ganado aviar. De especial interés es la actividad del A-2315 contra variedades de este organismo que son resistentes a la tilosina. Las concentraciones mínimas de inhibición, determinadas por estudios de dilución de caldo in vitro, están compendiadas en la siguiente Tabla III.

TABLA III

Sensibilidad del micoplasma gallisepticum (MG) al A-2315

<u>Aislado de MG</u>	<u>CMI (µg/ml)</u>
34159 (resistente a la tilosina)	0,195
41313 (resistente a la tilosina)	0,78
42854 (resistente a la tilosina)	0,195
43480 (resistente a la tilosina)	<0,097
38502 (sensible a la tilosina)	<0,097

Otras evaluaciones del antibiótico A-2315 en pollitos infectados con Mycoplasma gallisepticum indican cierto aumento del peso y una menor incidencia de las lesiones en el saco de aire en los pollitos supervivientes. El antibiótico se preparó en polietilenglicol 200 y se inyectó subcutá-



417327

1 neamente en el cuello. No se observó ningún indicio de toxicidad, excepto una ligera hemorragia en la zona del cuello en algunos de los pollitos tratados que murieron pronto. Los resultados de este ensayo se encuentran en la Tabla IV.

5

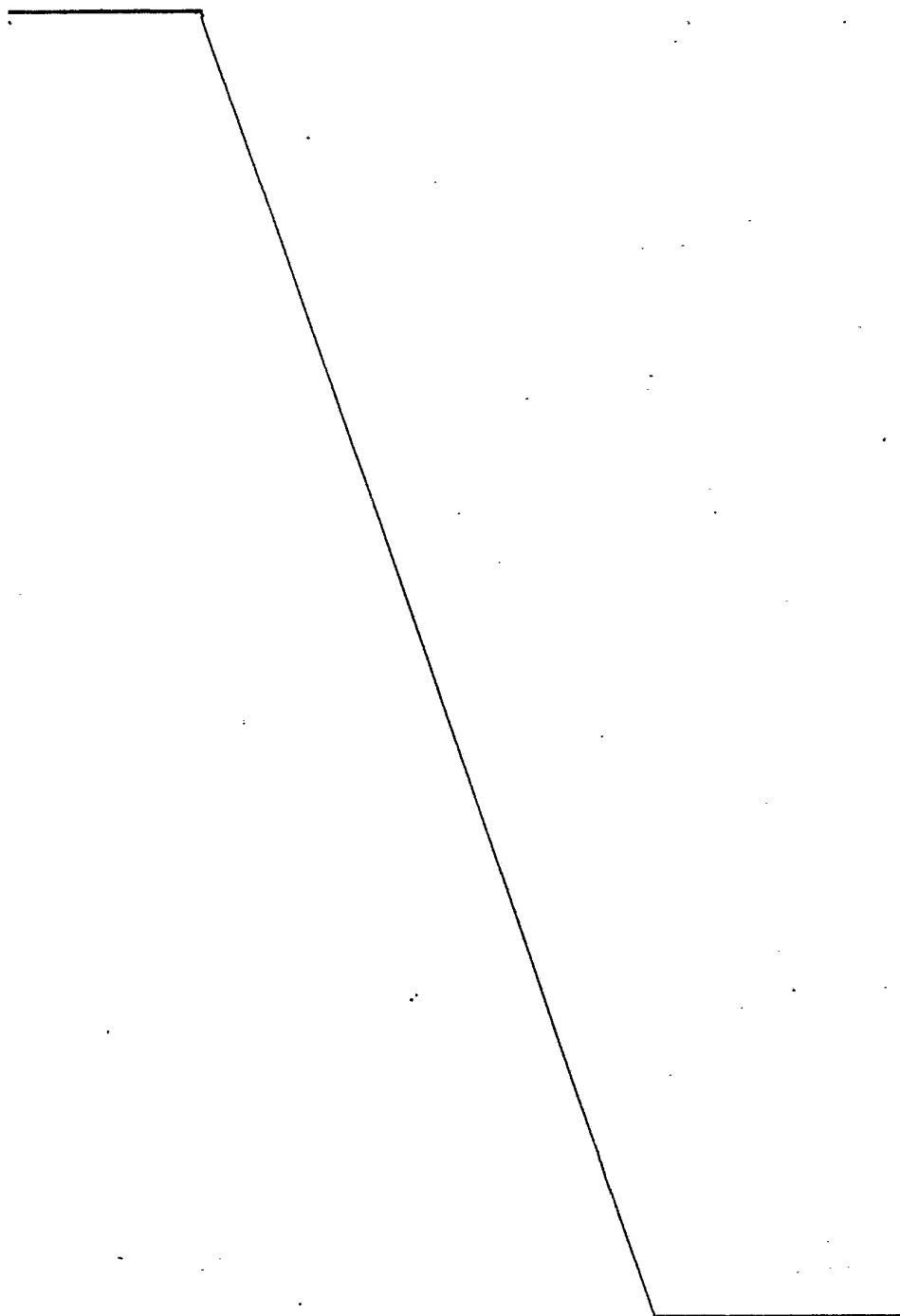
10

15

20

25

30



417327

417327

TABLA IV

Actividad del A-2315 en pollos embrionarios infectados con micoplasma gallisepticum

Grupos de tratamiento	Pollitos muertos		Supervivientes ^a	
	Número de muertes Número en el grupo	Lesiones en el saco de aire	Peso medio	Lesiones en el saco de aire
Controles infectados	13/20	11/13 ^b	100 g	7/7
Controles normales	0/20	-	214 g	0/20
A-2315 (3 mg/pollito)	12/20	9/9 ^c	133 g	0/8

a Datos recogidos a los 14 días

b 2/13 no examinados debido a la descomposición

c 3/3 no examinados debido a la descomposición

1

5

10

15

20

25

50

417327

Actividad del A-2315 en pol

1

5

Grupos de tratamiento

Númer
Númer

Controles infectados

Controles normales

A-2315 (3 mg/pollito)

10

a Datos recogidos a los 14 días

b 2/13 no examinados debido a la descomposi

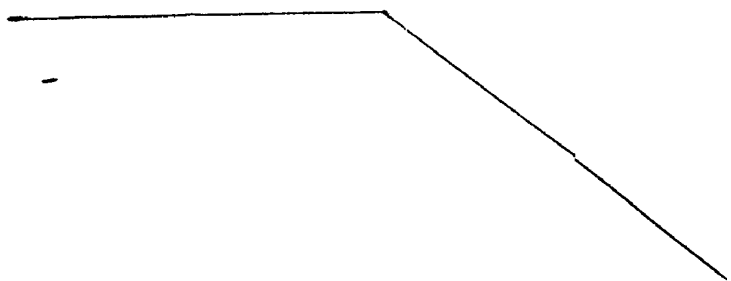
c 3/9 no examinados debido a la descomposic

15

20

25

30



7327

TABLA IV

LA M...
417327



L A-2315 en pollos embrionarios infectados con micoplasma gallisepticum

<u>Pollitos muertos</u>		<u>Supervivientes^a</u>		
<u>Número de muertes</u> <u>Número en el grupo</u>	<u>Lesiones en el</u> <u>saco de aire</u>	<u>Peso</u> <u>medio</u>	<u>Lesiones en el</u> <u>saco de aire</u>	<u>Anticuerpos</u> <u>MG</u>
13/20	11/13 ^b	100 g	7/7	7/7
0/20	-	214 g	0/20	0/20
12/20	9/9 ^c	133 g	0/8	8/8

ías

a la descomposición

. la descomposición



417327

1 Por lo tanto, en una realización esta invención
proporciona un agente útil contra los Mycoplasma resistentes
en el ganado aviar. La protección contra el Mycoplasma se
obtiene cuando el antibiótico A-2315 se administra por vía
5 parenteral u oral a los animales a unas dosis comprendidas
aproximadamente entre 50 y 500 mg/kg de peso corporal del ani-
mal. Cuando se utilizan para comunicar una protección profi-
láctica o terapéutica contra esta enfermedad del aparato res-
piratorio, se incorpora convenientemente una concentración
10 adecuada del antibiótico A-2315 a la ración de pienso normal
de los animales.

En otro aspecto de esta invención, el antibiótico
A-2315 es capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos
que contribuyen al desarrollo de la enfermedad periodon-
15 tal. En ensayos de dilución del caldo, el A-2315 inhibe el
crecimiento del organismo cariogénico Streptococcus mutans
a concentraciones de 1-2 µg/ml e inhibe el crecimiento de las
varillas filamentosas cariogénicas a una concentración tan
baja como 0,1 µg/ml.

20 Una solución del antibiótico A-2315 presenta acti-
vidad inhibitoria contra los organismos cariogénicos como
ilustra el siguiente sistema de ensayo: Unos tubos de caldo
nutritivo que contienen 5 % de sacarosa son inoculados con
microorganismos cariogénicos. En los tubos se insertan unas
25 varillas de vidrio estrechas, que se prolongan por debajo de
la superficie del caldo nutritivo. Después de cultivar a 37°C
durante la noche, se forma una capa de placas artificiales
(fundamentalmente células y dextrano) sobre la superficie de
las varillas. Después estas últimas se transfieren a solucio-
30 nes que contienen concentraciones variables de A-2315 y se



417327

1 dejan permanecer en contacto con las soluciones de antibióti-
co durante periodos de 5, 10 y 15 minutos. Después de haber
transcurrido el tiempo apropiado, las varillas se lavan su-
mergiéndolas en agua desionizada estéril; a continuación las
5 varillas se incuban durante la noche a 37°C en un medio no
inoculado que contiene sacarosa y azul de bromotimol. El cre-
cimiento se detecta observando el cambio de color del azul
de bromotimol de verde a amarillo, debido a la producción de
ácido por los organismos cuando se desarrollan en un medio
10 que contiene sacarosa. Un crecimiento nulo indica que el an-
tibiótico ha destruido al organismo.

Utilizando este ensayo, una solución de antibió-
tico A-2315 a una concentración de 0,1 % es eficaz contra un
Streptococcus sp. cariogénico cuando la solución se pone en
15 contacto con las placas incrustadas en las varillas durante
5 minutos solamente. Debido a su actividad contra los orga-
nismos cariogénicos y contra los organismos implicados en
la enfermedad periodontal, el antibiótico A-2315 es adecua-
do para incorporarlo, a concentraciones inhibitorias, a los
20 preparados empleados en la higiene oral, como pastas dentí-
fricas, polvos o geles, enjuagues bucales y similares. En
general, los preparados que contienen alrededor de 1 a 15 %
de A-2315 son útiles para el control de los organismos cario-
génicos.

25 Todavía otra propiedad útil del antibiótico A-
2315 es su capacidad para aumentar el desarrollo de los ani-
males. Cuando el A-2315 se agrega a la dieta de unos pollos
de cría a un nivel de 45,4 g/tonelada, el aumento medio de
peso después de 10 días es de 159 g, en comparación con un
30 aumento medio de peso de 148 g para el grupo de control. La



417327

1 eficacia de conversión de alimento (alimento/aumento de peso) para los pollitos que reciben el antibiótico A-2315 es 1,44; por el contrario, la eficacia de conversión del alimento para el grupo de control es de 1,53.

5 La capacidad del antibiótico A-2315 para estimular el aumento de peso lo hace especialmente útil para este fin. Cuando se utiliza como agente promotor del crecimiento, las concentraciones adecuadas del antibiótico se incorporan convenientemente a la ración de pienso normal de los animales. El antibiótico A-2315 es típicamente un eficaz agente
10 promotor del crecimiento cuando se administra a los animales a niveles de 20 a 50 g/tonelada de la ración alimenticia, aproximadamente.

15 Todavía en otro aspecto de la invención, el antibiótico A-2315 es útil como agente fungicida de las plantas. A concentraciones de 400 ppm, el antibiótico A-2315 protege a las plantas de judía que han sido inoculadas con la roña de la judía (Uromyces phaseoli var. typica) y comunican una protección moderada a las plantas de pepino que han sido inoculadas con antracnosis (Colletotrichum lagenarium). En cualquier caso se observa solamente una ligera fitotoxicidad.
20

25 Para proteger las plantas, puede aplicarse una cantidad fungicidamente eficaz del antibiótico A-2315 por diversos métodos, por ejemplo, en forma de pulverizaciones líquidas o espolvoreo de polvos, empleando disolventes, vehículos, emulgentes, agentes humectantes o agentes tensoactivos adecuados, según sean necesarios. Aunque deben considerarse las condiciones individuales, el A-2315 es típicamente útil en el control de los hongos cuando se administra a las plantas en
30 proporciones que oscilan entre 200 y 500 ppm aproximadamente.



417327

1

Como resulta evidente de las propiedades citadas, el antibiótico A-2315 es útil para suprimir el desarrollo de los organismos patógenos. Además de las aplicaciones anteriores, las soluciones que contienen solamente 2 % del antibiótico son útiles para desinfectar el material de vidrio, los instrumentos quirúrgicos y dentales y las superficies como paredes, suelos y mesas en las zonas donde es importante el mantenimiento de condiciones estériles, por ejemplo en hospitales, zonas de preparación de alimentos y similares.

5

10

El nuevo antibiótico de esta invención es producido cultivando una variedad productora de A-2315 de un organismo Actinoplanes, bajo condiciones aerobias sumergidas, en un medio de cultivo adecuado hasta que el medio de cultivo contiene una actividad antibiótica sustancial. El antibiótico es recuperado empleando diversos procedimientos de aislamiento y purificación comúnmente utilizados y conocidos en la técnica.

15

20

El microorganismo útil para la preparación del antibiótico A-2315 ha sido caracterizado taxonómicamente como una nueva variedad de Actinoplanes philippinensis Couch. El género Actinoplanes es un miembro de la familia Actinoplanaceae, una familia de microorganismos del orden Actinomycetales. La familia de Actinoplanaceae fué descrita por primera vez por Couch (J. Elisha Mitchell Sci. Soc., 65, 315-318 (1949); ibid. 66, 87-92 (1950); Trans. New York Acad. Sci., 16, 315-318 (1954); J. Elisha Mitchell Sci. Soc., 71, 148-155 y 269 (1955); "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" séptima edición, 825-829 (1957); J. Elisha Mitchell Sci. Soc., 79, 53-70 (1963) .

25

30

Los métodos empleados en los estudios taxonómicos



417327

1 de la variedad de actinoplanes productora de A-2315 son si-
milares a los recomendados por el International Streptomyces
Project junto con otros ensayos suplementarios comúnmente
empleados en taxonomía [E.B. Shirling y D. Gottlieb: "Me-
5 thods for Characterization of Streptomyces Species." Inter-
national Bull. Systemic Bacteriol., 16, 313-340 (1966)].

MORFOLOGIA

Micelio vegetativo

10 Las hifas sobre medios sintéticos y semisintéticos
de ágar son al principio cortas, ligeramente ramificadas,
septadas y con un diámetro de 0,2 a 1,2 μ m. Al cabo de unas
2 semanas, las colonias pueden estar constituidas por masas
bien definidas de hifas verticales que surgen de extensas
hifas de substrato enterradas más profundamente en el medio
15 de ágar; o, alternativamente, pueden estar constituidas por
masas ligeramente mucoidales de hifas más cortas que oscure-
cen las hifas verticales. En las colonias con una masa bien
definida de hifas verticales, los micelios forman un creci-
miento coriáceo compacto y ligeramente levantado. En las colo-
20 nias con las hifas más cortas, los micelios forman un cre-
cimiento predominantemente en forma de cúpula. En ningún me-
dio se producen hifas aéreas. Los esporangios son producidos
en grandes números sobre la superficie de las colonias en
forma de cúpula.

25 Esporangios

Los esporangios se forman en abundancia sobre
ágar semisintético Anio-Henssen. Aparecen al cabo de unas
2 a 4 semanas de incubación a 17-19°C. Los esporangios se
encuentran por unidades sobre esporangioforos muy cortos
30 (porción terminal de las hifas sobre la superficie del ágar).



417327

1 Los esporangios pueden ser esféricos, subesféricos o ligera-
mente en forma de ubanico y son relativamente pequeños, con
diámetros de 4 a 10 μ m. Los esporangios contienen de 20 a 40
5 esporangiosporas subesféricas que están dispuestas en una o
más espirales indistintas en los esporangios. Las esporangios-
poras tienen un diámetro de aproximadamente 1,0 μ m cuando es-
tán maduras. La dehiscencia esporangial parece ser por desin-
tegración completa o parcial del esporangio. Diez o quince
10 minutos después de haber sido colocados en agua, los esporan-
gios comienzan a hincharse hasta una forma esférica típica
y después a liberar esporas por desintegración de la pared.
Las esporas habitualmente no son movibles inmediatamente pe-
ro se vuelven muy movibles mediante unos flagelos polares
en unos 5 minutos.

15 ASEPECTO SOBRE LOS DIVERSOS MEDIOS

Agar solución de Czapek:

Buen crecimiento; un inoculum puntual produce una
colonia de unos 0,75 cm de diámetro en 4 semanas. No se ob-
servan hifas aéreas. La colonia es generalmente aplastada
20 con un ligero pico central. El color de la colonia es un na-
ranja moderado. Los esporangios se observan solo raras veces.

Agar peptona-solución de Czapek:

Buen crecimiento; un inoculum puntual produce una
colonia de 1,0 cm de diámetro aproximadamente, en 4 semanas.
25 No se observan hifas aéreas. La colonia está ligeramente ele-
vada y algo convolutada o irregular. El color de la colonia
es un castaño rojizo a castaño anaranjado mate. No se produ-
cen esporangios.

30 Agar Anio-Henssen:

Crecimiento medio; un inoculum puntual produce

417327



1 una colonia de unos 0,5 cm de diámetro en 4 semanas. No se observan hifas aéreas. La colonia forma un montón con una depresión o hendidura central redonda, cruciforme o estrellada. El color de la colonia es de gris a blanco grisáceo mate. Los esporangios se forman en grandes números en las colonias incubadas a 17-19°C y en pequeños números en las colonias incubadas a temperaturas más altas.

5 Las características de cultivo en los diversos medios están descritas en la Tabla V. Las designaciones ICP se refieren a medios del International Streptomyces Project (Shirling y Gottlieb).

TABLA V

Características de cultivo del A-2315 sobre diversos medios

(Temperatura de incubación; 30°C)

Medio	Cantidad del micelio vegetativo	Color del reverso	
		Clave M P ^x Nombre ICNB ^{xx}	Pigmento soluble
Emerson	3+	13K8; castaño amarillento intenso	castaño
20 Glicerol-glicina	4+	9I8; naranja intenso	castaño, ligero
Glucosa-asparagina	3+	10F7; naranja moderado	ninguno
Sales inorgánicas-ágar almidón (ICP 4)	3+	12A8; naranja moderado	castaño, ligero
25 Glicerol-asparagina-ágar (ICP 5)	4+	12A9; naranja parduzco	ninguno
Malato cálcico	2+	44B1; gris rojizo	púrpura ligero
Bennett	3+	12C7; castaño claro	marrón, ligero
30 Agar harina de avena (ICP 3)	2+	44B1; gris rojizo	ninguno



417327

TABLA V (continuación)

1

5

10

15

20

25

30

Medio	Cantidad del micelio vegetativo	Clave M P ^x Nombre ICNB ^{xx}	Pigmento soluble
Agar extracto de levadura-extracto de malta (ICP 2)	3+	12D7; castaño claro	ninguno
Nutriente	1-2+	12E6; castaño amarillento claro	ninguno
Czapek	3+	11C9; naranja moderado	ninguno
Extracto de levadura	3+	12H7; beige amarillento	ninguno
Tirosina	1+	Ninguna asignación porque el reverso es pobre	ninguno
TPO	2-3+	12E7; castaño pálido	castaño

^x Remitimos a A. Maerz y M. Real Paul, "A Dictionary of Color", McGraw-Hill, New York, N.Y.

^{xx} "The ISCC-NBS Method of Designating Colors and a Dictionary of Color Names," National Bureau of Standards Circular 553, U.S. Government Printing Office.

QUIMICA DE LA PARED CELULAR

El Actinoplanes philippinensis NRRL 5462 posee una química de la pared celular muy similar a la del Actinoplanes philippinensis (Szanislo and Gooder, 1967). Los análisis automáticos de aminoácidos y aminoazúcares de los residuos de las paredes celulares que quedan después de 18 horas de hidrólisis con 1 ml de ácido clorhídrico 6 N a 100°C revela la presencia en las paredes de glucosamina, ácido murámico, glicina, alanina y ácido 2,6-diaminopimélico (DAP) en grandes concentraciones. El ácido 2,6-diamino-3-hidroxipimélico (HDAP) está notablemente ausente. Una comparación de los ami-

417327



1 noácidos de la pared celular del Actinoplanes philippinensis
NRRL 5462 y A. philippinensis (Szanişzlo) se presenta en la
Tabla VI.

TABLA VI

5 Relaciones molares^a de los aminoácidos principales de la pa-
red celular

<u>Organismo</u>	<u>Glutámico</u>	<u>Glicina</u>	<u>Alanina</u>	<u>HDAP</u>	<u>DAP</u>
<u>A. philippinensis</u> NRRL 5462	1,00	1,14	0,59	-	1,10
<u>A. philippinensis</u> (Szanişzlo y Gooder)	1,00	1,08	0,57	-	1,06

10

^a
El ácido glutámico se considera como unidad..

15

Los análisis cromatográficos en papel de los resi-
duos que quedan después de 2 horas de hidrólisis con 2 ml de
ácido sulfúrico 2 N a 100°C revelaron que los monosacáridos
glucosa, galactosa, manosa, arabinosa, xilosa y ramnosa se
encuentran en las paredes celulares en cantidades detecta-
bles. Estos azúcares también se encontraron en las paredes
celulares de A. philippinensis (Szanişzlo y Gooder).

20

Basándose en la descripción taxonómica precedente,
el organismo productor de A-2315 ha sido clasificado como una
nueva variedad de Actinoplanes philippinensis Couch. El culti-
vo aquí descrito difiere de la descripción publicada de esa
especie en que no produce esporangios sobre un medio de ágar
glucosa-asparagina; asimismo, se observan ligeras diferencias
de color en tres medios. Estas diferencias indican la diver-
sidad de variedades, pero no constituyen una diferencia de
especie.

25

30

El cultivo de Actinoplanes útil para la producción
del antibiótico A-2315 ha sido depositado sin restricción en



417327

1 cuanto a su asequibilidad y forma parte de la colección de
cultivos de reserva del Agricultural Research Service Northern
Marketing and Nutrition Research Division, Departamento de
Agricultura de Estados Unidos, Peoria, Illinois 61604, en el
5 que se encuentra disponible para el público bajo el número
NRRL 5462.

 Como se ha observado anteriormente, el Actinoplanes
philippinensis NRRL 5462 puede ser cultivado en un medio de
cultivo para producir el antibiótico A-2315. El medio de cul-
10 tivo puede ser uno cualquiera de diversos medios; sin embargo,
por razones de economía de producción, máximo rendimiento y
facilidad de aislamiento del antibiótico, se prefieren cier-
tos medios de cultivo. Así, por ejemplo, la glucosa es una
de las fuentes preferidas de hidratos de carbono y la harina
15 de soja es una de las fuentes preferidas de nitrógeno.

 Las sales inorgánicas nutritivas que han de incor-
porarse al medio de cultivo pueden ser las sales habituales
capaces de proporcionar sodio, potasio, amonio, calcio, fos-
fato, cloruro, sulfato, acetato, carbonato y iones similares.
20 Además, pueden incluirse con resultados beneficiosos fuentes
de factores de crecimiento como solubles de destilería y ex-
tractos de levadura.

 Como es necesario para el crecimiento y desarrollo
de otros microorganismos, también deben incluir elementos tra-
25 za esenciales en el medio de cultivo del Actinoplanes emplea-
do en esta invención. Estos elementos traza son suministrados
comúnmente como impurezas accidentales a la adición de los
otros constituyentes del medio.

 El pH inicial del medio de cultivo puede variar
30 entre amplios límites. Sin embargo, antes de inocular el orga



417327

1 nismo, es conveniente ajustar el pH del medio de cultivo a
un valor comprendido entre 6,5 y 7,3, según el medio particu-
lar empleado. El pH final está determinado, por lo menos en
5 parte, por el pH inicial del medio, por los reguladores pre-
sentes en el medio y por el periodo de tiempo durante el cual
se permite crecer al organismo.

Preferiblemente, se utiliza una fermentación aero-
bia sumergida en grandes tanques para la producción de canti-
dades sustanciales del antibiótico A-2315. Las cantidades pe-
10 queñas del antibiótico se obtienen por cultivo en matraces
sacudidos. Debido al tiempo muerto en la producción de anti-
bióticos comúnmente asociado a la inoculación de grandes tan-
ques con la forma de esporas del organismo, es preferible em-
plear un inoculum vegetativo. Este inoculum vegetativo se pre-
15 para inoculando un pequeño volumen del medio de cultivo con
la forma de esporas o fragmentos de micelio del organismo pa-
ra obtener un cultivo fresco y de crecimiento activo del or-
ganismo. El inoculum vegetativo se transfiere después a un
tanque mayor. El medio empleado para el crecimiento del ino-
20 culum vegetativo puede ser el medio empleado para las fermen-
taciones de mayor volumen, aunque también pueden utilizarse
otros medios.

El organismo productor de A-2315 puede ser culti-
vado a temperaturas comprendidas aproximadamente entre 20° y
25 40°C. Al parecer, la producción óptima de A-2315 tiene lugar
a una temperatura de unos 30°C.

Como es costumbre en los procesos de cultivo su-
mergido aerobio, se hace burbujear aire estéril a través del
medio de cultivo. Para un crecimiento del organismo y una
30 producción de A-2315 eficientes, el volumen de aire empleado



417327

1 en la producción en tanque de a-2315 es preferiblemente su-
perior a 0,1 volúmenes de aire por minuto por volumen de me-
dio de cultivo. El crecimiento óptimo se produce cuando el
5 volumen de aire empleado está comprendido entre 0,2 y 0,8 vo-
lúmenes de aire por minuto y por volumen de medio de cultivo.

La producción de antibiótico puede ser seguida du-
rante la fermentación determinando en unas muestras del caldo
la actividad antibiótica contra organismos conocidos por su
sensibilidad al antibiótico. Un organismo de ensayo útil en
10 la determinación del antibiótico de esta invención es el
Sarcina lutea. El bioensayo se realiza convenientemente me-
diante un disco de papel sobre placas de ágar.

Generalmente, la producción máxima del antibióti-
co ocurre dentro de 2 a 6 días en la fermentación en tanques
15 grandes o en matraces sacudidos. Comúnmente, se observa una
producción máxima de actividad antibiótica dentro de las 20
a las 96 horas.

El antibiótico A-2315 puede ser recuperado del me-
dio de cultivo y separado de otras sustancias que pueden en-
20 contrarse presentes por técnicas extractivas y adsorptivas.
Se prefieren los procesos extractivos para la recuperación
inicial de A-2315. El cloroformo es un disolvente adecuado
para separar el antibiótico del caldo de cultivo filtrado y
alcalinizado, aunque son satisfactorios otros disolventes co-
25 múnmente utilizados. Para purificar mejor el A-2315, pueden
emplearse ventajosamente procesos de adsorción y elución em-
pleando materiales adsorbentes, como carbón, resina de poli-
amida, gel de sílice, Sephadex LH-20, el adsorbente poliméri-
co Amberlite XAD y similares.

30 Esta invención es ilustrada además mediante los



417327

1 siguientes ejemplos, pero no pretendemos que quede limitada por los mismos.

EJEMPLO 1

A. Fermentación en matraces sacudidos de A-2315

5 Se prepara un cultivo de Actinoplanes philippinensis NRRL 5462 y se mantiene en un tubo inclinado de ágar con la siguiente composición:

<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidad</u>
Harina de avena seca precocida	60,0 g
10 Levadura de cerveza seca desamargada	2,5 g
K_2HPO_4	1,0 g
Material mineral de Czapek ^x	5,0 ml
Agar	25,0 g
Agua desionizada	1100,0 ml

15 ^x El material mineral de Czapek tiene la siguiente composición:

<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidad</u>
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (disuelto en 2 ml de HCl concentrado)	2,0 g
20 KCl	100,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	100,0 g
Agua desionizada c.s. hasta	1 litro

25 El pH del medio se ajusta entre 6,2 y 7,3 aproximadamente con solución de hidróxido sódico. Después de esterilizar en autoclave a 120°C durante unos 30 minutos y a una presión de 15-20 libras (1,0-1,4 kg/cm²), el pH del medio es 6,7.

30 El tubo inclinado se inocula con Actinoplanes philippinensis NRRL 5462 y se incuba a 30°C durante 10 a 14 días. El cultivo no esporula normalmente sobre este medio; por lo tanto, es necesario macerar la manta micelial con una



417327

1 aguja de inoculación aplastada y afilada para aumentar el
 número de centros de crecimiento potenciales. El cultivo ma-
 dura macerado se cubre con suero de buey y se rasca cuidado-
 samente con una varilla estéril para obtener una suspensión
 5 micelial. Esta suspensión se divide en seis tubos para su
 liofilización. Uno de los gránulos liofilizados se emplea
 para inocular 50 ml de un medio vegetativo con la siguiente
 composición:

<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad</u>
10 Glucosa	10,0 g
Almidón de patata	30,0 g
Harina de soja	20,0 g
Harina de semilla de algodón desengrasada	20,0 g
CaCO ₃	2,0 g
15 Agua corriente	1,1 litros

 El medio vegetativo inoculado, en un matraz de
 250 ml, se incuba a 30^oC durante 72 horas en un sacudidor
 rotatorio que opera a 250 rpm.

20 Se emplean 10 ml del medio vegetativo incubado
 para inocular 200 ml de un medio de cultivo vegetativo de
 segunda fase de la misma composición que el medio vegetativo
 antes descrito. Este medio de segunda fase, en un matraz de
 1 litro, se incuba a 30^oC durante 24 horas en un sacudidor
 rotatorio que funciona a 250 rpm.

25 B. Fermentación en tanque de A-2315

 El medio vegetativo de segunda fase (200 ml) pre-
 parado como se ha descrito antes se emplea para inocular 25
 litros de un medio de producción estéril de la siguiente com-
 posición:

30



417327

	<u>Ingrediente</u>	<u>Porcentaje</u>
1	Glucosa	1,0
	Almidón de patata	4,0
	Melaza	0,5
5	Peptona de carne soluble	4,0
	Caseína hidrolizada con enzima	0,4
	Harina de soja	1,0
	MgSO ₄	0,3
	CaCO ₃	0,2
10	Antiespumante (Dow Corning)	0,02
	Agua corriente c.s. hasta	25 litros

15 El pH del medio es 6,4 después de esterilizar en autoclave a 120° durante 30 minutos y a una presión de 15-20 libras (1,0-1,4 kg/cm²). En un tanque de fermentación de 40 litros se deja fermentar el medio de producción inoculado durante 4 días, a una temperatura de 30°C. El medio de fermentación es aireado con aire estéril a un caudal de medio volumen de aire por volumen de medio de cultivo por minuto. El medio de fermentación se agita con agitadores convencionales a 400 rpm.

20 C. Aislamiento de A-2315

25 Empleando un auxiliar de filtración, se filtra el caldo de fermentación completo de un tanque de 25 litros cultivado de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección anterior. El filtrado se ajusta a pH 1,5 con hidróxido sódico 2 N y la solución resultante se extrae con 2/3 volúmenes de cloroformo. El extracto clorofórmico se concentra a vacío hasta volumen reducido y se agrega lentamente y agitando sobre 20 volúmenes de éter de petróleo (Skellysolve F).

30 El precipitado se separa por filtración y se seca a vacío pa-

417327



1 ra dar 3,13 g de antibiótico crudo.

Este antibiótico crudo, disuelto en 100 ml de acetato de etilo, se aplica a una columna de 2 x 100 cm de alúmina básica (M. Woelm, Eschwege, Alemania). Después de lavar la
5 columna con 300 ml de acetato de etilo, por elución con acetato de etilo:etanol (19:1) se obtienen unas fracciones que contienen actividad A-2315. Estas fracciones se combinan y evaporan a sequedad bajo vacío. Una solución de residuo en una pequeña cantidad de cloroformo se agrega sobre 20 volúmenes de
10 éter de petróleo (Skellysolve F) para precipitar el material activo. El precipitado se separa por filtración y se seca a vacío para dar 1,63 g de antibiótico A-2315.

La elución de la actividad se controla mediante una determinación de disco de papel en placa de ágar, empleando
15 Sarcina lutea como organismo de ensayo y por cromatografía en capa fina sobre gel de sílice, empleando acetato de etilo:etanol (9:1) como sistema desarrollador y Sarcina lutea como organismo de la bioautografía; alternativamente, se emplean vapores de yodo o rociada con ácido sulfúrico para detectar
20 la actividad.

EJEMPLO 2

Purificación del antibiótico A-2315 empleando gel de sílice

Se sigue el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, Parte C, para aislar el antibiótico A-2315 hasta la precipitación con éter de petróleo para dar 5 g de producto crudo. Este
25 producto se disuelve en acetato de etilo (aproximadamente 10 ml) y metanol suficiente para producir una solución transparente. La solución resultante se agrega a una columna de 5 x 90 cm que contiene 300 g de gel de sílice (Merck), rellena en
30 acetato de etilo. Después la columna se lava con 2,5 litros



417327

NOV. 1954

1

de acetato de etilo para separar las impurezas. La actividad A-2315 se eluye de la columna con acetato de etilo:etanol (95:5). Estas fracciones activas se combinan y se concentran a sequedad bajo vacío para dar 2,0 g de A-2315 en forma de polvo blanco. Por elución con este sistema disolvente se obtienen 0,8 g adicionales de A-2315 en forma de polvo amarillo pálido.

5

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

REIVINDICACIONES

10

1. Un procedimiento para la producción del antibiótico A-2315, antibiótico que es un sólido amorfo blanco con una rotación específica $[\alpha]_D^{27} = -132$ (c = 0,375 en metanol); con una composición elemental aproximada de 61,51 % de carbono, 7,51 % de hidrógeno, 8,69 % de nitrógeno y 21,53 % de oxígeno; con un peso molecular aproximado de 503, determinado por espectrometría de masas; con la fórmula empírica $C_{26}H_{37}N_3O_7$; que presenta en cloroformo las siguientes bandas distinguibles en su espectro de absorción infrarrojo: 2,81, 2,99, 3,38, 5,82, 6,02, 6,20, 6,30, 6,40, 6,66, 6,82, 6,94, 7,05, 7,30, 7,71, 8,88, 9,11, 10,41, 10,89 y 11,14 micras; que en solución en etanol al 95 ; presenta un máximo de absorción ultravioleta a 214 μ con un valor de la absorbividad ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$) de 799 aproximadamente; que es soluble en metanol y etanol pero sólo es ligeramente soluble en agua, que libera alanina en el análisis de aminoácidos; y contiene grupos hidroxilo susceptibles de esterificación; cuyo procedimiento se caracteriza por cultivar Actinoplanes philippinensis NRRL 5462 en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgá-

15

20

25

30



417327

1

nicas, en condiciones aerobias sumergidas, hasta que es producida una cantidad sustancial de antibiótico A-2315 por el citado organismo en dicho medio de cultivo.

5

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, caracterizado por recuperar el antibiótico A-2315 del medio de cultivo.

3. Se reivindica por último como objeto que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL ANTIBIOTICO A-2315.

10

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria descriptiva que consta de veintisiete páginas mecanografiadas.

Madrid, 27 de Julio 1.973

15

BERNARDO UNGRIA

D.P.

20

25

30

SPAIN

ELI LILLY AND COMPANY

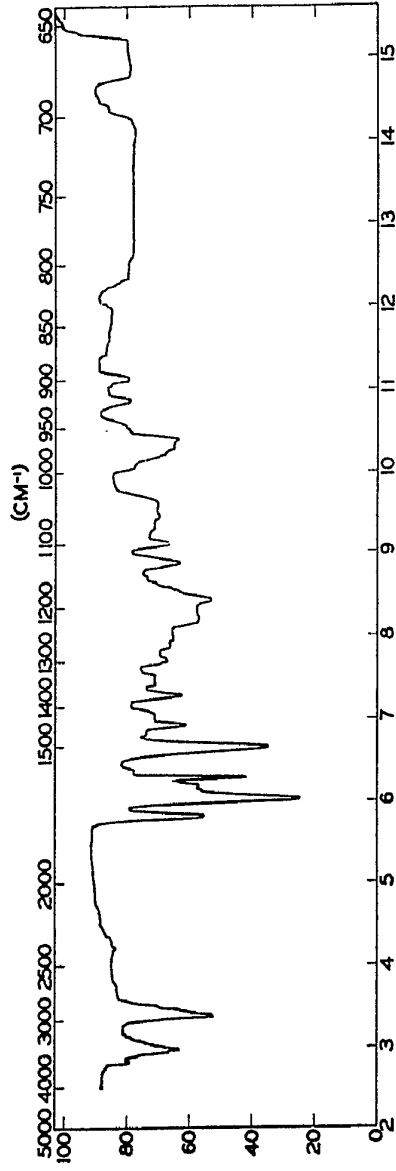
UNICA HOJA



417327

417327

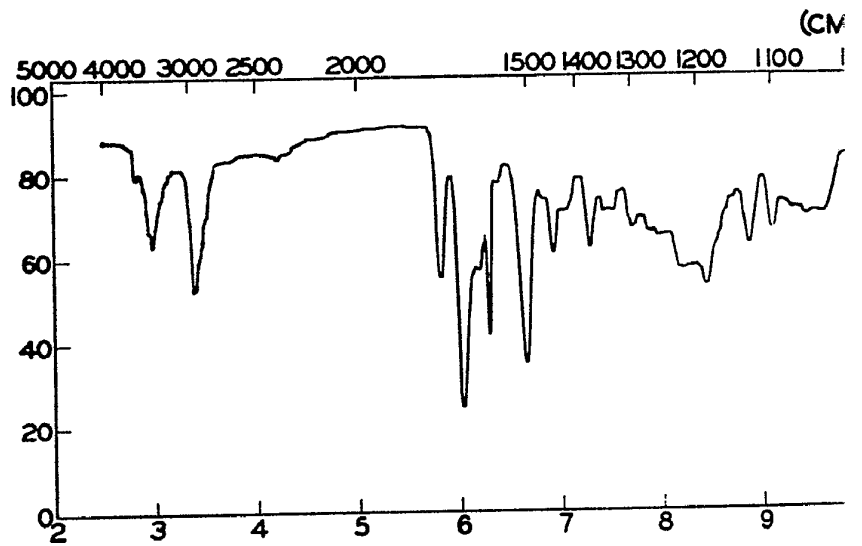
A 2315

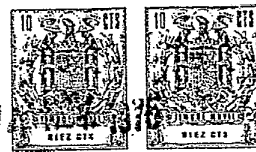


ESCALA VARIABLE
 MADRID, 27 Julio DE 19 25
 BARCELONA URGENTIA
 P. R.

ELI LILLY AND COMPANY

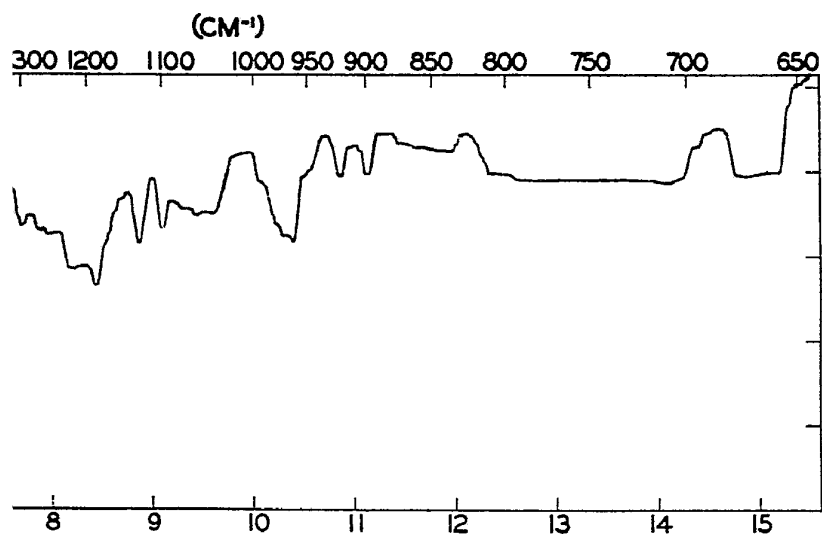
417327





417327

A 2315



ESCALA VARIABLE
MADRID, 27 Julio DE 1973
BERNARDO UNGRÍA
P. P.